

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

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

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

**Adulte Neurogenese im Gyrus dentatus der Ratte
28 Tage nach inkompletter globaler zerebraler Ischämie und Reperfusion
und deren Beeinflussung durch S(+)-Ketamin**

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

von
Birgit Kaepfel
aus
Augsburg

München, Juli 2005

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. A. Höflich

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	3
2.1	Zentrales Nervensystem	3
2.1.1	Anatomie des Gehirns	3
2.1.2	Allgemeine Histologie des Nervensystems	4
2.1.3	Blutversorgung des Gehirns	4
2.1.4	Gehirnstoffwechsel	5
2.1.5	Der Hippokampus	6
2.2	Zerebrale Ischämie	8
2.2.1	Definition der zerebralen Ischämie	8
2.2.2	Formen der zerebralen Ischämie	8
2.2.3	Pathophysiologie	9
2.2.4	Tiermodelle der zerebralen Ischämie	12
2.3	Stammzellen	16
2.3.1	Definitionen	16
2.3.1.1	Embryonale Stammzellen	16
2.3.1.2	Adulte Stammzellen	17
2.3.2	Neuronale Stammzellen, adulte Neurogenese	18
2.3.2.1.1	Einflussfaktoren auf die endogene Neurogenese	22
2.3.2.1.2	Therapeutische Optionen	23
2.3.2.1.3	Neurogenese nach zerebraler Ischämie	23
2.4	S(+)Ketamin	24
2.4.1	Allgemeines	24
2.4.2	Physikalische und chemische Eigenschaften	25
2.4.3	Pharmakokinetik und Metabolismus von Ketamin	26
2.4.4	Neuroprotektion durch Ketamin	26
2.4.5	Neuroregeneration unter Ketamin	27
2.4.6	Anwendung von Ketamin und S(+) Ketamin in der Tiermedizin	28
2.5	Halothan	29
2.5.1	Allgemeines	29
2.5.2	Physikalische und chemische Eigenschaften	29
2.5.3	Pharmakokinetik und Metabolismus	30
2.5.4	Unerwünschte Wirkungen	30
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	32
3.1	Ziel der Untersuchung	32
3.2	Material und Methodik	33
3.2.1	Versuchstiere	33
3.2.2	Versuchsaufbau	34
3.2.3	Gruppeneinteilung	35
3.2.4	Operativer Abschnitt	37
3.2.4.1	Narkoseeinleitung	39
3.2.4.2	Chirurgische Präparation	39
3.2.4.3	Narkose	42
3.2.4.4	Physiologische Parameter	44
3.2.4.5	Ischämieinduktion	46

3.2.5	In-vivo-Markierung der Stammzellen	48
3.2.6	Probengewinnung	49
3.2.6.1	Perfusion der Tiere	49
3.2.6.2	Präparation und Resektion des Gehirns	51
3.2.6.3	Schneiden des Gehirns	51
3.2.7	Untersuchung des Gehirns	52
3.2.7.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	52
3.2.7.1.1	Färbevorgang (modifiziert nach ROMEIS 1989).....	53
3.2.7.1.2	Untersuchung mit dem Lichtmikroskop.....	54
3.2.7.1.3	Klassifizierung des Schadens	55
3.2.7.1.4	Auswertung	55
3.2.7.2	BrdU-Färbung	55
3.2.7.2.1	Färbevorgang (modifiziert nach KUHN et al. 1996)	56
3.2.7.2.2	Untersuchung mit dem Lichtmikroskop.....	59
3.2.7.2.3	Auswertung	59
3.2.7.3	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung	60
3.2.7.3.1	Färbevorgang (modifiziert nach KUHN et al. 1996)	60
3.2.7.3.2	Beurteilung und Dokumentation am ApoTome	63
3.2.7.3.3	Auswertung	64
3.2.7.4	Volumenbestimmung des Gyrus dentatus	64
3.2.7.4.1	Flächenmessung	65
3.2.7.4.2	Volumenberechnung	65
3.2.8	Geräte, Antikörper, Chemikalien und Lösungen für die histologischen Untersuchungen	65
3.2.9	Statistische Berechnung und Dokumentation	70
3.3	Ergebnisse	71
3.3.1	Physiologische Parameter während des operativen Abschnitts	71
3.3.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	78
3.3.3	BrdU-Färbung	82
3.3.4	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung	84
3.3.5	Volumenbestimmung des Gyrus dentatus	87
3.3.6	Korrelation des histologischen Schadens mit der Anzahl neu gebildeter Neuronen	88
4	DISKUSSION	90
4.1	Diskussion der Methoden	90
4.1.1	Zerebrales Ischämiemodell	90
4.1.2	Einordnung des Gewebes Schadens anhand der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	93
4.1.3	Einsatz von BrdU zur Markierung von proliferativen Zellen in-vivo.....	94
4.1.4	Detektion BrdU-markierter Zellen und deren Differenzierung mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung	97
4.2	Diskussion der Ergebnisse	100
4.2.1	Physiologische Parameter während des operativen Abschnitts	100
4.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	104
4.2.3	BrdU-Färbung	107
4.2.4	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung	110
4.2.5	Volumenbestimmung des Gyrus dentatus	112
4.2.6	Korrelation des histologischen Schadens mit der Anzahl neu gebildeter Neuronen	112
4.3	Abschlussbetrachtung	114

5	ZUSAMMENFASSUNG	116
6	SUMMARY	117
7	LITERATURVERZEICHNIS	118
8	TABELLENVERZEICHNIS	131
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	132
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	133
11	DANKSAGUNG	137
12	LEBENS LAUF	138

1 EINLEITUNG

Lange Zeit galt es als wissenschaftliches Dogma, dass das Gehirn von Erwachsenen postnatal keine neuen Nervenzellen mehr hervorbringen kann und damit eine Regeneration von im Laufe des Lebens zugrunde gegangenen Neuronen nicht möglich ist. Diese Annahme musste Ende der 90er Jahre mit der Entdeckung adulter Stammzellen in mehreren Regionen des adulten Gehirns grundlegend revidiert werden. Seither stehen adulte Stammzellen und speziell die adulte Neurogenese im Mittelpunkt des neurowissenschaftlichen Interesses. Für viele Störungen neuronaler Strukturen und neurodegenerative Erkrankungen wie Parkinson und Alzheimer gibt es, trotz deutlicher Fortschritte in den therapeutischen Behandlungsmethoden in den letzten Jahren, keine kausalen Therapieansätze. Das Vorhandensein adulter neuronaler Stammzellen und die spontane Neubildung von Neuronen im Gehirn haben bei Wissenschaftlern die Hoffnung geweckt, die Regeneration neuronaler Strukturen im zentralen Nervensystem durch Stimulierung endogener neuronaler Vorläuferzellen möglicherweise positiv beeinflussen zu können und damit neue therapeutische Möglichkeiten zu schaffen. Der Einsatz adulter neuronaler Stammzellen könnte eine denkbare Alternative zu embryonalen Stammzellen darstellen, deren Verwendung aus ethischen Gründen kontrovers diskutiert wird. Die Schädigung neuronaler Gewebe infolge von Durchblutungsstörungen des Gehirns (zerebrale Ischämie) spielt bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems eine bedeutende Rolle. Nach Myokardinfarkten und malignen Tumoren stehen zerebrale Ischämien an dritter Stelle in der Häufigkeit der Todesursachen in der BRD.

Jedes Jahr erleiden allein in Deutschland ca. 200 000 Menschen einen Schlaganfall, wobei vorwiegend ältere Menschen (20% der über 65-Jährigen!) betroffen sind. Rund 20 % der direkt von einem Schlaganfall betroffenen Patienten sterben innerhalb von vier Wochen, über 37 % innerhalb eines Jahres. Bei Überlebenden bleiben nach einem Schlaganfall nicht selten neurologische Störungen - Sprachstörungen, Sehstörungen, Wesensveränderungen, Einschränkungen der geistigen Leistungsfähigkeit, Lähmungen - zurück, die sich unter konsequenter Physiotherapie und Logopädie in den meisten Fällen zwar bessern, aber dennoch nicht vollständig reversibel sind und damit einen der Hauptgründe für die Pflegebedürftigkeit im Alter darstellen. Neben dem Schlaganfall tritt die zerebrale Minderdurchblutung auch bei Schädel-Hirn-Trauma, während neuro-, kardio- oder gefäßchirurgischer Eingriffe und nach kardio-pulmonaler Reanimation auf und ist Hauptursache für die hohe Morbidität und Mortalität unter den Betroffenen.

Verschiedene Forschungsgruppen haben in den letzten Jahren Untersuchungen über die endogene Neuroneogenese nach zerebraler Ischämie im adulten Gehirn durchgeführt. In

EINLEITUNG

einem eigenen Vorversuch (ENGELHARD, in Vorb.) konnte gezeigt werden, dass die Proliferationsrate adulter Stammzellen im Gyrus dentatus in Abhängigkeit von der Dauer der zerebralen Ischämie ansteigt, wobei sich der überwiegende Teil der neu gebildeten Zellen zu Neuronen ausdifferenziert. Obwohl die neuroprotektive Wirkung von Anästhetika während eines ischämischen Geschehens weitgehend bekannt ist, finden sich in der Literatur bislang keine Studien, die eine mögliche Beeinflussung adulter neuronaler Stammzellen durch Anästhetika unter ischämischen Bedingungen untersucht haben.

In der vorliegenden Arbeit wird deshalb im Tiermodell an der Ratte untersucht, ob 28 Tage nach Induktion einer transienten inkompletten globalen zerebralen Ischämie abhängig von der Wahl der Anästhetika Halothan oder S(+)-Ketamin bzw. abhängig von dessen Konzentration ein Einfluss auf den neuronalen Schaden im Hippokampus und die neuronale Regeneration im Gyrus dentatus (schadensinduzierte adulte Neurogenese) zu beobachten ist.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Zentrales Nervensystem

Das Zentrale Nervensystem (ZNS) gliedert sich in das kraniorostral gelegene Gehirn (Encephalon) und das sich kaudal anschließende Rückenmark (Medulla spinalis).

Das ZNS dient der koordinierten Reizaufnahme, -leitung und -beantwortung und wird durch das so genannte periphere Nervensystem ergänzt. Dieses besteht aus afferenten und efferenten Nervenfasern, die Informationen über Rezeptoren an den Organen an das Rückenmark und das Gehirn weiterleiten und die Erregungsleitung an die Erfolgsorgane vermitteln (NICKEL et al. 1991).

2.1.1 Anatomie des Gehirns

Von kaudal betrachtet lässt sich das Gehirn entsprechend seiner phylogenetischen Entwicklung in folgende vier Abschnitte einteilen:

- das Rautenhirn (Rhombencephalon)
untergliedert sich in das Nachhirn (Myelencephalon, Medulla oblongata) und das Hinterhirn (Metencephalon) mit der Brücke (Pons) und dem Kleinhirn (Cerebellum)
- das Mittelhirn (Mesencephalon)
bestehend aus den Hirnschenkeln (Crus cerebri), der Haube (Tegmentum mesencephali) und der Vierhügelplatte (Lamina quadrigemina)
- das Zwischenhirn (Diencephalon)
mit dem Thalamus, dem Hypothalamus, der Epiphyse und dem Mamillarkörper
- und das Endhirn (Telencephalon)
bestehend aus den zwei Großhirnhemisphären mit der Hippokampusformation, dem Streifenhügel (Corpus striatum) und dem Riechhirn (Rhinencephalon)

Das Gehirn liegt geschützt in der soliden Knochenkapsel der Schädelhöhle (Cavum cranii) und ist von drei Hirnhäuten umgeben. Der äußeren, harten Hirnhaut (Pachymeninx, Dura mater) schließt sich die innere, weiche Hirnhaut (Leptomeninx) an, die sich in die dünne Spinnwebenhaut (Arachnoidea) und die dem Zentralorgan unmittelbar aufliegende Gefäßhaut (Pia mater) unterteilt. Der Hohlraum zwischen den beiden letztgenannten Häuten (Cavum leptomeningicum) steht mit dem Binnenraum des Gehirns in Verbindung und ist mit Liquor cerebrospinalis gefüllt (NICKEL et al. 1991).

2.1.2 Allgemeine Histologie des Nervensystems

Histogenetisch ist das ZNS aus zwei verschiedenen Komponenten aufgebaut: dem ektodermalen Nervengewebe und dem mesodermalen, umhüllenden Bindegewebe mit den sekundär einwachsenden Blutgefäßen (RÜSSE und SINOWATZ 1991).

Funktionell werden im Nervengewebe zwei Zelltypen unterschieden: die eigentlichen Nervenzellen (Neurone, Neurozyten) und die Gliazellen. Die hoch spezialisierten Neuronen übernehmen die Erregungsbildung sowie die zentripetale und die zentrifugale Erregungsleitung, sind allerdings durch ihren hohen Differenzierungsgrad nicht mehr in der Lage, sich eigenständig stoffwechselaktiv zu versorgen. Sie sind daher auf die Gliazellen (Neuroglia) angewiesen, die stoffwechselaktive Aufgaben für die Nervenzellen übernehmen, Stützfunktionen in der Gewebestruktur inne haben, durch Ausbildung der Axonscheide die Erregungsleitung fördern, die lebenswichtige Blut-Hirn-Schranke bilden und die Fähigkeit zur Phagozytose besitzen. Die Gliazellen des ZNS können aufgrund struktureller und funktioneller Kriterien weiter in Ependymzellen, Makroglia (Astrozyten), Oligodendrozyten und Mikroglia (Hortega-Glia) unterteilt werden (LIEBICH et al. 1999).

2.1.3 Blutversorgung des Gehirns

Die Anatomie der Gefäßversorgung des Rattengehirns stimmt weitgehend mit der des Menschen überein (YAMORI et al. 1976).

Für die adäquate, arterielle Blutversorgung des Gehirns sind zwei paarige Arterien, die Arteriae (Aa.) carotides internae und die Aa. vertebrales, angelegt. Die Aa. carotides internae treten über die Foramina laceri in die Schädelhöhle ein und teilen sich beiderseits in die Arteria (A.) cerebri rostralis, die sich mit der Gegenseite vereinigen kann und die kranialen und medialen Anteile der Hemisphären vaskularisiert, und die A. cerebri media, die den größten Teil der lateralen Großhirnhemisphären mit Blut versorgt (LIEBMANN et al. 1993).

Die Aa. vertebrales beider Seiten vereinigen sich, nach Eintritt durch das Foramen magnum in die Schädelhöhle und Abgabe kleiner Seitenäste, zur unpaaren A. basilaris. Auf Höhe der Brücke teilt sich diese in die Aa. cerebri caudales und gibt weitere Arterienäste zur Versorgung des Kleinhirns ab. Die Aa. cerebri caudales stellen die Blutversorgung der medialen und basilarer Regionen der hinteren Hemisphärenanteile sicher und bilden über Aa. communicantes caudales einen anastomosierenden Ring mit den Aa. cerebri mediae. Dieser Ring - Circulus arteriosus Willisii - vereinigt die Stromgebiete der zuführenden Aa. vertebrales und Aa. carotides internae. Bei Verschluss einer der vier zuführenden Arterien

kann sich somit ein Kollateralkreislauf für das betroffene Gebiet ausbilden, was von großer klinischer Bedeutung ist (NICKEL et al. 1991; LIEBMANN et al. 1993).

2.1.4 Gehirnstoffwechsel

Um die komplexen Vorgänge und Leistungen des Gehirns aufrecht zu erhalten, ist eine effiziente Versorgung des Nervengewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen notwendig. Um dies zu erreichen nimmt das Gehirn - welches nur 2 % des Körpergewichts ausmacht - 15 bis 20 % des Herz-Minuten-Volumens (LIEBMANN et al. 1993) und über ein Viertel der Glukose ($31 \mu\text{mol}/100 \text{ g Gehirnmasse (GM)}/\text{min}$), die dem gesamten Körper zur Verfügung steht (FITCH 1994), in Anspruch. Der normale Blutfluss im Gehirn beträgt durchschnittlich $50 \text{ ml}/100 \text{ g GM}/\text{min}$ und wird über weite Blutdruckbereiche konstant gehalten. Man spricht hierbei von zerebraler Autoregulation, die durch Konstriktion bzw. Dilatation zerebraler Widerstandsgefäße einen mittleren zerebralen Perfusionsdruck zwischen 60 und 140 mmHg aufrecht erhält (KEMPSKI 2000).

Der Stoffwechsel im Gehirn kann grundsätzlich in einen Struktur- und einen Funktionsstoffwechsel eingeteilt werden (ADAMS und WERNER 1997). Aufgabe des Strukturstoffwechsels ist die Proteinsynthese, die ausreichende Bereitstellung von Neurotransmittern und die Aufrechterhaltung der Membranpotentiale und Ionengradienten. Sein Anteil am Gesamtstoffwechsel des Gehirns beträgt 40 %. Die restlichen 60 % des Gehirnstoffwechsels entfallen auf den Funktionsstoffwechsel und dienen damit der Erregungsbildung, -weiterleitung und -verarbeitung (ADAMS und WERNER 1997).

Unterschreitet der zerebrale Blutfluss einen Wert von 20 bis 18 ml/100 g GM/min, kommt der Funktionsstoffwechsel zum Erliegen. Bei einem Blutfluss zwischen 12 und 18 ml/100 g GM/min kann der Strukturstoffwechsel noch aufrecht erhalten werden. Im Falle einer lokalen Minderperfusion entspricht dieser Blutfluss der Durchblutung in der paraischämischen Zone, der sogenannten Penumbra, in der ein temporärer elektrophysiologischer Funktionsausfall einsetzt, jedoch noch keine morphologischen Veränderungen oder Zelluntergang auftreten. Bei rechtzeitiger Reperfusion der Penumbra ist der Funktionsverlust voll oder partiell reversibel (SIESJÖ 1992; KEMPSKI 2000). Fällt der zerebrale Blutfluss unter 12 bis 10 ml/100 g GM/min, ist die Energie- und Sauerstoffzufuhr auch für den Strukturstoffwechsel nicht mehr ausreichend. Es kommt zu Zellschädigung und Gewebeuntergang (KEMPSKI 1994).

2.1.5 Der Hippokampus

Der Hippokampus, auch Cornu ammonis (CA) genannt, entsteht embryonal durch s-förmige Einrollung der dünnen, ventromedialen Hemisphärenwand und wölbt sich von ventral wulstartig in das Lumen der Seitenventrikel (NICKEL et al. 1991). Seine Form beschreibt einen kaudolateral konvexen Bogen, der durch Ausweitung des Endhirns in den Temporallappen verlagert wird (RÜSSE und SINOWATZ 1991). Er wird, seinem bogenförmigen Verlauf von dorsal nach ventral folgend, in die Regionen CA1, CA2, CA3 und CA4 eingeteilt:

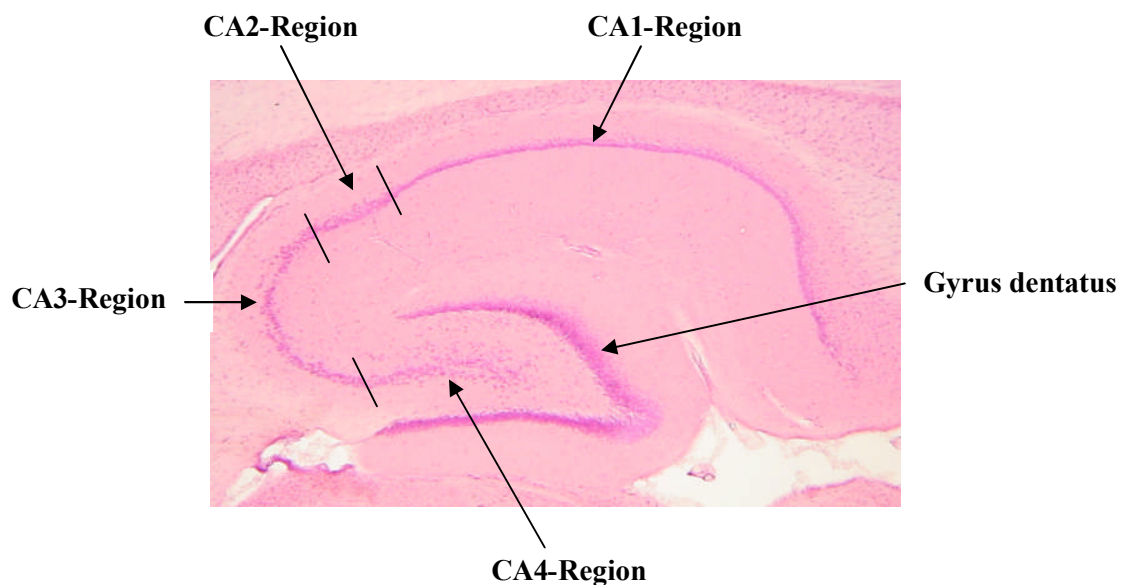


Abbildung 1: Hippokampusformation vom Gehirn einer Ratte mit Einteilung der verschiedenen CA-Regionen (nach PAXINOS und WATSON 1998)

Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Vergrößerung 22fach.

Neben dem Gyrus parahippocampalis, dem Gyrus dentatus (GD), den Fimbria hippocampi und der Fornix ist der Hippokampus Teil der sogenannten Hippokampusformation, die wiederum dem limbischen System zugeordnet wird. Am freien Ende der Hippokampusrinde stellt sich der Gyrus dentatus als kappenartiger Aufsatz dar. Dieser dient der Ausbreitung ihm zuströmender Erregungen in die Hippokampusformation (NICKEL et al. 1991).

Der Hirnmantel, Pallium, Teil des Telencephalons, tritt mit fortschreitender Höherentwicklung der Säugetiere bis hin zum Menschen immer mehr in den Vordergrund. Charakteristische Unterschiede im zytoarchitektonischen Rindenaufbau lassen eine

Unterscheidung des phylogenetisch alten Anteils, Allopallium - zusammengesetzt aus Palaeopallium und Archipallium -, und dem phylogenetisch jüngeren Anteil, Neopallium, dem übergeordneten Integrations- und Koordinationszentrum, zu (NICKEL et al. 1991).

Im Hippokampus und im Gyrus dentatus ist die Dreischichtigkeit des Allokortex besonders deutlich zu erkennen.

Der Hippokampus setzt sich zusammen aus dem Stratum moleculare, bestehend aus den Endverzweigungen afferenter Nervenfasern sowie der Spitzendendriten der großen Pyramidenzellen, dem Stratum pyramidale, das sich aus kleinen und dicht gelagerten großen Pyramidenzellen zusammensetzt, und dem Stratum multiforme, welches von kleinen, locker verteilten Assoziationszellen gebildet wird. An der Ventrikelfläche des Hippokampus schließt sich das Muldenblatt (Alveus) an, das von efferenten Axonen der Pyramidenzellen gebildet wird und aus dem die Fimbria hippocampi hervorgehen (NICKEL et al. 1991).

Der Gyrus dentatus weist eine ähnliche Dreischichtung auf: das Stratum moleculare, das Stratum granulare aus kleinen modifizierten Pyramidenzellen und das Stratum multiforme (NICKEL et al. 1991).

Die Untersuchung des Hippokampus ist für experimentelle Studien zur Erforschung der zerebralen Ischämie besonders geeignet, da die Neuronen dieser Region (insbesondere der CA1-Region) sehr sensibel auf bereits geringe ischämische Insulte reagieren (PULSINELLI 1985).

2.2 Zerebrale Ischämie

2.2.1 Definition der zerebralen Ischämie

Zerebrale Ischämie beschreibt den Zustand einer Unterversorgung bzw. einer vollständigen Unterbrechung der Durchblutung im Gehirn (KEMPSKI 2000). Dadurch wird die Substrat- und Sauerstoffzufuhr zum Gehirn unterbrochen, was ein zunehmendes Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf sowie zwischen Energieangebot und -bedarf und ferner eine Akkumulation metabolischer Abfallprodukte zur Folge hat (REEKER et al. 2000). Eine Ischämie kann durch Traumen, Thromben, Embolien, chirurgische Eingriffe, Vasospasmen, Herz-Kreislauf-Stillstand und andere pathologische Prozesse verursacht werden.

2.2.2 Formen der zerebralen Ischämie

Grundsätzlich sind zwei Formen der zerebralen Ischämie zu unterscheiden: es handelt sich um eine *globale Ischämie*, wenn eine Unterbrechung der gesamten Gehirndurchblutung vorliegt, wie es beispielsweise bei einem Herz-Kreislauf-Stillstand oder bei einem diffusen Hirnödem der Fall ist. Neuronaler Schaden tritt dabei in Abhängigkeit von der Ischämiedauer zuerst in selektiv vulnerablen Gehirnarealen auf. Im Gegensatz dazu steht die *fokale Ischämie*, bei welcher nur das Versorgungsgebiet einer Hirnarterie von der Mangel durchblutung betroffen ist, z.B. bei einem Schlaganfall (KEMPSKI 2000). Eine Sonderform der fokalen Ischämie stellt die multifokale Ischämie dar. Bei ihr sind multiple, ungleichmäßig verteilte Areale des Gehirns von einer Minderdurchblutung betroffen, z.B. als Folge einer Embolie (TRAYSTMAN 2003).

Ist die Durchblutung dauerhaft unterbrochen, spricht man von einer permanenten Ischämie, wohingegen sich einer temporären Ischämie die Reperfusion des getroffenen Gewebes anschließt. Weiterhin wird die globale Ischämie in eine komplette bzw. inkomplette Form unterteilt. Als Unterscheidungskriterium wird hierbei das Fehlen bzw. Vorhandensein einer residualen Durchblutung des Gehirns herangezogen (WERNER 2000). Da es bei globalen Ischämien bereits nach wenigen Minuten zu strukturellen Schäden kommt, kann dieser Zustand vom betroffenen Organismus nur über einen relativ kurzen Zeitraum toleriert werden. Je nach Grad der Einschränkung kommt es zum Zusammenbruch verschiedener metabolischer Prozesse, mit nachfolgend funktionellen und/oder strukturellen Schäden. Schwere- und

Ausdehnungsgrad des Schadens hängen von der Intensität, der Dauer der Ischämie und von der Reperusionszeit ab (ITO et al. 1975).

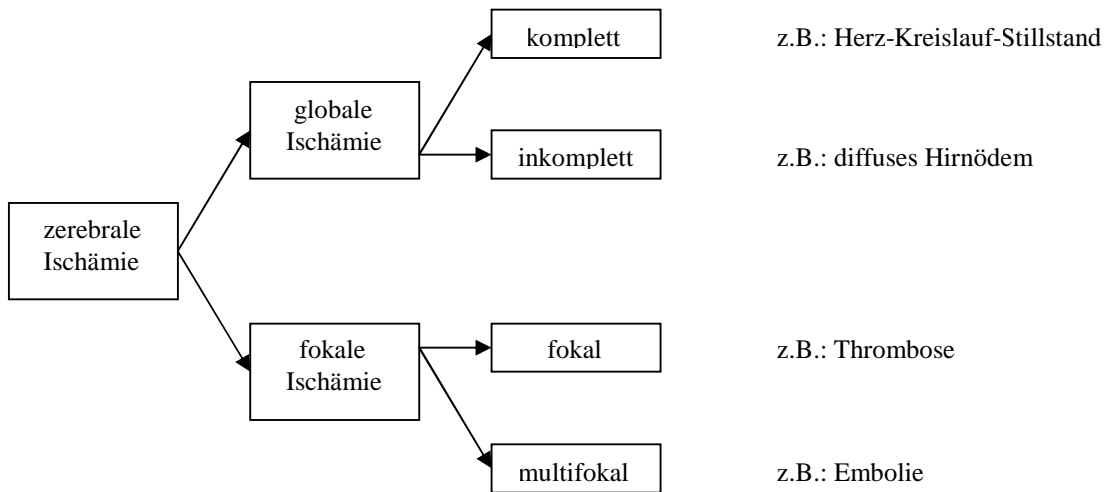


Abbildung 2: Formen der zerebralen Ischämie (modifiziert nach Traystman 2003)

2.2.3 Pathophysiologie

Unter physiologischen Umständen metabolisieren Gehirnzellen 1 Mol Glukose in aerober Glykolyse zu 36 Mol Adenosin-tri-Phosphat (ATP), um ihren Energiehaushalt zu decken. Da das Gehirn keine Substratspeicher besitzt, sind die Zellen auf eine kontinuierliche Zufuhr von Glukose und Sauerstoff aus dem Blut angewiesen, um ihre Funktionalität und Vitalität aufrecht zu erhalten. Dies ist auch die Ursache für die extreme Empfindlichkeit neuronalen Gewebes bereits gegenüber geringen Zirkulationsstörungen (KUSCHINSKY 1996).

Beim Auftreten einer zerebralen Ischämie, einer fokalen oder globalen Mangel durchblutung im Gehirn, ist die Zufuhr von Nährstoffen ganz (komplette Ischämie) unterbrochen oder stark vermindert (inkomplette Ischämie). Sinkt die Hirndurchblutung auf Werte unter 10 bis 12 ml/100 g GM/min, ist das zerebrale ATP innerhalb von 20 sec verbraucht. Die Umstellung der ATP-Produktion auf anaerobe Glykolyse (nur 2 Mol ATP pro 1 Mol Glukose) kann den Energiebedarf der Zellen nicht ausreichend decken. Das dabei als Nebenprodukt anfallende Laktat akkumuliert (aufgrund mangelnden Abtransports) und es entsteht, in Abhängigkeit vom Glukosespiegel, eine interstitielle wie auch intrazelluläre Azidose mit einem pH-Wert von 5,6 bis 6,4 (KEMPSKI 2000).

Die Laktatazidose hat Einfluss auf die Zellmembranpermeabilität und bewirkt eine Denaturierung von Membranproteinen und Enzymen. Als Folge dessen entsteht ein Ödem des

Gefäßendothels, der Astrozyten und anderer neuronaler Strukturen, welches die Durchblutung zusätzlich beeinträchtigt. In Abwesenheit von Sauerstoff kommt es zur Depolarisation der Zellen an der präsynaptischen Zellmembran und zeitgleich zur Blockierung der oxidativen Phosphorylierung (WERNER 1997).

Durch mangelnde ATP-Bereitstellung können die Energie-abhängigen Ionenpumpen die intra-/extrazellulären Ionengradienten nicht mehr aufrecht erhalten. Es kommt zum osmotischen Einstrom von Na^+ und Cl^- sowie zum K^+ -Ausstrom aus den Zellen und damit zur Membrandepolarisation. Dieser Vorgang wird durch massive Freisetzung von exzitatorischen Neurotransmittern - vor allem Glutamat und Aspartat - aus präsynaptischen Vesikeln beschleunigt. Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Transmitter im ZNS. Durch seine Eigenschaft, in höheren Konzentrationen im Extrazellularraum des Gehirns potentiell neurotoxische Wirkung (Schwellung von Nerven- und Gliazellen, Neuronenuntergang) zu entfalten, hat er den Begriff „Exzitotoxin“ geprägt und spielt pathophysiologisch eine besondere Rolle (GRAHAM und LANTOS 1997).

Derzeit sind aufgrund unterschiedlicher molekularer Strukturen und Wirkungsmechanismen fünf verschiedene Glutamat-Rezeptoren bekannt, wobei die an Ionenkanäle gekoppelten NMDA-, AMPA- bzw. Kainatrezeptoren am besten untersucht sind. Bindet Glutamat an einen AMPA- oder Kainatrezeptor bedingt dies einen Na^+ -Ionen-Einstrom in die Zelle. Im Gegensatz dazu ist für die Ansprechbarkeit des NMDA-Rezeptors die vorherige Depolarisation des Neurons Voraussetzung. Erst dadurch wird der Mg^{2+} -Block des Ionenkanals gelöst und dieser damit unter Glutamateinfluss permeabel für Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen (KEMPSKI 1994).

Die Öffnung der Ionenkanäle für Ca^{2+} und die massive Anhäufung von Ca^{2+} im Intrazellularraum der Zelle stellen einen entscheidenden Schritt für die zytotoxische Wirkung dar, weil dadurch zahlreiche Enzyme - die neuronale Stickstoffsynthetase, Phospholipasen, Proteasen und Lipidoxidasen - aktiviert werden (WERNER 2000).

Die Phospholipasen hydrolysieren Membranphospholipide und schädigen somit die Zellmembranintegrität, verbunden mit Änderungen der Permeabilität. Des Weiteren kommt es in Folge der Hydrolyse zur Freisetzung von hohen Konzentrationen freier Fettsäuren. Hierbei ist die Akkumulation von Arachidonsäure besonders bedeutend, die unter Beteiligung der Enzyme Cyclooxygenase und Lipooxygenase und bei Anwesenheit von Sauerstoff zu Eicosanoiden (Thromboxane, Prostaglandine, Leukotriene) oxidiert wird. Diese führen zu physiologischen und pathophysiologischen Reaktionen der Neuronen und - durch Aktivierung

und Anlagerung von Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen sowie durch Vasokonstriktion - zu Störungen der Mikrozirkulation (SIESJÖ 1992).

Auf verschiedenen Wegen kommt es zur Bildung von freien Radikalen, die ebenfalls zur Zerstörung von Membranen und Strukturproteinen beitragen. Steht nach der Reperfusion Sauerstoff wieder als Substrat zu Verfügung, sind freie Sauerstoffradikale wichtige Mediatoren der Zellschädigung (GRAHAM und LANTOS 1997).

Die Form, die Intensität, die Lokalisation, die Dauer der Ischämie, die Reperfusion und eventuelle intra- oder postischämische protektive Maßnahmen sind ausschlaggebende Faktoren für das Ausmaß und die Qualität der Zellschädigung und des Gewebeuntergangs (WERNER 2000).

Es werden zwei verschiedene Formen des Zelluntergangs - die Nekrose und die Apoptose - unterschieden. Als Nekrose wird das Absterben meist ganzer Zellgruppen infolge stark unphysiologischer Milieubedingungen bezeichnet. Sie tritt in der Regel bereits 12 bis 24 Stunden nach einem ischämischen Insult auf (GRAHAM und LANTOS 1997). Es kommt zum Verlust der Membranintegrität und zum passiven Eintritt von Ionen und Wasser in die Zelle (Zellödem). Die Desoxyribonukleinsäure (DNS) wird zerstört. Fragmente und Zellorganelle treten in den Extrazellularraum aus. Die Zellkerne erscheinen unter dem Lichtmikroskop pyknotisch und färben sich mit Hämalaun dunkelblau an. Eosin färbt das Zytoplasma mit Zunahme der sauren Abbauprodukte rot. Die sterbenden Zellen bzw. die austretenden Zellbestandteile werden von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten als Antigen erkannt und phagozytiert und rufen somit eine Endzündungsreaktion hervor (GRAHAM und LANTOS 1997).

Gegenüber dem schnellen, nekrotischen Zelluntergang ist die langsame, zeitlich verzögerte Form, der programmierte Zelltod (Apoptose), abzugrenzen. Die Nekrose ist ein unmittelbarer, passiver Prozess, wohingegen die Apoptose einen aktiven und ATP-verbrauchenden Vorgang darstellt (EGUCHI et al. 1997). Neben Proliferation und Differenzierung ist die Apoptose ein wichtiger physiologischer Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase.

Neben einer Vielzahl von unterschiedlichen Faktoren kann auch ein Mangel an Substanzen, die für die Zelle überlebenswichtig sind, zum Zelltod durch Apoptose führen. Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass die Aktivierung der Apoptose bei der Vermittlung des Zelltods nach einer zerebralen Ischämie große Bedeutung hat (HONKANIEMI et al. 1996; ENGELHARD et al. 2003).

Obwohl der ischämische neuronale Zelltod klassischerweise als nekrotisch betrachtet wird, ist in neuerer Zeit nachgewiesen worden, dass auch apoptotischer Zelltod vor allem dann auftritt, wenn der ischämische Insult relativ mild ist und ein zellulärer Metabolismus noch erhalten ist (EGUCHI et al. 1997). Zellen mit apoptotischem Schicksal zeigen initial keine morphologischen Veränderungen im Sinne einer Nekrose. Erst nach Stunden oder Tagen kommt es zur Verringerung des Zellvolumens und zum diskreten Umbau der Zellmembran durch Translokation von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Plasmamembran. Die Kernmembran wird abgebaut, das Chromatin kondensiert und gleichzeitig beginnt die Fragmentierung der DNS durch Endonucleasen in gleichmäßige Teilstücke. Ein typisches Bild der Apoptose ist das Auftreten von Apoptosekörperchen („apoptotic bodies“): abgeschnürte Zellbestandteile aus kondensiertem Intrazellulärmaterial, welches von einer intakten Zellmembran umgeben ist (GRAHAM und LANTOS 1997). Diese sind durch das Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche markiert und werden damit von phagozytierenden und benachbarten Zellen erkannt, aufgenommen und beseitigt.

2.2.4 Tiermodelle der zerebralen Ischämie

Um die komplexen, pathophysiologischen Vorgänge im Gehirn und mögliche therapeutische Ansätze der zerebralen Ischämie systematisch untersuchen zu können, sind histopathologische, biochemische und physiologische Untersuchungen des geschädigten Gehirngewebes notwendig. Dies setzt die Möglichkeit invasiver Eingriffe sowie die spätere Entnahme des Gehirns voraus, was zur Etablierung verschiedener Tiermodelle der zerebralen Ischämie geführt hat (GINSBERG und BUSTO 1989).

Klinische Studien am Menschen sind aufgrund der großen Heterogenität der Patientengruppen (Ursache, Ausprägung, Lokalisation und Dauer der zerebralen Ischämie sowie Alter, Geschlecht oder zusätzliche Erkrankungen) nur begrenzt aussagekräftig. Tiermodelle dagegen bieten durch Auswahl bestimmter Tiergruppen (z.B. Auszucht- oder Inzuchtstämme, gleiche Altersgruppen) und Induktion der zerebralen Ischämie unter Kontrolle der physiologischen Daten standardisierte Bedingungen und damit die Voraussetzungen zur Klärung medizinisch-wissenschaftlicher Fragestellungen (GINSBERG und BUSTO 1989).

Bis heute sind verschiedenste Modelle für die fokale bzw. globale Ischämie (temporär oder permanent) entwickelt und erweitert worden.

Die meisten Ischämie Modelle für Studien zur fokalen Ischämie beinhalten die Okklusion der A. cerebri media (MCAO), da diesem Gefäß eine große Bedeutung beim thromboembolischen

Schlaganfall des Menschen beigemessen wird und es somit im Mittelpunkt vieler Untersuchungen steht (GARCIA 1984).

TAMURA et al. (1981) entwickelten die permanente proximale MCAO unter subtemporalem Zugang als Standardmethode zur Untersuchung fokaler Hirninfarkte, mit der Infarkte sowohl im Kortex als auch im Kaudoputamen gesetzt werden. Technisch einfacher in der Ausführung ist die Variante der distalen MCAO, die 1986 von CHEN et al. eingeführt wurde. Dabei wird die A. cerebri media über der Fissura rhinalis ligiert und mit einer temporären Okklusion der ipsilateralen A. carotis communis kombiniert, um den zerebralen Blutfluss im MCA-Versorgungsgebiet auf ischämische Werte zu senken. In diesem Modell weisen die Gehirne moderate Infarkte im frontoparietalen Kortex auf, wohingegen das Kaudoputamen verschont bleibt. DUVERGER und MACKENZIE (1988) arbeiteten mit einer modifizierten Methode von TAMURA et al. (1981) und untersuchten die Auswirkungen einer permanenten MCAO vergleichend in verschiedenen Rattenstämmen. Gemessen am durchschnittlichen Infarktvolume nimmt die Sensibilität der Rattenstämmen für eine fokale Ischämie in folgender Reihenfolge zu: Wistar-Kyoto, Sprague-Dawley, Fischer-344, spontan hypertensive Ratten (SHR), spontan hypertensive Ratten mit Schlaganfallsneigung (SHRSP). Die Prädisposition von SHR und SHRSP durch MCAO große Infarkte im Bereich des Kortex zu entwickeln (OKAMOTO et al. 1974; IBAYASHI et al. 1986), macht diese Stämme für Tiermodelle experimenteller Studien zum Thema Schlaganfall interessant. Jedoch muss die bei diesen Stämmen von normotensiven Rattenstämmen abweichende Anatomie der zerebralen Vaskularisierung berücksichtigt werden (GINSBERG und BUSTO 1989).

Zur temporären Okklusion der A. cerebri media werden häufig Schlingenligaturen oder neurochirurgische Gefäßclips und zum permanenten Verschluss die Elektrokauterisation verwendet. Eine weitere, weniger invasive Möglichkeit stellt die photochemische Induktion von Thromben dar. Dazu wird den Tieren eine photosensitive Substanz (Bengalrosa) intravenös verabreicht, die durch gezielte Bestrahlung mit Licht von 560 nm Wellenlänge zur Bildung von Sauerstoffradikalen angeregt wird und damit eine mikrovaskuläre Thrombozytenaggregation hervorruft (WATSON et al. 1985). Mit dieser Technik ist es möglich, Gehirnininfarkte in jeder beliebigen Position im Kortex zu erzeugen und Studien zu antithrombotischen oder thrombolytischen Therapieansätzen durchzuführen. Nachteil der Methode ist die Schädigung der mikrovaskulären Strombahn durch die photochemische Reaktion. Es kommt dadurch zur Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke und es entstehen vasogene Ödeme - pathophysiologische Vorgänge, die nicht der Situation des humanen thrombotischen Schlaganfalls entsprechen (GINSBERG und BUSTO 1989).

Des Weiteren gibt es verschiedene embolische Modelle zur fokalen Ischämie: Embolisation durch intraarterielle Injektion von Blutklümpchen in die A. carotis communis oder über einen retrograden Katheter in die A. carotis interna (KUDO et al. 1982); Ischämieinduktion durch eine Bolus-Injektion viskösen Silikons (LAUER et al. 2002); oder intraarterielle Embolisation mit Makrosphären wie TiO₂ (GERRIETS et al. 2003). Bei den letztgenannten Modellen lässt sich die Verteilung der Mikrosphären im Gehirn nicht kontrollieren und beeinflussen; es ist daher keine Aussage über die Lokalisation und die Größe des ischämischen Schadens möglich.

Eine ebenfalls einfache, wenig invasive Okklusion der MCA, mit der sich konstante Infarkte erzeugen lassen, wird durch intraluminales Einführen eines Nylon-Fadens in die A. carotis interna erreicht. Das Fadenende wird nach kranial vorgeschoben und blockiert die MCA (KOIZUMI et al. 1986).

Für die Untersuchungen biochemischer und pathophysiologischer Mechanismen einer kompletten, globalen Ischämie ohne Reperfusion ist die Dekapitation ein sehr einfach durchzuführendes Ischämiemodell. SIEMKOWICZ und HANSEN (1978) verwenden für ihre Studien mit anschließender Reperfusion das sogenannte Neck Tourniquet, eine aufpumpbare Druckmanschette, die um den Hals des anästhesierten Tieres gelegt wird. Primär wird damit nur eine inkomplette globale Ischämie erzeugt, die durch zusätzliche Okklusion der Aa. vertebrales (die im Wirbelkanal knöchern geschützt liegen) in eine komplette globale Ischämie überführt werden kann. Nachteil dieses Vorgehens ist die starke Kompression aller Halsstrukturen (Nervus vagus!) und die Stauung venöser Gefäße.

Um eine komplette globale Ischämie zu erzeugen, die der klinischen Situation eines Herzstillstands entspricht, wird - meist bei großen Versuchstieren - künstlich ein Kammerflimmern herbeigeführt. Viele Untersucher schließen in ihren Studien dem provozierten Herzstillstand eine Herz-Lungen-Reanimation an. Während dieser Zeit folgt nun eine inkomplette Ischämie, da der zerebrale Perfusionsdruck und der zerebrale Blutfluss noch beachtlich unterhalb der Normwerte liegen. KOFLER et al. (2002) verwenden ein Mausmodell in dem der Herzstillstand durch Einsatz von Kaliumchlorid herbeigeführt wird. Um den ischämischen Zustand in übrigen Teilen des Körpers zu vermeiden, wurden Ischämie Modelle mit Verschluss der Kopfarterien im Bereich des Nackens eingeführt.

PULSINELLI und BRIERLEY (1979) entwickelten die „four-vessel-occlusion“ (4-VO), um bei Ratten eine globale zerebrale Ischämie zu untersuchen. Dieses Modell bedarf eines zweistufigen Vorgehens - am Tag vor der Ischämieinduktion werden in einem chirurgischen

Eingriff atraumatische Gefäßklammern locker um die Aa. carotides communes angebracht und die Aa. vertebrales durch die Foramina alares des Atlas verödet; am nächsten Tag erfolgt die Ischämieinduktion durch temporären Verschluss der beiden Arterienklemmen. Dieses Verfahren ist auch am wachen, nicht narkotisierten und frei beweglichen Tier anwendbar. Die Folgeschäden der Ischämie variieren zwischen verschiedenen Rattenstämmen. Als Ursache dafür werden unter den Stämmen abweichende Verzweigungen von Kollateralgefäßen vermutet (PULSINELLI und BUCHAN 1988). Das 4-VO-Modell findet vielfach Anwendung und ist gut beschrieben, obwohl es nicht einfach einzusetzen ist und die Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboratorien deutlich variieren.

Eine Alternative zur 4-VO ist die „two-vessel-occlusion“ (2-VO), durch die eine Vorderhirn-Ischämie induziert wird (SMITH et al. 1984a). Dieses Modell beinhaltet die temporäre bilaterale Okklusion der Aa. carotides communes in Kombination mit einer systemischen Hypotension. Die Reduktion des Blutdrucks auf 50 mmHg kann durch Blutentzug alleine (KAGSTROM et al. 1983a; SMITH et al. 1984a) oder in Ergänzung mit Blutdruck-senkenden Pharmaka (SMITH et al. 1984a) erfolgen. Während der Ischämie sinkt damit der Blutfluss im Kortex bis auf 5 % vom Normwert, im Thalamus und Mittelhirn auf noch geringere Werte (KAGSTROM et al. 1983b). SMITH et al. (1984b) konnten zeigen, dass mit der 2-VO zuerst selektiv vulnerable Strukturen geschädigt werden, wie die Pyramidenzellen in der CA1-Region des Hippokampus, das Kaudoputamen und der Neokortex.

(In der vorliegenden Studie wird ein Verschluss der beiden Aa. carotides communes in Kombination mit einer hämorrhagischen Hypotension auf einen mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) von 40 mmHg über eine Zeitspanne von 10 Minuten mit anschließender Reperfusion durchgeführt. Das Modell entspricht einer temporären inkompletten globalen zerebralen Ischämie.)

2.3 Stammzellen

2.3.1 Definitionen

Stammzellen sind undifferenzierte (nicht spezialisierte) Zellen, deren weitere Entwicklung noch nicht festgelegt ist. Sie besitzen die einzigartige Fähigkeit, sich selbst fortlaufend zu erneuern und unter dem Einfluss bestimmter Milieufaktoren verschiedene differenzierte Vorläuferzellen hervorzubringen (GAGE 2000).

Je nach den Entwicklungsperspektiven werden totipotente (= omnipotente) und pluripotente (= multipotente) Stammzellen unterschieden. In der frühen Embryonalentwicklung des Menschen (bis zum Achtzellstadium, 3. Tag) ist jede einzelne Zelle für sich in der Lage, zu einem vollständigen Lebewesen heranzureifen. Zellen mit dieser Fähigkeit werden als totipotent bezeichnet. Mit der weiteren Entwicklung verlieren die Zellen dieses Potential. Es ist ihnen zwar weiterhin möglich, sich in verschiedenste Zellen und Gewebe des Körpers zu entwickeln, sie können jedoch kein komplettes Individuum mehr hervorbringen. Man spricht hierbei von Pluripotenz der Stammzellen. Zu ihnen gehören die embryonalen Stammzellen, die Nabelschnurstammzellen, sowie die adulten Stammzellen (s.u.) (WINSLOW 2001).

Die Stammzellen teilen sich und bringen in der Regel Vorläuferzellen (progenitor cells) hervor, die in ihrem Entwicklungspotential eingeschränkter sind als die ursprüngliche Stammzelle. Sie sind Vorläufer für unterschiedliche gewebespezifische Zellen (z.B. Neurone, Astrozyten und Oligodentrozyten), bringen aber in ihrer normalen Umgebung kein weiteres Spektrum von Zelltypen hervor (GAGE 2000).

Aus diesen Vorläuferzellen entwickeln sich schließlich die reifen (maturen) Zellen mit den charakteristischen Formen und Funktionen des jeweiligen spezialisierten Zelltyps. Sie ersetzen geschädigte oder abgestorbene Zellen und erhalten so die Integrität und die Funktion des Gewebes aufrecht (WINSLOW 2001).

2.3.1.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen werden dem Embryonalstadium der Blastozyste (Tag 4-5) aus der inneren Zellmasse entnommen. Sie erneuern sich auch unter Laborbedingungen fortlaufend selbst und sind daher gut über längere Zeit als Stammzelllinien in vitro zu kultivieren. Sie können sich zu Zellen/Geweben aller drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm, Ektoderm) und damit zu den mehr als 200 verschiedenen Zelltypen des Körpers entwickeln (pluripotent) (WINSLOW 2001).

Ein Einsatzgebiet für humane embryonale Stammzellen liegt in der Gewinnung von Zellkulturen für die Verträglichkeitsprüfung pharmakologischer Substanzen im Rahmen des präklinischen Zulassungsverfahrens und der Toxizitätsprüfungen. Könnten spezifische Zellkulturen direkt aus humanen embryonalen Stammzellkulturen entwickelt werden, würden diese im Test evtl. die In-vivo-Reaktionen von Zellen oder Geweben besser imitieren als Zellkulturen anderer Spezies oder über sehr lange Zeiträume kultivierte humane Zelllinien, die sich oft in ihrem Verhalten von Zellen in-vivo unterscheiden. Sie könnten damit ein sichereres Modell für Pharmaka-Screening darstellen (WINSLOW 2001).

Zu den Krankheiten, die möglicherweise durch Transplantation von humanen embryonalen Stammzellen behandelt werden könnten, zählen u.a. die Parkinsonsche Krankheit, Diabetes mellitus, traumatische Rückenmarksverletzungen, Purkinjezell-Degeneration, Duchenne Muskeldystrophie, Herzversagen und Osteogenesis imperfecta (WINSLOW 2001).

2.3.1.2 Adulte Stammzellen

Als adulte Stammzellen werden undifferenzierte Zellen bezeichnet, die vereinzelt in einem spezialisierten Gewebe auftreten und sich selbst erneuern. Aus ihnen können alle spezialisierten Zelltypen des betreffenden Gewebes/Organs hervorgehen. Sie sind für Regenerationsvorgänge des jeweiligen Organs verantwortlich. Das Auftreten von adulten Stammzellen ist bisher in folgenden Organen nachgewiesen worden: Knochenmark, Blut, Kornea, Retina, Gehirn, Skelettmuskel, Zahnpulpa, Leber, Haut, Gastrointestinaltrakt und Pankreas (WINSLOW 2001).

Neuere Studien haben gezeigt, dass adulte Stammzellen unter dem Einfluss bestimmter Mediatoren die Fähigkeit besitzen, spezialisierte Zellen eines anderen Gewebes, als das aus dem sie stammen, zu erzeugen. Dieses Phänomen wird als Plastizität der Stammzellen bezeichnet und ist derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen (GALLI et al. 2003).

Dahinter steht die Hoffnung auf neuartige Therapieansätze: der potentielle Einsatz von Stammzellen für die Transplantationstherapie, um durch Krankheit oder Verletzung geschädigte Gewebe zu ersetzen bzw. zu regenerieren.

Bisher am besten erforscht und bereits im routinemäßigen klinischen Einsatz sind die hämatopoetischen Stammzellen. Sie werden aus dem peripheren Blut oder aus dem Rückenmark gewonnen und aufgrund ihrer Fähigkeit, alle Zellvarianten des roten und weißen

Blutbildes (u.a. B- /T-Lymphyten) hervorzubringen, bei der Behandlung von Krebspatienten (nach radiologischer Bestrahlung oder Chemotherapie) und bei Patienten mit Dysfunktionen des blutbildenden Systems oder des Immunsystems angewandt (WINSLOW 2001).

2.3.2 Neuronale Stammzellen, adulte Neurogenese

Es galt lange Zeit als Dogma, das Nervensystem ausgewachsener Säugetiere (incl. des Menschen) sei postmitotisch und damit nicht mehr in der Lage, neue Nervenzellen zu bilden. Es wurde angenommen, nahezu alle Nervenzellen würden während der Embryogenese und kurz postnatal gebildet und ihre Anzahl unterliege von da ab einer stetigen Reduktion (RAMÓN Y CAJAL 1928) ohne regenerative Aktivitäten. Dies stand im Gegensatz zur Fähigkeit vieler anderer Organe, wie z.B. der Haut, dem Blut oder der Muskulatur, deren Zellen sich zeitlebens teilen, eine kontinuierliche Zellerneuerung bewerkstelligen, am Wachstum des Organismus beteiligt und zur funktionellen Regeneration von Gewebeschäden befähigt sind.

Bereits 1912 berichtete ALLEN über mitotische Aktivität in der subependymalen Schicht im vorderen Bereich des lateralen Gehirnvtrikels bei adulten Säugetieren. Allerdings wurde es erst Mitte der sechziger Jahre durch Einführung Thymidin-H³-autoradiografischer Techniken (DNS-Markierung mitotisch aktiver Zellen) möglich, das weitere Schicksal dieser neu gebildeten Zellen zu verfolgen und zu untersuchen (ALTMAN und DAS 1965), und KAPLAN und HINDS (1977) lieferten mit Hilfe des Elektronenmikroskops den Beweis, dass die neu gebildeten Zellen im Gehirn neuronale Merkmale besitzen. Es ist histologisch möglich, die neu gebildeten Zellen durch Einsatz zellspezifischer Marker zu identifizieren (z.B. neuronal specific nuclear protein (NeuN) für Neurone) (MULLEN et al. 1992).

ALTMAN und DAS (1965) konnten in tierexperimentellen Studien zeigen, dass im Gyrus dentatus des Hippokampus und im Bulbus olfaktorius von adulten Ratten Neuronen aus Vorläuferzellen gebildet werden. NOTTEBOHM und Kollegen (1981) gelang der Nachweis der De-novo-Synthese von Neuronen im Telencephalon adulter Singvögel, die für das Erlernen neuer Gesangselemente benötigt werden. Vollständig akzeptiert wurde das Auftreten postembryonaler Neurogenese jedoch erst vor gut zehn Jahren durch den Nachweis von Neurogenese in der subventrikulären Zone (SVZ) des lateralen Vtrikels und dem Vorhandensein von Zellen in der SVZ, die sich sowohl in Neuronen wie auch in Gliazellen differenzieren können (LOIS und ALVAREZ-BUYLLA 1993).

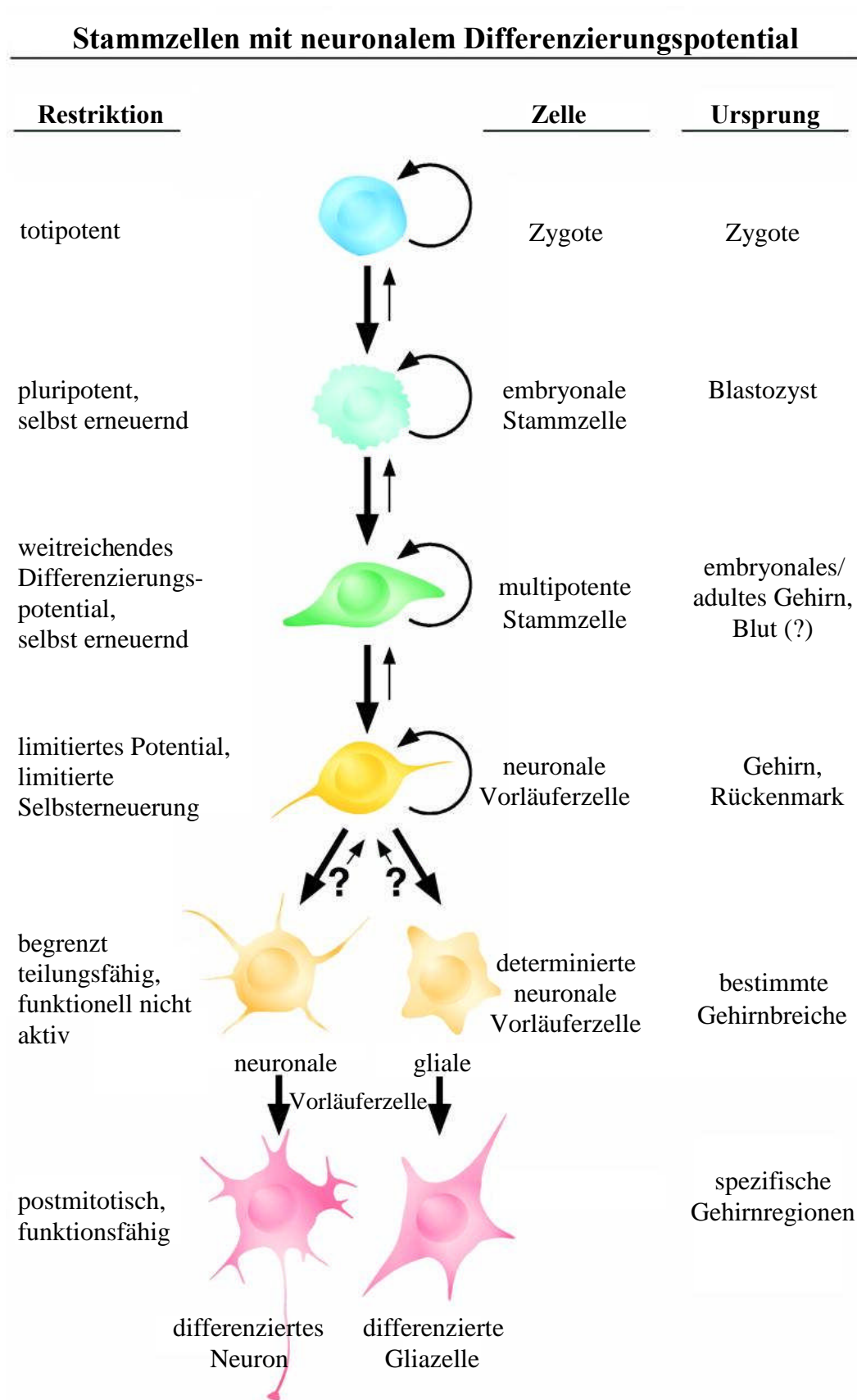


Abbildung 3: Stammzellen mit neuronalem Differenzierungspotential (modifiziert nach Gage 2000)

Die Neubildung von Gehirnzellen im Erwachsenenalter konnte seither bei allen untersuchten Säugetierspezies, einschließlich des Menschen und anderer Primaten, nachgewiesen werden (ERIKSSON et al. 1998; GOULD et al. 1998; TONCHEV et al. 2003).

REYNOLDS und WEISS (1992) gelang es erstmals, neuronale Stammzellen aus der SVZ von Ratten zu isolieren und zu kultivieren. Durch Stimulierung von Zellpopulationen aus Mäusen mit spezifischen Wachstumsfaktoren (z.B.: epidermal growth factor (EGF)) in vitro konnten diese expandiert und nach Absetzen des Wachstumsfaktors in Neuronen oder Astrozyten differenziert werden. In-vivo wurden ebenfalls neuronale Stammzellen gefunden, deren Identität wird jedoch kontrovers diskutiert (GAGE 2000). Technische Fortschritte der letzten Jahre, wie die von GRATZNER et al. (1982) entwickelte DNS-Markierung mit synthetisch hergestelltem 5-Bromo-2-Deoxyuridin (BrdU) und die Kennzeichnung von Zellen durch retroviral induzierte Genexpression (PRICE et al. 1987), haben das Wissen über Migrationsmuster (LOIS und ALVAREZ-BUYLLA 1994), Phänotypen (CAMERON et al. 1993) und die Integration adult-generierter Neuronen im Gyrus dentatus und in der SVZ gefestigt (VAN PRAAG et al. 2002).

Im Gegensatz zur hohen Neurogeneserate bei einigen Wirbeltieren (NOTTEBOHM 2002) haben sich die Beweise für das Vorkommen neu gebildeter Neuronen im adulten Säugetiergehirn von Nagetieren und Primaten (unter physiologischen Bedingungen) auf die Region des Gyrus dentatus und der SVZ beschränkt (KAPLAN und HINDS 1977; LOIS und ALVAREZ-BUYLLA 1994).

Der Gyrus dentatus der Hippokampusformation ist somit eine der zwei germinativen Regionen im Vorderhirn von adulten Säugern. Neuronale Vorläuferzellen entwickeln sich an der Grenze zwischen der Granulärzellschicht (Körnerzellschicht) des Hippokampus und dem Hilus, in der subgranulären Zone (SGZ), in Form von Clustern (KAPLAN und HINDS 1977; KUHN et al. 1996). Ihre Abkömmlinge wandern über nur kurze Distanz in die Granulärzellschicht ein und differenzieren sich dort zu maturen Neuronen, die Körnerzeleigenschaften annehmen können (CAMERON et al. 1993) und den Körnerzellmarker Calbindin exprimieren (KUHN et al. 1996). Ein geringer Anteil der Nachkommenschaft differenziert sich wahrscheinlich auch zu Astrozyten oder Gliazellen (CAMERON et al. 1993). Die überwiegende Mehrheit aller Neuronen der Granulärzellschicht wird bei der Ratte gegen Ende der ersten Lebenswoche gebildet. Die Bildungsrate nimmt nach diesem Zeitpunkt stark ab, bleibt aber in einem geringeren Umfang auch im Erwachsenenalter erhalten (KUHN et al. 1996). Dieser Befund konnte auch beim Menschen

bestätigt werden (ERIKSSON et al. 1998). In adulten Mäusen wird pro Tag 1 neue Körnerzelle auf 2000 bis 4000 existierende Körnerzelle geboren, bei einer Gesamtkörnerzellzahl von ca. 280000 Zellen pro Hippokampus (KEMPERMANN et al. 1997). Diese neu gebildeten Neuronen bilden Moosfasern in die CA3-Region des Hippokampus sowie synaptische Kontakte aus (MARKAKIS und GAGE 1999), gliedern sich in den Schaltkreis des Hippokampus ein und sind elektrophysikalisch aktiv (VAN PRAAG et al. 2002). Die genaue Funktion dieser neuen Neuronen ist zwar noch nicht bekannt, es wird jedoch vermutet, dass sie für Hippokampus-abhängige Lernprozesse und Gedächtnisleistungen eine Rolle spielen (SHORS et al. 2001). Untersuchungen von BARNEA und NOTTEBOHM (1996) zeigen z.B., dass die Neurogenese von adulten Singvögeln saisonalen Schwankungen unterliegt, wobei die Tiere mehr hippocampale Neuronen in den Jahreszeiten produzieren, in denen ihr Erinnerungsvermögen herausgefordert ist, da sie größere Territorien bewohnen und diverse Futterverstecke in Erinnerung behalten müssen.

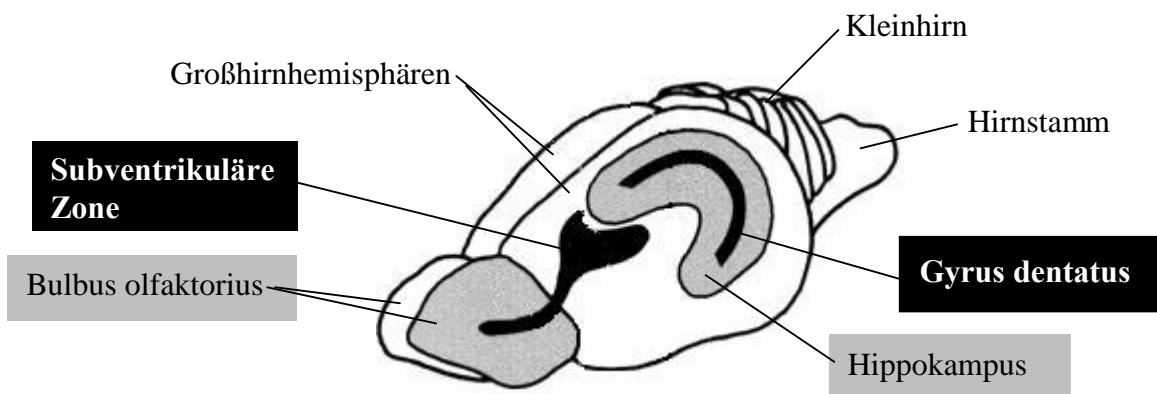


Abbildung 4: Übersicht über das Gehirn einer Ratte (modifiziert nach Galli et al. 2003)

In den schwarz dargestellten Regionen werden Neuronen generiert: Gyrus dentatus (GD) des Hippokampus, subventrikuläre Zone (SVZ) mit ihrem rostral den Bulbus olfaktorius (BO) erreichenden Ausläufer. Von dort aus wandern die neu gebildeten Neuronen in die grau dargestellten Gebiet ein: Bulbus olfaktorius, Hippokampus (H).

Die SVZ des Vorderhirns ist die zweite germinative Zone, die nach Abschluss des Wachstums erhalten bleibt. Ontogenetisch ist sie ein Residuum der Wand des Neuralrohrs, der Proliferationszone des embryonalen Nervensystems. Neuronale Vorläuferzellen der SVZ wandern bei Ratten in den Bulbus olfaktorius ein und entwickeln sich dort zu granulären und perigranulären Neuronen (LOIS und ALVAREZ-BUYLLA 1994). Um zum Bulbus olfaktorius zu gelangen, müssen die Zellen eine relativ lange Distanz zurücklegen. Dazu

benutzen die Neuroblasten einen begrenzten Pfad, den sogenannten rostralen Migrationsstrom (RMS). Sie bilden kettenartige Strukturen aus, die von Astrozyten schlauchartig umgeben werden und damit als Leitschiene dienen (PERETTO et al. 1997).

2.3.2.1.1 Einflussfaktoren auf die endogene Neurogenese

Über die Mechanismen der Differenzierung oder die Funktion neu gebildeter Neuronen im adulten Gehirn ist bisher wenig bekannt. Dennoch wurden bereits einige Einflussfaktoren auf die Regulierung der Zellproliferation, der Migration, des Überlebens der Zellen und der Zelldifferenzierung im Gyrus dentatus untersucht. Verschiedene exogene Faktoren wirken auf die Neurogenese im Hippokampus und bieten dadurch die potentielle Möglichkeit, auf diese im therapeutischen Sinne Einfluss zu nehmen, z.B. durch Verabreichung von Wachstumsfaktoren. Der „Insulin-like growth factor-1“ (IGF-1) verstärkt unter physiologischen Bedingungen die Proliferation und die Neurogenese im Hippokampus (ABERG et al. 2000) und verlängert zusätzlich die Überlebenszeit der Vorläuferzellen bei ischämischen Ratten (DEMPSEY et al. 2003). Im Gegensatz zur Neurogenese in der SVZ wird die Neurogenese im Hippokampus weder durch intraventrikuläre Infusion von „Epidermal growth factor“ (EGF) noch von „Fibroblast growth factor“ (FGF) gefördert. EGF bewirkt jedoch eine Verschiebung der Zelldifferenzierung hin zu einer verstärkten Gliogenese (KUHN et al. 1997).

Glukokortikoide wirken hemmend auf die adulte Neurogenese, wie GOULD et al. (1992) an adrenaletomierten Mäusen zeigen konnten. Ebenso vermindert Stress die Proliferationsrate in der SGZ bei Ratten (GOULD und CAMERON 1996), Spitzhörnchen (GOULD et al. 1997) und Krallenäffchen (GOULD et al. 1998). CAMERON et al. (1998) untersuchten den Einfluss des Neurotransmitters Glutamat auf die Produktion neuer Nervenzellen mit dem Ergebnis, dass ein Mangel dieses Botenstoffes zu einer verstärkten Neurogenese im GD führt.

Einen stimulierenden Einfluss auf die adulte Neurogenese bei Mäusen haben dagegen vielfältige Umweltreize mit Laufrädern, Tunnel, Spielsachen und Gruppenhaltung („enriched environment“). Unter diesen Bedingungen wird das Überleben neu geborener Vorläuferzellen im Hippokampus bei Mäusen um 60 % gefördert (KEMPERMANN et al. 1997).

Des Weiteren befassen sich viele Studien mit dem Auftreten schadensinduzierter Neurogenese im Hippokampus. Um das Reparationspotential der SGZ zu erforschen, werden Tiermodelle für verschiedene neurologische Erkrankungen entwickelt und angewandt. Durch Exzitotoxine ausgelöste Temporallappenanfälle z.B. führen zu einer massiven Stimulation der Vorläuferzellproliferation im Gyrus dentatus, wobei die Neuriten der neu gebildeten Zellen in

diesem unphysiologischen Fall aber aberrante Verbindung eingehen (PARENT et al. 1997). Nach zerebraler Ischämie konnte bei Nagern (LIU et al. 1998) und Makaken (TONCHEV et al. 2003) eine Steigerung der Zellproliferationsrate nachgewiesen werden. SHARP und Kollegen (2002) induzierten bei Wüstenrennmäusen eine temporäre globale zerebrale Ischämie und verfolgten den zeitlichen Proliferations- und Migrationsverlauf der Zellen im Gyrus dentatus. Ferner wurde eine Aktivierung der Neurogenese im Hippokampus in einer Vielzahl von Tiermodellen für fokale (TAKASAWA et al. 2002; DEMPSEY et al. 2003) sowie globale Ischämie (TONCHEV et al. 2003) nachgewiesen.

2.3.2.1.2 Therapeutische Optionen

Seit die neurogenetische Kapazität des adulten ZNS bekannt ist, werden viele Anstrengungen unternommen, Strategien zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen zu entwickeln. Die meisten Studien untersuchen das Reparationspotential durch Transplantation embryonaler oder perinataler Stammzellen. Dies setzt jedoch die Verfügbarkeit, die Vermehrung und Manipulation der Zellen in vitro vor der Transplantation voraus. Bei multifokalen Erkrankungen des ZNS, wie z.B. bei Multipler Sklerose, ist eine Zelltherapie kein optimaler Denkansatz. Deshalb sind Wissenschaftler bemüht, experimentelle Strategien zu entwerfen, die Reaktivierung und Mobilisierung endogener neuronaler Stammzellen zu unterstützen. Damit könnte ein neuer therapeutischer Ansatz für neurodegenerative oder demyelinisierende Krankheiten geschaffen werden (WINSLOW 2001).

2.3.2.1.3 Neurogenese nach zerebraler Ischämie

Verschiedene Autoren haben bei Wüstenrennmaus (LIU et al. 1998), Maus (TAKAGI et al. 1999) und Ratte (KEE et al. 2001; YAGITA et al. 2001; TAKASAWA et al. 2002) gezeigt, dass es nach dem Ereignis einer zerebralen Ischämie zu einer gesteigerten Neubildung von Nervenzellen im Gyrus dentatus kommt. Wie der Literatur zu entnehmen ist, wurden von den entsprechenden Arbeitsgruppen unterschiedliche Narkosepräparate und Dosierungen bei der Durchführung der Ischämie Modelle angewendet. Neben Halothan in unterschiedlichen Dosierungen und in Kombination mit N₂O (YAGITA et al. 2001; TAKASAWA et al. 2002) kommen u.a. Pentobarbital (GOULD und TANAPAT 1997) (KEE et al. 2001) und Isofluran (LIU et al. 1998) zum Einsatz. Ein Einfluss der angewandten Anästhetika auf die Proliferation und Differenzierung der neuronalen Stammzellen kann generell nicht ausgeschlossen werden.

2.4 S(+)**Ketamin**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, in einem standardisierten Modell einer globalen inkompletten zerebralen Ischämie mögliche Auswirkungen durch die Anwendung unterschiedlicher Anästhetika (Halothan versus S(+)**Ketamin**) bzw. durch die Verwendung verschieden hoher Dosierungen S(+)**Ketamin** auf die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus der Ratte zu untersuchen.

2.4.1 Allgemeines

Ketamin wurde in den sechziger Jahren erstmals von MC CARTHY und CHEN (1968) synthetisiert (zitiert nach DIWO und PETROIANU 2000). Aufgrund seiner speziellen Wirkweise lässt sich **Ketamin** nicht in die herkömmliche Klassifizierung der Anästhetika einordnen, sondern stellt im Grunde eine eigene Kategorie dar. Es wirkt als Pharmakon stark analgetisch und bewirkt gleichzeitig eine sogenannte dissoziative Anästhesie. Durch Dämpfung der neuronalen Aktivität thalamokortikaler Bahnen einerseits und Aktivierung subkortikaler Strukturen, des limbischen Systems und des Hippokampus andererseits, kommt es beim Patienten zur Entkopplung (Dissoziation) der somatischen Sensorik und des verarbeitenden Empfindens. Bei hervorragender Analgesie ist das Bewusstsein zwar abgeschaltet, die hypnotische Wirkung ist jedoch unzureichend. Der Muskeltonus ist erhalten oder gesteigert, so dass die Schutzreflexe im Allgemeinen nicht beeinträchtigt sind. Ebenfalls erhalten bleibt die Spontanatmung (in üblichen Dosierungen). Aufgrund dieser einzigartigen Eigenschaften unter den Anästhetika hat **Ketamin** einen herausragenden Platz in der präklinischen Notfallmedizin erhalten und ist fester Bestandteil der Analgosedierung bei schwer brandverletzten und polytraumatisierten Patienten (ADAMS und WERNER 1997).

Des Weiteren hat **Ketamin** im Gegensatz zu allen anderen Anästhetika eine stimulierende sympathikoadrenerge Wirkung auf das kardiovaskuläre System. Blutdruckanstieg und Herzfrequenzsteigerung sind die Folge, was je nach Einsatzgebiet erwünscht (Patient im hypovolämischen Schock) oder unerwünscht (Hypertoniker, dekompensierte Herzinsuffizienz) sein kann. Am Herzen selbst zeigt **Ketamin** negativ inotrope und antiarrhythmische Wirkung. Bei Anwendung einer Kombinationsnarkose des sympathomimetischen **Ketamins** mit sympatholytisch wirksamen Komponenten (z.B. Propofol, Midazolam) können sympathikoneutrale Anästhesie- bzw. Analgesieformen herbeigeführt werden. Man spricht von balancierter Anästhesie/Analgesie.

Zusätzlich hat Ketamin bronchodilatierende Eigenschaften, die von LUNDY et al. (1974) neben der Potenzierung der β -mimetischen Adrenalinwirkung auch auf direkte relaxierende Effekte an der Bronchial- und Trachealmuskulatur zurückgeführt werden. Es hat daher auch eine etablierte Bedeutung bei der notfallmäßigen Intubation des beatmungspflichtigen Asthmapatienten im therapierefraktären Status asthmaticus (ADAMS und WERNER 1997). Limitiert wird der Einsatz von Ketamin als Monosubstanz durch psychomimetische Nebenwirkungen, besonders bei Erwachsenen. Quantität und Qualität der Symptome sind individuell sehr unterschiedlich und von den Ausgangsbedingungen seitens des Patienten und der Umgebung abhängig. Patienten berichten von Traumerlebnissen, Halluzinationen und außerkörperlichen Erfahrungen. Es können unruhige, delirante Aufwachreaktionen auftreten. Deshalb wird die kombinierte Anwendung mit Sedativa oder Anxiolytika dringend empfohlen (ADAMS und WERNER 1997).

2.4.2 Physikalische und chemische Eigenschaften

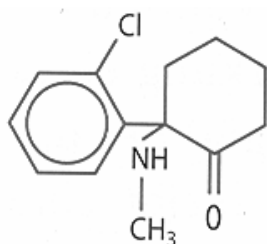


Abbildung 5: Strukturformel von S(+)-Ketamin (aus DIWO 2000)

Ketamin ist eine weiße kristalline Substanz mit einem Molekulargewicht von 274 kDa und als wässrige Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen als Razemat und als S(+)-Stereoisomer auf dem Markt.

Von seiner Struktur ist Ketamin (Chlorophenyl-Methylamino-Cyclohexanon-Hydrochlorid) ein chirales Pharmakon mit zwei Stereoisomeren. Die chemische Summenformel ist $C_{13}H_{16}ClNO$. Die beiden Stereoisomere haben spiegelbildliche Ähnlichkeit, lassen sich jedoch durch Drehung in einer Ebene nicht zur Deckung bringen. Sie lassen sich u.a. physikalisch durch ihre Eigenschaft, polarisiertes Licht in unterschiedliche Richtungen abzulenken, unterscheiden und werden dementsprechend mit S(+) für linksdrehend und R(-) für rechtsdrehend bezeichnet. Zunächst liegt Ketamin als Razemat, eine äquimolare Mischung beider Formvarianten, vor (DIWO und PETROIANU 2000).

Die ausgeprägte analgetische Wirkung von Ketamin beruht in erster Linie auf seinem nicht-kompetitiven Glutamat-Antagonismus am N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-

Rezeptor). Da S(+)-Ketamin eine signifikant höhere Affinität zum NMDA-Rezeptor ausweist als das R(-)-Isomer, zeigt es in Reinform eine annähernd zweifach stärkere anästhetische und analgetische Potenz gegenüber dem Razemat. Eine bessere Steuerbarkeit, kürzere Aufwachzeiten und die Halbierung der Substanzbelastung bei grundsätzlich gleichem Nebenwirkungsspektrum sind die Vorzüge der Anwendung reinen S(+)-Ketamins (ADAMS und WERNER 1997). Die Markteinführung erfolgte 1997 (Ketanest[®]S, Gödecke/Parke-Davis Freiburg).

2.4.3 Pharmakokinetik und Metabolismus von Ketamin

Die lipophile Substanz erreicht im Hirngewebe etwa 6,5-fach höhere Höchstkonzentrationen als im Plasma (ADAMS und WERNER 1997), ist gut liquorgängig und liegt dort etwa in halber Höhe der Plasmakonzentration vor. Nach intramuskulärer Injektion wird es rasch resorbiert und ist zu 93 % bioverfügbar, bei einer Plasmaproteinbindung von 47 %. Die Metabolisierung erfolgt ebenfalls rasch durch Demethylierung zu Norketamin (anästhetische Wirkung 10 bis 30 %) und anschließender Hydroxylierung (Wirkung 0,1 % der Ausgangssubstanz) in der Leber. Ketamin hat eine relativ kurze Verteilungs- und Eliminationshalbwertszeit (Katze, Pferd: ca. 1 h, Mensch: 2,17 h). Die Metaboliten werden zu 97 % renal ausgeschieden und finden sich nur zu 3 % in den Fäzes wieder (DIWO und PETROIANU 2000).

2.4.4 Neuroprotektion durch Ketamin

Es bestehen Hinweise auf neuroprotektive Eigenschaften von Ketamin. Neuroprotektion wird im weitesten Sinne als die Verlängerung der vom neuronalen Gewebe tolerierten Ischämiedauer unter Einschluss von Prävention und Regeneration definiert (WERNER 2000). Der NMDA-Rezeptor ist ein komplexer Subtyp des Glutamatrezeptors und verfügt über mehrere Bindungsstellen (KEMPSKI 1994). Als entscheidender und klinisch relevanter Wirkmechanismus des Ketamin sind seine Effekte an der Phencyclidin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptorkomplexes im ZNS zu werten, wo es eine nicht-kompetitive Hemmung der Glutamatwirkung herbeiführt (ADAMS und WERNER 1997). Die Aminosäure Glutamat bewirkt als wichtigster exzitatorischer Neurotransmitter des ZNS einen neuronalen Kalziumeinstrom, der als Botenstoff (second messenger) vielfältige intrazelluläre zytotoxische Prozesse induziert (s. Kapitel 2.2.3). Die Gabe selektiver NMDA-Rezeptorblocker kann während zerebraler Ischämie die neurotoxische Wirkung des Glutamats

reduzieren. Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass hohe Dosen von Ketamin-Razemat zu einer Verminderung des ischämischen Neuronenschadens und der neurologischen Ausfälle führen können, wenn die Gabe der Substanz vor Beginn des Insultes begonnen und über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten wird (CHURCH et al. 1988). Auch 2 h posttraumatisch verabreichte Dosen Ketamin-Razemat (180 mg/kg i.p.) konnten in einem standardisierten Schädel-Hirn-Trauma-Modell bei Ratten neurologische Defizite und die Infarktgröße reduzieren (SHAPIRA et al. 1994). REEKER et al. (2000) untersuchten in einem Rattenmodell mit inkompletter zerebraler Hemispährenischämie den Einfluss von S(+)-Ketamin in unterschiedlichen Dosierungen auf neurologische Defizite und histologische Veränderungen. In ihren Studien konnten sie zeigen, dass S(+)-Ketamin in hoher Dosierung (1,0 mg/kg/min i.v.) in diesem Modell neuroprotektiv wirkt. Die niedrigere Dosierung (0,25 mg/kg/min i.v.) brachte dagegen keine signifikante Reduktion des Schadens gegenüber der Kontrollgruppe. Diese nahezu übereinstimmenden positiven tierexperimentellen Daten rechtfertigen noch keinen unkritischen klinischen Einsatz von Ketamin bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma oder zerebraler Ischämie, stellen aber einen Ansatz und eine gute Grundlage für weitere Forschungsarbeiten zum neuroprotektiven Potential von S(+)-Ketamin dar.

2.4.5 Neuroregeneration unter Ketamin

In-vitro-Untersuchungen an Neuronen zeigen, dass Ketamin Auswirkungen auf intrinsische und molekulare Regulationsmechanismen hat, die neben neuroprotektiven Effekten auch das Potential für neuroregenerative Wirksamkeit beinhalten könnten. So weisen z.B. kultivierte hippokampale Neuronen nach mechanischer Schädigung und Therapie mit Ketamin-Razemat oder S(+)-Ketamin nach sieben Tagen sowohl eine signifikant bessere Überlebensrate als auch ein signifikant größeres axonales Wiederaussprossen auf (HIMMELSEHER et al. 1996). An durch Glutamat-Exposition geschädigten hippokampalen Neuronen haben HIMMELSEHER et al. (2000) eine durch S(+)-Ketamin erhöhte Proteinexpression des „Growth Associated Protein-43“ (GAP-43) festgestellt. GAP-43 charakterisiert die axonalen Mikrodomänen differenzierter Nervenzellen und besitzt entscheidende Funktionen bei neuronalen Regenerations- und Wiederaussprossungsvorgängen (SKENE 1984).

Da bei adulten Tieren die Synthese von GAP-43 charakteristischerweise bei erfolgreicher Regeneration von geschädigten Nerven auftritt (SKENE 1984), erscheint dieser Befund klinisch bedeutsam und kann als neuroregeneratives Potential von S(+)-Ketamin gewertet werden.

2.4.6 Anwendung von Ketamin und S(+)Ketamin in der Tiermedizin

Auch in der Tiermedizin hat Ketamin einen weiten Anwendungsbereich. Als Injektionsnarkose ist die Anwendung von Ketamin ohne die technische Ausstattung eines Inhalationsgerätes möglich. Es wird häufig für kurze schmerzhaft eingriffe oder Behandlungen (Röntgenaufnahmen, Verbandswechsel bei schwierigen Patienten, besonders Katzen) angewendet (FREY und LÖSCHER 2002).

Die positiven Eigenschaften der dissoziativen Anästhesie durch Ketamin werden gerne in Kombination mit Sedativa, besonders α_2 -Adrenozeptoragonisten aber auch Benzodiazepinen, die die Ketamin-induzierte Muskelrigidität aufheben, eingesetzt. Da die Wirkung sehr stark von der Metabolisierung- bzw. von der Ausscheidungsgeschwindigkeit abhängt, wird der Einsatz nur bei jungen gesunden Tieren empfohlen. Bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma, Neigung zu epileptoiden Anfällen und zur Myelographie ist Ketamin wegen der Erhöhung des intrakraniellen Drucks kontraindiziert (ERHARDT et al. 2004). Um dem Auftreten von Krämpfen vorzubeugen, ist bei Raubkatzen, Hunden und Pferden eine adäquate Prämedikation erforderlich (FREY und LÖSCHER 2002). Außerdem ist bei Operation in der Pleural- und Abdominalhöhle zu berücksichtigen, dass hier nur eine schwache Analgesie durch Ketamin gegeben ist und die Schmerzausschaltung durch Kombination mit anderen Wirkstoffen gewährleistet werden muss. Ketamin-Razemat ist in verschiedenen Präparationen für Hunde und Katzen sowie für Lebensmittel liefernde Tiere zugelassen.

Dosierung:	Hund: 1,0 mg/kg KGW i.v.	}	(ERHARDT et al. 2004)
	5,0 mg/kg KGW i.m.		
	Katze: 1,5 mg/kg KGW i.v.	}	(HARKNESS 1995)
	8,0 mg/kg KGW i.m.		
	Ratte: 40-80 mg/kg KGW i.p.		

S(+)-Ketamin ist bisher nicht als Tierarzneimittel zu gelassen. Die Hälfte der Dosis wirkt bei Nagern und Kaninchen etwa so stark wie das Razemat. Durch seine kürzere Halbwertszeit ist es besonders für kurze Eingriffe bei diesen Spezies in Kombination mit Medetomidin von Vorteil, da es nach Antagonisierung von Medetomidin zu keinem oder nur einem sehr geringen Ketamin-Überhang kommt. Bei Hund und Katze bewirkt S(+)-Ketamin keine kürzer Wirkzeit als unter Ketamin-Razemat (ERHARDT et al. 2004).

2.5 Halothan

2.5.1 Allgemeines

Halothan zählt, neben Lachgas, Enfluran, Isofluran, Sevofluran und Desfluran, zu den heute für die Tiermedizin wichtigen Inhalationsanästhetika. Es ist in Deutschland nicht als Tierarzneimittel zugelassen, seine Anwendung ist jedoch bei allen Tierarten erfolgt (FREY und LÖSCHER 2002).

Halothan zeichnet sich durch seine hohe Wirksamkeit aus und ist vergleichsweise kostengünstig. Allerdings ist die therapeutische Breite von Halothan aufgrund hoher Kreislauftoxizität gering, so dass es nur in Dosierungen unter 1,0 Vol% eingesetzt werden sollte. Ferner verursacht es bei guten hypnotischen Eigenschaften keine ausreichende Analgesie und nur unzureichende Muskelrelaxation, was eine Kombination mit Neuroleptika - im Sinne einer „balanced anaesthesia“ - notwendig macht (ERHARDT et al. 2004).

Die Anwendung von Halothan war auch in der Humanmedizin lange Zeit weit verbreitet, ist aber inzwischen weitgehend von neueren volatilen Anästhetika wie Sevofluran und Desfluran verdrängt worden (ROCHE 2003).

2.5.2 Physikalische und chemische Eigenschaften

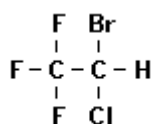


Abbildung 6: Strukturformel von Halothan

Das Inhalationsanästhetikum Halothan zählt zur Gruppe der halogenierten Kohlenwasserstoffverbindungen. Es hat gegenüber anderen Substanzen dieser Gruppe den Vorteil, dass es unter normalen Anwendungsbedingungen weder brennbar noch explosiv ist. Halothan hat die chemische Summenformel $\text{C}_2\text{HBrClF}_3$, ein Molekulargewicht von 197,4 kDa, der Siedepunkt liegt bei 50,2 °C und der Dampfdruck entspricht bei 20 °C 244,1 mmHg (STEFFEY 2001). Es hat einen angenehm süßlichen Geruch und reizt die Schleimhäute des Respirationstraktes nicht. Die klare, farblose, leicht flüchtige Flüssigkeit wird unter Zusatz von 0,01 % Thymol (Stabilisator) in braunen, lichtundurchlässigen Flaschen aufbewahrt, da unter dem Einfluss von Licht Brom und flüchtige Säuren freigesetzt werden können (FORTH et al. 1996).

2.5.3 Pharmakokinetik und Metabolismus

Halothan wird schnell über die Alveolarmembran der Lunge absorbiert. Aufgrund seiner Lipophilie und seiner geringen Blutlöslichkeit zeichnet es sich durch eine hohe Wirksamkeit, leichte Steuerbarkeit, schnelle und fast immer exzitationsfreie Narkoseeinleitung, ruhigen, gleichmäßigen Narkoseverlauf sowie durch relativ rasches Erwachen aus. Es schaltet abhängig von der Dosierung reversibel das Bewusstsein aus, dämpft das Schmerzempfinden und die vegetativen Reflexe und unterdrückt die Willkürmotorik. Die Aufrechterhaltung des Toleranzstadiums erfolgt durch Zufuhr von 0,5 bis 1,5 Vol% Halothan (Katze, Hund, Ratte). Es hat nur eine gering muskelrelaxierende Wirkung und wirkt dämpfend auf Atmung und Kreislauf (FREY und LÖSCHER 2002).

Der überwiegende Teil des Halothans (60-80 %) wird unverändert über die Lunge eliminiert. 20 bis 40 % des absorbierten Halothans werden in der Leber durch das Cytochrom P₄₅₀-System metabolisiert. Liegt eine ausreichende Sauerstoffsättigung vor, wird Halothan oxidativ zum Hauptmetaboliten Trifluoressigsäure und Halogenidionen (Chlorid, Bromid, Fluorid) abgebaut, die renal ausgeschieden werden. Eine weitere Möglichkeit des Halothanmetabolismus ist der reduktive Weg, wobei nur eine geringe bis keine Sauerstoffsättigung und die Gegenwart eines Elektronenspenders benötigt wird (NJOKU et al. 1997) und reaktive Abbauprodukte gebildet werden. Diese können bei Ratten durch kovalente Bindung an körpereigene Proteine in der Leber zentrolobuläre Nekrosen, ähnlich der „Halothan-Hepatitis“ beim Menschen, hervorrufen (FORTH et al. 1996).

2.5.4 Unerwünschte Wirkungen

Halothan wirkt dosisabhängig atemdepressiv, da das Atemzentrum nicht mehr auf einen Anstieg der CO₂-Spannung im Blut reagiert. Diese nachteilige Wirkung ist jedoch beim kontrolliert beatmeten Patienten zu vernachlässigen. Bedingt durch die hohe Lipidlöslichkeit des Inhalationsnarkotikums haben länger andauernde Halothan-Narkosen eine veränderte Zusammensetzung der Lipidfraktion der „Surfactants“ (physiologischer Flüssigkeitsüberzug der Lungenalveolen zur Reduktion der Oberflächenspannung) zur Folge, wodurch die Surfactantfunktion eingeschränkt wird. Es kommt zu vorübergehenden Atelektasen, denen teilweise durch einen positiven endexpiratorischen Druck bei der künstlichen Beatmung begegnet werden kann. Ferner hat Halothan eine relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur und erzeugt damit neben einer Bronchiolenerweiterung auch eine Verminderung

des peripheren Gefäßwiderstandes. Diese ruft zusammen mit der gleichzeitig Halothan-induzierten Abnahme der Kontraktionskraft des Myokards eine ausgeprägte Blutdrucksenkung hervor. Infolge der Stimulierung des Parasympathikus entsteht eine Bradykardie. Des Weiteren kann es wegen Sensibilisierung des Myokards und des Erregungsleitungssystems gegenüber Katecholaminen während einer Halothan-Narkose zu ventrikulären Arrhythmien, Tachykardien bis hin zum Kammerflimmern kommen. Eine endogene Adrenalin-Ausschüttung als Reaktion auf Schmerzen in zu flacher Narkose bzw. durch unzureichende Analgesie während der Operation können lebensbedrohliche Zwischenfälle auslösen und sind strengstens zu vermeiden (FREY und LÖSCHER 2002).

Ein seltener, oft jedoch tödlich verlaufender Zwischenfall bei einer Halothan-Narkose ist das Auftreten der malignen Hyperthermie. Diese Myopathie wird bei Schweinen, Pferden, Hunden, Katzen und Menschen beschrieben und beruht auf einem genetischen Defekt im Kalziumstoffwechsel der Skelettmuskulatur (GRONERT und MILDE 1981). Halothan hat hierbei Triggerfunktion und kann eine Kaskade mit Muskelkontrakturen, -rigidität, einen raschen Anstieg der Körpertemperatur, erhöhten Sauerstoffverbrauch, starke Azidose und Hyperkaliämie auslösen (FREY und LÖSCHER 2002).

Mit einer Häufigkeit von 1:100000 tritt beim Menschen 5 bis 8 Tage nach einer Halothan-Narkose eine schwere, oft tödliche Hepatitis auf, für deren Entstehung andere Ursachen ausgeschlossen werden können. Mehrmalige Anwendungen von Halothan in kurzen Zeitabständen und die Anwendung bei Patienten mit vorgeschädigter Leber sollten daher vermieden werden (FORTH et al. 1996).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Ziel der Untersuchung

Seit der Entdeckung, dass das Gehirn adulter Säugetiere auch nach Abschluss der embryonalen Neurogenese weiterhin die Fähigkeit besitzt, neue Neuronen zu bilden bzw. diese infolge eines neuronalen Schadens zu regenerieren, werden viele Bemühungen unternommen, die Mechanismen und mögliche Einflussfaktoren auf das neuronale Geschehen zu erforschen. Neben diversen anderen Stimuli bewirkt auch neuronale Schädigung infolge Ischämie eine Aktivierung der Neurogenese im adulten Gehirn (KEE et al. 2001; TAKASAWA et al. 2002) und aufgrund ihrer großen klinischen Relevanz in der Humanmedizin ist die zerebrale Ischämie Gegenstand zahlreicher Studien. In Studien an Nagern nach fokaler und globaler zerebraler Ischämie wurde eine 3- bis 8-fache Proliferationssteigerung neuronaler Stammzellen beobachtet (YAGITA et al. 2001; TAKASAWA et al. 2002). Auch die Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München hat einen Forschungsschwerpunkt auf die Untersuchung grundlegender Mechanismen der zerebralen Ischämie und die Testung neuroprotektiver Behandlungsstrategien gelegt. Die Forschungsgruppe „Neuroprotektion“ konnte bereits in einem Ischämiemodell der einseitigen Hemisphärenischämie der Ratte nachweisen, dass sowohl Inhalationsanästhetika als auch intravenöse Anästhetika den histopathologischen Schaden und das neurologische Defizit reduzieren (KOCHS et al. 1992; WERNER et al. 1995; ENGELHARD et al. 1999; REEKER et al. 2000; ENGELHARD et al. 2004).

Bisher nicht genauer untersucht wurde die Frage, inwieweit die in unterschiedlichen Studien zur Versuchsdurchführung bei den Tieren angewendeten Anästhetika die Generierung von Stammzellen nach zerebraler Ischämie beeinflussen und ob die Neurogenese durch die Wahl des Anästhetikums bzw. durch Anwendung unterschiedlicher Konzentration desselben beeinflusst werden kann.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, in einem Ischämiemodell der Ratte mit inkompletter temporärer globaler zerebraler Ischämie mit anschließender Reperfusion unter ansonsten identischen Versuchsbedingungen die Wirkung von S(+)-Ketamin auf die Neurogenese im Hippokampus zu untersuchen. Dies geschieht in zwei unterschiedlichen Dosierungen von S(+)-Ketamin (0,75 bzw. 1,0 mg/kg/min) im Vergleich zu einer mit Halothan narkotisierten Versuchsgruppe.

Parallel zur vorliegenden Arbeit werden in einer Studie mit ähnlichem Design am gleichen Ischämiemodell die Auswirkungen einer Sevofluran-Narkose untersucht (KLUGE, in Vorb.).

Die Untersuchungen dienen der Qualitätssicherung weiterer Studien mit diesem Ischämiemodell und ermöglichen eine Standardisierung des Modells bezüglich der Wahl des Hintergrundanästhetikums. Des Weiteren könnten Rückschlüsse auf mögliche positive Effekte der Anästhetika auf die Migration und Differenzierung der neu gebildeten Neuronen nach zerebraler Schädigung gezogen werden.

In dieser Studie wird mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) unter dem Lichtmikroskop eine Differenzierung in ischämisch geschädigte und ungeschädigte Neuronen bzw. Hippokampus-Regionen vorgenommen und so das Ausmaß der Zell- und Gewebeschädigung bei allen Versuchstieren ermittelt.

Das Ausmaß der ablaufenden Regenerationsprozesse im Gyrus dentatus nach 28 Tagen wird semi-quantitativ mit der immunhistochemischen BrdU-Färbung bestimmt. Diese Ergebnisse sollen die Gesamtzahl aller neugebildeten Zellen darstellen, die sich während der In-vivo-Markierung mit BrdU, also im Zeitraum von Tag 1 bis Tag 7 postoperativ, neu gebildet haben. In einem zweiten Schritt schließt sich die qualitative Auswertung der Gehirnproben mit der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung an, mit welcher der prozentuale Anteil an Neuronen bezogen auf alle neugebildete Zellen bestimmt werden kann. Als Maß der Neurogenese dient die absolute Zahl neuer Neuronen im Gyrus dentatus, die aus den beiden oben genannten Ergebnissen errechnet wird.

3.2 Material und Methodik

3.2.1 Versuchstiere

Die Eingriffe und Untersuchungen dieser Studie werden an 56 männlichen Sprague-Dawley Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) mit einem Durchschnittsgewicht zum Zeitpunkt der Operation von 359 ± 24 g durchgeführt. Nach Anlieferung der Tiere vom Züchter beginnt die Haltung der Tiere im Institut zur Eingewöhnung mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn in Standardkäfigen (Makrolon Typ 4, H: 20 cm, B: 35 cm, T: 55 cm) in Gruppen von bis zu 5 Tieren. Zu Versuchsbeginn werden die Tiere in Einzelkäfige umgesetzt und mit Sicht- und Geruchskontakt zu anderen Tieren gehalten. Futter (Alleinfutterpellets für Ratten und Mäuse „sniff R/M-Haltung, 10 mm, Nitrosamin arm“ der Fa. Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser erhalten die Tiere ad libitum. Entsprechend den Vorgaben für Versuchstierhaltung sind die Tiere bei einer Raumtemperatur von 20 bis 23 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60 % untergebracht. Die Beleuchtung erfolgt in je

12-stündigen Intervallen im Hell-Dunkel-Rhythmus mit einer Beleuchtungsintensität im Käfig von 50 bis 100 Lux in der Hellphase. Als Einstreu dient entkeimtes und entstaubtes Weichholzgranulat (Fa. Altromin, Lage/Lippe).

Um einen niedrigen normoglykämischen Zustand (Blutglukosekonzentration 60-80 mg/dl) vor und während der Operation zu erreichen, setzt man die Tiere zwölf Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern. Wasser steht den Tieren jedoch weithin ad libitum zur Verfügung.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG i. d. F. vom 25.05.1998, BGBl I S. 1105) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2.2 Versuchsaufbau

Der Versuch besteht aus drei Teilen:

- 1) Der **operative Teil** umfasst die Präparation, die Äquilibration, den Blutentzug, die Ischämie, die Reinfusion des Blutes sowie die Erholungs- und anschließende Aufwachphase.
- 2) Die **In-vivo-Markierung** der Stammzellen erfolgt durch die intraperitoneale Applikation von BrdU täglich ab dem 1. bis einschließlich 7. Tag postoperativ. Der Beobachtungszeitraum ist auf 28 Tage nach der Operation festgelegt und verläuft ohne weitere Manipulation an den Tieren. Am Tag 28 werden die Tiere euthanasiert und das Gehirn konserviert.
- 3) Die **laboranalytischen Untersuchungen** des Gehirns erstrecken sich auf die Beurteilung des Gewebeschadens mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung, den qualitativen Nachweis der mit 5-Bromo-2-Deoxyuridin markierten Zellen durch Immunfluoreszenz-Doppelfärbung sowie den quantitativen Nachweis BrdU-markierter Zellen mit der BrdU-Färbung.

Alle Tiere werden unmittelbar vor der Operation einer kurzen Allgemeinuntersuchung unterzogen, um sicherzustellen, dass nur klinisch gesunde Tiere in diesen Versuch eingehen.

3.2.3 Gruppeneinteilung

Der Versuch umfasst insgesamt 56 Tiere. 48 Tiere durchlaufen den operativen Abschnitt des Versuchs. Sie werden nach Abschluss der Präparation randomisiert in sechs Versuchsgruppen eingeteilt. Acht weitere Tiere (ohne operativen Eingriff) bilden die Nativgruppe, die zur Gewinnung physiologischer Vergleichswerte herangezogen wird.

Die sechs Versuchsgruppen umfassen drei Ischämiegruppen und drei Kontrollgruppen. Die Ischämiegruppen unterscheiden sich untereinander in der Form der angewendeten Narkose. Jeder Ischämiegruppe steht eine Kontrollgruppe gegenüber, bei der dieselbe Narkose verwendet, jedoch keine Ischämie induziert wird. Die Ischämie wird erzeugt durch Okklusion der Aa. carotides communes (BCAO) mit gleichzeitigem Blutentzug bis zu einem mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) von 40 mmHg über 10 Minuten.

Ischämiegruppen:

Gruppe 1: 0,8 Vol% Halothan + 0,01 mg/kg/h Fentanyl + BCAO

⇒ *Halothan-Ischämiegruppe*

Gruppe 2: 0,75 mg/kg/min S(+)Ketamin + 0,01 mg/kg/h Fentanyl + BCAO

⇒ *0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe*

Gruppe 3: 1,0 mg/kg/min S(+)Ketamin + 0,01 mg/kg/h Fentanyl + BCAO

⇒ *1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe*

(BCAO = beidseitige Okklusion der Arteria carotis communis)

Kontrollgruppen:

Gruppe 4: 0,8 Vol% Halothan + 0,01 mg/kg/h Fentanyl (ohne BCAO)

⇒ *Halothan-Kontrollgruppe*

Gruppe 5: 0,75 mg/kg/min S(+)Ketamin + 0,01 mg/kg/h Fentanyl (ohne BCAO)

⇒ *0,75 mg-Ketamin-Kontrollgruppe*

Gruppe 6: 1,0 mg/kg/min S(+)Ketamin + 0,01 mg/kg/h Fentanyl (ohne BCAO)

⇒ *1,0 mg-Ketamin-Kontrollgruppe*

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Zusätzlich gibt es eine weitere Gruppe mit Nativtieren (**Nativgruppe**), die den operativen Teil des Versuchs nicht durchlaufen und als physiologische Vergleichswerte dienen.

Gruppe 7: wach, ohne Narkose, ohne BCAO

⇒ Nativgruppe

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere

Anästhetikum	Kontrollgruppen (keine BCAO)	Ischämiegruppen (BCAO über 10 min)
Halothan 0,8 Vol% + Fentanyl	Halothan-Kontrollgruppe n=8	Halothan-Ischämiegruppe n=8
S(+)-Ketamin 0,75 mg/kg/min + Fentanyl	0,75 mg-Ketamin- Kontrollgruppe n=8	0,75 mg-Ketamin- Ischämiegruppe n=8
S(+)-Ketamin 1,0 mg/kg/min + Fentanyl	1,0 mg-Ketamin- Kontrollgruppe n=8	1,0 mg-Ketamin- Ischämiegruppe n=8
-----	Nativtiere n=8	-----

Gruppeneinteilung der Versuchstiere nach Narkoseform, Kontroll- und Ischämiegruppen. Hinzu kommt die Nativgruppe mit weiteren 8 Tieren.

3.2.4 Operativer Abschnitt

Nach Abschluss der Operationsvorbereitungen und Überprüfung sämtlicher technischer Geräte auf ihre Funktionalität, beginnt der operative Abschnitt, der sich in folgende 7 Abschnitte gliedert:

- 1. Präparation** ca. 90 min
Narkoseeinleitung, Intubation, Anästhesie mit Halothan, Katheterisierung der Gefäße, Applikation der Messsonden, Umschlingen der Aa. carotides communes.
- 2. Äquilibrierungsphase** 30 min
nach Umstellen auf das Anästhetikum und die Konzentration entsprechend der Gruppenzuteilung, Blutdruckstabilisierung durch Gabe von Arterenol, Beginn der Fentanyl-Infusion.
Messung 1 (Ausgangswert) (Messparameter s. S. 44)
- 3. Blutentzug** über 8 min
zur hämorrhagischen Hypotension.
- 4. Ischämie** 10 min
Hypotension (MAP konstant bei 40 mmHg) und temporärer Verschluss beider Aa. carotides communes.
Messung 2 (Ende der Ischämie)
- 5. Reinfusion** über 15 min
des entzogenen Blutes, Eröffnung der arteriellen Okklusion und Reperfusion des Gehirns.
Messung 3 (Ende der Reperfusion)
- 6. Erholungsphase** 15 min
ohne jede Manipulation.
Messung 4 (Ende der Erholung)
- 7. Ende der operativen Phase (Aufwachphase)**
Wundverschluss, subkutane Applikation eines Flüssigkeitsdepots und Ende der Narkose.

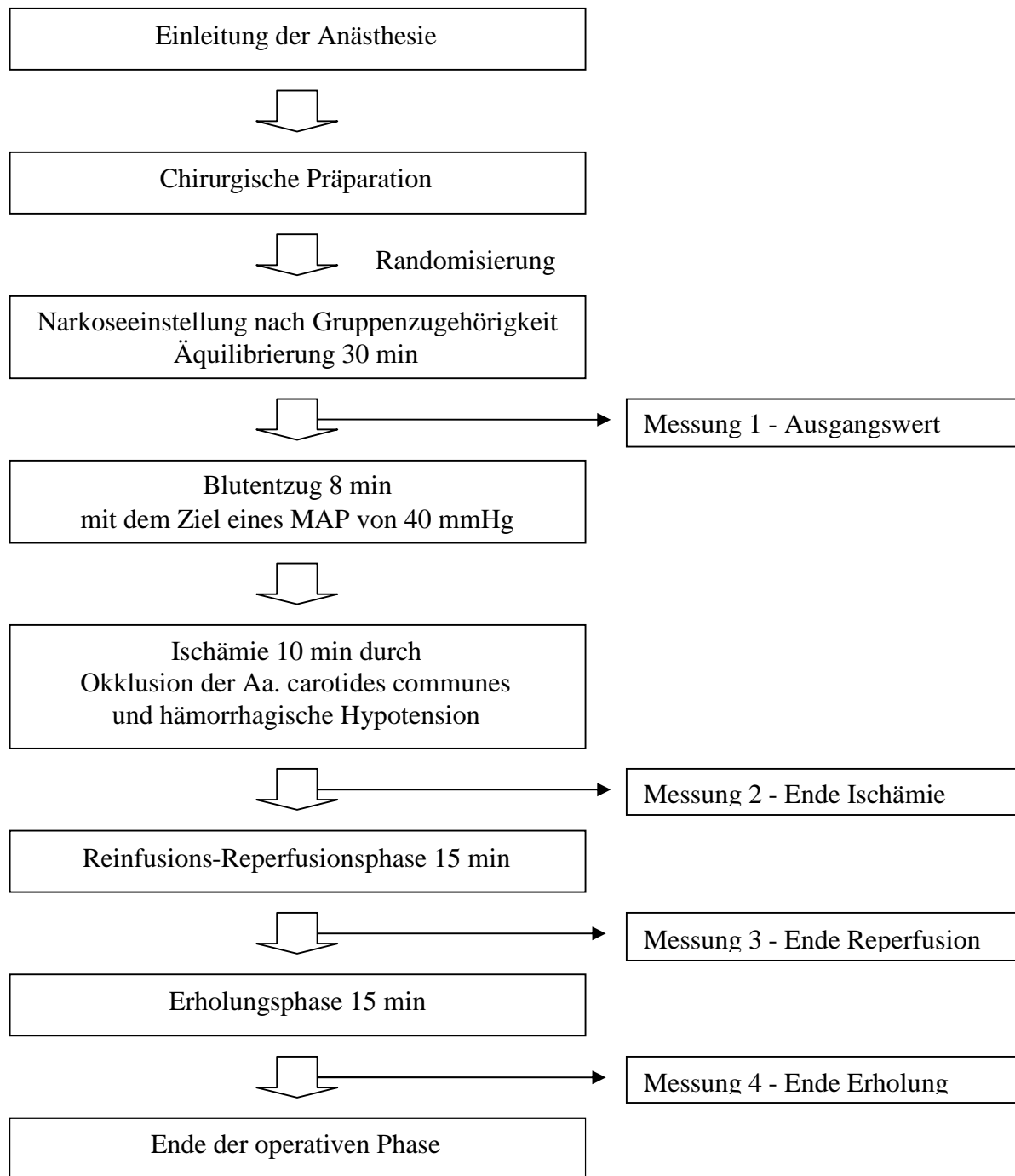


Abbildung 7: Übersicht über das Verlaufsprotokoll des operativen Abschnitts

3.2.4.1 Narkoseeinleitung

Die Narkoseeinleitung erfolgt durch das Einsetzen des Tieres in einen geschlossenen Glaszylinder, der mit einem Halothan (Halocarbon Laboratories, North Augusta, USA) getränkten Tupfer ausgelegt ist. Man wartet den Eintritt der Bewusstlosigkeit des Tieres ab, entnimmt es zügig aus dem Zylinder und fixiert es an einer schiefen Ebene mit den Schneidezähnen des Oberkiefers in einer Drahtschlinge in Rückenlage. In dieser gestreckten Position kann die orotracheale Intubation - unter Zuhilfenahme eines eigens von STEIGENBERGER konstruierten Laryngoskops - mit einem 5 cm langen Tubus (5 cm eines Herzkatheters, Cavafix Certo 225, G18, Fa. Braun AG, Melsungen) unter Sichtkontrolle einfach durchgeführt werden.

Nun lagert man die Ratte auf den Operationstisch um, schließt sie an eine volumengesteuerte Beatmungspumpe (Harvard Rodent Ventilator, Model 683, Harvard Apparatus Inc., South Natick Massachusetts, USA) an und beatmet sie kontrolliert mit einem Sauerstoff-Luft-Gemisch im Verhältnis 1:2 (inspiratorische Sauerstofffraktion, $FiO_2=0,33$) und 1,0 bis 1,8 Vol% Halothan nach Wirkung.

Dabei handelt es sich um ein Überschusssystem ohne Rückatmung mit konstanter Frischgaszufuhr von ca. 2 l/min, dem eine Gasabsaugung angeschlossen ist. Ein Atemgasmonitor (Capnomac, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) misst die endexpiratorischen Gaskonzentrationen von CO_2 , O_2 und Halothan. Die endexpiratorische CO_2 -Konzentration wird, geregelt durch die Beatmungsfrequenz, bei Werten zwischen 38 und 42 mmHg konstant gehalten. Diese Form der Narkose bleibt während der Präparation unverändert.

Das Maul der Ratte wird mit feuchten Mulltupfern ausgestopft, um ein Austrocknen der Maulschleimhaut und ein Vorbeiatmen am Tubus einzuschränken (Cuff-Wirkung).

3.2.4.2 Chirurgische Präparation

Sobald die Ratte das Toleranzstadium der Narkose erreicht hat, wird mit der Präparation begonnen. Zum Anbringen der Elektroden des Elektrokardiogramms (EKG) wird das Tier in Rückenlage verbracht. Die Nadelelektroden werden beidseitig subkutan in Höhe der Regio axillaris (Achselhöhle) ca. 1 cm paramedian des Sternums platziert und leiten die Impulse an die Messapparatur (Cardiocarp II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) weiter, die das Elektrokardiogramm auf den Monitor überträgt. Die Herzfrequenz lässt sich durch Auszählen des EKG ermitteln.

Um ein Auskühlen der Ratte während der Narkose zu verhindern, wird die perikranielle Temperatur (T_{peri}) gemessen. Hierfür wird, nachdem man das Tier in Bauchlage gedreht hat, ein Messfühler (0,2 mm dick und 1,5 cm lang/Hypodermic needle probe, Fa. Omega, Stanford, CT, USA) schädelnah in den Muskel (M.) temporalis eingestochen. Dieser ist direkt mit einem Temperatur-Kontrollgerät (Fa. Omega, Stanford, CT, USA) und einer über dem Tierkörper angebrachte Wärmelampe gekoppelt, die so aufeinander eingestellt sind, dass T_{peri} konstant auf 37,5 °C gehalten wird.

Mit Dexpanthenol-Creme (Bepanten[®] Augen- und Nasensalbe, Fa. Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) und aufgelegten Mullkompressenstückchen schützt man die Augen vor Austrocknung.

Für die Ableitung des Elektroenzephalogramms (EEG) (Oscilloscope HM205-3, Hameg Instruments, Melrose, Massachusetts) werden jeweils eine Nadelsonde rechts und links etwa 5 mm kaudal des lateralen Augenwinkels, sowie rechts und links über den Ohransätzen eingestochen. Zusätzlich bringt man eine Erdungselektrode an der Schwanzwurzel an. Die Ableitungen des Elektroenzephalogramms werden direkt auf einen Monitor übertragen. Die Ableitungen des EEG und des EKG dienen der Beurteilung der physiologischen Hirnaktivität und der Narkosetiefe.

Es schließt sich die Präparation und Katheterisierung der Gefäße an. Das Fell an der rechten Halsseite und medial am Oberschenkel wird rasiert und mit einem Desinfektionsmittel (Cutasept[®]F, Fa. Bode, Hamburg) eingesprüht. Vor der Inzision unterspritzt man die Haut der rechten Inguinalgegend mit Bupivacain 0,5 % (Bucain[®] 0,5 %, Curasan AG, Kleinostheim), um eine ausreichende Schmerzausschaltung zu gewährleisten. Nach dem Hautschnitt präpariert man stumpf durch das subkutane Fettgewebe und legt die A. femoralis, die V. femoralis und den N. femoralis frei.

Um eine Thrombosierung der Katheter zu verhindern, werden alle verwendeten Polyethylenkatheter (Außendurchmesser: 0,97 mm, Innendurchmesser: 0,58 mm, Länge: 33,5 mm, LL-Aufsatz) über Nacht in Heparinlösung (Liquemin[®]F, LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen) gelagert und vor ihrer Anwendung mit einer heparinisierten Vollelektrolytlösung (Thomæjonin[®], Fa. Braun AG, Melsungen) (1000 I.E. Heparin auf 500 ml Lösung) gespült.

Die A. femoralis wird eröffnet, ein angespitzter Katheter eingeführt und dieser mit einem Faden an dem Gefäß fixiert. Er dient über einen Druckdom (MX 960, Fa. Medexmedical, Lancashire, England) der invasiven arteriellen Blutdruckmessung sowie der wiederholten

Probengewinnung für die Blutgasanalyse und Messung der Blutglukosekonzentration. Für den Blutentzug, über den in der Ischämiephase die hämorrhagische Hypotension erzeugt wird, wird die V. femoralis nach Eröffnen des Gefäßes mit einem stumpfen Katheter katheterisiert. Das entnommene Blut wird anschließend über denselben Katheter wieder reinfundiert.

Sodann inzidiert man die Haut an der rechten Halsseite paramedian kaudodorsal nachdem man die Haut in diesem Bereich mit Bupivacain unterspritzt hat. Die V. jugularis wird durch stumpfe Präparation zwischen dem M. brachiocephalicus und M. sternooccipitalis im Sulcus jugularis dargestellt. In dieses Gefäß werden drei Katheter eingebracht und fixiert. Je einer für die Applikation von Fentanyl Dihydrogenzitat (Fentanyl-Janssen[®] 0,1 mg, Pharmaceutica N.V., Beerse, Belgien), Norepinephrinhydrochlorid (Arterenol[®] 1 ml, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main) und S(+)-Ketamin (KetanestS[®] 25 mg/ml, Pharma Hameln GmbH, Hameln). Um eine identische Manipulation an allen Tieren vorzunehmen, wird der dritte Katheter auch bei den Tieren plaziert, die kein Ketamin verabreicht bekommen. Kleine Blutungen werden mit einem Hämostyptikum (Tabotamp[®], Ethicon, Norderstedt) gestoppt, das um die Eintrittsstelle der Katheter in die Vene gewickelt wird.

Beidseitig ventrolateral der Trachea sucht man in der Tiefe die A. carotis communis auf und trennt diese vorsichtig vom Truncus vagosympathicus und dem umliegenden Gewebe. Die A. carotis communis jeder Seite wird mit je einem 1 mm dicken Gummiband (Fa. Ethicon, Norderstedt) umschlungen und wieder in die Tiefe zurückgelegt. Die Gummibänder dienen dem schnellen Wiederauffinden der Gefäße bei der Induktion der Ischämie. Damit ist die Präparation abgeschlossen.

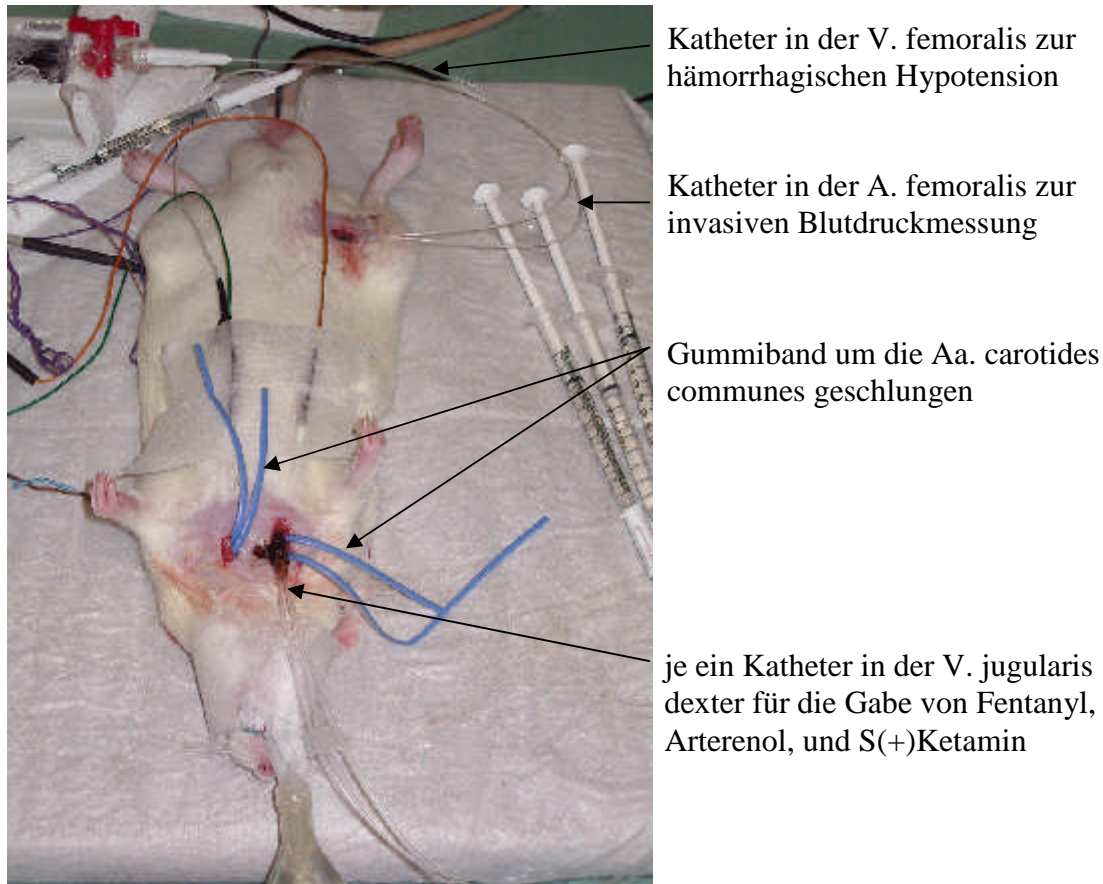


Abbildung 8: Ratte während des operativen Abschnitts nach abgeschlossener Präparation

3.2.4.3 Narkose

Nach Abschluss der Präparation wird die Narkose entsprechend der Gruppenzugehörigkeit des Tieres umgestellt und bis zum Ende des Versuchs nicht mehr verändert.

Alle Tiere erhalten eine Dauerinfusion über die V. jugularis von 0,01 mg/kg/h Fentanyl, deren exakte Dosierung ein Perfusor (Spritzenpumpe Modell 11, Fa. Harvard Apparatus, South Natick, USA) sicherstellt.

Um gleiche Ausgangsbedingungen vor Beginn der Ischämieinduktion zu gewährleisten, wird bei allen Tieren ein mittlerer arterieller Blutdruck von 110 mmHg angestrebt. Dies erreicht man durch kontrollierte Applikation von Norepinephrinhydrochlorid (Arterenol, ca. 0,5-1,3 µg/kg/min bzw. 0,03-0,078 mg/kg/h) nach Wirkung über einen zweiten Katheter in der V. jugularis.

Tiere der Halothan-Ischämiegruppe

Die acht Tiere der Halothan-Ischämiegruppe durchlaufen alle sieben Phasen des operativen Abschnitts (s. Kap. 3.2.4). Zu Beginn der Äquilibrationsphase wird die Halothan-Konzentration in der Beatmungsluft auf 0,8 Vol% reduziert und gleichzeitig mit der intravenösen Infusion von 0,01 mg/kg/h Fentanyl zur Schmerzbekämpfung begonnen. Man setzt die Infusion von Norepinephrin nach Wirkung fort und beatmet die Tiere mit Sauerstoff/Luft ($FiO_2=0,33$). Nach 30 min ist die Äquilibrationsphase abgeschlossen. Die Narkosekonzentration wird bis zum Ende der Operation konstant gehalten.

Tiere der Halothan-Kontrollgruppe

Die acht Tiere dieser Gruppe durchlaufen die selben Schritte des Versuchs wie die Tiere der Halothan-Ischämiegruppe ohne hämorrhagische Hypotension und Okklusion der Aa. carotides communes. Die Narkoseeinstellung und -führung entspricht der Halothan-Ischämiegruppe.

Tiere der 0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe

Dieser Gruppe werden acht Tiere zugeteilt, bei denen die Ischämieinduktion nach oben angegebenem Operationsprotokoll (s. Kap. 3.2.4) durchgeführt wird. Nach Narkoseeinleitung und abgeschlossener Präparation wird die Halothan-Inhalation beendet und durch einen Perfusor mit 0,75 mg/kg/min S(+)Ketamin über die V. jugularis ersetzt. Ferner wird mit der Gabe von 0,01 mg/kg/h Fentanyl ebenfalls über einen Perfusor begonnen und die Gabe von Arterenol wird nach Wirkung beibehalten.

Tiere der 0,75 mg-Ketamin-Kontrollgruppe

Ebenfalls acht Tiere werden dem gleichen Prozedere wie die Ketamin-Ischämiegruppe unterzogen, wobei auf die Ausführung der Ischämieinduktion verzichtet wird.

Tiere der 1,0 mg-Ketamin-Ischämie- bzw. Kontrollgruppe

Die Gruppengröße und die Versuchsdurchführung entspricht der der oben genannten Ketamin-Gruppen allerdings mit der Dosierung von 1,0 mg/kg/min S(+)Ketamin.

Tiere der Nativgruppe

Die acht Tiere dieser Gruppe durchlaufen den operativen Abschnitt des Versuchs nicht sondern werden nach der üblichen Eingewöhnungsphase von einer Woche lediglich der

In-vivo-Markierung unterzogen. Der Beobachtungszeitraum beträgt 28 Tage ab dem Tag der ersten BrdU-Applikation (5-Bromo-2-Deoxyuridine, Sigma, Steinheim).

Das neuronale Gewebe dieser ansonsten unbehandelten Nativtiere liefert physiologische Vergleichswerte hinsichtlich der Zellteilungsaktivität und Zelldifferenzierung.

3.2.4.4 Physiologische Parameter

Während des gesamten operativen Geschehens werden wiederholt zu festgelegten Zeitpunkten folgende physiologische Parameter der Tiere gemessen:

Tabelle 2: Messzeitpunkte der Messparameter

Messzeitpunkt	Gemessene Parameter
Messung 1 – Ausgangswert (AW) am Ende der Äquilibrationsphase	perikranielle Temperatur (°C)
Messung 2 – Ischämie (Isch) am Ende der Ischämiephase	mittlerer arterieller Blutdruck (MAP, mmHg) Herzfrequenz (Schläge/min) Blutglukose (Glc, mg/dl)
Messung 3 – Reperfusion (Rep) am Ende der Reperusionsphase	arterieller Sauerstoffpartialdruck (PaO ₂ , mmHg) arterieller Kohlendioxidpartialdruck (PaCO ₂ , mmHg) pH-Wert
Messung 4 – Erholung (Erh) am Ende der Erholungsphase	Hämoglobinkonzentration (Hb, mg/dl)

Messzeitpunkte und Messwerte, die während des operativen Abschnitts im Versuch erhoben werden.

Temperatur:

Die Messung der perikraniellen Temperatur erfolgt mit einer Temperatursonde (Hypodermic Needle Probes Hyp f-30-1/2-T-G-60-SMP-M, Stanford, USA) im rechten M. temporalis. Diese Sonde ist gekoppelt mit einem Temperatur-Kontrollgerät (Ω Omega, Stamford, USA) und einer über dem Tier angebrachten Wärmelampe. Über einen Rückkopplungsmechanismus schaltet sich diese Wärmelampe automatisch ein bzw. aus, um die perikranielle Temperatur des Tieres auf konstant 37,5 °C zu halten.

Blutdruck:

Zur invasiven Messung des Blutdruckes ist ein Druckdom (MX 960, Fa. Medexmedical, Lancashire, Großbritannien) an den Katheter in der rechten A. femoralis angeschlossen, der ferner für den nötigen Gegendruck mit einem Beutel physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, Deltaselect, Pfullingen) (mit Druckmanschette) verbunden ist. Der Druckdom steht mit der Messapparatur (Cardiocap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) in Verbindung, die den systolischen Blutdruck, den diastolischen Blutdruck und den arteriellen Mitteldruck (MAP) bestimmt. Vor jedem Versuchsbeginn muss das Messgerät dem atmosphärischen Druck entsprechend neu kalibriert werden.

Blutglukosemessung:

Die Bestimmung der Konzentration der arteriellen Blutglukose erfolgt mit Hilfe eines Schnelltests (Glucometer Elite, Fa. Bayer Diagnostics, München).

Atmung:

Die Atmung wird mit Hilfe eines Atemgasmonitors (Capnomac, Fa. Datex Helsinki, Finnland) überwacht. Dargestellt werden die Atemfrequenz, das Atemzugsvolumen sowie die in- und expiratorischen Halothan-, O₂- und CO₂-Werte.

Blutgasanalyse (BGA):

Zur Durchführung der BGA wird zu den genannten Messzeitpunkten über den Katheter der A. femoralis Blut mit einer heparinisierten Kapillare (MultiCap 175µl, Chiron Diagnostics GmbH, Fernwald) entnommen.

Folgende Parameter werden mit Hilfe des pH/Blutgas Analyzer 1306 (Fa. Instrumentation Laboratory, Mailand, Italien) bestimmt: PaO₂, PaCO₂, pH-Wert, BE, Hb, Hkt.

Elektrokardiographie:

Zwei subkutane Nadelelektroden, rechts und links ventral am Thorax etwa einen Zentimeter neben dem Brustbein auf Höhe der Achselhöhle, dienen der Ableitung des EKG. Die Elektroden sind ebenfalls mit dem Cardiocap II-Monitor (Fa. Datex, Helsinki, Finnland) verbunden, der das EKG darstellt. Die Herzfrequenz wird durch Anlegen eines EKG-Lineals am Standbild des EKG-Monitors ausgemessen und dokumentiert.

Elektroenzephalographie:

Die Messung des EEG erfolgt über fünf Nadelelektroden, wovon jeweils eine Elektrode auf der rechten und linken Seite des Kopfes etwa 5 mm kaudal des lateralen Augenwinkels, zwei Nadelelektroden rechts und links über dem Ohransatz und eine weitere Erdungselektrode an der Schwanzwurzel angebracht sind. Die Ableitungen des EEG werden über eine Messeinheit (Oscilloscope HM205-3, Hameg Instruments, Melrose, Massachusetts) registriert und auf einen Bildschirm projiziert.

Das Eintreten der zerebralen Ischämie wird über die Veränderung des EEG im Sinne eines isoelektrischen EEG verifiziert.

3.2.4.5 Ischämieinduktion

Phase der Äquilibration:

Ist die Präparation beendet und die Umstellung der Narkose erfolgt, beginnt die Äquilibrationsphase. Sie dient als Adaptationszeit zur Stabilisierung der Stoffwechselfvorgänge. Dies ist nötig, um nach unterschiedlich schneller Anflutung des Narkotikums in den verschiedenen Geweben und nachfolgenden Umverteilungsvorgängen, eine konstante Medikamentenkonzentration im gesamten Tierkörper zu erzielen (steady state). Um gleiche Ausgangsbedingungen zu gewährleisten, wird bei allen Tieren ein MAP von 100-110 mmHg angestrebt. Dies erreicht man durch kontrollierte Gabe von Norepinephrin nach Wirkung.

Die Äquilibrationsphase dauert 30 min und am Ende dieser Phase werden die präischämischen Basiswerte (Messung 1 - Ausgangswert) ermittelt.

Phase des Blutentzugs:

Ist die Äquilibration abgeschlossen und eine Stabilisierung des Kreislaufes eingetreten, schließt sich die Phase der Hypoperfusion an. Ziel ist es, über einen Zeitraum von 8 min durch Blutentnahme den MAP auf 40 mmHg zu senken und diesen Wert nachfolgend konstant zu halten. Um dies zu erreichen wird die Gabe von Norepinephrin eingestellt und über den in der V. femoralis liegenden Katheter unter exakter Kontrolle des Blutdruckes so viel Blut entnommen wie nötig. Die entzogene Blutmenge schwankt in einem Bereich von $7,5 \pm 2,4$ ml Blut. Dieses Blut wird in heparinisierten 5 ml-Spritzen (Fa. Braun AG, Melsungen) bis zur Reinfusion auf Körpertemperatur gehalten und geschwenkt, um ein Absetzen der Blutkörperchen zu verhindern. Die hämorrhagische Hypotension führt zu einer Minderdurchblutung im gesamten Gehirn, die durch den sich nun anschließenden Verschluss

der Hauptversorgungsgefäße des Gehirns verstärkt wird. Ist nach 8 min der MAP von 40 mmHg erreicht, wird der Blutfluss in den Aa. carotides communes mit je einem Gefäßclip unterbunden, womit die Phase der zerebralen Ischämie eingeleitet wird.

Phase der Ischämie:

Beträgt der MAP 40 mmHg und sind die Aa. carotides communes mit Clips verschlossen, beginnt die 10-minütige Ischämie-Phase. Der MAP wird manuell durch Gabe bzw. Entnahme geringfügiger Mengen Blut über die V. femoralis konstant gehalten.

Nach Ablauf der 10 min werden ein weiteres Mal die Messparameter dokumentiert (Messung 2 - Ende Ischämie).

Phase der Reinfusion/Reperfusion:

Diese Phase beginnt mit dem Lösen der Clips von den Aa. carotides communes, wodurch die Reperfusion des Gehirns beginnt. Das vor der Ischämie entnommene Blut wird nun langsam und gleichmäßig über 15 min reinfundiert. Da es sich hierbei um venöses, CO₂-reiches Blut handelt, das in verhältnismäßig kurzer Zeit in den Kreislauf gelangt, kommen die Tiere in eine azidotische Stoffwechsellage (Säureüberschuss). Um den Tieren ein Abatmen dieses CO₂-Überschusses zu erleichtern, werden sie während dieser Phase - abhängig von der expiratorischen CO₂-Konzentration - hyperventiliert.

Gegen Ende der Reperfusion wird erneut Blut zur Blutgasanalyse über den Katheter der A. femoralis entnommen und alle weiteren Messwerte aufgezeichnet (Messung 3 - Ende Reperfusion).

Phase der Erholung:

Nach der vollständigen Reinfusion des zuvor entnommenen Blutes beginnt die 15-minütige Erholungsphase.

Während dieser Phase werden keinerlei Manipulationen am Tier vorgenommen. Sie dient der Erholung und der erneuten Stabilisierung des Kreislaufes der Tiere. Um bei allen Tieren nun erneut einen MAP von mindestens 100 bis 110 mmHg zu gewährleisten, wird ,falls nötig, erneut Norepinephrin nach Wirkung verabreicht.

Nun werden zum vierten und letzten Mal die physiologischen Daten der Tiere erfasst (Messung 4 - Ende Erholung).

Ende des operativen Abschnitts

Abschließend werden die Sonden und Katheter entfernt und die Wunden verschlossen (4/0 Prolene[®], Ethicon GmbH, Norderstedt). Die Tiere erhalten ein Flüssigkeitsdepot von 5 ml (erwärmte Thomaejonin[®]-Infusionslösung) subkutan auf zwei Körperstellen verteilt appliziert. Bei den Tieren der Ketamin-Gruppen wird von der Depotmenge das Volumen der bereits mit der Narkose verabreichten Infusionsmenge abgezogen.

Nach Beendigung der Narkose wird das Tier bis zum Einsetzen der Spontanatmung mit 100 % Sauerstoff beatmet, nach Rückkehr der Spontanatmung, der Reflexe und des Muskeltonus extubiert und weiterhin sorgfältig überwacht.

3.2.5 In-vivo-Markierung der Stammzellen

Zur In-vivo-Markierung der Stammzellen wird den Tieren systemisch BrdU verabreicht. (BrdU ist ein Thymidin-Analogon, welches an Stelle von Thymidin in die DNS von mitotisch aktiven Zellen eingebaut wird und somit neu entstandene Zellen kennzeichnet.)

Über sieben Tage - vom ersten bis zum siebten postoperativen Tag - bekommen die Ratten täglich zur gleichen Uhrzeit BrdU intraperitoneal (i.p.) gespritzt. Die Dosierung beträgt 100 mg/kg Körpergewicht (KGW) in einer Konzentration von 20 mg/ml NaCl 0,9 % (Isotonische Kochsalzlösung, Fresenius Kabi, Bad Homburg). Nach genauer Gewichtsbestimmung der Tiere kann die exakt zu applizierende Menge aus der Tabelle (s.u.) abgelesen werden.

Die BrdU-Lösung wird täglich direkt vor der Applikation frisch hergestellt. Dazu wird die abgemessene sterile 0,9%ige NaCl-Lösung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und das abgewogene, tiefgekühlte BrdU-Pulver darin über 15 min auf dem Rotationsschüttler (Assistent Reamix, Karl Hecht GmbH, Sondheim) gelöst. Anschließend spritzt man die Lösung durch einen sterilen Spritzenvorsatzfilter (Minisart, Porendurchmesser 0,20 µm, Sartorius AG, Göttingen) um eine partikelfreie, gebrauchsfertige Injektionslösung zu erhalten. Die Injektion erfolgt unter guter Fixierung des Tieres in Rücklage. Es ist darauf zu achten, dass der Kopf des Tieres etwas tiefer gehalten wird, damit das Darmkonvolut nach kranial rutschen und somit beim Einstechen der Nadel in die Bauchhöhle ausweichen kann. Man verwendet eine sterile Kanüle (BD Mikrolance 3, 0,5x25 mm, Nr. 18, BD Medical Systems Drogheda, Irland), die in dorsokranieler Richtung paramedian durch die Bauchdecke eingestochen wird. Der Sitz der Nadel wird durch Aspiration überprüft bevor die Injektion erfolgt.

Tabelle 3: BrdU-Dosierungstabelle für die In-vivo-Markierung

KGW (g)	Vol BrdU (ml)	KGW (g)	Vol BrdU (ml)	KGW (g)	Vol BrdU (ml)	KGW (g)	Vol BrdU (ml)
300	1,50	350	1,76	400	2,00	450	2,26
302	1,52	352	1,76	402	2,02	452	2,26
304	1,52	354	1,78	404	2,02	454	2,28
306	1,54	356	1,78	406	2,04	456	2,28
308	1,54	358	1,80	408	2,04	458	2,30
310	1,56	360	1,80	410	2,06	460	2,30
312	1,56	362	1,82	412	2,06	462	2,32
314	1,58	364	1,82	414	2,08	464	2,32
316	1,58	366	1,84	416	2,08	466	2,34
318	1,60	368	1,84	418	2,10	468	2,34
320	1,60	370	1,86	420	2,10	470	2,36
322	1,62	372	1,86	422	2,12	472	2,36
324	1,62	374	1,88	424	2,12	474	2,38
326	1,64	376	1,88	426	2,14	476	2,38
328	1,64	378	1,90	428	2,14	478	2,40
330	1,66	380	1,90	430	2,16	480	2,40
332	1,66	382	1,92	432	2,16	482	2,42
334	1,68	384	1,92	434	2,18	484	2,42
336	1,68	386	1,94	436	2,18	486	2,44
338	1,70	388	1,94	438	2,20	488	2,44
340	1,70	390	1,96	440	2,20	490	2,46
342	1,72	392	1,96	442	2,22	492	2,46
344	1,72	394	1,98	444	2,22	494	2,48
346	1,74	396	1,98	446	2,24	496	2,48
348	1,74	398	2,00	448	2,24	498	2,50

Entsprechend dem Körpergewicht (KGW, g) der Tiere kann das Injektionsvolumen der BrdU-Lösung (Vol BrdU, ml) direkt aus der Tabelle abgelesen werden. Die Dosierung beträgt 100 mg BrdU/kg KGW bei einer Konzentration der Injektionslösung von 20 mg BrdU/ml.

3.2.6 Probengewinnung

3.2.6.1 Perfusion der Tiere

Für diesen Versuch werden alle Tiere nach einer Überlebenszeit von 28 Tagen post operationem getötet. Um die Gehirne möglichst ohne Substanzverlust und Schädigung gewinnen zu können, werden die Tiere in situ mit Paraformaldehyd 4 % (PFA 4%) perfundiert und anschließend die bereits fixierten Gehirne für die Untersuchungen entnommen.

Dazu werden die Tiere ein zweites Mal in Narkose gelegt. Das Vorgehen ist identisch mit der Narkoseeinleitung zum Zwecke des operativen Eingriffs (s. Kap. 3.2.4.1), allerdings wird anstelle von Halothan nun Sevofluran (Sevorane, Abbot GmbH, Wiesbaden) als Narkotikum verwendet.

Die Tiere werden in einen Glaszylinder mit einem Sevofluran getränkten Tupfer gesetzt und nach Eintritt der spontanatmenden Bewusstlosigkeit intubiert, an das Inhalationsgerät und die Beatmungspumpe angeschlossen und mit einem Sauerstoff-Luft-Gemisch im Verhältnis 1:2 ($F_{iO_2}=0,33$) und 4 Vol% Sevofluran beatmet.

Liegen die Tiere in tiefer Narkose (Narkosestadium III3) mit progressiver Kreislaufdepression infolge der Überdosierung von Sevofluran wird der damit verbundene Abfall der CO_2 -Konzentration in der Ausatemluft des Tieres über den Atemgasmonitor überwacht. (Die Tiere werden noch künstlich beatmet, es findet aber nur noch ein verminderter O_2 - CO_2 -Austausch in der Lunge statt, da sämtliche Körperfunktionen bereits stark eingeschränkt sind).

Nun wird die Bauchhöhle eröffnet und mit zwei Entlastungsschnitten der gesamte Bauchraum freigelegt (um später das Ausbluten zu erleichtern). Man eröffnet vorsichtig das Diaphragma (Zwerchfell) - ohne Herz und Lunge zu verletzen -, präpariert dieses vom Rippenansatz ab und eröffnet, durch Umschneiden und Wegklappen des Sternums (Brustbein), den Brustkorb weiträumig. Mit einer Butterflykanüle (Venofix S, Fa. Braun, Melsungen) wird von der Herzspitze ausgehend in den linken Herzventrikel eingestochen und diese mit einer Klemme fixiert. Um ein Ausbluten der Tiere zu ermöglichen macht man zwei Schnitte in die Leberlappen. Über die Kanüle werden nacheinander mit zwei 50 ml-Spritzen langsam über 10 min 100 ml isotonische NaCl-Lösung in den linken Ventrikel des noch schlagenden Herzens injiziert, um das Blut aus dem Tierkörper zu spülen. Sobald das Herz still steht, werden die Beatmung und die Narkose abgeschaltet und das Tier extubiert.

Daran anschließend erfolgt auf gleiche Weise die Perfusion mit 100 ml Paraformaldehyd 4 % (PFA, Merck, Darmstadt). Diese Lösung ist täglich frisch herzustellen und körperwarm zu applizieren.

Ist dieser Vorgang abgeschlossen, durchtrennt man mit einer Schere die Nackenmuskulatur und trennt den Kopf mit einem Scherenschlag im Genick vom Tierkörper ab, um die weitere Präparation zu erleichtern.

3.2.6.2 Präparation und Resektion des Gehirns

Zuerst präpariert man die Kopfhaut beginnend rostral der Ohren hinunter bis zu den Augen ab. Anschließend werden die Mm. temporales durchtrennt, vom Schädelknochen abgehoben und entfernt. Mit Hilfe einer Hohlmeißelzange werden die verbliebene Nackenmuskulatur sowie das Os occipitale und Os parietale stückchenweise abgetragen und die Dura mater (harte Gehirnhaut) eröffnet. Nun durchtrennt man vom Foramen magnum aus mit einem feinen Spatel alle basal gelegenen Gehirnnerven und den Bulbus olfaktorius soweit kranial wie möglich und löst das Gehirn vorsichtig aus der knöchernen Schädelkalotte. Das Kleinhirn wird mit einem Skalpell abgetrennt und verworfen.

Anschließend verbringt man das Gehirn in ein Glasgefäß mit 4%igem PFA und lagert es darin für 24 h im Kühlschrank. Am nächsten Tag wird das Gehirn in einem neuen Gefäß mit 30%iger Saccharose-Lösung (Sigma, Steinheim) eingelegt. Zu Beginn schwimmt das Gehirn an der Oberfläche der Saccharose und sinkt nach ein bis zwei Tagen ab (wenn es vollständig durchtränkt ist). Ab diesem Zeitpunkt kann das Gehirn geschnitten oder bis auf weiteres in Saccharose aufbewahrt werden.

3.2.6.3 Schneiden des Gehirns

Zum Schneiden des Gehirns benütze man ein Gleitschlittenmikrotom (Schlittenmikrotom Hn 40, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim).

Das Gehirn wird mit einem Skalpell im Sulcus sagittalis durchtrennt und damit in seine rechte und linke Gehirnhälfte geteilt. Nachdem man etwas Einbettmedium (Tissue Freezing Medium, Leica Instruments, Nussloch) auf die Schnittunterlage aufgebracht hat, wird das Gefäß unter der Schnittfläche mit Ethanol 96 % (Merck, Darmstadt) und Trockeneis befüllt. Man legt die beiden Gehirnhälften auf das Einbettmedium - die ursprünglich mediane Seite kommt jetzt unten zu liegen - und bedeckt sie mit zerkleinertem Trockeneis, um ein schnelles Durch- und Anfrieren zu gewährleisten. Nach 1 bis 2 min wird das Trockeneis wieder entfernt und mit dem Schneiden begonnen. Bei den ersten Schnitten wird die Schnittebene überprüft und evtl. die Unterlage neu austariert.

Man lässt die Mikrotomklinge vorsichtig horizontal über das gefrorene Gewebe gleiten und erhält so 40 µm dicke Sagittalschnitte, die man mit einem Kunststoffpinsel in vorbereitete, mit Kryoprotektionslösung (eigene Herstellung, s. Kap. 3.2.8) gefüllte Eppendorfgläser (2 ml, Fa. Eppendorf Netheler-Hinz, Hamburg) überführt.

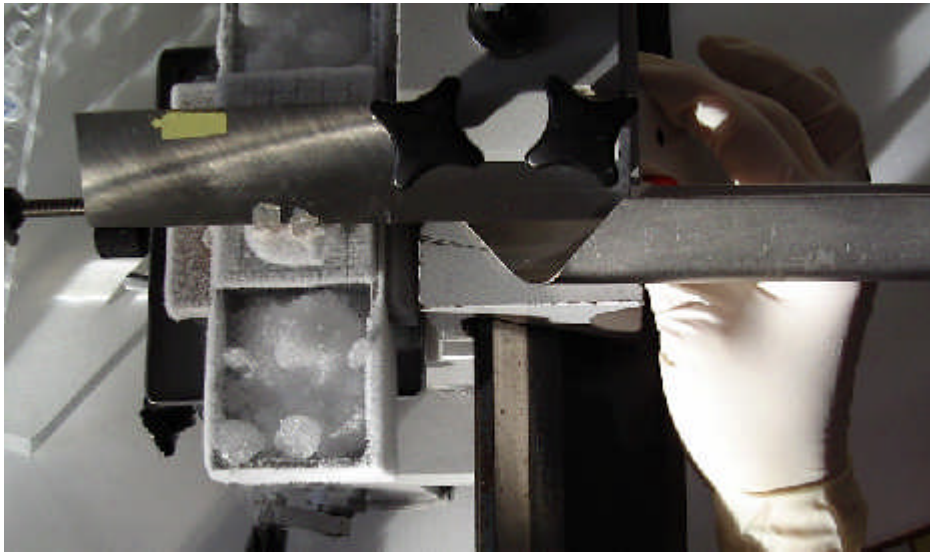


Abbildung 9: Schneiden des Gehirns mit dem Schlittenmikrotom

Pro Gehirnhälfte werden je zehn Gefäße beschriftet, durchnummeriert und immer nacheinander rotierend mit einzelnen Schnitten befüllt, bis das Gehirn komplett geschnitten ist. Damit erhält man eine gleichmäßige Verteilung der Schnitte aller Gehirnregionen auf die zehn Eppendorfgefäße, was für die statistische Auswertung von großer Bedeutung ist. Pro Färbung werden später die Schnitte von jeweils einem Gefäß ausgewertet, die für das gesamte Gehirn repräsentativ sind. Bis zur weiteren Verwendung werden die Schnitte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.2.7 Untersuchung des Gehirns

Die Herstellerangaben aller für die histologischen Färbungen verwendeten Materialien und Chemikalien sowie die Zusammensetzung der selbst hergestellten Lösungen sind in Kapitel 3.2.8 aufzufinden.

3.2.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ist eine Übersichtsfärbung und dient der Klassifizierung des Gewebeschadens in der Hippokampusformation.

(Hämatoxylin gehört zu den Kernfärbungen. Es ist positiv geladen und bindet sich an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Zellkern-DNS. Durch Oxidation (= Reifung) entsteht

daraus die färberisch wirksame Substanz Hämatein, die sich in alkalischem Milieu intensiv blau färbt. Eosin gehört zu den Zytoplasmafärbungen der Fluoreszeingruppe und färbt sich im saueren Milieu rot, d.h. geschädigte Zellen, die auf Grund der Umstellung auf anaerobe Glykolyse vermehrt saure Valenzen in Form von Laktat bilden, färben sich eosinophil an (GRAHAM und LANTOS 1997).)

3.2.7.1.1 Färbevorgang (modifiziert nach ROMEIS 1989)

Man entnimmt die Eppendorfgefäße mit den Gehirnschnitten zügig aus dem -20 °C Gefrierschrank und erwärmt sie auf Raumtemperatur. Anschließend werden die Schnitte in eine große Petrischale mit 0,1 molarer Phosphatpuffer-Lösung (0,1 M PO₄-Lösung), unter Zugabe von einem Tropfen 10%igem TritonX-100 zur Reduktion der Oberflächenspannung verbracht und darin 15 min gewaschen. Es folgt ein Waschdurchgang in Leitungswasser für 15 min und eine weitere Waschung in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) für 10 min. Danach werden je zwei Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen und ca. 30 min luftgetrocknet.

Zur Fixierung der Schnitte durch Flüssigkeitsentzug werden sie für 10 min in Ethanol 100 % pro analysi getaucht. Die anschließende Rehydrierung erfolgt in einer absteigenden Alkoholreihe: 1 min in Ethanol 96 % und dann 1 min in Ethanol 70 %. Die Objektträger werden zweimal kurz in ddH₂O geschwenkt bevor sie in Hämalaun nach Mayer (gem. Romeis Nr. 648, Hausapotheke, Klinikum rechts der Isar, München) für 2 min gefärbt werden. Anschließend wird der überschüssige Farbstoff 10 min lang mit kaltem, fließendem Leitungswasser abgespült. Vor dem nächsten Färbeschritt werden die Objektträger wiederum zweimal in ddH₂O geschwenkt und dann für 1 min in wässriger Eosin-Dinatrium Lösung gefärbt. Es folgt erneutes, zweimaliges Schwenken in ddH₂O.

Um die Schnitte vor dem Eindecken wieder zu dehydrieren, verwendet man eine aufsteigende Alkoholreihe. Die Objektträger werden nacheinander für 5 min in Ethanol 70 %, 2 ½ min in Ethanol 80 %, 1 min in Ethanol 96 % und 1 min in Ethanol 100 % getaucht.

Nach der aufsteigenden Alkoholreihe werden die Schnitte je für 2 min und 5 min in zwei separate Gefäße mit Roti-Histol verbracht. Danach werden die Objektträger einzeln aus der Roti-Histol-Küvette entnommen und der Schnitt unter Verwendung von Roti-Histokitt eingedeckt. Man lässt die Schnitte über Nacht bei Zimmertemperatur trocknen. Nach ordnungsgemäßer Beschriftung werden die gefärbten Schnitte in Objektträgerkästen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Protokoll der HE-Färbung in der Übersicht:

1. 15 min in 0,1 M PO₄-Lösung (+ 1 Tropfen Triton[®]X 10 %)
2. 15 min in Leitungswasser
3. 10 min in ddH₂O
4. Schnitte auf Objektträger aufziehen und 30 min lufttrocknen
5. absteigende Alkoholreihe: 10 min in Ethanol 100 %
1 min in Ethanol 96 %
1 min in Ethanol 70 %
6. 2 x 5 sec in ddH₂O
7. 2 min in Hämalaun nach Mayer
8. 10 min in fließendem Leitungswasser
9. 2 x 5 sec in ddH₂O
10. 1 min in Eosin
11. 2 x 5 sec in ddH₂O
12. aufsteigende Alkoholreihe: 5 min in Ethanol 70 %
2 ½ min in Ethanol 80 %
1 min in Ethanol 96 %
1 min in Ethanol 100 %
13. 2 min in Roti-Histol I, 5 min in Roti-Histol II
14. Eindecken mit ca. 4 Tropfen Roti-Histokitt

3.2.7.1.2 Untersuchung mit dem Lichtmikroskop

Die Beurteilung der Gehirnschnitte in der HE-Färbung dient dazu, das Ausmaß der Neuronenschädigung infolge der zerebralen Ischämie einzuschätzen. In jedem einzelnen Schnitt wird der Hippokampus und der Gyrus dentatus untersucht und beurteilt. In unserer Einteilung fassen wir die CA1- und CA2-Region zur Region CA1 sowie die CA3- und CA4-Region zur Region CA3 zusammen.

Man beginnt beim Mikroskopieren mit dem Objektiv zur 25-fachen Vergrößerung, um sich eine Übersicht über den gesamten Hippokampus zu verschaffen. Dann wird das Bild schrittweise bis auf das 400-fache vergrößert, um in den einzelnen Regionen die genauen Zellstrukturen und -grenzen erkennen zu können.

In den höheren Vergrößerungen (100-, 200- und 400-fach) wird der Hippokampus stets nach dem gleichen Prinzip untersucht und nach dem unten aufgeführten Schema beurteilt: man beginnt in der CA1-Region und untersucht das Zellband des Hippokampus bis an das Ende

der Region CA4. Danach folgt die Auswertung des Gyrus dentatus von dessen oberen zum unteren Ast.

3.2.7.1.3 Klassifizierung des Schadens

In Anlehnung an das Schema von SANO et al. (1992) wird die Ausdehnung des entstandenen histologisch nachweisbaren Neuronenschadens mit einem 3 Punkte-System in vier Schadenskategorien mit aufsteigendem Schweregrad eingeordnet:

0 Punkte	= kein Neuronenschaden, Zellen intakt, Zellband geschlossen
1 Punkt	= 1 bis 10 % der Neuronen geschädigt, geringe eosinophile Zellschädigung
2 Punkte	= 11 bis 50 % der Neuronen geschädigt, Zellband lückenhaft, deutliche eosinophile Zellschädigung
3 Punkte	= > 50 % der Neuronen geschädigt, Zellband in Auflösung, massenhaft Gliazellen eingewandert, massive eosinophile Zellschädigung, Zelltrümmer

Die Klassifizierung wird für die CA1-Region, CA3-Region und den Gyrus dentatus jedes Schnittes separat durchgeführt und in eine Tabelle eingetragen.

3.2.7.1.4 Auswertung

Zur Auswertung werden für jede Region die Punkte aller Schnitte einer Gehirnhälfte addiert und durch die Anzahl der beurteilten Schnitte geteilt, so dass man einen Durchschnittswert zwischen 0 und 3 erhält, der den neuronalen Schaden der entsprechenden Gehirnhälfte beschreibt. Dieser Wert wird im Folgenden als HE-Index bezeichnet.

3.2.7.2 BrdU-Färbung

Durch die In-vivo-Markierung (siehe vorne) enthalten die Zellkerne aller im Zeitraum der BrdU-Applikation neu gebildeten Zellen BrdU. Um diese BrdU-markierten Zellen nachzuweisen, bedient man sich eines immunhistochemischen Verfahrens, der indirekten Avidin-Biotin-Immunperoxidase-Technik.

(Das Prinzip des Immunenzy-m-Verfahrens beruht auf der Sichtbarmachung der Lokalisation des gesuchten Antigens mit Hilfe von enzymgekoppelten Antikörpern. Das Enzym wandelt

ein Chromogen in einen Farbkomplex um, der am Ort der Antigen-Antikörper-Reaktion präzipitiert.

Der unmarkierte Primärantikörper (Mouse-Anti-BrdU-Antikörper) bindet spezifisch an das nachzuweisende Antigen (BrdU). Der Sekundärantikörper ist mit dem Vitamin Biotin gekoppelt und gegen die Immunglobulinfraktion derjenigen Spezies gerichtet, von der der Primärantikörper gewonnen wurde (Donkey-Anti-Mouse-Antikörper). Er lagert sich an den primären Antigen-Antikörper-Komplex an. Die dritte Komponente ist ein löslicher Komplex aus biotinylierter Peroxidase und Avidin. Das Avidin ist in der Lage vier Moleküle Biotin mit sehr hoher Affinität zu binden (HSU et al. 1981) und dient somit als Bindeglied zwischen dem Biotin des Sekundärantikörpers und dem Biotin-Peroxidase-Komplex, so dass jeweils drei Peroxidase-Komplexe pro Antigenlokus gebunden werden. Dies bewirkt nachfolgend eine Potenzierung des Signals. Die Sichtbarmachung des gesuchten Antigens erfolgt über die enzymatische Umsetzung eines dazugegebenen Chromogensubstrates (3,3'-Diaminobenzidin-tetra-hydrochlorid, DAB), das zu einem stabilen, farbigen Endprodukt polymerisiert und gut unter dem Lichtmikroskop sichtbar ist.)

3.2.7.2.1 Färbvorgang (modifiziert nach KUHN et al. 1996)

Die Eppendorfgefäße mit den Schnitten werden aus dem Gefrierschrank entnommen und die Schnitte auf Raumtemperatur erwärmt. Dann schüttet man die Schnitte vorsichtig in eine Petrischale mit 0,1 M PO_4 -Lösung, der zur Reduzierung der Oberflächenspannung ein Tropfen 10%iges TritonX zugesetzt ist, und verteilt sie anschließend in Netwells (kleine Plastikgefäße mit Netzboden, maximal 10 Schnitte pro Netwell). Darin werden sie für 3 x 10 min in TrizmaBase Solution (TBS, eigene Herstellung, s. Kap. 3.2.8) gewaschen, bevor sie 30 min in einer 0,6%igen Wasserstoffperoxid-Lösung (0,6 % H_2O_2) zur Blockierung der endogenen Peroxidase inkubiert werden. Es folgt ein zweiter Waschgang von 3 x 10 min in TBS. Zur Denaturierung der DNS schließt sich eine Inkubation über 90 min in einer 50%igen Formamide-Lösung bei 65 °C an. Danach wäscht man die Schnitte 5 min in einer 2 molaren Natriumzitat-Lösung (solution of sodium citrate, 2 M SSC) und gibt sie für 30 min bei 38 °C in 2 molare Salzsäure-Lösung (2 M HCl) um sie für die Bindung der Antikörper vorzubereiten. Um nun den stark sauren pH-Wert wieder zu neutralisieren, werden die Schnitte 10 min in einer 0,1 molaren Boratpuffer-Lösung und anschließend erneut 4 x 5 min in TBS gewaschen. Um einer unspezifischen Bindung der Antikörper auf Grund von elektrostatischen Ladungen von Proteinen vorzubeugen, werden diese gesättigt

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

(= Proteinblockierung). Dazu verwendet man eine TBS-Lösung mit 3 % Donkey Serum (DS) und 1 % TritonX und inkubiert damit für 30 min. Nun ist das Gewebe optimal für die Bindung des ersten Antikörpers vorbereitet.

In vorliegender Studie werden Anti-bromodeoxyuridine mouse monoclonal antibody (Klon BMG 9318, IgG₁, Fa. Roche, Mannheim) in einer Konzentration von 1:500 in einer TBS-Lösung mit 3 % DS und 0,1 % TritonX verwendet. Die Inkubationszeit beträgt 16 h (über Nacht) und wird bei 5 °C auf dem Schüttler durchgeführt.

Am nächsten Tag wird über 8 x 5 min der restliche, nicht gebundene primäre Antikörper mit TBS ausgewaschen und anschließend der sekundäre, Biotin-konjugierte Antikörper - Donkey Anti-Mouse IgG - ebenfalls in einer Konzentration von 1: 500 in 3 % DS/ 0,1 % TritonX/ TBS-Lösung zugegeben. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur für 4 h. Danach wird erneut 8 x 5 min mit TBS gewaschen, um überschüssige Antikörper zu beseitigen.

Als nächster Schritt erfolgt die Zugabe der Avidin-Biotin-Peroxidase (Vectastain Elite ABC Kit), die an den primären Antigen-Antikörper-Komplex bindet.

Die Herstellung dieser Peroxidase-Lösung wird entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Man gibt zu 3920 µl TBS zuerst 40 µl der Lösung A (Avidin DH) und vermischt die beiden Lösungen, bevor man 40 µl der Lösung B (Biotin-gebundene Peroxidase) hinzu gibt. Dieses Gemisch muss mindestens 30 min vor Anwendung vorbereitet werden, da dieser Zeitraum zur Äquilibrierung des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes notwendig ist. Die Inkubationszeit beträgt 1 Stunde. Anschließend wird erneut 6 x 5 min mit TBS gewaschen.

Daran schließt sich die eigentliche Färbung mit dem Chromogensubstrat an. Dieses polymerisiert in Anwesenheit von Peroxidase und Wasserstoffperoxid zu einem unlöslichen schwarzen Farbprodukt. Hierfür wird eine Stammlösung aus TBS unter Zugabe von 0,25 mg DAB/ml, 0,3 µl H₂O₂ 30 %/ml und 5 µl Nickelchlorid 8 %/ml verwendet und damit für 5 min inkubiert. Dieser Vorgang ist unter der Abzugshaube durchzuführen, da Nickelchlorid und DAB giftig sind. Ferner müssen alle Materialien, die mit DAB in Berührung kommen, mit Natriumhypochloridlösung 12 % gespült und die Lösungen als Sondermüll entsorgt werden.

Nun werden die Schnitte 4 x kurz in Leitungswasser geschwenkt und ein letztes Mal für 4 x 5 min in TBS gewaschen. Abschließend überführt man die gefärbten Schnitte in eine Petrischale mit 0,1 M PO₄-Lösung mit einem Tropfen 10%igem TritonX und zieht sie auf Objektträger auf. Nachdem sie luftgetrocknet sind, taucht man die Objektträger in einer

Objektträgerküvette in ein Gefäß mit Neo-Clear. Man entnimmt sie der Reihe nach, deckt sie einzeln mit einigen Tropfen Neo-Mount-Eindeckmedium ein und lässt sie über Nacht trocknen.

Protokoll der BrdU-Färbung in der Übersicht:

1. Befüllen der Netwells
0,1 M PO₄-Lösung
2. Waschen
in TBS, 3 x 10 min
3. Hemmung der endogenen Peroxidase
mit 0,6 % H₂O₂ in TBS, 30 min
4. Waschen
in TBS, 3 x 10 min
5. DNS-Denaturierung
mit 50%iger Formamide-Lösung, 90 min, 65 °C
6. Waschen
in 2 M SSC, 5 min
7. Protein Vorbereitung für Antikörperbindung
mit 2 M HCl, 30 min, 38 °C
8. Neutralisation des pH-Wertes
mit 0,1 molarem Boratpuffer, 10 min, pH 8,5
9. Waschen
in TBS, 4 x 5 min
10. Proteinblockierung
mit TBS/ 3 % DS/ 1 % TritonX, 30 min
11. Inkubation mit Mouse-anti-BrdU-Antikörper
mit TBS/ 3 % DS/ 0,1 % TritonX/1. Antikörper 1:500, über Nacht
12. Waschen
in TBS, 8 x 5 min
13. Inkubation mit Donkey-anti-mouse-Antikörper
in TBS/ 3 % DS/ 0,1 % TritonX/ 2. Antikörper 1:500, 4 h
14. Waschen
in TBS, 8 x 5 min

15. Enzymmarkierung

in TBS mit Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, 1 h

16. Waschen

in TBS, 6 x 5 min

17. Färbung durch Chromogenzugabe

DAB in TBS/ H₂O₂/NiCl-Stammlösung, 5 min

18. Waschen

in Leitungswasser, 4 x kurz eintauchen

19. Waschen

in TBS, 4 x 5 min

20. Aufziehen auf Objektträger

in 0,1 M PO₄-Lösung

21. Fixieren

in Neo-Clear

22. Eindecken

mit einigen Tropfen Neo-Mount

3.2.7.2.2 Untersuchung mit dem Lichtmikroskop

Die immunhistochemische BrdU-Färbung dient zur Bestimmung der Gesamtzahl BrdU-markierter Zellen im Gyrus dentatus.

Gefärbt und untersucht werden die Schnitte aus je einem Eppendorfgefäß, d.h. jeder 10. Gehirnschnitt. Man beginnt beim Mikroskopieren mit der Übersichtsvergrößerung (25-fach) und zählt mit 400-facher Vergrößerung die einzelnen schwarz gefärbten BrdU-positiven Zellen. Dabei ist darauf zu achten, die ganze Dicke des Präparates (40 µm) sorgfältig zu durchmustern, um alle markierten Zellen zu erfassen. Die ermittelte Zellzahl jedes Schnittes wird in eine Tabelle eingetragen.

3.2.7.2.3 Auswertung

Die Addition der Zahlenwerte aller ausgezählten Schnitte ergibt die Anzahl BrdU-positiver Zellen pro gefärbtes Eppendorfgefäß. Diese Summe muss mit der Anzahl der Eppendorfgefäße (10), auf die das ganze Gehirn gleichmäßig aufgeteilt ist, multipliziert werden, um die absolute Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen im gesamten Gyrus dentatus zu erhalten.

3.2.7.3 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Das Prinzip der Immunfluoreszenz (IF)-Färbung beruht, wie das der immunhistochemischen Verfahren, auf der Markierung des gesuchten Antigens mit einem Antigen-Antikörper-Komplex. Der Unterschied zwischen diesen beiden Färbetechniken liegt in der Art der Sichtbarmachung dieses Komplexes, die bei der Immunhistochemie durch Präzipitation eines Farbkomplexes, bei der Immunfluoreszenz durch Lumineszenz des zweiten Antikörpers erfolgt.

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung dient der qualitativen Beurteilung der in der immunhistochemischen BrdU-Färbung quantitativ bestimmten BrdU-positiven Zellen. Dazu verwendet man einen BrdU-spezifischen ersten Antikörper (Monoclonal Rat anti-Bromodeoxyuridine) in Kombination mit einem Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten zweiten Antikörper (Fluorescein-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG). Zur Detektion neuronaler Zellen wird ein neuronenspezifischer erster Antikörper (Mouse anti-neuronal nuclei (NeuN) monoclonal antibody) in Kombination mit einem Rhodamine Red-X (ROX) markierten zweiten Antikörper (Rhodamine Red-X-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG) verwendet. Die beiden Marker fluoreszieren bei unterschiedlichen Wellenlängen, wodurch eine Differenzierung beider Antigene im Fluoreszenzmikroskop möglich ist. Durch die Anwendung einer Doppelfärbung kann man jede einzelne Zelle gleichzeitig auf zwei Merkmale untersuchen.

3.2.7.3.1 Färbevorgang (modifiziert nach KUHN et al. 1996)

Die Eppendorfgefäße mit den Gehirnschnitten werden aus dem Gefrierschrank entnommen, auf Raumtemperatur gebracht und die Schnitte in 0,1 M PO_4 -Lösung mit einem Tropfen 10%igem TritonX vermischt und anschließend in Netwells überführt. Man taucht diese in TBS und wäscht sie über 30 min auf der Schüttelmaschine, wobei das TBS zweimal gewechselt wird. Daran schließt sich die Inkubation in einer 50%igen Formamide-Lösung an, die eine Denaturierung der DNS bewirkt. Die Inkubationszeit beträgt 90 min bei 65 °C. Diese Lösung besteht aus 4 ml ddH_2O , 1 ml 20xSSC und 5 ml Formamide pro Netwell. Es folgt ein Waschdurchgang in 2 molarer SSC für 5 min bevor die Schnitte für 30 min in 2 molarer Salzsäurelösung (2 M HCl) bei 38 °C inkubiert werden, um das Gewebe für die Antikörperbindung vorzubereiten. Für die nächsten 10 min werden die Gehirnschnitte bei Raumtemperatur in 0,1 molarer Boratpuffer-Lösung (pH 8,5) gegeben, um den stark saueren

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

pH zu neutralisieren. Danach wird noch mal für 20 min mit TBS gewaschen (mehrmals wechseln). Als nächster Schritt werden die primären Antikörper zugegeben.

Beide Antikörpermischungen werden mit derselben Grundlösung aus TBS mit 3 % Donkey Serum (DS) und 0,1 % TritonX hergestellt.

Für die primäre Antikörpermischung wird der Grundlösung Monoclonal Rat anti-Bromodeoxyuridine-Antikörper in einer Konzentration von 1:500 und Mouse anti-neuronal nuclei (NeuN) monoclonal antibody in einer Konzentration von 1:250 zugesetzt. Die Inkubationszeit beträgt 16 h (über Nacht) und wird bei 5 °C auf der Schüttelmaschine durchgeführt.

Am nächsten Tag werden zu Beginn nicht gebundene Antikörperreste mit TBS (30 min, 2 x wechseln) ausgewaschen. Anschließend wird mit der sekundären Antikörpermischung inkubiert. Diese enthält Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG und Rhodamine Red-X (ROX)-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG jeweils in der Konzentration von 1:500. Die Immunfluoreszenzfarbstoffe sind sehr lichtempfindlich. Deshalb erfolgen alle weiteren Arbeitsschritte im abgedunkelten Raum, um die Lichtexposition auf ein Minimum zu beschränken. Die Inkubationszeit beträgt 4 h. Danach werden überschüssige Antikörperreste erneut ausgewaschen (TBS, 5 x 15 min) und die Schnitte in eine große Petrischale mit 0,1 M PO₄-Lösung mit 1 Tropfen 10%igem TritonX überführt. Man zieht je zwei Schnitte vorsichtig mit einem Pinsel auf einen Objektträger auf. Die luftgetrockneten Gehirnschnitte werden mit einigen Tropfen ProLongAntifade Kit eingedeckt und die Ränder des Deckgläschens zur Abdichtung mit Nagellack versiegelt. Man lässt die fertigen Objektträger über Nacht trocknen, versieht sie mit einer dauerhaften Beschriftung und ordnet sie in Objektträgerkästen ein.

Protokoll der Immunfluoreszenz-Färbung in der Übersicht:

1. Befüllen der Netwells
0,1 M PO₄-Lösung
2. Waschen
in TBS, 3 x 10 min
3. DNS-Denaturierung
mit 50%iger Formamide-Lösung, 90 min, 65 °C
4. Waschen
in 2 M SSC, 5 min
5. Proteinvorbereitung für Antikörperbindung
mit 2 M HCl, 30 min, 38 °C
6. Neutralisation des pH-Wertes
mit 0,1 M Boratpuffer, 10 min, pH 8,5
7. Waschen
in TBS, 4 x 5 min
8. Inkubation mit Rat-anti-BrdU-Antikörper 1:500
+ Mouse anti-NeuN-Antikörper 1:250
in TBS/ 3 % DS/ 0,1 % TritonX, über Nacht
9. Waschen
in TBS, 3 x 10 min
10. Inkubation mit Donkey-anti-rat-FITC-Antikörper 1:500
+ Donkey-anti-mouse-ROX-Antikörper 1:500
in TBS/ 3 % DS/ 0,1 % TritonX, 4 h
11. Waschen
in TBS, 5 x 15 min
12. Aufziehen auf Objektträger
in 0,1 M PO₄-Lösung
13. Eindecken
mit einigen Tropfen ProLongAntifade Kit + Nagellack

3.2.7.3.2 Beurteilung und Dokumentation am ApoTome

Für die Auswertung der Immunfluoreszenz gefärbten Gehirnschnitte wird ein Gesamtsystem (Carl Zeiss, Göttingen) bestehend aus einem Mikroskop (Axiovert 200), einem speziellen Einschub (ApoTome), einer Kamera (AxioCam HR), einem Rechner (XEON Hochleistungs-Rechner 512 MB RAM) und einer speziellen Software (AxioVision 4) verwendet.

Optische Schnittbilder mit dem ApoTome

Um bei der Fluoreszenzmikroskopie auftretende Artefakte durch Überstrahlung von Ebenen ober- und unterhalb der Fokusebene zu verhindern, werden mit Hilfe des ApoTomes optische Schnittbilder der Präparate von ca. 1 μm Dicke erzeugt. Dazu bedient sich das ApoTome der „Gitterprojektionstechnik“, auch „strukturierte Beleuchtung“ genannt.

Bei der ApoTome Hardware handelt es sich um einen Einschub in den Fluoreszenzstrahlengang in die Ebene der Leuchtfeldblende, der aus zwei planparallelen Glasplatten besteht. Auf der ersten Glasplatte befindet sich eine Gitterstruktur, die in den Anregungsstrahlengang eingeprägt und in der Fokusebene des Präparates scharf abgebildet wird. Die zweite Glasplatte wird über einen feinjustierten Scanningmechanismus gekippt und damit der Strahlengang mit dem eingepägten Gittermuster um einen definierten Versatz lateral in der Präparatenebene verschoben. Das Emissionslicht wird im Objektiv gesammelt und auf einer Kamera abgebildet. In drei verschiedenen, definierten Gitterpositionen wird jeweils ein Bild gemacht. Diese drei Rohbilder werden online zu einem Ergebnisbild verrechnet. Das Gitter wie auch die Gewebestruktur wird nur im Tiefenschärfebereich des Objektivs scharf abgebildet. Ober- und unterhalb dieses Schärfebereichs ist alles unscharf und verschwommen, so dass in den drei Rohbildern keine Unterschiede in den Bildwerten (Grauwerte) vorliegen. Aufgrund der Homogenität dieser Daten außerhalb der Tiefenschärfe, kann der verwendete Algorithmus diese "Out-of-Focus" Bildanteile entfernen. Das Resultatbild ist ein optischer Schnitt durch das Präparat mit verbessertem Signal-zu-Rausch-Verhältnis, sowie eine um ca. Faktor 2 verbesserte Auflösung in axialer (Z-) Richtung.

Untersuchung und Beurteilung

Untersucht wird der Gyrus dentatus des Hippokampus. Die gesuchte Region wird im Mikroskop aufgesucht und systematisch mit einem 40x Wasserobjektiv (40x/1,2 W Korr, Zeiss) nach markierten Zellen durchgemustert. Dazu verwendet man den Immunfluoreszenzfilter Fluoresceinisothiocyanat (FITC), der zur Anregung der Fluoreszenz Licht im Wellenlängenbereich von 450-490 nm liefert. Jede Fluorescein-markierte Zelle wird

einzelnen fokussiert und davon ein Schnittbild mit dem ApoTome angefertigt. Das ApoTome macht jeweils selbstständig zwei einzelne Schnittbilder für die zwei verwendeten Fluoreszenzkanäle - eines mit dem Fluoresceinisothyocyanat-Filter und ein zweites mit dem Rhodamine-Filter - und stellt diese auf dem Monitor übereinander projiziert in einem Bild dar. Per Mausklick kann man die beiden Bilder einzeln zu- und wegschalten, um die markierten Zellen auf ihre Einfach- oder Doppel-Markierung hin zu beurteilen.

Die Ergebnisse werden in eine Strichliste eingetragen, die folgende Einteilung enthält:

- nur BrdU-positive Zellen, d.h. nur Fluorescein-markiert
- doppelt-positive Zellen, d.h. Fluorescein- und Rhodamine-markierte Zellen.

3.2.7.3.3 Auswertung

Pro Gehirnhälfte werden so viele Schnitte durchmustert bis man 50 doppelt-positive Zellen gefunden und dokumentiert hat. Anschließend wird die Anzahl doppelt-positiver Zellen (=50) zur Anzahl aller BrdU-positiven Zellen ins Verhältnis gesetzt und so der prozentuale Anteil doppelt-positiver Zellen (= Neurone) an der Gesamtheit BrdU-markierter Zellen ermittelt. Das Ergebnis entspricht der Neurogeneserate.

3.2.7.4 Volumenbestimmung des Gyrus dentatus

Um später vergleichende Aussagen über die Anzahl neu gebildeter Neuronen zwischen den Tieren der Versuchsgruppen treffen zu können, ist es notwendig das Volumen des Gyrus dentatus zu bestimmen.

Dies erfolgt mit folgender technischer Ausrüstung:

- Komplettrechner P4, 512 MB RAM, 80 GB HDD, Intel CPU 2,66 GHZ
- 21“ Samsung-Monitor

(IS-Computersysteme, Erding)

- Kompaktes LED-Leuchtfeld für homogenes Durchlicht, Leuchtfläche 83x75 mm
- Evolution MP Digital Color Kit incl. Treiber
IEEE Kamera MP ungekühlt für IPP/ IPD /IPE
- Makro-Video-Zoom, Präzisions-Zoom-Objektiv 2/3“
- Software: Image-Pro Express Version 4.5

(Weiss, Imaging and Solutions GmbH, Günding/ Bergkirchen)

3.2.7.4.1 Flächenmessung

Für die Flächenmessung verwendet man ein zweites Mal die HE-gefärbten Gehirnschnitte. Ausgewertet werden alle Schnitte eines Eppendorfgefäßes.

Man legt den Objektträger auf das LED-Leuchtfeld und durchleuchtet ihn mit homogenem Durchlicht. Darüber sind die Kamera und das Makro-Zoom-Objektiv angebracht, die ein Live-Bild auf den Monitor projizieren. Die Bildeinstellung wird optimiert und dann ein Bild des Gehirnschnittes gemacht.

Die weitere Bearbeitung dieses Bildes erfolgt mit Hilfe der Software. Der Bildausschnitt des Gyrus dentatus wird herausgeschnitten und vergrößert, um ein exaktes Arbeiten zu ermöglichen. Mit dem Cursor umfährt man die Grenzen des Gyrus dentatus und die Software errechnet automatisch die umfahrene Fläche.

Die Flächenwerte werden für jeden Schnitt in eine Excel-Tabelle eingetragen und alle Werte pro Gehirnhälfte addiert.

3.2.7.4.2 Volumenberechnung

Um von den gemessenen Flächenangaben das Gesamtvolumen des Gyrus dentatus zu errechnen, wird die Summe aller Flächenergebnisse (pro Gehirnhälfte) mit:

- 0,04 mm (entspricht der Dicke der Gewebeschnitte von 40 µm) und mit
- 10 (entspricht der Anzahl Eppendorfgefäße, auf die das ganze Gehirn aufgeteilt ist)

multipliziert.

3.2.8 Geräte, Antikörper, Chemikalien und Lösungen für die histologischen Untersuchungen

Geräte

- Inkubator Titramax 1000, Heidolph Instruments, Schwabach
- Schüttler Rocky3D, Fröbel Labortechnik, Lindau

Antikörper

Immunhistochemie

1. Antikörper

- Anti-bromodeoxyuridine Cat # 1170376, mouse monoclonal IgG₁, 100 µg/ml, Fa. Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, USA

2. Antikörper

- Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG, 1,6 mg/ml, Cat # 715-065-151

Immunfluoreszenz

1. Antikörper

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

2. Antikörper

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

Alle Antikörper bis auf die gesondert benannten von Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA, bezogen über Dianova, Hamburg

Verbrauchsmaterialien

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

Chemikalien

- Aqua Spüllösung, DeltaSelect, Pfullingen
- Borsäure zur Analyse, Merck, Darmstadt
- 3,3'-Diaminobenzidin-tetra-hypochlorid (DAB), Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England
- Donkey Serum, Pan Biotech GmbH, Aidenbach
- Eisessig 100 %, Merck, Darmstadt
- Ethanol 96 %, Merck, Darmstadt
- Ethanol 100 % pro analysi, Merck, Darmstadt
- Formamide, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Glycerol anhydrous, Fluka, Steinheim
- Nagellack klar, Jade, Düsseldorf
- Natriumchlorid, Merck, Darmstadt
- Natriumhypochloridlösung 12 % Cl, Roth, Karlsruhe
- Neo-Clear, Merck, Darmstadt
- Neo-Mount, Merck, Darmstadt
- Nickel(II)-chlorid, Merck, Darmstadt
- Roti-Histokitt, Roth, Karlsruhe
- Roti-Histol, Roth, Karlsruhe
- Salzsäure 2 mol/l (2 N), Merck, Darmstadt
- Saures Hämalun nach Mayer, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München
- Sodium Phosphate dibasic heptahydrate, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Sodium Phosphate monobasic monohydrate, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Merck, Darmstadt
- TritonX-100, Fluka, Steinheim
- TrizmaBase, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- TrizmaHCl, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- ProLongAntifade Kit, Molecular Probes Europe BV, Leiden, Holland
- VectastainElite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA
- Wässrige Eosin-Dinatrium Lösung, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München
- Wasserstoffperoxid 30 %, Merck, Darmstadt

Lösungen

- 1,0 M PO₄-Lösung

31,75 g	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
<u>206,75 g</u>	<u>Na₂HPO₄ x 7 H₂O</u>
ad 1000 ml	ddH ₂ O

- 0,1 M PO₄-Lösung

100 ml	1,0 M PO ₄ -Lösung
900 ml	ddH ₂ O

- TBS (10x)

132,2 g	TrizmaHCl
19,4 g	TrizmaBase
90,0 g	NaCl
855 ml	ddH ₂ O

mit 1 M HCl auf pH 7,5 einstellen

- TBS (1x)

100 ml	TBS (10x)
900 ml	ddH ₂ O

- 10%ige TritonX-Lösung (Lagerung bei +5 °C)

20 ml	TritonX-100
180 ml	ddH ₂ O

- 0,6%ige Wasserstoffperoxid-Lösung

2 ml	H ₂ O ₂ 30 %
100 ml	TBS (1x)

- SSC (20x)

175,3 g	NaCl
<u>88,2 g</u>	<u>Na₂CO₃ x 2 H₂O</u>
ad 1000 ml	ddH ₂ O

mit 1 M HCl auf pH 7,4 einstellen

- SSC (2x)

100 ml	SSC (20x)
900 ml	ddH ₂ O

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

- 0,5 M Boratpuffer

15,45 g	Borat
450 ml	ddH ₂ O
<u>5 ml</u>	<u>10 M NaOH</u>
ad 500 ml	ddH ₂ O

mit 10 M NaOH auf pH 8,5 einstellen

- 50%ige Formamide-Lösung

5 ml	Formamide
1 ml	SSC (20x)
4 ml	ddH ₂ O

- Kryoprotektionslösung

Glycerin	250 ml
Ethylenglycol	250 ml
0,1 M Phosphatpuffer	500 ml

3.2.9 Statistische Berechnung und Dokumentation

Gemessene Variablen werden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen hinsichtlich physiologischer Parameter wird mit dem Kruskal-Wallis Test und im Falle von signifikanten Unterschieden mit dem bivariaten Mann-Whitney Test überprüft. Um innerhalb der Gruppen zeitliche Veränderungen der physiologischen Parameter zu untersuchen werden der Friedman Test und post hoc der Wilcoxon Test angewendet.

Die primären Studienendpunkte Anzahl BrdU-positiver Zellen, Klassifizierung des Gewebeschadens in der HE-Färbung, prozentualer Anteil an Neuronen und Volumen des Hippokampus werden zunächst mit dem Kruskal-Wallis Test und anschließend mit dem Mann-Whitney Test auf Gruppenunterschiede untersucht.

Die Bonferroni Korrektur wird für die gesamte Auswertung zur Adjustierung multipler Tests verwendet.

Um Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß der Gewebeschädigung (HE-Färbung) und der Anzahl neuer Neuronen festzustellen, werden der Spearman's Korrelationskoeffizient berechnet. Tiere mit neuronalem Schaden werden mit Tieren ohne nachweisbaren Neuronenschaden hinsichtlich der Anzahl neu gebildeter Neuronen mit dem Mann-Whitney Test verglichen. Alle Tests wertet man zweiseitig mit einem Signifikanzbereich von $p < 0,05$ aus. Die Auswertung wird mit dem Statistikprogramm SPSS Version 11.5 durchgeführt.

3.3 Ergebnisse

In die Ergebnisse gehen die intraoperativ erhobenen und die histologisch ausgewerteten Daten von 48 männlichen Sprague-Dawley Ratten ein. Die Gruppeneinteilung erfolgt nach abgeschlossener Präparation in sechs Versuchsgruppen:

für die drei zu untersuchenden Narkoseformen

- 0,8 Vol% Halothan
- 0,75 mg/kg/min S(+)Ketamin
- 1,0 mg/kg/min S(+)Ketamin

jeweils eine Ischämie- sowie eine Kontrollgruppe. Die genaue Gruppeneinteilung wurde bereits ausführlich in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

Zusätzlich liefern acht Tiere ohne operativen Eingriff (Nativgruppe) die physiologischen Referenzwerte für die histologischen Ergebnisse der Studie.

3.3.1 Physiologische Parameter während des operativen Abschnitts

Es findet eine Darstellung der Ergebnisse statt, die sich aus den während des operativen Abschnitts des Versuchs ermittelten Daten ergeben. Dabei werden jeweils die Daten der drei Ischämiegruppen sowie der drei Kontrollgruppen miteinander verglichen. Des Weiteren werden innerhalb einer Narkosegruppe die Werte der jeweiligen Kontroll- mit denen der zugehörigen Ischämiegruppe verglichen, sowie innerhalb jeder einzelnen Gruppe die Parameter zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten.

Körpergewicht

Die Versuchstiere werden morgens vor der Operation gewogen. Der Mittelwert und die Standardabweichung des Körpergewichts aller gewogenen Tiere betragen 359 ± 24 g.

Temperatur

Die perikranielle Temperatur (T_{peri}) wird kontinuierlich gemessen und zu den vier festgelegten Zeitpunkten dokumentiert. Mit Hilfe einer automatischen mit der Temperatursonde rückgekoppelten Wärmelampe wird, die perikranielle Temperatur konstant auf $37,5$ °C gehalten. Während dies bei den drei Kontrollgruppen ohne statistische Abweichung gelingt, kommt es in der 0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe und in der Halothan-Ischämiegruppe trotzdem zu einem signifikanten Abfall der T_{peri} während der Phase der Ischämie ($37,2 \pm 0,2$ °C bzw. $37,1 \pm 0,2$ °C) und einem Wiederanstieg in der Reperfusion-

bzw. Erholungsphase ($38,1 \pm 0,6$ °C bzw. $37,7 \pm 0,2$ °C). Auch in der 1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe ist ein Absinken zu verzeichnen, wenngleich dieser kein signifikantes Niveau erreicht.

Hämodynamische Parameter und Blutglukosekonzentration

In den folgenden Tabellen und Abbildungen sind, ebenfalls aufgeteilt nach den sechs Untersuchungsgruppen, die Mittelwerte und die Standardabweichungen des mittleren arteriellen Blutdrucks (mmHg) (Tabelle 4, Abbildung 10), der Herzfrequenz (Schläge/min) und der Blutglukosekonzentration (mg/dl) (Tabelle 5) dargestellt.

Tabelle 4: Mittlerer arterieller Blutdruck

		Ketamin 0,75 mg/kg/min		Ketamin 1,0 mg/kg/min		Halothan 0,8 Vol%	
	Messzeit- punkt	Ischämie- gruppe	Kontroll- gruppe	Ischämie- gruppe	Kontroll- gruppe	Ischämie- gruppe	Kontroll- gruppe
MAP (mmHg)	AW	110 ± 19	108 ± 10	106 ± 6	105 ± 4	101 ± 5	101 ± 4 \$
	Isch	40 ± 0 k	101 ± 30 #	40 ± 0 k	102 ± 19 #	40 ± 1 k	82 ± 8
	Rep	114 ± 32	113 ± 16 #	123 ± 19	113 ± 13 #	110 ± 6 *	96 ± 4 \$
	Erh	117 ± 19	120 ± 14 #	114 ± 10	111 ± 11	103 ± 8	100 ± 6 \$

MW und SD des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) der sechs Versuchsgruppen (je n=8), in mmHg, zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten.

AW=Ausgangswert, Messung am Ende der Äquilibrationsphase; Isch=Ischämie, Messung am Ende der Ischämiephase; Rep=Reperfusion, Messung am Ende der Reperfusionphase; Erh=Erholung, Messung am Ende der Erholungsphase.

*Signifikanzen: *=p<0,05 vs. Kontrollgruppe bei gleicher Narkosedosierung zum gleichen Messzeitpunkt; #=p<0,05 vs. Halothan-Kontrollgruppe zum gleichen Messzeitpunkt; \$=p<0,05 vs. Phase der Ischämie (Isch) in der selben Gruppe; ohne Sonderzeichen=nicht signifikant; k=kontrollierter Parameter.*

Der mittlere arterielle Blutdruck ist als kontrollierter Parameter während der ischämischen Phase in allen drei Ischämiegruppen im Vergleich zu den anderen Messzeitpunkten versuchsbedingt signifikant erniedrigt. Der mittlere arterielle Blutdruck beider (0,75 mg- und 1,0 mg-) Ketamin-Kontrollgruppen ist während der Phase der Ischämie und der Reperfusion

im Vergleich zu den Werten der Halothan-Kontrollgruppe signifikant höher. In der 0,75 mg-Ketamin-Kontrollgruppe trifft dies auch für die Erholungsphase zu. Im Vergleich der beiden Halothan-Gruppen fällt auf, dass der MAP der Halothan-Ischämiegruppe zum Messzeitpunkt der Reperfusion signifikant höher ist als in der Halothan-Kontrollgruppe. Außerdem ist der MAP in der Halothan-Kontrollgruppe in der Phase der Ischämie (ohne B CAO!) signifikant niedriger wie zu allen anderen intraoperativen Messzeitpunkten.

Mittlerer arterieller Blutdruck

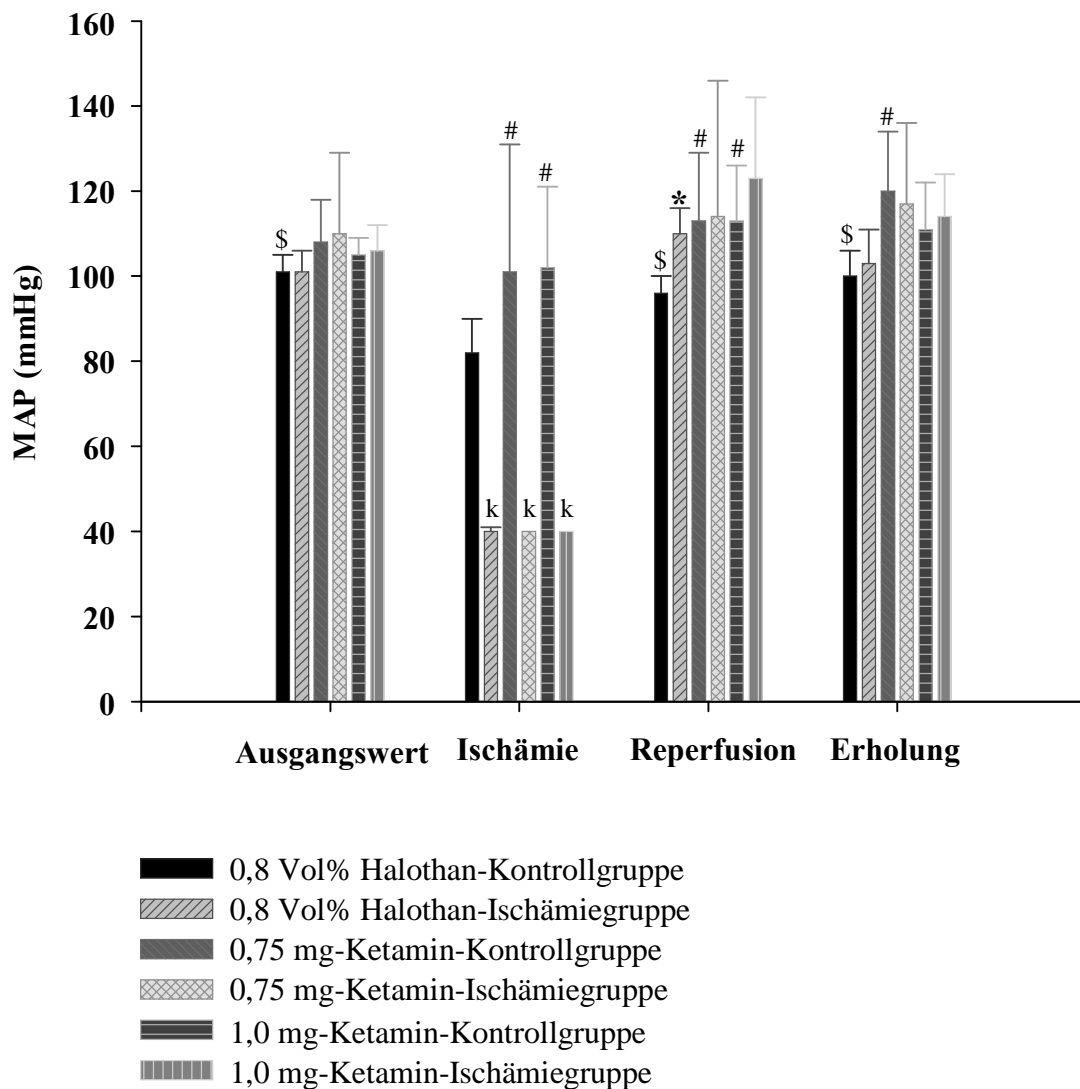


Abbildung 10: Mittlerer arterieller Blutdruck

MD und SD des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) der drei Ischämie- und der drei Kontrollgruppen (je n=8), in mmHg, zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten.

Signifikanzen: *=p<0,05 vs. Kontrollgruppe bei gleicher Narkosedosierung zum gleichen Messzeitpunkt; #=p<0,05 vs. Halothan-Kontrollgruppe zum gleichen Messzeitpunkt; \$=p<0,05 vs. Phase der Ischämie in der selben Gruppe; k=kontrollierter Parameter.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Herzfrequenz zeigt in keiner der Gruppen signifikante Unterschiede und liegt bei allen Gruppen im physiologischen Bereich.

Tabelle 5: Herzfrequenz und Blutglukosekonzentration

		Ketamin 0,75 mg/kg/min		Ketamin 1,0 mg/kg/min		Halothan 0,8 Vol%	
	Messzeit- punkt	Ischämie- gruppe	Kontroll- gruppe	Ischämie- gruppe	Kontroll- gruppe	Ischämie- gruppe	Kontroll- gruppe
Herz- frequenz (/min)	AW	369 ± 70	373 ± 61	341 ± 55	326 ± 53	338 ± 64	354 ± 44
	Isch	371 ± 72	385 ± 57	335 ± 44	345 ± 56	369 ± 80	385 ± 54
	Rep	333 ± 41	395 ± 50	328 ± 43	343 ± 56	349 ± 67	381 ± 54
	Erh	350 ± 52	375 ± 92	336 ± 48	344 ± 61	358 ± 72	371 ± 62
Glukose (mg/dl)	AW	69 ± 10	93 ± 25	66 ± 17	76 ± 20	75 ± 19	73 ± 21
	Isch	78 ± 15	88 ± 23	69 ± 23	62 ± 10	87 ± 29	67 ± 12
	Rep	75 ± 10 §	80 ± 21 §	70 ± 22	61 ± 14 §	83 ± 19 §	75 ± 16
	Erh	69 ± 9	81 ± 21	61 ± 13	61 ± 19 §	76 ± 10	72 ± 12

MW und SD der Herzfrequenz (Schläge/min) und der Blutglukosekonzentration (mg/dl) der sechs Versuchsgruppen (je n=8), zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten.

AW=Ausgangswert, Messung am Ende der Äquilibrationsphase; Isch=Ischämie, Messung am Ende der Ischämiephase; Rep=Reperfusion, Messung am Ende der Reperfusionphase; Erh=Erholung, Messung am Ende der Erholungsphase.

Signifikanzen: §=p<0,05 vs. Ausgangswert (AW) in der selben Gruppe; ohne Sonderzeichen=nicht signifikant.

Die Blutglukosewerte liegen bei allen Tieren im physiologisch niedrigen Bereich. Während der Reperfusion zeigt sich in der 0,75 mg Ketamin-Ischämiegruppe und der Halothan-Ischämiegruppe eine signifikante Erhöhung der Glukosekonzentration gegenüber dem Ausgangswert. In der 0,75 mg-Ketamin-Kontrollgruppe und der 1,0 mg-Ketamin-Kontrollgruppe zeichnet sich im Gegensatz dazu eine signifikante Erniedrigung der

Blutglukosekonzentration in der Phase der Reperfusion gegenüber dem Ausgangswert ab, die bei der 1,0 mg-Ketamin-Kontrollgruppe auch während der Erholungsphase bestehen bleibt.

Blutgasanalyse

Während des Versuchs werden zu festgelegten Messzeitpunkten bestimmte Werte der Blutgasanalyse gemessen: der arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO_2), der arterielle Kohlendioxidpartialdruck (PaCO_2), der pH-Wert (pH) und der Hämoglobingehalt des Blutes (Hb). Die Mittelwerte und die Standardabweichung dieser Ergebnisse finden sich in den Tabellen 6 und 7 (s.u.) wieder.

Die Messwerte des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes der Tiere aller Gruppen liegen im physiologischen Wertebereich.

Der arterielle Kohlendioxidpartialdruck ergibt in der 0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe und der Halothan-Ischämiegruppe signifikant niedrigere Messwerte während der Phase der Ischämie im Vergleich zum Ausgangs- und Reperfusionswert der selben Gruppe, sowie im Vergleich zur Kontrollgruppe mit identischer Narkose in der Ischämiephase.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 6: PaO₂ und PaCO₂

		Ketamin 0,75 mg/kg/min		Ketamin 1,0 mg/kg/min		Halothan 0,8 Vol%	
	Messzeit- punkt	Ischämie- gruppe	Kontroll- gruppe	Ischämie- gruppe	Kontroll- gruppe	Ischämie- gruppe	Kontroll- gruppe
PaO₂ (mmHg)	AW	145 ± 26	124 ± 27	125 ± 41	124 ± 14	121 ± 21	146 ± 16
	Isch	165 ± 21	137 ± 29	138 ± 35	174 ± 24	165 ± 16	147 ± 24
	Rep	167 ± 28	147 ± 35	141 ± 27	149 ± 31	157 ± 30	144 ± 24
	Erh	165 ± 30	169 ± 22	132 ± 25	154 ± 27	149 ± 22	145 ± 23
PaCO₂ (mmHg)	AW	40 ± 3 \$	42 ± 3	39 ± 4	43 ± 2	41 ± 4 \$	38 ± 5
	Isch	32 ± 4 *	41 ± 4	39 ± 14	40 ± 3	32 ± 4 *	38 ± 5
	Rep	41 ± 2 \$	41 ± 2	43 ± 6	41 ± 3	41 ± 5 \$	39 ± 8
	Erh	39 ± 3	40 ± 4	41 ± 3	38 ± 5	39 ± 3	39 ± 4

MW und SD des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes (PaO₂) und des arteriellen Kohlendioxidpartialdruckes (PaCO₂) der sechs Versuchsgruppen (je n=8), in mmHg, zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten.

AW=Ausgangswert, Messung am Ende der Äquilibrationsphase; Isch=Ischämie, Messung am Ende der Ischämiephase; Rep=Reperfusion, Messung am Ende der Reperfusionphase; Erh=Erholung, Messung am Ende der Erholungsphase.

*Signifikanzen: *=p<0,05 vs. Kontrollgruppe bei gleicher Narkosedosierung zum gleichen Messzeitpunkt; \$=p<0,05 vs. Phase der Ischämie (Isch) in der selben Gruppe; ohne Sonderzeichen=nicht signifikant.*

Die Ergebnisse der pH-Wert-Messung liegen alle im physiologischen Bereich. Die einzige signifikante Abweichung weist der pH-Wert der Halothan-Ischämiegruppe zum Zeitpunkt der Ischämieinduktion auf, sowohl gegenüber dem Ausgangswert der eigenen Gruppe als auch gegenüber der Halothan-Kontrollgruppe zum Messzeitpunkt der Ischämie.

Tabelle 7: pH-Wert und Hämoglobinkonzentration

		Ketamin 0,75 mg/kg/min		Ketamin 1,0 mg/kg/min		Halothan 0,8 Vol%	
	Messzeit- punkt	Ischämie- gruppe	Kontroll- gruppe	Ischämie- gruppe	Kontroll- gruppe	Ischämie- gruppe	Kontroll- gruppe
pH-Wert	AW	7,37 ± 0,03	7,38 ± 0,03	7,34 ± 0,03	7,36 ± 0,04	7,36 ± 0,03 \$	7,38 ± 0,04
	Isch	7,41 ± 0,05	7,41 ± 0,03	7,35 ± 0,08	7,40 ± 0,04	7,43 ± 0,04 *	7,37 ± 0,03
	Rep	7,38 ± 0,03	7,40 ± 0,03	7,36 ± 0,02	7,40 ± 0,04	7,38 ± 0,04	7,36 ± 0,04
	Erh	7,39 ± 0,03	7,42 ± 0,06	7,36 ± 0,03	7,40 ± 0,04	7,39 ± 0,03	7,37 ± 0,04
Hämo- globin (g/dl)	AW	12,7 ± 0,9 \$	12,4 0,7	12,2 ± 1,1	12,5 ± 1,2	12,6 ± 1,0 \$	12,7 ± 1,1
	Isch	9,8 ± 1,4 *	12,1 ± 1,0	10,4 ± 0,8 *	12,4 ± 1,0	10,7 ± 0,7 *	12,4 ± 0,8
	Rep	12,2 ± 1,0 \$	12,2 ± 0,9	12,1 ± 0,7	12,7 ± 1,1	12,0 ± 1,8	13,0 ± 0,9
	Erh	12,4 ± 1,2	12,3 ± 0,9	12,2 ± 0,7	12,1 ± 1,4	12,3 ± 1,2	12,2 ± 0,9

MW und SD des pH-Wertes und des Hämoglobingehalts des Blutes (g/dl) der sechs Versuchsgruppen (je n=8), zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten.

AW=Ausgangswert, Messung am Ende der Äquilibrationsphase; Isch=Ischämie, Messung am Ende der Ischämiephase; Rep=Reperfusion, Messung am Ende der Reperfusionphase; Erh=Erholung, Messung am Ende der Erholungsphase.

Signifikanzen: *=p<0,05 vs. Kontrollgruppe bei gleicher Narkosedosierung zum gleichen Messzeitpunkt; \$=p<0,05 vs. Phase der Ischämie (Isch) in der selben Gruppe; ohne Sonderzeichen=nicht signifikant.

Die Werte der Hämoglobin-Bestimmung weisen bei den Tieren der 0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe und bei der Halothan-Ischämiegruppe einen signifikanten, bei der 1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe zwar keinen signifikanten, aber auch einen deutlich erkennbaren Abfall des Hämoglobingehaltes während der Phase der Ischämie auf, der artifizuell durch die hämorrhagische Ischämieinduktion hervorgerufen wird. Zum Messzeitpunkt der Ischämie sind daher auch die Werte der Ischämiegruppen gegenüber den Werten der jeweiligen Kontrollgruppe signifikant erniedrigt.

3.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die zerebrale Ischämie induziert einen Schaden, der anhand der Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gehirnschnitte unter dem Lichtmikroskop beurteilt und klassifiziert wird. Beide Gehirnhälften werden unter besonderer Beachtung der Hippokampusformation untersucht. Das sog. Zellband, welches sich aus den Neuronen des Hippokampus und des Gyrus dentatus formiert, wird auf das Vorkommen und die Verteilung von eosinophilen (rot angefärbten) und nicht-eosinophilen (blau-lila angefärbten) Zellen untersucht und entsprechend der Schadensklassifizierung (s. Kap. 3.2.7.1.3) einer Schadensgruppe zugeordnet (siehe Abbildung 11 und 12). Anschließend wird daraus der HE-Index für die jeweilige Hemisphäre berechnet, der die Schwere des Schadens als Zahlenwert zwischen 0 (keine Neuronenschaden) und 3 (maximaler Neuronenschaden) veranschaulicht. Da sich nach statistischer Überprüfung keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen der linken und der rechten Hemisphäre ergeben haben, werden im Folgenden die Ergebnisse beider Hemisphären zusammengefasst dargestellt.

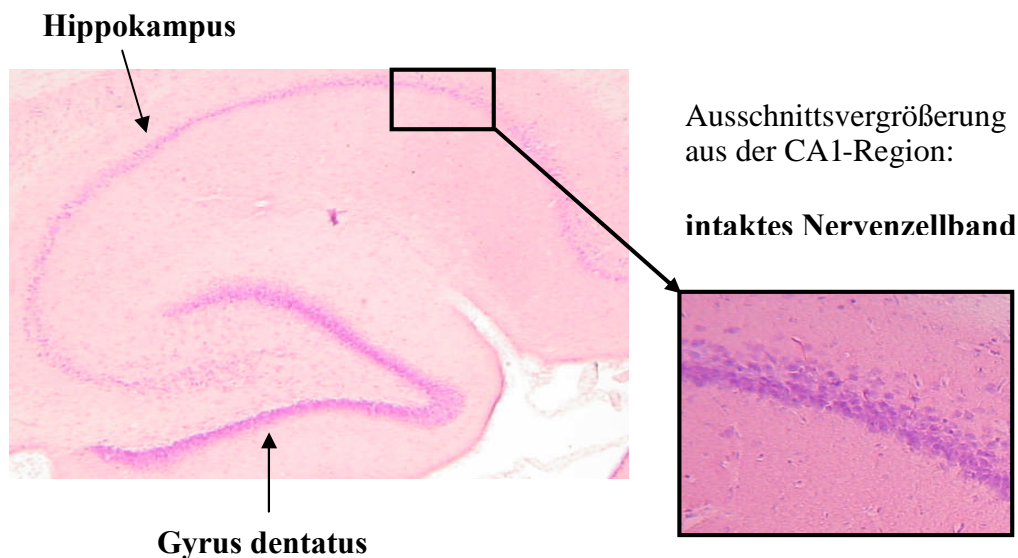


Abbildung 11: Histologische Beurteilung des neuronalen Gewebes in der Hippokampusformation und dem Gyrus dentatus der Ratte - physiologischer Befund

HE-Färbung; links: Übersicht über die Hippokampusformation und den Gyrus dentatus (24x); rechts: Ausschnittsvergrößerung aus dem Nervenzellband der CA1-Region (80x); neuronales Zellband des Hippokampus und Neuronen des Gyrus dentatus intakt, Schadensklassifizierung: CA1-Region=0, CA3-Region=0.

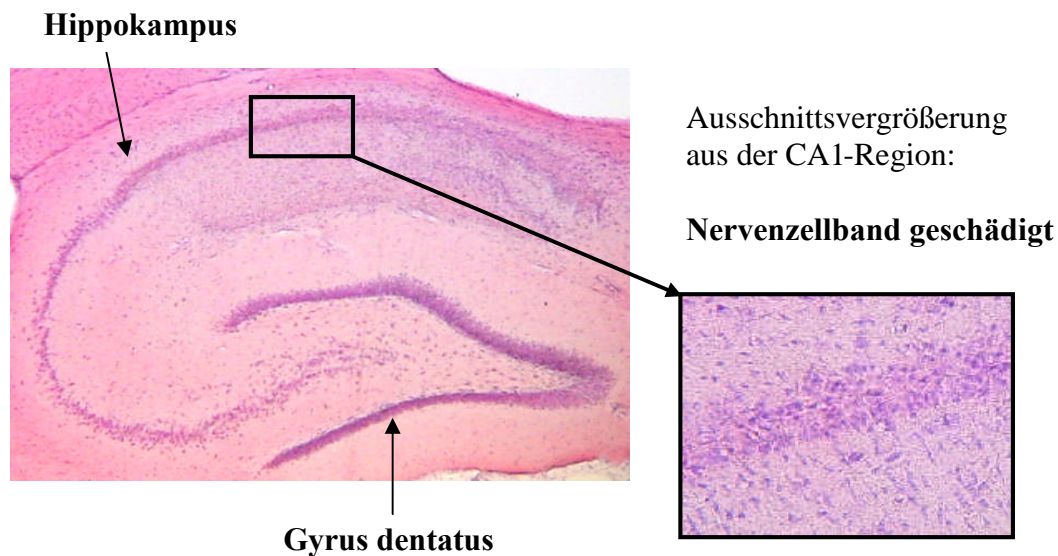


Abbildung 12: Histologische Beurteilung des neuronalen Gewebes in der Hippokampusformation und dem Gyrus dentatus der Ratte - Neuronenschaden

HE-Färbung; links: Übersicht über die Hippokampusformation und den Gyrus dentatus (24x); rechts: Ausschnittsvergrößerung aus dem Nervenzellband der CA1-Region (80x); Neuronen der CA3-Region des Hippokampus und des Gyrus dentatus intakt; Neuronen der CA1-Region stark geschädigt; Schadensklassifizierung: CA1-Region=3, CA3-Region=0.

Bei allen Tieren, die keiner Ischämie ausgesetzt wurden, d.h. Tiere der Nativgruppe und aller drei Kontrollgruppen (0,75 mg-Ketamin-Kontrollgruppe, 1,0 mg-Ketamin-Kontrollgruppe, Halothan-Kontrollgruppe), ist histologisch in der gesamten Hippokampusformation incl. des Gyrus dentatus kein Schaden zu erkennen (Tabelle 8). Es folgt die Zuteilung der Schadensklasse 0. Es liegen damit keine statistischen Unterschiede zwischen diesen vier Tiergruppen vor, weder zwischen einer der Kontrollgruppen in Bezug auf die Nativgruppe, noch zwischen den einzelnen Kontrollgruppen der verschiedenen Narkoseformen.

Tabelle 8: Histologische Schadensklassifizierung in der HE-Färbung

Behandlungsgruppe	Neuronaler Schaden, HE-Index	
	CA1-Region	CA3-Region
Halothan-Ischämiegruppe	1,30 ± 1,25 * #	0,00 ± 0,00
Halothan-Kontrollgruppe	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe	0,92 ± 1,09 * #	0,00 ± 0,00
0,75 mg-Ketamin-Kontrollgruppe	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe	0,57 ± 0,80 * #	0,01 ± 0,02
1,0 mg-Ketamin-Kontrollgruppe	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Nativgruppe	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

*Ergebnisse der HE-Auswertung für den neuronalen Schaden des Hippokampus in Form des HE-Index der sieben Tiergruppen (je n=8), getrennt dargestellt für die Regionen CA1 und CA3, (MW±SD). Signifikanzen: *=p<0,05 vs. Kontrollgruppe bei gleicher Narkosedosierung; #=p<0,05 vs. Nativgruppe.*

Deutlich anders verhält es sich mit den Ergebnissen der drei Ischämiegruppen:

bei allen drei Ischämiegruppen ist ein histologischer Schaden in der CA1-Region nachzuweisen. Der HE-Index für die CA1-Region ist bei allen drei Ischämiegruppen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe der zugehörigen Narkoseform signifikant erhöht (siehe Abbildung 13). Ebenfalls signifikant erhöht sind die HE-Indices aller drei Ischämiegruppen bezogen auf die Nativgruppe. Die CA3-Region ist nur bei einem einzigen Tier der gesamten Studie leicht geschädigt. Dabei handelt es sich um eine Ratte der 1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe. Dieser Schaden ist jedoch so gering, dass er statistisch keine Auswirkungen hat. Die CA3-Regionen der Hippokampi aller Versuchsgruppen werden daher einheitlich als intakt beurteilt. Das histologische Bild des Gyrus dentatus entspricht in allen Gruppen den physiologischen Verhältnissen ohne erkennbare Veränderungen.

Neuronaler Schaden CA1-Region

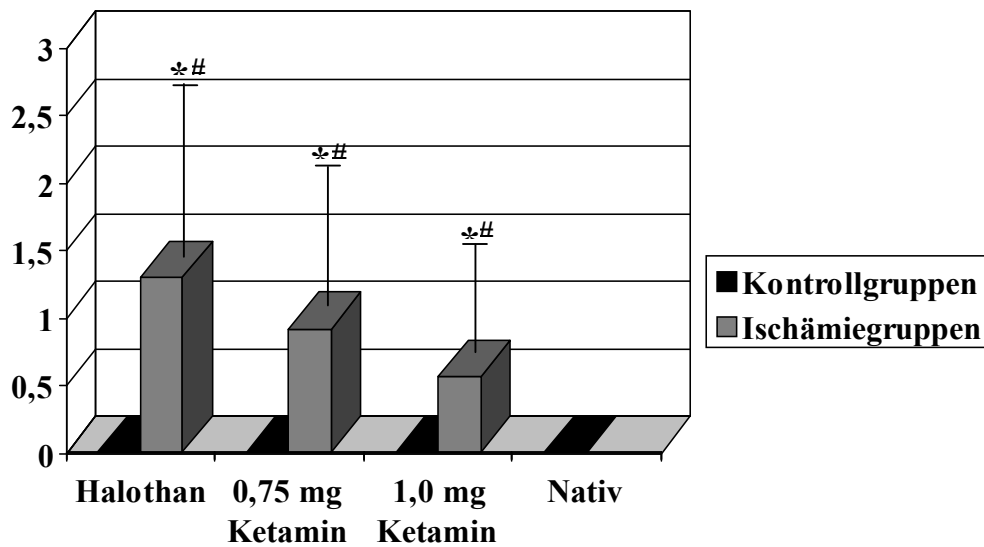


Abbildung 13: Grafische Darstellung des neuronalen Schadens bzw. der HE-Indices der CA1-Region des Hippokampus

*MW und SD der HE-Indices der CA1-Region der sieben Tiergruppen (je n=8). Signifikanzen: *=p<0,05 vs. Kontrollgruppe bei gleicher Narkosedosierung; #=p<0,05 vs. Nativgruppe.*

Die Intensität der neuronalen Schädigung in der CA1-Region, gemessen als HE-Index, zeigt eine tendenzielle Zunahme in folgender Reihenfolge der Gruppen:

- 1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe
- 0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe
- Halothan-Ischämiegruppe

Die Unterschiede im Ausmaß des histologischen Schadens erreichen zwischen den drei Ischämiegruppen jedoch kein signifikantes Niveau.

3.3.3 BrdU-Färbung

Durch die In-vivo-Markierung aller mitotisch aktiven Zellen in der postoperativen Phase (s. Kapitel 3.2.5) hat sich der Marker BrdU in die DNS-Stränge neu gebildeter Zellen eingebaut und kann nun mit Hilfe der immunhistochemischen BrdU-Färbung nachgewiesen werden. Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate erfolgt ebenfalls mit dem Lichtmikroskop. Eine beispielhafte Darstellung der BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus einer Ratte findet sich in Abbildung 14:

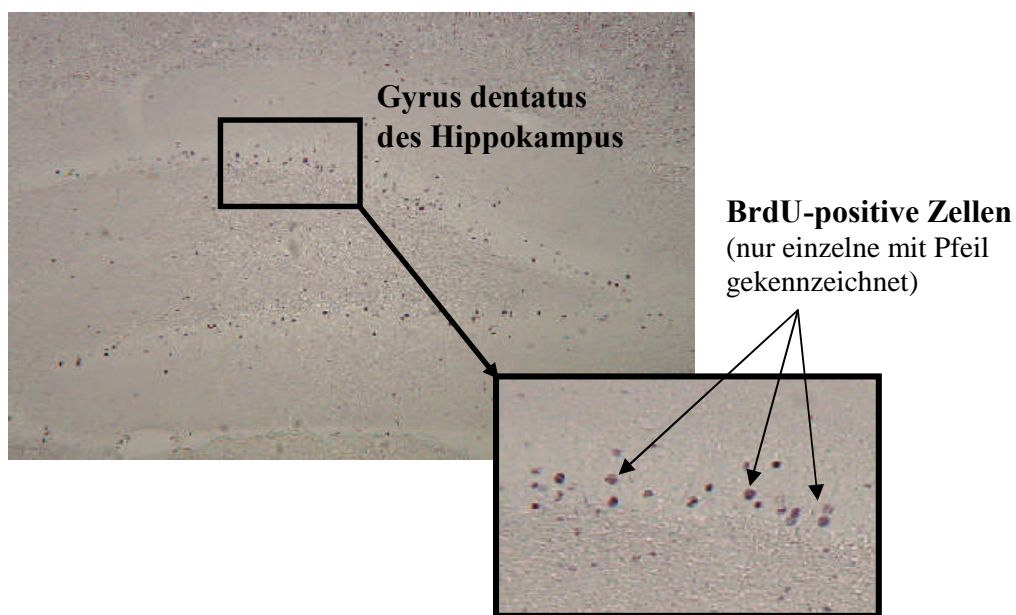


Abbildung 14: Gyrus dentatus einer Ratte der 0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe

BrdU-Färbung, links: Übersicht über den Gyrus dentatus (40x); rechts: Ausschnittsvergrößerung aus dem Neuronenband des GD (100x). Proliferierende Zellen haben BrdU in ihren Zellkern eingebaut und stellen sich in der BrdU-Färbung schwarz dar.

Angefärbte d.h. BrdU-positive Zellen im Gyrus dentatus werden ausgezählt. Das Ergebnis entspricht dem zehnten Teil der im Zeitraum der In-vivo-Markierung neu gebildeter Zellen (da nur eines von zehn Eppendorfgläsern, auf die die Gehirnschnitte beim Schneiden aufgeteilt wurden, in die BrdU-Färbung und die anschließende Auswertung eingeht) und ist in Tabelle 9 wiedergegeben. Aus Gründen der besseren Verständlichkeit wird im Folgenden von der Gesamtzahl der BrdU-positiven Zellen gesprochen und darauf hingewiesen, dass es sich dabei nur um die Anzahl ausgezählter Zellen handelt. Um die absolute Gesamtzahl aller BrdU-positiven Zellen im gesamten Gyrus dentatus zu erhalten, muss man die Ergebnisse der Auszählung mit dem Faktor 10 multiplizieren.

Auch diese Auswertung ergibt keine statistischen Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Hemisphären, so dass die rechte und linke Gehirnhälfte zusammen dargestellt werden.

Tabelle 9: Anzahl BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus der Ratte

Behandlungsgruppe	Anzahl BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus
Halothan-Kontrollgruppe	249 ± 163
Halothan-Ischämiegruppe	637 ± 330 * #
0,75 mg-Ketamin-Kontrollgruppe	283 ± 89
0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe	726 ± 349 * #
1,0 mg-Ketamin-Kontrollgruppe	207 ± 133
1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe	427 ± 208 *
Nativgruppe	267 ± 40

MW und SD der Anzahl BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus der sechs Versuchsgruppen und der Nativgruppe (je n=8).

*Signifikanzen: *=p<0,05 vs. Kontrollgruppe bei gleicher Narkosedosierung; #=p<0,05 vs. Nativgruppe.*

Die statistische Auswertung der Anzahl BrdU-positiver Zellen ergibt folgendes Ergebnis:

Die Ischämiegruppen aller drei Narkoseformen (Halothan-Ischämiegruppe, 0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe, 1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe) haben signifikant mehr BrdU-positive Zellen im Gyrus dentatus als die jeweils entsprechende Kontrollgruppe derselben Narkoseform. Dabei unterscheiden sich die Ergebnisse der Halothan-Ischämiegruppe und der 0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe ebenfalls signifikant von denen der Nativgruppe, nicht jedoch die Ergebnisse der 1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe. Vergleicht man die Anzahl positiver Zellen der drei Kontrollgruppen untereinander, ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Ebenfalls keine signifikanten Abweichungen finden sich im Vergleich der drei Ischämiegruppen der verschiedenen Narkoseformen (siehe Abbildung 15).

Zellproliferation

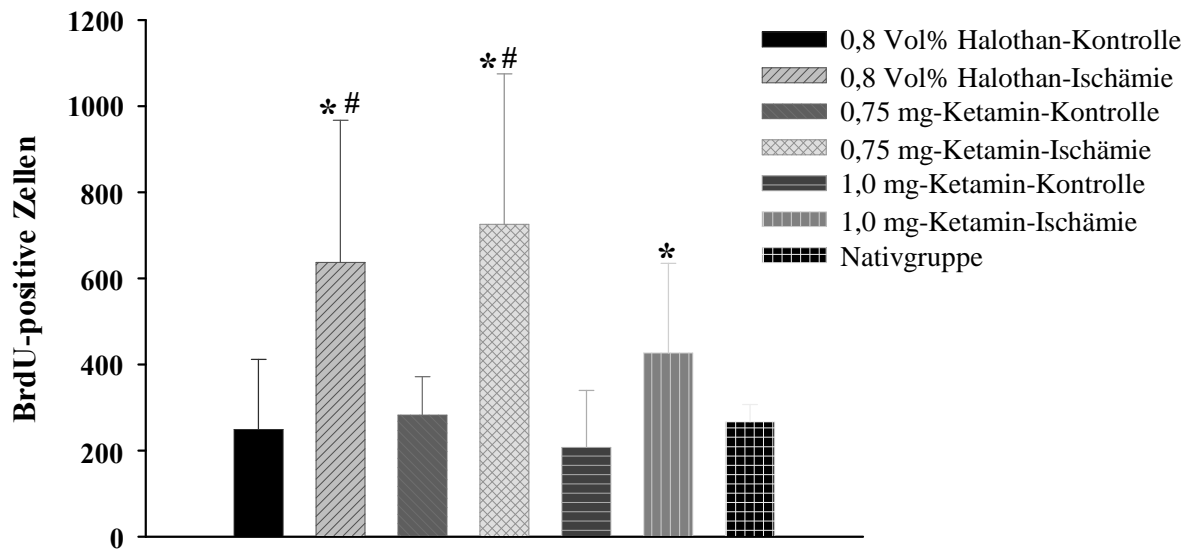


Abbildung 15: Graphische Darstellung der Anzahl BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus

*MW und SD der Anzahl BrdU-positiver Zellen um Gyrus dentatus der sechs Versuchsgruppen und der Nativgruppe (je n=8), 28 Tage nach zerebraler Ischämie. Signifikanzen: *=p<0,05 vs. Kontrollgruppe bei gleicher Narkosedosierung; #=p<0,05 vs. Nativgruppe.*

3.3.4 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung ermöglicht unter Zuhilfenahme des ApoTomes eine qualitative Differenzierung der BrdU-positiven Zellen. Diese werden im Rahmen der Doppelfärbung mit dem Fluoreszenzmarker FITC konjugiert und können dadurch mit dem Immunfluoreszenzmikroskop aufgefunden werden. Man untersucht 50 FITC- bzw. BrdU-positiven Zellen und prüft sie auf eine gleichzeitige Markierung mit dem zweiten Fluoreszenzfarbstoff ROX, der sich über spezifische Antikörper nur an Neuronen binden kann (s. Kapitel 3.2.7.3). Auf diesem Wege wird die Neurogeneserate - also der prozentuale Anteil der Neuronen an der Gesamtheit BrdU-markierter Zellen - bestimmt. Die Neurogeneserate weist keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf. Die Werte sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Eine beispielhafte Darstellung einer in der Immunfluoreszenz-Färbung doppelt-positiv markierten Zelle findet sich in Abbildung 16.

Tabelle 10: Neurogeneserate im Gyrus dentatus

Behandlungsgruppe	Neurogeneserate (%)
Halothan-Kontrollgruppe	93 ± 5
Halothan-Ischämiegruppe	91 ± 6
0,75 mg-Ketamin-Kontrollgruppe	91 ± 5
0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe	92 ± 4
1,0 mg-Ketamin-Kontrollgruppe	92 ± 4
1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe	90 ± 9
Nativgruppe	92 ± 4

MW und SD für den Anteil der Neuronen (%) an allen BrdU-markierten Zellen im Gyrus dentatus der sechs Versuchsgruppen und der Nativgruppe (je n=8), 28 Tage nach zerebraler Ischämie. Signifikanzen: keine.

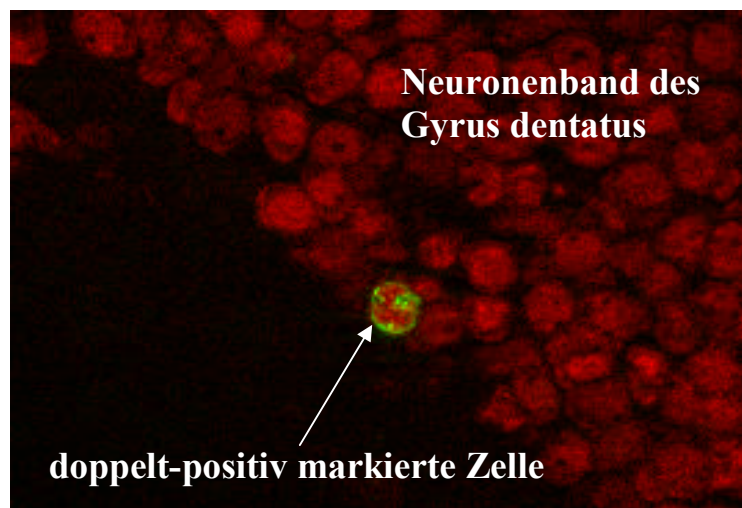


Abbildung 16: Ausschnitt aus dem Neuronenband des Gyrus dentatus der Ratte

Immunfluoreszenz-Doppelfärbung (400x): rot dargestellt sind mit NeuN markierte Zellen (Neurone), grün dargestellt sind mit BrdU markierte Zellen (neu gebildete Zellen); die doppelt-positiv markierte Zelle entspricht einem neu gebildeten Neuron.

Die nur an einem repräsentativen Teil BrdU-positiver Zellen bestimmte Neurogeneserate wird im Folgenden mit der Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen (s.o.) eines jeden Tieres multipliziert und somit die Anzahl neuer Neuronen im Gyrus dentatus errechnet. (Es wird wieder darauf hingewiesen, dass es sich auch bei den neuen Neuronen um den zehnten Teil der absoluten Anzahl handelt). Die Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen für die verschiedenen Gruppen sind in folgender Tabelle (Tabelle 11) zusammengefasst:

Tabelle 11: Anzahl neu generierter Neuronen im Gyrus dentatus

Behandlungsgruppe	Anzahl neu generierter Neurone im Gyrus dentatus
Halothan-Kontrollgruppe	230 ± 150
Halothan-Ischämiegruppe	590 ± 319 * #
0,75 mg-Ketamin-Kontrollgruppe	259 ± 87
0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe	667 ± 322 * #
1,0 mg-Ketamin-Kontrollgruppe	190 ± 121
1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe	387 ± 198
Nativgruppe	246 ± 40

MW und SD der Anzahl neu gebildeter Neuronen im Gyrus dentatus der sechs Versuchsgruppen und der Nativgruppe (je n=8), 28 Tage nach zerebraler Ischämie.

*Signifikanzen: *=p<0,05 vs. Kontrollgruppe bei gleicher Narkosedosierung; #=p<0,05 vs. Nativgruppe.*

Die Ergebnisse zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Kontrollgruppen untereinander und der Nativgruppe. Die 1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe weist ebenfalls keine statistische Signifikanz gegenüber der Nativgruppe auf, wodurch sie sich von der Halothan-Ischämiegruppe und der 0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe unterscheidet. Die beiden letztgenannten Gruppen sind sowohl zur Nativgruppe als auch zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen signifikant unterschiedlich und weisen eine höhere Anzahl neuer Neuronen auf. Werden die drei Ischämiegruppen untereinander verglichen, sind keine signifikanten Abweichungen festzustellen. Jedoch ist eine Tendenz dahingehend erkennbar, dass in der 1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe weniger neue Neuronen gebildet werden als in der 0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe (p=0,074). Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse findet sich in Abbildung 17.

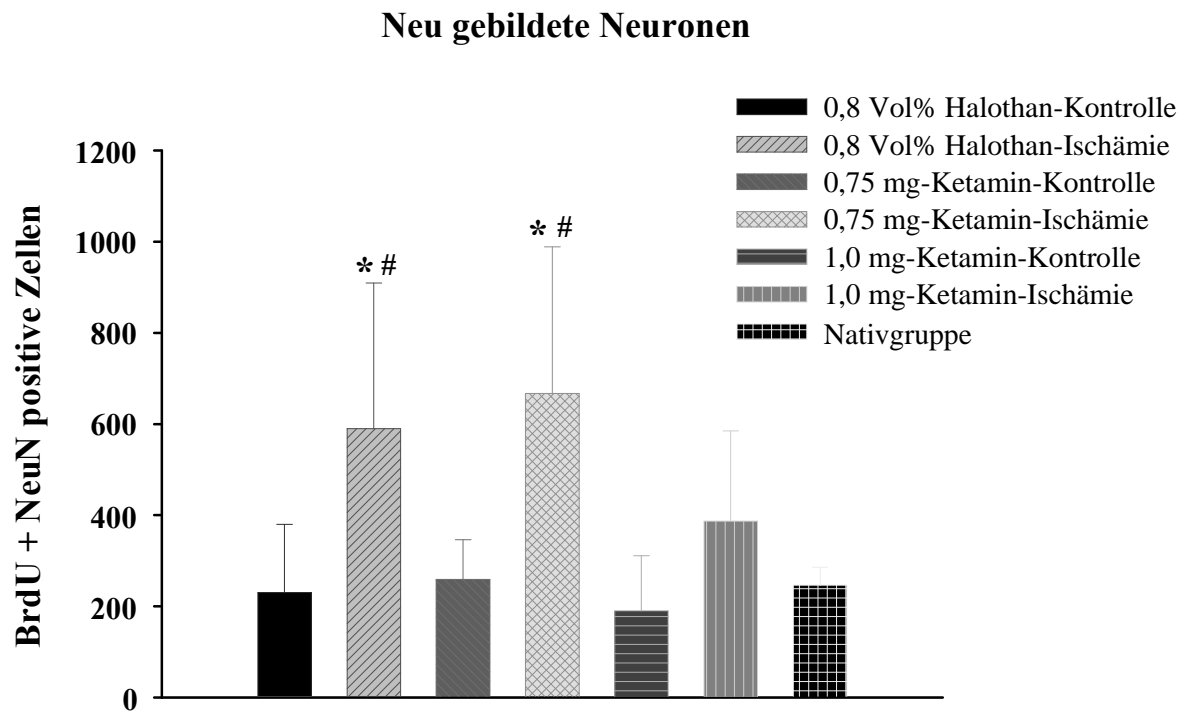


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Anzahl neu gebildeter Neuronen im Gyrus dentatus

MW und SD der Anzahl neu gebildeter Neuronen im Gyrus dentatus bei den sechs Versuchsgruppen und der Nativgruppe (je n=8); 28 Tage nach zerebraler Ischämie.

*Signifikanzen: *= $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe bei gleicher Narkosedosierung; #= $p < 0,05$ vs. Nativgruppe.*

3.3.5 Volumenbestimmung des Gyrus dentatus

Um vergleichbare Aussagen über die Neubildung von Neuronen im Gyrus dentatus der verschiedenen Versuchsgruppen treffen zu können, muss die Größe bzw. das Volumen des GD berücksichtigt werden. Bei den HE-gefärbten Gehirnschnitten wird eine Flächenmessung des GD durchgeführt und aus den gewonnenen Daten die Größe des vorliegenden Volumens errechnet (Kap. 3.2.7.4). Dabei sind keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Volumens aufgetreten (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Volumen des Gyrus dentatus

Narkose	Behandlungsgruppe	Volumen des Gyrus dentatus (mm³)
Halothan 0,7 MAC	Kontrollgruppe	2,183 ± 0,262
	Ischämiegruppe	2,091 ± 0,224
S(+)Ketamin 0,75 mg/kg/min	Kontrollgruppe	1,939 ± 0,246
	Ischämiegruppe	2,129 ± 0,255
S(+)Ketamin 1,0 mg/kg/min	Kontrollgruppe	2,064 ± 0,349
	Ischämiegruppe	2,085 ± 0,302
keine	Nativgruppe	1,962 ± 0,283

MW und SD der Volumenmessung des Gyrus dentatus (mm³) der sechs Versuchsgruppen und der Nativgruppe (je n=8). Signifikanzen: keine.

3.3.6 Korrelation des histologischen Schadens mit der Anzahl neu gebildeter Neuronen

Es stellt sich die Frage, ob mit zunehmender Schadensgröße die Neurogenese verstärkt angeregt und vermehrt neue Neuronen gebildet werden oder ob mit der Stärke des Gewebeschadens zunehmend die Regenerationsfähigkeit eingeschränkt wird. Um dies zu beantworten, werden die Ergebnisse der beiden Parameter HE-Index und neu gebildete Neuronen mit dem Spearman Korrelationskoeffizient untersucht.

Mit Hilfe dieser statistischen Berechnung kann eine hochsignifikante Korrelation zwischen den HE-Indices der CA1-Region und der Anzahl neu gebildeter Neuronen aufgezeigt werden. Für die HE-Indices der CA3-Region dagegen konnte keine Wechselbeziehung mit der Anzahl neuer Neuronen festgestellt werden. Um Fehler in der Beurteilung dieses Tests auszuschließen, die sich durch das überwiegende Auftreten komplett schadensfreier Tiere ergeben können, wurde zusätzlich ein Mann-Whitney Test durchgeführt, der Tiere mit und ohne histologischem Schaden als getrennte Gruppen untersucht. Die Ergebnisse dieses Tests stimmen mit den Spearman Korrelationskoeffizienten sehr gut überein und bestätigen damit die signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten eines neuronalen Schadens in der CA1-Region und der gesteigerten Bildung neuer Neuronen (siehe Abbildung 18).

Anzahl neu gebildeter Neuronen im Gyrus dentatus
geordnet nach Tiergruppen ohne bzw. mit Neuronenschaden
in der CA1-Region

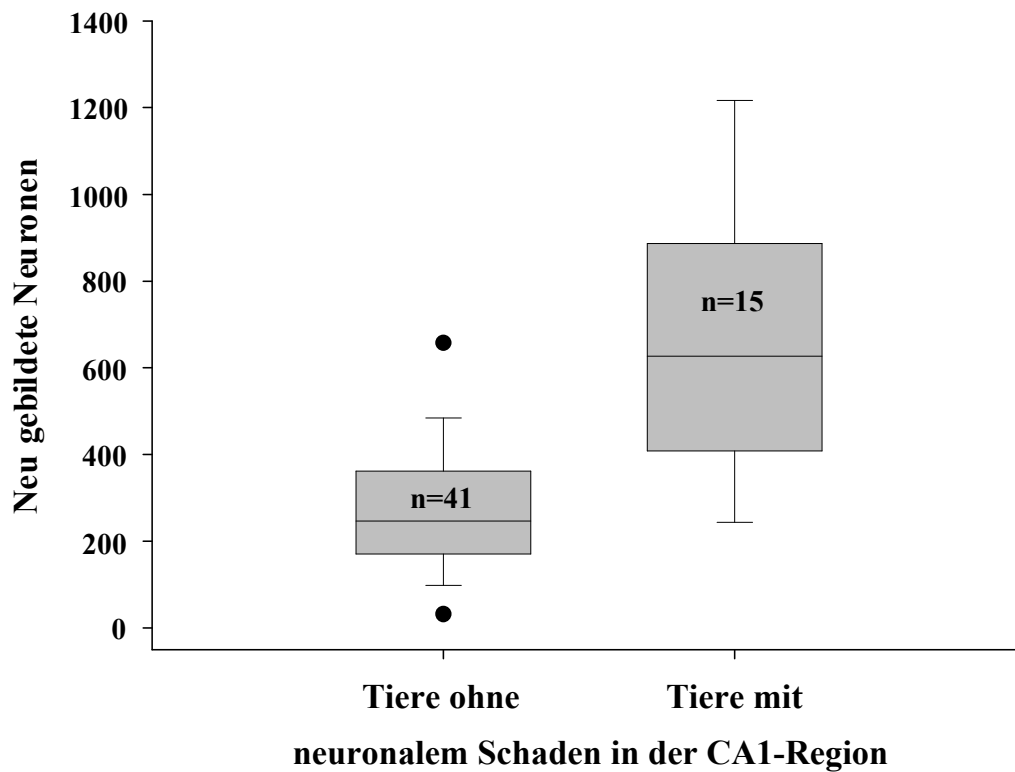


Abbildung 18: Anzahl neu gebildeter Neuronen bei Tieren ohne und mit Neuronenschaden in der CA1-Region

Die 56 Tiere der Studie werden hier anhand der histologischen HE-Auswertung neu gruppiert: Tiere ohne neuronalem Schaden ($n=41$) vs. Tiere mit neuronalem Schaden ($n=15$).

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Zerebrales Ischämiemodell

Der Einsatz und die Durchführung von Tierversuchen werden von Seiten der Öffentlichkeit aus ethischen und moralischen Gründen unter Berufung auf das Tierschutzgesetz (TierSchG §1 „... Niemand darf einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen ...“, SCHIWY und HARMONY 2003) zunehmend heftig kritisiert. Die Forderungen sowie die Bemühungen, die Anzahl der Tierversuche zu reduzieren und diese teilweise durch alternative Methoden - In-vitro-Modelle für Zellkulturen, Gewebekulturen, isolierte Organe, Hühnereier oder Computersimulationen - zu ersetzen, sind in den letzten Jahren deutlich verstärkt worden. Diese sehr begrüßenswerte Entwicklung stößt jedoch mit der Komplexität vieler pathologischer Abläufe bzw. medizinischer Fragestellungen an ihre Grenzen. Komplexe pathophysiologische Mechanismen, wie sie z.B. während bzw. nach einer Ischämie im neuronalen Gewebe ablaufen, sind mit derartigen Analysemethoden nicht ausreichend zu beleuchten, da Untersuchungen an Zellkulturen oder ischämischen Gewebeschnitten aufgrund der vom physiologischen Zustand abweichenden - aber sehr bedeutsamen - (Re-)Perfusion keine In-vivo-Situation simulieren können. Klinische Studien an humanen Patienten mit zerebraler Ischämie sind bedingt durch die große Inhomogenität des Patientenguts hinsichtlich Ursache, Schwere und Manifestation des Insults, des Alters, zusätzlicher Erkrankungen usw. kaum aussagekräftig. Es ist daher notwendig, für Studien zur Erforschung der zerebralen Ischämie Tiermodelle einzusetzen.

Die Möglichkeit der Überwachung und Kontrolle verschiedener Parameter vor und während der Durchführung eines Tierversuches schafft die nötige Voraussetzung für die geforderte Reproduzierbarkeit ablaufender pathophysiologischer Prozesse. Ein weiterer Vorteil eines Tierversuches liegt in der Möglichkeit, umfassende histologische, biologische und pathologische Untersuchungen intra- und postoperativ am Gehirn durchzuführen (GINSBERG und BUSTO 1989).

Als Versuchstiere werden heutzutage, neben einem verhältnismäßig geringen Anteil an größeren Säugetieren (Katzen, Hunde, Schweine, Primaten), in erster Linie Nagetiere eingesetzt. Gründe für dieses Vorgehen sind die geringeren Kosten für Anschaffung, Haltung und Medikamentenanwendung, sowie eine einfachere Unterbringung und einfacheres Handling der Tiere aufgrund ihrer geringeren Körpergröße. Dies erleichtert ebenso die Probenentnahme, -aufbereitung und -lagerung und führt auch in diesem Bereich zu

finanziellen Einsparungen gegenüber größeren Tierspezies. Die kurze Tragzeit der Tiere in Kombination mit hohen Wurfgrößen erleichtert die Zucht und stellt die Voraussetzung für eine gute Verfügbarkeit dar. Ein weiteres wichtiges Kriterium für den Einsatz von Ratten im Tiermodell ist eine dem Menschen vergleichbare Anatomie und Physiologie (YAMORI et al. 1976) und - für die vorliegende Studie - die anatomische Ähnlichkeit mit der zerebrovaskulären Blutversorgung des Menschen. Des Weiteren spricht die bessere Akzeptanz der Bevölkerung aus ethischer Sicht für die Verwendung von Nagetieren als Versuchstier - im Gegensatz zu höheren Säugern oder Primaten (TRAYSTMAN 2003). Die Ratte stellt das geeignete Versuchstier dar, an dem eine für die Versuchsdurchführung erforderliche Überwachung der Vitalfunktionen, sowie eine kontrollierte Beatmung und das Konstanthalten physiologischer Variablen durchgeführt werden kann. Durch Entschlüsselung und der damit erwiesenen Ähnlichkeit zwischen dem menschlichen und dem rodenten Genom werden heutzutage fast ausschließlich Ratten und Mäuse für versuchstierkundliche Zwecke herangezogen (JACOB und KWITEK 2002).

Aus oben ausgeführten Gründen und der Auswahl an gut etablierten Ischämie-Modellen an Ratten für Studien der zerebralen Ischämie ist für die Fragestellung der vorliegenden Studie ein Rattenmodell zur Induktion einer inkompletten, temporären, globalen, zerebralen Ischämie mit Reperfusion ausgewählt worden. Die zerebrale Ischämie wird durch 10-minütigen Verschluss der beiden Aa. carotides communes bei gleichzeitiger hämorrhagischer Hypotension auf einen MAP von 40 mmHg induziert. Mit Hilfe einer Vorstudie (ENGELHARD, in Vorb.) wurde die Dauer der Ischämie so gewählt, dass eine Schädigung der selektiv vulnerablen Neuronen der Hippokampusformation (PULSINELLI 1985) auftritt, weniger Ischämie-empfindliche Regionen aber verschont bleiben.

Es ist wichtig, bei der Versuchsdurchführung darauf zu achten, alle Faktoren, die das Ausmaß des induzierten ischämischen Schadens zusätzlich beeinflussen können, durch kontinuierliches Monitoring konstant zu halten bzw. so zu regeln, dass sie keine zusätzliche neuroprotektive oder schädigende Wirkung verursachen (TRAYSTMAN 2003). Da eine durch Futteraufnahme bedingte vorübergehende Hyperglykämie während der Ischämieinduktion einen schadenpotenzierenden Effekt verursacht (HOFFMAN et al. 1990; MARIE et al. 1990), wird bei allen Tieren vor Versuchsbeginn auf eine 12-stündige Nahrungskarenz geachtet, um einen niedrigen, normoglykämischen Blutglukosespiegel zu gewährleisten. Die kontinuierlich vom Atemgasmonitor gemessene endexpiratorische CO₂-Konzentration wird während des gesamten Versuchs durch Regulierung der Beatmungsfrequenz im Bereich physiologischer Werte zwischen 38 und 42 mmHg konstant gehalten. Es werden so gravierende Abweichungen im Säure-Basen-Haushalt der Tiere

verhindert bzw. ausgeglichen, da eine Azidose zur Verstärkung, eine Alkalose zu einer Verminderung des Gewebeschadens führt (SIESJÖ 1992; ANDERSON und MEYER 2002). Eine bedeutende Rolle für das Ausmaß eines ischämischen Gehirnschadens spielt die kraniale Temperatur nicht nur zum Zeitpunkt der Ischämieinduktion. Besonders bei kleinen Tierspezies kommt es während einer Narkose durch verminderte Stoffwechselleistungen zum Absinken der Körpertemperatur. Da Hypothermie einen nachweislich neuroprotektiven Effekt im ischämischen Geschehen hat (BUSTO et al. 1987), ist es sehr wichtig, sowohl die Körpertemperatur, aber besonders die perikranielle Temperatur stetig zu kontrollieren und konstant aufrecht zu erhalten. Dies erfolgt über eine Temperatursonde im rechten M. temporalis, die mit einem Temperatur-Kontrollgerät und einer Infrarot-Wärmelampe gekoppelt ist. Über einen Rückkopplungsmechanismus wird eine perikranielle Temperatur von 37,5 °C durch automatisches An- und Abschalten der Wärmelampe aufrecht erhalten. Ein weiterer Parameter, der zur Standardisierung der Ausgangsbedingungen beachtet werden sollte, ist der mittlere arterielle Blutdruck der Tiere. Um die direkte Wirkung der Anästhetika auf den neuronalen Schaden bzw. die Neurogenese zu erfassen, müssen deren indirekte, den Blutdruck und damit den Perfusionsdruck bzw. die zerebrale Oxygenierung beeinflussende Wirkungsweisen ausgeschlossen werden. Deshalb wird der MAP der Tiere vor der Ischämieinduktion (also während der Äquilibrationsphase) und ab Beginn der Reperfusion durch die wirkungsabhängige intravenöse Applikation von Norepinephrin auf einen Wert zwischen 100 und 110 mmHg eingestellt. Umwelteinflüsse wie z.B. abwechslungsreiche Lebensräume (KEMPERMANN et al. 1997), Lernaufgaben (GOULD et al. 1999) o.ä. stimulieren die Neurogenese im Gyrus dentatus, wohingegen Stress hemmend auf die adulte Neurogenese wirkt (GOULD et al. 1997) (s. Kapitel 2.3.2.1.1). Um derartige Auswirkungen exogener Faktoren im Umfeld der Tiere weitestgehend zu minimieren, erfolgt die Tierhaltung und -fütterung unter standardisierten Bedingungen sowie die Pflege und Versorgung der Tiere durch geschultes personengebunden Personal.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, eine mögliche (positive oder negative) evtl. dosisabhängige Beeinflussung der Neurogenese durch das Anästhetikum S(+)-Ketamin nachzuweisen.

Die zwei hier zur Versuchsdurchführung herangezogenen Dosierungen wurden folgendermaßen gewählt:

1) eine möglichst geringe Dosis, die gerade noch eine ausreichende Anästhesie der Tiere gewährleistet. In Voruntersuchungen wurde die ursprünglich geplante Dosierung von

0,25 mg/kg/min S(+)-Ketamin als unzureichend eingestuft, da man damit nicht die notwendige Narkosetiefe erreichen konnten. Es erfolgte eine schrittweise Dosisfindung anhand der Narkosetiefe der Tiere nach dem Grundsatz: so gering wie möglich, aber gleichzeitig so hoch wie nötig. Daraufhin wurde als niedrige S(+)-Ketamin-Dosis 0,75 mg/kg/min festgelegt.

2) Als Vergleich dazu sollte die zweite Dosierung ein tiefes Stadium der Narkose bei den Ratten hervorrufen, welches mit 1,0 mg/kg/min S(+)-Ketamin erreicht wird.

Um eine exakte Aussage über den Grad der Einflussnahme des Anästhetikums auf die Neurogenese treffen zu können, wäre es nötig, die gewonnenen Ergebnisse mit den Ergebnissen von Tieren im Wachzustand (also ohne jeglichen anästhetischen Einfluss) zu vergleichen. Ein derartiger Eingriff an nicht narkotisierten Tieren ist jedoch nicht möglich und unethisch. Deshalb erfolgt der Vergleich an einem in tierexperimentellen Studien eingesetzten Inhalationsanästhetikum, dem Halothan. Dem Halothan werden in der Literatur von mehreren Autoren ebenfalls neuroprotektive Eigenschaften zugesprochen (WARNER et al. 1993; KAPINYA et al. 2002), allerdings ist seine neuroprotektive Wirkung verglichen mit diversen anderen Anästhetika gering (NELLGARD et al. 2000; HAELEWYN et al. 2003).

4.1.2 Einordnung des Gewebeschadens anhand der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung wird in der Histologie und der Histopathologie als Standard-Färbung eingesetzt. Sie ist innerhalb einer Stunde durchzuführen und damit eine der schnellsten und unkompliziertesten Färbemethoden. Die verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien sind vergleichsweise kostengünstig, nicht toxisch und gut lagerbar.

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung sind zwei Farbstoffe nötig. Die eine Komponente dieser Färbung ist das Hämatoxylin, ein durch Ätherextraktion aus dem Campechenbaum gewonnenes primär farbloses Pflanzenextrakt. Erst durch Oxidation während des Färbedurchgangs entsteht aus dem Hämatoxylin der eigentliche Farbstoff, das Hämatein. Die positiv geladenen Molekülanteile des Hämatein gehen Verbindungen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNS ein (Elektroadsorption). Nach Bläuen mit Leitungswasser färbt das gebundene Hämatein die Zellkerne dunkelblau an. Die zweite Komponente ist ein saurer, roter Xanthinfarbstoff, das Eosin. Es ist ein Abkömmling des Fluoreszein und färbt eosinophile Bestandteile der Zellen leuchtend pink (Plasmafärbung).

Die HE-Färbung dient als Übersichtsfärbung dazu, das Ausmaß des Schadens im Hippokampus nach zerebraler Ischämie zu erfassen und die Verteilung der geschädigten Zellen zu untersuchen. Während der Ischämie kommt es infolge der unphysiologischen Stoffwechsellage zur Anreicherung saurer Stoffwechselprodukte in den Zellen und somit zu

einer Verschiebung des pH-Wertes in den azidotischen Bereich. Das Eosin färbt betroffene Zellen rot. Dadurch wird die Unterscheidung von Zellen, die zum Zeitpunkt der Fixierung in ihrem Stoffwechsel beeinträchtigt waren, von intakten Zellen möglich. Es kann anhand der HE-Färbung jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die eosinophil angefärbten Zellen durch Nekrose oder durch Apoptose zugrunde gehen.

Die HE-Färbung liefert wichtige Informationen über das Schadensbild in Form der Menge der eosinophilen Zellen in Relation zu den verbliebenen basophilen Zellen und über die Schwere (lediglich diffuse Auflockerung des Gewebes, Makrophageneinwanderung oder Substanzverlust) des Schadens und erlaubt eine übersichtliche Einteilung der Präparate anhand ihrer Schadensausdehnung. Des Weiteren können Art und Menge der eingewanderten Zellen beurteilt werden. Qualitativ sind die Ergebnisse der HE-Färbung mit den Ergebnissen anderer Färbemethoden, wie z.B. der Kresyl-Violett- oder Silberfärbung, gut vergleichbar (CRAIN et al. 1988). Vor Versuchsbeginn wurden diverse Färbetestreihen durchgeführt und das Färbeprotokoll auf ein optimales Färbeergebnis für das hier verwendete Material (Gehirngewebe, Schnittdicke 40 µm) abgestimmt.

4.1.3 Einsatz von BrdU zur Markierung von proliferativen Zellen in-vivo

Um die Existenz und Aktivität von Stammzellen in-vivo nachzuweisen und zu untersuchen, ist es nicht nur notwendig, proliferierende Zellen zu identifizieren, sondern auch ihre Nachkommenschaft dauerhaft zu markieren und weiterzuverfolgen. Bisherige Bemühungen, einen spezifischen Marker für Stammzellen ausmachen zu können, sind erfolglos geblieben, was die Identifizierung und den direkten Nachweis von Stammzellen nach wie vor schwierig macht. Die Markierung mit BrdU ist daher heute die bevorzugt eingesetzte Methode für Studien zur Proliferation und Neurogenese in-vivo (DEL RIO und SORIANO 1989). Als Thymidin-Analogon wird BrdU bei der De-novo-DNS-Synthese während der S-Phase des Mitosezyklus von Zellen anstelle von Thymidin in die DNS eingebaut. Einmal in die DNS des Zellkerns integriert, kann das BrdU immunhistochemisch in den nun postmitotischen Zellen über deren gesamte Lebensdauer nachgewiesen werden. Durch die fortlaufende Teilungsfähigkeit von Stammzellen kommt es allerdings mit fortschreitender Anzahl von Teilungszyklen zu einer Ausdünnung des BrdU-Gehalts der Zellen, weil sich das eingebaute BrdU auf die Tochterzellen verteilt, d.h. das Signal der BrdU-Detektion wird abgeschwächt (WARD et al. 1991). Dieser Effekt spielt bei dem hier untersuchten Überlebenszeitraum der Tiere (3 Wochen nach der letzten BrdU-Injektion) eine zu vernachlässigende Rolle, da die Teilungsrate neuronaler Stammzellen verhältnismäßig gering ist. Außerdem wird die

Detektion im Rahmen der angewandten BrdU-Färbung durch den Einsatz des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes in ihrer Intensität potenziert (s. Kapitel 3.2.7.2), so dass selbst geringe Mengen an BrdU noch nachweisbar sind. Im Vergleich zur früher angewandten Thymidin-H³-autoradiografischen Nachweismethode ist der Einsatz von BrdU weniger zeit- und arbeitsaufwändig und ohne Einsatz radioaktiver Substanzen aus Gründen der Arbeitssicherheit zu bevorzugen. Die Markierung sich teilender Zellen und deren Nachkommen kann des Weiteren alternativ durch Verwendung von Retroviren erfolgen. Dies hat den Vorteil, dass das Retrovirusgenom in die chromosomale DNS mit eingebaut, bei jeder Zellteilung dupliziert und in vollem Umfang (unabhängig von der Anzahl der Zellteilungen) an die Tochterzellen weitergegeben wird. Außerdem ist es z.B. durch den Einbau und die Expression viraler Reportergene für verschiedene Plasmaproteine, die sich frei im Zytoplasma verteilen, möglich, die Zellformen (incl. axonaler und dendritischer Ausläufer) als Differenzierungsmerkmal der neu gebildeten Zellen zu untersuchen (PRICE et al. 1987). Auf diese Vorteile wurde jedoch verzichtet, da das Retrovirus-Material direkt in die zu untersuchende Gehirnregion appliziert werden muss (um die Blut-Hirn-Schranke zu umgehen), wodurch eine unerwünschte zusätzliche Gehirnläsion erzeugt wird. Ferner sprechen auch der hohe Aufwand und hohe Kosten zur Aufbereitung der Retroviren sowie die Frage der Biosicherheit für die Verwendung von BrdU. Lange gehegte Kritik am Einsatz von BrdU zum Nachweis proliferierender Zellen war die ungeklärte Frage, ob damit nicht auch bereits mature Zellen mit erfasst werden, bei denen nur DNS-Reparaturvorgänge ablaufen. Eine Studie von COOPER-KUHN und KUHN (2002) konnte diesen Einwand jedoch widerlegen.

Nach Ablauf der Mitose sind die Zellen dauerhaft mit BrdU markiert. Die Entwicklung und das weitere Schicksal dieser postmitotischen Zellen kann durch den kombinierten Einsatz mit spezifischen Zellmarkern für neuronale Entwicklungsstufen weiter verfolgt werden. Für die Wahl des neuronenspezifischen Markers, der die Identität der BrdU-positiven Zellen aufdecken soll, ist der Zeitpunkt der Probenentnahme, bezogen auf den BrdU-Injektionszeitpunkt, und das nachzuweisende Entwicklungsstadium der Neuronen entscheidend. Da ein alles umfassender Neuronen-Marker nach wie vor fehlt, muss für den Nachweis auf die zeitlich begrenzte Expression bestimmter neuronaler Proteine zurückgegriffen werden. Der in dieser Studie verwendete Neuronen-Marker NeuN kennzeichnet nur mature Neurone, nicht jedoch immature Entwicklungsstadien und Vorläuferzellen (MULLEN et al. 1992). Eine Co-Expression von BrdU und NeuN tritt bei Untersuchungen auf, die ab Tag 10 nach BrdU-Injektion durchgeführt werden (COOPER-KUHN und KUHN 2002). Für die

vollständige Reifung und Differenzierung benötigen neu gebildete Neuronen ungefähr vier Wochen (CAMERON et al. 1993).

In der vorliegenden Studie wird das BrdU einmal täglich an sieben aufeinander folgenden Tagen durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Einfacher in der Durchführung und mit verminderter Stressbelastung für die Tiere verbunden ist die Applikation des BrdU per os über das Trinkwasser. Dabei variiert jedoch die individuell aufgenommene Menge an BrdU zwischen den Tieren, was quantitative Analysen unmöglich macht. Die intrazerebroventrikuläre Injektion des BrdU scheidet - als invasiver Eingriff - aufgrund der schwierigen Durchführung und zusätzlicher Läsionen im Gehirn aus, zumal die Blut-Hirn-Schranke für BrdU gut durchgängig ist.

Bei Untersuchung der Neurogenese unter pathologischen Bedingungen stellt sich allerdings die Frage, ob eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke infolge der Läsionen die Menge des verfügbaren BrdU (exogener Proliferationsmarker) im geschädigten Bereich verändert und somit ein quantitativer Vergleich zu Kontrollgruppen ohne Schaden überhaupt gerechtfertigt ist. KEE et al. (2002) haben die Steigerung des BrdU-Signals bei geschädigten Tieren durch vergleichenden Nachweis des endogenen Proliferationsmarkers Ki-67 als tatsächliche Steigerung der Zellproliferation bestätigt.

Durch den Einbau von BrdU in die DNS der Zellen kommt es durch die Größe des Bromatoms zu strukturellen Veränderungen mit Stabilitätseinbußen der DNS. Das Risiko für Schwester-Chromatin-Austausch, Mutationen und DNS-Doppelstrang-Brüche ist erhöht und nach BrdU-Anwendung während der Embryonalentwicklung kann es zu teratogenen Veränderungen sowie zu Verhaltensanomalien kommen (KOLB et al. 1999). Daher sollte generell die geringste nötige Konzentration von BrdU verwendet werden. Die häufig in der Literatur beschriebene Dosierung von 50 mg/kg KGW BrdU pro Tag erbrachte in den eigenen Vorversuchen jedoch keine für die Histologie zufriedenstellenden Färbeergebnisse, so dass den Tieren dieser Studie 100 mg/kg KGW BrdU appliziert wurde. Es wurden weder gesundheitliche Beeinträchtigungen noch Verhaltensänderungen oder sonstige Nebenwirkungen bei den Tieren beobachtet.

Die zu applizierende BrdU-Menge wird täglich für jedes Tier individuell dem Körpergewicht angepasst (100 mg/kg KGW), um quantitativ vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Dabei wird besonders auf routinierte Abläufe und ruhigen, stressfreien Umgang mit den Tieren - durch nur wenige, mit den Tieren vertraute Tierärzte und -pfleger - geachtet. Bei der i.p. Injektion der in Rückenlage fixierten Tiere wird der richtige Sitz der Kanüle durch

Aspiration überprüft, um einer versehentlichen Applikation in die Blase oder das Darmkonvolut sicher auszuschließen und eine gute systemische Resorption sicherzustellen.

4.1.4 Detektion BrdU-markierter Zellen und deren Differenzierung mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

BrdU-Färbung

Die Detektion aller BrdU-markierten Zellen - unabhängig vom Zelltyp und ihrem Differenzierungsgrad - erfolgt mit Hilfe eines immunhistochemischen Färbeverfahrens, der BrdU-Färbung (wie sie in Kap. 3.2.7.2 beschrieben ist). Dieses Nachweisverfahren erfasst *alle* sich im Zeitraum der BrdU-Applikation in Teilung (S-Phase) befindlichen Zellen, d.h. neben den gesuchten Neuronen auch alle anderen Zelltypen, wie z.B. Entzündungszellen, Gliazellen oder Astrozyten. Deshalb stellt die Anzahl der BrdU-positiven Zellen einen Gradmesser für die Mitoseaktivität und den Proliferationsgrad des gesamten Gewebes nach Einwirkung der Ischämie dar.

Die Färbung ist einfach durchzuführen, nimmt allerdings pro Färbedurchgang wegen langer Inkubationszeiten fast 2 Tage in Anspruch und liefert ein quantitativ reproduzierbares Ergebnis für den Nachweis proliferierender Zellen. Die Sichtbarmachung des in den Zellkern eingebauten BrdU erfolgt nach folgendem Prinzip: Um das eingebaute BrdU für immunhistochemische Bindungen überhaupt zugänglich zu machen, muss die komplex gefaltete DNS zu Beginn denaturiert werden. Dieser Schritt wird hier durch das kombinierte Einwirken von Säure und Wärme auf die Gehirnschnitte erreicht. Nach Zugabe des primären Antikörpers bindet dieser spezifisch an das BrdU. Durch Einsatz des sekundären Biotin-gebundenen Antikörpers, der eine Komplexbindung mit dem primären Antikörper eingeht, in Kombination mit der nachfolgenden von HSU et al. (1981) etablierten ABC-Methode kommt es zu einer Signalverstärkung. Die Methode beruht darauf, dass Avidin - mit seinen vier Biotin-Bindungsstellen - als Bindeglied zwischen dem sekundären Antikörper und drei Molekülen Biotin-Peroxidase-Komplex fungiert. Die Peroxidase ist somit indirekt am Ort des Antigens (BrdU) gebunden und vermittelt dort die enzymatische Umwandlung des zugegebenen Chromogens zu einem detektierbaren Farbkomplex, der markierte Zellen für lichtmikroskopische Darstellungen sichtbar macht. Durch diesen Verstärkermechanismus ist der Nachweis selbst für geringe BrdU-Konzentrationen sehr

sensitiv, so dass auch Zellen, die weitere Teilungszyklen durchlaufen haben, miterfasst werden.

Damit sich die BrdU-positiven Zellen möglichst kontrastreich vom umgebenden Gewebe abheben, und um eine unspezifische Hintergrundfärbung weitestgehend zu vermeiden, wurden in mehreren Färbestriehen die optimalen Antikörperkonzentrationen (1:500) ermittelt. Nach Bezug vom Hersteller werden die Antikörper umgehend aliquotiert und portionsweise eingefroren, um die Qualität der Antikörper bis zur Verwendung zu erhalten und die Haltbarkeit zu verlängern.

Damit die Qualität der Färbedurchgänge konstant bleibt und die Ergebnisse qualitativ und quantitativ miteinander vergleichen zu können, wurde nach einem exakten Protokoll gearbeitet, welches Inkubationszeiten und -temperaturen genau vorschreibt. Zusätzlich wurde die Auswertung von nur einer einzigen Person durchgeführt, um alle Gehirnschnitte nach einem einheitlichen Muster zu beurteilen.

Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Da anhand der BrdU-Färbung der Phänotyp der markierten Zellen nicht differenziert und somit auch keine Aussage über die Neurogeneserate getroffen werden kann, ist es notwendig, eine weitere Färbung durchzuführen.

Die Auswertung der BrdU-Färbung erfasst quantitativ die Anzahl aller markierten Zellen. Im Gegensatz dazu ist es Ziel der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung, eine qualitative Aussage über den Phänotyp der Zellen zu treffen. Dabei wird nur repräsentativ ein Teil der Zellen (50 doppelt-markierte Zellen pro Gehirnhemisphäre) untersucht, um den prozentualen Anteil der Neuronen an der Gesamtzahl aller BrdU-positiven Zellen zu ermitteln. Diese Vorgehensweise ist in der Literatur vielfach beschrieben und wird routinemäßig in Studien zur Untersuchung der adulten Neurogenese eingesetzt.

Die histologische Untersuchung des Gehirns wird nach einem Überlebenszeitraum von 28 Tagen durchgeführt. Diese Zeitspanne wurde gewählt, um neu gebildeten Neuronen die Reifung zu maturaen Neuronen zu ermöglichen (CAMERON et al. 1993; KEE et al. 2001). Nicht alle von den Vorläuferzellen gebildeten Tochterzellen differenzieren sich vollständig aus; ein Teil der Zellen stirbt bald wieder ab (BIEBL et al. 2000) und ein anderer Teil differenziert sich zu Glia- und Endothelzellen aus (KEE et al. 2001). Der in dieser Studie angewendete Neuronen-Marker NeuN kennzeichnet nur Neurone, die ihre Differenzierung abgeschlossen haben und somit zumindest potenziell funktionsfähig sind. Über die Integrität

der Zellen in das neuronale Netzwerk und über die neuronale Aktivität dieser Neuronen kann in dieser Studie jedoch keine Aussage getroffen werden.

Für die Durchführung der IF-Färbung gilt das Gleiche wie das bereits bei der BrdU-Färbung Gesagte (festgelegtes Protokoll, in Vorversuchen optimierte Antikörper-Konzentrationen, Lagerung der Antikörper, Auswertung von immer derselben Person). Neben BrdU wird bei dieser Färbung NeuN als zweites Antigen untersucht. An Stelle der chemischen Farbreaktion zur Sichtbarmachung des Antigen-Antikörper-Komplexes sind die sekundären Antikörper mit Immunfluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, die durch Bestrahlung mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge zum Leuchten angeregt werden. Während des Färbevorgangs ist eine Lichtexposition der IF-Antikörper zu vermeiden, um einen vorzeitigen Intensitätsverlust der Immunfluoreszenz zu verhindern. Ab Zugabe der sekundären Antikörper sind deshalb alle weiteren Arbeitsschritte im abgedunkelten Raum auszuführen. Für das Eindecken der Gehirnschnitte auf dem Objektträger wird ein spezielles Eindeckmedium für Fluoreszenzfarbstoffe verwendet.

Die Auswertung der IF-gefärbten Gehirnschnitte wird mit dem ApoTome durchgeführt. Das ApoTome erzeugt in der Fokusebene Schnittbilder durch die Präparate mit 1 µm Dicke. Dadurch kann relativ sicher davon ausgegangen werden, dass es sich bei einer dargestellten Zelle um eine einzige Zelle mit doppelter Markierung handelt, und nicht wie von einigen Autoren (KUHNS et al. 1997; RAKIC 2002) kritisch angemerkt, um zwei eng aneinander liegende Zellen mit unterschiedlicher Kennzeichnung, die übereinander projiziert dargestellt werden. Um Artefakte durch Überschneidung der Wellenlängenbereiche zu vermeiden, werden die beiden Immunfluoreszenzfarbstoffe zeitlich nacheinander angeregt und betrachtet. Die optimale Anregungswellenlänge für den entsprechenden Farbstoff wird durch Einbringen des jeweils passenden Filtersatzes in den Strahlengang erzeugt. Das Präparat wird durchgemustert, zu untersuchende Zellen werden fokussiert und mit der Kamera in jedem IF-Kanal ein Bild aufgenommen. Die Einzelbilder werden auf dem Computerbildschirm übereinander gelegt, was die Beurteilung der Zellen erheblich erleichtert.

Ein ganz entscheidendes Kriterium für die Qualität der IF-Auswertung ist der Ausblutungsgrad des Gehirns. Im Gehirn verbleibende Erythrozyten werden ebenfalls von FITC angefärbt und ergeben störende Artefakte. Zwar können sie anhand ihrer charakteristischen Form und evtl. geldrollenartigen Anordnung als Erythrozyten erkannt werden, sie führen aber neben einem Farbstoffverlust zu derart intensiver Emission, dass sie umliegende Zellen überstrahlen und in bisweilen eine sinnvolle Auswertung unmöglich machen. Nach anfänglichen Problemen diesbezüglich konnte der Ausblutungsgrad der

Gehirne verbessert werden, indem bei der Perfusion der Tiere das PFA 4 % körperwarm (statt gekühlt) perfundiert wurde, wodurch eine Vasokonstriktion aufgrund des Kältereizes vermieden wird.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Physiologische Parameter während des operativen Abschnitts

Um experimentelle Studien miteinander vergleichbar zu machen und korrekte Schlussfolgerungen aus den gewonnenen Ergebnissen ziehen zu können, ist es zwingend erforderlich, definierte, standardisierte und reproduzierbare Versuchsbedingungen zu schaffen bzw. einzuhalten. Dies verhindert zusätzliche schädliche Einflüsse, die sich auf das Ausmaß des zerebralen Schadens bzw. auf die Neurogenese auswirken und damit die Ergebnisse verfälschen können. Aus diesem Grund wird vor Versuchsbeginn das Körpergewicht der Tiere bestimmt und während der operativen Phase des Versuchs werden zu vier festgelegten Zeitpunkten die perikranielle Temperatur, der mittlere arterielle Blutdruck, die Herzfrequenz, die Blutglukosekonzentration, die arteriellen Blutgaswerte, der pH-Wert und der Hb-Wert gemessen und dokumentiert. Ferner werden nur männliche Ratten für den Versuch herangezogen, um genusspezifische Unterschiede sowie zyklische Schwankungen des Hormonhaushalts auszuschließen.

Körpergewicht (g)

Die Tiere der sechs Versuchsgruppen sowie der Nativgruppe zeigen keine signifikanten Unterschiede in ihrem Gewicht. Das Durchschnittsgewicht beträgt 359 ± 24 g. Da das Gewicht in der juvenilen Wachstumsphase mit dem Alter der Tiere korreliert, gehen diese mit einem ungefähren Alter von 12 Wochen in den Versuch ein. Aufgrund nur sehr geringer Abweichungen des Körpergewichts unter den Tieren kann von einer homogenen Tiergruppe ausgegangen und eine mögliche Beeinflussung des neurologischen Schaden durch das Körpergewicht ausgeschlossen werden.

Temperatur

Da während einer Ischämie die Körpertemperatur von der kraniellen Temperatur abweichen kann, reicht eine rektale Messung zur Regulierung der Hirn-nahen Temperatur nicht aus (BUSTO et al. 1987). Wie WARNER et al. (1993) in einer Studie aufgezeigt haben, verdoppelt eine Erhöhung der Gehirntemperatur um $1,2$ °C während einer fokalen Ischämie

bei der Ratte das ischämische Infarktvolume, wohingegen eine Erniedrigung der perikraniellen Temperatur neuroprotektiv auf ischämisches Gewebe wirkt (WERNER 1997). Deshalb wird die perikranielle Temperatur direkt über eine Sonde im M. temporalis gemessen und unter Verwendung eines Rückkopplungsmechanismus automatisch auf einem physiologischen Wert von 37,5 °C gehalten. Das Absinken der T peri bei den drei Ischämiegruppen auf maximal $37,1 \pm 0,2$ °C (bei der 0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe und Halothan-Ischämiegruppe signifikant, bei der 1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe als Tendenz erkennbar) ist durch die verminderte Blutzirkulation, gleichbedeutend mit einer verminderten Wärmezufuhr, im Gehirn durch das Abklemmen der Aa. carotides communes zu erklären. Dank des Einsatzes der Infrarot-Wärmelampe über dem Kopf des Tieres wird eine Änderung der Gehirntemperatur auf unphysiologisch niedrige Werte verhindert. Ein geringfügig neuroprotektiver Effekt dieser dennoch nicht zu vermeidenden, relativ geringen Abweichungen (niedrigster Wert $37,2 \pm 0,2$ °C) ist nicht gänzlich auszuschließen. Eine dadurch bedingte geringfügige Änderung der Schadensdifferenz zwischen den Ischämie- und Kontrollgruppen kann jedoch aufgrund der ohnehin großen Differenzspanne vernachlässigt werden. Im Vergleich der verschiedenen Ischämiegruppen untereinander wird der Einfluss der Gehirntemperaturschwankungen ebenfalls nicht weiter berücksichtigt, da die Abweichungen bei allen drei Ischämiegruppen in ähnlicher Form auftreten und somit wieder ähnliche Bedingungen vorherrschen.

Hämodynamische Parameter und Blutglukosekonzentration

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP, mmHg)

Gemäß des Versuchsprotokolls wird der MAP bei den drei Ischämiegruppen während der Phase der Ischämie auf 40 mmHg gesenkt. Eine signifikante Erniedrigung des MAP während der 10-minütigen Ischämie im Vergleich zu den anderen Messzeitpunkten innerhalb der drei Versuchsgruppen ist daher bewusst herbeigeführt und muss nicht diskutiert werden.

In der Halothan-Kontrollgruppe zeigt sich ein signifikantes Absinken des MAP (82 ± 8 mmHg) während der Ischämiephase im Vergleich zum Ausgangs-, Reperfusion- und Erholungswert. Dies ist auf die vasodilatatorische Eigenschaft des Halothans und seine daraus resultierend kreislaufdepressive Wirkung zurückzuführen (FORTH et al. 1996). Während der Äquilibrationsphase und nach Beendigung der 10-minütigen Ischämiephase wird der MAP aller Versuchsgruppen durch die Gabe von Arterenol auf einem einheitlichen Niveau zwischen 100 und 110 mmHg gehalten und somit die blutdrucksenkende Wirkung des Halothans ausgeglichen. Der blutdrucksenkende Effekt des Halothans tritt dementsprechend nur während der Phase der Ischämie auf, in der die Arterenol-Gabe unterbrochen wird. Die beiden Ketamin-Kontrollgruppen

(0,75 mg- und 1,0 mg-) weisen zu diesem Zeitpunkt (Isch) signifikant höhere MAP-Werte auf als die Halothan-Kontrollgruppe, was auf die sympathomimetische Wirkung des Ketamins (ADAMS und WERNER 1997) zurückzuführen ist.

Alle Werte liegen dennoch im physiologischen Bereich, so dass in der vorliegenden Studie davon ausgegangen wird, dass die vorliegenden Unterschiede des MAP zwischen den Gruppen keinen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse haben.

Herzfrequenz (Schläge/min)

Die Herzfrequenz liegt in allen Gruppen während des gesamten Versuches im physiologischen Bereich. Es ist anzunehmen, dass Schwankungen in dieser geringen Größenordnung keinen Einfluss auf den neurologischen Schaden nehmen.

Blutglukosekonzentration (mg/dl)

Glukose spielt, als wichtigster Energielieferant des ZNS, bei Versuchen, die sich mit zerebral hypoxisch-ischämischen Zuständen befassen, eine bedeutende Rolle. Unter normalen Umständen mit ausreichender Sauerstoffversorgung wird Glukose aerob zu Energie (36 Mol ATP aus einem Mol Glukose) verstoffwechselt. Unter anaeroben Bedingungen entstehen aus einem Mol Glukose lediglich 2 Mol ATP und zusätzlich das saure Stoffwechselnebenprodukt Laktat. Durch vermehrte Bildung aufgrund des O₂-Mangels und verlangsamten Abtransportes infolge verringerter Stoffwechselleistung kommt es zu einer Anhäufung von Laktat im Gehirn (SIESJÖ 1992). HOFFMAN et al. (1990) haben gezeigt, dass ein hoher Blutglukosespiegel, gekoppelt mit einem Anstieg des Laktatspiegels, während einer Ischämie negative Auswirkungen auf den Umfang des neuronalen Schadens hat. Im Gegensatz dazu kann durch Fasten der Tiere vor einer transienten zerebralen Ischämie der verzögerte neuronale Zelltod reduziert werden (MARIE et al. 1990). Aus diesem Grund wird in diesem Versuch durch Futterentzug 12 Stunden vor Versuchsbeginn versucht, bei den Ratten einen einheitlich normoglykämischen Glukosespiegel zu erreichen. Die trotz gleicher Behandlung aller Tiere entstehenden Unterschiede in den Blutglukosewerten basieren auf individuellen Stoffwechselunterschieden und bewegen sich im physiologischen Bereich von 60 bis 90 mg/dl. Differenzen dieser Größenordnungen bei den hier erhobenen Glukosewerten dürften das Gesamtergebnis nicht beeinflussen.

Blutgasanalyse

Blutgase (PaO_2 und $PaCO_2$)

Die PaO_2 -Werte der sechs Versuchsgruppen liegen während des gesamten Operationsverlaufs im physiologischen Bereich und üben vermutlich keinen negativen Einfluss auf die Ergebnisse der Studie aus.

Da negative Auswirkungen zu hoher $PaCO_2$ -Werte bzw. positive Auswirkungen zu niedriger $PaCO_2$ -Werte bekannt sind (WERNER 2000), wird in dieser Studie der $PaCO_2$ über die Atemfrequenz der Ratten reguliert und im physiologischen Rahmen gehalten. In der 0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe und in der Halothan-Ischämiegruppe kommt es während der Ischämiephase dennoch zu verminderten $PaCO_2$ -Werten. Dies kann einen Effekt auf den ischämischen Schaden verursachen, da endogene Regulationsmechanismen infolge des erniedrigten $PaCO_2$ die Gehirndurchblutung vermindern und den intrakraniellen Druck senken (LASSEN und CHRISTIENSEN 1973). Allerdings ist die zerebrale Durchblutung während der Ischämieinduktion - durch das temporäre Verschließen der Hauptzuflussgefäße zum Gehirn und die hämorrhagische Hypotension - ohnehin stark reduziert, so dass die Kopplung der Gehirndurchblutungsrate an den CO_2 -Wert im Blut nicht mehr wirksam ist (KAGSTROM et al. 1983a). Es ist daher anzunehmen, dass die verbleibende Gehirndurchblutung bei allen Tieren der Ischämiegruppen unabhängig vom gemessenen Kohlendioxidpartialdruck in ähnlichem Umfang drastisch erniedrigt ist.

pH

Der Blut pH-Wert wird an den vier festgelegten Zeitpunkten während des Versuchs gemessen. Eine Erniedrigung des pH kann negative Auswirkungen auf geschädigtes Gewebe haben, wohingegen sich eine Alkalisierung des Blutes potentiell neuroprotektiv auswirkt (ANDERSON und MEYER 2002). Die gemessenen pH-Werte der Tiere liegen alle innerhalb der physiologischen Grenzen. Es kann davon ausgegangen werden, dass sie keinen Einfluss auf die Ausprägung des Schadens haben.

Hämoglobin (Hb, g/dl)

Die gemessenen Hämoglobinwerte bewegen sich während des Versuchs bis zum Zeitpunkt des Blutentzuges bei allen Tieren im physiologischen Bereich. Das Abfallen der Werte bei den drei Ischämiegruppen in der ischämischen Phase ist versuchsbedingt auf die hämorrhagische Hypotension zurückzuführen. Aufgrund der Volumenmangelsituation wird

Flüssigkeit aus dem Interstitium mobilisiert, was ein Absinken des Hb-Werts herbeiführt. Während der Reinfusion des vorher entzogenen Blutes normalisieren sich die Werte wieder.

4.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung wird eingesetzt, um einen Überblick über die Schwere der zerebralen Ischämie und die Ausdehnung des histologischen Schadens zu erhalten, anhand dessen eine Einteilung in die vier Schadenskategorien nach SANO et al. (1992) erfolgt.

Wie erwartet, zeigt sich histologisch ein deutlicher Unterschied zwischen Tieren der Ischämie- und Tieren der Kontrollgruppen bzw. der Nativgruppe. Bei den Tieren der Nativgruppe wurde keinerlei Eingriff vorgenommen. Die von ihnen gewonnenen Gehirnproben dienen als Vergleichsgrundlage für die Beurteilung der Gewebeschnitte der Versuchsgruppen und zeigen den physiologischen Normalzustand auf. Dementsprechend weisen alle Tiere dieser Gruppe eine vollkommen intakte Hippokampusformation auf. Die Kontrollgruppen haben im Gegensatz dazu den operativen Teil des Versuchs durchlaufen, wurden jedoch keiner BCAO unterzogen, d.h. die Tiere waren den Einflüssen einer Narkose (je nach Gruppenzugehörigkeit) ausgesetzt, allerdings ohne Induktion eines Reizes bzw. Schadens im Gehirn. Bei den Tieren aller drei Kontrollgruppen (0,75 mg-Ketamin-Kontrollgruppe, 1,0 mg-Ketamin-Kontrollgruppe, Halothan-Kontrollgruppe) ist ebenfalls kein histologischer Neuronenschaden, weder in der CA1- und CA3-Region des Hippokampus noch im Gyrus dentatus, nachzuweisen. Unter physiologischen Durchblutungs- und Stoffwechselverhältnissen im neuronalen Gewebe haben die angewendeten Anästhetika keine histologisch nachweisbare spezifische Wirkung auf den Hippokampus.

Innerhalb der Ischämiegruppen weist die Ausprägung des Schadens ein weites Spektrum auf: von lichtmikroskopisch unauffälligen Präparaten (37,5 % der Tiere der Halothan-Ischämiegruppe, 33,3 % der 0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe, 50 % der 1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe), über ödemartige Veränderungen des umgebenden Gewebes und eosinophiler Zellfärbung in Teilen der CA1-Region des Hippokampus, bis hin zu deutlicher Narbenbildung mit Einwanderung zahlreicher Gliazellen/Makrophagen und massiver Eosinophilie in der gesamten CA1-Region, bei einem Tier bis in die CA3-Region reichend. Dies gründet sich in der Tatsache, dass die Dauer der Ischämie von 10 Minuten bei einem MAP von 40 mmHg einen kritischen Schwellenwert für die Versorgung des Gewebes darstellt. Aufgrund anatomischer Unterschiede reagieren einzelne Tiere empfindlicher auf ischämische Einflüsse und zeigen in der Auswertung einen ausgeprägteren Gewebeschaden als andere weniger empfindliche Tiere.

In einer Vorstudie wurde die Dauer des ischämischen Insultes in Abhängigkeit vom MAP ermittelt, die für dieses Modell den kritischen Schwellenwert für den histologischen Schadenseintritt darstellt (ENGELHARD, in Vorb.). Durch die selektive Vulnerabilität der Hippokampusformation sind feine Abstufungen im Ausmaß der pathologischen Abläufe gut darzustellen. Die Empfindlichkeit der Zellen im Hippokampus der Ratte (SMITH et al. 1984a) findet sich auch hier in den Ergebnissen widergespiegelt: die Neuronen der CA1-Region sind besonders vulnerabel und gehen unter ischämischen Bedingungen als erste zugrunde. Die Neuronen der CA3-Region erleiden bei einer Ischämiedauer von 10 min nur sehr vereinzelt einen Schaden und die Zellen des Gyrus dentatus tolerieren diesen Insult sogar ohne jede Schädigung.

Eine mögliche Wirkung der Anästhetika auf das neuronale Gewebe wird im Bereich der kritischen Grenze (Kompensationsfähigkeit der Zellen unter ischämischen Bedingungen versus Schadenseintritt) am deutlichsten. Werden die Ischämiegruppen miteinander verglichen, findet man in der 1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe die geringste Schadensausprägung bzw. den niedrigsten HE-Index, gefolgt von der 0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe. Die Halothan-Ischämiegruppe weist den größten Neuronenschaden auf. Daraus kann eine gewisse neuroprotektive Wirkung von S(+)-Ketamin abgeleitet werden, die mit Steigerung der Dosis (von 0,75 mg/kg/min auf 1,0 mg/kg/min, bei einer Narkosedauer von 78 min (s. Abb 7) entspricht das eine Gesamtdosis von 58,5 mg/kg KGW bzw. 78 mg/kg KGW i.v. S(+)-Ketamin) zunimmt. Allerdings sind die HE-Indices nur tendenziell aber nicht signifikant unterschiedlich, so dass diese Aussage im Umfang dieser Studie nur sehr vorsichtig getroffen werden darf. MARCOUX et al. (1988) untersuchten die neuroprotektiven Eigenschaften von Ketamin mit einem BCAA-Modell an Wüstenrennmäusen und konnten eine dosisabhängige Verbesserung unter Einsatz von Ketamin (100, 150 und 200 mg/kg KGW i.p.) sowohl in Verhaltenstests als auch in histologischen Befunden 17 Tage postischämisch nachweisen. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse einer Studie von JENSEN und AUER (1988), die bei Induktion einer Vorderhirn-Ischämie über 9 min bei Ratten keine neuroprotektive Wirkung von Ketamin-Razemat nachweisen konnten, was evtl. auf den Einsatz zu geringer Ketamindosen zurückgeführt werden kann (6 mg/kg KGW i.v., 60 mg/kg KGW i.m. 3 Tage prä- und 7 Tage postischämisch bzw. 24 mg/kg KGW i.v + 120 mg/kg KGW i.m. über 7 Tage). Untersuchungen zur Schädigung des Hippokampus infolge zerebraler Ischämie bei Ratten in Abhängigkeit verschiedenen Ketamin-Dosierungen, dem Applikationszeitpunkt (prä-/postischämisch) und der Behandlungsdauer (bis zu 8 h postoperativ) wurden von CHURCH et

al. (1988) durchgeführt. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass 20 mg/kg Ketamin i.v. direkt vor oder unmittelbar nach einer 10-minütigen Ischämiephase keinerlei protektive Wirkung auf die selektiv vulnerablen Neuronen der CA1-Region entfalten, jedoch zunehmende Gesamtdosen von Ketamin über einen längeren postischämischen Behandlungszeitraum (wiederholte Applikationen mit einer Gesamtdosis von 70 mg/kg KGW i.v + 140 mg/kg KGW i.p über 8 h) den Neuronenschaden signifikant verringern können. Nach ihren Erkenntnissen treten jedoch bei der Anwendung dazu erforderlicher Konzentrationen bei den Ratten Verhaltenstörungen auf, was den Einsatz von Ketamin als Neuroprotektivum limitiert. Die selbe Forschergruppe zeigte in einer weiteren Studie, dass die gleiche Ketamin-Dosis und -Applikationsart, die sich in ihrem Rattenmodell mit einer Ischämiedauer von 10 Minuten als neuroprotektiv erwiesen hat, unter gleichen Versuchsbedingungen mit einem schwächeren Insult (Ischämiedauer 6 min) das histologische Ergebnis im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe sogar verschlechtert (CHURCH und ZEMAN 1991). In der Literatur finden sich viele weitere, je nach Versuchsanordnung und Fragestellung sehr unterschiedliche, Berichte, die ein sehr heterogenes Bild über das neuroprotektive Potential von Ketamin abgeben. Bei Studien, die unter Halothan-Narkosen durchgeführt wurden, sollte bei der Bewertung negativer Befunde jedoch die Erkenntnis von LEES (1989) berücksichtigt werden, der beobachtete, dass eine Hintergrundanästhesie mit Halothan den protektiven Effekt von Ketamin nach direkter Injektion von Ibotensäure (NMDA-Agonisten) in den Hippokampus verhindert.

Bisherige Studien beziehen sich in der Regel auf die Anwendung von Ketamin-Razemat. Da es sich bei S(+)-Ketamin um eine relativ „junge Substanz“ handelt, sind bisher nur wenige Untersuchungen über die Wirkung des isolierten Isomers im Speziellen durchgeführt worden. Erste Untersuchungen über den Einfluss von S(+)-Ketamin auf das neurologische Defizit nach inkompletter zerebraler Hemisphärenischämie haben REEKER et al. 2000 in einem Rattenmodell durchgeführt. Sie konnten zeigen, dass sowohl die neurologischen Ausfälle bis zu drei Tage nach einer 30-minütigen inkompletten Hemisphärenischämie als auch der histopathologische Schaden bei Tieren mit hochdosierter S(+)-Ketamin-Anästhesie (1,0 mg/kg/min) gegenüber Fentanyl/N₂O-anesthetisierten Tieren und niedrig dosiertem S(+)-Ketamin (0,25 mg/kg/min) signifikant reduziert waren. Obwohl PROESCHOLDT et al. (2001) in ihrer Studie (aufgrund des massiven ischämischen Insults von 15 min) keine neuroprotektive Wirkung im Hippokampus beobachten konnten, konnten sie die Neuronenschaden mindernde Wirkung von S(+)-Ketamin in hohen Dosen

(60 und 90 mg/kg KGW) im Kortex bestätigen, wohingegen eine niedrige Konzentration (30 mg/kg KGW) und eine hohe Dosierung von R(-)Ketamin diese Wirkung verfehlten.

4.2.3 BrdU-Färbung

Seit Entdeckung der fortlaufenden Neurogenese im Gehirn auch bei adulten Säugetieren sind viele Studien unternommen worden, um zu erforschen, ob und wenn ja, welche endogenen und exogenen Einwirkungen diese Neurogenese beeinflussen. Die Neurogenese wird sowohl durch physiologische (KEMPERMANN et al. 1997; GOULD et al. 1999; VAN PRAAG et al. 1999) also auch pathologische Stimuli (PARENT et al. 1997) moduliert. Eine Steigerung der Zellproliferation im Gyrus dentatus von Nagetieren nach globaler Vorderhirn-Ischämie wurde bereits in verschiedenen Tiermodellen nachgewiesen. LIU et al. (1998) haben die Proliferationsrate im Gyrus dentatus im zeitlichen Verlauf von 5 Wochen nach Induktion einer transienten globalen zerebralen Ischämie (BCAO über 10 min) bei Wüstenrennmäusen untersucht und konnten einen markanten Anstieg der Zellproliferationsrate ab Tag 6 aufzeigen, der sein Maximum zwischen Tag 9 und Tag 11 (12-facher Anstieg der BrdU-positiven Zellen gegenüber unbehandelten Kontrolltieren) erreicht, danach steil abfällt und nach 3 bis 5 Wochen postischämisch wieder seine Ausgangswerte erreicht. Die selbe Arbeitsgruppe überprüfte im gleichen Modell die Auswirkung der Ischämiedauer auf die Proliferationsrate am Tag 8. Bis zu einer Ischämiedauer von 4 min steigt die Anzahl der BrdU-positiven Zellen stark an (auf das 6-fache des Ausgangswerts), wohingegen bei einer Verlängerung der Ischämie auf 10 min nur mehr eine geringe Zunahme der Zellproliferationen folgt (auf das 7,5-fache des Ausgangswerts).

Eine Steigerung der Zellproliferation mit ähnlichem zeitlichen Verlauf nach globaler Ischämie wurde auch von TAKAGI et al. (1999) an Mäusen und YAGITA et al. (2001) an Ratten nachgewiesen. Jedoch werden bei den in der Literatur beschriebenen Studien zur Proliferation im Gyrus dentatus keine einheitlichen Narkosemethoden eingesetzt, was die Ergebnisse schlecht vergleichbar macht. Aufgrund der Eigenschaft einiger Anästhetika protektiver auf Nervengewebe zu wirken als andere, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verwendeten Narkosemittel möglicherweise auch einen direkten oder indirekten Einfluss auf endogene Stammzellen ausüben und damit Einfluss auf die Zellproliferation nach zerebraler Ischämie nehmen.

Die Ergebnisse der drei Ischämiegruppen der vorliegenden Studie heben sich von den Kontrollgruppen und der Nativgruppe durch eine deutlich erhöhte Anzahl BrdU-positiver

Zellen ab und bestätigen damit eine Ischämie-induzierte Stimulation der Zellproliferation. Die BrdU-positiven Zellen entsprechen in der hier verwendeten Versuchsanordnung den Zellen, die innerhalb des Zeitraums der BrdU-Applikation neu gebildet worden sind und deren Tochterzellen, die bis Tag 28 (Probenentnahme) überlebt haben. Dies ist nicht mit der Zahl der innerhalb der ersten Wochen neu gebildeter Zellen gleichzusetzen, denn das intraperitoneal verabreichte BrdU steht nur ungefähr 2 Stunden nach Applikation zur Aufnahme in DNS-synthetisierende Zellen zur Verfügung (PACKARD et al. 1973). Bei Hunden wurde nach intravenöser Applikation eine BrdU-Clearance von durchschnittlich 60 ml/min/kg gemessen (PHUPHANICH und LEVIN 1985). Genauere Angaben über die zeitliche Verfügbarkeit von BrdU und dessen Eliminierung aus dem Organismus bei Ratten liegen nicht vor. Um das komplette Spektrum der Neuronenneubildung in der postischämischen Phase zu erfassen, wäre eine mehrmals tägliche BrdU-Applikation notwendig. Auf die damit verbundene Stressbelastung für die Tiere wird in dieser Studie verzichtet, und es werden somit nur neu gebildete Zellen/Neuronen markiert, die im Zeitfenster unmittelbar nach der täglichen BrdU-Injektion die Synthese-Phase des Mitosezyklus durchlaufen. Da bei allen Tieren das gleiche Schema der In-vivo-Markierung angewandt wird, sind die Ergebnisse dennoch vergleichbar und aussagekräftig. Bereits markierte Zellen teilen sich während des Untersuchungszeitraums von 4 Wochen erneut und geben das BrdU an ihre Nachkommenschaft weiter. Auch schließt sich der Bildung neuer Zellen eine kritische Phase von 1 bis 2 Wochen an, in der sich das weitere Schicksal der Zellen entscheidet (CAMERON et al. 1993; GOULD et al. 1999). Viele neue Zellen sterben bald wieder ab, nur ein Teil der gebildeten Zellen überlebt und differenziert sich vollständig aus. Die Überlebensrate scheint von physiologischen Reizen, wie z.B. Hippokampus-abhängigem Lernen, mitbestimmt zu werden (CAMERON et al. 1993). An einem ähnlichen Rattenmodell mit transients globaler Ischämie konnte gezeigt werden, dass nur ungefähr die Hälfte der BrdU-positiven Zellen, die eine Woche nach BrdU-Applikation gefunden werden, bis vier Wochen nach BrdU-Applikation überleben (KEE et al. 2001).

Um der Frage nachzugehen, in wie weit die angewendeten Narkoseformen bei der Untersuchung der Neurogenese eine Rolle spielen, werden die Versuchsgruppen vergleichend betrachtet. Alle drei Ischämiegruppen haben signifikant mehr BrdU-positive Zellen gegenüber ihren Kontrollgruppen, es sind jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der drei Ischämiegruppen bzw. der drei Kontrollgruppen untereinander festzustellen. D.h. keine der Anästhesieformen hebt sich durch stärkere oder schwächere Auswirkungen auf das

ischämische Geschehen von den anderen ab. In der 1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe wird im Vergleich zu den beiden anderen Ischämiegruppen eine geringere Anzahl BrdU-positiver Zellen aufgefunden, so dass hier eine Tendenz (nicht signifikant) ersichtlich ist, die besagen würde, dass S(+)-Ketamin in höherer Konzentration potentiell eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferationssteigerung nach zerebraler Ischämie ausübt.

In der Literatur finden sich diverse Studien, die dem neuroprotektiven Potential von Ketamin gewidmet sind (s.o.). Es liegen bisher jedoch keine Untersuchungen vor, die die fortlaufende Neurogenese unter Einwirkung von Ketamin bzw. S(+)-Ketamin untersucht haben.

Es ist bekannt, dass die Neurogenese im adulten Gyrus dentatus, zumindest teilweise, durch NMDA-Rezeptoren reguliert wird (CAMERON et al. 1995). Die Bildungsrate neuer Zellen im Gyrus dentatus steigt durch die Blockierung von NMDA-Rezeptoren an (GOULD et al. 1997).

BERNABEU und SHARP (2000) fanden nach der systemischen Applikation der NMDA-Rezeptor-Antagonisten Mk-801 und NBQX einen Anstieg proliferierender Zellen im Gyrus dentatus von Wüstenrennmäusen. Die Gabe dieser Substanzen (3x i.p.: 0, 6 und 24 bzw. 36 h post operationem) bei gleichzeitiger Induktion einer globalen Ischämie hat jedoch einen gegenteiligen Effekt. 15 Tage nach Ischämie tritt dabei kein Zellschaden in der CA1-Region des Hippokampus auf, allerdings wird auch die Neubildung von Zellen als Reaktion auf den ischämischen Insult verhindert. Den selben Effekt konnten ARVIDSSON et al. (2001) nach fokaler Ischämie bei Ratten bestätigen. Mk-801 unterdrückte hier eine Proliferationssteigerung im GD zwei Stunden nach MCAO.

Es wird vermutet, dass Veränderungen der NMDA-Rezeptor-Dichte im GD für die Ischämie-induzierte Neurogenese von Bedeutung sind (LIU et al. 1998). Infolge einer zerebralen Ischämie tritt innerhalb einer Woche eine 20%ige Reduktion der NMDA-Rezeptoren auf, die nach einer weiteren Woche wieder ausgeglichen wird (WESTERBERG et al. 1989). Die Veränderungen der NMDA-Rezeptor-Dichte im GD weisen einen ähnlichen zeitlichen Ablauf auf, wie die von LIU et al. (1998) gezeigte Veränderung der Neurogeneserate nach zerebraler Ischämie. Dies führt zu der Annahme, dass durch eine Ischämie-bedingte Abnahme der NMDA-Rezeptor-vermittelten Signale die Neurogenese begünstigt wird und steht im Widerspruch zu der verminderten Zellproliferation nach Gabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten nach Ischämie. Unter ischämischen Bedingungen spielen anscheinend andere Pathomechanismen eine überwiegende Rolle, für deren Verständnis weitere Forschungsarbeiten notwendig sind.

Die Verwendung von S(+)-Ketamin - ebenfalls ein NMDA-Rezeptor-Antagonist - führt in der vorliegenden Studie bei Tieren der Kontrollgruppen (ohne Ischämie) zu keiner gesteigerten Zellproliferation, vergleichbar mit der für Mk-801 in oben genannten Studien. Ebenso wenig konnte eine Hemmung der postischämischen Steigerung der Neurogenese beobachtet werden. Allerdings scheint die Neurogeneserate bei der hohen Dosierung von S(+)-Ketamin in der 1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe tendenziell geringer zu sein, d.h., dass S(+)-Ketamin als NMDA-Antagonist wesentlich schwächer wirksam und weniger potent ist, als das wirkungsverwandete Mk-801 (CHURCH et al. 1988).

Da eine pathophysiologische Stimulierung der NMDA-Rezeptoren nicht nur Zelltod in Form von Nekrose sondern auch Apoptose hervorruft (HONKANIEMI et al. 1996), sind ENGELHARD et al. (2003) der Frage nachgegangen, in wie weit das neuroprotektive Potential von S(+)-Ketamin neben NMDA-Rezeptor-vermittelten Mechanismen auch auf die Apoptose-Beeinflussung zurückgeführt werden kann. Sie konnten aufzeigen, dass S(+)-Ketamin in einer Dosierung von 1,0 mg/kg/min die Überexpression des pro-apoptotischen Proteins Bax nach einer zerebralen Hemisphärenischämie im Rattenmodell verhindert und dadurch Apoptose-hemmend wirkt.

Im Rahmen des für die vorliegende Studie gewählten Versuchsaufbaus kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob der tendenziell geringeren Anzahl BrdU-positiver Zellen bei der 1,0 mg-Ketamin-Ischämiegruppe eine geringere Zellproliferation oder ein vermehrter Zelluntergang während des Untersuchungszeitraums von 4 Wochen zugrunde liegt. Hierzu müssten Verlaufsuntersuchungen zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten und histologische Untersuchung zum Nachweis apoptotischer Vorgänge durchgeführt werden.

4.2.4 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung ermöglicht die qualitative Analyse des Phänotyps der neu gebildeten Zellen und erlaubt damit, von der gesamten Zellproliferation den Anteil neu gebildeter Neuronen zu bestimmen. Mit Hilfe des Neuronen-Marker NeuN werden nur vollständig ausdifferenzierte Neuronen detektiert. Der Überlebenszeitraum der Tiere von 28 Tagen bis zur Probenentnahme entspricht in etwa dem Zeitraum, den die Neuronen zur Ausdifferenzierung und Reifung benötigen (CAMERON et al. 1993; KEE et al. 2001).

In allen Versuchsgruppen sowie in der Nativgruppe konnte, wie erwartet, das Vorkommen adulter Neurogenese bestätigt werden. Bei der Untersuchung doppelt-immunfluoreszenz-markierter Zellen ergaben sich ein Prozentsatz für neu gebildete Neuronen von

durchschnittlich 92 ± 5 % ohne signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Das heißt, durch die Ischämie wird eine Steigerung der Zellproliferation im GD induziert, jedoch hat weder die Ischämie noch eine der Anästhesieformen Einfluss auf die Differenzierung der Zellen. Der Anteil neuer Neuronen an der Gesamtzahl proliferierender Zellen bleibt unverändert. Dies stimmt mit den Ergebnissen einer Studie von Kee et al. (2001) überein, in der sich, in einem Rattenmodell mit 2-VO über 12 min, die absolute Anzahl doppelt markierter Zellen, nicht jedoch deren relativer Anteil zwischen Ischämie- und Kontrollgruppe unterscheiden.

In anderen Studien über die Proliferation im Gyrus dentatus wurde die Neurogeneserate mit 80 % bei Weißbüschelaffen (GOULD et al. 1998), ~80 % bei Spitzhörnchen (GOULD und TANAPAT 1997), zwischen 70 % und 80 % (CAMERON et al. 1993; TAKASAWA et al. 2002) bei Ratten, 57 bis 61% bei Mäusen (KEMPERMANN et al. 1997) und 61 % bei Wüstenrennmäusen (LIU et al. 1998) angegeben. Diese voneinander abweichenden Angaben sind speziesspezifisch und abhängig vom jeweiligen Untersuchungsdesign hinsichtlich des Zeitraumes zwischen der Zellmarkierung und der Gewebeentnahme. Der vergleichsweise hohe Prozentsatz an Neuronen in der eigenen Studie ist durch die relativ lange Überlebenszeit der Ratten von 28 Tagen zu erklären. Nach Ablauf dieser Zeitspanne ist das akute nekrotische Geschehen mit einwandernden (teilweise ebenfalls markierten) Entzündungszellen und Makrophagen sowie die Beseitigung der Zelltrümmer weitgehend abgeschlossen.

Das Ergebnis dieser Studie stimmt mit den vorher genannten Studien darin überein, dass der Anteil neu gebildeter Neuronen in den Versuchs- und Kontrollgruppen, also unabhängig vom Eintreten einer zerebralen Ischämie, gleich hoch ist.

Der verbleibende Teil nicht doppelt-markierter Zellen entspricht entweder undifferenzierten Vorläuferzellen oder differenzierten Zellen eines anderen, in dieser Untersuchung nicht erfassten Phänotyps (z.B. Gliazellen, Entzündungszellen).

Die transiente globale zerebrale Ischämie führt zu einer Proliferationssteigerung im GD und damit zu einem Anstieg der absoluten Neuronenzahl. Mit den hier durchgeführten Untersuchungen kann allerdings keine Aussage über die Funktionalität dieser neuen Neuronen getroffen werden. Ob sie tatsächlich zur Regeneration des Hippokampus beitragen und neuronale Leistungen zugrunde gegangener Neuronen übernehmen bzw. diese ersetzen können, bleibt ungeklärt. Die funktionelle Integration in die Strukturen des Hippokampus von unter physiologischen Bedingungen neu gebildeten Neuronen bei Mäusen konnte bereits von VAN PRAAG et al. (2002) nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass folglich alle neu gebildeten Neuronen Funktionsfähigkeit erlangen. Der Beweis, dass dies uneingeschränkt

auf die vermehrt gebildeten Neuronen infolge pathologischer Ereignisse übertragen werden kann, ist jedoch noch zu erbringen.

4.2.5 Volumenbestimmung des Gyrus dentatus

Angaben über die Gesamtzahl der BrdU-positiven Zellen bzw. neu gebildeter Neuronen ohne Angabe einer Bezugsgröße hat keinen Aussagewert. Als Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Tiere oder Tiergruppen untereinander muss eine einheitliche Bezugsgröße geschaffen bzw. genannt werden. In der vorliegenden Studie erfolgt die Angabe der Zahl BrdU-positiver Zellen bzw. neu gebildeter Neuronen anhand der Auswertung eines Eppendorfgefäßes, welches jeden zehnten Sagittalschnitt eines Rattengehirns enthält. Um absolute Zahlenwerte pro Gehirnhemisphäre bzw. GD zu erhalten, müssen diese Zahlen deshalb mit 10 multipliziert werden.

Diese Angaben setzen jedoch eine einheitliche Größe der Gyri dentati aller Tiere voraus. Aus diesem Grund wird über eine Flächenmessung anhand der HE-gefärbten Gehirnschnitte das Volumen des GD errechnet und die Volumina statistisch ausgewertet. Es haben sich hierbei keine signifikanten Unterschiede für die Größe der GD ergeben, so dass eine Steigerung oder Verminderung der Zellzahlen nicht auf Unterschiede der Gehirngröße zurückzuführen sind, sondern als gesteigerte oder verminderte Proliferationsrate interpretiert werden kann.

4.2.6 Korrelation des histologischen Schadens mit der Anzahl neu gebildeter Neuronen

Die Korrelation zwischen dem Auftreten eines histologisch nachweisbaren Neuronenschadens in der CA1-Region und der Anzahl neu gebildeter Neuronen im GD ist in der vorliegenden Studie hochsignifikant. Das heißt, dass bei Tieren, deren Hippokampus keinen oder nur einen geringfügigen Schaden erlitten hat, nach einem Untersuchungszeitraum von 28 Tagen weniger neue Neuronen gefunden werden als bei Tieren, die einen schweren histologischen Gewebeschaden aufweisen. Im Umkehrschluss lässt sich sagen: mit zunehmender Intensität des Neuronenschadens in der CA1-Region steigt die Zellproliferationsrate im GD an.

Zelluntergang in der Hippokampusregion stellt einen möglichen Stimulus für die Steigerung der Neurogenese nach zerebraler Ischämie dar.

Eine Studie von GOULD und TANAPAT (1997), in der durch mechanische Einwirkung sowie durch Exzitotoxine Läsionen in der Granulärzellschicht hervorgerufenen wurden, hat

eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß des Zellschadens in der Granulärzellschicht des GD und der Anzahl proliferierender Zellen im GD nachgewiesen. Krampfanfälle des limbischen Systems, die zu apoptotischem Zelltod von Körnerzellen führen, rufen im Gyrus dentatus ebenfalls gesteigerte Neurogenese hervor (PARENT et al. 1997). In der vorliegenden Studie wurde die Schwere des ischämischen Insults jedoch so gewählt, dass nur die Ischämieempfindlicheren CA-Regionen, nicht aber die resistenteren Körnerzellen des GD geschädigt werden. Keines der histologischen Präparate zeigt Veränderungen im Bereich des GD auf.

Um den Zusammenhang zwischen Zellschädigung in der CA1-Region und Stimulation der Neurogenese im GD zu untersuchen, haben LIU et al. (1998) ein Modell mit Ischämietoleranz bei Wüstenrennmäusen entworfen. Während eine einmalige globale Ischämie von 5 min bei dieser Tierspezies zu einem deutlichen Schaden in der CA1-Region des Hippokampus führt, tritt ein Schaden bei nur 50 % der Tiere auf, wenn diese drei Tage vor dem selben Eingriff durch eine 2-minütige Ischämie präkonditioniert werden. Eine Ischämie von 2 min Dauer alleine verursacht weder einen Zellschaden noch eine signifikante Steigerung der Zellproliferation. Präkonditionierte Tiere ohne nachweisbaren Zelluntergang in der CA1-Region reagieren auf den ischämischen Insult (5 min) mit einem ähnlich hohen Anstieg der Neurogeneserate am Tag 8 wie Tiere mit histologisch nachgewiesenem Gewebeschaden. Diese Beobachtung führt zu der Schlussfolgerung, dass ein Anstieg der Neurogenese im GD nicht zwangsläufig an das Auftreten einer Zellschädigung in der CA1-Region gebunden ist. Durch Ischämie kommt es aber auch zum Absterben von Interneuronen im Hilusbereich des GD (JOHANSEN et al. 1987), was möglicherweise Auswirkungen auf die neuronale Aktivität des GD oder die NMDA-Rezeptor-Regulation hat und somit stimulierend auf die Neurogenese wirken könnte. Der Verlust von Interneuronen tritt allerdings auch bereits nach einer Ischämiedauer von 2 min (SUGIMOTO et al. 1993) auf, die aber wiederum nicht lang genug ist, um die Neurogenese zu stimulieren.

Es kann also zusammenfassend gesagt werden:

Der Ischämie-induzierte Neuronenschaden in der CA1-Region des Hippokampus ruft eine gesteigerte Neurogenese in der subgranulären Zone des GD bei der Ratte hervor. Es gibt aber noch eine Reihe anderer Einflussfaktoren, die bei der Regulation der adulten Neurogenese eine Rolle spielen und diese unabhängig vom Auftreten neuronalen Zelluntergangs beeinflussen. Die exakten Regulationsmechanismen adulter Neurogenese nach zerebraler

Ischämie sind noch nicht vollständig aufgeklärt und werden Gegenstand weiterer Studien sein.

4.3 Abschlussbetrachtung

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen zusammenfassend, dass bei Ratten, die im Versuch einer künstlich erzeugten temporären globalen Vorderhirn-Ischämie mit Reperfusion ausgesetzt waren und deren Kontrollparameter überwacht und konstant gehalten wurden, eine Behandlung mit S(+)-Ketamin während der Ischämie die Tendenz aufweist, den neuronalen Schaden im Zellband des Hippokampus nach einem Zeitraum von 28 Tagen gegenüber einer Behandlung mit Halothan zu reduzieren. Dieser Effekt wird mit steigender Konzentration von S(+)-Ketamin verstärkt, erreicht allerdings kein signifikant unterschiedliches Niveau. Hinsichtlich der Neurogenese erbrachte eine Behandlung mit 0,75 mg/kg/min S(+)-Ketamin ein ähnliches Ergebnis wie unter Behandlung mit 0,8 Vol% Halothan. Bei einer höheren Dosierung von 1,0 mg/kg/min S(+)-Ketamin wird jedoch eine tendenziell schwächere Stimulation der Zellproliferation bzw. Neurogenese nach zerebraler Ischämie beobachtet, wobei kaum (statistisch nicht signifikant) mehr neue Neuronen gebildet werden als in der zugehörigen Kontrollgruppe.

Mit der HE-Färbung, der immunhistochemischen BrdU-Färbung und einer Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit dem Proliferationsmarker BrdU und dem neuronalen Marker NeuN wurden die notwendigen histologischen Untersuchungen der Gehirne durchgeführt und die Ergebnisse sorgfältig dokumentiert.

Die Ergebnisse der HE-Färbung zeigen, dass S(+)-Ketamin in einer Dosierung von 0,75 mg/kg/min und 1,0 mg/kg/min zwar in der Lage ist, die Ausprägung des Zellschadens im Hippokampus über einen Zeitraum von 28 Tagen abzuschwächen, ein signifikant durchschlagend neuroprotektiver Erfolg jedoch ausbleibt.

Die Auswertung der BrdU-Färbung bestätigt das Auftreten einer Ischämie-induzierten Stimulation der Zellproliferation im Gyrus dentatus bei der Ratte bei allen drei ischämischen Behandlungsgruppen. Es wird allerdings eine tendenziell geringere Proliferationsrate unter Einsatz einer erhöhten S(+)-Ketamin-Konzentration beobachtet. Keinerlei Einfluss auf die Zellproliferation im Gyrus dentatus haben die unterschiedlichen Anästhetika unter hämodynamisch physiologischen Bedingungen im Vergleich mit der Nativgruppe aufgezeigt.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurde eine von der Narkoseform unabhängige Neurogeneserate von 92 ± 5 % ermittelt. Die verwendeten Anästhetika üben also keinen Einfluss auf die Differenzierung der proliferierenden Zellen aus.

Trotz intensiver Bemühungen sind die neuroprotektiven Mechanismen des Narkotikums Ketamin bei einer zerebralen Ischämie noch nicht endgültig aufgeklärt und die protektiven Eigenschaften werden nach wie vor kontrovers diskutiert. Für therapeutische Erfolgsaussichten ist die Summe verschiedener, auf mehreren Ebenen des zerebralen Sekundärschadens Einfluss nehmende, pharmakologischer und physikalischer Maßnahmen entscheidend. Für die Abklärung, welcher Stellenwert S(+)-Ketamin im Zusammenspiel solcher pharmakologischer Strategien zukommt und um einen möglichen Einsatz von S(+)-Ketamin zur therapeutischen Behandlung zerebraler Ischämien zu erwägen, sind weiterführende experimentelle und klinische Studien nötig.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Adulte Neurogenese im Gyrus dentatus der Ratte 28 Tage nach inkompletter globaler zerebraler Ischämie und Reperfusion und deren Beeinflussung durch S(+)-Ketamin

Die vorliegende Studie befasst sich mit dem konzentrationsabhängigen Einfluss des Anästhetikums S(+)-Ketamin auf den Neuronenschaden im Hippokampus und die Neurogenese nach inkompletter globaler zerebraler Ischämie mit Reperfusion in der Ratte nach einem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen.

Die Tiere wurden randomisiert einer der folgenden Narkoseformen - Halothan (0,8 Vol%), S(+)-Ketamin mit 0,75 mg/kg/min und S(+)-Ketamin mit 1,0 mg/kg/min - zugewiesen und innerhalb jeder Narkoseform jeweils in eine Ischämie- und eine Kontrollgruppen (mit je n=8) eingeteilt. Bei den Tieren der drei Ischämiegruppen wurde durch bilaterale Okklusion der Aa. carotides communes und gleichzeitige hämorrhagische Hypotension (MAP bei 40 mmHg) eine 10-minütige inkomplette globale zerebrale Ischämie induziert. Die Tiere der drei Kontrollgruppen durchliefen ebenfalls die Präparation in gruppenspezifischer Narkose, jedoch ohne Induktion der zerebralen Ischämie. Als physiologische Referenz für die histologische Auswertung gingen zusätzlich 8 Tiere einer Nativgruppe in die Studie ein. Die Markierung von Stammzellen in vivo erfolgte bei allen Tieren durch intraperitoneale Injektion von 5-Bromo-2-Deoxyuridin (BrdU, 100 mg/kg KGW). Nach 28 Tagen wurden die Tiere getötet und die Gehirne zur weiteren Analyse aufbereitet.

In der HE-Färbung wurde das Ausmaß des ischämischen Schadens im Hippokampus bestimmt. Über die immunhistochemische Darstellung des BrdU, welches sich in den Zellkern mitotischer Zellen eingebaut hat, wurde die Anzahl proliferierender Zellen im Gyrus dentatus erfasst. Um eine Differenzierung der BrdU-positiven Zellen in Neuronen und andere Zellen zu ermöglichen, wurde mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit BrdU und NeuN die Neurogeneserate bestimmt.

Die Ergebnisse der HE-Färbung zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung des ischämischen Schadens in Abhängigkeit von der Narkoseform, allerdings war die Tendenz zu erkennen, dass S(+)-Ketamin in der Dosierung von 1,0 mg/kg/min das neuronale Schadensausmaß gegenüber Halothan reduziert. Die Ergebnisse der BrdU-Färbung bestätigen eine Steigerung der Zellproliferation infolge eines ischämischen Reizes gegenüber den Kontroll- und der Nativgruppe/n. Auch hier finden sich keine signifikanten Abweichungen in der Anzahl BrdU-positiver Zellen unter Anwendung der verschiedenen Narkoseformen. Tendenziell scheint die Anwendung von S(+)-Ketamin in höherer Dosierung die Zellteilungsaktivität zu reduzieren. Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zeigte, dass weder die Form der Anästhesie noch die Induktion einer Ischämie die Differenzierungsrichtung der neu gebildeten Zellen beeinflusst.

Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass S(+)-Ketamin in hoher Dosierung bis zu 28 Tage nach einem ischämischen Insult neuroprotektiv wirkt, gleichzeitig aber auch die schadensinduzierte Neurogenese vermindert. Es werden allerdings weitere Untersuchungen notwendig sein, um die Wirkmechanismen des Anästhetikums S(+)-Ketamin genauer zu ergründen und gezielt erfolgreiche Therapiekonzepte für ischämische Ereignisse und deren Folgeerscheinungen entwickeln zu können.

6 SUMMARY

The effect of S(+)*ketamine* on neuroregenerative potency in the dentate gyrus of the adult rat after incomplete global cerebral ischemia and reperfusion

The present study investigates the concentration dependent effect of the anaesthetic agent S(+)*ketamine* on the neuronal damage in the hippocampus and on the adult neurogenesis in the rat after incomplete global cerebral ischemia and reperfusion after a time period of 28 days.

Animals were randomly assigned to one of the following anaesthetic groups: halothane (0.8 Vol%), S(+)*ketamine* 0.75 mg/kg/min and S(+)*ketamine* 1.0 mg/kg/min. Each anaesthetic group was subdivided into an ischemic group and a control group (each group n=8). Ischemia of the forebrain was induced by bilateral occlusion of the common carotid arteries for 10 minutes in combination with hemorrhagic hypotension (mean arterial pressure: 40 mmHg) in animals of the three ischemic but not in the three control groups. A native group (n = 8) without any treatment serves as physiological control for the histological examinations in addition to the operated test groups. To mark the stem cells *in vivo* 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU, 100 mg/kg) was injected intraperitoneally to all animals. After 28 days at the end of the observation period the animals were euthanized and the brains were prepared for further analysis.

We used a Hematoxylin-Eosin (HE) staining to evaluate the extent of tissue damage in the CA1- and CA3-region of the hippocampus. The immunohistochemical detection of BrdU, which was incorporated into the nucleus of mitotic cells, was performed to examine the number of proliferating cells in the dentate gyrus. To differentiate whether newly formed cells were neurons or other cells, an additional double immunofluorescence staining with BrdU and the neuronal marker NeuN was performed and the ratio of neurogenesis assessed.

HE-staining revealed no significant differences in the extent of the ischemic damage dependant of the mode of anaesthesia, although there was a tendency found that S(+)*ketamine* in a dosage of 1.0 mg/kg/min seems to reduce the neuronal damage compared to halothane anaesthesia. The results of the BrdU-staining show an increase of cell proliferation after an ischemic insult compared with the control groups and the native group. But neither in the control groups nor in the ischemic groups were significant differences in the number of BrdU-positive cells dependent of the chosen anaesthetic agents or dosages. There was a trend of S(+)*ketamine* in higher dosages to reduce the neuroregenerative potency. The data of the double immunofluorescence staining showed that neither the mode of anaesthesia nor the induction of an ischemic insult influenced the differentiation of newly born cells.

In summary, the findings suggest that a high dose of S(+)*ketamine* acts neuroprotective up to 28 days after an ischemic insult, but concurrently reduces the extent of damage-induced neurogenesis. Further investigations will be required to investigate the detailed mechanisms of the anesthetic agent S(+)*ketamine* on neuroregenerative potency and to develop a successful treatment of ischemic insult and its consequences.

7 LITERATURVERZEICHNIS

ABERG MA, ABERG ND, HEDBACKER H, OSCARSSON J, ERIKSSON PS
Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus
J Neurosci 2000; 20: 2896-2903

ADAMS HA, WERNER C
From the racemate to the eutomer: (S)-ketamine. Renaissance of a substance?
Anaesthesist 1997; 46: 1026-1042

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

ALTMAN J, DAS DG
Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats
J Comp Neurol 1965; 124: 319-335

ANDERSON RE, MEYER FB
Protection of focal cerebral ischemia by alkalinization of systemic pH
Neurosurgery 2002; 51: 1256-1265

ARVIDSSON A, KOKAIA Z, LINDVALL O
N-Methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke
Eur J Neurosci 2001; 14: 10-18

BARNEA A, NOTTEBOHM F
Recruitment and replacement of hippocampal neuron in young and adult chickadees: an addititon to the theory of hippocampal learning
Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 714-718

BERNABEU R, SHARP FR
NMDA and AMPA/kainate glutamate receptors modulate dentate neurogenesis and CA3 synapsin-1 in normal and ischemic hippocampus
J Cereb Blood Flow Metab 2000; 20: 1669-1680

BIEBL M, COOPER CM, WINKLER J, KUHN HG
Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain
Neurosci 2000; 291: 17-20

BUSTO R, DIETRICH WD, GLOBUS MY, VALDÉS I, SCHEINBERG P, GINSBERG MD
Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury
J Cereb Blood Flow Metabol 1987; 7: 729-738

CAMERON HA, MCEWEN BS, GOULD E
Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus
J Neurosci 1995; 15: 4687-4692

CAMERON HA, TANAPAT P, GOULD E

Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway
Neuroscience 1998; 82: 349-354

CAMERON HA, WOOLLEY CS, MCEWEN BS, GOULD E

Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat
Neuroscience 1993; 56: 337-344

CHEN ST, HSU C, HOGAN EI, MARICQ H, BALENTINE JD

A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction
Stroke 1986; 17: 738-743

CHURCH J, ZEMAN S

Ketamine promotes hippocampal CA1 pyramidal neuron loss after a short-duration ischemic insult in rats
Neurosci Lett 1991; 123: 65-68

CHURCH J, ZEMAN S, LODGE D

The neuroprotective action of ketamine and MK-801 after transient cerebral ischemia in rats
Anesthesiology 1988; 69: 702-709

COOPER-KUHN CM, KUHN HG

Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain
Dev Brain Res 2002; 134: 13-21

CRAIN BJ, WESTERKAM WD, HARRISON AH, NADLER JV

Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the mongolian gerbil: a silver impregnation study
Neuroscience 1988; 27: 387-402

DEL RIO JA, SORIANO E

Immunocytochemical detection of 5'-bromodeoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse
Dev Brain Res 1989; 49: 311-317

DEMPSEY RJ, SAILOR KA, BOWEN KK, TUREYEN K, VEMUGANTI R

Stroke-induced progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: effect of exogenous IGF-I and GDNF
J Neurochem 2003; 87: 586-597

DIWO S, PETROIANU G

Die Pharmakologie von Ketamin: Enantiomere, Diastomere, Eutomere und Razemat
In: Klose R, Hoppe U (Hrsg.), (S)-Ketamin, Aktuelle interdisziplinäre Aspekte
Springer Verlag, Berlin, 2000: 1-16

DUVERGER D, MACKENZIE ET

The quantification of cerebral infraction following focal ischemia in the rat: influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration, and age
J Cereb Blood Flow Metab 1988; 8: 449-461

EGUCHI Y, SHIMIZU S, TSUJIMOTO Y

Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis
Cancer Res 1997; 57: 1835-1840

ENGELHARD K, WERNER C, EBERSPÄCHER E, BACHL M, BLOBNER M, HILDT E, HUTZLER R, KOCHS E

The effect of the α_2 -agonist dexmedetomidine and the NMDA-antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats
Anesth Analg 2003; 96: 524-531

ENGELHARD K, WERNER C, EBERSPACHER E, PAPE M, BLOBNER M, HUTZLER P, KOCHS E

Sevoflurane and propofol influence the expression of apoptosis-regulating proteins after cerebral ischaemia and reperfusion in rats
Eur J Anaesthesiol 2004; 21: 530-537

ENGELHARD K, WERNER C, REEKER W, LU H, MÖLLENBERG O, MIELKE L, KOCHS E

Desflurane and isoflurane improve neurological outcome after incomplete cerebral ischaemia in rats
Br J Anaesth 1999; 83: 415-421

ENGELHARD K, STEGEMANN U, WERNER C, KAEPL B, KLUGE J, WINKLER J, HUTZLER P, KOCHS E

Einfluss der Stärke des Insults auf das neuroregenerative Potential nach experimenteller zerebraler Ischämie
DAC Abstractband 2004; SO 100

ERHARDT W, HENKE J, HABERSTROH J

Anästhesie & Analgesie beim Klein- und Heimtier
Schattauer, Stuttgart, 2004, 63-82

ERIKSSON PS, PERFILIEVA E, BJÖRK-ERIKSSON T, ALBORN A-M, NORDBORG C, PETERSON DA, GAGE FH

Neurogenesis in the adult human hippocampus
Nature 1998; 4: 1313-1317

FITCH W

Brain Metabolism

In: Cottrell J, Smith D (Hrsg.), Anaesthesia and neurosurgery
Mosby, St. Louis, 1994: 1-16

FORTH W, HENSCHLER D, RUMMEL W, STARKE K

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996, 244-246

FREY HH, LÖSCHER W

Lehrbuch für die Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin
Enke Verlag, Stuttgart, 2002, 97-107

GAGE FH

Mammalian neural stem cells
Science 2000; 287: 1433-1438

GALLI R, GRITTI A, BONFANTI L, VESCOVI AL

Neural stem cells: an overview
Circ Res 2003; 92: 598-608

GARCIA J

Experimental ischemic stroke: a review
Stroke 1984; 15: 5-14

GERRIETS T, LI F, SILVA MD, MENG X, BREVARD M, SOTAK CH, FISHER M

The macrosphere model: evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats
J Neurosci Meth 2003; 122: 201-211

GINSBERG MD, BUSTO R

Rodent models of cerebral ischemia
Stroke 1989; 20: 1627-1642

GOULD E, BEYLIN A, TANAPAT P, REEVES A, SHORS T

Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation
Nat Neurosci 1999; 2: 260-265

GOULD E, CAMERON HA

Regulation of neuronal birth, migration and death in the rat dentate gyrus
Dev Neurosci 1996; 18: 22-35

GOULD E, CAMERON HA, DANIELS DC, WOOLLEY CS, MCEWEN BS

Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus
J Neurosci 1992; 12: 3642-3650

GOULD E, MCEWEN BS, TANAPAT P, GALEA LA, FUCHS E

Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation
J Neurosci 1997; 17: 2492-2498

GOULD E, TANAPAT P

Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat
Neurosci 1997; 80: 427-436

GOULD E, TANAPAT P, MCEWEN BS, FLÜGGE G, FUCHS E

Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress
Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 3168-3171

GRAHAM DI, LANTOS PL
Greenfield's Neuropathology
Arnold, London, 1997, 86-90

GRATZNER HG
Monoconal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication
Science 1982; 218: 474-475

GRONERT GA, MILDE JH
Variation in onset of porcine malignant hyperthermia
Anesth Analg 1981; 60: 499-503

HAELEWYN B, YVON A, HANOUS JL, MACKENZIE ET, DUCOURET P, GERARD JL, ROUSSEL S
Desflurane affords greater protection than halothane against focal cerebral ischemia in the rat
Br J Anaesth 2003; 91: 390-396

HARKNESS JE, WAGNER JE
The biology and medicine of rabbits and rodents
Williams & Wilkins, Baltimore (USA), 1995, 372

HIMMELSEHER S, PFENNINGER E, GEORGIEFF M
The effects of ketamine-isomers on neuronal injury and regeneration in rat hippocampal neurons
Anesth Analg 1996; 83: 505-512

HIMMELSEHER S, PFENNINGER E, KOCHS E, AUCHTER M
S(+)-ketamine up-regulates neuronal regeneration associated proteins following glutamate injury in cultured rat hippocampal neurons
J Neurosurg Anesthesiol 2000; 12: 84-94

HOFFMAN WE, BRAUCHER E, PELLIGRINO DA, THOMAS C, ALBRECHT RF, MILETICH DJ
Brain lactate and neurologic outcome following incomplete ischemia in fasted, nonfasted, and glucose-loaded rats
Anesthesiology 1990; 72: 1045-1050

HONKANIEMI J, MASSA SM, BRECKINRIDGE M, SHARP FR
Global ischemia induces apoptosis-associated genes in hippocampus
Mol Brain Res 1996; 42: 79-88

HSU S, RAINE L, FANGER H
Use of the avidin-biotin-peroxidase complex in peroxidase techniques
J Histochem Cytochem 1981; 29: 577-581

IBAYASHI S, FUJISHIMA M, SADOSHIMA S, YOSHIDA F, SHIOKAWA O, OGATA J, OMAE T
Cerebral blood flow and tissue metabolism in experimental cerebral ischemia of spontaneously hypertensive rats with hyper-, normo- and hypoglycemia
Stroke 1986; 17: 261-266

ITO U, SPATZ M, WALKER JT, KLATZO I

Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils
Acta Physiol Scand 1975; 32: 209-223

JACOB HJ, KWITEK AE

Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome
Nat Rev Genet 2002; 3: 33-42

JENSEN ML, AUER RN

Ketamine fails to protect against ischemic neuronal necrosis in the rat
Br J Anaesth 1988; 61: 206-210

JOHANSEN FF, ZIMMER J, DIEMER NH

Early loss of somatostatin neurons in dentate hilus after cerebral ischemia in the rat precedes
CA-1 pyramidal cell loss
Acta Neuropathol 1987; 73: 110-114

KAGSTROM E, SMITH ML, SIESJO BK

Cerebral circulatory responses to hypercapnia and hypoxia in the recovery period following
complete and incomplete cerebral ischemia in the rat
Acta Physiol Scand 1983a; 118: 281-291

KAGSTROM E, SMITH ML, SIESJÖ BK

Recirculation in the rat brain following incomplete ischemia
J Cereb Blood Flow Metab 1983b; 3: 183-192

KAPINYA KJ, LOWL D, FUTTERER C, MAURER M, WASCHKE KF, ISAEV NK,
DIRNAGL U

Tolerance against ischemic neuronal injury can be induced by volatile anesthetics and is
inducible NO synthase dependent
Stroke 2002; 33: 1889-1898

KAPLAN MS, HINDS JW

Neurogenesis in adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs
Science 1977; 197: 1092-1094

KEE NJ, PRESTON E, WOJTOWICZ JM

Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat
Exp Brain Res 2001; 136: 313-320

KEMPERMANN G, KUHN HG, WINKLER J, GAGE FH

More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment
Nature 1997; 386: 493-495

KEMPSKI O

Neuroprotektion
Anaesthesist 1994; 43: 25-33

KEMPSKI O

Pathologische Neurophysiologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2000, 92-94

KLUGE J

Adulte Neurogenese bei der Ratte nach inkompletter globaler zerebraler Ischämie und deren Beeinflussung durch Sevofluran
Vet Med Diss München, in Vorb.

KOCHS E, HOFFMAN WE, WERNER C, THOMAS C, ALBRECHT RF, SCHULTE AM
ESCH J

The effect of propofol on brain electrical activity, neurologic outcome, and neuronal damage following incomplete ischemia in rats
Anesthesiology 1992; 76: 245-252

KOFLER J, SAWADA M, HATTORI K, DAWSON VL, HURN PD

Brain injury after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation (CPR)
In: Kriegelstein J (Hrsg.), Pharmacology of cerebral ischemia
Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 2002

KOIZUMI J, YOSHIDA Y, NAKAZAWA T, OONEDA G

Experimental studies of ischemic brain edema, 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area
Jpn J Stroke 1986; 8: 1-8

KOLB B, PEDERSEN B, BALLERMANN M, GIBB R, WHISHAW IQ

Embryonic and postnatal injections of bromodeoxyuridine produce age-dependent morphological and behavioral abnormalities
J Neurosci 1999; 19: 2337-2346

KUDO M, AOYAMA A, ICHIMORI S, FUKUNAGA N

An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats
Stroke 1982; 13: 505-508

KUHN HG, DICKINSON-ANSON, H., GAGE FH

Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation
J Neurosci 1996; 16: 2027-2033

KUHN HG, WINKLER J, KEMPERMANN G, THAL LJ, GAGE FH

Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain
J Neurosci 1997; 17: 5820-5829

KUSCHINSKY Y

Lehrbuch der Physiologie
In: Klinker R, Silbernagl S (Hrsg.), Blut-Hirn-Schranke, Liquor cerebrospinalis, Hirndurchblutung und Hirnsstoffgewechsel
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1996: 721-732

LASSEN NA, CHRISTIENSEN MS

Physiology of cerebral blood flow
Br J Anaesth 1973; 1: 507-510

LAUER KK, SHEN H, STEIN EA, HO KC, KAMPINE JP, HUDETZ AG
Focal cerebral ischemia in rats produced by intracarotid embolization with viscous silicone
Neurol Res 2002; 24: 181-190

LEES GJ
Halothane anaesthesia reverses the neuroprotective effect of ketamine against ibotenic acid
toxicity in the rat hippocampus
Brain Res 1989; 50: 280-286

LIEBICH HG, BÖCK P, BUDRAS KD
Funktionelle Histologie der Haustiere
Schattauer GmbH, 1999,

LIEBMANN M, SCHÜNKE M, SCHÜNKE G
Basiswissen Neuroanatomie
Thieme Verlag, Stuttgart, 1993, 113-117

LIU J, SOLWAY K, MESSING RO, SHARP FR
Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils
J Neurosci 1998; 18: 7768-7778

LOIS C, ALVAREZ-BUYLLA A
Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain
Science 1994; 264: 1145-1148

LOIS C, ALVAREZ-BUYLLA A
Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into
neurons and glia
Sci USA 1993; 90: 2074-2077

LUNDY PM, GOWDEY CW, COLHOUN EH
Tracheal smooth muscle relaxant effect of ketamine
Br J Anaesth 1974; 46: 333-336

MARCOUX FW, GOODRICH JE, DOMINICK MA
Ketamine prevents ischemic neuronal injury
Brain Res 1988; 452: 329-335

MARIE C, BRALET AM, GUELDRY S, BRALET J
Fasting prior to transient cerebral ischemia reduces delayed neuronal necrosis
Metab Brain Dis 1990; 5: 65-75

MARKAKIS EA, GAGE FH
Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are
surrounded by synaptic vesicles
J Comp Neurol 1999; 406: 449-460

MULLEN RJ, BUCK CR, SMITH A
NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates
Development 1992; 116: 201-211

- NELLGARD B, MACKENSEN GB, PINEDA J, WELLONS JCR, PEARLSTEIN RD, WARNER DS
Anesthetic effects on cerebral metabolic rate predict histologic outcome from near-complete forebrain ischemia in the rat
Anaesthesiology 2000; 93: 431-436
- NICKEL R, SCHUMMER A, SEIFERLE E
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Band 4, Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen
Paul Parey Verlag, Berlin, 1991, 74-199
- NJOKU D, LASTER MJ, GONG DH, EGER EIN, REED GF, MARTIN JL
Biotransformation of halothane, enflurane, isoflurane and desflurane to trifluoroacetylated liver proteins: association between protein acylation and hepatic injury
Anesth Analg 1997; 84: 173-178
- NOTTEBOHM F
A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain
Science 1981; 214: 1368-1370
- NOTTEBOHM F
Neuronal replacement in adult brain
Brain Res Bull 2002; 57: 737-749
- OKAMOTO K, YAMORI Y, NAGAOKA A
Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR)
Circ Res 1974; 34-35 (suppl1): 1-143/ 1-153
- PACKARD DS, MENZIES RA, SKALKO RG
Incorporation of thymidine and its analogue, bromodeoxyuridine, into embryos and maternal tissues of the mouse
Differentiation 1973; 1: 397-404
- PARENT JM, YU TW, LEIBOWITZ RT, GESCHWIND DH, SLOVITER RS, LOWENSTEIN DH
Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus
J Neurosci 1997; 17: 3727-3738
- PAXINOS G, WATSON C
The rat brain in stereotaxic coordinates
Academic Press, San Diego, 1998
- PERETTO P, MERIGHI A, FASOLO A, BONFANI L
Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat
Brain Res Bull 1997; 42: 9-21
- PHUPHANICH S, LEVIN VA
Bioavailability of bromodeoxyuridine in dogs and toxicity in rats
Cancer Res 1985; 45: 2387-2389

PRICE J, TURNER D, CEPKO C

Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer
Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84

PROESCHOLDT M, HEIMANN A, KEMPSKI O

Neuroprotection of S(+)-ketamine isomer in global forebrain ischemia
Brain Res 2001; 904: 245-251

PULSINELLI W, BUCHAN AM

The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation
Stroke 1988; 19: 913-914

PULSINELLI WA

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

PULSINELLI WA, BRIERLEY JB

A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat
Stroke 1979; 10: 267-272

RAKIC P

Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis
J Neurosci 2002; 22: 614-618

RAMON Y CAJAL S

Degeneration and regeneration of the nervous system
Oxford UP, London, 1928

REEKER W, WERNER C, MÖLLENBERG O, MIELKE L, KOCHS E

High-dose S(+)-ketamine improves neurological outcome following incomplete cerebral ischemia
Can J Anaesth 2000; 47: 572-578

REYNOLDS BA, WEISS S

Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the mammalian central nervous system
Science 1992; 255: 1707-1710

ROCHE

Roche Lexikon Medizin
Urban & Fischer Verlag, München, 5. Aufl., 2003

ROMEIS B

Mikroskopische Technik
Urban und Schwarzenberg, München, 1989

RÜSSE I, SINOWATZ F

Lehrbuch der Embryologie der Haustiere
Verlag Paul Parey, Berlin, 1991, 271-272

LITERATURVERZEICHNIS

SANO T, DRUMMOND JC, PATEL PM, GRAFE MR, WATSON JC, COLE DJ
A comparison of the cerebral protective effects of isoflurane and mild hypothermia in a model of incomplete forebrain ischemia in the rat
Anesthesiology 1992; 76: 221-228

SCHIWY P, HARMONY T
Deutsches Tierschutzgesetz. Kommentar zum Tierschutzgesetz und Sammlung deutscher und internationaler Bestimmungen
Schulz, Starnberg, 2003

SHAPIRA Y, LAM AM, ENG CC, LAOHAPRASIT V, MICHEL M
Therapeutic time window and dose response of the beneficial effects of ketamine in experimental head injury
Stroke 1994; 25: 1637-1643

SHARP FR, LIU J, BERNABEU R
Neurogenesis following brain ischemia
Brain Res Dev Brain Res 2002; 134: 23-30

SHORS TJ, MIESEGAES G, BEYLIN A, ZHAO M, RYDEL T, GOULD E
Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories
Nature 2001; 410: 372-376

SIEMKOWICZ E, HANSEN AJ
Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo-, normo- and hyperglycemic rats
Acta Neurol Scand 1978; 58: 1-8

SIESJÖ BK
Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia; Part I: Pathophysiology
J Neurosurg 1992; 77: 169-184

SKENE JH
Growth-associated proteins and the curious dichotomies of nerve regeneration
Cell 1984; 37: 697-700

SMITH ML, AUER RN, SIESJO BK
The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia
Acta Neuropathol 1984a; 64: 319-332

SMITH ML, BENDEK G, DAHLGREN N, ROSEN I, WIELOCH T, GINSBERG MD
Models for studying longterm recovery following forebrain ischemia in the rat. A 2-vessel occlusion model
Acta Neurol Scand 1984b; 69: 385-401

STEFFEY EP
Inhalation anesthetics
In: Adams HR (Hrsg.), Veterinary pharmacology and therapeutics
Iowa State University Press, Ames (USA), 2001: 184-212

SUGIMOTO A, SHOZUHARA H, KOGURE K, ONODERA H

Exposure to sub-lethal ischemia failed to prevent subsequent ischemic death of dentate hilar neurons, as estimated by laminin immunohistochemistry
Brain Res 1993; 629: 159-162

TAKAGI Y, NOZAKI K, TAKAHASHI J, YODOI J, ISHIKAWA M, HASHIMOTO N

Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice
Brain Res 1999; 831: 283-287

TAKASAWA K, KITAGAWA K, YAGITA Y, SASAKI T, TANAKA S, MATSUSHITA K, OHSTUKI T, MIYATA T, OKANO H, HORI M, MASUMOTO M

Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival of newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats
J Cereb Blood Flow Metab 2002; 22: 299-397

TAMURA A, GRAHAM DI, MCCULLOCH J, TEASDALE GM

Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion
J Cereb Blood Flow Metab 1981; 1: 53-60

TONCHEV AB, YAMASHIMA T, ZHAO L, OKANO JH, OKANO H

Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys
Neurosci 2003; 23: 292-301

TRAYSTMAN RJ

Animal models of focal and global cerebral ischemia
Ilar J 2003; 44: 85-95

VAN PRAAG H, KEMPERMANN G, GAGE FH

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

VAN PRAAG H, SCHINDER AF, CHRISTIE BR, TONI N, PALMER TD, GAGE FH

Functional neurogenesis in the adult hippocampus
Nature 2002; 415: 1030-1034

WARD JM, HENNEMAN JR, OSIPOVA G, ANISIMOV VN

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

WARNER DS, MCFARLANE C, TODD MM, LUDWIG P, MCALLISTER AM

Sevoflurane and halothane reduce focal ischemic brain damage in the rat. Possible influence on thermoregulation.
Anesthesiology 1993; 79: 985-992

WATSON BD, DIETRICH WD, BUSTO R, WACHTEL MS, GINSBERG MD

Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis
Ann Neurol 1985; 17: 497-504

WERNER C

Mild and moderate hypothermia as a new therapy concept in treatment of cerebral ischemia and craniocerebral trauma. Pathophysiologic principles
Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 1997; 32: 210-218

WERNER C

Neuroprotektion
In: Jantzen J, Löffler W (Hrsg.), Neuroanaesthesie
Thieme Verlag, Stuttgart, 2000: 121-142

WERNER C, MOLLENBERG O, KOCHS E, SCHULTE JAE

Sevoflurane improves neurological outcome after incomplete cerebral ischemia in rats
Br J Anaesth 1995; 75: 756-760

WESTERBERG E, MONAGHAN DT, KALIMO H, COTMAN CW, WIELOCH TW

Dynamic changes of excitatory amino acid receptors in the rat hippocampus following transient cerebral ischemia
J Neurosci 1989; 9: 798-805

WINSLOW T

Stem Cells
Department of health and human services, <http://stemcells.nih.gov/info/scireport>, 2001

YAGITA Y, KITAGAWA K, OHTSUKI T, TAKASAWA K, MIYATA T, OKANO H,
HORI M, MATSUMOTO M

Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus
Stroke 2001; 32: 1890-1896

YAMORI Y, HORIE R, HANDA H, SATO M, FUKASE M

Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans
Stroke 1976; 7: 46-53

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Gruppeneinteilung der Versuchstiere	36
Tabelle 2:	Messzeitpunkte der Messparameter	44
Tabelle 3:	BrdU-Dosierungstabelle für die In-vivo-Markierung	49
Tabelle 4:	Mittlerer arterieller Blutdruck	72
Tabelle 5:	Herzfrequenz und Blutglukosekonzentration	74
Tabelle 6:	PaO ₂ und PaCO ₂	76
Tabelle 7:	pH-Wert und Hämoglobinkonzentration	77
Tabelle 8:	Histologische Schadensklassifizierung in der HE-Färbung	80
Tabelle 9:	Anzahl BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus der Ratte	83
Tabelle 10:	Neurogeneserate im Gyrus dentatus	85
Tabelle 11:	Anzahl neu generierter Neuronen im Gyrus dentatus	86
Tabelle 12:	Volumen des Gyrus dentatus	88

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Hippokampusformation vom Gehirn einer Ratte mit Einteilung der verschiedenen CA-Regionen (nach PAXINOS und WATSON 1998).....	6
Abbildung 2:	Formen der zerebralen Ischämie (modifiziert nach Traystman 2003).....	9
Abbildung 3:	Stammzellen mit neuronalem Differenzierungspotential (modifiziert nach Gage 2000).....	19
Abbildung 4:	Übersicht über das Gehirn einer Ratte (modifiziert nach Galli et al. 2003) ..	21
Abbildung 5:	Strukturformel von S(+)-Ketamin (aus DIWO 2000).....	25
Abbildung 6:	Strukturformel von Halothan	29
Abbildung 7:	Übersicht über das Verlaufsprotokoll des operativen Abschnitts.....	38
Abbildung 8:	Ratte während des operativen Abschnitts nach abgeschlossener Präparation	42
Abbildung 9:	Schneiden des Gehirns mit dem Schlittenmikrotom.....	52
Abbildung 10:	Mittlerer arterieller Blutdruck.....	73
Abbildung 11:	Histologische Beurteilung des neuronalen Gewebes in der Hippokampusformation und dem Gyrus dentatus der Ratte - physiologischer Befund.....	78
Abbildung 12:	Histologische Beurteilung des neuronalen Gewebes in der Hippokampusformation und dem Gyrus dentatus der Ratte - Neuronenschaden.....	79
Abbildung 13:	Grafische Darstellung des neuronalen Schadens bzw. der HE-Indices der CA1-Region des Hippokampus	81
Abbildung 14:	Gyrus dentatus einer Ratte der 0,75 mg-Ketamin-Ischämiegruppe	82
Abbildung 15:	Graphische Darstellung der Anzahl BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus	84
Abbildung 16:	Ausschnitt aus dem Neuronenband des Gyrus dentatus der Ratte.....	85
Abbildung 17:	Graphische Darstellung der Anzahl neu gebildeter Neuronen im Gyrus dentatus	87
Abbildung 18:	Anzahl neu gebildeter Neuronen bei Tieren ohne und mit Neuronenschaden in der CA1-Region	89

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
2-VO	Verschluss von zwei Gehirnarterien (engl.: two-vessel-occlusion)
4-VO	Verschluss von vier Gehirnarterien (engl.: four-vessel-occlusion)
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
AMPA	Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure
ATP	Adenosin-tri-Phosphat
AW	Ausgangswert
BE	Basenabweichung (engl.: base excess)
BGA	Blutgasanalyse
BrdU	5-Bromo-2-Deoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
CA	Cornu ammonis
ca.	zirka
Ca ²⁺	Kalzium
Cl ⁻	Chlorid
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-tetra-hydrochlorid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dl	Deziliter
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DS	Donkey Serum
EEG	Elektroenzephalogramm
EGF	Epidermal growth factor
EKG	Elektrokardiogramm
engl.	Englisch
Erh	Erholungsphase
et al.	et alii (lat.: und Mitarbeiter)
evtl.	eventuell
Fa.	Firma

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ff.	Folgende
FGF	Fibroblast growth factor
FiO ₂	Fraction of inspiratory oxygen
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
g	Gramm
GAP-43	Growth Associated Protein-43
GD	Gyrus dentatus
Gluc	Glukose
GM	Gehirnmasse
h	Stunden
H	Hippokampus
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobingehalt des Blutes
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Herzfrequenz
Hkt	Hämatokrit
I.E.	Internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IF	Immunfluoreszenz
IGF-1	insulin-like growth factor
incl.	inklusive
Isch	Phase der Ischämie
K ⁺	Kalium
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
li	links
M	molar
M.	Musculus
Mm.	Musculi
MAC	Minimale alveoläre Konzentration (engl.: concentration)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MAP	mittlerer arterieller Blutdruck (engl.: pressure)
MCA	Arteria cerebri media (engl.: middle cerebral artery)
MCAO	Okklusion der Arteria cerebri media (engl.: middle cerebral artery occlusion)
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N.	Nervus
N ₂ O	Lachgas
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NeuN	Neuronal specific nuclear protein
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O ₂	Sauerstoff
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PaCO ₂	arterieller Kohlenstoffpartialdruck
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PO ₄	Phosphat
pH	arterieller pH-Wert
re	rechts
Rep	Phase der Reperfusion
RMS	rostraler Migrationsstrom
ROX	Rhodamine Red-X
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SD	Standardabweichung (engl.: standard deviation)
sec	Sekunde

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SGZ	Subgranuläre Zone
SHR	spontan hypertensiver Rattenstamm
SHRSP	spontan hypertensiver Rattenstamm mit Schlaganfallsneigung
sog.	so genannt
SSC	Natriumzitat-Lösung (engl.: solution of sodium citrate)
SVZ	subventrikuläre Zone
T peri	perikranielle Temperatur
Tab.	Tabelle
TBS	TrizmaBase Solution
TiO ₂	Titandioxid
u.a.	unter anderem
V.	Vena
vs.	versus
Vv.	Venae
Vol%	Volumen Prozent
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

11 DANKSAGUNG

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

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Direktor des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

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

Zudem bedanke ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt für die Durchsicht des Manuskripts und die jederzeit freundliche Beratung.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Kolleginnen der Forschungsgruppe „Neuroprotektion“ in der Klinik für Anaesthesiologie der TU München, Frau Dr. med. Kristin Engelhard, Frau Dr. med. vet. Eva Eberspächer und Frau Dr. med. vet. Uta Stegemann für ihre entscheidende Hilfe und Beratung in allen Dingen rund um diese Arbeit. Ebenso ein herzliches Dankeschön für die gemeinsam durchstandenen Höhen und Tiefen an meine beiden Doktorandenkolleginnen Kerstin Heimann und Julia Kluge.

Vielen Dank an Herrn Dr. rer. nat. Peter Hutzler (Leiter) vom Institut für Pathologie der GSF Neuherberg für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und ihre freundliche und geduldige Hilfe bei technischen Fragen bei der Arbeit am ApoTome.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Doris Droese, Herrn Sepp Straßmair und Frau Anne Frye für ihre große Hilfe, ebenso wie den Kolleginnen und Kollegen des Labors Gebäude 522.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre unermüdliche finanzielle, moralische und sonstige Unterstützung.

12 LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Birgit Beate Kaepfel
Geburtsdatum: 17.05.1978
Geburtsort: Augsburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: römisch katholisch
Eltern: Dr. Ulrich Kaepfel
selbstständiger Unternehmensberater
Edeltraud Kaepfel, geb. Merz

Geschwister: Martin Kaepfel

Schulbildung: 1984-1988 Grundschule Aystetten
1988-1997 Justus-von-Liebig-Gymnasium Neusäß
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1997-2003 Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
17.02.2003 Letzte Prüfung des Dritten Staatsexamens
05.03.2003 Approbation
Seit 01.07.2003 Promotionsstudium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

mit den folgenden Praktika:

27.03.-31.03.2000 Einführungskurs in die Funktionelle Klauenpflege, Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim
14.02.-01.04.2001 Praktikum in der Tierärztlichen Klinik für Pferde, Rinder und Kleintiere, Dres. Erben, Fitz und Partner in Gessertshausen
05.09.-21.10.2001 Praktische Ausbildung in der Schlachttier- und Fleischuntersuchung, Veterinäramt und Schlachthof Göppingen
27.04.-11.06.2002 Praktikum in der Kleintierklinik Breitensee, Univ.-Doz. Dr. Norbert Kopf, Wien