

Aufbau und Etablierung eines Tiermodells zur Erzeugung eines diffusen axonalen Schädelhirntraumas zur Untersuchung von Xenon und Hypothermie als Neuroprotektiva

SONJA GALOW



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere, Chirurgie
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: PD Dr. med. vet. AkR S. P. Tacke

und

der Klinik für Anaesthesiologie und operative Intensivmedizin

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH

Fachbereich Humanmedizin

Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: PD Dr. med. M. Gruß

**Aufbau und Etablierung eines Tiermodells zur
Erzeugung eines diffusen axonalen
Schädelhirntraumas zur Untersuchung von Xenon
und Hypothermie als Neuroprotektiva**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Sonja Galow

Tierärztin aus Frankfurt

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Professor Dr. Martin Kramer

Gutachter/in: PD Dr. med. vet. AkR S. P. Tacke

PD Dr. med. M. Gruß

Tag der Disputation: 09. Dezember 2010

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Abkürzungsverzeichnis und Fachausdrücke	6
3	Einleitung	10
3.1	Hintergrund	10
3.2	Schädelhirntrauma	10
3.3	Ziele der vorgestellten eigenen Untersuchung.....	11
4	Literaturübersicht.....	13
4.1	Das Nervensystem	13
4.1.1	Gehirn – Anatomie, Stoffwechsel	13
4.1.2	Hippokampus.....	16
4.2	Pathophysiologie des Schädelhirntraumas	16
4.3	Der Zelltod: Apoptose und Nekrose	20
4.3.1	Morphologische Veränderungen während des Zelltodes	21
4.3.2	Caspasen	22
4.4	Tiermodelle zur Erzeugung eines Schädelhirntraumas	26
4.4.1	Ansprüche an ein Tiermodell	26
4.4.2	Beschreibung	27
4.5	Neuroprotektion	32
4.5.1	Xenon.....	33
4.5.2	Die Vorteile von Xenon.....	36
4.5.3	Der Wirkungsmechanismus von Xenon.....	37
4.5.4	Hypothermie	41
5	Material und Methoden.....	44
5.1	Vorbereitung der ersten Versuche	44
5.2	Planung der Versuchsgruppen	45
5.3	Durchführung der Pilotversuche	47
5.4	Abbruchkriterien.....	49
5.5	Versuchstiere.....	50

Inhaltsverzeichnis

5.5.1	Wahl der Versuchstiere	50
5.5.2	Art und Haltung der Tiere	50
5.5.3	Allgemeine Werte	51
5.6	Versuchsdurchführung	51
5.6.1	Narkoseeinleitung	51
5.6.2	Steuerung der Narkose	52
5.6.3	Intubation und Beatmung	52
5.6.4	Präparation der Schwanzarterie	54
5.6.5	Weiteres Monitoring	55
5.6.6	Vorbereitung des Schädelhirntraumas	56
5.6.7	Einleitung von Xenon	57
5.6.8	Kühlung	57
5.6.9	Narkoseausleitung	58
5.6.10	Unterstützende Maßnahmen	58
5.6.11	Postoperative Untersuchungen	59
5.6.12	Schmerzmittelgabe	59
5.7	Tötung der Versuchstiere zur Gehirnentnahme nach Perfusion	59
5.7.1	Schneiden der Gehirne	61
5.8	Einwaschversuche	62
5.9	Schaumstofftests	63
5.9.1	Neurologischer Test mit dem Rota-Rod	64
5.10	Färbemethoden	66
5.10.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	66
5.10.2	Immunhistochemische Färbung und Immunfluoreszenzfärbung	67
5.10.3	Durchführung der Caspase-3-Färbung mit der Avidin-Biotin Komplexmethode	68
5.10.4	Durchführung der Doppelfärbung gegen Caspase-3 und NeuN	70
5.10.5	Durchführung der Immunfluoreszenzdoppelfärbung	71
5.10.6	Durchführung der Antigendemaskierung	73
5.10.7	Einbettung in Paraffin	74
5.10.8	Durchführung der Präabsorption	75
5.10.9	Erläuterung der Methoden zur histologischen Aufarbeitung	75
5.11	Statistische Auswertung	77

Inhaltsverzeichnis

6	Ergebnisse und Auswertung	78
6.1	Aufbau des Traumamodells	78
6.2	Narkosesteuerung.....	78
6.3	Blutgasanalyse und Monitoring	79
6.4	Xenoneinwasch.....	83
6.5	Hypothermie	85
6.6	Gewichtsentwicklung der Tiere	93
6.7	Histologische Färbungen	95
6.7.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	95
6.7.2	Immunhistochemische Färbung.....	98
6.7.3	Immunhistochemische Doppelfärbung.....	98
6.7.4	Immunfluoreszenzfärbung.....	99
6.7.5	Antigendemaskierung in der Immunfluoreszenzfärbung	100
6.7.6	Einbettung in Paraffin.....	101
6.7.7	Präabsorption	102
6.8	Die Ergebnisse der Schaumstofftests.....	103
6.9	Rota-Rod Test.....	106
7	Diskussion.....	109
7.1	Probleme bisheriger Untersuchungen.....	109
7.2	Etablierung des Modells	110
7.2.1	Wahl des Modells	110
7.2.2	Das Weight drop Modell	111
7.3	Wahl der Versuchstiere.....	112
7.4	Histologische Auswertung.....	113
7.5	Evans Blue und Schaumstoffe	114
7.6	Etablierung und Durchführung des Narkoseregimes.....	114
7.7	Narkoseführung mit Xenon und unter Hypothermie	116
7.8	Die Gewichtsentwicklung.....	118
7.9	Neurologischer Test mit dem Rota-Rod	119
7.10	Relevanz der vorgestellten Untersuchung für die Veterinärmedizin.....	120
8	Kritische Schlussbetrachtung.....	121
9	Zusammenfassung	123

Inhaltsverzeichnis

10	Summary	124
11	Anhang	126
11.1	Maligne Hyperthermie	126
11.2	Abbildungsverzeichnis.....	126
11.3	Tabellenverzeichnis	128
11.4	Färbeprotokolle.....	129
11.4.1	HE-Färbeprotokoll Gefrierschnitte.....	129
11.4.2	HE-Färbeprotokoll Paraffinschnitte	129
11.4.3	Färbeprotokoll der Caspase-3-Färbung mit der Avidin-Biotin Komplexmethode...130	
11.4.4	Färbeprotokoll der lichtmikroskopischen Doppelfärbung gegen Caspase-3 und NeuN.....	131
11.4.5	Färbeprotokoll der Immunfluoreszenzdoppelfärbung gegen Caspase-3 und NeuN.....	132
11.4.6	Färbeprotokoll der Immunfluoreszenzdoppelfärbung gegen Caspase-3 und NeuN an Paraffinschnitten	133
11.5	Lösungen.....	134
11.5.1	Vorspüllösung.....	134
11.5.2	Fixationslösung.....	134
11.5.3	Lösung A	134
11.5.4	Lösung B.....	134
11.5.5	Phosphatpuffer 0, 2 M	135
11.5.6	PBS-Lösung.....	135
11.5.7	PBS+S-Lösung	135
11.5.8	Sucrose-Lösung 30%ige	135
11.5.9	Histoblocklösung	135
11.5.10	Faulhammer-Blocklösung	136
11.5.11	Fixierlösung nach Zamboni.....	136
11.5.12	Tris-HCl-Puffer	136
11.5.13	HEPES-Puffer	136
11.5.14	10 mM Zitronensäure pH 6,0.....	137
11.5.15	Triton X 100.....	137
11.5.16	Eosin.....	137
12	Literatur.....	138

13 Danksagung..... 153

2 Abkürzungsverzeichnis und Fachausdrücke

α -	alpha-
ABC-Method	avidin-biotin complex method
ad libitum	zur freien Verfügung
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
β -	beta-
Bcl-2-Proteine	B-cell lymphoma 2-Proteine
BGA	Blutgasanalyse
BSA	bovines Serum-Albumin
BZ	Blutzucker
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius (Einheit für die Temperatur)
Ca^{2+}	Kalziumionen
CA1-4	Regionen des Hippokampus
CAD	Caspase-aktivierte DNase
CCI	Controlled Cortical Impact (Traumamodell)
CED-3	Protein von <i>Caenorhabditis elegans</i>
cm	Zentimeter (Längeneinheit)
Cl^{-}	Chloridion
CO_2	Kohlendioxid
Cy3	Indocarbocyanin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dk-a-ms	Donkey anti mouse (Antikörper)
dk-a-rb	Donkey anti rabbit (Antikörper)
dL	Deziliter
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EKG	Elektrokardiogramm
FiO_2	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat

Abkürzungsverzeichnis und Fachausdrücke

γ -	Gamma-
g	Gramm (Gewichtseinheit)
G	Gauge (Lumenbezeichnung bei Kanülen und Venenverweilkathetern)
GABA _A -Rezeptor	γ -Aminobuttersäure A-Rezeptor
GCS	Glasgow Coma Scale
gt-a-rb	goat anti rabbit (Antikörper)
h	hora (Stunde)
H ⁺	Wasserstoffion/Hydroniumion
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat/Hydrogenkarbonation
H ₂ CO ₃	Kohlensäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Puffersubstanz
HF	Herzfrequenz
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IE	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin (Antikörper)
K ⁺	Kaliumion
kD	Kilodalton/Dalton (Masseneinheit des Molekulargewichts)
kg	Kilogramm
M	molar
m	Meter
MAC	minimale alveoläre Konzentration
Mg ²⁺	Magnesiumion
μ g	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar

Abkürzungsverzeichnis und Fachausdrücke

mm	Millimeter
mmol	Millimol (Stoffmengen)
µm	Mikrometer
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule (Druckeinheit)
MZ 1-5	Messzeitpunkt 1-5
N/n	Anzahl
N ₂	Stickstoff-Molekül
nAChR	Nikotinerge Acetylcholinrezeptoren
NaCl	Kochsalz
NaOH	Natronlauge
NeuN	neuronaies Strukturprotein
NGS	Normal goat serum
NH ₂ -	Amino-Gruppe
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
N ₂ O	Lachgas
O ₂	Sauerstoff
OxI	Oxygenierungsindex
p	Partialdruck
PBS	Phosphate buffered saline
per os	durch die Mundöffnung
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus hydrogenii (negativ dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration)
PUFA	poly unsaturated fatty acids
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RGT-Regel	Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel
RNS	Ribonukleinsäure
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
TASK-Kanal	Kaliumkanal (TWIK-related acid-sensitive K ⁺ channel)
T-Lymphozyten	vom Thymus abhängige Lymphozyten

Abkürzungsverzeichnis und Fachausdrücke

TRAAK-Kanal	Kaliumkanal (TWIK-related arachidonic-acid-stimulated K ⁺ channel)
TREK-Kanal	Kaliumkanal (TWIK-related K ⁺ channel)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TWIK	Tandem of P domains in a weak inwardly rectifying K ⁺ channel
Xe	Xenon
ZVK	Zentraler Venenkatheter

3 Einleitung

3.1 Hintergrund

Jährlich erleiden alleine in Deutschland etwa 200.000 Menschen ein Schädelhirntrauma (SHT). Davon sterben zirka 20.000 Menschen an den Folgen der Schädigung und weitere 40.000 Menschen erleiden eine Beeinträchtigung ihres Lebens durch bleibende neurologische Schäden bis hin zum andauernden Koma (Quelle: Informationsdienst der Wissenschaft http://idw-online.de/public/pmid-110/zeige_pm.html). Bei zirka 40 bis 60% der Unfallopfer liegen noch weitere Verletzungen vor. Dem Ausmaß des Schädelhirntraumas kommt im Hinblick auf die Prognose eine große Bedeutung zu. Die häufigste Ursache für das Erleiden eines Schädelhirntraumas sind Verkehrsunfälle, gefolgt von Unfällen im Haushalt, beim Sport und im Beruf. Opfer von Autounfällen sind häufig auch polytraumatisiert.

Die schnelle Versorgung von Patienten mit schwerem Schädelhirntrauma hat einen entscheidenden Einfluss auf das Therapieergebnis. Die Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin hat zur Standardisierung „Leitlinien zur Primärversorgung von Patienten mit SHT“ herausgegeben und aktualisiert diese regelmäßig (Baetgen *et al.*, 2009).

3.2 Schädelhirntrauma

Das Gesamtausmaß des Schadens am Gehirn setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen. Zum einen aus der primären Verletzung der Gehirnstrukturen, beeinflusst durch Ausmaß und Schwere des Traumas, zum anderen aus den, auf die initiale Schädigung folgenden intra- und extrakraniellen Prozessen, die zu einer sekundären Ausweitung des Schadens führen. Die primäre Schädigung kann im Verlauf einer Therapie nicht mehr rückgängig gemacht werden, deshalb ist die Begrenzung des Ausmaßes der sekundären Schädigung für die Prognose von entscheidender Bedeutung.

Einleitung

Nur durch ein frühzeitiges Eingreifen mit einer geeigneten Therapie kann das Fortschreiten der schädigenden Prozesse aufgehalten und damit das Leben der Patienten erheblich verbessert werden (Werner & Engelhard, 2007).

Zahlreiche Therapiemaßnahmen wurden in tierexperimentellen Untersuchungen zum Teil erfolgreich getestet (Alessandri & Bullock, 1998; Royo *et al.*, 2003). Einen therapeutischen Effekt konnte man bisher in klinischen Untersuchungen aber nicht nachweisen (Narayan *et al.*, 2002). Einem therapeutischem Nutzen stehen auch auftretende Nebenwirkungen und zusätzliche Komplikationen im Wege. Als Beispiele sind hier zu nennen der NMDA-Antagonist MK-801, der sich nach erfolgreicher Laborerprobung als zu neurotoxisch erwiesen hat (Fix *et al.*, 1993) und die experimentell und klinisch ebenfalls erfolgreich eingesetzte Hypothermie (Arrich *et al.*, 2009). Letztgenannte Maßnahme ist jedoch im klinischen Einsatz bei Schädelhirntrauma-Patienten nicht ganz unumstritten, da sie zum Teil schwere Lungenentzündungen und andere Komplikationen verursachen kann (Huh *et al.*, 2000; Celik *et al.*, 2006; Hutchison *et al.*, 2008).

3.3 Ziele der vorgestellten eigenen Untersuchung

Ziel der hier vorgestellten Untersuchung ist der Aufbau eines Tiermodells, mit dem ein diffuses axonales Trauma erzeugt werden soll. Es wird angestrebt, die Bedingungen, wie sie nach einem Autounfall oder einem Sturz aus größerer Höhe auftreten, im Labor nachzustellen. Dazu wird das Modell nach Marmarou (Marmarou *et al.*, 1994; Foda & Marmarou, 1994) ausgewählt und leicht modifiziert (siehe Kapitel „Material und Methoden“). Zunächst muss dafür das Traumamodell selbst aufgebaut werden. In der Folge sollen Initialversuche unter Beweis stellen, dass die Aufrechterhaltung der Narkose bei den Tieren über einen längeren Zeitraum gelingt. Gleichzeitig sollen die Versuche Daten über die Sauerstoff- und Kohlendioxid-Partialdrücke im arteriellen Blut liefern und die Aufrechterhaltung besonders des Sauerstoff-Partialdrucks unter Frischgas-Niedrigflussbedingungen zeigen. Dabei sollen Atemfrequenz und Atemvolumen bei abweichenden Werten entsprechend so angepasst werden, dass das bluteigene Bikarbonat-Kohlensäure-Puffersystem in der Lage ist, den pH-Wert des Blutes auf dem physiologischen Niveau zu halten.

Einleitung



Abbildung 1: Gleichung des Bikarbonat-Kohlensäure-Puffers

Diese Ausgangsdaten werden dann im nächsten Schritt herangezogen, um die Aufrechterhaltung der Narkose unter Zuleitung von Xenon beziehungsweise unter Einleitung einer moderaten Hypothermie zu untersuchen. In der Folge werden dann Xenon-Einwaschkurven erstellt. Diese zeigen am Tiermodell die Möglichkeit einer stabilen Narkose unter den Bedingungen des Einwaschens, der Aufrechterhaltung und des Auswaschens von Xenon. Das Gleiche wird mit der Anwendung einer moderaten Hypothermie durchgeführt.

In einem weiteren Schritt soll der Beweis erbracht werden, dass mit dem selbst aufgebauten Modell das gewünschte Trauma erzeugt werden kann. Die Auswirkungen des Schädelhirntraumas und die möglichen neuroprotektiven Effekte sollen mit Hilfe histologischer Methoden aufgezeigt werden. Dazu wird eine Standardlaborfärbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) durchgeführt. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung soll helfen, nekrotische Zellen aufzuzeigen. Des Weiteren soll auch eine immunhistochemische Färbemethode mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 zum Einsatz kommen, die das Vorhandensein apoptotischer Zellen nachweisen soll. Sind diese Methoden etabliert, werden sie im Tierversuch einen Vergleich ermöglichen zwischen einem in Deutschland standardmäßig bei Patienten mit einem Schädelhirntrauma eingesetzten Narkose- beziehungsweise Sedierungsprotokoll und einem alternativen Narkoseprotokoll unter Verwendung von Xenon. Nur versuchsweise soll im Rahmen dieser Untersuchung ein motorischer Test zur Überprüfung des neurologischen Status ausprobiert werden. Die Erkenntnisse dieser Vorversuche sollen als Grundlage für eine sich anschließende Untersuchung dienen, in der unter anderem motorische Tests zur Bewertung des neuroprotektiven Effekts von Xenon herangezogen werden sollen.

4 Literaturübersicht

4.1 Das Nervensystem

4.1.1 Gehirn – Anatomie, Stoffwechsel

Voraussetzung für das Verstehen pathologischer Veränderungen ist ein grundlegendes Wissen über die morphologischen Gegebenheiten und physiologisch ablaufenden Prozesse des Nervensystems. Zunächst wird grob in ein zentrales Nervensystem mit Gehirn und Rückenmark und ein peripheres Nervensystem mit peripheren Nerven und Ganglien unterteilt. Funktionell unterscheidet man ein somatisches Nervensystem, das bewusste Aktionen und Reaktionen kontrolliert, und das vegetative Nervensystem, das unbewusst die lebenserhaltenden Vorgänge im Körper steuert. Das vegetative oder auch autonome Nervensystem kann weiter unterteilt werden in sympathisches und parasympathisches sowie intramurales System (Nickel *et al.*, 1992b).

Nach der fetalen Entwicklung des Gehirnes können kranial des Rückenmarks folgende Abschnitte unterschieden werden:

Rautenhirn/Rhombencephalon mit

- Nachhirn/Myelencephalon, wird zur Medulla oblongata umgestaltet
- Hinterhirn/Metencephalon, ventral Pons und dorsal Kleinhirn/Cerebellum

Mittelhirn/Mesencephalon

Vorderhirn/Prosencephalon mit

- Zwischenhirn/Diencephalon
- Endhirn/Telencephalon oder auch Großhirn/Cerebrum (König & Liebich, 1999)

Ontogenetisch betrachtet entwickelt sich das Nervengewebe aus dem äußeren Keimblatt (Ectoderm). Die Meningen, die bindegewebigen Hüllen der peripheren Nerven und Ganglien sowie die sekundär in das Nervengewebe einwachsenden Gefäße sind dagegen mesodermalen Ursprunges (mittleres Keimblatt). Das Nervengewebe besteht seinerseits aus den Nervenzellen und ihren Fortsätzen sowie den Neurogliazellen. Die Gliazellen

Literaturübersicht

haben Abgrenzungs- und Stoffwechselfunktionen und ersetzen so das im Gehirn nicht vorhandene interstitielle Bindegewebe. Die Glia besteht aus Ependymzellen, Astrozyten und Oligodendrozyten. Die drei Zelltypen sind in weit höherer Zahl vorhanden als die Nervenzellen (etwa zehnfach). Als weiteren nicht neuronalen Zelltyp können die zur Phagozytose befähigten und zum Teil beweglichen Zellen der sogenannten Mikroglia (Hortega-Zellen) angesprochen werden (Nickel *et al.*, 1992b; König & Liebich, 1999).

Nervenzellen (Neurone) sind hochspezialisierte Zellen, die ihre Teilungsfähigkeit größtenteils eingebüßt haben und nur über eine eng begrenzte Regenerationsfähigkeit verfügen. Nach neueren Forschungserkenntnissen sind jedoch Zellteilungen auch noch beim Erwachsenen, zum Beispiel im Hippokampus möglich. Dort befindliche Stammzellen können sich nach einer Verletzung des Gewebes unter der Wirkung von Wachstumsfaktoren in Astrozyten oder Oligodendrozyten umwandeln und zu einem kleinen Teil auch zu Neuronen entwickeln (Bambakidis *et al.*, 2005).

Die Neurone bilden durch verschiedene Fortsätze ein dichtes Geflecht. Der Zelleib mit dem Kern liegt in der grauen Substanz, der Substantia grisea, die mit einer Markscheide umgebenen Axone bilden die weiße Substanz (Substantia alba) (Nickel *et al.*, 1992b).

Umgeben werden das Gehirn und auch das Rückenmark von drei übereinanderliegenden Hüllen. Diese sogenannten Meningen sind bindegewebiger Herkunft. Die äußere Schicht wird durch die Dura mater, die harte Hirn- und Rückenmarkshaut gebildet. Darauf folgt die Leptomeninx, die weiche Gehirnhaut. Diese setzt sich aus der Arachnoidea und der Pia mater zusammen (Benninghoff & Goertler, 1960b; Nickel *et al.*, 1992b; Roche Lexikon Medizin, 1998).

Das Gehirn wird zusammen mit seinen Hüllen und seinen Blutgefäßen von den Knochen des Hirnschädels (Neurocranium) umgeben. Dieser beherbergt daneben auch die höheren Sinnensorgane und stellt die Fortsetzung der Wirbelsäule dar (Benninghoff & Goertler, 1960a). Das Neurocranium setzt sich aus mehreren miteinander verbundenen Knochen zusammen. Diese Zusammensetzung aus mehreren Komponenten trägt während der Wachstums- und Entwicklungsphase zur nötigen Elastizität bei. Die am Schädelknochen deutlich sichtbaren Knochennähte sind ein Hinweis auf diese Entwicklung. Die verschiedenen Knochen des Hirnschädels (Ossa cranii) formen die Begrenzungen der Schädelhöhle, Cavum cranii (Benninghoff & Goertler, 1960a). Sie wird durch das häutige Hirnzelt (Tentorium cerebelli membranaceum, Duraduplikatur) in eine große und eine kleine Abteilung unterteilt. In der großen Abteilung ist das Großhirn untergebracht, in der kleinen das Rautenhirn (Benninghoff & Goertler, 1960a; Nickel *et al.*, 1992a).

Literaturübersicht

Das Gehirngewicht beträgt nur etwa zwei Prozent an der gesamten Körpermasse eines Menschen. Da das Gehirn aber eine zentrale Rolle als übergeordnetes Integrations-, Koordinations- und Regulationsorgan erfüllt, erhält es zirka 13% des Herzzeitvolumens. Es deckt seinen Energiebedarf fast ausschließlich durch oxidative Phosphorylierung und reagiert deshalb gegenüber einem Sauerstoffmangel besonders empfindlich. Neurone sind die gegenüber einer Hypoxie sensitivste Zellpopulation. Aus diesem Grund verbraucht das Gehirn etwa 21% des Gesamtsauerstoffverbrauches des Körpers (Silbernagl & Despopoulos, 2001; Bickler & Donohoe, 2002). Sauerstoff sowie dringend benötigte Nährstoffe gelangen über große Arterien, die paarig angelegte Arteria carotis interna und die ebenso auf jeder Seite vorhandene Arteria vertebralis, zum Gehirn (Benninghoff & Goerttler, 1960b; Trepel, 1995). Erst dann verzweigen sich die Gefäße. Innerhalb des subarachnoidalen Raums liegt der Circulus arteriosus cerebri, der von den zur Arteria basilaris vereinigten Arteriae vertebrales und den Carotisarterien gebildet wird (Benninghoff & Goerttler, 1960b; Nickel *et al.*, 1996). Der sie umspülende Liquor cerebrospinalis bildet ein Druckpolster, das für die Regulation des Hirnperfusiondruckes von Bedeutung ist. Dieser wird zur Versorgung des Hirngewebes auf einem konstanten, hohen Niveau gehalten (Benninghoff & Goerttler, 1960b; Trepel, 1995; König & Liebich, 1999). Die Venen folgen in ihrem Verlauf nicht, wie in anderen Organen üblich, den Arterien. Die dünnwandigen und klappenlosen Gefäße sind auch aufgrund einer fehlenden oder nur schwach ausgebildeten Muscularis nicht aktiv an der Abflussregulation beteiligt. Eine Besonderheit des Gehirnes sind die Sinus durae matris, die Hauptabflussleiter (Benninghoff & Goerttler, 1960b; König & Liebich, 1999). Dabei handelt es sich um in die Dura eingelassene Abflusskanäle für das venöse Blut. Sie bestehen aus einer Intima mit vereinzelt Muskelfasern, haben aber sonst keine selbständige Wand. Das Blut der Sinus fließt zum Foramen jugulare auf der jeweiligen Schädelseite und wird dort vom Bulbus venae jugularis superioris aufgenommen. Dieser dient durch Drosselung des Blutstroms zur Konstanterhaltung der Blutmenge innerhalb des Gehirnes (Benninghoff & Goerttler, 1960b). Blutdruck und Blutmenge sind so sehr eng einreguliert. Würde der Hirndruck den Kapillardruck übersteigen, käme es zu einem Kreislaufstillstand im Gehirn. Zur Aufrechterhaltung der physiologischen Verhältnisse steigt der arterielle Blutdruck deshalb reflektorisch, wenn der Schädelinnendruck ansteigt. Dadurch wird das Druckgefälle zu den komprimierten Venen wiederhergestellt. Die Pulsfrequenz wird zeitgleich verlangsamt (Benninghoff & Goerttler, 1960b). Das

venöse Blut aus den Sinus wird über die Vena jugularis interna in die obere Hohlvene und darüber zum Herzen abgeleitet (Trepel, 1995).

4.1.2 Hippokampus

Der Hippokampus hat eine zentrale Funktion innerhalb des limbischen Systems. Dieses setzt sich aus funktionell miteinander in Verbindung stehender Gehirnregionen zusammen und stellt die „Emotionslokalisierung“ im Gehirn dar (Trepel, 1995). Der Hippokampus ist aber auch an der Gedächtnisbildung beteiligt (Nickel *et al.*, 1992b). Zur Hippokampusformation gehören der Hippokampus oder das Ammonshorn (Cornu ammonis), der Gyrus parahippocampalis, der Gyrus dentatus, die Fimbria hippocampi und der Fornix (Nickel *et al.*, 1992b). Sie wird von dem inneren Bogen des entstehungsgeschichtlich alten Archipallium gebildet (Benninghoff & Goertler, 1960b; Trepel, 1995). Man findet den Hippokampus am Boden des Unterhorns des Seitenventrikels im Gehirn (Nickel *et al.*, 1992b). Durch die eingerollte Archikortexstruktur bildet der Hippokampus im Querschnitt die Struktur des Ammonshorns. Zur Orientierung teilt man das Cornu ammonis in die Felder CA1 bis CA4 ein (Trepel, 1995). Der Gyrus dentatus gilt als besonders empfindlich gegenüber traumatischen Einflüssen und ist für die hier vorgestellte Untersuchung deshalb von besonderem Interesse (Santhakumar *et al.*, 2000).

4.2 Pathophysiologie des Schädelhirntraumas

Bei einem Schädelhirntrauma handelt es sich um eine kombinierte Verletzung von Epicranium (Haut, Unterhaut und Galea aponeurotica, der Sehnenplatte des Kopfes), Schädelknochen und Hirn. Die äußere Abdeckung kann jedoch intakt sein. Man unterscheidet ein offenes und ein gedecktes Schädelhirntrauma. Eine verletzte Dura mit Austritt von Liquor und/oder Hirnsubstanz gilt als Kriterium für ein offenes Schädelhirntrauma. Die gedeckte Form mit intakter Dura wird auch als stumpfes Trauma bezeichnet (Moskopp & Wassmann, 2005). Zur Beurteilung des Schweregrads wird unter anderem die Glasgow Coma Scale verwendet. Dieses Punkteschema zieht mehrere Kriterien heran, dazu gehören die Fähigkeit der Verletzten, die Augen zu öffnen, verbale

Literaturübersicht

Reaktion auf Ansprache und motorische Reaktion (Teasdale & Jennett, 1974; Teasdale & Jennett, 1976; Moskopp & Wassmann, 2005).

Tabelle 1: Glasgow Coma Scale, modifiziert nach Roche Lexikon Medizin (Roche Lexikon Medizin, 1998)

Die Punktzahl für den jeweiligen Patienten ergibt sich durch Addition. Eine Gesamtpunktzahl von weniger als 8 Punkten spricht für eine schwerwiegende Beeinträchtigung.

Augenöffnen		
Spontan	4 Punkte	zusätzlich Beurteilung der Pupillengröße und ihrer Form
auf Aufruf	3 Punkte	
auf Schmerz	2 Punkte	
auf Schmerz nicht	1 Punkt	
Beste motorische Antwort		
auf Aufforderung	6 Punkte	
auf Schmerz gezielt	5 Punkte	
auf Schmerz ungezielt	4 Punkte	
Beugesynergismen	3 Punkte	
Strecksynergismen	2 Punkte	
keine Schmerzabwehr	1 Punkt	
Verbale Antwort		
koordiniertes Gespräch	5 Punkte	zusätzlich Beurteilung der Reaktion nach ihrem einsetzen
unkoordiniertes Gespräch	4 Punkte	
einzelne Worte	3 Punkte	
unverständliche Laute	2 Punkte	
keine Antwort	1 Punkt	

Das Schädelhirntrauma entsteht durch starke Beschleunigung oder Entschleunigung des Gehirns im knöchernen Schädel. Ursache sind meist Autounfälle, Stürze aus großer Höhe oder Schläge auf den Kopf. Sportunfälle und Unfälle im Rahmen militärischer Einsätze spielen in letzter Zeit zunehmend auch eine Rolle. Penetrierende Verletzungen sind seltener und in der Regel schwerer. Dabei handelt es sich meist um Schussverletzungen

Literaturübersicht

mit hoher Mortalität (Dutton & McCunn, 2003). Zu den primären Verletzungen kommt es während des Traumas, dazu gehören Gewebszerreißen, Quetschungen, Scherverletzungen und Dehnung von Axonen sowie Veränderungen an den Gefäßen. Damit sind subdurale Hämatome, ein verminderter Blutfluss aufgrund eines Anstiegs des intrakraniellen Druckes und Gefäßinfarzierungen gemeint (Helmy *et al.*, 2007). Dem primären Trauma folgen in der Regel weitere Veränderungen, die sich aufgrund der durch die primäre Schädigung entstandenen Verletzungen entwickeln. Diese sekundären Schädigungen manifestieren sich erst nach Stunden oder Tagen (Yakovlev *et al.*, 1997; Cernak *et al.*, 2004). Dazu gehören zum Beispiel eine Beeinträchtigung des zerebralen Blutflusses und eine dadurch bedingte Störung des Sauerstofftransports und Gehirnstoffwechsels. Die ablaufende Kaskade pathobiochemischer Prozesse wird als Sekundärtrauma bezeichnet. Dieses wirkt über den Zeitraum des eigentlichen Traumas hinaus fort und kann bleibende neurologische Defizite zur Folge haben (Foda & Marmarou, 1994; Cernak *et al.*, 2004).

Durch Minderversorgung der neuronalen Zellen kann es sowohl zu ischämisch-nekrotischem als auch apoptotischem Zelltod kommen. Gehirnzellen haben aufgrund ihrer Funktion einen hohen Bedarf an Sauerstoff und Glukose und sind in ihrer Energiegewinnung auf die oxidative Phosphorylierung angewiesen. Die anaerobe Energieproduktion (Glykolyse) kann mit dem Bedarf der Neurone nicht Schritt halten und führt außerdem zu einer intrazellulären Azidose. Diese pH-Wertänderung in den Neuronen schädigt die Zellen zusätzlich (Fukuda & Warner, 2007). Energie wird unter anderem benötigt, um Ionengradienten für die Signaltransduktion aufrechtzuerhalten. Energiemangel verursacht den Verlust des Membranpotentials und damit die Depolarisierung sowohl von Neuronen als auch von Gliazellen (Dirnagl *et al.*, 1999; Bickler & Donohoe, 2002; Chen & Lipton, 2006). Dadurch kommt es zur Aktivierung dendritischer und praesynaptischer spannungsabhängiger Kalziumkanäle (Ca^{2+} -Kanäle) sowie zur Freisetzung exzitatorisch wirksamer Aminosäuren (Glutamat, Aspartat) in den synaptischen Spalt. Eine Wiederaufnahme der Aminosäuren in die Synapsen ist aufgrund des Energiemangels nicht oder nur eingeschränkt möglich. Darüber hinaus führt das Einströmen von Natriumionen in die Zelle zum Erliegen des Natrium-Glutamat-Kotransporters. Dies wiederum verursacht eine Akkumulation von Glutamat im extrazellulären Raum (Dirnagl *et al.*, 1999; Bickler & Donohoe, 2002). Glutamat als starker exzitatorischer Neurotransmitter sorgt für eine Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren. Von besonderer Bedeutung in diesem Zusammenhang sind sogenannte

Literaturübersicht

N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren) (Chen & Huang, 1991; Beer *et al.*, 2000; Chen & Lipton, 2006). Diese sind maßgeblich für den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zellen und exzitatorische Schäden verantwortlich (Bath *et al.*, 1996; Charriaut-Marlangue *et al.*, 1996; Ruscher *et al.*, 1998; Dirnagl *et al.*, 1999; Bickler & Donohoe, 2002). Zu den Schäden nach exzitatorischer Aktivierung gehören ein Einstrom von Natrium- und Chlorid-Ionen sowie das passive Nachströmen von Wasser in die Zellen. Daraus resultierende Zellödeme führen einerseits zum Tod der betroffenen Zelle, andererseits behindern sie den Stoffwechsel benachbarter Zellen. Die Minderversorgung dieser Zellen führt wieder zu den oben beschriebenen Prozessen, so dass eine Kaskade in Gang gesetzt wird. Blutgefäße können durch solche ödematösen Bereiche komprimiert werden, der intrakranielle Druck kann ansteigen.

Kalzium-Ionen wirken intrazellulär als sekundäre Botenstoffe (second messenger) und aktivieren proteolytische Enzyme, die Proteine des Zytoskeletts und extrazelluläre Matrixproteine abbauen (Lipton & Nicotera, 1998; Dirnagl *et al.*, 1999; Bickler & Donohoe, 2002). Über die Aktivierung von Phospholipase A_2 und Cyclooxygenase kommt es zur Entstehung von freien Radikalen, die Fette oxidieren und die Membran (Lipoperoxidation) angreifen können (Dirnagl *et al.*, 1999; Chen & Lipton, 2006). Freie Radikale können aber auch Cyclooxygenase-unabhängig entstehen und den gleichen Mechanismus in Gang setzen (Hoffman *et al.*, 1997; Lipton & Nicotera, 1998; Gupta *et al.*, 2007). Dadurch wird wiederum die Aktivität der Phospholipase A_2 gesteigert und damit weitere Arachidonsäure aus membrangebundenen Phospholipiden freigesetzt. Das Enzym Cyclooxygenase vermittelt die weitere Prostaglandinsynthese (Balboa & Balsinde, 2006). Die Geschwindigkeit des entstehenden Kreislaufs wird weiter gesteigert, die lokalen Entzündungserscheinungen schreiten in ihrem Ausmaß fort. Freie Radikale dienen damit auch als Signalmoleküle für die Entwicklung von Entzündungsreaktionen und spielen am Beginn der Apoptosekaskade eine Rolle (Chen & Lipton, 2006). Durch freie Radikale werden auch die Mitochondrien beschädigt, wodurch es zur Freisetzung von Cytochrom C (Teil der Atmungskette) kommt. Dieses spielt seinerseits in der Initiierung der Apoptose eine Rolle (Dirnagl *et al.*, 1999). Außer den bereits beschriebenen lokalen Reaktionen treten auch systemische Entzündungsreaktionen auf. Dabei sind sowohl neuronenspezifische (S-100 β) als auch systemische Entzündungsmarker (Interleukin-6 und Interleukin-8) nachweisbar (Dutton & McCunn, 2003). Der Subtyp S-100 β gilt dabei als spezifisch für verschiedene Zellen des zentralen Nervensystems. Eine Erhöhung von S-100 β im Blutserum weist deshalb auf eine

Literaturübersicht

Störung der Blut-Hirn-Schrankenfunktion hin. Der zeitliche Verlauf der S-100 β -Serumkonzentration lässt Rückschlüsse auf die Schwere eines Traumas zu und kann zur Abschätzung der Prognose herangezogen werden (Wunderlich *et al.*, 1999; Fries *et al.*, 2004).

Die Diagnose eines Schädelhirntraumas ist abhängig von der neurologischen Untersuchung und Informationen, die bildgebende Verfahren liefern. Eine Computertomographie kann Hinweise auf Blutungen und Infarkte, Mittellinienverschiebung, subkortikale Kontusionen und bilaterale Verletzungen liefern. Diffuse axonale Verletzungen sind frühzeitig mit Hilfe einer Magnetresonanztomographie nachzuweisen, diese Untersuchungen sind jedoch aufwendig (Dutton & McCunn, 2003). Durch eine Computertomographie dagegen kann ein diffuses axonales Trauma trotz ausgedehnter Hirnschäden nicht immer nachgewiesen werden (Foda & Marmarou, 1994).

Der primäre Schaden ist irreversibel, das Gewebe um diese letal geschädigten Zellen, die sogenannte Penumbra, ist aber möglicherweise noch zu retten. Das Fortschreiten der schädigenden Mechanismen muss aufgehalten werden (Dirnagl *et al.*, 1999). Nach einer traumatischen Schädelhirnverletzung müssen protektive Maßnahmen zum Schutz dieser Zellen ergriffen werden. Ziel muss es sein, das Leben von Schwerverletzten zu retten beziehungsweise deren Lebensqualität zu verbessern. An diesem Punkt setzt die hier vorgelegte Arbeit an.

4.3 Der Zelltod: Apoptose und Nekrose

Der Zelltod neuronaler Zellen kann durch verschiedene Mechanismen eintreten. Man unterscheidet zwei morphologisch unterschiedliche Arten des Zelltodes, die Nekrose und die Apoptose. Dabei sind entweder aktive oder passive zelluläre Mechanismen beteiligt. Als Nekrose (griechisch: nekros = tot) wird das Erlöschen aller Zellfunktionen, also der Energiebildung und der Synthesefähigkeit, bezeichnet. Betrifft sie nur einzelne Zellen, spricht man von einer Zellnekrose. Mit Gruppennekrosen ist das Absterben zahlreicher Zellen in einem Gewebeverband gemeint und eine Massennekrose umfasst Gewebsverbände mit Parenchym und Stroma. Die Nekrose stellt als pathologische Form

die schwerste Folge einer örtlichen Stoffwechselstörung dar (Stünzi & Weiss, 1990). Der nekrotische Zelltod tritt zum Beispiel nach Verletzungen auf und wird von einer entzündlichen Reaktion begleitet (Charriaut-Marlangue *et al.*, 1996). Bei nekrotischen Zellen kommt es zu einem Verlust der strukturellen Integrität der Zellmembran. Darüber hinaus lassen sich Anzeichen für Schäden an den Organellen und einer Kernauflösung erkennen. Die betroffenen Zellen schwellen an und es kommt zur lytischen Zerstörung (Yakovlev *et al.*, 1997).

Der Begriff Apoptose (griechisch: herabfallen) wurde durch Kerr, Wyllie und Currie im Jahre 1972 definiert. Diese Form des Zelltodes wird aktiv durch die Zelle selbst ausgelöst (Kerr *et al.*, 1972; Stünzi & Weiss, 1990; Dahme & Weiss, 1999). Die Apoptose erlaubt einem mehrzelligen Organismus die enge Kontrolle der Zahl seiner Zellen und Größe des Gewebes sowie den Schutz vor entarteten Zellen (Hengartner, 2000). Sie spielt als genetisch vorprogrammierter Zelltod eine Rolle bei der Elimination unerwünschter Zellen während der Entwicklung und der physiologischen Regeneration, kann aber auch nach einem Schlaganfall oder im Zuge neurodegenerativer Erkrankungen auftreten (Kerr *et al.*, 1972; Chen & Lipton, 2006). Der apoptotische Zelltod kann nach einem Trauma durch die Aktivierung proapoptotischer Proteine gestartet werden und trägt damit zu einem Fortschreiten der Schädigung über das Ausmaß der Primärschädigung hinaus bei (Charriaut-Marlangue *et al.*, 1996; Beer *et al.*, 2000; Hengartner, 2000; Alessandri *et al.*, 2006).

4.3.1 Morphologische Veränderungen während des Zelltodes

Der Vorgang der Apoptose unterscheidet sich durch charakteristische morphologische und biochemische Besonderheiten deutlich von der Nekrose (Charriaut-Marlangue *et al.*, 1996). Zellen, in denen das genetisch festgelegte Programm der Apoptose abläuft, schrumpfen deutlich. Das Zytoplasma kondensiert, die Zellorganellen dagegen bleiben unverändert. Auch der Kern verändert sich durch Schrumpfung, das Chromatin verdichtet sich und zerfällt in Bruchstücke. Die DNS wird durch Ca^{2+} -/ Mg^{2+} -abhängige Endonukleasen in Fragmente aufgespalten. Diese lagern sich innen an der Membran des Zellkerns an. Die ganze Zelle zerfällt in dichte Körperchen, sogenannte apoptotic bodies. Diese werden durch Endozytose von benachbarte Zellen aufgenommen oder durch Gewebsmakrophagen entfernt. Bei dieser Form des Zelltodes tritt kein Zellinhalt aus, dadurch wird das Immunsystem nicht so ausgeprägt wie bei der Nekrose aktiviert

(Charriaut-Marlangue *et al.*, 1996; Yakovlev *et al.*, 1997; Thornberry & Lazebnik, 1998; Beer *et al.*, 2000). Nach einem Trauma treten die beschriebenen Veränderungen in den Zellen nicht direkt auf, sondern entwickeln sich erst mit der Zeit. Die Schwere und die Lokalisation der Verletzung spielen dabei ebenso eine Rolle wie die unterschiedliche Empfindlichkeit einzelner Zellpopulationen gegenüber einer Beeinträchtigung. Die bereits geschilderte Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (siehe Kapitel „Pathologie des Schädelhirntraumas“) führt zu einem intrazellulären Anstieg von Kalziumionen. Durch eine Aktivierung der Apoptosekaskade kann sich ein Schaden vom (nekrotischen) Kern der eigentlichen Verletzung weiter ausbreiten (Charriaut-Marlangue *et al.*, 1996; Chen & Lipton, 2006).

4.3.2 Caspasen

Ein wichtiger Bestandteil der Apoptose ist ein proteolytisch wirksames Enzymsystem. Dazu gehört die Familie der Caspasen, die Teil einer Kaskade ist und durch proapoptotische Faktoren aktiviert wird. Proteasen werden als inaktive Vorläuferenzyme synthetisiert. Die Bindung von Kofaktoren oder Entfernung von Inhibitoren löst die proteolytische Spaltung und damit ihre Aktivierung aus. Da die Proteolyse irreversibel ist, sind die Regulierungsmöglichkeiten auf die Kontrolle der Aktivierung und die Verfügbarkeit des entsprechenden Substrates beschränkt (Charriaut-Marlangue *et al.*, 1996; Yakovlev *et al.*, 1997; Thornberry & Lazebnik, 1998).

Caspasen sind während der Evolution hochkonservierte Proteasen, die sich in den verschiedensten Organismen finden (Hengartner, 2000). Ein für den Zelltod erforderliches Genprodukt (CED-3) der Nematode *Caenorhabditis elegans* ist mit dem bei Säugetieren vorkommenden Interleukin-1 β -converting Enzym (ICE oder Caspase-1) verwandt. Caspase-1 stellt damit den ersten bekannten Vertreter dieser inzwischen vierzehn Mitglieder umfassenden Proteasenfamilie dar. Von etwa zwei Drittel dieser Caspasen nimmt man heute an, dass sie an apoptotischen Vorgängen beteiligt sind (Hengartner, 2000). Alle Caspasen weisen Ähnlichkeiten in Bezug auf ihre Aminosäuresequenz, Struktur und Substratspezifität auf und liegen zunächst als Proenzyme vor (Charriaut-Marlangue *et al.*, 1996; Yakovlev *et al.*, 1997; Thornberry & Lazebnik, 1998; Beer *et al.*, 2000; Hengartner, 2000). Die Aktivierung kann vermutlich autokatalytisch oder in einer Kaskade mit anderen Enzymen ähnlicher Spezifität gestartet werden. Die Caspasen -3, -6 und -7, werden im Rahmen einer Kaskade aktiviert (Beer *et*

Literaturübersicht

al., 2000; Hengartner, 2000). Unter anderem ist aus den Mitochondrien freigesetztes Cytochrom C an dieser Kaskade beteiligt (Xu *et al.*, 2002). Nach der proteolytischen Spaltung lagern sich die Untereinheiten des Proteins zu einer Tertiärstruktur um, die einen Einfluss auf die Substraterkennung hat (Beer *et al.*, 2000; Hengartner, 2000). Die oben bereits beschriebenen Vorgänge einer apoptotisch zugrunde gehenden Zelle können sich innerhalb von 30 bis 60 Minuten abspielen (Thornberry & Lazebnik, 1998). Zu den Aufgaben der aktivierten Caspasen gehört dabei die Inaktivierung von Proteinen, die die Zelle vor dem apoptotischen Tod schützen sollen beziehungsweise die Aktivierung von weiteren abbauenden Proteinen. An der Regulation der Apoptose sind auch Bcl-2-Proteine beteiligt, welche die Freisetzung proapoptotischer Faktoren beeinflussen (Thornberry & Lazebnik, 1998; Hengartner, 2000). Zusammenfassend lassen sich die Funktionen der Caspasen im programmierten Zelltod wie folgt darstellen: Sie trennen Verbindungen zu benachbarten Zellen, gestalten das Zytoskelett neu, regulieren die DNS-Replikation und Reparatur herunter, unterbrechen die Reifung der RNS, zerstören die DNS, beschädigen die Kernstruktur, regen die Zelle zur Expressierung von Signalen an, die sie als zur Phagozytose vorgesehen kennzeichnen und spalten die Zelle in apoptotic bodies auf (Yakovlev *et al.*, 1997; Thornberry & Lazebnik, 1998; Hengartner, 2000). Ihr Aktivitätsmaximum erreichen Caspasen etwa 48 Stunden nach einem Trauma. Dabei konnte Caspase-3 in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten nachgewiesen werden, jedoch nicht in der Mikroglia (Beer *et al.*, 2000). Caspase-Vorläuferformen, also inaktive bzw. nur in geringem Umfang aktive Formen, sogenannte Procaspasen, werden in allen lebenden Zellen gebildet. Die Komplexität der Regulierungsmechanismen der Caspasen ist mit denen der Koagulation (Blutgerinnung) und des Komplementsystems zu vergleichen (Thornberry & Lazebnik, 1998; Hengartner, 2000). Die genaue Zusammenwirkung von proapoptotischen Signalen, Kofaktoren, Inhibitoren und Procaspasen ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Thornberry & Lazebnik, 1998; Hengartner, 2000).

Apoptotische Prozesse spielen im Rahmen verschiedener Erkrankungen eine Rolle. Dies lässt ein therapeutisches Eingreifen an diesem Punkt sinnvoll erscheinen. Exzessiver apoptotischer Zelltod wird für schwere Erkrankungen verantwortlich gemacht, dazu gehören neurodegenerative Krankheiten, Reperfusionsschäden, Transplantatabstoßungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen. Demgegenüber stehen tumorös entartete Zellen, bei denen es nicht mehr zum natürlichen Zelltod kommt. Bedingt durch die bedeutende Rolle, die Caspasen in diesem Zusammenhang zukommt,

Literaturübersicht

könnte die erfolgreiche Hemmung bzw. Aktivierung dieser Proteasen einen therapeutischen Fortschritt bedeuten. Dafür ist es aber unbedingt nötig, das Zusammenwirken der einzelnen Caspasen und gewebespezifischer Inhibitoren genau zu kennen. Zunächst scheint es daher realistischer zu sein, sich auf die Behandlung akuter Geschehen zu konzentrieren (Charriaut-Marlangue *et al.*, 1996; Thornberry & Lazebnik, 1998; Beer *et al.*, 2000; Hengartner, 2000). Man darf dabei jedoch nicht vergessen, dass es auch noch andere Formen des Zelltodes gibt, deren Mechanismen noch nicht aufgeklärt sind, beziehungsweise, bei denen Caspasen keine Rolle spielen (Hengartner, 2000).

**Tabelle 2: Gegenüberstellung der wichtigsten Merkmale von Nekrose und Apoptose
(Zusammenfassung aus dem Text)**

Nekrose	Apoptose
pathologische Form des Zelltodes	„physiologische“ Form des Zelltodes
Ausgelöst	genetisch vorprogrammiert, ausgelöst
nach Trauma, Schlaganfall usw.	während der Entwicklung und der Regeneration, nach Trauma, Schlaganfall usw.
entzündliche Reaktion (Phagozytose der Zelltrümmer)	keine ausgeprägte entzündliche Reaktion (Endozytose durch benachbarte Zellen)
Erlöschen der Zellfunktionen	Zellfunktionen ermöglichen erst den Zellabbau (Enzyme u. a.)
Verlust der strukturellen Integrität der Zellmembran	Integrität der Zellmembran bleibt erhalten (apoptotic bodies)
zum Teil Schädigung der Organellen	Organellen bleiben intakt
Kernauflösung	Kernschrumpfung und Fragmentierung der DNS
Schwellung der Zelle und lytische Zerstörung	Kondensation des Zytoplasmas und Schrumpfung der Zelle

4.4 Tiermodelle zur Erzeugung eines Schädelhirntraumas

4.4.1 Ansprüche an ein Tiermodell

Tierexperimentelle Traumamodelle werden zur Aufdeckung von primären und sekundären Folgen eines Kopftraumas beim Menschen eingesetzt. Zur Untersuchung verschiedener Therapiemethoden wurden zahlreiche Tiermodelle entwickelt, die jeweils nur einen Teilaspekt der tatsächlich vorkommenden Situation simulieren können. Die Wahl des Modells für eine wissenschaftliche Untersuchung erfolgt anhand des angestrebten Ziels und der zugrundegelegten Umstände. Kein einzelnes Modell vermag die Komplexität eines Schädelhirntraumas beim Menschen wiederzugeben, dennoch sind sie für das Verstehen der pathobiologischen Vorgänge unentbehrlich. Sie bieten die Möglichkeit zur Untersuchung verletzungsbedingter Veränderungen im Verhalten, der Physiologie, des Metabolismus, der Blut-Gewebe-Interaktion, der Blut-Hirn-Schranke sowie entzündlicher und immunmodulierter Reaktionen. Eine Schwierigkeit stellt die Entwicklung eines Traumamodells dar, dass diffuse axonale Verletzungen hervorruft (Cernak *et al.*, 2004; Cernak, 2005). Dies ist jedoch von besonderem Interesse für die Forschung, da ein diffuses axonales Trauma ein häufiges Merkmal bei einem vorliegenden Schädel-Hirn-Trauma darstellt.

Man kann vier überlappende Phasen bei einer traumatischen Schädel-Hirn-Verletzung unterscheiden. Dazu gehören die *primäre Verletzung*, das *Fortschreiten der primären Verletzung*, sowie *sekundäre oder zusätzliche Verletzung* und natürlich eine *Phase der Regeneration* (Cernak, 2005). Die komplexen Zusammenhänge dieser verschiedenen Phasen lassen sich an einem Tiermodell besser untersuchen als an einem *in vitro*-Modell. Das ausgewählte Modell sollte mehrere Voraussetzungen erfüllen: Die zur Auslösung der Verletzung genutzte mechanische Kraft muss kontrolliert, reproduzierbar und quantifizierbar sein. Die zugefügte Verletzung sollte ebenso reproduzierbar und quantifizierbar sein, sowie Teilaspekte einer beim Menschen vorkommenden Verletzung simulieren. Die Verletzungsfolgen, die durch morphologische, physiologische, biochemische oder Verhaltensparameter messbar sein sollen, müssen in Relation zu der die Verletzung auslösenden mechanischen Krafteinwirkung stehen. Der Grad der mechanischen Krafteinwirkung zur Auslösung der Verletzung sollte die Traumaschwere berechenbar, beziehungsweise voraussehbar machen (Cernak, 2005). In den meisten Modellen kommen Nagetiere wie Mäuse und Ratten zum Einsatz.

4.4.2 Beschreibung

Mechanische Krafteinwirkungen verursachen entweder ein dynamisches oder statisches Hirntrauma, abhängig von Amplitude, Dauer, Geschwindigkeit und Beschleunigung. Ein statisches Trauma wird zum Beispiel durch Druck über einen bestimmten Zeitraum mittels einer Pinzette auf einen Nerv erzeugt und soll hier für die weitere Betrachtung keine Rolle mehr spielen.

Dynamische Traumen lassen sich weiter unterteilen in direkte und indirekte Traumen. Bei indirekten dynamischen Hirnverletzungen wirkt eine mechanische Kraft auf den ganzen Körper ein, auch dieses Modell soll hier nur kurz ausgeführt werden. Direkte dynamische Hirnverletzungen lassen sich weiter unterteilen in Modelle mit Aufprall und Modelle ohne Aufprall aber mit Beschleunigung. Bei beiden Modelltypen kann noch weiter unterschieden werden, nämlich ob die Bewegung des Kopfes nur in einer Ebene oder eine freie Beweglichkeit möglich ist (Cernak, 2005).

4.4.2.1 Fluid Percussion Modell

Zu den am häufigsten benutzten Modellen vom Typ Hirnverletzung durch Aufprall mit penetrierender Verletzung beziehungsweise direkter Hirndeformation gehört das Fluid Percussion Modell. Zur Erzeugung der Verletzung lässt man einen Flüssigkeitsdruck bei intakter Dura auf das Gewebe einwirken. Die Traumaschwere ist abhängig von dem einwirkenden Druck. Der Hirnstamm wird kaum betroffen (Cernak, 2005).

4.4.2.2 Controlled Cortical Impact Modell

Das Controlled Cortical Impact Modell (CCI) stellt ein ebenfalls häufig eingesetztes Modell diesen Typs dar. Dieses Modell erlaubt eine genaue Kontrolle über die Geschwindigkeit des Einschlags und der Eindringtiefe in das Gewebe, die gemeinsam mit der Einwirkungsdauer die Traumaschwere bestimmen. Auf die intakte Dura wird nach der Eröffnung des Schädelknochens eine Hülse aufgesetzt, durch die ein Pressluft-getriebener Bolzen auf das Gehirn auftrifft. Das erzeugte Trauma ist genauer lokalisiert und komplexer als das beim Fluid Percussion Modell (Cernak, 2005). Andere Modelle diesen Typs sind die Anwendung eines Vakuumimpulses, Injektionen von zellzerstörenden Stoffen zur fortschreitenden Aushöhlung des Gehirnes, Anwendung von

Literaturübersicht

Saugkraft auf die intakte Dura, fokale Kryoläsionen und weitere Methoden. Sie dienen der Untersuchung einzelner Sachverhalte.

4.4.2.3 Perforierendes Modell

Zur Untersuchung von Schussverletzungen wurden Modellvarianten mit einem Hochgeschwindigkeitsgeschoss entwickelt, dabei wird der Schädelknochen perforiert. Der Schusskanal kann je nach Untersuchungsziel variieren. Die Schwere der Verletzung ist abhängig von der Energie mit der das Geschoss einwirkt (Cernak, 2005).

4.4.2.4 Controlled Concussion Modelle und Weight Drop Modell

Zur Erzeugung von diffusen axonalen Traumen wurden Modelle vom Typ Hirnverletzung durch Aufprall ohne penetrierende Verletzungen beziehungsweise mit geschlossener Schädeldecke entwickelt. Dazu gehören Controlled Concussion Modelle mit kontrollierter Erschütterung. Sie sollen die Verhältnisse bei einer Gehirnerschütterung und diffusen Traumen widerspiegeln. Die Reproduzierbarkeit ist nicht in dem gleichen Maße gegeben wie bei den bisher vorgestellten Modellen, ungewollte Schädelfrakturen können auftreten. Die histologischen Veränderungen sind meist auf den Hirnstamm beschränkt. Modellmodifikationen nutzen ein Pendel, das mit veränderbarem Gewicht und einstellbarem Winkel auf dem Kopf auftrifft (Cernak, 2005). Weiterhin zu diesem Typ von Traumamodell gehören Modelle mit eingeschränkter und uneingeschränkter Aufprall-Beschleunigung. Bei Modellen ohne Beschränkung wird die Beweglichkeit des Kopfes nur durch die physiologischen Verhältnisse eingeschränkt. Das erlaubt die Entstehung von Verletzungsmustern, die durch die Beschleunigung und Entschleunigung zum Beispiel bei Autounfällen auftreten. Ein großer Nachteil ist die mangelnde Reproduzierbarkeit aufgrund der hohen Variabilität. Besser geeignet für Laboruntersuchungen erscheinen deshalb Modelle, bei denen die Kopfbewegung eingeschränkt wird. Zu dieser Variante zählt das Weight Drop Modell nach Marmarou (Marmarou *et al.*, 1994; Foda & Marmarou, 1994; Cernak, 2005). Bei diesem werden aus einer veränderbaren Höhe Gewichte durch ein Plexiglasrohr auf den Kopf eines darunter positionierten Tieres fallen gelassen. Zur Vermeidung von Komplikationen durch Schädelfrakturen wird auf den Schädelknochen ein Schutzhelm aufgeklebt. Die Bewegung des Kopfes wird durch Lagerung auf einer Schaumstoffunterlage eingeschränkt, bleibt aber in einem gewissen Umfang möglich.

Literaturübersicht

Die Traumaschwere ist abhängig vom Gewicht und der Höhe aus der es herabfällt und kann je nach Untersuchungsziel variiert werden. Eine Fallhöhe von einem Meter und ein Gewicht von 450 Gramm haben sich als geeignet zur Erzeugung eines mittelschweren Schädelhirntraumas erwiesen (Marmarou *et al.*, 1994). Die Mortalitätsrate unter den Versuchstieren lässt sich durch mechanische Beatmung senken. Auf Zellebene lassen sich sowohl nekrotischer als auch apoptotischer Zelltod induzieren (Foda & Marmarou, 1994; Marmarou *et al.*, 1994; Cernak, 2005). Zu den Vorteilen dieses Modells gehört auch sein relativ einfacher Aufbau. Dieser ermöglicht einen vergleichsweise preiswerten Nachbau in einer universitätseigenen Werkstatt. Ein großer Nachteil ist eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit bedingt durch die Lagerung der Versuchstiere auf einer Schaumstoffunterlage und einer minimalen Bewegung des Gewichtes während der Fallzeit durch das Rohr. Diese kann zu einer Ungleichverteilung der Aufprallenergie führen. Zudem besteht die Gefahr eines zweiten Aufpralls des Gewichtes, nachdem es von dem Schutzhelm abgeprallt ist. Als Weiterentwicklung bietet sich ein pressluftgetriebener Bolzenschussapparat an. Der Bolzen hat den gleichen Durchmesser wie der Schutzhelm. Der Kopf des Tieres wird auf einer gelgefüllten Unterlage gelagert (Cernak, 2005). Die Strecke, die der Bolzen nach dem Kontakt mit dem Schutzhelm weiter vordringt, bestimmt die Intensität des Traumas. Die Geschwindigkeit des Aufschlags und die Kontaktdauer können genau eingestellt und kontrolliert werden. Diese Modellvariation stellt deshalb eine Kombination aus den Techniken und Vorteilen des CCI-Modells und des Weight Drop Modells dar (Cernak, 2005).

4.4.2.5 Rotationsmodell

Die Bewegung des Gehirnes im Schädel stellt bei einem Schädelhirntrauma einen großen Teil der Ursache der Gewebeschädigung dar. Deshalb wurden auch Modelle entwickelt, bei denen kein Aufprall, sondern nur eine Beschleunigung stattfindet. Dabei wird eine Rotationsbewegung entweder koronar oder axial ausgeführt werden. Die Beschleunigungsphase und Entschleunigungsphase folgen aufeinander. Der Kopf kann sich entweder frei oder nur eingeschränkt bewegen. In diesem Modell ist die kinetische Energie bestimmend für die Traumaschwere (Cernak, 2005).

4.4.2.6 Modell mit Unter- und Überdruck

Indirekte dynamische Hirnverletzungen entstehen durch starke Druckwellen, wie sie zum Beispiel bei Explosionen auftreten. Modelle in denen Unter- und Überdruck auf den Kopf von Versuchstieren einwirken wurden hierfür entwickelt. Die Dauer der Druckeinwirkung kann variiert werden (Cernak, 2005).

4.4.2.7 Kombinationsmodelle

Traumatische Hirnverletzungen werden meist von Hypoxie, Ischämie, Hypovolämie und Hypotension begleitet. Die Auswirkungen des Schädelhirntraumas werden dadurch verschlimmert. Um die natürlichen Verhältnisse möglichst genau unter Laborbedingungen nachstellen zu können, sind Kombinationsmodelle entwickelt worden. Dabei werden ein Fluid Percussion Modell, ein Controlled Cortical Impact Modell oder ein Aufprall-Beschleunigungsmodell anschließend an die Traumainduktion mit einer hypoxischen Phase kombiniert. Alternativ kann auch eine Kombination des Traumas mit einer Phase der Hypovolämie bzw. Hypotension durchgeführt werden (Cernak, 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keines der genannten Modelle die natürlich vorkommenden Bedingungen mit allen ihren Facetten widerspiegeln kann. Dennoch lassen sich Auswirkungen auf den gesamten Organismus nur im Tierversuch untersuchen. Die Wahl des Modells muss sich an dem Untersuchungsziel orientieren und ist für die Ergebnisse entscheidend.

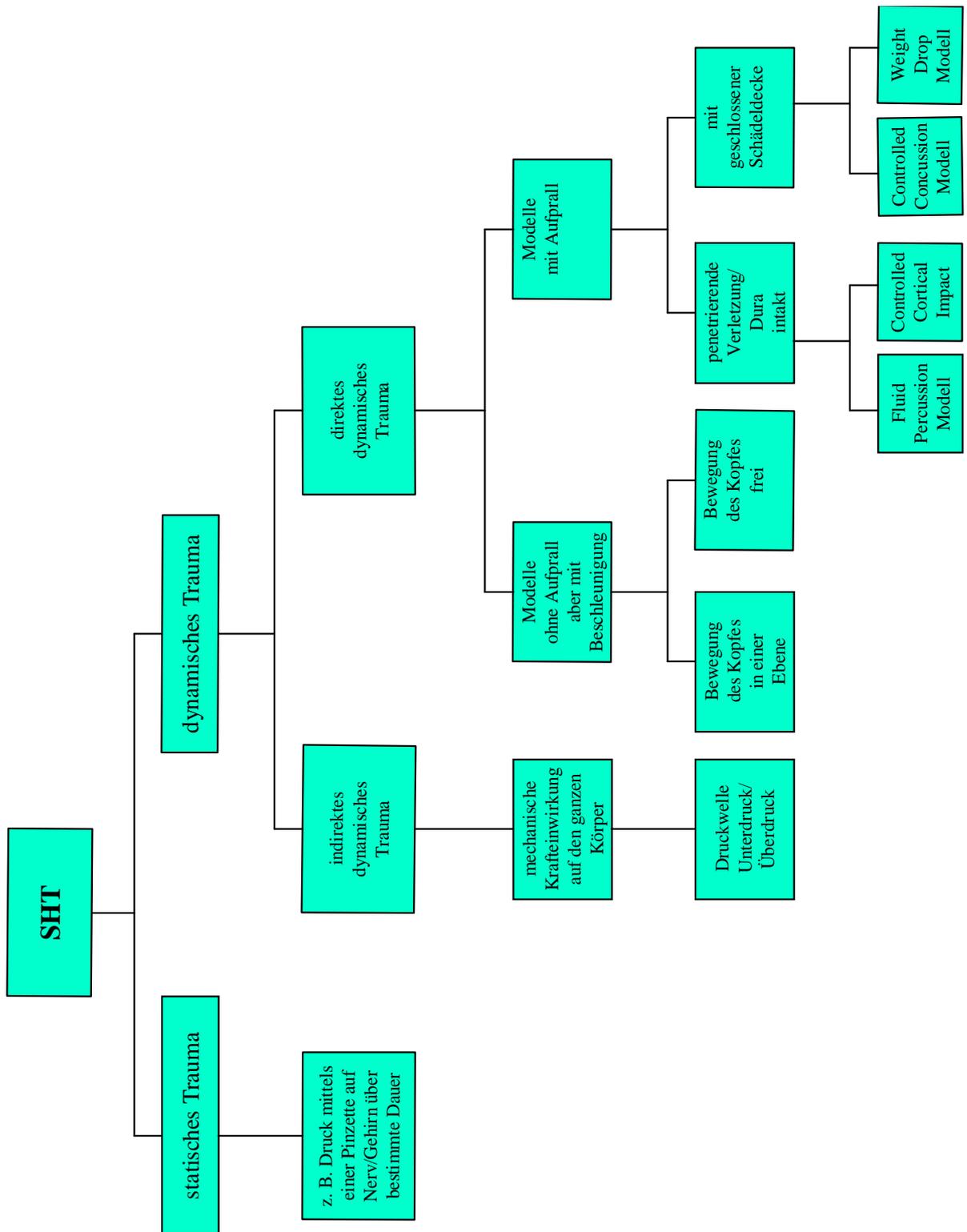


Abbildung: 2 Vereinfachte Übersicht der vorgestellten Tiermodelle

4.5 Neuroprotektion

Neuroprotektive Maßnahmen haben das Ziel, neuronale Zellen während und nach einer potentiellen Schädigung zu schützen. Vor allem die Zellen der sogenannten Penumbra (siehe Kapitel „Pathophysiologie des Schädelhirntraumas“) sollen in möglichst großer Zahl erhalten werden. Dazu sind eine Optimierung der Versorgung dieser Zellen sowie der Schutz vor sekundären Schäden, wie sie unter anderem durch die oben beschriebene Kaskade der Apoptose entstehen, von herausragender Bedeutung. Verschiedenen Forschungsergebnisse haben zeigen können, dass ein Fortschreiten der Schädigung aufgehalten werden kann. In tierexperimentellen Untersuchungen zum Schädelhirntrauma beziehungsweise ischämischen Schlaganfall haben zum Beispiel N-Methyl-D-Aspartat-Antagonisten (NMDA), die Glutamat-Rezeptoren blockieren, einen neuroprotektiven Effekt gezeigt. Die sogenannten NMDA-Rezeptoren kontrollieren einen Ionenkanal, der für Kalzium-, Natrium- und Kaliumionen permeabel ist (Alessandri & Bullock, 1998; Royo *et al.*, 2003; Celik *et al.*, 2006). Jedoch konnte dieser Erfolg in Studien am Menschen nicht nachvollzogen werden (Morris *et al.*, 1999; Narayan *et al.*, 2002). Auftretende Nebenwirkungen oder nicht ausreichende Wirkstoffkonzentrationen im Zielgewebe kommen als mögliche Ursache dieser Ergebnisse in Frage. Andere erfolgreich im Labor getestete NMDA-Antagonisten, zum Beispiel der die Blut-Hirn-Schranke leicht passierende Wirkstoff MK-801 (Dizolcipine), haben sich als zu neurotoxisch erwiesen, um in klinischen Studien eingesetzt zu werden (Fix *et al.*, 1993; Lockwood *et al.*, 2006). In experimentellen Studien konnte auch bei verschiedenen Anästhetika eine neuroprotektive Wirkung beobachtet werden. Barbiturate beispielsweise senken die elektrische Aktivität des Gehirnes mit der Folge eines reduzierten Energie- und Sauerstoffverbrauchs. Die positiven Effekte beobachtet man jedoch zum Teil nur dann, wenn diese Medikamente vor beziehungsweise während der Schädigung verabreicht werden, wie es bei Operationen der Fall ist. Zudem werden hohe Dosen benötigt, um die gewünschte Wirkung zu erreichen. Im Falle einiger Anästhetika wird dadurch aber die Narkosedauer unnötig verlängert (Fukuda & Warner, 2007). Darüber hinaus können Anästhetika noch an anderen Punkten ansetzen und nicht nur die metabolische Aktivität herabsetzen. Beispielsweise können sie als NMDA- oder AMPA-Rezeptor-Antagonisten (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propionsäure) wirken oder aber als Verstärker der inhibitorischen

GABA_A-Rezeptor-Aktivität (γ -Aminobuttersäure; dabei handelt es sich um Liganden-gesteuerte Chloridionen-Kanäle) und anderer Ionenkanäle.

Neben der Herabsetzung der synaptischen Aktivität wirkt Propofol möglicherweise als Radikalfänger und so auch entzündungshemmend. Das Lokalanästhetikum und Antiarrhythmikum Lidocain kann durch Inhibition der Apoptose schon in einer geringen Dosierung neuroprotektiv wirken (Koerner & Brambrink, 2006; Fukuda & Warner, 2007). Volatile Anästhetika entfalten ihre neuroprotektive Wirkung ebenfalls in klinisch relevanter Dosierung. Zu den wichtigsten Vertretern dieser Gruppe gehören Isofluran und Sevofluran. Sie wirken hemmend auf exzitatorische neuronale Signalübertragung und potenzierend an inhibitorischen Rezeptoren. Volatile Anästhetika öffnen daneben Hintergrundkaliumkanäle (zum Beispiel TREK, siehe Kapitel „Die Wirkungsweise von Xenon“) und führen so eine geringere Erregbarkeit durch Hyperpolarisierung der Zelle herbei (Fukuda & Warner, 2007). Des Weiteren können sie möglicherweise auch die Genexpression der Zellen beeinflussen oder als Radikalfänger fungieren. Der protektive Effekt von Isofluran ist jedoch nur vorübergehend und lässt den Schluss zu, dass dieses Anästhetikum nur eine verzögernde Wirkung auf später auftretende Mechanismen, wie die Apoptose, hat. Letztendlich kann Isofluran diese Veränderungen aber nicht verhindern. Ähnliches gilt für Ketamin, das auch über NMDA-Rezeptoren wirkt, in Langzeitvergleichen mit anderen Anästhetika aber keinen Vorteil bietet (Koerner & Brambrink, 2006). Trotz ihres neuroprotektiven Potentials haben auch Anästhetika neurotoxische Wirkungen. Besonders sehr junge und alte Patienten sind gefährdet. So wird für NMDA-Antagonisten eine Störung der Synapsenentwicklung beziehungsweise die Auslösung des apoptotischen Zelltodes vermutet (Koerner & Brambrink, 2006; Ma *et al.*, 2007; Fukuda & Warner, 2007). Zu beachten sind auch unerwünschte Wirkungen von gasförmigen Anästhetika, die nicht nur bei Patienten zu beobachten sind, sondern auch beim medizinischen Personal auftreten können (Vaisman, 1967; Cohen *et al.*, 1971; Larsen, 2006). Lachgas spielt darüber hinaus auch als Treibhausgas eine Rolle (Spence, 1987; Dingley *et al.*, 1999).

4.5.1 Xenon

In der hier vorgestellten Studie soll Xenon auf mögliche neuroprotektiven Eigenschaften nach einem Schädelhirntrauma untersucht werden. Anders als bei bisher untersuchten potentiellen Neuroprotektiva konnten in vorangegangenen Untersuchungen keine

Literaturübersicht

neurotoxische Effekte, sondern im Gegenteil neuroprotektive Effekte nachgewiesen werden (Wilhelm *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2002; Lockwood *et al.*, 2006).

Xenon (Xe) mit der Ordnungszahl 54 im Periodensystem gehört zu den Edelgasen und hat einen Anteil von 9×10^{-6} Volumen-Prozent (0,00000875%) in der Luft. Es wurde bereits 1898 durch W. Ramsay und W. M. Travers entdeckt. Man gewinnt es neben anderen Edelgasen durch fraktionierte Destillation verflüssigter Luft. Das Gas ist farb- und geruchlos und extrem reaktionsträge. Als völlig inert, kann es jedoch nicht mehr bezeichnet werden, da es zum Beispiel mit Fluor verbunden werden kann. Verbindungen mit Sauerstoff (Xenontrioxid, XeO_3) sind sogar explosiv (Brockhaus Enzyklopädie, 1974). Bisher konnte nicht nachgewiesen werden, ob das Gas kovalente Bindungen eingehen kann. Xenon findet bisher vor allem in der Technik Verwendung, zum Beispiel in Lasern, besonders hellen Glüh- und Scheinwerferbirnen, der Raumfahrt und in Röntgenröhren. In der Medizin findet es Anwendung sowohl in der Bildgebung (als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie und als radioaktiv markiertes Isotop in der Lungenzintigrafie) als auch aufgrund seiner anästhetischen und analgetischen Eigenschaften. Der hohe Preis des Gases wird durch seine aufwendige und teure Gewinnung erklärt und ist der Grund für den bisher seltenen Einsatz von Xenon im medizinischen Bereich (Brockhaus Enzyklopädie, 1974; Dingley *et al.*, 1999; Mortimer, 2000; Reyle-Hahn & Rossaint, 2000d; Bedi *et al.*, 2003).

Die Anwendung von Anästhetika bergen immer Risiken. Bei intravenös zu verabreichenden Mitteln, wie zum Beispiel Propofol, Fentanyl oder Midazolam, besteht zum Beispiel immer die Gefahr der Akkumulation. Als Alternative bieten sich gasförmige Anästhetika an. Diese können zum überwiegenden Teil über die Atmung aus dem Körper eliminiert werden. Ein Beispiel hierfür ist Isofluran, ein halogenierter Ether, das jedoch wie Halothan ein Auslöser der malignen Hyperthermie sein kann (Baur *et al.*, 2000; Bedi *et al.*, 2003). Lachgas (N_2O) wird häufig als Trägergas für andere volatile Anästhetika eingesetzt und soll deren Wirkung verstärken (Erhardt *et al.*, 2004). Es ist jedoch ein potentes Treibhausgas, das den pulmonalen Widerstand erhöht und möglicherweise toxische Effekte im Körper hervorruft (Amess *et al.*, 1978; Layzer, 1978; Spence, 1987). Zudem diffundiert es frei in gasgefüllte Räume. Als weitere Alternative kommt Xenon in Betracht. Aufgrund seiner Eigenschaften als (fast) inertes Gas weist es nur minimale Nebenwirkungen auf und hat sich als nahezu ideales Narkosegas bewiesen (Lawrence *et al.*, 1946; Dingley *et al.*, 1999; Nakata *et al.*, 2001; Bedi *et al.*, 2003; Homi *et al.*, 2003). Xenon überwindet als apolares Molekül die Blut-

Literaturübersicht

Hirn-Schranke problemlos und wirkt dort narkotisch. Diese anästhetische Wirkung von Xenon ist schon seit über 50 Jahren bekannt. Für das Edelgas wurde beim Menschen ein MAC-Wert von 71% ermittelt (Lawrence *et al.*, 1946; Cullen & Gross, 1951). Der MAC-Wert bezeichnet die minimale alveoläre Konzentration (MAC), die nötig ist, damit 50% aller Patienten auf eine Hautinzision keine Abwehrreaktionen mehr zeigen. Dieser Wert stellt ein Maß für die Wirkstärke eines Inhalationsanästhetikums dar. Ein niedriger MAC-Wert bedeutet eine große Potenz (Erhardt *et al.*, 2004). In der Vergangenheit wurde Xenon bereits beim Menschen als Anästhetikum getestet und ohne Probleme eingesetzt. Es wurde im Rahmen verschiedener Operationen verwendet, darunter auch bei einer Sectio cesarea (Morris *et al.*, 1955; Marshall *et al.*, 1998; Dingley *et al.*, 1999; Sanders *et al.*, 2003).

Bei der Einleitung einer Narkose mit einem Gemisch aus 70% Xenon und 30% Sauerstoff können vier Stadien beobachtet werden. Auf eine Phase mit Parästhesien und Hypalgesie am ganzen Körper folgt eine euphorische Phase. Die dritte Phase umfasst die Analgesie und eine partielle Amnesie. Dieses Stadium ist nach etwa drei bis vier Minuten erreicht. Die vierte Phase ist die der chirurgischen Toleranz. Etwa zwei Minuten nach Ausleitung der Narkose erlangen die Patienten das Bewusstsein wieder, nach vier Minuten sind sie ganz wach. Die analgetische Wirkkomponente hält darüber hinaus etwa zehn bis zwölf Minuten an (Cullen & Gross, 1951; Burov *et al.*, 1993; Dingley *et al.*, 1999; Homi *et al.*, 2003). Eine rasche Narkoseein- und -ausleitung wird durch einen geringen Blut-Gas-Verteilungskoeffizienten von nur 0,14 ermöglicht. Dieser Umstand macht das Gas besonders geeignet zur Anwendung bei Patienten mit einem Schädelhirntrauma, da die Beurteilung des neurologischen Status rasch nach Narkoseausleitung ermöglicht wird. Xenon wird in unveränderter Form über die Atemwege wieder abgegeben und kann auch bei älteren Patienten oder solchen mit chronischen Lungenerkrankungen eingesetzt werden. Da es nicht verstoffwechselt werden muss, stellt es auch keine Belastung für das hepatische oder renale System dar und kann deshalb auch bei Patienten mit vorgeschädigter Leber oder Nieren zur Anwendung kommen (Bedi *et al.*, 2003). Darüber hinaus verursacht es im Gegensatz zu anderen Anästhetika keinen Abfall des arteriellen Blutdruckes oder des Herzschlagvolumens (Bedi *et al.*, 2003). In Tierversuchen konnten bisher auch keine negativen Wirkungen auf Feten nachgewiesen werden. Der sichere klinische Einsatz wurde schon unter Beweis gestellt und erlaubt aufgrund seiner analgetischen Wirkkomponente während und nach Operationen häufig eine Reduktion von opioiden

Schmerzmitteln (Bedi *et al.*, 2003). Xenon ist kein Auslöser für eine maligne Hyperthermie, einer schweren Komplikation im Rahmen des Einsatzes von volatilen Anästhetika und depolarisierenden Muskelrelaxantien (Baur *et al.*, 2000). Als Narkosegas ist es von besonderem Interesse, da es im Gegensatz zu anderen inerten Gasen auch unter normalen Druckverhältnissen anästhetische Eigenschaften hat (Reyle-Hahn & Rossaint, 2000a; Schmidt *et al.*, 2001). Xenon weist zudem nahezu keine negativen Effekte auf das kardiovaskuläre System auf, verändert nicht die Konzentration der Katecholamine im Plasma und erhöht zudem in manchen Bereichen den zerebralen Blutfluss (in der weißen Substanz). Dieser Aspekt muss jedoch auch kritisch betrachtet werden, da dies die Erhöhung des intrakraniellen Druckes zur Folge haben kann. Die zerebrale Autoregulation bleibt aber erhalten. Die Durchblutung anderer Organe wird nicht nennenswert beeinflusst was seine Anwendung auch bei Risikopatienten möglich macht (Baur *et al.*, 2000; Reyle-Hahn & Rossaint, 2000c; Schmidt *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2002; Bedi *et al.*, 2003; Laitio *et al.*, 2007).

Die Entwicklungen von Niedrigfluss- und geschlossenen Beatmungssystemen sowie Recyclingsystemen macht die Anwendung von Xenon in letzter Zeit kostengünstiger (Luttropp *et al.*, 1991; Dingley *et al.*, 1999). Für den Einsatz von Xenon eignen sich Niedrigfluss-Systeme, bei denen durch geeignete Rückgewinnungssysteme ein Teil des Edelgases zurückgewonnen werden kann. Für eine optimale Einstellung des Gasgemisches, besonders in Niedrigfluss-Systemen, ist die Messung der Gaskonzentrationen von großer Bedeutung. In der Vergangenheit wurde der Gehalt von Xenon indirekt über den Gehalt an Sauerstoff ermittelt. Da Xenon ein Edelgas ist, können konventionelle Messtechniken nicht eingesetzt werden. Die Verwendung eines Massenspektrometers ist zwar möglich, aber für einen praktischen Einsatz viel zu teuer. Neuere Entwicklungen nutzen eine piezoelektrische Bindung, Wärmeleitfähigkeit oder Ultraschall (Luttropp *et al.*, 1991; Dingley *et al.*, 1999; Reyle-Hahn & Rossaint, 2000b; Bedi *et al.*, 2003). Trotz all dieser Vorteile ist zurzeit die indirekte Messung noch immer die einfachste und billigste Möglichkeit, die Zusammensetzung des Gasgemisches zu kontrollieren.

4.5.2 Die Vorteile von Xenon

Zusammenfassend lässt sich Xenon als wirksames Anästhetikum und Analgetikum beschreiben. Durch eine rasche Narkoseeinleitung und ebenso rasche Narkoseausleitung

ist es für manche Anwendungsgebiete von besonderem Interesse. Es erfüllt fast alle Ansprüche an ein ideales Anästhetikum. Da es im Körper nahezu nicht verstoffwechselt wird, ist es auch bei Risikopatienten einsetzbar. Seine praktische Anwendung hat schon bei verschiedenen chirurgischen Eingriffen erfolgreich stattgefunden. Darüber hinaus ist es beim Menschen bereits als Anästhetikum zugelassen. Der technologische Fortschritt bei der Entwicklung von Narkosesystemen mit Xenonrückgewinnung und einer optimalen computergesteuerten Einstellung des Gasgemisches unter Einsatz einer exakten Messmethode lassen in Zukunft den Einsatz des Edelgases wahrscheinlich wirtschaftlicher werden.

4.5.3 Der Wirkungsmechanismus von Xenon

Die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften von Xenon kommen denen eines idealen Narkosegases sehr nahe. Auch wenn es chemisch als nahezu inertes Gas beschrieben wird, kann es biologisch nicht vollkommen inert sein (Bedi *et al.*, 2003). Trotz seiner bekannten anästhetischen und analgetischen Wirkungen war lange Zeit wenig über den Wirkungsmechanismus von Xenon bekannt. Während die meisten für eine Allgemeinanästhesie eingesetzten Pharmaka die Aktivität von GABA an inhibitorischen GABA_A-Rezeptoren (γ -Aminobuttersäure) potenzieren, ist dieser Effekt für die Wirkung von Xenon vernachlässigbar. Das Edelgas entfaltet stattdessen eine inhibitorische Wirkung an den bereits erwähnten exzitatorischen NMDA-Rezeptorkanälen (N-Methyl-D-Aspartat). Dies erklärt zumindest einen Teil seiner anästhetischen und analgetischen Effekte (Franks *et al.*, 1998; Bedi *et al.*, 2003; Rex *et al.*, 2006). Auf die bereits erwähnten GABA_A-Rezeptoren übt Xenon dagegen keinen Einfluss aus (Gruss *et al.*, 2004). NMDA-Rezeptoren haben als ein Subtyp von Glutamat-aktivierten Ionenkanälen eine Bedeutung im Rahmen synaptischer Prozesse. Die Aktivierung dieser Rezeptoren im Übermaß führt zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle, der durch die Aktivierung einer biochemischen Kaskade letztendlich den Tod der Zelle bedingt (siehe Kapitel „Pathophysiologie des Schädelhirntraumas“). Ketamin und Lachgas (N₂O) wirken ebenfalls über diesen Rezeptortyp. Im Gegensatz zu Ketamin senkt Xenon den zerebralen Blutfluss im Kleinhirn, im Thalamus und im Kortex. Im gesamten Gehirn senkt es zudem den Metabolismus, besonders stark im Thalamus und in einigen Bereichen des Kortex. Das Edelgas hemmt den Rezeptor nicht-kompetitiv, das bedeutet, es besetzt eine andere Bindungsstelle als der eigentliche Bindungspartner und

entfaltet darüber seine Wirkung. Xenon hemmt auch unter Anwesenheit großer Mengen Glutamat im synaptischen Spalt neurale Signalübertragungen. Zu den Wirkungen, die Xenon zugeschrieben werden, gehören die Verminderung von Schmerzen und die ebenfalls schon erwähnte Amnesie sowie die auch durch Lachgas hervorgerufene Euphorie. Vermutlich beeinflusst es auch andere Rezeptoren, diese Mechanismen bedürfen aber noch der Aufklärung (Franks *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2002; Homi *et al.*, 2003; Rex *et al.*, 2006; Laitio *et al.*, 2007). Xenon hemmt über seine Wirkung an NMDA-Rezeptoren den genannten exzitatorischen Signalweg, wie es für andere Neuroprotektiva schon gezeigt werden konnte. Diese Eigenschaft lässt auf eine neuroprotektive Wirkung des Gases schließen (Homi *et al.*, 2003). Die Überprüfung dieser These an verschiedenen Modellen hat deutliche neuroprotektive Eigenschaften des Gases in Hypoxie- und Ischämie-Modellen sowohl *in vitro* und *in vivo* bestätigt (Wilhelm *et al.*, 2002; Petzelt *et al.*, 2003). Xenon konnte in einem Schlaganfallmodell an Mäusen beziehungsweise in einem Hypoxie-/Ischämie-Modell an Ratten die Infarktgröße reduzieren und zu einem verbesserten funktionellen Ergebnis beitragen (Homi *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003; Rajakumaraswamy *et al.*, 2006). Diese positiven Effekte sind auch unter Verwendung subanästhetischer Konzentrationen nachweisbar (Wilhelm *et al.*, 2002). Das Edelgas kann auch bei Schwangeren und Neugeborenen eingesetzt werden, da es in bisherigen Versuchen im Gegensatz zu Isofluran keine Apoptose ausgelöst und keine teratogenen Effekte wie das fetotoxische N₂O gezeigt hat (Cohen *et al.*, 1971; Lane *et al.*, 1980). Es wirkt auch nicht als Allergen (Nakata *et al.*, 2001; Sanders *et al.*, 2003; Rajakumaraswamy *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2007). Andere NMDA-Antagonisten, wie zum Beispiel MK-801 reichen jedoch an diese Wirkung nicht heran, was weitere Angriffspunkte des Xenons wahrscheinlich macht (Fix *et al.*, 1993; Petzelt *et al.*, 2003). Auch die Blockade anderer Glutamatrezeptoren, zum Beispiel der sogenannten AMPA-Rezeptoren, die je nach ihrer Zusammensetzung aus verschiedenen Untereinheiten permeabel für Natrium-, Kalium- oder Calcium-Ionen sind (Mosbacher *et al.*, 1994), und ebenfalls durch Lachgas und Xenon inhibiert werden, erklärt noch nicht das ganze Wirkspektrum (Mosbacher *et al.*, 1994).

Als weitere Angriffspunkte des Xenons kommen sogenannte Hintergrund-Kaliumkanäle in Betracht. Unter physiologischen Bedingungen sind diese Kanäle teilweise geöffnet und helfen so bei der Aufrechterhaltung des Ruhepotentials der Membran mit. Für mehrere Mitglieder dieser Gruppe von Kaliumkanälen (TREK, TASK) konnte die Aktivierung durch volatile Anästhetika gezeigt werden. Halothan und Isofluran

Literaturübersicht

beispielsweise aktivieren sowohl TREK-Kanäle als auch TASK-Kanäle, während Xenon, Lachgas und auch Cyclopropan nur an TREK-Kanälen eine Wirkung haben. Diese Kanäle sind verantwortlich für Hintergrundkaliumströme, die modulierend auf die neuronale Erregbarkeit einwirken. Durch Anästhetika aktivierte Kanäle führen eine Steigerung der Kaliumströme herbei und führen je nach Ausgangslage zu einer Stabilisierung des Ruhepotentials beziehungsweise zu einer Hyperpolarisierung der Zellen. Dagegen ermöglicht die Hemmung dieser Ströme eine Depolarisierung und Erregung von Neuronen. Die Aktivität der Hintergrund-Kaliumkanäle wird außerdem beeinflusst durch Dehnung der Membran, die Temperatur, dem extrazellulären und intrazellulären pH-Wert und durch Lipide. Beispielsweise wirken mehrfach ungesättigte Fettsäuren, sogenannte PUFAs (polyunsaturated fatty acids) aktivierend. Zu diesen Fettsäuren gehört unter anderen die Arachidonsäure (Patel & Honore, 2001b). Die anatomische Verteilung der Kanäle im Zentralnervensystem ist für ihre Beteiligung an der anästhetischen und analgetischen Wirkung von Xenon ebenfalls von Bedeutung. Das Edelgas aktiviert diese Kanäle, die speziesspezifisch in fast allen Bereichen des zentralen und auch des peripheren Nervensystems zu finden sind (Goldstein *et al.*, 2001; Patel & Honore, 2001a; Lang-Lazdunski *et al.*, 2003; Gruss *et al.*, 2004; Heurteaux *et al.*, 2004; Rajakumaraswamy *et al.*, 2006). Von Bedeutung für ihre Funktion ist auch die gesteigerte Expressierung der Hintergrund-Kaliumkanäle (TREK-1 und TRAAK) nach zerebraler Ischämie (Xu *et al.*, 2004). Das neuroprotektiv wirkende Riluzol aktiviert TREK- und TRAAK-Kanäle (Duprat *et al.*, 2000). Möglicherweise entfaltet Xenon auch über die Aktivierung dieser speziellen Kanäle eine neuroprotektive Wirkung. Diese Annahme bekommt mehr Gewicht, bedenkt man, dass an TREK-1-Knockout-Mäusen gezeigt werden konnte, wie das Fehlen der genannten Kanäle die Tiere gegenüber volatilen Anästhetika unempfindlicher macht. Neuroprotektive Effekte sind bei diesen Tieren gegenüber Kontrolltieren nicht mehr nachweisbar (Heurteaux *et al.*, 2004).

Die Aktivierung einer bestimmten Subpopulation von nikotinergen/nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) durch volatile Anästhetika wird für die analgetische Wirkung verantwortlich gemacht. Die analgetische Wirkkomponente von Xenon kommt wahrscheinlich nicht über diesen Mechanismus zustande, da es wie Lachgas diese Rezeptoren nichtkompetitiv hemmt (Yamakura & Harris, 2000).

Als ein weiteres Ziel der Xenon-Wirkung kommt möglicherweise auch die präsynaptische, kalziumgesteuerte Neurotransmitterfreisetzung in Betracht. Durch hypoxische Ereignisse wird unter anderem der Ca^{2+} -Calmodulin-aktivierte Kinase

Literaturübersicht

II-Komplex (CaMKII) aktiviert. Dies führt zu einer übermäßigen Freisetzung von Glutamat, die den Tod von Nervenzellen zur Folge hat. Xenon hemmt die Aktivierung des CAMKII-Systems und anderer kalziumgesteuerter Signalwege, damit werden die Nervenzellen vor der neurotoxischen Wirkung zu großer Mengen von Glutamat geschützt (Petzelt *et al.*, 2003; Rajakumaraswamy *et al.*, 2006).

Das Edelgas hat, wie schon beschrieben, in seiner Anwendung bisher kaum Nebenwirkungen gezeigt. Jedoch ist als eine der wenigen unerwünschten Wirkungen die Größenzunahme von intravaskulären Luftblasen bei chirurgischen Eingriffen am Herzen zu nennen (Sta & Eckmann, 2003; Lockwood *et al.*, 2006; Jungwirth *et al.*, 2006). Diese könnten die Gefahr einer relevanten Embolie steigern und damit auch zu einem schlechteren neurologischen Status beitragen. Jedoch haben weitere Untersuchungen zeigen können, dass die Größenzunahme unter dem Einfluss von Xenon nur moderat ist. Diese durch das Edelgas bedingte Steigerung der Größe fällt geringer aus als die durch Lachgas verursachte. Mikroluftblasen nehmen in ihrem Umfang unter moderater Kühlung, genauer gesagt bei der Wiedererwärmung, jedoch stärker zu (Benavides *et al.*, 2006). Dieser unerwünschte Effekt kommt durch den niedrigen Blut-Gas-Verteilungskoeffizienten von Xenon und Lachgas zustande. Beide Gase treten leicht in schon vorhandene Gasansammlungen beziehungsweise Gasblasen über, die dadurch noch an Größe zunehmen (Benavides *et al.*, 2006).

Xenon wurde in vorangegangenen Forschungsarbeiten schon auf seine verschiedenen Wirkungen hin untersucht. Bisher hat man neuroprotektive Effekte in Traumaversuchen nur beobachtet, wenn es vor oder gleichzeitig mit dem induzierten Schaden zugeführt wurde. Xenon soll nun auf seine neuroprotektiven Effekte nach einem Schädelhirntrauma untersuchen werden. Die technischen Voraussetzungen dafür sind leicht zu erfüllen, die Gas-Applikation stellt kein größeres Problem bei intubierten Schädelhirntrauma-Patienten dar. Bevor Xenon jedoch in einer klinischen Studie zur Neuroprotektion am Menschen zum Einsatz kommen kann, sollte die neuroprotektive Wirkung bei Schädelhirntrauma in einem Tierversuch gezeigt werden.

4.5.4 Hypothermie

Der Verminderung der Körpertemperatur wird beinahe seit 60 Jahren eine Schutzwirkung vor neuronalen Schäden zugeschrieben (Bigelow *et al.*, 1950). Nach erfolgversprechenden experimentellen Untersuchungen wurde die Kühlung von Patienten während operativen Eingriffen am Herz und nach Schädelhirnverletzungen eingesetzt (Busto *et al.*, 1989; Celik *et al.*, 2006; Fukuda & Warner, 2007). Da die Kühlung und Wiedererwärmung in der Durchführung aufwändig und mit nicht sehr hohem Wirkungsgrad verbunden waren, ist diese Methode für Jahrzehnte jedoch bedeutungslos gewesen (Fukuda & Warner, 2007). Der Kühlungsidee liegt zum Teil die Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel (RGT-Regel) zugrunde, die eine Korrelation zwischen Temperatur und Stoffwechselaktivität herstellt. Diese Faustregel besagt, dass sich mit einer Steigerung der Temperatur um 10°C die Reaktionsgeschwindigkeit chemischer Reaktionen etwa verdoppelt (Bayrhuber & Kull, 1998). Stoffwechselprozesse laufen unter Hypothermie langsamer ab als unter Normothermie. Auch die Stoffwechselaktivität des Gehirnes und damit auch der Sauerstoffverbrauch sinken mit der Reduktion der Temperatur. Möglicherweise besteht der Effekt einer Hypothermiebehandlung in der Verzögerung von Prozessen mit negativen Folgen oder gar deren vollständigen Unterdrückung (Xu *et al.*, 2002; Fukuda & Warner, 2007). Die ausgeprägte Senkung des Hirnstoffwechsels tritt jedoch nur bei sehr niedrigen Temperaturen von 18 bis 22°C auf, während dieser Effekt bei milder Hypothermie (32 bis 35°C) kaum eine Rolle spielt. Daher müssen für neuroprotektive Effekte weitere Mechanismen verantwortlich sein (Nakashima & Todd, 1996; Xu *et al.*, 2002; Hoeger *et al.*, 2006; Fukuda & Warner, 2007). Die Anwendung milder Hypothermie senkt den intrakraniellen Druck, der zerebrale Perfusionsdruck dagegen steigt an. Dadurch kann das Gehirn besser durchblutet werden.

Es wird postuliert, dass die therapeutische Wirkung auf eine Regulierung der zellulären Azidose, der Verlangsamung des Einstroms von Kalziumionen, einer Verringerung der Glutamat- und Aspartatfreisetzung (exzitatorisch wirksame Aminosäuren, siehe Kapitel „Pathophysiologie des Schädelhirntraumas“) sowie einer Verhinderung der Freisetzung von Neurotransmittern und freien Fettsäuren zurückzuführen sein könnte (Patel *et al.*, 1995; Nakashima & Todd, 1996; Kil *et al.*, 1996; Huh *et al.*, 2000; Fukuda & Warner, 2007). Möglicherweise hat auch die verringerte Entstehung von reaktiven Sauerstoffradikalen während der Hypothermie und eine Beeinflussung von Teilen der

Literaturübersicht

Apoptosekaskade einen Anteil an der protektiven Wirkung (Kil *et al.*, 1996; Huh *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2002).

Eine Hypothermiebehandlung erhöht die Ischämietoleranz des Gehirns und wirkt in bisherigen Untersuchungen bei ischämischen Schäden besser als nach traumatischen Schäden (Fukuda & Warner, 2007). Zum Teil werden intraintrischämische und postischämische Kühlung für gleichwertig erachtet, zum Teil wird nur die intraintrischämische Hypothermie für wirkungsvoll gehalten. Ein früher Beginn nach dem traumatischen Ereignis erscheint sinnvoll (Gunn *et al.*, 1999; Inamasu *et al.*, 2000; Huh *et al.*, 2000; Celik *et al.*, 2006). Die Absenkung der Temperatur kann die Aktivierung von Neutrophilen und der Mikroglia, die an der fortschreitenden Schädigung des Gewebes beteiligt sind, nur verzögern und nicht aufhalten (Inamasu *et al.*, 2000). Eine Erhöhung der Temperatur über die Normothermie hinaus muss aber auf jeden Fall verhindert werden, da diese für eine Ausweitung der Schäden sorgt (Dietrich *et al.*, 1990).

In Deutschland hat sich bisher kein einheitliches Protokoll zur Hypothermieinduktion in der Patientenversorgung durchgesetzt. Die optimale Temperatur zur Erzielung eines neuroprotektiven Effektes ist noch nicht ermittelt worden (Himmelseher & Werner, 2004). Die angestrebte Temperatur liegt meistens zwischen 34 und 36°C und nur selten zwischen 32 und 34°C. Diese mild-moderate Kühlung wird nach, zum Teil auch vor und während (geplanter) operativen Eingriffen eingesetzt. Gesenkt wird die Temperatur in der Regel über eine langsam und schlecht steuerbare Oberflächenkühlung. Daneben kommen kalte intravenöse Infusionen und Wärmeaustauschkatheter zum Einsatz. Die zerebrale Temperatur kann sich dabei um bis zu 2°C von der restlichen Körpertemperatur unterscheiden, mit den wärmeren Bereichen zentral im Gehirn (Henker *et al.*, 1998; Rumana *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002; Soukup *et al.*, 2002). Intrazerebrale Messungen der Temperatur sind zur Kontrolle der Hypothermiebehandlung Messungen an anderen Orten vorzuziehen (Himmelseher & Werner, 2004). Kriterien für die Anwendung einer Hypothermie sind ein schweres Schädelhirntrauma und ein therapieresistenter erhöhter intrakranieller Druck (Himmelseher & Werner, 2004; Jiang, 2009). Durchgeführt wird die Kühltherapie für 24 bis 48 Stunden und länger, nur selten wird die Dauer patientenindividuell anhand der Höhe des intrakraniellen Druckes angepasst (Polderman *et al.*, 2002; Gasser *et al.*, 2003; McIntyre *et al.*, 2003; Himmelseher & Werner, 2004). Die Wiedererwärmung kann mit einer Rate von 0,5 bis 1°C pro Stunde, spontan oder

Literaturübersicht

auch patientenindividuell erfolgen (Himmelseher & Werner, 2004). Einem möglichen therapeutischen Effekt der Hypothermie stehen aber Nebenwirkungen, wie Hypotension, Herzarrhythmie, Störung der Blutgerinnung und die Gefahr der Entwicklung einer Pneumonie, gegenüber (Huh *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2003). Auch hat sich nach Anwendung milder beziehungsweise moderater Hypothermie während kardialen Eingriffen im Vergleich zur Normothermie nicht zweifelsfrei als schützend für die kognitiven Fähigkeiten erwiesen (Grigore *et al.*, 2001). Nach Einleitung einer Hypothermiebehandlung kann es zu individuellen Schwankungen in der Geschwindigkeit und dem Ausmaß der Abkühlung kommen. Überschießende Reaktionen sind nachteilig für den gesamten Organismus und müssen daher vermieden werden. Bei einer Reduktion der Gehirntemperatur unter 35°C oder einer sehr langen Kühldauer kann es bei Patienten nach einem Schädelhirntrauma zu einer mangelhaften Sauerstoffversorgung des Gehirnes kommen mit den schon im Kapitel „Pathophysiologie des Schädelhirntraumas“ beschriebenen negativen Folgen (Gupta *et al.*, 2002; Himmelseher & Werner, 2004; Hoeger *et al.*, 2006). Die wenigen bisher durchgeführten Studien haben widersprüchliche Ergebnisse erbracht (Gunn *et al.*, 1999; Clifton *et al.*, 2001; Clifton, 2004). Hypothermie soll deshalb hier auf seine neuroprotektiven Eigenschaften nach einem experimentellen Schädelhirntrauma getestet werden.

Die Kombination von Xenon mit milder Hypothermie hat einigen Studien zufolge einen synergistisch neuroprotektiven Effekt (Ma *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2007). Diese positive Wirkung lässt sich auch dann noch nachweisen, wenn Hypothermie und Xenon nacheinander angewendet werden. Die Wirkung der Hypothermie beruht unter anderem auf einer Reduzierung der Freisetzung von Glutamat. Darüber hinaus hemmt es proapoptische Faktoren (Lockwood *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2007). Die gemeinsame Anwendung von Xenon und Hypothermie in einem Tiermodell soll in der vorgestellten Studie vorbereitet werden.

5 Material und Methoden

5.1 Vorbereitung der ersten Versuche

Zu den zentralen Aufgaben gehört der Aufbau des Tiermodells. Ziel ist es, in ersten Pilotversuchen das Tiermodell an der Justus-Liebig-Universität in Gießen zu etablieren. In weiteren Versuchen soll Xenon auf eine mögliche neuroprotektive Wirkung nach einem Schädelhirntrauma getestet werden. Für die histologische Untersuchung der Hirnschnitte sollen eine Standardlaborfärbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) und eine Spezialfärbung gegen aktivierte Caspase-3, einem Schlüsselenzym der Apoptosekaskade, dienen. Dafür ist es zunächst notwendig, einige Grundtechniken zu erlernen. Zu diesem Zweck finden mehrere Besuche in der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz statt. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. C. Werner werden Schlaganfall- und Traumamodelle an Ratten untersucht. Für die Auslösung des Traumas wird hier allerdings ein Controlled Cortical Impact-Modell (CCI) benutzt. Mit diesem wird eine fokale Läsion erzeugt. Frau Dr. med. vet. E. Eberspächer und Frau Dr. med. vet. U. Winkelheide führen uns in Techniken zur Intubation und der Kanülierung der Schwanzarterie ein. Zudem erhalten wir noch nützliche Hinweise zur Einstellung des Beatmungsgerätes und notwendigen Medikamenten. Der Besuch in diesem Labor hat überdies einen Eindruck vermittelt, was alles für den Aufbau des eigenen Versuchsstandes notwendigerweise noch bestellt werden muss.

Frau PD Dr. med. vet. S. Tacke von der Klinik für Kleintiere, Abteilung Chirurgie der tierärztlichen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen hat die Betreuung im Fachbereich Veterinärmedizin für diese Doktorarbeit übernommen. Sie hat uns bezüglich der Dosierung der Anästhetika und Schmerzmittel mit ihrem Rat unterstützt.

Prof. N. Franks und Prof. M. Maze vom Imperial College in London haben bei einem Laborbesuch in London die Erweiterung der geplanten Versuchsgruppen vorgeschlagen. So wird noch eine weitere Hypothermiegruppe eingeführt, die die Wirkung von Xenon in Zusammenhang mit einer Herunterkühlung der Körpertemperatur austesten soll.

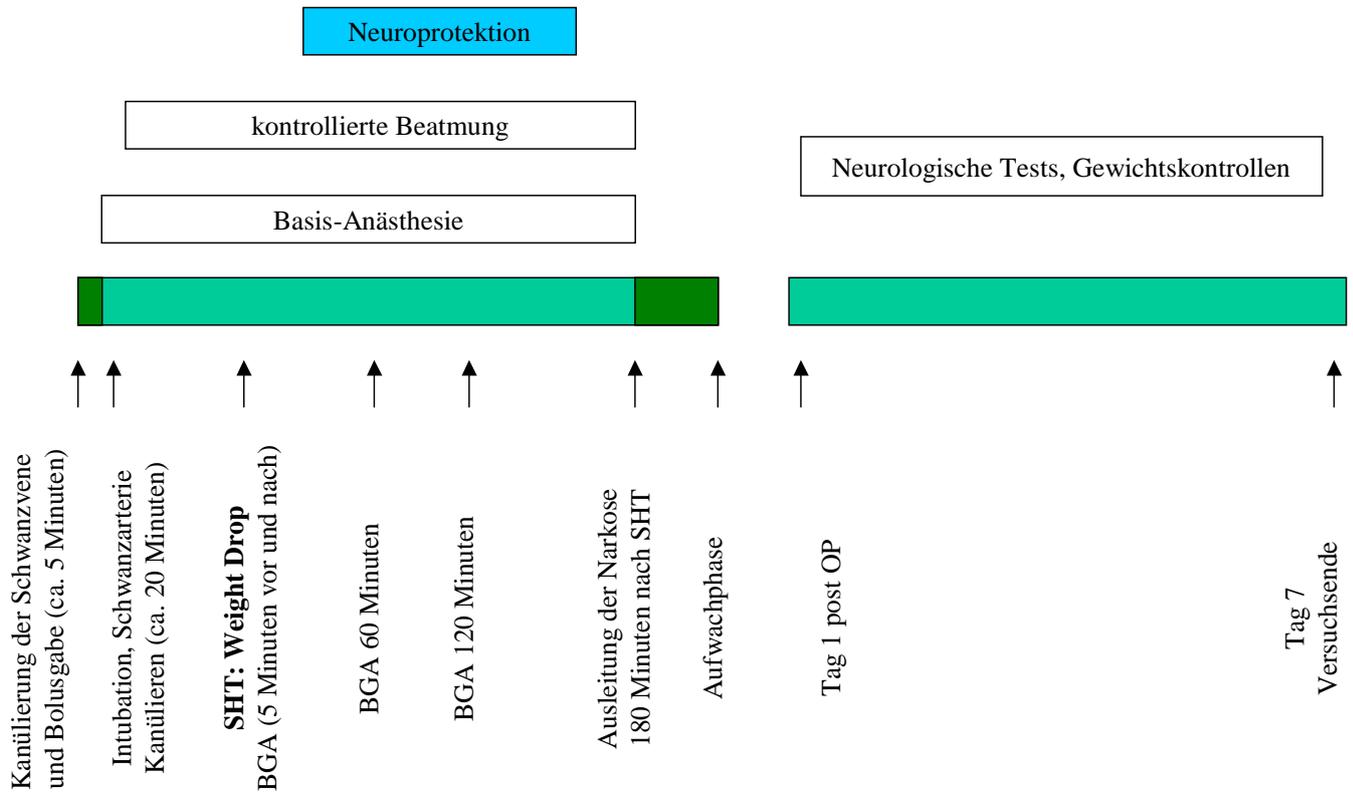


Abbildung 3 Zeitlicher Verlauf der geplanten Versuche

5.2 Planung der Versuchsgruppen

Für die Auswertung der Versuche ist es unbedingt notwendig, mehrere Versuchsgruppen zu haben (siehe Tabelle 3). Eine Gruppe muss als Vergleichsgruppe für die anderen Gruppen dienen. Die Ratten werden hierfür exakt der gleichen Prozedur unterzogen wie alle anderen Tiere, es wird jedoch kein Trauma induziert. Die Narkose wird mit Fentanyl und Propofol aufrechterhalten (Gruppe 0). Eine weitere Gruppe erhält die gleiche Basisanästhesie wie die vorhergenannte Gruppe, es wird aber ein Trauma induziert (Gruppe A). Dadurch soll zunächst nachgewiesen werden, dass das Trauma erfolgreich induziert werden kann (histologischer Nachweis einer Nekrose). In der nächsten

Material und Methoden

Traumagruppe wird zusätzlich zur Basisanästhesie Xenon in den Beatmungskreislauf eingeleitet. Es soll 30 Minuten nach dem Trauma in den Beatmungskreislauf eingeleitet werden, um die reale Versorgung eines Unfallopfers zu simulieren (Gruppe B). Das Edelgas wird 30 Minuten vor dem Ende der Basisanästhesie wieder ausgeleitet. Die erste Hypothermiegruppe erhält die Basisanästhesie mit Fentanyl und Propofol, mit der Kühlung wird 30 Minuten nach dem induzierten Trauma begonnen (Gruppe C). Die Wiedererwärmung beginnt 15 Minuten vor dem Ende der Basisanästhesie. In der zweiten Hypothermiegruppe wird Xenon zusätzlich mit dem Beginn der Kühlung, also wieder 30 Minuten nach dem Trauma appliziert (Gruppe D). Auch in dieser Gruppe werden Xenon (30 Minuten) und Kühlung (15 Minuten) vor dem Narkoseende ausgeleitet. Aus praktischen Gründen werden Xenon und Hypothermie etwas zeitversetzt ein- und ausgeleitet. Geplant sind acht bis zehn Tiere pro Gruppe in den Versuch einzubeziehen.

Tabelle 3: Die Versuchsgruppen im Überblick

Gruppe	Anästhesie	Trauma	Gas/Beatmungsgemisch
Gruppe 0 (Negativ-Kontrolle)	Fentanyl 2 µg/kg/min Propofol 20 mg/kg/h	nein	30% O ₂ + 70 % N ₂ Normothermie
Gruppe A (Positiv-Kontrolle)	Fentanyl 2 µg/kg/min Propofol 20 mg/kg/h	ja	30% O ₂ + 70 % N ₂ Normothermie
Gruppe B (Xenon)	Fentanyl 2 µg/kg/min Propofol 20 mg/kg/h	ja	30% O ₂ + 70 % N ₂ 30 Minuten nach Trauma 30% O ₂ + 70% Xenon Normothermie
Gruppe C (Hypothermie)	Fentanyl 2 µg/kg/min Propofol 20 mg/kg/h	ja	30% O ₂ + 70 % N ₂ 30 Minuten nach Trauma Beginn Hypothermie
Gruppe D (Xenon und Hypothermie)	Fentanyl 2 µg/kg/min Propofol 20 mg/kg/h	ja	30% O ₂ + 70 % N ₂ 30 Minuten nach Trauma 30% O ₂ + 70% Xenon und Beginn Hypothermie

5.3 Durchführung der Pilotversuche

Nach der Ausstattung des Labors mit den nötigen Geräten und Instrumenten (siehe dieses Kapitel) findet zunächst ein Testlauf ohne Tiere statt. Dabei wird eine Voreinstellung des Beatmungsgerätes und der Pumpen zur Narkosesteuerung vorgenommen. Für die Einstellung der Spritzenpumpen ist es wichtig, den genauen Spritzendurchmesser zu kennen. Bei diesem Probelauf erweisen sich die bestellten Teflonschläuche als Verbindungsschläuche zwischen dem Narkosegastopf und Beatmungsgerät als zu steif. Sie werden durch einfache Plastikschläuche aus dem Baumarkt ersetzt (Rauclair-E und Raufilam-E, PVC-Schlauch, Rehau Unlimited Polymer Solution, Rehau, Deutschland). Bei den für diese ersten Versuche bestellten Tieren handelt es sich um männliche, zirka 330 g schwere Sprague Dawley Ratten der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland), die vor dem Versuch im Tierstall des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität in Gießen untergebracht werden.

Die ersten Versuche mit Tieren sollten helfen, weitere Fehler im Versuchsablauf zu finden, außerdem dienen sie der Übung der einzelnen Techniken. Dabei zeigt sich, dass der schon schmalere geschliffene Laryngoskop-Spatel noch zu breit ist und ein Wulst die Sicht auf den Eingang der Trachea versperrt. Er wird daraufhin noch schmaler geschliffen.

Zur Übung der anderen Techniken werden frisch getötete Tiere herangezogen, dies soll vor allem auch die Zahl der Versuchstiere möglichst niedrig halten. An diesen frisch getöteten Ratten lässt sich die Schwanzarterie gut kanülieren. Außerdem werden die Femoralarterie und -vene dargestellt. Auch das Freipräparieren des Schädels wird an diesen Tieren geübt.

Die bestellte Temperatursonde für den Temporalismuskel (IT-21 Flexible Implantable Microprobe, BioMedical Instruments/Dr. Joachim Gründel, Zöllnitz, Deutschland) muss zur Implantation in den Muskel in eine großlumige Kanüle eingefädelt werden, da es sich bei der Sonde um einen dünnen Metallfaden handelt. Beim Herausziehen der Kanüle gleitet die Sonde leicht mit aus dem Muskel, eine erneute Implantation wird notwendig. Die Sonde ist sehr empfindlich und hat nur eine kurze Lebensdauer. Eine selbst in den Muskel einsteckbare Sonde wird daraufhin bestellt (MT-23/3 Needle Microprobe, BioMedical Instruments/Dr. Joachim Gründel, Zöllnitz, Deutschland). Einmalrasierer zur Entfernung der Haare an Kopf und Schwanz haben sich ebenso als untauglich erwiesen.

Material und Methoden

Sie werden zu schnell stumpf und verletzen überdies die Kopfhaut. Stattdessen dienen in den folgenden Versuchen Skalpellklingen der Rasur. Damit dauert die Entfernung der Haare sehr lang, außerdem besteht auch hierbei eine Verletzungsgefahr für die Kopfhaut. Aus diesen Gründen wird ein Haar- und Bartschneider ausgewählt, der die Haare zunächst grob entfernt. Die Schur der Kopfhaut mit einer Skalpellklinge wird dadurch deutlich erleichtert und vor allem die benötigte Zeit verkürzt. Die Befestigung des Metallschutzhelmes mit Sekundenkleber (Pattex Blitz Kleber flüssig, Henkel KGaA, Düsseldorf, Deutschland) ist nicht besonders stabil. Stattdessen wird Zahnzement ausgewählt, dabei handelt es sich um einen Zweikomponentenkleber (Easy Mix Ketac Cem, ESPE Dental AG, Seefeld, Deutschland). Die Fixierung mit diesem Kleber funktioniert besser. Probeweise wird in diesen Initialversuchen auch die Auslösung des Traumas durchgeführt. Dabei kommen fünf Einzelgewichte von 50 g zum Einsatz. Sie fallen aus einer Höhe von einem Meter auf den Metallschutzhelm des Tieres. Dabei verkanten sich die Gewichte leicht in dem Rohr. Nach dem Aussprühen des Rohres mit Silikonspray ist dieses leichtgängiger. Bei einer erneuten Traumaauslösung werden neun Einzelgewichte zu je 50 g fallen gelassen. Die Einzelgewichte müssen aber wegen der Gefahr, in dem Rohr zu verkanten und zur Vermeidung eines ungewollten Doppelschlages durch ein einziges Gewicht zu 454 g ersetzt werden. Die Haltevorrichtung des Rohres muss verbessert werden, da es sich zu leicht verschieben lässt. Mehrere Muffen werden zusätzlich angebracht und stabilisieren das Rohr zusätzlich.

Erst nach einigen Übungen wird auch die Technik der Schwanzvenenkanülierung beherrscht. Die Steuerung der Narkose erfolgt nun über die bestellten Pumpen. Die manuelle Einstellung der Pumpen erweist sich als sehr mühsam und während des Versuches als nicht praktikabel. Ein Wechsel der Einstellungen zwischen der für die Initialdosis und der für die Erhaltungsnarkose dauert viel zu lang. Zur Umgehung dieses Problems erfolgte die Vernetzung der Pumpen mit dem Laborcomputer, auf dem ein spezielles Programm zur Steuerung der Pumpen installiert wird (Dr. Michael Gruß, Aachen).

Während der Durchführung der ersten Versuche findet eine Beatmung mit 100% Sauerstoff statt. Volumen und Frequenz der Beatmung müssen jedoch noch angepasst werden.

Das Extubieren der Tiere schon beim Wiederkehren der Reflexe erweist sich als ungünstig, da Propofol zur Produktion eines zähflüssigen Schleimes führt, den die Tiere

Material und Methoden

in einem halbwachen Zustand nicht abhusten oder abschlucken können. Dieser Schleim verlegt dann die Atemwege und kann zu einem Tod durch Ersticken führen. Um dies zu verhindern, bleiben die Tiere so lange intubiert, bis sie wach genug sind. Der Tubus wird in der Zwischenzeit mehrfach mittels einer Spritze und einem darauf aufgesetzten dünnen Plastikschlauch vorsichtig von Schleim befreit.

Die Ratten der ersten Versuche werden mit einer Überdosis Isofluran, einer Überdosis Propofol oder durch Blutentzug getötet. In weiteren Versuchen wird auch die Perfusion der Tiere mit Paraformaldehyd geübt. Nach weiterer Beratung im Institut für Anatomie wird auch die Perfusion einer Vorspüllösung vor der PFA-Lösung ausprobiert. Die Entnahme des Gehirnes erweist sich beim ersten Versuch als schwierig, da die gewählte Zange zu grob für die zarten Knochen der Ratte ist und deshalb das Gehirn verletzt. Mittels einer Klemme allein lässt sich das Gehirn dann aber unversehrt entfernen. Die ersten erhobenen Daten werden zunächst handschriftlich notiert und später in die Maske einer Datenbank (Microsoft Access 2002, Microsoft Corporation, USA) auf dem Laborcomputer übertragen.

Am Ende der Initialversuche zur Austestung der verschiedenen Techniken und zur Erprobung der geeignetsten Versuchsdurchführung werden die Tiere schmerzfrei getötet. In den darauf folgenden Versuchen werden die Versuche nach den Ausführungen in dem Material- und Methodenteil durchgeführt.

5.4 Abbruchkriterien

Im Sinne des Tierschutzes ist es vor der Durchführung der Versuche notwendig, Kriterien zu definieren, bei deren Eintreten ein Versuch vorzeitig abgebrochen werden muss. Dabei muss unterschieden werden zwischen dem eigentlichen Versuch, zu dem auch die Aufwachphase gehört und der Zeit bis zur Tötung der Tiere am Tag 7 nach dem operativen Eingriff. Zu den Abbruchkriterien in der Aufwachphase gehören eine abnormale Respiration mit Apnoe-Phasen oder Schnappatmung genauso wie starke Blutungen, die auf eine Schädelfraktur hinweisen. Verletzungen, die durch eine unsachgemäße Intubation entstehen können und Atmung sowie Futter- und Wasseraufnahme in der Folgezeit beeinträchtigen werden, spielen ebenfalls eine Rolle.

Tiere, die aus der Narkose nicht richtig erwachen (komatöser Zustand) oder andere deutliche neurologische Ausfallserscheinungen zeigen, wie zum Beispiel

Material und Methoden

Bewegungsunfähigkeit, Orientierungslosigkeit und andere, sind ebenfalls vorzeitig zu töten. Apathie, das Tier stark beeinträchtigende Lähmungserscheinungen oder ausgeprägte Koordinationsstörungen sind klare Abbruchkriterien in der Zeit bis zum geplanten Versuche. In den folgenden Tagen nach dem Eingriff muss das Körpergewicht der Tiere regelmäßig kontrolliert werden, da es die Futteraufnahme der Tiere widerspiegelt. Die Kot- und Urinmenge im Laborkäfig lassen auch auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme schließen. Eine deutliche Gewichtsreduktion bedeutet dabei immer ein gestörtes Allgemeinbefinden. Ein Hinweis auf ein gestörtes Allgemeinbefinden ist auch ein verminderter Pflegezustand (gesträubtes Fell) des Tieres. Zudem treten bei Ratten sogenannte blutige Tränen auf. Dabei handelt es sich um ein porphyrinhaltiges, rotes Sekret der Harder'schen Drüsen, die hinter den Augenbulbi liegen. Bei ungestörtem Allgemeinbefinden wird das Sekret während der normalen Körperpflege im Fell verteilt und nur bei gestörtem Pflegeverhalten in Form von roten Rändern um die Augen und als rote Krusten an den Nasenöffnungen sichtbar. Lässt sich das Allgemeinbefinden durch zusätzliche Schmerzmittelgaben nicht verbessern, muss das betroffene Tier erlöst werden.

5.5 Versuchstiere

5.5.1 Wahl der Versuchstiere

In der Vergangenheit wurden zur Erforschung der Auswirkungen von Traumen und den Wirkungsweisen potentieller Neuroprotektiva meist Ratten verwendet. Für die Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse ist es deshalb sinnvoll, dieselbe Tierart einzusetzen. Der Ersatz der Tierversuche durch alternative Verfahren ist zur Untersuchung der vielfältigen Auswirkungen eines Schädelhirntraumas auf den gesamten Organismus leider noch nicht möglich.

5.5.2 Art und Haltung der Tiere

Bei den für die Versuche verwendeten Tieren handelt es sich um Sprague Dawley-Ratten der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland). Es werden ausschließlich

Material und Methoden

männliche Tiere mit einem Gewicht von 275-450 Gramm eingesetzt. Vor dem Eingriff werden die Ratten in Gruppenkäfigen (Makrolon-Käfige Größe IV; Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen versorgt. Dort wird ein Licht-Dunkel-Zyklus von 12:12 Stunden eingehalten.

Nach dem Versuch müssen die Tiere zur besseren Beobachtung und zur Vermeidung gegenseitiger Verletzungen in Einzelkäfigen (Makrolon-Käfige Größe III) im eigenen Labor untergebracht werden. Die Haltung erfolgt auf Holzeinstreu, als Nahrung bekommen die Tiere über den ganzen Zeitraum pelletiertes Futter. Futter und Wasser in Trinkflaschen stehen zur ad libitum Aufnahme zur Verfügung (Mäuse- und Rattenvolldiät sowie das Einstreumaterial in den Käfigen: Charles River Laboratories, Research Models and Services, Salzfild, Deutschland).

5.5.3 Allgemeine Werte

Zur Feststellung des Allgemeinzustandes der Tiere wird das Körpergewicht (Precision Balance, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) vor Beginn des Eingriffes und nach dem Versuch täglich kontrolliert. Nach dem Eingriff werden auch Futter- u. Wasseraufnahme sowie Kot- u. Urinabsatz beobachtet und neben der Beobachtung des allgemeinen Verhaltens in einer Tabelle notiert.

5.6 Versuchsdurchführung

5.6.1 Narkoseeinleitung

Die Tierversuche werden unter Beachtung des § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland durchgeführt. Sie wurden durch das Regierungspräsidium Gießen am 15. September 2004 genehmigt (AZ V54-19c 20-15 (1) GI 20/14-Nr. 29/2004).

Die Tiere dürfen selbstverständlich keine unnötigen Schmerzen erleiden und müssen für den Versuch absolut ruhig liegen, deshalb soll der Eingriff in tiefer Allgemeinanästhesie

Material und Methoden

erfolgen. Auf den Einsatz von Muskelrelaxantien wird verzichtet, um eventuell auftretende Reaktionen der Tiere aufgrund einer zu geringen Narkosetiefe nicht zu verschleiern. Da eine Intubation am wachen Tier nicht möglich ist, müssen die Ratten dafür betäubt werden. Dazu wird ein Tier in einen sogenannten Tube Holder (Hugo Sachs Elektronik/Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) verbracht. Aus diesem ragt nur noch der Schwanz des Tieres heraus. Nach Entfernung der Haare und Desinfektion der Haut (Softasept N, Braun, Melsungen, Deutschland), erfolgt die Kanülierung einer Schwanzvene (BD Insyte-W, i. v.-Katheter mit Flügeln, 0,7 x 19 mm, Becton Dickinson GmbH, Deutschland). Über diesen Zugang werden zur Narkoseeinleitung 8 mg/kg Propofol (Konzentration 20 mg/ml; Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. H., Deutschland) und 26,7 µg/kg Fentanyl (Konzentration 50 µg/ml; Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) über einen Zeitraum von 80 Sekunden verabreicht.

5.6.2 Steuerung der Narkose

Für eine genaue Verabreichung so kleiner Volumina sind spezielle Pumpen erforderlich, die über einen PC gesteuert werden. Die Steuerung der Narkoseeinleitung sowie der rein intravenösen (Basis-) Anästhesie aller Versuchsgruppen erfolgt ebenfalls über diese Pumpen (Harvard Pump 11 Plus Advanced, Hugo Sachs Elektronik/Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland), die eine kontinuierliche Gabe von 2 µg/kg/min Fentanyl und 20 mg/kg/h Propofol gewährleisten. Am Versuchsende nach sieben Tagen erfolgt die Narkoseeinleitung in einer Narkosegas-Box, in die Isofluran eingeleitet wird.

5.6.3 Intubation und Beatmung

Die Intubation erfolgt an einem Schrägbrett (Intubationsbrett-Sonderanfertigung, Schreinerei Both, Oberursel, Deutschland). Das betäubte Tier wird mit den oberen Incisivi in eine stabile Schlinge aus PVC-Schlauchmaterial eingehängt, welche über zwei Bohrungen am Schrägbrett befestigt ist. Der Bauch des Tieres zeigt dabei nach oben. Dann wird die Intubation mit einem Kinderlaryngoskop (McIntosh-Laryngoskopspatel der Größe 0, seitlich schmal geschliffen, Wamed Medizintechnik, Starnberg, Deutschland) durchgeführt, wobei als Tubus eine großlumige Venenverweilkanüle (Braunüle 14G oder 16G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) benutzt

Material und Methoden

wird. Der gekürzte Führungsdraht eines zentralen Venenkatheters (ZVK) dient während der Intubation als Führungsschiene. Anschließend wird der Tubus mittels Faden auf dem Nasenrücken hinter den Barthaaren und den Incisivi fixiert und eventuell zusätzlich mit Klebeband gesichert. Neben den Zungengrund werden feuchte Gaze-Stücke gelegt, um das Austrocknen der Mundhöhle zu verhindern. Die Augen werden mit Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) oder mit feuchten Tupferstücken geschützt.

Nach der Intubation wird das Tier sofort an ein Beatmungsgerät (Inspira Advanced Safety Ventilator, Volume-Controlled, Harvard Apparatus) angeschlossen. Das Beatmungsgerät wird initial auf ein Atemzugvolumen von 1,05 ml pro 100 g Körpergewicht der Ratte und eine Atemfrequenz von 75 Zügen pro Minute eingestellt, wobei diese Werte anhand arterieller Blutgasanalysen angepasst werden (ABL 510, Radiometer GmbH, Willich, Deutschland). Die $p\text{CO}_2$ -Werte (Partialdruck) sollen optimalerweise in einem Bereich von 38 – 42 mmHg liegen. Da bei einer wachen Ratte die Atemfrequenz zwischen 70 und 150 Atemzügen pro Minute liegt, bietet die Einstellung der Beatmungsfrequenz den nötigen Spielraum zur Nachregulation bei deutlich abweichenden Werten. Initial werden die Tiere mit 100% Sauerstoff beatmet und erst nach der Ermittlung der Basisblutgaswerte auf ein halb-geschlossenes Niedrigflusssystem umgestellt. Dabei wird nur etwas mehr Frischgas zugeführt, als verbraucht wird. Diese Maßnahme dient auch der Einsparung des teuren Xenons. Da eine längere Beatmungsdauer mit 100% Sauerstoff vermieden werden soll, wird eine Sauerstoffkonzentration von 30% angestrebt. Die restlichen 70% werden in dem zugeführten Gasgemisch durch Stickstoff beziehungsweise in den Xenon-Gruppen durch das Edelgas gestellt. Die Regulation des Flusses erfolgt mittels eines Durchflussmessers. Die vom Tier ausgeatmete Luft wird über einen CO_2 -Absorber (Drägersorb 800 Plus, Dräger Medical AG u. Co KG, Lübeck, Deutschland) geleitet und über das Beatmungsgerät wieder dem Tier zugeführt. Die angestrebte Sauerstoffkonzentration von 30% wird mit Hilfe einer in den Inspirationsschenkel des Kreisteils geschalteten Sauerstoffmesszelle (Oxycom 100D, Drägerwerk AG Lübeck, Lübeck, Deutschland) ermittelt und der Fluss mit Hilfe des Durchflussmessers reguliert.

Das intubierte Tier wird in Rückenlage auf einer festen Unterlage mit Heizmatte (Small Homeothermic Blanket, Hugo Sachs Elektronik/Harvard Apparatus GmbH, March-

Material und Methoden

Hugstetten, Deutschland) plziert. Die Heizmatte ist über ein rektal eingeführtes Thermometer (Flexible Probe, Harvard Apparatus) rückgekoppelt; dies gewährleistet das Aufrechterhalten einer konstanten Körpertemperatur von 37°C bzw. in der Phase der Hypothermie in den entsprechenden Tiergruppen (siehe Kapitel „Planung der Versuchsgruppen“) einer Temperatur von 34°C. Für den Versuch ist die Bestimmung und Kontrolle der Hirntemperatur von großer Bedeutung. Zu diesem Zweck wird die perikranielle Temperatur am Kopf mittels einer in den Musculus temporalis eingestochenen Messsonde (MT-23/3 Needle Microprobe, BioMedical Instruments/Dr. Joachim Gründel, Zöllnitz, Deutschland) gemessen. Über ein Kontrollgerät (TCAT-2AC Temperature Controller, BioMedical Instruments/Dr. Joachim Gründel, Zöllnitz, Deutschland) ist diese Sonde mit einem Infrarotwärmestrahler gekoppelt. Auf diese Weise kann die Kopf­temperatur exakt kontrolliert werden. EKG-Stichelektroden dienen der kontinuierlichen EKG-Ableitung und so der weiteren Überwachung des Tieres (SC 7000, Siemens AG, Nürnberg, Deutschland).

5.6.4 Präparation der Schwanzarterie

Für die angestrebte direkte beziehungsweise invasive Blutdruckmessung und zur Entnahme arterieller Blutproben ist es notwendig, eine Arterie zu kanülieren. Da die Schwanzarterie relativ leicht zugänglich ist, wird diese ausgewählt. Außerdem behindern möglicherweise auftretende Schwellungen nicht die Bewegungsfähigkeit des Tieres, was für die Durchführung motorischer Tests besonders wichtig ist. Das Tier befindet sich nach wie vor in Rückenlage. Zur Präparation der Schwanzarterie muss die Haut entfettet und gereinigt werden (Softasept N, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), anschließend wird der betroffene Schwanzabschnitt mittels einer Skalpellklinge vorsichtig rasiert.

Danach erfolgen die Hautinzision und das stumpfe Präparieren bis zur Faszie. Diese wird mit einem scharfen Skalpell (Swann Morton, Sheffield, England) vorsichtig inzidiert und mit dem Skalpell dem Arterienverlauf folgend eröffnet. Die Arterie muss nun vorsichtig vom umgebenden Gewebe freipräpariert werden. Das Auftropfen von einigen Tropfen Bupivacain (Carbostesin 0,25%, AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) dient der Vasodilatation. Überschüssiges Lokalanästhetikum erschwert das weitere Vorgehen und wird mit einem Tupfer entfernt. Anschließend wird die Arterie mit Hilfe einer gebogenen Uhrmacherpinzette (Hogetu, Gosheim, Deutschland) vorgelagert. Dabei sollte etwas Blut

Material und Methoden

im Lumen verbleiben, dies erleichtert die Punktion und das Verschieben des Katheters. Die Arterienpunktion erfolgt mittels einer umgebogenen Kanüle. Die Kanülenspitze wird für diesen Zweck mit einem Nadelhalter im 90° Winkel zurechtgebogen wobei der Schliff der Kanüle nach oben zeigt. Die Kanüle wird in das Gefäß eingestochen und dieses damit auch etwas fixiert. Nun wird am Kanülenschliff entlang ein 3 French-PE-Katheter (3 F-Katheter, Dispomedica GmbH, Hamburg, Deutschland) eingeführt. Dieser wird zur Erleichterung des Einführens angeschrägt und abgeschnitten, sowie zuvor mit Vollelektrolytlösung gespült. Als Spüllösung dient eine Ringer-Lösung (500 ml, B. Braun, Melsungen AG, Deutschland) der Heparin (Heparin-Natrium 25000-ratiopharm, Ratiopharm, Ulm, Deutschland; 10 IE pro ml) zugefügt wurden. Unter Zuhilfenahme einer feinen Pinzette wird das Gefäß vorsichtig über den Katheter gezogen. Danach wird das Gefäß am Katheter mittels chirurgisch geknoteten feinen Fadens fixiert und das Gefäß kaudal davon abgebunden. Die freigelegte Arterie wird mit feuchter Gaze vor dem Austrocknen bewahrt und der Katheter mit Klebeband zusätzlich am Schwanz befestigt (Durapore Medizinisches Pflaster, Neuss, Deutschland). Anschließend testet man vorsichtig die Durchgängigkeit des Katheters und schließt ihn über ein Combitrans Monitoring-Set (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) an einen Perfusor (B. Braun Melsungen AG) und einen Monitor (SC 7000, Siemens AG, Nürnberg, Deutschland) an. Durch das Anschließen an den Perfusor wird der arterielle Zugang ständig mit einer heparinisierten Natriumchlorid-Lösung (500 ml, B. Braun, Melsungen mit Heparin versetzt; 10 IE pro ml) mit einer Rate von 1,3 ml pro Stunde gespült.

5.6.5 Weiteres Monitoring

Die Augen sind nach den Umlagerungen immer wieder mit Bepanthensalbe zu versorgen. Wie oben beschrieben, wird zur Messung der Körpertemperatur eine Rektalsonde eingeführt (Bepanthensalbe) und zunächst mittels Klebeband an einem Hinterbein fixiert. Sobald die Schwanzarterie kanüliert ist, kann das Verbindungskabel ebenfalls am Schwanz festgeklebt werden. Die perikranielle Temperaturmessung erfolgt, wie bereits erwähnt, mittels einer in den Musculus temporalis eingestochenen Sonde. Zur Platzierung der Temperatursonde wird diese zunächst auf den Knochen zu eingestochen und dann im Muskel parallel zur Knochenoberfläche vorgeschoben. Diese Temperatursonde ist mit einem Infrarotwärmestrahler gekoppelt und ermöglicht über

Material und Methoden

einen Rückkopplungs-Mechanismus die Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur am Kopf von ebenfalls 37°C bzw. in der Hypothermiegruppe einer Temperatur von 34°C. Diese Sonde wird mit breitem Klebeband leicht am Körper fixiert, um zu starke Bewegungen der Sonde im Muskel bei Umlagerungen zu vermeiden. Diese würden zu einer unnötigen Traumatisierung des Muskels führen.

Vor dem Eingriff werden eine erste Blutgasanalyse und Glukose-Messung (BGA-Gerät ABL 510 Radiometer GmbH, Willich, Deutschland; Accu-Check Sensor, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland und Messstreifen Accu-Check Sensor Comfort Pro Glucose) vorgenommen und als Basiswerte vermerkt. Mit Hilfe dieser ersten Messergebnisse wird die Beatmung angepasst.

5.6.6 Vorbereitung des Schädelhirntraumas

Zur Umlagerung der Ratte in Brustbauchlage wird sie kurz von der Beatmung abgekoppelt. Das Tier wird nach dem Umdrehen sofort wieder an das Beatmungsgerät angeschlossen. Dem Hautschnitt am Kopf in der Medianen geht wieder die Rasur des Felles voraus. Das Fell wird zunächst grob mit einem Philips Multitrim QG 3040 (Royal Philips Electronics, Amsterdam, Niederlande) entfernt, anschließend erfolgt eine Nacharbeitung mit der Skalpellklinge und das Aufsprühen des Hautdesinfektionsmittels. Die Präparation bis auf den Schädelknochen erfolgt nach einem Hautschnitt stumpf mit einer Schere. Als lokale Betäubungsmaßnahme wird Bupivacain auf das empfindliche Periost aufgetropft und dieses dann mittels eines Raspatoriums entfernt. Nun wird ein Metall-Schutzhelm, dabei handelt es sich um eine Stahlscheibe mit einem Durchmesser von 1 cm und einer Stärke von 3 mm an der stärksten Stelle, die an der Unterseite zur Aufnahme des Klebers konkav ist (Anfertigung in der Werkstatt des Physiologischen Institutes, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen), mit Zahnzement (Zweikomponentenkleber, Easy Mix Ketac Cem, ESPE Dental AG, Seefeld, Deutschland) auf den Schädelknochen aufgeklebt. Durch diesen Schutz sollen Schädelfrakturen und somit auch unkontrollierte Blutungen vermieden werden. Anschließend wird das gesamte Tier auf einer Schaumstoffunterlage gelagert, der Kopf wird zusätzlich mit einem Schaumstoffpolster unterlegt, dies ermöglicht die plane Ausrichtung des Kopfes mit dem Schutzhelm unter dem Fallrohr.

Ein modifiziertes Fallrohr wird an einem Stativ befestigt und mit Hilfe einer Wasserwaage senkrecht ausgerichtet. Bei dem Fallrohr handelt es sich um eine

Material und Methoden

Spezialanfertigung aus einer Gardinenstange mit einem Innendurchmesser von 21 mm und einem Außendurchmesser von 25 mm, die mit mehreren Bohrungen versehen ist (1,5 m lang, Werkstatt des Physiologischen Institutes, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen). In einem Abstand von 5 mm über dem Kopf des Tieres wird dieses Rohr installiert. Ein Gewicht von 454 g (Einzelgewicht aus Messing gefertigt, mit einem Durchmesser von 20 mm und einer Länge von 16,8 cm) wird aus 100 cm Höhe durch das Rohr auf den zentral liegenden Schutzhelm fallen gelassen und danach das Tier sofort unter dem Rohr weggezogen, um einen erneuten Aufprall zu vermeiden.

Während des gesamten Versuchs werden eventuell auftretende Reaktionen des Tieres genau beobachtet und führen gegebenenfalls zu einer Anpassung des Versuchsablaufes hinsichtlich der Narkosetiefe oder der Schmerzmittelgabe.

5.6.7 Einleitung von Xenon

Das Einleiten von Xenon in den Beatmungskreislauf erfolgt durch das Öffnen des entsprechenden Ventils. An dem Druckminderer der Xenon-Flasche ist ein geeichter Durchflussmesser angebracht. Mit diesem wird eine Voreinstellung vorgenommen. Mit Hilfe der gemessenen Sauerstoffkonzentration (Sauerstoffmesszelle Oxycom 100D, Drägerwerk AG Lübeck, Lübeck, Deutschland) und eines zweiten Durchflussmessers wird die zugeleitete Menge des Edelgases reguliert. Da zunächst 100% Sauerstoff zugeführt werden, kann nach Zuleitung von Xenon dessen Konzentration mit 100% abzüglich der Sauerstoffkonzentration in Prozent angenommen werden.

5.6.8 Kühlung

Die Tiere der Hypothermie-Gruppen sollen auf eine Körper- und Hirntemperatur von 34°C heruntergekühlt werden. Dazu werden handelsübliche mit Gel gefüllte Kalt-Warm-Mehrfachkompressen aus der Apotheke unter den Körper des Tieres und auch auf das Tier gelegt. Die Kontrollgeräte der Heizmatte und des Infrarotwärmestrahlers werden von 37°C auf 34°C heruntergeregelt, um bei Erreichen der Zieltemperatur diese auch konstant halten zu können. Ohne rechtzeitiges Gegensteuern droht der Körper zu stark abzukühlen. Mit Hilfe der Gelkompressen und der Infrarotlampe wird die Temperatur auf dem angestrebten Niveau gehalten. Die Kühlphase beginnt 30 Minuten nach dem Trauma und wird 15 Minuten vor der

Material und Methoden

Narkoseausleitung beendet. Die Tiere werden wieder auf die Ausgangskörpertemperatur aufgewärmt. Dies erfolgt mit Hilfe der Heizmatte und des Infrarotwärmestrahlers. Eine überschießende Erwärmung der Körpertemperatur auf über 37°C ist dabei auf jeden Fall zu vermeiden.

5.6.9 Narkoseausleitung

Nach der Auslösung des Schädelhirntraumas werden die Tiere auf das Vorhandensein von Frakturen und starken Blutungen kontrolliert. Liegen diese nicht vor, wird die Kopfhaut mit einem feinen Faden vernäht (Ethicon Vicryl 3-0, geflochten, chirurgisches Nahtmaterial, Johnson-Johnson, St-Stevens-Woluwe, Belgien), wobei der aufgeklebte Schutzhelm belassen wird. Die Narkose inklusive der Beatmung wird nach dem Trauma für 180 Minuten aufrechterhalten, danach erfolgt die Narkoseausleitung. Der Katheter muss aus der Schwanzarterie entfernt werden. Dazu wird die Befestigung gelöst, der Katheter zunächst nur ein Stück zurückgezogen, das Gefäß abgebunden und nun der Katheter vollständig entfernt. Der Zugang zur Schwanzarterie wird vernäht. Zum Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes und als Vorbeugemaßnahme werden zu Beginn und gegen Ende des Versuches je zirka 2 ml Vollelektrolytlösung auf zwei Stellen verteilt als Flüssigkeitsdepot unter die Haut injiziert. Nach dem Einsetzen der Spontanatmung und der Rückkehr der Reflexe wird das Tier von dem Beatmungsgerät getrennt. Der Tubus wird zunächst belassen, um bei Bedarf zähen Schleim absaugen zu können.

Sobald die Ratte in der Lage ist, den Kopf zu heben und den Tubus fast schon selbst entfernen kann, wird das Tier extubiert und zur weiteren Beobachtung in einen Laborkäfig umgesetzt. Bei Hinweisen auf Schmerzen wird die Standard-Schmerztherapie mit Metacam (siehe unten) durch weitere Schmerzmittelgaben ergänzt.

5.6.10 Unterstützende Maßnahmen

Präparationsbedingt sowie durch die Blutentnahmen für die Messungen verlieren die Tiere etwas Blut. Bei einer Blutmenge von 5 bis 8 ml pro 100 Gramm Körpermasse bedeutet dies einen nicht zu vernachlässigenden Verlust. Zur Unterstützung des Kreislaufs der Tiere wird zu Beginn und kurz vor Ende des Versuches Vollelektrolytlösung subkutan verabreicht. Dies kann den Blutverlust nicht ausgleichen,

Material und Methoden

soll den Tieren aber vor allem in der postoperativen Phase helfen, sich schneller zu erholen.

5.6.11 Postoperative Untersuchungen

An den Tagen nach dem Eingriff wird das Allgemeinbefinden der Tiere regelmäßig kontrolliert und dabei besonders auf neurologische Veränderungen geachtet. Das aktuelle Gewicht, außerdem Futter- und Wasseraufnahme sowie auch Kot- und Urinabsatz werden in einer Tabelle notiert. Am 7. Tag nach der Induktion des Schädelhirntraumas erfolgt die Entnahme der Gehirne.

5.6.12 Schmerzmittelgabe

Zur Reduktion der Schmerzen wird Meloxicam (Metacam[®]) eingesetzt. Von der 5 mg/ml Injektionslösung (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland) werden 1 bis 2 mg/kg Körpergewicht subkutan verabreicht. Dies entspricht einer Menge von 0,02 bis 0,04 ml pro 100 g Ratte. Alternativ können 2 bis 4 Tropfen pro 100 g Körpergewicht der Metacam-Suspension[®] für Hunde per os verabreicht werden. Kombiniert können 1 bis 2 Tropfen Metamizol (Novalgin-Tropfen Ratiopharm) per os alle sechs Stunden gegeben werden.

5.7 Tötung der Versuchstiere zur Gehirnentnahme nach Perfusion

Die Tiere werden sieben Tage nach dem Eingriff unter möglichst stressfreien Bedingungen getötet. Zum jeweiligen Tötungszeitpunkt werden die Ratten in einen Narkosegastopf (modifiziertes IKEA-Vorratsbehältnis) verbracht, in den Isofluran (Baxter international Inc., Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) eingeleitet werden kann (Vapor, 5 Vol% bei hohem Sauerstoff-Fluss). Sobald die Ratten ausreichend betäubt sind, erfolgt die Intubation und das Anschließen an das Beatmungsgerät, wie oben bereits beschrieben. Die Isoflurankonzentration wird bei 5 Vol% belassen. Zusätzlich wird intraperitoneal 1 ml Thiopental Inresa 0,5 g injiziert (Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland; Pulver mit 20 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst). Reagieren die Tiere nicht mehr auf Schmerzreize, der

Material und Methoden

Tiefenschmerz wird mit Hilfe einer Klemme an einer Gliedmaße überprüft, wird die Bauchhöhle mittels einer feinen spitzen Schere (chirurgische Schere, Hogetu, Gosheim, Deutschland) eröffnet und der Thorax von dort aus zugänglich gemacht. Eine 14G-Braunüle wird in den linken Ventrikel des Herzens eingestochen und die Leber an mehreren Stellen eingeschnitten. Dies ermöglicht das Herauslaufen des Blutes. Sofort werden die Tiere mit 200 ml PVP-Lösung (siehe Anhang „Lösungen“) und anschließend mit 100 ml 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (siehe Anhang „Lösungen“) perfundiert. Die Perfusion mit PFA erfolgt unter dem Abzug.

Es folgt die Entnahme des Gehirnes. Dazu wird der Kopf unter Zuhilfenahme eines Skalpellles vom Rumpf getrennt. Die Kopfhaut muss in Höhe der Ohren beginnend nach rostral bis zu den Augen entfernt werden. Darauf folgt die teilweise Abpräparation des Musculus temporalis auf beiden Seiten des Schädelknochens. Der knöcherne Schädel wird vom Foramen magnum ausgehend nach rostral mit einer Arterienklemme (Hogetu, Gosheim, Deutschland) Stück für Stück eröffnet. Die Dura mater wird mit einer Skalpellklinge (Surgical Blades; Swann-Morton Limited, Sheffield, England) vorsichtig entfernt und das Gehirn nach Durchtrennung der Nervi optici und Nervi trigemini entnommen. Dieses wird anschließend in einem Wheaton-Szintillations-Fläschchen 20 ml (neoLab Migge, Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland) in 4%iger PFA-Lösung eingelegt. Nach vierundzwanzig Stunden wird es in 30%ige Sucrose-Lösung (siehe Anhang „Lösungen“) umgebettet. In der Zuckerlösung kann es zu einem Verderb des Gehirns durch Schimmelpilze und Bakterien kommen. Da es für das weitere Vorgehen ohnehin erforderlich ist, wird das Gehirn eingefroren. Dies erfolgt sobald das Gehirn in der Sucrose-Lösung auf den Boden des Gläschens gesunken ist. Ein größerer Tropfen Tissue Tek (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) wird auf ein Stückchen zurechtgeschnittenes Filterpapier (Rundfilter, Schleicher und Schuell MicroScience GmbH, Dassel, Deutschland) gegeben und in flüssigem Stickstoff angefroren. Das Gehirn wird aus dem Wheaton-Gläschen mittels einer Pinzette entnommen. Da das Kleinhirn für die weitere Untersuchung nicht von Interesse ist, wird es abgetrennt. Das verbleibende Gehirn wird in die Mitte des Tissue Tek-Kleckses gegeben. Dabei steht es auf dem Kleinhirnstumpf. Das Gewebe wird kurz angefroren und dann mit Tissue Tek möglichst gleichmäßig umgeben. Das Filterpapier wird entsprechend der Versuchsnummer beschriftet. Bis zur weiteren Verarbeitung wird das Gewebe bei -20°C gelagert.

5.7.1 Schneiden der Gehirne

Die nach der Tötung der Tiere entnommenen und bei -20°C gelagerten Gehirne werden mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Leica CM 1900, Firma Leica, Bensheim, Deutschland) geschnitten. Dazu wird jeweils ein Gehirn im Innenraum des Kryostaten mit Tissue Tek auf einem Objektisch befestigt und dieser anschließend im Probenblock fixiert. Eine Temperatur von -22°C wird eingestellt, da diese sich für das Schneiden des empfindlichen Gewebes als günstig erwiesen hat. Die Proben verbleiben für einige Minuten in dem Kryostaten, um sich der Temperatur anzupassen, bevor mit dem Schneiden begonnen wird. Der Messerblock steht in einem Winkel von 4° zur Gewebeoberfläche. Sobald der für die Auswertung relevante Bereich aufgefunden wird, werden Schnitte von 8 bis $10\ \mu\text{m}$ Dicke von rostral nach caudal (coronare Schnitte) angefertigt. Diese werden vorsichtig auf einen, bei Raumtemperatur gelagerten, SuperFrost-Objektträger (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) aufgefangen. Dies geschieht, indem man den Objektträger direkt über den Schnitt hält, dieser haftet dann sehr leicht an dessen Oberfläche an. Anschließend müssen die Schnitte zirka eine Stunde bei Raumtemperatur antrocknen und können dann direkt verwendet werden oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C in Kladden gelagert werden.

Alternativ zu der eben beschriebenen Methode kann das Gewebe auch nach der Perfusion in Paraffin eingebettet werden. Nach der Entnahmen müssen die Gehirne für zwei Tage in 4%iger PFA-Lösung eingelegt werden und anschließend für 3 bis 4 Stunden in Leitungswasser gewaschen werden. Vor der Einbettung in Paraffin durchläuft das Gewebe eine aufsteigende Alkoholreihe (30%, 40%, 50%, 60%, 70%). Eingeschlossen von dem Paraffinwachs ist das Gewebe haltbar und lässt sich sehr dünn ($5\ \mu\text{m}$) schneiden. Die Schnitte sind zunächst etwas gewellt und werden in einem kalten Wasserbad (Aqua dest.) auf einen Super-Frost-Objektträger aufgezogen und in einem warmen Wasserbad (Aqua dest.) gestreckt. Für eine anschließende Hämatoxylin-Eosin-Färbung müssen die Objektträger bei 60°C für 20 bis 30 Minuten in einen Wärmeschrank gelegt werden und können dann direkt weiterbearbeitet werden. Andernfalls können die Objektträger über Nacht hängend gelagert trocknen. Da diese Bearbeitungsmethode zunächst nur versuchsweise durchgeführt werden sollte, werden keine frisch entnommenen Gehirne verwendet. Stattdessen kommen bereits eingefrorene

Material und Methoden

Gehirne zum Einsatz, die zu diesem Zweck wieder aufgetaut werden müssen. Die Einbettung wird im Gewebeatwässerungs- und -einbettautomaten TissueTek VIP 5Jr (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) des Institutes für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (kommissarischer Leiter Prof. Dr. med. K. Kuchelmeister) durchgeführt. Ein auf diesem Wege bearbeitetes Gehirn ist schon während des Schneidens brüchig. Die gewonnenen Schnitte lassen sich nicht ohne Qualitätsverlust auf Objektträger aufziehen. Es ist anzunehmen, dass diese Mängel bei entsprechend anders behandeltem Gewebe nicht auftreten. Darüber hinaus kann frisch entnommenes Gehirn in seiner Größe noch reduziert werden, das heißt man kann für die Untersuchung weniger relevante Bereich gleich abtrennen. Das übrigbleibende Gewebe wird besser von den Lösungen und dem Paraffin durchdrungen, dies könnte zu einem Qualitätsgewinn führen.

5.8 Einwaschversuche

Für die Einwaschversuche mit Xenon wird eine Messmethode benötigt, die Auskunft über die im System vorhandene Xenonkonzentration gibt. Da eine direkte Messung von Xenon, wie oben schon beschrieben aufwändig und teuer ist, wird stattdessen die Sauerstoffkonzentration im Beatmungssystem mit Hilfe einer Sauerstoffmesszelle (Oxycom 100D, Drägerwerk AG Lübeck, Lübeck, Deutschland) kontrolliert. Da während des Einwasches kein anderes Gas eingesetzt wird, kann die Xenonkonzentration mit 100% abzüglich der ablesbaren Sauerstoffkonzentration in Prozent angenommen werden. Zunächst wird eine Sauerstoffkonzentration von 100% angestrebt und nach zehnminütiger Aufrechterhaltung dieses Wertes Xenon zugeleitet. Vor Erreichen der Angestrebten Xenonkonzentration von 70% wird das System zum Sparen des teuren Edelgases auf ein halb-geschlossenes Niedrigflusssystem umgestellt. Ab diesem Zeitpunkt wird dem Kreislaufsystem nur noch wenig mehr Frischgas zugeführt, als verbraucht wird. Das Gasgemisch zirkuliert. Die Sauerstoffkonzentration muss zu diesem Zeitpunkt immer wieder kontrolliert und gegebenenfalls nachreguliert werden. Die entsprechenden Werte werden notiert. Der Auswasch des Xenons erfolgt durch Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im Kreislauf.

Die Hypothermie wird durch auf- beziehungsweise unterlegen von handelsüblichen Kalt/Warm Mehrfach-Kompressen (K.-H. Kaiping Import-Vertrieb, Steinberg,

Material und Methoden

Deutschland; in den Größen 13x14 cm und 12x30 cm) erreicht. Gleichzeitig werden die Kontrollgeräte des Infrarotwärmestrahlers (TCAT-2AC Temperature Controller, BioMedical Instruments/Dr. Joachim Gründel, Zöllnitz, Deutschland) und der Heizmatte (Small Homeothermic Blanket, Hugo Sachs Elektronik/Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) auf eine Solltemperatur von 34°C eingestellt. Zunächst wird der ganze Körper der Ratte auf einer gelgefüllten Kalt/Warm Mehrfach-Kompresse gelagert, das im Gefrierfach eines Kühlschranks zuvor benutzbar gemacht wurde. Zusätzlich lagert ein kleineres Gelpaket auf dem Kopf des Tieres. Die perikranielle und die rektale Temperatur des Tieres werden regelmäßig kontrolliert und die Werte aufgezeichnet. Zur Vermeidung einer zu starken Auskühlung wird das unter dem Tier liegende Gelpaket vor dem Erreichen der gewünschten Temperatur entfernt. Kleinere, zum Teil nur im Kühlschrank gelagerte Kalt/Warm Mehrfach-Kompressen werden nun zur Konstanterhaltung der Temperatur benötigt. Die Wiedererwärmung wird mit Hilfe des Infrarotwärmestrahlers und der Heizmatte vorgenommen. Die Kontrollgeräte werden zu diesem Zweck wieder auf eine Solltemperatur von 37°C eingestellt. Einer überschießenden Erwärmung wird mit Hilfe der gekühlten Gelpakete entgegengewirkt. Die Einwaschversuche sind aus praktischen Gründen kürzer als es in der Planung der Versuche eigentlich vorgesehen ist. Ein Langzeitversuch beweist jeweils aber auch die Möglichkeit zur Aufrechterhaltung beider Methoden über einen längeren Zeitraum.

5.9 Schaumstofftests

Da sich mit den durchgeführten histologischen Untersuchungsmethoden ein Trauma im Gehirn nicht nachweisen lässt (siehe Kapitel „Ergebnisse und Auswertung“), werden andere Methoden als Alternative in Betracht gezogen. Beispielsweise verursacht eine traumatische Hirnverletzung häufig eine Störung der Blut-Hirn-Schrankenfunktion. Zum Sichtbarmachen einer auftretenden Störung, injiziert man den Tieren einen Farbstoff, der bei normaler Funktion der Blut-Hirn-Schranke diese nicht passieren kann. Wird die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke nun beschädigt, tritt der Farbstoff in das Gewebe über und kann makroskopisch dargestellt werden. Verwendet wird ein blauer Farbstoff, das sogenannte Evans Blau (auch: Evans Blue), der sich im Blut an Albumin bindet (Hatashita & Hoff, 1990). Albumin ist ein relativ großes Molekül, das die intakte

Material und Methoden

Blut-Hirn-Schranke nicht zu überwinden vermag. Diese relativ einfache Methode eignet sich für Austestungsverfahren besonders gut.

Die Tiere werden für den Versuch, wie oben schon ausführlich beschrieben, mit einem intravenösen Zugang versorgt. Die Narkoseeinleitung erfolgt über diesen Zugang mit einem Bolus von Fentanyl und Propofol (siehe Kapitel „Versuchsdurchführung“). Die Aufrechterhaltung der Narkose wird aus Gründen der besseren Verträglichkeit für die Tiere und der Zeitersparnis mit Isofluran durchgeführt. Eine intravenöse Verabreichung des Farbstoffes Evans Blau vor Induktion des Traumas, wie zunächst praktiziert, erweist sich als nachteilig. Ein Kontrolltier, das nur den Farbstoff erhalten hat, zeigt 24 Stunden später ein stark gestörtes Allgemeinbefinden. Zum Ausschluss solcher ungewollten Nebenwirkungen des Farbstoffes wird dieser 24 Stunden nach Induktion des Traumas gegeben. Dazu werden 0,1 g des Farbstoffes (Evans Blau, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) abgewogen und mit 1 ml einer physiologischen Kochsalzlösung aufgelöst. Die Tiere erhalten 2 ml pro Kilogramm Körpergewicht dieser Lösung. Nach einer Zirkulationszeit von einer Stunde wird die Ratte, wie ebenfalls schon beschrieben, in tiefer Allgemeinanästhesie perfundiert und anschließend das Gehirn entnommen. Dieses wird bei -20°C angefroren, um es leichter schneiden zu können. Zur Dokumentation wird das Gehirn mit einer Rasierklinge in zirka 2 mm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Fotoscanner (HP Scanjet G2710 Photo Scanner, Hewlett Packard Company, Palo Alto, USA) gelegt. Ein schwarzer Hintergrund sorgt für den nötigen Kontrast. Die Hirnscheiben können in 4%igem Paraformaldehyd gelagert werden.

5.9.1 Neurologischer Test mit dem Rota-Rod

Neurologische Tests dienen der Beurteilung der senso-motorischen und kognitiven Fähigkeiten nach einer Schädelhirnverletzung. Für aufwändige Testverfahren, wie zum Beispiel den Morris water maze Test (Morris, 1984), benötigt man einen eigens dafür geschulten Untersucher. Wesentlich einfacher lassen sich die motorischen Fähigkeiten der Tiere mit Hilfe eines Laufrades untersuchen (Irwin, 1968; O'Connor *et al.*, 2003; Hoeger *et al.*, 2006). Die Geschwindigkeit des Laufrades (Rota-Rod Treadmills Model 755, IITC Inc., Woodland Hills, Kalifornien, USA), auf das die Tiere gesetzt werden, erhöht sich kontinuierlich. Das Tempo steigert sich von 0 Umdrehungen pro Minute alle 10 Sekunden um 3 Umdrehungen pro Minute. Das Testtier soll die Endgeschwindigkeit

Material und Methoden

von 30 Umdrehungen pro Minute für mehrere Sekunden bewältigen können. Der Zeitpunkt, an dem das Tier vom Laufrad herunterfällt, wird als Laufrad-Score in Sekunden gemessen.

Zur Vorbereitung des neurologischen Testes müssen die Tiere zunächst an das Gerät und die darin entstehenden Geräusche gewöhnt werden. Die Versuche werden immer von derselben Person durchgeführt und finden immer Vormittags zu etwa der gleichen Zeit statt. Die Fenster des Untersuchungsraumes sind mit einem Vorhang abgedunkelt und die Deckenbeleuchtung bleibt ausgeschaltet. Zu viel Licht ist für dämmerungs- und nachtaktive Tiere unangenehm. Besonders stark davon betroffen sind Albinotiere, denen jegliche Farbpigmente fehlen. Darüber hinaus verursachen Neonröhren ein unruhiges Summen, welches die Tiere zusätzlich irritieren könnte. Ein ruhiger Umgang mit den Tieren ist Voraussetzung für diese Art von Versuch. Das Gerät verfügt in jeder Bahn über eine Wippe, die durch ein darauf herabfallendes Tier eine Lichtschranke unterbricht und dadurch die Zeit für das jeweilige Tier stoppt. Für die Gewöhnungsversuche wird die Wippe einfach ausgebaut und die Tiere zunächst nur auf den Boden des Gerätes gesetzt. In einem nächsten Schritt wird das Gerät angestellt. Das Laufrad beginnt sich mit wenigen Umdrehungen pro Minute zu bewegen, verursacht dabei aber für die Ratten ungewohnte Geräusche und Vibrationen. An darauffolgenden Versuchstagen werden die Tiere auf das bereits laufende Rad gesetzt. Die Oberfläche ist leicht aufgeraut, damit sie nicht so leicht abrutschen können. Die Fallhöhe ist so gering, dass für die Tiere keine Verletzungsgefahr besteht. Mit ihrem langen Schwanz lösen Ratten leicht die Wippe aus, dadurch wird jedes Mal das Laufrad gestoppt. In den folgenden Versuchen bleibt die Wippe ausgebaut und die Zeit wird manuell gestoppt. Da aber jedes Mal nur ein Tier in dem Gerät sitzt, ist dies ohne weiteres möglich. Darüber hinaus zeigt sich, dass die Tiere auch weiterhin bei schon laufendem Gerät auf das Rad gesetzt werden müssen, da sie sonst das Interesse verlieren. Die Ratten lassen sich bei noch geringer Umdrehungsgeschwindigkeit fallen oder versuchen nach oben aus dem Gerät herauszuklettern. Hält der Untersucher eine Hand unterhalb des Laufrades vor die Tiere, erkennen diese darin ein zu erreichendes Ziel und laufen kontinuierlich weiter auf dem Rad. An jedem Trainingstag werden mehrere Durchgänge, jeweils im Abstand von etwa fünf bis zehn Minuten mit den Tieren durchgeführt. Etwa fünf aufeinanderfolgende Durchläufe erweisen sich als Ideal. Da es sich hierbei nur um Vorversuche handelt, werden insgesamt nur drei Tiere über einige Zeit im Laufrad trainiert. Zwei dieser trainierten Ratten erhalten ein Trauma.

5.10 Färbemethoden

5.10.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Färbung mit Hämatoxylin und Eosin werden die angefertigten Gefrierschnitte beziehungsweise die Paraffinschnitte verwendet. Hämatoxylin wird aus dem roten Kernholz des Campechebaumes (Südamerika) gewonnen. Anschließend wird es zu Hämatein/Oxyhämatein oxidiert. Sogenannte Alaunhämatoxyline werden für die Kernfärbung eingesetzt. Meistens wird das saure Hämalaun nach Mayer verwendet. Dieses wird mit Natriumjodat und Kalialaun hergestellt und ist von rotvioletter Farbe. Mit Hämatoxylin muss progressiv gefärbt werden, das heißt eine Kontrolle des Färbeergebnisses von Zeit zu Zeit ist dringend notwendig. Eine Überfärbung lässt sich durch Waschen in Leitungswasser nicht korrigieren. Für die Gegenfärbung wird Eosin benutzt, dabei handelt es sich um einen sauren Teerfarbstoff (Plasmafärbung), der in verschiedenen Rottönen färbt (Romeis, 1989). Die Gefrierschnitte werden für diese Färbung aus dem Gefrierfach entnommen und müssen zunächst etwa eine Stunde bei Raumtemperatur antrocknen. Dann werden sie nach dem Arbeitsprotokoll für Gefrierschnitte gefärbt (Protokoll aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen; siehe Anhang „Färbeprotokolle“). Die Paraffinschnitte können erst nach dem Herauslösen des Paraffins bearbeitet werden. Dieses Herauslösen erfolgt in umgekehrter Richtung der Einbettung, das heißt zunächst wird das Lösungsmittel Xylol eingesetzt und anschließend wird das Gewebe mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe wieder hydratisiert. Bei der Färbung mit Hämalaun nach Mayer (Herstellung im Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen), verbleiben die Objektträger für 10 Minuten in der Farbstoff-Küvette. Durch das nachfolgende Spülen in Leitungswasser führt man Hämatoxylin in seine blaue Form über, dieser Vorgang wird deshalb auch Bläuen genannt. Durch das Waschen mit Leitungswasser wird ein pH-Wert größer als drei erreicht, Säurereste werden entfernt und es kommt zum Farbumschlag. Gleichzeitig kommt es dabei zu einer Fixierung der Färbung, da die Farbe im alkalischen Milieu schlecht löslich ist. Die Haltbarkeit des Präparates wird positiv beeinflusst. Für 30 Sekunden werden die Schnitte mit Eosin (0,5%ige Konzentration, Herstellung im Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, Essigsäure zum Ansäuern hinzufügen; Essigsäure 100%, Merck, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt. Das Eindecken der

Material und Methoden

Schnitte beginnt mit einer aufsteigende Alkoholreihe, diese dient der Dehydratation des Gewebes. Da sich das Eindeckmedium nicht mit Wasser und Alkohol verträgt, werden die Schnitte in RotiHistol (Firma Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) verbracht, welches als Zwischenmedium dient. Nach diesem Klärungsschritt im Lösungsmittel (RotiHistol) werden sie mit einem Eindeckmedium RotiHistoKitt (Firma Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) und einem Deckgläschen bedeckt. Durch dieses Vorgehen werden die Schnitte dauerhaft fixiert. Dabei wird jeweils ein Tropfen des Eindeckmediums pro Schnitt auf den Objektträger aufgebracht. Abschließend bringt man ein Deckgläschen (Microscope Cover Glasses 24 x 60 mm, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Teningen, Deutschland) blasenfrei darüber. Die fertigen Objektträger lässt man bei Raumtemperatur noch etwas antrocknen und bewahrt diese dann in Objektträgerkästen auf.

5.10.2 Immunhistochemische Färbung und Immunfluoreszenzfärbung

Immunhistochemische Färbemethoden und Immunfluoreszenz-Färbungen sind heute Standardverfahren in histologischen Laboren, sie dienen der Lokalisation und der Bestimmung der Verteilung von Antigenen in bestimmten Geweben. Mit ihrer Hilfe können Gewebeantigene sichtbar gemacht werden. In diesem Fall soll das Vorhandensein der aktivierten Caspase-3 als ein Zeichen für Apoptosevorgänge histologisch nachgewiesen werden. Caspase-3 tritt im Zusammenhang mit verzögertem Zelltod auf (Alessandri *et al.*, 2006) und aktivierte Caspase-3 konnte bereits nach einem Schädelhirntrauma nachgewiesen werden (Beer *et al.*, 2000). Da nach einer Schädigung sowohl Neurone als auch Gliazellen dem programmierten Zelltod unterliegen können, wird mit Hilfe eines Antikörpers gegen ein neuronales Strukturprotein (NeuN) eine Unterscheidung der Zellen vorgenommen.

5.10.2.1 Grundprinzip

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung und der Immunfluoreszenz-Färbung beruht auf einer Komplexbildung zwischen einem Antigen und einem Antikörper, der spezifisch bindet. Als Antigene werden in diesem Fall die Gewebestrukturen bzw. Enzyme bezeichnet, die mit Hilfe dieser Färbemethode nachgewiesen werden sollen. Die Antikörper sind entsprechend der Strukturen, an die sie sich binden sollen, auszuwählen

Material und Methoden

(Schlüssel-Schloss-Prinzip). Die erzeugten Antigen-Antikörper-Komplexe alleine sind im Gewebe aber nicht sichtbar, deshalb werden die Antikörper mit Markersystemen gekoppelt. Konjugiert man einen für die angestrebte Darstellung spezifischen Antikörper direkt mit einem Marker, dann handelt es sich um eine sogenannte direkte Methode. Die erfolgreiche Komplexbildung kann dann direkt sichtbar gemacht werden. Bei der indirekten Methode hingegen wird ein Sekundärantikörper benötigt, der mit einem entsprechenden Markersystem gekoppelt ist. Ziel dieses Umweges ist eine Signalverstärkung. Der Sekundärantikörper ist dabei nicht mehr auf eine spezifische Bindungsstelle im Gewebe ausgerichtet, sondern findet sie an dem unkonjugierten Primärantikörper. Bei der Wahl des Sekundärantikörpers ist die Tierspezies zu beachten, von der der Primärantikörper gewonnen wurde, denn er richtet sich gegen die speziesspezifische Immunglobulinfraktion des Primärantikörpers. Der Sekundärantikörper kann zum Beispiel an ein Enzym gekoppelt sein. Dieses Enzym wandelt ein Chromogen in einen Farbkomplex um, welcher sich am Ort der Antigen-Antikörper-Reaktion niederschlägt. Für eine noch höheren Signalverstärkung verwendet man eine sogenannte Avidin-Biotin Komplex Methode (avidin-biotin complex method, ABC) (Hsu *et al.*, 1981). Dabei ist der Sekundärantikörper mit Biotin konjugiert. Dieses weist vier Bindungsstellen für Avidin auf und hat eine hohe Affinität dazu. Vier mit Peroxidase konjugierte Streptavidinmoleküle können an den biotinylierten Sekundärantikörper binden. Nach der Zugabe einer Chromogensubstrat-Lösung entwickelt sich unter dem Einfluss der Peroxidase die Farbreaktion, dies führt zu einem farbigen Niederschlag (Präzipitation) am Ort der Antigen-Antikörperbindung. Diese Präzipitation kann mit Hilfe eines Lichtmikroskops dargestellt werden.

Alternativ zu der bisher vorgestellten Färbemethode kann der Sekundärantikörper aber auch mit einem Farbstoff gekoppelt sein, der unter der Einwirkung von Licht einer bestimmten Wellenlänge fluoresziert. Für die Auswertung wird dann ein Fluoreszenzmikroskop benötigt.

5.10.3 Durchführung der Caspase-3-Färbung mit der Avidin-Biotin Komplexmethode

Die Färbung wird nach einem Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. C. Werner, Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz, durchgeführt. Die Gehirnschnitte müssen nach dem Schneiden

Material und Methoden

beziehungsweise nachdem man sie aus dem Gefrierfach entnommen hat etwa eine Stunde antrocknen. Für die hier verwendete Färbemethode ist es unbedingt notwendig, dass die endogene Peroxidase blockiert wird. Sonst kommt es zum ungerichteten Farbniederschlag im Gewebe. Dazu inkubiert man das Gewebe mit 3%igem H_2O_2 in Methanol (10 ml H_2O_2 30%ig, Merck, Darmstadt, Deutschland; 90 ml Methanol, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland). Da die Auswertung der spezifischen Anfärbung häufig durch unspezifische Hintergrundfärbung erschwert wird, inkubiert man die Schnitte mit einer Proteinblockierungslösung (Protein Block Serum-Free, Code X0909, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland). Diese enthält Casein, ein hydrophiles Protein, das sich an unspezifische Bindungsstellen anheftet. Dadurch wird die Bildung von diffusen Antigen-Antikörper-Komplexe im Gewebe verhindert.

Der Primärantikörper Anti-Aktivierte Caspase-3-Antikörper (Purified Rabbit Anti-Active Caspase-3 Monoclonal Antibody, Clone C92-605, BDPharMingen, Heidelberg, Deutschland) wird mit der Proteinblockierungsreagenz (DAKO, siehe oben) als Verdünnungsmittel auf die Schnitte aufpipettiert. Es kommt zu einer Bindung des unkonjugierten Antikörpers an die aktivierte Form des Apoptoseenzymes Caspase-3 im Gewebe. Die Inkubation erfolgt über Nacht in einer biologischen Testkammer. Dabei handelt es sich um eine flache Plastikbox mit Deckel, in die etwas mit Aqua dest. befeuchteter Zellstoff gelegt wird. Diese feuchte Kammer wird mit Parafilm verschlossen und dadurch das Austrocknen der Schnitte verhindert. Die lange Zeitspanne erhöht die Bindungschancen des Antikörpers. Der Biotin-konjugierte Sekundärantikörper (DAKOCytomation LSAB2 System-HRP, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) bindet an den speziesspezifischen Teil des Primärantikörpers. Die Auswahl eines geeigneten Sekundärantikörpers orientiert sich an der Spezies, in welcher der zuvor benutzte Primärantikörper erzeugt wurde. Streptavidin, das mit Meerrettichperoxidase beladen ist, wird auf das Gewebe gegeben. Dieses bindet an das Biotin des Sekundärantikörpers, ist aber seinerseits noch nicht sichtbar (DAKO LSAB2 System-HRP). Über diese Streptavidin-Biotin-Brückenbindung erreicht man die angestrebte Signalverstärkung durch eine Erhöhung der Empfindlichkeit des Testsystems. Avidin verfügt über eine hohe Affinität zu Biotin, dieses wiederum besitzt vier Bindungsstellen für Avidin. Um die Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar zu machen wird DAB-Chromogen (3,3'-Diaminobenzidin in Chromogenlösung; DAKOCytomation Liquid DAB Substrate Chromogen System, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland), ein licht-sensibler Farbstoff, auf die Schnitte pipettiert.

Material und Methoden

Die Inkubation wird unter einer lichtundurchlässigen Abdeckung durchgeführt. Für den Beginn der Farbreaktion wird H_2O_2 benötigt, das in dem verwendeten Kitt enthalten ist (Meerrettichperoxidase, siehe oben). Da eine Inkubationszeit von 2 Minuten mit dem DAB-Chromogen-Substrat noch nicht zu dem gewünschten Färbeergebnis geführt hat, erfolgt eine schrittweise Verlängerung der Inkubationszeit bis zu einer Dauer von 45 Minuten. Nach der Oxidierung bildet DAB an der Bindungsstelle ein braunes Reaktionsprodukt. Danach führt man eine Gegenfärbung mit Hämalaun durch, dies erleichtert die Unterscheidung von Strukturen im Gewebe. Die Farbreaktion kann im Hellfeldmikroskop dargestellt werden. Das DAB-Chromogen-Substrat ist giftig, deshalb wird es in einer auslaufsicheren Schale unter dem Abzug auf die Objektträger aufgetragen. Die überschüssige Lösung wird mit Natriumhydrochloritlösung (Natriumhydrochloritlösung 12% Cl, Carl Roth GmbH u. Co KG, Karlsruhe, Deutschland) neutralisiert und unter dem Abzug bis zur Entsorgung gelagert.

Zum Ausschluss falsch-positiver Reaktionen, die immer wieder auftreten können, wird bei allen Färbedurchläufen eine Negativkontrolle durchgeführt. Es wird jeweils eine Negativkontrolle für zehn bis zwölf Objektträger mit gefärbten Schnitten benötigt. Diese Objektträger durchlaufen die einzelnen Schritte der Färbung wie die anderen, mit Ausnahme der ersten Inkubation, bei der diese Kontrollen mit der Proteinblockierungsreagenz, ohne Primärantikörper inkubiert werden.

Die Auswertung der Caspase-3-Färbung der Avidin-Biotin Komplexmethode kann unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskops durchgeführt werden.

5.10.4 Durchführung der Doppelfärbung gegen Caspase-3 und NeuN

Mit der Färbung gegen aktivierte Caspase-3 will man, wie schon erwähnt, das Vorkommen von apoptotischen Vorgängen im Gewebe nachweisen. Dabei ist es aber nicht möglich, zwischen einer Nervenzelle und einer Gliazelle (Astrozyten, Oligodendrozyten, Mesogliazellen und Ependymzellen) zu unterscheiden, da vom programmierten Zelltod beide Zelltypen betroffen sind. Verwendet man zusätzlich einen Antikörper gegen ein neuronales Strukturprotein, das so genannte NeuN (Mullen *et al.*, 1992; Engelhard *et al.*, 2004; Korzhevskii *et al.*, 2006), ist es möglich eine Unterscheidung vorzunehmen. Mit der Doppelfärbung färbt man erst gegen aktivierte Caspase-3 und dann in einem zweiten Schritt gegen NeuN. Dabei werden alle apoptotischen Zellen sichtbar und zeigen so das Ausmaß der Schädigung an. Bei den

Material und Methoden

doppeltgefärbten Zellen handelt es sich dann nur um die geschädigten Neurone. Die neuronalen Zellen nehmen durch den Farbstoff aus dem Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I nur eine leichte rosa Färbung an. Der braune Farbstoff (DAB-Chromogen-Substrat) lässt sich nicht mehr erkennen. Für einen möglicherweise besseren Erfolg werden die Schnitte mit den Primär- und Sekundärantikörpern jeweils in einem Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Da auch diese Maßnahme nicht erfolgreich ist, werden die Schnitte mit den jeweiligen Primärantikörpern über Nacht inkubiert. Dadurch verlängert sich die Färbung auf insgesamt drei Tage. Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit stellt die Verlängerung der Einwirkungszeit des DAB-Chromogen-Substrats auf 30 Minuten, später sogar auf 45 Minuten und des Vector Red Kits auf 30 Minuten und dann ebenfalls auf 45 Minuten dar. Des Weiteren wird eine Vorinkubation des Gewebes mit DAB-Chromogen-Substrat durchgeführt, das mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,6) angesetzt wird. Nach 10 Minuten wird diese Lösung von den Objektträgern ohne Waschen entfernt und das DAB-Chromogen-Substrat mit dem, im Kit enthaltenen Puffer, angesetzt und daraufgegeben. Diese Vorinkubation führt nicht zu dem gewünschten Erfolg. Eine getrennt durchgeführte NeuN-Färbung zeigt, dass der Farbstoff hauptsächlich in Randbereichen des Schnittes und in Falten hängen bleibt. Durch die verschiedenen Variationen kann keine Verbesserung erzielt werden. Auch eine Austestung des NeuN-Antikörpers in anderen Konzentrationen ist nicht erfolgreich. Aufgrund der geschilderten Probleme werden weitere Möglichkeiten zur Färbung gesucht.

Das Färbeergebnis ist ebenfalls mit Hilfe eines Lichtmikroskops überprüfbar.

5.10.5 Durchführung der Immunfluoreszenzdoppelfärbung

Die bisher durchgeführten Versuche einer lichtmikroskopisch Doppelfärbung haben nicht zu den gewünschten Ergebnissen geführt. Nun soll auf Vorschlag von Prof. Dr. Klaus T. Preissner (Biochemisches Institut der Justus-Liebig-Universität in Gießen) eine Immunfluoreszenzfärbung zur Anwendung kommen. Die Gefrierschnitte müssen dafür nach dem Schneiden zunächst eine Stunde antrocknen und werden anschließend mit Isopropanol fixiert. Daraufhin müssen sie erneut eine Stunde antrocknen. Da auch hier die Auswertung der spezifischen Anfärbung häufig durch unspezifische Hintergrundfärbung erschwert wird, inkubiert man die Schnitte mit einer Horseserum-Verdünnung beziehungsweise mit Histoblocklösung oder Faulhammer-

Material und Methoden

Blocklösung (siehe Anhang „Lösungen“). Dadurch wird die Bildung von diffusen Antigen-Antikörper-Komplexen im Gewebe verhindert. Der Primärantikörper Anti-Aktivierte Caspase-3-Antikörper (Purified Rabbit Anti-Active Caspase-3 Monoclonal Antibody, Clone C92-605, BDPharMingen, Heidelberg, Deutschland) und der Primärantikörper gegen NeuN (Mouse Anti-Neuronal Nuclei Monoclonal Antibody, MAB377, Chemicon International/Millipore, Temecula, USA) werden mit PBS+S (siehe Anhang „Lösungen“) als Verdünnungsmittel auf die Schnitte aufpipettiert. Die Inkubation erfolgt, wie schon erwähnt, über Nacht in einer biologischen Testkammer. Die Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörper (Fluorescein-5-isothiocyanat FITC gt-a-rb Ig, Cappel/ICD Biomedicals, Biochemical Division, Aurora, Ohio, USA; Indocarbocyanin Cy3 dk-a-ms Ig, Dianova, Gesellschaft für biochemische, immunologische und mikrobiologische Diagnostika mbH, Hamburg, Deutschland) binden jeweils an den speziesspezifischen Teil des Primärantikörpers. Nach einem Waschschrift werden die Schnitte in 4%iger PFA-Lösung nachfixiert. Auch hier wird jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt, um falsch-positive Reaktionen ausschließen zu können. Diesen Objektträgern wird nur das Verdünnungsmedium ohne Primärantikörper aufpipettiert, sie durchlaufen die einzelnen Schritte der Färbung wie alle anderen Objektträger. Zunächst werden die Kombinationen von Primär- und passenden Sekundärantikörpern getrennt voneinander ausgetestet. Der Primärantikörper gegen Caspase-3 wird in den ersten Färbedurchgängen nur in einer niedrigen Verdünnungsstufe von 1:20 eingesetzt. Als Sekundärantikörper für diesen Färbeteil wird zunächst ein Indocarbocyanin Cy3 dk-a-rb Ig von Chemicon International (Chemicon International, Temecula, USA) eingesetzt. Für die ersten Färbeversuche kommt als Gewebe Thymus zum Einsatz. In diesem primären lymphatischen Organ erfolgt die Entwicklung der immunkompetenten T-Lymphozyten. Während der Pubertät geht das Organ bis auf wenige Reste zugrunde und wird in einen Fettkörper umgewandelt. Die Zellen sterben einen programmierten Zelltod. Dies macht das Gewebe besonders interessant für eine Färbung, die dem Nachweis von apoptotischen Zellen dienen soll. Dabei erweist sich der Cy3-Sekundärantikörper als ungeeignet, da Lipofuszingranula im Thymus unter dem Fluoreszenzlicht Autofluoreszenz in der gleichen Wellenlänge zeigen. Stattdessen fällt dann die Wahl auf den Fluorescein-5-isothiocyanat FITC gt-a-rb Ig von Cappel. Für die Testfärbung gegen NeuN muss Gehirn gefärbt werden, da hier der Nachweis von Neuronen am sichersten gelingen kann. Als Sekundärantikörper findet zunächst ein Fluorescein-5-isothiocyanat FITC dk-a-ms Ig von Dianova Verwendung. Da aber in

Material und Methoden

einer Doppelfärbung nicht beide Sekundärantikörper mit dem gleichen Fluoreszenzfarbstoff markiert sein dürfen, muss ein Wechsel zu dem Indocarbocyanin Cy3 dk-a-ms Ig von Dianova stattfinden. Während die Färbung gegen NeuN erfolgreich ist und problemlos reproduziert werden kann ist die Färbung gegen Caspase-3 nicht eindeutig. Als Alternativen zu der Fixierung der Schnitte mit Isopropanol (2-Propanol reinst, Merck, Darmstadt, Deutschland) werden auch die Fixierung in Aceton (Apotheke des Universitätsklinikums Gießen), 4% PFA oder Zamboni (siehe Anhang „Lösungen“) ausprobiert. Die verschiedenen Methoden führen jedoch zu keinem deutlichen Unterschied. Als weitere Variante wird ein Blockung mit Histoblocklösung (siehe Anhang „Lösungen“) ausprobiert, auch das bringt keinen Vorteil.

Für die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung wird ein Mikroskop benötigt, das Licht in verschiedenen Wellenlängen emittieren kann.

5.10.6 Durchführung der Antigendemaskierung

Enzyme wie die Caspasen befinden sich innerhalb der Zelle. Für das leichtere Eindringen der Antikörper in die Zelle kann man eine sogenannte Antigendemaskierung durchführen. Dazu werden die Schnitte nach dem Antrocknen in eine Küvette mit Zitratpuffer (siehe Anhang „Lösungen“) gegeben und diese in ein Wasserbad in einem Kochtopf gestellt. Statt dieser Kochtopfmethode kann auch eine Mikrowelle verwendet werden. Das Ganze wird zum Kochen gebracht. Nachdem der Zitratpuffer fünf Minuten gekocht hat, füllt man die verdampfte Flüssigkeit in der Küvette mit Leitungswasser auf. Das Gewebe wird fünf Minuten weiter gekocht. Anschließend lässt man die Objektträger etwa 15 Minuten in dem Puffer abkühlen. Es folgen Waschschrte in PBS und Triton X 100 (Serva Feinbiochemica GmbH u. Co., Heidelberg, Deutschland). Das Detergenz bricht die Phospholipiddoppelschicht der Zellen auf und soll so das Eindringen des Antikörpers erleichtern. Erst dann blockt man die Schnitte mit Faulhammer-Blocklösung (siehe Anhang „Lösungen“) für eine Stunde und führt die Färbung nach dem gewohnten Protokoll durch. Da möglicherweise die Antikörperkonzentration des BD PharMingen Purified Rabbit Anti-Active Caspase-3 zu hoch ist, werden verschiedene Verdünnungen jedoch ohne eindeutigen Erfolg ausprobiert.

5.10.7 Einbettung in Paraffin

Die Qualität von Paraffinschnitten ist im Allgemeinen besser als die von Gefrierschnitten. Nach Beratung durch Prof. Dr. med. K. Kuchelmeister vom Institut für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen werden fünf Gehirne in Paraffin eingebettet. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass nicht jeder Antikörper paraffingängig ist. Das heißt, nicht jeder an Gefrierschnitten funktionierende Antikörper lässt sich auch ohne weiteres bei Paraffinschnitten einsetzen. Der Hersteller des Caspase-3-Antikörpers BD PharMingen hat den Antikörper nur in einem eigenen Protokoll an Paraffinschnitten ausprobiert. Dabei hat der Antikörper nicht funktioniert (persönliche Mitteilung). Dennoch wird die Färbung zunächst mit den vorhandenen Mitteln ausprobiert. Zur Austestung des BD PharMingen Primärantikörpers wird dieser zunächst wieder allein eingesetzt. Die Nachfixierung mit 4% PFA wird versuchsweise unterlassen. Diese Maßnahme fixiert die Immunreaktion und wirkt so stabilisierend auf die Färbung. Die unfixierten Schnitte sind aber schon während einer kurzen Betrachtung ausgebleichen. Eine Dokumentation ist so nicht möglich. Die Nachfixation erweist sich damit als unerlässlich. Da die Fluoreszenzfarbstoffe nicht nur unter Lichteinfluss sondern auch mit der Zeit ausbleichen, werden die Schnitte beginnend dreißig Minuten nach dem Eindeckeln unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Eine halbe Stunde ist mindestens für das Durchdringen der Schnitte mit dem Eindeckmedium Glycerol nötig. Weiterhin erfolgten so über zwei Stunden alle dreißig Minuten und erneut am Tag danach Aufnahmen von den Schnitten. Dabei hat sich gezeigt, eine gute Durchdringung mit dem Eindeckmedium ist erst nach Lagerung der Schnitte über Nacht im Kühlschrank erreicht. Da mit dem Caspase-3 Antikörper von BD PharMingen kein eindeutiges Färbeergebnis erzielt werden kann, wird ein Antikörper von Sigma Aldrich bestellt. Dabei handelt es sich um den Anti-Caspase-3, Active C8487 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Die Firma hat den Antikörper noch nicht an Paraffinschnitten getestet. Der Antikörper wird in verschiedenen Verdünnungsstufen in dem oben beschriebenen Protokoll eingesetzt. Dabei hat sich kein eindeutiges Ergebnis eingestellt. Zur Vermeidung von Verunreinigungen durch ungenügendes Waschen werden alle Waschschrte auf 10 Minuten verlängert. Zur besseren Austestung des Antikörpers wird auf schockgefrorenen Thymus und Darm zurückgegriffen. In beiden Geweben findet apoptotischer Zelltod statt. Thymusschnitte beziehungsweise Darmschnitte werden in Aceton oder 4% PFA fixiert, als Blockierungsmedien kommen Histoblocklösung

Material und Methoden

beziehungsweise Faulhammer-Blocklösung zum Einsatz. Der Antikörper C8487 durchläuft das Färbeprotokoll in mehreren Verdünnungen.

5.10.8 Durchführung der Präabsorption

Die Präabsorption wird wie eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt und dient der Bestätigung, dass der Primärantikörper das entsprechende Antigen auch wirklich bindet. Das entsprechende Antigen sollte möglichst von der gleichen Firma hergestellt werden wie der Antikörper. Sigma hat eine solche Präabsorption noch nicht durchgeführt. Erst nach Rücksprache mit dem Hauptwerk in den USA kann ein Produkt bestellt werden. Das Antigen, Caspase-3 human C1224 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), wird mit dem Primärantikörper C8487 über Nacht bei 4°C inkubiert (für einen Ansatz von 100µl Endvolumen werden 8 µl/1, 45 µg Antigen mit 1µl 1:10 vorverdünntem Antikörper und 91 µl Puffer angesetzt). Der Antikörper bekommt so die Gelegenheit sich an das Antigen zu binden. Nach dieser Vorinkubation sollte kein freier Primärantikörper mehr vorhanden sein, der an das Zielantigen im Gewebe binden könnte. Daneben wird auch der Antikörper in der gleichen Verdünnung jedoch ohne das Antigen über Nacht inkubiert. Diese Verdünnungen werden dann gemäß dem oben aufgeführten Protokoll verwendet. Gleichzeitig wird immer unter allen Bedingungen ein Objektträger mitgeführt, der das gleiche Protokoll durchläuft, auf den jedoch statt des Primärantikörpers nur das Verdünnungsmedium aufpipettiert wird. Diese Maßnahme soll zeigen, wo der Sekundärantikörper im Gewebe bindet. Die Schnitte mit Primärantikörper, Primärantikörper-Antigen-Gemisch und ohne Primärantikörper unterschieden sich bei Betrachtung durch das Fluoreszenzmikroskop nicht.

5.10.9 Erläuterung der Methoden zur histologischen Aufarbeitung

5.10.9.1 *Fixierung*

Die Fixierung des entnommenen Gewebes und der Schnitte ist für die Bindung der Antikörper und damit letztlich für den Erfolg der Färbung von entscheidender Bedeutung. Die Fixierung mit Hilfe von Isopropanol und Aceton führt zu einer Dehydrierung des Gewebes und ist zum Nachweis von Proteinen an Gefrierschnitten geeignet. Die Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA 4%) ist gewebeschonender, da es zu

Material und Methoden

einer Stabilisierung der Gewebestrukturen durch Quervernetzung von Amido-, Amino- und anderen Gruppen führt.

5.10.9.2 Waschen

Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten werden die Objektträger sorgfältig in PBS gewaschen. Diese Wasch-Schritte dienen der Entfernung von Rückständen der zuvor benutzten Substanzen (zum Beispiel der Antikörper) und um ablaufende Reaktion zu stoppen. Der pH-Wert von PBS muss auf 7,4 eingestellt werden, da die Antikörper sonst nicht reagieren.

5.10.9.3 Inkubation

Für die Inkubation werden die Objektträger in einer feuchten Kammer (biologische Testkammer) aufbewahrt. Diese verhindert die Verdunstung der aufgetragenen Substanzen und damit das Austrocknen der Gewebeschnitte. Für die Inkubation werden die Antikörper in der jeweiligen Verdünnung aufgetragen und die Objektträger anschließend in die feuchte Kammer gelegt. Für die Inkubation über Nacht wird die Kammer mittels Parafilm verschlossen. Die Inkubation mit den Sekundärantikörpern in der Immunfluoreszenz-Färbung findet im dunklen statt, da die Fluoreszenzfarbstoffe lichtempfindlich sind. Alle nachfolgenden Schritte müssen deshalb ebenfalls im dunklen durchgeführt werden.

5.10.9.4 Eindeckeln

Die Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitte werden permanent eingedeckelt. Jeweils ein Tropfen des RotiHistoKitts wird pro Schnitt mit Hilfe einer Einmalpipette auf die Objektträger aufgetragen. Das Deckgläschen wird möglichst blasenfrei darübergedeckt. Die Immunfluoreszenzschnitte werden mit gepuffertem Glycerol (aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen) eingedeckt. Etwa 40 µl werden pro Schnitt auf den Objektträger aufgebracht und ein Deckgläschen darübergelegt.

5.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wird unter Verwendung des Statistikprogramms SPSS 17.0 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) durchgeführt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe des Programms Origin 6.0 (Micorcal Software, Inc., Northampton, USA). Die Normalverteilung der Werte wird mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest überprüft. Sind die Messergebnisse normalverteilt, wird paarweise ein zweiseitiger T-Test durchgeführt. Sind diese nicht normalverteilt, findet stattdessen der Wilcoxon-Test Anwendung. Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wird ein Signifikanzniveau von 0,05 zugrunde gelegt. Angegeben sind in den Tabellen die errechneten arithmetischen Mittelwerte \pm der Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) bei normalverteilten Werten, bei den nichtnormalverteilten wird der Median \pm dem Standardfehler angegeben.

6 Ergebnisse und Auswertung

6.1 Aufbau des Traumamodells

Der Aufbau der Apparatur zur Auslösung des Schädelhirntraumas wird nach den Beschreibungen des Modells nach Marmarou (Marmarou *et al.*, 1994; Foda & Marmarou, 1994) vorgenommen. In den Originalarbeiten wird ein Plexiglasfallrohr beschrieben. Für den eigenen Modellaufbau kommt eine Aluminiumstange zum Einsatz. Diese wird zur Einstellung der gewünschten Fallhöhe mit mehreren Bohrungen versehen, durch die ein Stahlstift geführt werden kann. Das Fallrohr wird mit zwei Muffen an einem Stativ befestigt und mit Hilfe einer Wasserwaage senkrecht ausgerichtet. Nach den Originalarbeiten von Foda und Marmarou (siehe Kapitel „Tiermodelle zur Erzeugung eines Schädelhirntraumas“) wird eine Fallhöhe von 1 m als Traumahöhe ausgewählt. Für ein reibungsloses Funktionieren wird ein 454 g schweres Messinggewicht mehrfach nachgeschliffen und vor Gebrauch mit Silikonspray eingesprüht. Ebenso wird mit dem Rohr verfahren. Die Bearbeitung des Fallrohres und die Herstellung des Gewichtes sowie der benötigten Helme für die Tierköpfe erfolgt in der Werkstatt des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität in Gießen.

6.2 Narkosesteuerung

Die Steuerung der Narkoseeinleitung muss nach den Erkenntnissen der ersten Versuche verändert werden. Es war geplant die Narkose mit 6 mg/kg Propofol und 20 µg/kg Fentanyl, verabreicht über einen Zeitraum von 60 Sekunden, zu starten. Da die Tiere aber nach dieser einleitenden Dosis noch nicht in einem intubationsfähigen Zustand sind, werden alle weiteren Versuche mit 8 mg/kg Propofol (Konzentration 20 mg/ml; Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. H., Deutschland) und 26,7 µg/kg Fentanyl (Konzentration 50 µg/ml; Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) über einen Zeitraum von 80 Sekunden verabreicht, eingeleitet.

6.3 Blutgasanalyse und Monitoring

Während der Pilotversuche werden auch bereits Daten der Blutgasanalysen gesammelt, um aus diesen eine optimale Starteinstellung von Beatmungsfrequenz und Beatmungsvolumen zu ermitteln. Die Anpassung von Volumen und Frequenz wird dann nach den Ergebnissen der Basalwerte individuell vorgenommen. Die $p\text{CO}_2$ -Werte (Partialdruck) sollen optimalerweise in einem Bereich von 38 – 42 mmHg liegen. Der Atemkalk, der in dem verwendeten halb-geschlossenen Beatmungskreislauf für die Adsorption von CO_2 verwendet wird, muss vor jedem Versuchsdurchgang erneuert werden. Initial werden die Tiere mit 100% Sauerstoff beatmet und erst nach der Erhebung der Basalwerte auf eine Sauerstoffkonzentration von 30% eingestellt. Damit die Werte dennoch vergleichbar sind, wird statt des Sauerstoff-Partialdruckes in der Darstellung der Ergebnisse der Horowitz-Quotient beziehungsweise der Oxygenierungsindex (OxI) angegeben. Zu seiner Berechnung wird der gemessene Sauerstoff-Partialdruck ($p\text{O}_2$) durch die inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FiO_2) dividiert.

Die Umstellung auf ein halb-geschlossenes Niedrigflusssystem soll vor allem in den Einwaschversuchen helfen, das teure Edelgas Xenon zu sparen.

Die Daten werden in allen Versuchen jeweils zu den gleichen Zeitpunkten erfasst. Die Basalwerte werden gemessen, sobald der arterielle Zugang gelegt worden ist. Die nächsten Werte werden fünf Minuten vor und nach dem Trauma ermittelt (Messzeitpunkt 1 und Messzeitpunkt 2, MZ 1 und MZ 2). Die Zeitspanne von jeweils fünf Minuten soll Zeit geben für die Umlagerung des Tieres auf den Schaumstoff beziehungsweise zurück in die Ausgangsposition und die Ausrichtung des Kopfes unter der Traumavorrichtung. Anschließend werden 60, 120 und 180 Minuten nach dem Trauma weitere Daten erhoben (Messzeitpunkte 3 bis 5, MZ 3 bis MZ 5). Wird kein Trauma ausgelöst, werden die Messdaten dennoch zu den gleichen Zeitpunkten erfasst. Neben den sogenannten Blutgasen, also den Partialdrücken von Sauerstoff ($p\text{O}_2$) und Kohlendioxid ($p\text{CO}_2$) sowie dem Basenüberschuss (base excess, BE-Werte), werden die Blutzuckerwerte (BZ) mit einem einfachen Accu-Check Blutzuckermessgerät gemessen. Der Hämoglobingehalt (Hb) des Blutes wird als weiterer Wert erfasst.

In den folgenden Tabellen sind die Parameter auf der linken Seite untereinander stehend aufgeführt, die Einheit der Werte steht in Klammern. Der Zeitpunkt, zu dem der jeweilige Wert erfasst wird, steht oben. Angegeben sind alle Zahlen als Mittelwerte

Ergebnisse und Auswertung

beziehungsweise Median. Die Mittelwerte werden \pm der Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Der Median wird \pm Standardfehler angegeben. Die in die Auswertung einbezogene Anzahl an Tieren steht in Klammern darunter.

Tabelle: 4 Ergebnisse der Blutgas- und Temperaturmessungen von Tieren mit Standardnarkose (Propofol und Fentanyl) bei Normothermie (Gruppe 0 und Gruppe A)

Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM; in Klammern ist die Zahl der einbezogenen Tiere dargestellt. Es gilt $p < 0,05$ im Vergleich zum Basalwert bei den markierten Werten (*).

	Basalwert	MZ 1	MZ 2	MZ 3	MZ 4	MZ 5
OxI (mmHg)	423 \pm 21 (21)	460 \pm 20 (21)	423 \pm 21 (21)	455 \pm 31 (21)	427 \pm 28 (21)	477 \pm 12 (10)
pCO ₂ (mmHg)	44 \pm 1,5 (20)	44 \pm 1,7 (21)	42 \pm 1,6 (21)	42 \pm 1,6 (21)	40 \pm 1,6* (21)	37 \pm 1,9* (19)
pH-Wert	7,37 \pm 0,01 (20)	7,37 \pm 0,01 (21)	7,35 \pm 0,01* (21)	7,35 \pm 0,01* (21)	7,35 \pm 0,01 (21)	7,35 \pm 0,01 (19)
Hb (g/dL)	14,5 \pm 0,3 (19)	14,4 \pm 0,2 (21)	13,8 \pm 0,4 (21)	13,4 \pm 0,2* (21)	12,2 \pm 0,4* (21)	11,6 \pm 0,4* (19)
BZ (mg/dL)	92 \pm 4 (20)	93 \pm 5 (21)	89 \pm 6 (21)	87 \pm 9 (21)	79 \pm 4* (21)	73 \pm 5* (18)

Die oben aufgelisteten Daten zeigen, dass die Einhaltung der angestrebten Parameter nahezu gelungen ist. Der Partialdruck von CO₂ kann durch Anpassung der Beatmung nach der Ermittlung der Basalwerte mit kaum nennenswerten Abweichungen von den Idealwerten eingehalten werden. Darüber hinaus beweisen die Messwerte des pH-Wertes die Stabilität der Beatmung. Nur gegen Ende des Versuches sinkt dieser geringfügig ab und wird leicht azidotisch.

Mit Hilfe der Wärmematte und des Infrarotstrahlers kann die Temperatur der Tiere konstant gehalten werden. Sowohl die rektal als auch die perikraniell gemessene

Ergebnisse und Auswertung

Temperatur (T_{rektal} , $T_{\text{perikraniell}}$) verändert sich über den gesamten Versuchszeitraum nur in sehr geringem Maße.

Zu den gleichen Messzeitpunkten werden die in Tabelle 5 dargestellten Daten erhoben.

Tabelle 5: Die Messergebnisse mit Standardnarkose (Propofol und Fentanyl) bei Normothermie (Gruppe 0 und Gruppe A)

Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM; in Klammern ist die Zahl der einbezogenen Tiere dargestellt. Es gilt $p < 0,05$ im Vergleich zum Basalwert bei den markierten Werten (*).

	Basalwert	MZ 1	MZ 2	MZ 3	MZ 4	MZ 5
HF (1/min)	415 \pm 13 (21)	450 \pm 10* (21)	457 \pm 12* (21)	463 \pm 11* (21)	432 \pm 16 (21)	418 \pm 15 (19)
art. Blutdruck (mmHg)	111 \pm 4 (21)	120 \pm 4 (21)	108 \pm 4 (21)	109 \pm 5 (21)	92 \pm 6* (21)	81 \pm 7* (19)
BE (mmol/l)	0,26 \pm 0,5 (20)	-0,89 \pm 0,6 (20)	-2,82 \pm 0,8* (20)	-2,74 \pm 0,5* (20)	-4,12 \pm 0,7* (20)	-4,99 \pm 0,7* (18)
$T_{\text{perikraniell}}$ (°C)	37,0 \pm 0,03 (21)	36,9 \pm 0,1* (21)	36,8 \pm 0,1* (21)	37,1 \pm 0,01 (21)	37,1 \pm 0,02 (21)	37,0 \pm 0,03 (19)
T_{rektal} (°C)	37,0 \pm 0,1 (21)	37,1 \pm 0,06 (21)	37,1 \pm 0,07 (21)	37,2 \pm 0,1 (21)	37,1 \pm 0,07 (21)	37,0 \pm 0,08 (19)

Die Herzfrequenz liegt während des ganzen Versuches innerhalb der physiologischen Grenzen von 200 bis 500 Schlägen pro Minute (Erhardt *et al.*, 2004). Am entscheidenden Punkt, der Auslösung beziehungsweise der vorgetäuschten Auslösung des Traumas, verändert sich die Frequenz im Vergleich zu den erhobenen Werten fünf Minuten vor dem Trauma nicht. Im Laufe des Eingriffes werden mehrere Blutproben für die Blutgasanalyse und die Blutglukosemessung entnommen. Außerdem wird die Haut am

Ergebnisse und Auswertung

Kopf eröffnet und der Schädel freipräpariert. Dabei verlieren die Tiere über den Hautschnitt etwas Blut. Gegen Ende des Versuches sinken deshalb der Hämoglobinwert (Hb) um 3 g/dL und der Blutdruck um 30 mmHg ab.

6.4 Xenoneinwasch

Die Einleitung von Xenon in das Beatmungssystem ist problemlos möglich. Die Gasflasche verfügt über einen Druckminderer und einen eigenen, geeichten Durchflussmesser. Die Regulation des Gasgemisches wird mit Hilfe weiterer Durchflussmesser anhand der von der Sauerstoffmesszelle erhaltenen Werte vorgenommen. Die Aufrechterhaltung der gewünschten Xenon-Konzentration erfordert einiges Geschick und ständige Kontrollen. Die Tiere liegen unter dem Einfluss von Xenon zusätzlich zur Standard-Medikation stabil in Narkose.

Abbildung 4 zeigt die Mittelwerte aller durchgeführten Einwaschversuche.

Die Einwaschversuche zeigen die rasche Zunahme der Xenonkonzentration im Beatmungsgemisch der Tiere. Schon nach etwa fünf Minuten wird die angestrebte Konzentration von 70% Xenon erreicht. Weitere drei Minuten sind zur Stabilisierung des Gemisches im Niedrigflusssystem nötig. Während dieser Zeit müssen geringe Schwankungen der Xenonkonzentration in Kauf genommen werden. Mit Hilfe weniger Nachkorrekturen kann der Wert dann aber über lange Zeit konstant gehalten werden. Der Xenonauswasch aus dem Beatmungssystem wird noch schneller erreicht. Bereits nach etwa zwei Minuten ist das Edelgas wieder vollständig ausgewaschen. Da den Tieren 100% Sauerstoff zugeführt wird, sind keine Nachkorrekturen mehr nötig (siehe Kapitel „Xenoneinwasch“).

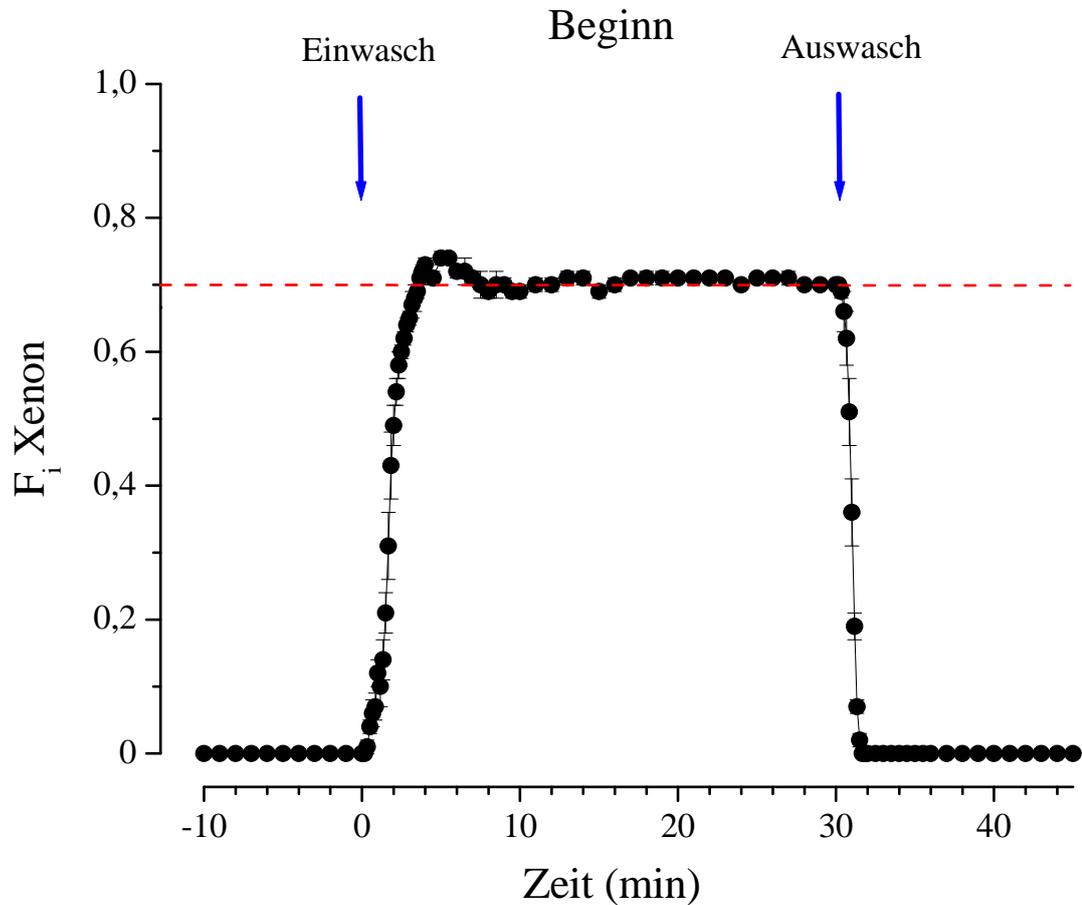


Abbildung 4: Mittelwerte von Xenonein- und -auswasch, angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (Gruppe B, n = 8)

Einen neuroprotektiven Effekt von Xenon erwartet man erst nach einer längeren Einwirkungszeit des Gases. In Abbildung 5 ist deshalb exemplarisch dargestellt, dass auch die Aufrechterhaltung einer Narkose unter Zuführung von Xenon über einen längeren Zeitraum möglich ist. Gezeigt wird neben dem Ein- und dem Auswasch auch eine Phase, in der eine Konzentration von 70% Xenon konstant gehalten werden kann. Die bereits erwähnte Sauerstoff-Messzelle wird für eine kontinuierliche Messung eingesetzt.

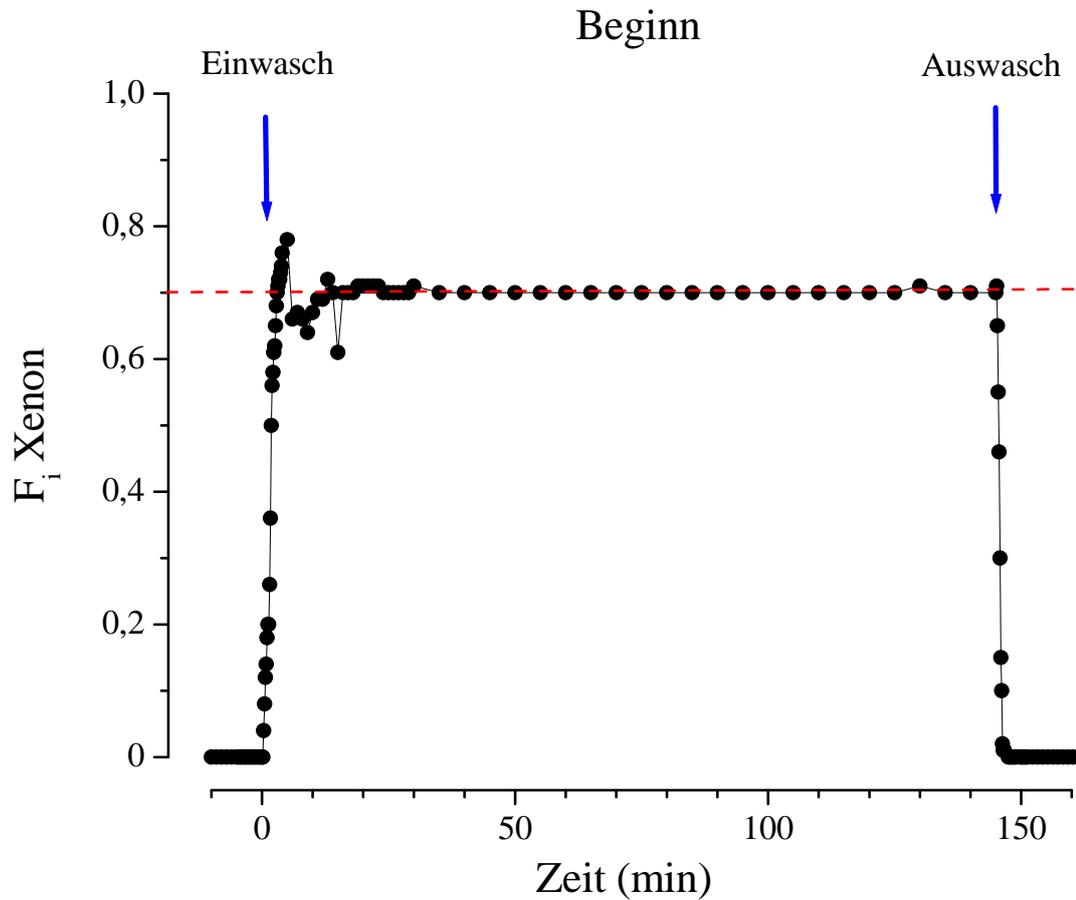


Abbildung 5: Verlauf der Xenonkonzentration (Beispiel) über einen längeren Zeitraum

6.5 Hypothermie

Rektal gemessene Temperatur und perikranielle Temperatur können mit Hilfe der Heizmatte und des Infrarotwärmestrahlers konstant gehalten werden. Zu geringen Abweichungen kommt es nur während der Umlagerung vor der Auslösung des Traumas (siehe Tabelle 5). Die gewollte Abkühlung unter Zuhilfenahme von Kalt/Warm Mehrfach-Kompressen führt besonders bei der am Kopf gemessenen Temperatur zu schnellem Erfolg. Die Abbildung 6 zeigt die Mittelwerte der im Musculus temporalis gemessenen Temperaturen. Nach dem Erreichen der angestrebten Temperatur von 34°C muss einer zu starken Abkühlung entgegengesteuert werden. Die Abbildung 6 zeigt auch,

Ergebnisse und Auswertung

dass häufig Nachkorrekturen zur Aufrechterhaltung der gewünschten Temperatur notwendig sind.

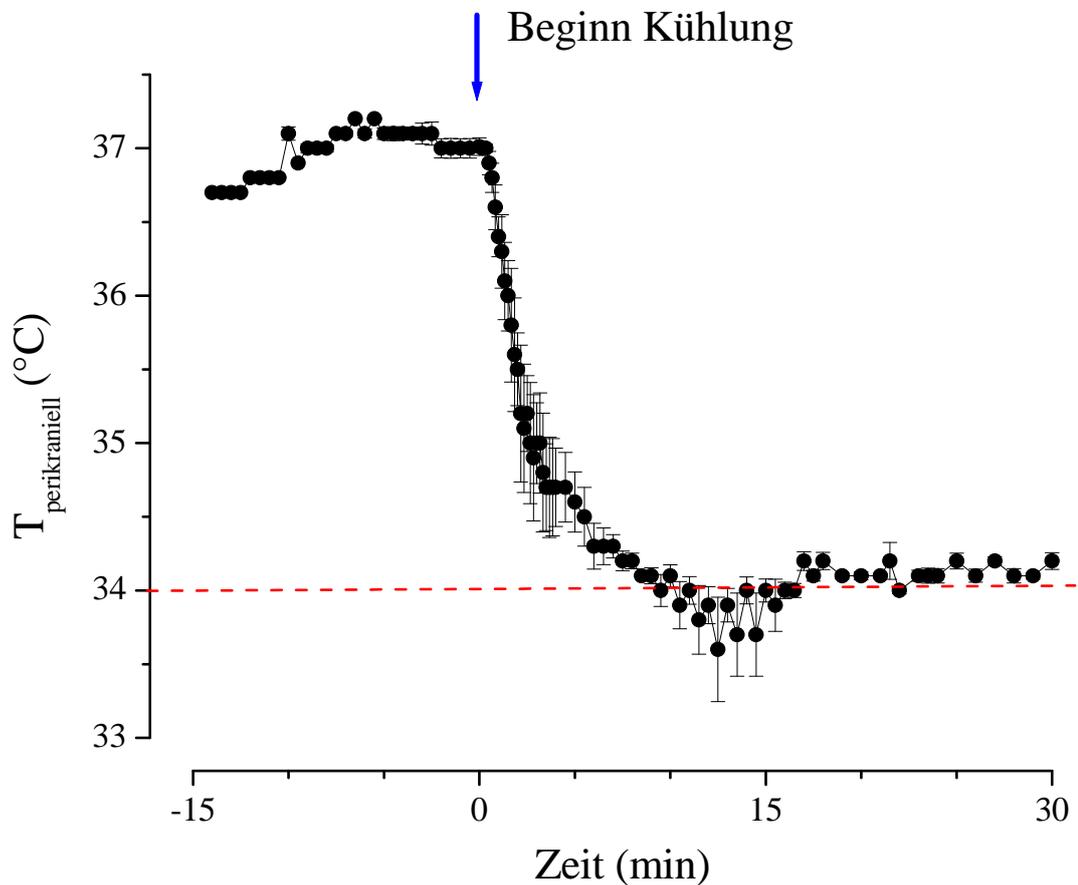


Abbildung 6: Mittelwerte der perikraniellen Hypothermieinduktion, angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (Gruppe C, n = 9)

Die rektal gemessene Temperatur braucht länger, bis sie etwas langsamer abzusinken beginnt. Aufgrund seiner Masse nimmt die Abkühlung des Körpers mehr Zeit in Anspruch. Nach etwa zehn Minuten haben aber sowohl die perikraniell als auch die rektal gemessene Temperatur das gewünschte Ziel erreicht. Ohne rechtzeitiges Gegensteuern droht der Körper aber zu stark abzukühlen. Die Phase, in der eine Temperatur von 34°C aufrechterhalten werden soll, erfordert eine besonders sorgfältige Nachregulation mit der Infrarotlampe und den Gelkompressen. Besonders die von der

Ergebnisse und Auswertung

rektalen Temperatursonde gemessenen Werte müssen dabei ständig beachtet werden. Die Abbildung 7 zeigt die Schwankungen der rektal gemessenen Temperatur während der Hypothermiephase besonders deutlich. Die Nachkorrektur ist hier aufwändiger als am Kopf.

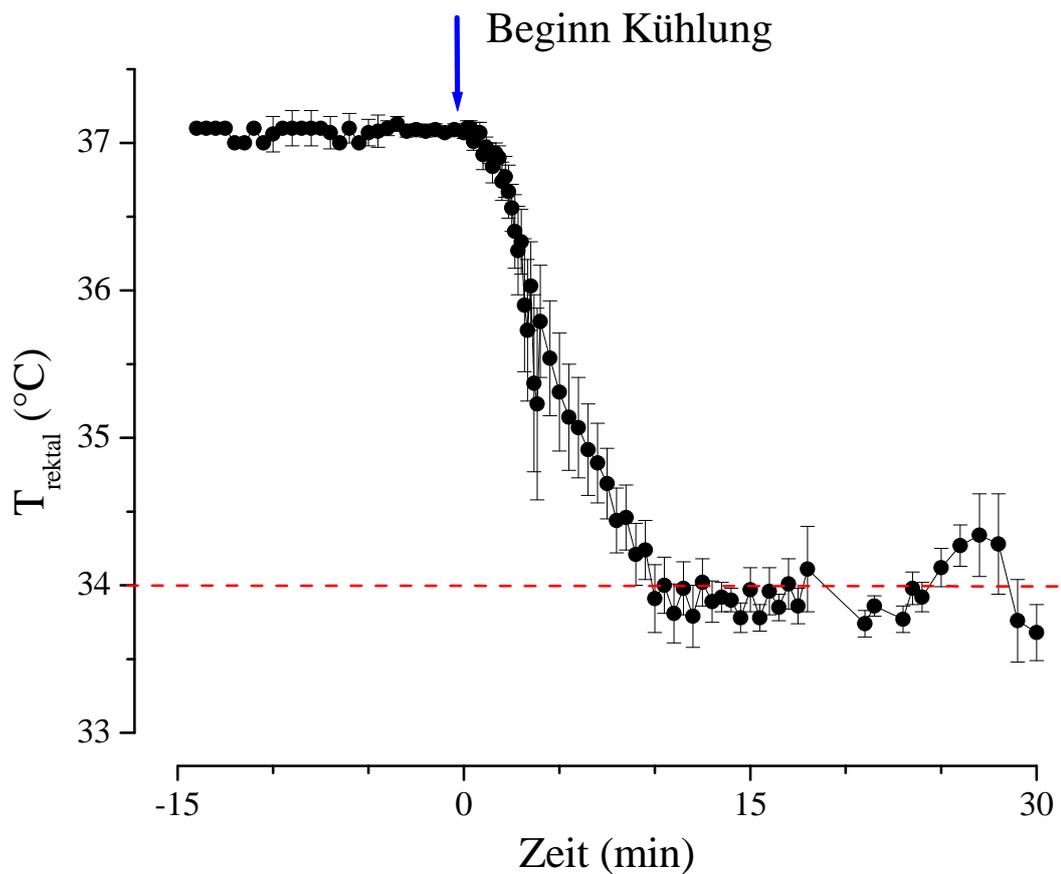


Abbildung 7: Rektalen Temperatur während der Hypothermieinduktion, angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (Gruppe C, n = 9)

Die rektal gemessene Temperatur schwankt in einzelnen Versuchen deutlich stärker als die am Kopf gemessene Temperatur. Ein vorsichtiges Wiedererwärmen ist besonders wichtig, um eine überschießende Erwärmung zu vermeiden. Gegebenenfalls muss auch in dieser Phase mit Kalt/Warm Mehrfach-Kompressen gegengesteuert werden. In Abbildung 8 sind die perikraniellen Messwerte während der Aufrechterhaltung der

Ergebnisse und Auswertung

Kühlung und die Phase der Wiedererwärmung dargestellt. Die angestrebte Temperatur von 37°C wird innerhalb von etwa acht Minuten erreicht. Danach zeigen sich aber Schwankungen, die mit Hilfe der Kompressen ausgeglichen werden müssen.

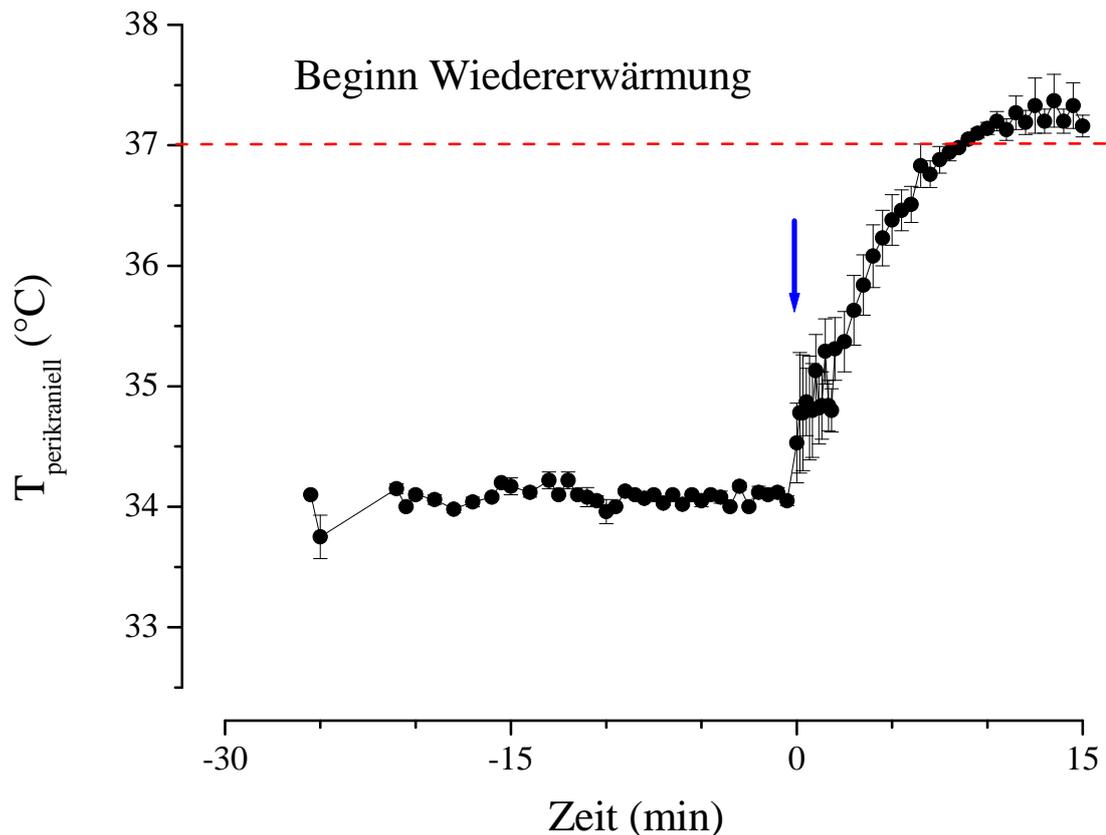


Abbildung 8: Mittelwerte der perikraniellen Wiedererwärmung, angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (Gruppe C, n = 9)

Während die perikraniell gemessene Temperatur kontinuierlich den angestrebten Wert erreicht, zeigt Abbildung 9 deutlich mehr Schwankungen in der rektal gemessenen Temperatur. Die Körpertemperatur erreicht erst nach etwa 15 Minuten den Wert von 37°C. Zwischen der am Kopf gemessenen Temperatur und der Körpertemperatur besteht also zu den Messzeitpunkten eine gewisse Diskrepanz.

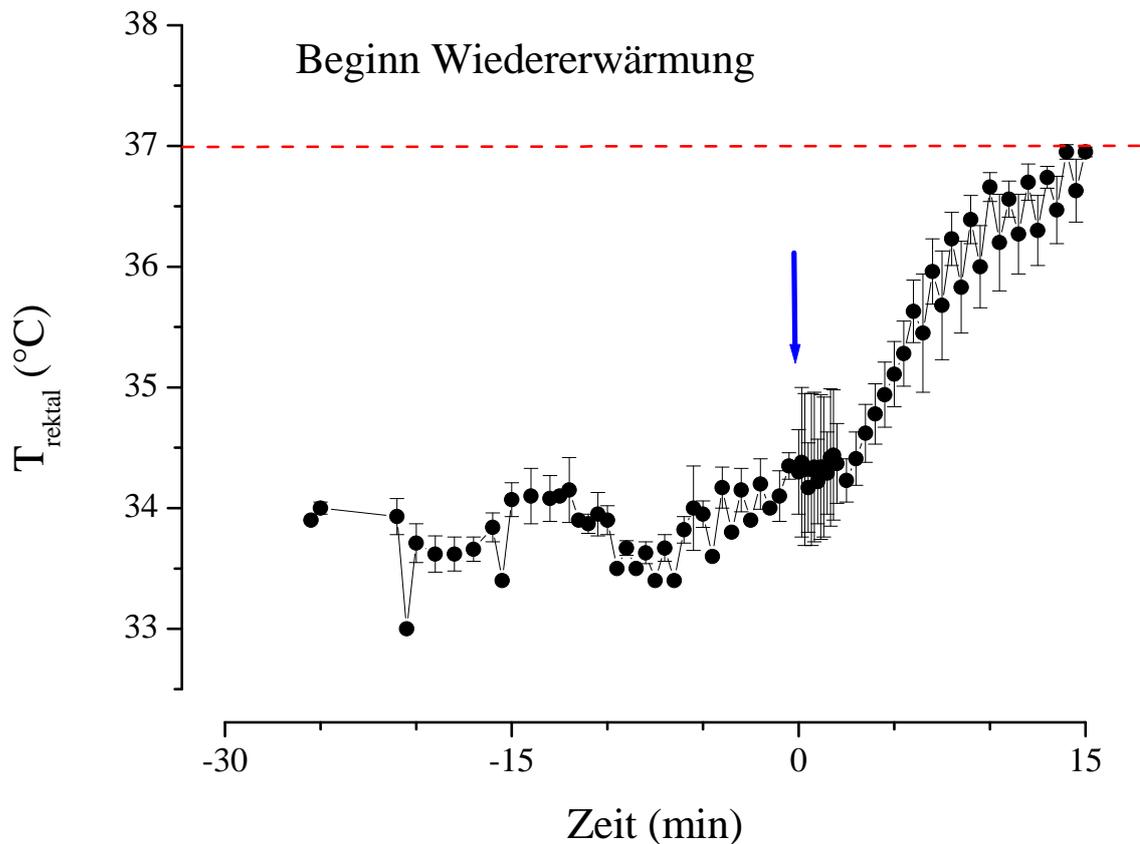


Abbildung 9: Mittelwerte der rektalen Wiedererwärmung, angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (Gruppe C, n = 9)

Ähnlich wie für Xenon erwartet man auch bei der Kühlung einen messbaren neuroprotektiven Effekt erst nach einer längeren Einwirkungsphase. Abbildung 10 zeigt in einer Graphik sowohl die Messwerte für die perikranielle als auch für die rektale Temperatur über einen größeren Zeitraum. Bei dieser Darstellung eines einzelnen Versuches fallen die Temperaturschwankungen, besonders der rektalen Messwerte, deutlich auf. Dadurch werden die oben genannten Probleme während der hypothermen Phase noch einmal veranschaulicht.

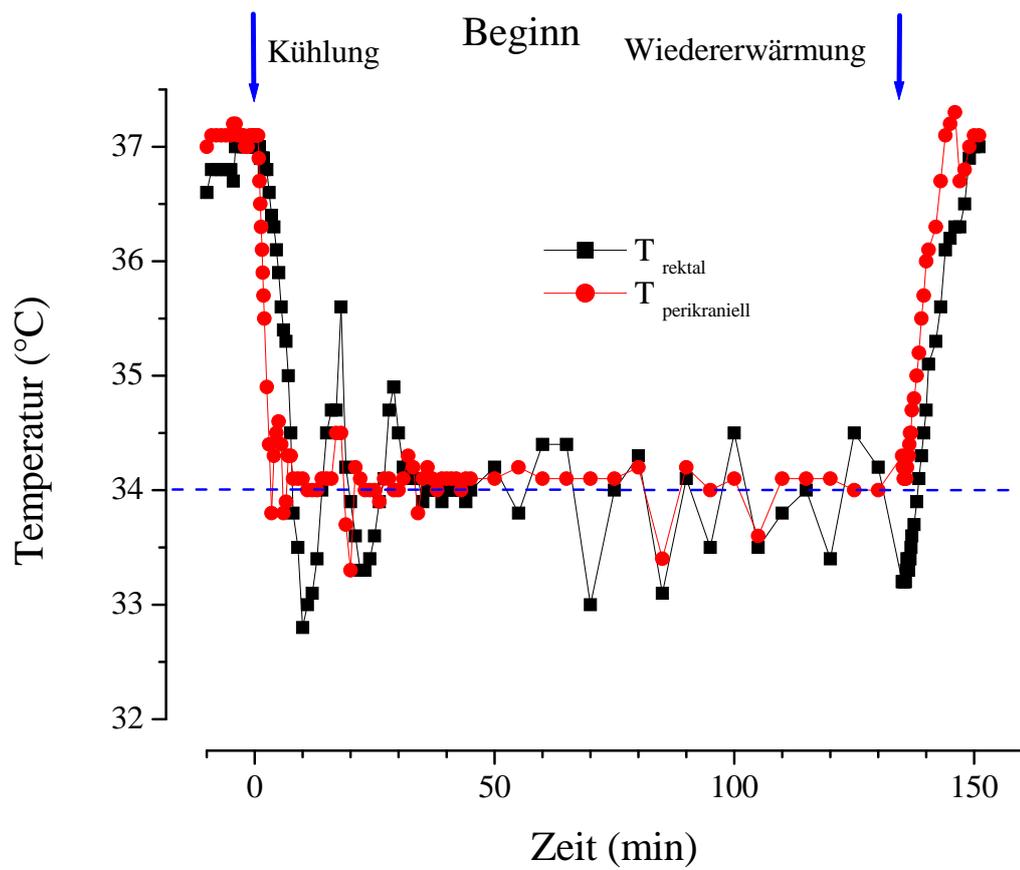


Abbildung 10: Beispiel eines Hypothermie Langzeitversuches, die roten Kreise stehen für die perikranielle Temperatur, die schwarzen Quadrate für die rektal gemessene Temperatur

Während der Hypothermieversuche werden neben den Temperaturmesswerten genau wie in den Normothermie-Versuchen Blutgasmessungen durchgeführt. Daneben werden natürlich auch Herzfrequenz, Blutdruck und Blutglukosewerte erfasst. Dargestellt sind die Ausgangswerte, die Werte während der Kühlung und im Stadium der Wiedererwärmung.

Tabelle 6: Ergebnisse der Blutgas- und Temperaturmessungen von Tieren mit Standardnarkose (Propofol und Fentanyl) bei Hypothermie (Gruppe C)

Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM; in Klammern ist die Zahl der einbezogenen Tiere dargestellt. Es gilt $p < 0,05$ im Vergleich zum Basalwert bei den markierten Werten (*).

	Basalwert	Hypothermie	Wiedererwärmung
OxI (mmHg)	426 \pm 29 (13)	452 \pm 32 (13)	339 \pm 39 (12)
pCO ₂ (mmHg)	45 \pm 3,0 (13)	40 \pm 2,3 (13)	42 \pm 2,0 (13)
pH-Wert	7,37 \pm 0,02 (13)	7,34 \pm 0,01 (13)	7,31 \pm 0,02* (13)
Hb (g/dL)	13,8 \pm 0,4 (13)	12,3 \pm 0,6 (13)	11,6 \pm 0,5* (13)
BZ (mg/dL)	125 \pm 22 (13)	118 \pm 28 (13)	114 \pm 14 (13)

Die Messergebnisse, die während der Hypothermie aufgezeichnet werden, zeigen, dass es auch unter den Bedingungen der Kühlung möglich ist, die pCO₂-Werte in den angestrebten Grenzen zu halten. Durch Nachregulation der Beatmungsfrequenz liegen die pCO₂-Werte sowohl in der Kühlungsphase als auch nach der Wiedererwärmung weiter in den angestrebten Grenzen. Die Tiere entwickeln gegen Ende des Versuches eine geringgradige metabolische Azidose.

Tabelle 7: Die Messergebnisse mit Standardnarkose (Propofol und Fentanyl) bei Hypothermie (Gruppe C)

Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM; in Klammern ist die Zahl der einbezogenen Tiere dargestellt. Es gilt $p < 0,05$ im Vergleich zum Basalwert bei den markierten Werten (*).

	Basalwert	Hypothermie	Wiedererwärmung
HF (1/min)	375 \pm 10 (13)	341 \pm 15* (13)	387 \pm 19 (13)
art. Blutdruck (mmHg)	101 \pm 7 (13)	88 \pm 8 (13)	81 \pm 8 (13)
BE (mmol/l)	-2,04 \pm 0,7 (8)	-3,91 \pm 1,4 (8)	-4,26 \pm 1,3 (7)
T _{perikraniell} (°C)	37,0 \pm 0,08 (13)	34,1 \pm 0,06* (13)	37,1 \pm 0,09 (13)
T _{rektal} (°C)	37,0 \pm 0,1 (13)	33,8 \pm 0,2* (13)	37,1 \pm 0,08 (13)

Die Phase der Hypothermie hat einen Einfluss auf den Blutdruck, der mit Beginn der Kühlung abfällt. Darüber hinaus sinken der Blutdruck und der Hämoglobinwert auch durch die oben schon beschriebenen Blutentnahmen und den Blutverlust geringgradig ab. Besonders auffällig ist die Senkung der Herzfrequenz mit dem Beginn der Kühlung und die Erholung mit der Wiedererwärmung.

6.6 Gewichtsentwicklung der Tiere

Neben den schon erwähnten Laborwerten und der Temperatur der Tiere wird auch ihre Gewichtsentwicklung während ihres Aufenthaltes im Labor festgehalten. Das Gewicht spiegelt die Futter- und Wasseraufnahme der Tiere wider und ist so ein Indikator für deren Allgemeinbefinden. Ein schlechtes Allgemeinbefinden führt zu einer schlechten Futteraufnahme und damit auch zu einem Gewichtsverlust beziehungsweise einer Stagnation in der Gewichtsentwicklung. Andere Faktoren, wie zum Beispiel Frakturen, die eine Futteraufnahme negativ beeinflussen können, werden durch die klinische Untersuchung der Tiere ausgeschlossen. Gewogen werden die Tiere am Versuchstag vor der Narkose (Versuchstag) und in den darauffolgenden Tagen bis zur Tötung der Tiere zur Gewebeentnahme. In Abbildung 11 sind die Mittelwerte des Körpergewichts der Tiere an den entsprechenden Tagen gezeigt. Dabei werden andere Gruppen zusammengestellt als in der Planung der Versuchsgruppen dargestellt. Allen in diese Auswertung eingegangenen Tiere werden in ihrer Gewichtsentwicklung verglichen mit den Tieren, die einem Trauma ausgesetzt waren, den gekühlten Traumatieren und den nichttraumatisierten Kontrolltieren.

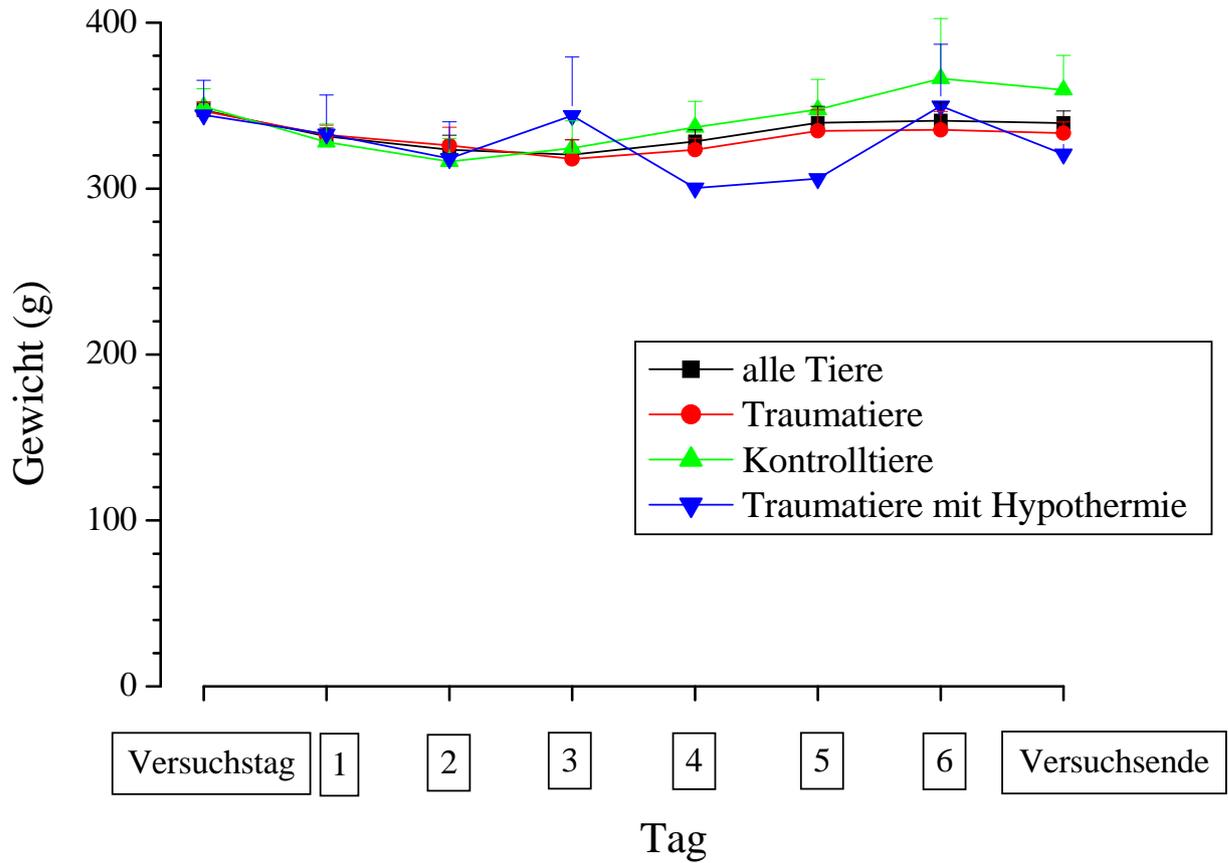


Abbildung 11: Darstellung der Mittelwerte des Körpergewichts. Die schwarzen Quadrate stehen für alle Tiere (n = 53), die roten Kreise für die Traumatiere (n = 39), die blauen Symbole für die gekühlten Traumatiere (n = 3) und die grünen Dreiecke für die Kontrollgruppe (n = 11)

In Abbildung 11 erkennt man, dass die Tiere nach dem Eingriff bis zum Tag 3 an Gewicht verlieren. Einzelne Tiere aus der Gruppe der Traumatiere verlieren bis zum Tag 1 etwa 20 g gegenüber dem Versuchstag. Ab Tag 4 nehmen die Tiere dann wieder zu, um am Tag 7 etwa wieder das Ausgangsgewicht zu erreichen. Auf die Darstellung der Tiere, die Xenon erhalten haben, wird wegen zu geringer Datenmenge verzichtet. Signifikante Unterschiede können in der Gewichtsentwicklung der Tiere zwischen den Gruppen nicht festgestellt werden.

6.7 Histologische Färbungen

Zur Orientierung in den gefärbten Schnitten erfolgt hier zunächst eine von Hand gezeichnete schematische Darstellung des Hippokampus (Abbildung 12). An den Schnitten lassen sich acht Regionen unterscheiden. Als Region 0 bezeichnet man die dorsale hippocampale Kommissur, die Verbindung zwischen der rechten und der linken Seite des Hippokampus. Die folgenden drei Regionen und die zwischen den oberen und unteren Ast des Gyrus dentatus reichende vierte Region werden CA1 bis CA4 benannt und sind für die Auswertung von besonderem Interesse. Unterer und oberer Ast des Gyrus werden als die Regionen fünf und sechs bezeichnet. Sie sind für die Auswertung ebenso von Interesse. Mit der siebten Region wird der Bereich zwischen der Spitze des Gyrus dentatus und der dorsalen hippocampalen Kommissur beschrieben (siehe dazu auch „Literaturübersicht“).

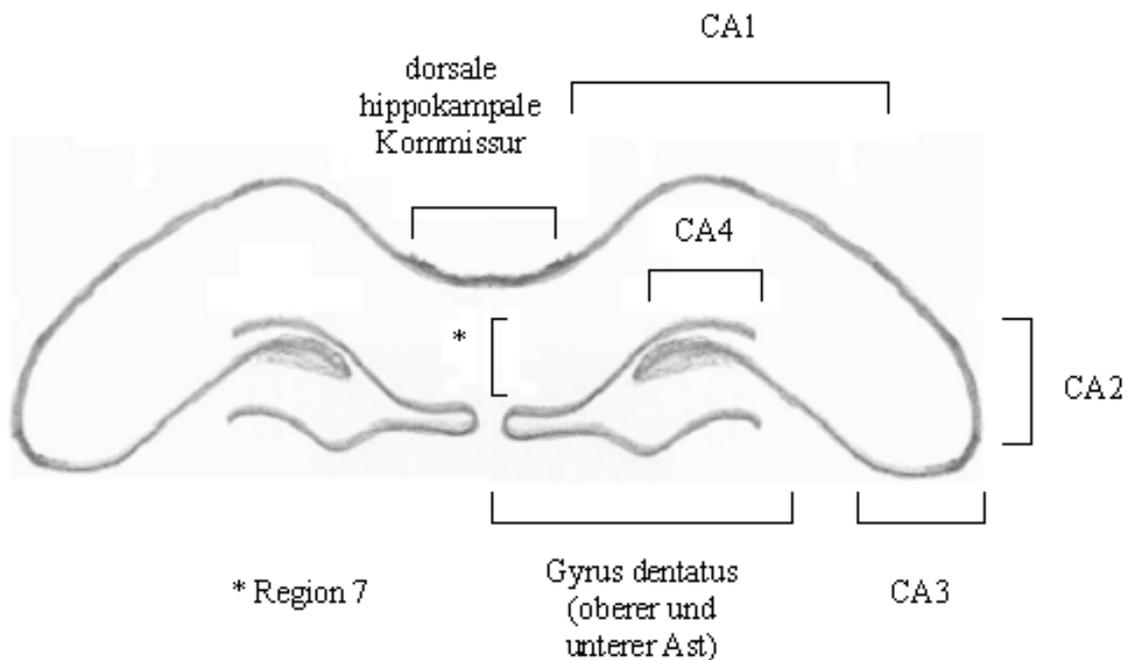


Abbildung 12: Schematische Zeichnung des Hippokampus

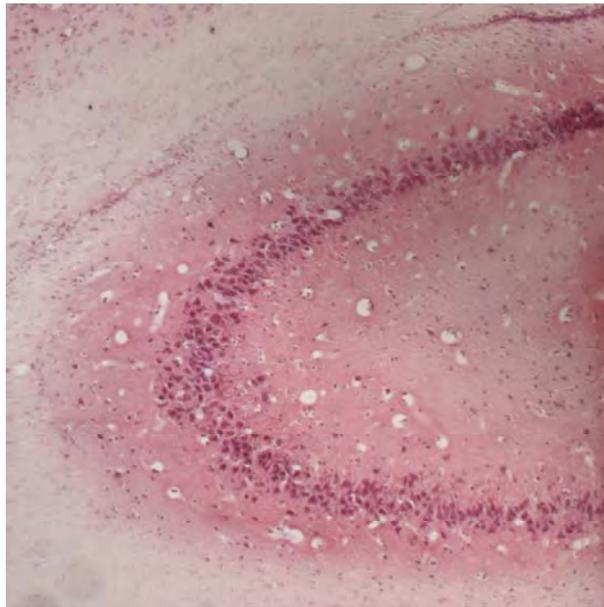
6.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wird mit Hilfe eines Lichtmikroskops vorgenommen. Von besonderem Interesse ist dabei die Hippokampusformation, denn

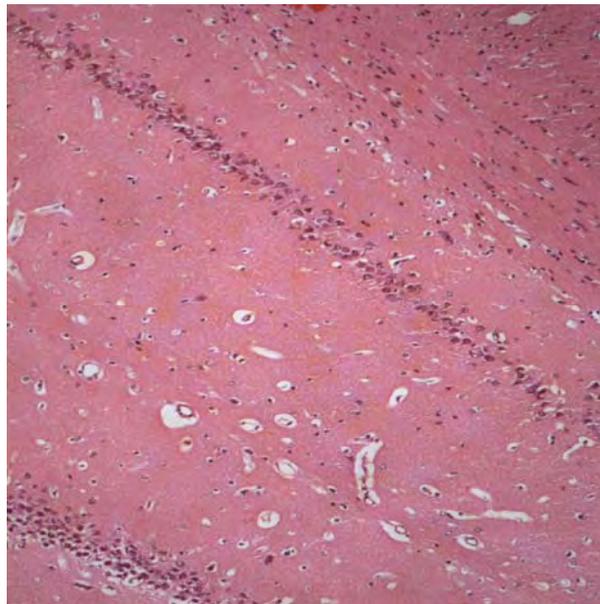
Ergebnisse und Auswertung

dort wird die Läsion vermutet (Abbildungen 13 und 14). Die Zellen in diesem Bereich gelten als besonders empfindlich gegenüber schädigenden Einflüssen (siehe Kapitel „Literaturübersicht“ und „Färbemethoden“). Beschädigte Zellen, die einen nekrotischen Zelltod sterben, färben sich anders an als intakte Zellen. Sie weisen eine eosinophile Färbung auf. Durch die beschriebene Aufarbeitung der Gehirne liegt das Ammonshorn mit dem Gyrus dentatus quergeschnitten vor. Eine erste Beurteilung richtet sich nach der Vollständigkeit des vorliegenden Nervenzellbandes der Regionen CA1 bis CA4 (siehe Kapitel „Das Nervensystem“). Geplant war in 400-facher Vergrößerung mit einer Zählvorrichtung eosinophilen Zellen auszuzählen, getrennt nach den Regionen des Hippokampus. Aus den Werten dieser gezählten Zellen kann anschließend die Gesamtzellzahl der eosinophilen Zellen ermittelt werden. Die Zählung ist auch an archivierten Bildern möglich. Zum Teil fehlen die Nervenzellen in den Schnitten Paraffin-eingebetteter Gehirne. Dieses Artefakt entsteht durch die Aufarbeitung des Gewebes und erschwert die Auswertung.

Da sich nach einer ersten Betrachtung kein deutlicher Unterschied bei Schnitten von Trauma- und Kontrolltieren in der Vollständigkeit der Nervenzellen im Ammonshorn gezeigt hat, ist eine verwertbare Auszählung nicht möglich. Auch durch einen Untersucher, dem die Versuchsgruppen unbekannt sind, konnte visuell kein Unterschied zwischen einem Tier mit Trauma und einem ohne Trauma festgestellt werden.



**Abbildung 13: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Region CA1-CA4 (Experiment 07626),
Vergrößerung 50-fach, kein Trauma**



**Abbildung 14: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Region CA1 (Experiment 071112),
Vergrößerung 50-fach, Trauma**

Ergebnisse und Auswertung

6.7.2 Immunhistochemische Färbung

Die ergänzend geplante immunhistochemische Färbung, die Färbung gegen Caspase-3 mit der Avidin-Biotin Komplexmethode, soll ebenfalls im Hellfeldmikroskop ausgewertet werden können.

Ein brauner Niederschlag zeigt sich in den Schnitten vor allem in den Gefäßwänden (Abbildung 15). Hellere, braune Sprenkel finden sich auch in anderen Bereichen der Schnitte. Eine genaue Zuordnung ist jedoch durch die fehlende Unterscheidungsmöglichkeit der Zellpopulationen mit dieser Färbemethode begrenzt.

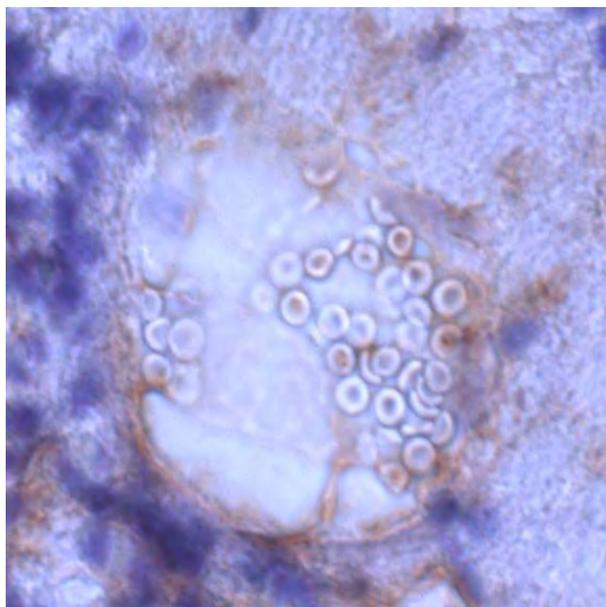


Abbildung 15: DAB-Färbung, Gefäßendothel Kleinhirn mit braunem Niederschlag (Experiment 06821), Vergrößerung 400-fach, Trauma

6.7.3 Immunhistochemische Doppelfärbung

Nach weiterem Textstudium fällt die Wahl auf eine Doppelfärbung gegen Caspase-3 und ein neuronales Strukturprotein (NeuN). Das Färbeergebnis ist bedauerlicherweise auch nicht zufriedenstellend ausgefallen. Alle Modifizierungen des Färbeprotokolls waren nicht erfolgreich. Der Farbstoff bleibt hauptsächlich in Randbereichen des Schnittes und in Falten hängen. Eine Abgrenzung zu dem braunen Farbniederschlag des DAB-Chromogensubstrates ist nicht möglich. Auf Grund dieser Schwierigkeiten werden andere Färbemethoden ausgetestet.



Abbildung 16: Lichtmikroskopische Doppelfärbung, Gyrus dentatus (Experiment 061106), Vergrößerung 100-fach, Trauma



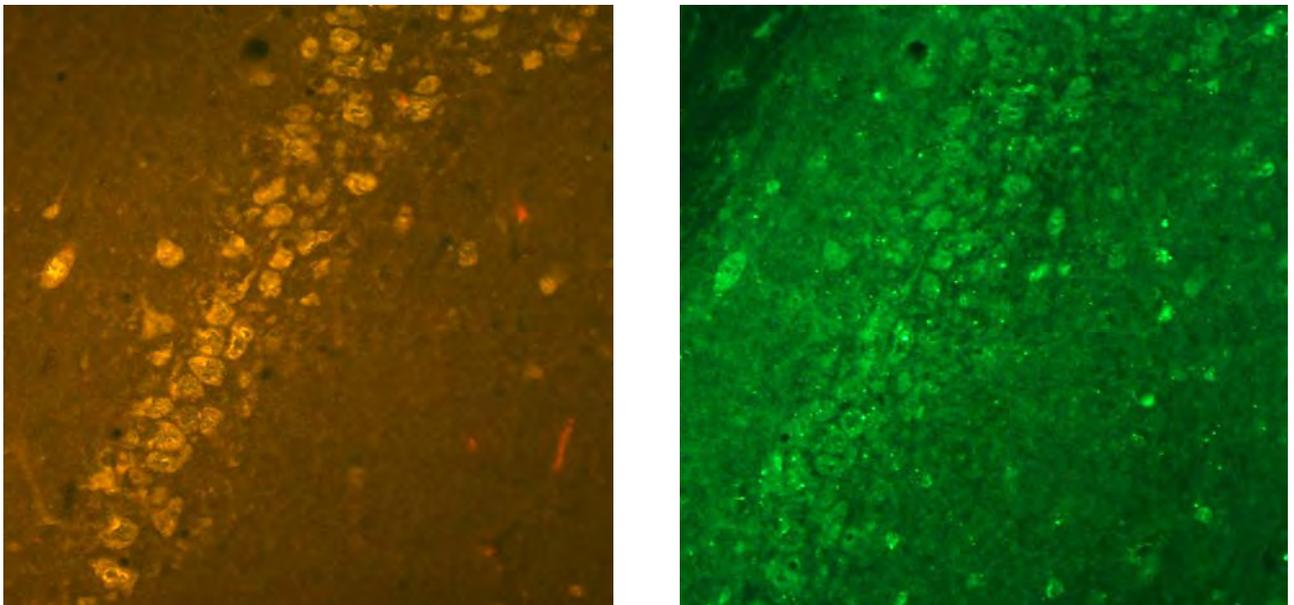
Abbildung 17: Lichtmikroskopische Doppelfärbung, Gyrus dentatus (Experiment 07626), Vergrößerung 10-fach, kein Trauma

6.7.4 Immunfluoreszenzfärbung

Als weitere Alternative zu den bereits durchgeführten Färbungen wird eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung ausgewählt. Nach den negativen Erfahrungen mit der

Ergebnisse und Auswertung

lichtmikroskopischen Doppelfärbung werden die Primärantikörper in der Immunfluoreszenzfärbung zunächst getrennt voneinander ausgetestet. Die Färbung gegen NeuN ist mit beiden ausgetesteten Sekundärantikörpern erfolgreich und kann auch reproduziert werden (Abbildung 18). Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops können Neurone sowohl im Kortex als auch im Hippokampus dargestellt werden. Teilweise sind die Kerne der Neuronen in den Paraffinschnitten herausgelöst beziehungsweise so areaktiv, dass sie sich nicht anfärben. Dabei handelt es sich aber nur um ein Aufbereitungs- und Färbe-bedingtes Artefakt. Die Färbung gegen Caspase-3 dagegen ist weniger erfolgreich. Weder im zunächst verwendeten Thymus noch im Gehirn kann ein eindeutiger Färbeerfolg nachgewiesen werden.



**Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung, Region CA1 (Experiment 071105),
Vergrößerung 200-fach, kein Trauma, Neurone Cy3 (orange), FITC (grün)**

6.7.5 Antigenmaskierung in der Immunfluoreszenzfärbung

Da Caspase-3 in der Zelle lokalisiert ist, könnte ein schlechtes Eindringen des Antikörpers in die Zellen den Färbeerfolg negativ beeinflussen. Um dem entgegen zu wirken kann man eine sogenannte Antigenmaskierung durchführen. Diese hat jedoch zu keinem Erfolg geführt und wurde aus diesem Grund wieder aufgegeben.

Ergebnisse und Auswertung

6.7.6 Einbettung in Paraffin

Die Qualität von Paraffinschnitten ist im Allgemeinen besser als die von Gefrierschnitten (Abbildung 19). Da die an das Institut für Neuropathologie zur Einbettung übergebenen Gehirne bereits einmal eingefroren waren, kann leider keine optimale Schnittqualität erzielt werden. Da auch in den hier ausgetesteten Varianten keine eindeutige Anfärbung auszumachen ist, wird zur Bestätigung der spezifischen Anfärbung die Durchführung einer Präabsorption nötig.

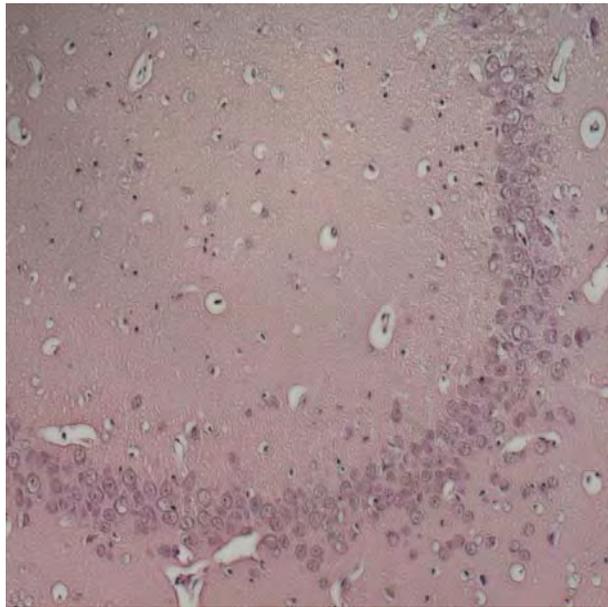


Abbildung 19: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Region CA1-CA3 (Experiment 071102), Vergrößerung 100-fach, kein Trauma

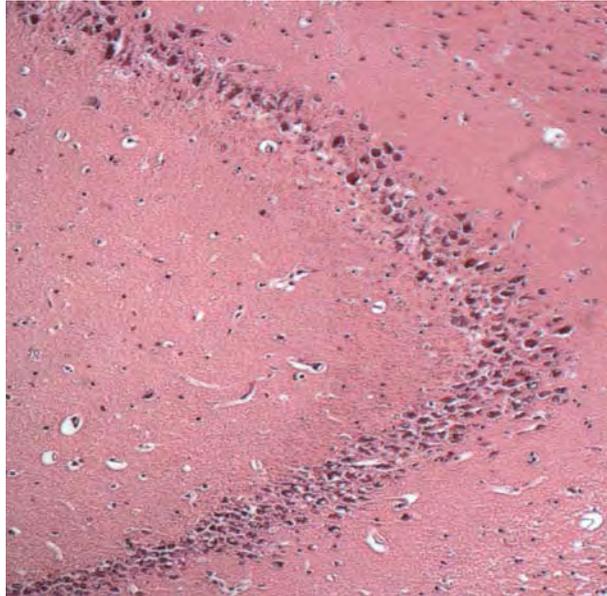


Abbildung 20: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Region CA1-CA3 (Experiment 071112), Vergrößerung 100-fach, Trauma

6.7.7 Präabsorption

Die Präabsorption soll zeigen, dass der Primärantikörper tatsächlich funktioniert und sich an das entsprechende Antigen zu binden vermag. Man erwartet eine Bindung des Primärantikörpers gegen Caspase-3 mit dem passend dazu ausgewählten Antigen während der Vorinkubation. Der Objektträger sollte unter dem Fluoreszenzmikroskop das gleiche Erscheinungsbild haben wie die Negativkontrolle. Die Präabsorption hat unglücklicherweise nicht zu dem erhofften Ergebnis geführt (Abbildung 21).

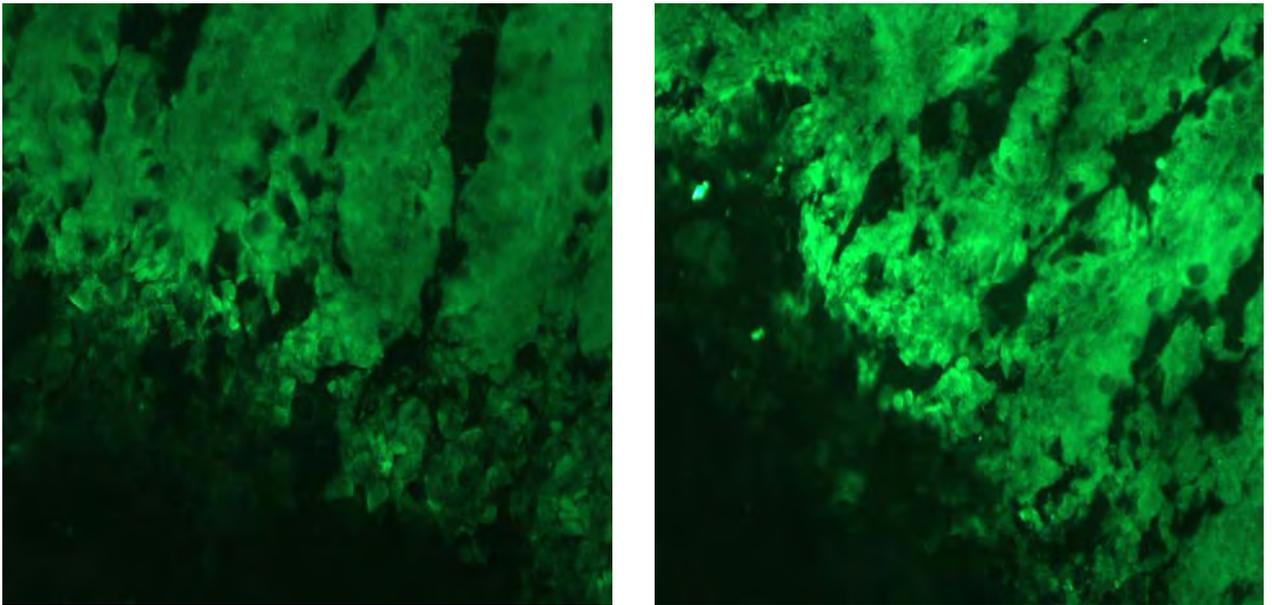


Abbildung 21: Präabsorption Immunfluoreszenz-Färbung, Darm Ratte (Experiment 57508D), Bild links mit Primärantikörper, Bild rechts mit Primärantikörper und Antigen (Präabsorption)

6.8 Die Ergebnisse der Schaumstofftests

Die ersten Versuchen mit Evans Blau haben gleich gezeigt, dass die bisher verwendete Schaumstoffunterlage zu stark abpolsternd wirkt und keine Störung in der Funktion der Blut-Hirn-Schranke auftritt. In den darauffolgenden Versuchen werden Schaumstoffe mit unterschiedlicher Dicke und unterschiedlicher Härte ausprobiert. Darüber hinaus wird die Fallhöhe des Gewichtes variiert. In der unten stehenden Tabelle sind alle durchgeführten Variationen aufgelistet. Ein „+“ -Zeichen bedeutet in Spalte „Evans Blue“, dass sich der Farbstoff im Gewebe findet und in der Spalte „Überleben 24 h“, dass die Tiere nach 24 Stunden nach dem Trauma noch am Leben waren.

Tabelle 8: Ergebnisse der Versuche mit Farbstoff und verschiedenen Fallhöhen

Schaumstoff	Fallhöhe (cm)	Evans Blue im Gewebe	Überleben 24 h
A (3,5 cm)	100	+	-
A x 2 (7 cm)	100	-	+
B (5 cm, weich)	100	-	+
C1 (4 cm, weich)	100	+	-
C1 (4 cm, weich)	90	+	-
C1 (4 cm, weich)	80	+	-
C1 (4 cm, weich)	75	+	-
C1 (4 cm, weich)	72, 5	+	-
C1 (4 cm, weich)	70	-	+
C1 + 1 cm	80	-	+
C2 (4 cm, fest)	100	+	-
C2 (4 cm, fest)	90	-	+
C2 (4 cm, fest)	80	-	+
D (6 cm)	100	-	+
E (5 cm, mittelhart)	100	-	+

Ergebnisse und Auswertung

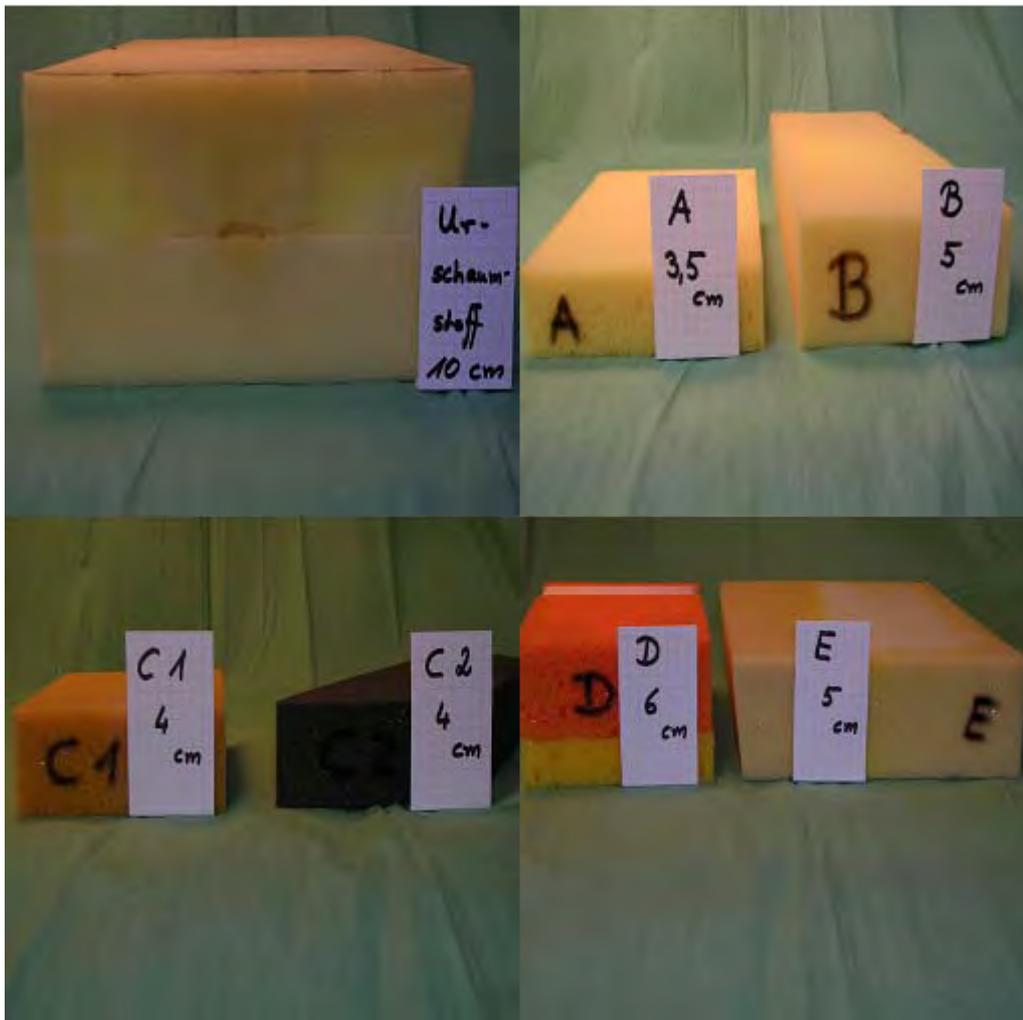


Abbildung 22: Verwendete Schaumstoffe, zum Teil wurden sie miteinander kombiniert, auf den Fotos ist jeweils die Schaumstoffhöhe angegeben

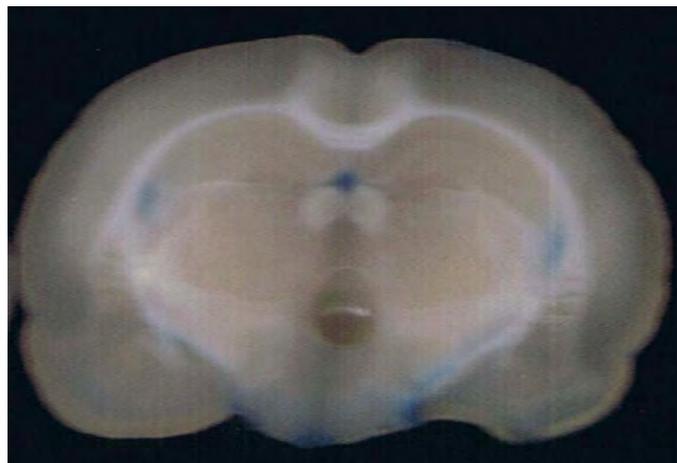


Abbildung 23: Versuch mit Evans Blue, Experiment A80919, Trauma aus 80 cm Höhe, Schaumstoff C2 (4 cm)

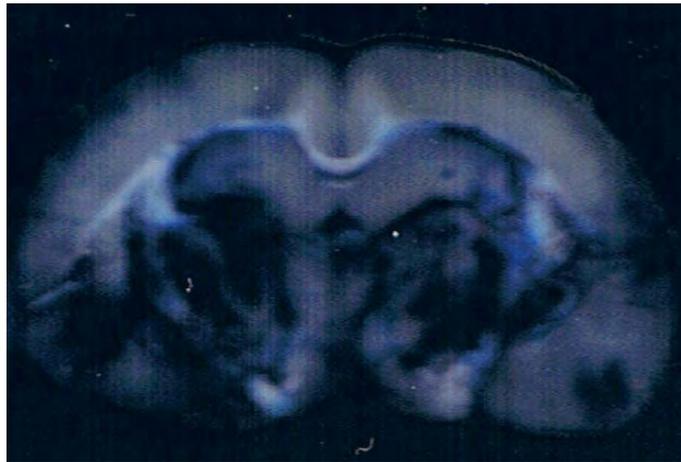


Abbildung 24: Versuch mit Evans Blue, Experiment 080822, Trauma aus 100 cm Höhe, Schaumstoff A (3, 5 cm)

6.9 Rota-Rod Test

Nachdem die Tiere für den neurologischen Test an das Gerät und die darin entstehenden Geräusche gewöhnt worden sind, werden die Ratten in fünf aufeinanderfolgenden Durchläufen getestet. Die Leistung der Ratten nimmt zunächst kontinuierlich zu. Dann verlieren die Tiere das Interesse und lassen sich schon nach wenigen Umdrehungen von dem Rad fallen. Am Tag nach der Erzeugung des Traumas zeigt ein Tier ein gestörtes Allgemeinbefinden. Die Ratte kann sich nur mit Mühe auf dem Laufrad halten, der Versuch muss vorzeitig abgebrochen werden. Das zweite Tier kann an zwei verschiedenen Tagen nach dem Trauma nachgetestet werden und zeigt eine deutlich bessere Leistung. Am ersten Testtag nach dem Trauma ist das Tier schwächer als am zweiten Testtag. Die Ratte, bei der kein Trauma ausgelöst wurde, zeigt keine Beeinträchtigung in der Leistung, ganz im Gegenteil, die Leistung nimmt noch zu. Die Ergebnisse der durchgeführten Tests sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Ergebnisse des Laufradtests, angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte und in Klammern darunter die Zahl der Versuchsdurchgänge

Experiment	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Nachtest 1	Nachtest 2
06821 (Trauma)	0,1 m (4)	0,9 m (5)	0,8 m (5)	3,5 m (5)	0,2 m (5)	/
06822 (Trauma)	0,2 m (6)	1,3 m (5)	1,6 m (5)	2,5 m (5)	1,3 m (5)	2 m (5)
07709 (kein Trauma)	0,69 m (4)	0,71 m (3)	0,8 m (3)	1,1 m (2)	2,3 m (2)	1,89 m (2)

Ergebnisse und Auswertung



Abbildung 25: Ratte auf dem Rota-Rod

7 Diskussion

7.1 Probleme bisheriger Untersuchungen

Die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen vorklinischen und klinischen Untersuchungen von neuroprotektiven Therapeutika erklärt sich zum Teil aus dem Mangel an Komplexität der verwendeten Tiermodelle beziehungsweise aus der eingeschränkten Aussagekraft von in vitro-Modellen. Die meisten Modelle spiegeln nur einen Teilaspekt der eigentlich hochkomplexen, durch mehrere Faktoren bedingten Traumata wieder (Ma *et al.*, 2003; Cernak, 2005; Koerner & Brambrink, 2006). Andere experimentelle Studien waren kurzfristig angelegt, so können langfristige Effekte oft nicht beurteilt werden. Genau diese über längere Zeit zu beobachtenden Effekte von Therapiemaßnahmen können aber für einen klinischen Einsatz entscheidend sein. Zu häufig werden für die Auswertung nur histopathologische Parameter herangezogen und andere Möglichkeiten, wie zum Beispiel die Gewichtsentwicklung der Tiere und motorisch-kognitive Tests, außer Acht gelassen. Einige Studien setzen ein möglicherweise neuroprotektiv wirksames Pharmakon ein, bevor ein Trauma induziert wird. Es erklärt sich von selbst, dass eine so aufgebaute Untersuchung nicht mit der Situation bei einem Unfall vergleichbar ist. Bei geplanten Operationen, bei denen mit ischämischen Komplikationen gerechnet werden muss, können solche Maßnahmen aber eingesetzt werden (Koerner & Brambrink, 2006). Mit NMDA-Rezeptorantagonisten konnten in der Vergangenheit schon beachtliche Erfolge erzielt werden (Celik *et al.*, 2006). Jedoch ließen sich diese in experimentellen Studien erlangten Erkenntnisse nicht in klinischen Studien nachvollziehen. Die Misserfolge liegen zum Teil in ungünstigen pharmakologischen Eigenschaften begründet, die ein schnelles Überwinden der Blut-Hirn-Schranke (zum Beispiel Remacemide) unmöglich machten (Arrowsmith *et al.*, 1998). Bei manchen müssen zum Erzielen einer Wirkung so hohe Dosen verabreicht werden, dass als Nebenwirkung eine systemische Intoxikation auftritt (MK-801). Phencyclidin blockiert zusätzlich bestimmte Serotoninrezeptoren und Kalziumkanäle, wodurch die klinische Einsetzbarkeit limitiert ist (McIntosh *et al.*, 1989). Zudem wirken MK-801 und Phencyclidin selbst neurotoxisch beziehungsweise haben starke psychomimetische

Diskussion

Nebenwirkungen und vermindern so wieder ihr neuroprotektives Potential (Wilhelm *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2003). Dagegen hat der Kalziumkanalblocker Nimodipin einen positiven Effekt auch im klinischen Einsatz bei traumatisch bedingten Subarachnoidalblutungen zeigen können (Harders *et al.*, 1996; Murray *et al.*, 1996). Viele experimentell erfolgreiche Neuroprotektiva haben es hierzulande jedoch im klinischen Alltag nicht zu einer größeren Verbreitung gebracht (Himmelseher & Pfenninger, 2000). Tirilazad ein Aminosteroid-Derivat, hat einen antioxidativen Effekt und könnte so die Entstehung freier Radikale verhindern. Diese greifen sonst die Lipiddoppelschicht der Zellen an und tragen zu einem Fortschreiten der neuronalen Schädigung bei. Auch hier lassen sich die positiven experimentellen Ergebnisse bisher nicht in klinischen Studien nachvollziehen. Klinische Besserungen treten nur bei bestimmten Patientengruppen (männliche Patienten mit Subarachnoidalblutung) auf und verhindern so einen allgemeinen Einsatz als Therapeutikum (Marshall *et al.*, 1998; Narayan *et al.*, 2002).

Studien zum Einsatz von Hypothermie lassen sich oft nur schwer vergleichen, da unterschiedliche Kühl- und Messmethoden zum Einsatz kommen. Darüber hinaus werden unterschiedliche Werte als Zieltemperatur angegeben (Huh *et al.*, 2000; Himmelseher & Werner, 2004). Bisherige Untersuchungen konnten auch noch nicht eindeutig klären, ob die Kühlung des ganzen Körpers oder nur eine selektive Kühlung des Kopfes ausreichend für einen neuroprotektiven Effekt sind (Huh *et al.*, 2000). Dagegen haben einige Studien statt der erhofften Neuroprotektion unerwünschte Wirkungen der Kältebehandlung aufgezeigt (Clifton *et al.*, 2001; Narayan *et al.*, 2002). Aus den bisher gewonnenen Erkenntnissen lassen sich noch keine verlässlichen Empfehlungen zur Hypothermie nach Schädelhirntrauma herauslesen.

7.2 Etablierung des Modells

7.2.1 Wahl des Modells

Die hier vorgestellte Untersuchung hat den Aufbau eines Modells zur Erzeugung eines diffusen Schädelhirntraumas bei Ratten zum Ziel. Als Vorlage für den Modellaufbau werden die Originalarbeiten von Foda und Marmarou (Marmarou *et al.*, 1994; Foda &

Diskussion

Marmarou, 1994) herangezogen. Da in den dort beschriebenen Versuchen, wie in vielen anderen Untersuchungen zum Schädelhirntrauma, Ratten als Versuchstiere dienen, fällt die Wahl auf diese Tiere (siehe „Wahl der Versuchstiere“). Das macht die hier vorgestellte Untersuchung besser mit anderen vergleichbar. Zu der Installation des modifizierten Modells nach Marmarou (Marmarou *et al.*, 1994; Foda & Marmarou, 1994), das bisher in keinem Labor der Justus-Liebig-Universität in Gießen verwendet wird, gehört auch die Etablierung eines Narkoseregimes und eine entsprechende Überwachung der Tiere.

7.2.2 Das Weight drop Modell

Das ausgewählte Weight drop Modell weist erhebliche Vorteile gegenüber anderen Modellen auf. So simuliert es *in vivo* Verhältnisse wie sie nach Auto- oder Skiunfällen, aber auch nach Stürzen auftreten können. Mit der Hilfe von EKG- und Blutdruckmessung sowie der Messung der Blutzucker- und Blutgaswerte können die Auswirkungen eines solchen Traumas auf den gesamten Organismus beobachtet und dokumentiert werden. Dabei wird nur ein moderates Trauma induziert, das den Versuchstieren ein Überleben sichert und sie für weitere Untersuchungen, zum Beispiel motorisch-neurologische Tests, zur Verfügung stehen. In der Durchführung zeigt das Modell jedoch auch gravierende Nachteile. Die zentrale Ausrichtung des Kopfes unter dem Rohr ist für den Versuch genauso essentiell wie die plane Lagerung des Kopfes auf der Schaumstoffunterlage. Beides ist nicht immer in zufriedenstellender Form zu erreichen. Daraus ergeben sich Probleme mit der Standardisierung des Traumas. Trifft das Gewicht den Helm nur wenige Millimeter zu weit kaudal, sind erhebliche Blutungen im Bereich des Hirnstamms die Folge. Diese bedingen eine Beeinträchtigung des Atemzentrums. Der Versuch muss vorzeitig durch Euthanasie der betroffenen Tiere abgebrochen werden, da diese keine Spontanatmung in der Aufwachphase zeigen. Doppelschläge werden verhindert, da sie das Trauma in unkontrollierter Form verstärken. Auch der fehlende histologische Nachweis für das erzeugte Trauma (siehe unten) stellt ein Problem der eigenen Untersuchung dar.

7.3 Wahl der Versuchstiere

Im Jahr 2007 wurden 2 692 890 Wirbeltiere in Deutschland für wissenschaftliche Zwecke eingesetzt. Zu den am häufigsten eingesetzten Versuchstieren gehören dabei Ratten und Mäuse. Sie stellen mit circa 2,2 Millionen Tieren 80% aller Wirbeltiere in Versuchslaboren. Davon wurden im Jahr 2008 484 990 Ratten (*Rattus norvegicus*) und 1 765 416 Mäuse (*Mus musculus*) im Rahmen von Tierversuchen getötet (Quelle: Informationsseite des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung Landwirtschaft, www.bmelv.de, Stand: 23. Oktober 2009). Diese Tiere sind auf Grund ihrer Größe leicht unter Laborbedingungen zu halten, zudem gelten sie als relativ anspruchslos.

Für Schädelhirntrauma-Versuche wurden in der Vergangenheit meist Ratten verwendet. Für die Vergleichbarkeit der eigenen Versuchsergebnisse ist es deshalb sinnvoll, dieselbe Tierart einzusetzen. Der Versuch, Tiere durch alternative Verfahren zu ersetzen, hat zur Etablierung von Gewebekulturen, an denen viele Untersuchungen vorgenommen werden können, geführt. Letztendlich lassen sich aber nur im Tierversuche die vielfältigen Auswirkungen eines Schädelhirntraumas auf den gesamten Organismus wie Blutdruckveränderungen, Blutgase, Verhalten nach dem Erwachen aus der Narkose und im Anschluss daran auch die Effekte der zu testenden Narkoseprotokolle verfolgen. Besonders diese Auswirkungen des induzierten Schädelhirntraumas sollen in der eigenen Untersuchung beobachtet werden. Zur Etablierung des Narkoseprotokolls, der Traumaapparatur und der Einwaschversuche werden insgesamt 134 Tiere benötigt. Andere im Labor erprobte Neuroprotektiva (zum Beispiel NMDA-Antagonisten) haben sich in der Anwendung am Menschen als zu toxisch erwiesen (Fix *et al.*, 1993), deshalb müssen die Wirkungsmechanismen vor der Applikation am Menschen in einem Tiermodell überprüft werden. Dennoch muss man sich bei der Interpretation der Ergebnisse immer vor Augen halten, dass es sich beim Menschen anders verhalten kann. Ratten sind Kulturfolger des Menschen und erstaunlich robust. Kleine Verletzungen heilen schnell, möglicherweise erholen sie sich deshalb schneller von einem induzierten Schädelhirntrauma als andere Spezies. Sorgfältig überwachte klinische Studien sind deshalb vor der breiten Anwendung immer notwendig.

7.4 Histologische Auswertung

Mit dem ausgewählten Modell soll ein diffuses Schädelhirntrauma erzeugt werden, das sich histologisch nur schwer quantifizieren lässt. Bei einem lokal begrenzten Schaden kann das Volumen des Schadens durch Ausmessen berechnet werden (Engelhard *et al.*, 2007). Andere Arbeiten, die einen ähnlichen Färbeansatz verfolgt haben, belegen die Ergebnisse ihrer erfolgreich durchgeführten Färbungen nicht durch entsprechende Bilder (Engelhard *et al.*, 2004). Andere Arbeitsgruppen nutzen ebenfalls Caspasen als Apoptosemarker, verwenden jedoch auch Immunoblot-Methoden aus homogenisiertem Material zu ihrem Nachweis (Sharangpani *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2009; Cheng & Wei, 2009). Dabei kommen Primärantikörper anderer Firmen zum Einsatz, die beschriebenen immunhistochemische Verfahren (zum Beispiel DAB-Färbung) entsprechen sich aber (Gao *et al.*, 2009; Krajewska *et al.*, 2009). In verschiedenen Untersuchungen wird auch die TUNEL-Färbung eingesetzt (Krajewska *et al.*, 2009; Cheng & Wei, 2009).

In dem vorliegenden Fall eines diffusen Schadens verteilen sich einzelne nekrotische beziehungsweise apoptotische Zellen über ein größeres Areal. Dennoch sollten sich vermehrt Caspase-3-positive Zellen im Hippokampus finden, da diese Zellen als besonders sensibel beschrieben werden und eine enge Korrelation zwischen Caspase-3 und dem Ausmaß der Apoptose vermutet wird (Gao *et al.*, 2009; Cheng & Wei, 2009). Diese Region wird auch von anderen Untersuchern zum Nachweis der Apoptose aufgesucht (Gao *et al.*, 2009). Apoptotische Zellen beziehungsweise die in apoptotic bodies verpackten Zellreste werden in der Regel schnell von benachbarten Zellen aufgenommen. Sie liegen nicht in großer Zahl vor, was eine histologische Bewertung erschwert. Die Auswertung ist mit den verwendeten Färbemethoden trotz aller durchgeführten Variationen nicht gelungen. Der ausgewählte Apoptosemarker Caspase-3 (Beer *et al.*, 2000; Alessandri *et al.*, 2006) lässt sich mit den verwendeten Antikörpern im Gewebe nicht nachweisen. Auch die Verwendung von Gewebe, in dem mit Sicherheit immer Zellen durch den programmierten Zelltod zugrunde gehen (Thymus von Jungtieren, Dünndarm) hat keine aussagekräftigen Ergebnisse erbracht. Dies offenbart die Schwäche des beziehungsweise der verwendeten Primärantikörper genauso wie das mangelhafte Ergebnis der Präabsorption. Die ausgewerteten histologischen Bilder weisen visuell keine nennenswerten Unterschiede auf. Die Auswertung der Färbungen erfolgte rein qualitativ. Andererseits räumt der Körper apoptotische Zellen beziehungsweise die entstehenden apoptotic bodies schnell durch benachbarte Zellen ab, daraus kann der

Diskussion

fehlende Nachweis von Caspase-3 auch resultieren. Mit den verwendeten Mitteln gelingt der Nachweis eines erzeugten diffusen Schädelhirntraumas nicht.

7.5 Evans Blue und Schaumstoffe

Die Versuche mit Evans Blue (Hatashita & Hoff, 1990) zeigen ein Grundproblem des Versuchsaufbaus auf. Die Auswahl der verschiedenen Schaumstoffe führt deutlich vor Augen, wie gering die Spanne zwischen dem Überleben und dem Sterben der Tiere ist. Der verwendete 4 cm dicke Schaumstoff (C1) ermöglicht bei einer Fallhöhe des Gewichtes aus 70 cm Höhe das Überleben der Tiere. Leider findet sich kein Evans Blue im Gewebe. Bei einer Erhöhung der Fallhöhe um nur 2,5 cm ist Evans Blue im Gehirn deutlich sichtbar, die Tiere überleben aber den Versuch nicht. Bisher wurde Evans Blue hauptsächlich in Schlaganfall Modellen verwendet. Dabei konnte mit Hilfe des Farbstoffes die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke mit dem Fortschreiten der Schädigung nachgewiesen werden (Hatashita & Hoff, 1990; Karibe *et al.*, 1994). Cernak verwendet ebenfalls Evans Blue im Zusammenhang mit einem Traumamodell. Allerdings nutzt er ein Spektrometer zum Nachweis des Farbstoffs im Gewebe (Cernak *et al.*, 2004). Mit keiner der verwendeten Kombinationen von Schaumstoffstärke und Fallhöhe des Gewichtes kann in den eigenen Versuchen makroskopisch ein verwertbares Ergebnis erzielt werden. Die induzierten Schäden bei den überlebenden Trauma-Tieren sind so dezent, dass sie mit den im eigenen Labor zur Verfügung stehenden technischen Methoden nicht nachweisbar sind. Aber bei den anderen Tieren so erheblich, dass sie entweder direkt nach der Traumaauslösung versterben oder nach der Narkoseausleitung getötet werden müssen, da sie nicht mehr zu eigenständiger Atmung befähigt sind.

7.6 Etablierung und Durchführung des Narkoseregimes

Für die Versuche wird ein Narkoseprotokoll erstellt, das die in der Klinik bei Patienten mit einem Schädelhirntrauma angewendeten Narkosemittel einsetzt. Die Dosierung von Fentanyl und Propofol wird mit Hilfe von Pilotversuchen an die Bedürfnisse der Versuchstiere angepasst. Isofluran wird nur am Versuchsende beziehungsweise zur Verkürzung der Versuchsdauer bei den Evans Blue Versuchen verwendet. Die

Diskussion

Etablierung des Narkoseregimes ist in der vorgelegten Untersuchung eindeutig erfolgreich gelungen. Die Narkoseführung mit Hilfe von computergesteuerten Narkosepumpen ist problemlos durchzuführen. Nach der Optimierung der Beatmung können die Tiere über Stunden in Narkose gehalten werden. Die Vitalparameter der Ratten sind stabil. Beispielsweise liegt die Herzfrequenz während der Versuchsdauer innerhalb der physiologischen Parameter. Nur gegen Ende der Normothermieversuche sinkt der pH-Wert des Blutes geringfügig ab. Unter normalen Bedingungen stimuliert ein steigender $p\text{CO}_2$ -Wert beziehungsweise ein sinkender pH-Wert des Blutes das Atemzentrum im Gehirn. Über diesen Mechanismus wird die Ventilation aktiviert und vermehrt CO_2 mit der Atemluft abgegeben (Engelhardt *et al.*, 2000; Erhardt *et al.*, 2004). Da für die Durchführung des Versuches aber eine tiefe Narkose benötigt wird, werden die Ratten kontrolliert beatmet. Besonders wichtig ist dies vor dem Hintergrund von anderen Schädelhirntrauma-Versuchen mit spontan atmenden Tieren, die nicht erfolgreich waren (Marmarou *et al.*, 1994). Die Notwendigkeit für eine Anpassung der Atemfrequenz bei abweichenden Werten wird während der gesamten Versuchsdauer mit Hilfe der Blutgasmessung überprüft. Andernfalls ist das bluteigene Bikarbonat-Kohlensäure-Puffersystem nicht mehr in der Lage, den pH-Wert des Blutes auf dem physiologischen Niveau zu halten und die Tiere entwickeln in der Folge eine respiratorische Azidose (Engelhardt *et al.*, 2000; Erhardt *et al.*, 2004). Die Optimierung der Beatmung ist für die Aufrechterhaltung des Blut-pH-Wertes von essentieller Bedeutung. Die sich zum Teil entwickelnde Azidose gegen Ende des Eingriffes kann aber auch metabolische Ursachen haben. In der eigenen Untersuchung wird die leichte Azidose nur zum Teil durch die Beatmung erklärt. Während der $p\text{CO}_2$ -Wert Hinweise auf die respiratorische Seite des Säure-Basen-Haushaltes gibt, beleuchten die Werte des Basenüberschusses (base excess, BE) die metabolische Seite. Der Basenüberschuss kann damit einen Hinweis auf metabolische Störungen des Säure-Basen-Haushaltes geben und ist deshalb in die Darstellung der Ergebnisse eingeflossen (Engelhardt *et al.*, 2000; Erhardt *et al.*, 2004). Die Normwerte des BE liegen zwischen + 3 mmol/l und - 3 mmol/l. Ein größerer negativer Wert zeigt das Vorliegen einer metabolischen Azidose an. In den dargestellten Ergebnissen ist in diesem Zusammenhang der im Laufe des Versuches absinkende Blutglukosegehalt (BZ) zu beachten. Das Absinken des Glukosewerts um etwa 20 mg/dL ist in dem hohen Energiebedarf der Tiere begründet. Ratten haben einen raschen Stoffwechsel und nehmen täglich viele kleine Mahlzeiten zu sich (Erhardt *et al.*, 2004; Ewringmann & Glöckner, 2008). Bedingt durch die für den Versuch notwendige

Diskussion

Narkose wird der Energieverbrauch der Tiere zunächst stressbedingt während der Narkoseeinleitung gesteigert, dann geringgradig gesenkt. Eine Futteraufnahme ist jedoch während des vier bis fünf Stunden dauernden Versuches nicht möglich. Durch diese Beeinträchtigung des Kohlenhydratstoffwechsels kann es zu einer stoffwechselbedingten Ansammlung von organischen Säuren im Blut kommen. Der pH-Wert sinkt aber nur geringgradig, während gleichzeitig der Partialdruck von CO₂ abnimmt. Das bedeutet, die sich gegen Ende des Versuches entwickelnde minimale metabolische Azidose wird durch die Anpassung der Beatmung teilweise respiratorisch kompensiert (Engelhardt *et al.*, 2000; Erhardt *et al.*, 2004). In den Versuchen von Marmarou und Cernak kann der pH-Wert im Vergleich zu den eigenen Versuchen konstanter aufrecht erhalten werden. Jedoch weisen die Tiere dort niedrigere CO₂-Partialdrücke auf (Marmarou *et al.*, 1994; Cernak *et al.*, 2004). Die Narkosedauer in diesen Versuchen ist aber um mindestens eine Stunde kürzer als im eigenen Versuch. Der Arbeitsgruppe um Prof. C. Werner in Mainz ist eine konstante Aufrechterhaltung der dokumentierten Parameter über eine Narkosedauer von sechs Stunden gelungen. Der Glukosewert sinkt aber im Vergleich zum Ausgangswert deutlich ab (Eberspacher *et al.*, 2006).

Für die schnellere Erholung der Tiere nach dem Trauma hat sich während der Pilotversuche die subkutane Injektion von Vollelektrolytlösung als nützlich erwiesen. Der durch die Untersuchungen entstehende Blutverlust kann zwar so nicht ausgeglichen werden, dient aber der Unterstützung des Kreislaufes der Ratten, die nur etwa fünf bis acht Milliliter Blut pro 100 Gramm Körpermasse haben (Quesenberry & Carpenter, 2004; Erhardt *et al.*, 2004). Sobald die Ratten wieder aus der Narkose erwacht sind, können sie ihren Glukose- und Flüssigkeitshaushalt durch Nahrungsaufnahme und trinken wieder selbständig regulieren.

7.7 Narkoseführung mit Xenon und unter Hypothermie

Die Einleitung von Xenon in das System ist unter den beschriebenen Versuchsbedingungen ohne weiteres möglich. Die Tiere sind weiterhin stabil in Narkose und zeigen zu keinem Zeitpunkt in der Aufwachphase noch danach negative Reaktionen auf das Gas. Die während des Einwasches auftretenden Schwankungen in der Gaskonzentration sind durch die Umstellung auf einen niedrigen Frischgasfluss zurückzuführen. Sobald sich das System aber eingependelt hat, kann die angestrebte

Diskussion

Edelgaskonzentration stabil gehalten werden. Die Aufrechterhaltung einer Xenonnarkose über einen längeren Zeitraum hat sich als gut durchführbar erwiesen. Durch nur minimale Nachkorrekturen lässt sich die gewünschte Konzentration von 70% Xenon aufrechterhalten. Bei dieser längeren Versuchsdauer sind dann fast keine Änderungen in den Einstellungen mehr nötig. Das Edelgas beweist sich als sicher anzuwendendes Narkosegas, das für einen klinischen Einsatz besonders durch sein schnelles An- und Abfluten geeignet ist.

Die Kühlung der Tiere für die Untersuchung der Auswirkung von hypothermen Phasen stellt an den Untersucher größere Herausforderungen als die Einleitung des Edelgases, da ständigen Schwankungen rechtzeitig entgegengewirkt werden muss. Die verwendeten Kalt/Warm Mehrfach-Kompressen sind verformbar und können für einen optimalen Kontakt der Körperform angepasst werden. Sie haben sich in der Durchführung unter Laborbedingungen bewährt. Zur Kühlung kleiner Körper sind die Kompressen gut geeignet, da sie sowohl im Kühlfach (+4°C) als auch im Tiefkühlfach (-18°C) gelagert werden können. Dadurch stehen sie in verschiedenen Temperaturbereichen für eine schrittweise Abkühlung zur Verfügung. Für ihre Benutzung sind keine besonderen Voraussetzungen notwendig, sie sind einfach in der Handhabung. Die Diskrepanz in den eigenen Ergebnissen zwischen der am Kopf gemessenen Temperatur und der rektal gemessenen Temperatur ist auf die unterschiedlichen Massen zurückzuführen, die gekühlt beziehungsweise wieder erwärmt werden müssen. An dem im Vergleich zur Körpergröße des Tieres kleineren Kopf sind die Zieltemperaturen schneller erreicht. Die Körpertemperatur steigt während der Wiedererwärmungsphase deutlich langsamer an und sinkt zum Teil sogar wieder etwas ab. Sowohl für das Herunterkühlen der Körpermasse als auch zu ihrer Wiedererwärmung sind ein größerer Aufwand und mehr Zeit nötig. Dabei wird vor allem die Wiedererwärmung vorsichtig vorgenommen, um eine überschießende Erwärmung zu verhindern. Hypertherme Phasen können das neurologische Ergebnis verschlechtern (Fukuda & Warner, 2007). Auch in der Aufwachphase wird die Körpertemperatur der Tiere weiter beobachtet und die Infrarotwärmelampe weiter angeboten. Wie schwierig sich die Aufrechterhaltung der Hypothermie über einen längeren Zeitraum gestaltet, zeigen die Ergebnisse des Langzeitversuches. Trotz ständiger Nachkorrekturen mit den Gelkompressen und der Heizmatte beziehungsweise der Wärmelampe gelingt die Aufrechterhaltung der gewünschten Temperatur nicht immer optimal. Die gezeigten Schwankungen lassen sich nicht vermeiden. In der Aufwachphase nach der Narkoseausleitung besteht erneut die

Diskussion

Gefahr der Hyperthermie. Die Tiere müssen bis zum Erwachen ständig kontrolliert werden, da ihre eigene Temperaturregulation durch die Nachwirkungen der Narkosemittel noch beeinträchtigt ist.

Die Kühlung des gesamten Tierkörpers führt zu einer Verringerung der Stoffwechselaktivität. Dadurch wird weniger Energie verbraucht und der Blutglukosespiegel der Hypothermientiere sinkt nicht so auffällig wie in den Versuchen unter Normothermie. Erst mit der Wiedererwärmung steigen die Herzfrequenz und damit auch der Energieverbrauch wieder an. Ein Teil der sich entwickelnden Azidose kann also auch hier eine metabolische Komponente beinhalten. Wie unter den Bedingungen der Normothermie ist diese aber respiratorisch teilweise kompensiert (Erhardt *et al.*, 2004). Zu beachten ist dabei auch, dass mit der absinkenden Temperatur die Löslichkeit von CO₂ im Blut zunimmt. Gleichzeitig fällt dadurch der Partialdruck des Gases ab. Bei der Blutgasmessung mit entsprechend eingestellter Temperatur (34°C) erwartet man dann geringere pCO₂-Werte und eine Erhöhung des pH-Wertes, also eine Alkalose. Im vorliegenden Fall werden alle Messungen bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Der pH-Wert bleibt während der Kühlphase relativ konstant. Neben dem Bikarbonatpuffer spielt vor allem während dieser Phase ein Proteinpuffer-System eine große Rolle (Hogue, Jr. *et al.*, 2006). Die Beatmung wird während der Hypothermiephase entsprechend angepasst. Mit der Wiedererwärmung sinkt die Löslichkeit von CO₂ im Blut dann wieder ab. Durch Nachregulation der Beatmungsfrequenz oder des Beatmungsvolumens können die Werte in den angestrebten Grenzen gehalten werden.

7.8 Die Gewichtsentwicklung

Die Gewichtsentwicklung der Tiere zeigt, dass auch die Tiere an Gewicht verlieren, die keinem Trauma ausgesetzt waren. Diese Reduktion muss auf den durchgeführten Eingriff und den damit einhergehenden Stress für die Tiere selbst zurückzuführen sein. Die Narkose und ihre Nachwirkung haben einen messbaren Effekt auf die Tiere. Als eines der Abbruchkriterien ist eine zu starke Gewichtsabnahme definiert, die auf eine deutliche Beeinträchtigung der Tiere schließen lässt (Ewringmann & Glöckner, 2008). Da weder die Traumatiere noch die Hypothermientiere im Vergleich zu den Kontrolltieren einen deutlich abweichenden Gewichtsverlust zeigen, wird dieses Abbruchkriterium nicht

Diskussion

erfüllt. Das bedeutet auch, dass das induzierte Trauma nur moderat ist und von den Tieren gut toleriert werden kann. Insgesamt nehmen aber die Tiere, die keinem Trauma ausgesetzt waren, ab Tag 3 deutlicher zu als die Traumatiere. In der Stagnation des Körpergewichts der Traumatiere zeigen sich die längerfristigen Auswirkungen des Schädelhirntraumas. Die deutlichen Schwankungen bei den Hypothermietieren mit Trauma gehen auf die geringe Datenmenge zurück. Insgesamt zeigt die Gewichtsentwicklung der Tiere aber einen ähnlichen Verlauf wie bei den anderen dargestellten Gruppen.

7.9 Neurologischer Test mit dem Rota-Rod

Motorische Tests gelten als sensible Methode zur Detektierung von neurologischen Störungen. In der hier vorgestellten Untersuchung kommt das Laufrad nur testweise zum Einsatz. Für die Durchführung der Untersuchung wird eigentlich ein separater Raum mit konstanten Lichtverhältnissen benötigt, der im Rahmen der eigenen Untersuchung aber nicht zur Verfügung steht. Die Gewöhnung der Tiere an das Laufrad und die Tests nehmen mehr Zeit in Anspruch und sind deutlich personalintensiver als ursprünglich eingeplant. Aus diesen Gründen werden nur wenige Versuche mit dem Rota-Rod durchgeführt. Jedoch zeigen schon diese ersten Versuche einen Unterschied bei den Tieren, die ein Trauma erhalten haben. Während bei den Traumatieren die Leistung nach dem Trauma abfällt, steigert sie sich bei dem Tier ohne Trauma weiter. Motorische Defizite, die bei der einfachen Beobachtung der Tiere in ihren Laborkäfigen nicht so deutlich zu Tage treten, können mit Hilfe eines Laufrades erkannt werden (Irwin, 1968; O'Connor *et al.*, 2003). Ersatzweise können die Bewegungsfähigkeit und die Koordination der Tiere in einem größeren Auslauf beobachtet werden. Dieses vereinfachte Verfahren kann auch einen Hinweis auf neurologische Störungen liefern und wird deshalb einmal täglich bis zum Versuchsende durchgeführt. Den motorischen Test kann dieses alternative Vorgehen jedoch nicht ersetzen.

7.10 Relevanz der vorgestellten Untersuchung für die Veterinärmedizin

In der Veterinärmedizin wird Xenon bisher hauptsächlich im Rahmen von Forschungsarbeiten eingesetzt. Als radioaktives Xenon¹³³ dient es zum Beispiel der Untersuchung von Mikrogefäßen und ihrer Durchblutung (Raisis, 2005). Sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin werden heute Endoskope mit Xenon-Lichtquelle eingesetzt. In Lasern mit Xenon-Blitzlichtlampen wird es ebenfalls verwendet (Dietz & Litzke, 2004). Außerdem kann ¹²⁹Xenon bei Magnetresonanzuntersuchungen als Kontrastmittel benutzt werden. In seiner Eigenschaft als narkotisch wirkende Substanz wird es bei Tieren derzeit klinisch kaum angewendet. Es steht aber zum Beispiel unter dem Handelsnamen LENOXeTM von der Firma Air Liquide Medical GmbH (Düsseldorf, Deutschland) für dieses Einsatzgebiet zur Verfügung. Die in der Literatur als Neuroprotektivum sowohl experimentell als auch klinisch beim Menschen zum Teil sehr positiv beschriebene Hypothermie (Busto *et al.*, 1989; Marion & Bullock, 2009) hat in der veterinärmedizinischen Praxis keine Bedeutung. Im Gegenteil, polytraumatisierte Unfalltiere werden wegen der großen Gefahr von Komplikationen (Erhardt *et al.*, 2004) möglichst schonend wieder auf eine physiologische Körpertemperatur erwärmt. Im Allgemeinen wird die Prognose bei hypothermen Tieren als vorsichtig bis schlecht beurteilt.

8 Kritische Schlussbetrachtung

Das Ziel, ein Tiermodell mit entsprechendem Monitoring aufzubauen, wurde nur zum Teil erfüllt. Dagegen kann das Ziel, Xenon als sicheres Narkosegas bei einer Schädelhirnverletzung einzusetzen, als erreicht gelten. Das mit Hilfe des modifizierten Modells nach Marmarou erzeugte Trauma war jedoch zu diffus, um es quantitativ mit den hier verwendeten histologischen Untersuchungsmethoden auszuwerten.

Für weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet empfiehlt es sich daher, ein anderes Modell zu wählen, zum Beispiel das Controlled Cortical Impact Modell. Dieses spiegelt die Verhältnisse nach Unfällen zwar weniger optimal wider, ist aber unter Laborbedingungen einfacher anzuwenden. Die Übertragbarkeit solcher gewonnener Ergebnisse in die klinische Anwendung muß aber auch dann kritisch hinterfragt werden. Die histologischen Färbemethoden, vor allem die immunhistochemischen beziehungsweise die Immunfluoreszenz-Färbungen müssten durch weitere Variationen der Methode und vor allem durch andere Primärantikörper auswertbar gemacht werden. Möglicherweise muss nach anderen Zielantigenen, beispielsweise anderen Apoptosemarkern, im Gewebe gesucht werden.

Unter Versuchsbedingungen war die Bestimmung der Xenon-Konzentration im Beatmungssystem durch Messung der Sauerstoff-Konzentration als einzigem weiterem Gas im System ausreichend. Für den breiten klinischen Einsatz müssten leicht zu bedienende Messvorrichtungen für die Verwendung verschiedener Gasgemische entwickelt werden. Die Kosten, die durch den Einsatz des Edelgases insgesamt im klinischen Alltag entstünden, müssten in Korrelation zu Einsparungen im Pflegeaufwand und einem besseren Outcome Schädelhirnverletzter gesetzt werden.

In der Veterinärmedizin dagegen wird Xenon in absehbarer Zeit keine große Bedeutung erlangen; denn das Patientenaufkommen ist zu gering und es entstehen keine volkswirtschaftlichen Schäden durch neurologische Defizite bei Tieren.

Die Erzeugung einer Hypothermie und ihre Aufrechterhaltung über einen längeren Zeitraum sind gelungen. In der vorgestellten eigenen Untersuchung ließ sich keine

Kritische Schlussbetrachtung

positive oder negative Wirkung anhand der erhobenen Vitalparameter durch die Kühlung absehen. Es zeigte sich aber deutlich, dass die Anwendung der Kühlung größere Herausforderungen an den Untersucher stellte als die Einleitung von Xenon allein. Die auftretenden Schwankungen der Körpertemperatur und die damit verbundenen Änderungen der Laborparameter mussten ständig überwacht und gegebenenfalls therapeutisch eingegriffen werden. Einheitliche Protokolle für klinische Studien mit Kühlung und Wiedererwärmung konnten sich bisher nicht durchsetzen. Auch im Rahmen von Tierversuchen werden verschiedene Untersuchungsprotokolle angegeben. Erst nach Standardisierung wäre die neuroprotektive Wirkung von Hypothermie wirklich vergleichbar mit anderen Neuroprotektiva.

9 Zusammenfassung

Jährlich erleiden alleine in Deutschland etwa 200.000 Menschen ein Schädelhirntrauma (SHT). Davon sterben zirka 20.000 Menschen an den Folgen der Schädigung und weitere 40.000 Menschen erleiden eine Beeinträchtigung ihres Lebens durch bleibende neurologische Schäden bis hin zum andauernden Koma. Die schnelle Versorgung von Patienten mit schwerem Schädelhirntrauma hat einen entscheidenden Einfluss auf das Therapieergebnis. Neuroprotektive Maßnahmen könnten geeignet sein, Folgeschäden zu verringern. Bisher hat jedoch kein getestetes Neuroprotektivum einen durchschlagenden Erfolg gebracht. Das Edelgas Xenon erschien in experimentellen Untersuchungen geeignet, die Folgen eines Schädelhirntraumas zu verringern.

Ziel der eigenen Untersuchung war es, zunächst eine Versuchsvorrichtung aufzubauen, mit der im Tiermodell an Sprague Dawley-Ratten ein diffuses axonales Trauma erzeugt werden konnte. Die Versuchsvorrichtung bestand aus einem Fallrohr, durch das ein Gewicht (454 g) aus verschiedenen Höhen auf den darunter positionierten, fixierten Kopf einer Ratte fiel, die sich in tiefer Allgemeinanästhesie befand. Als Basisanästhesie diente ein dafür standardisiertes Narkoseprotokoll mit Propofol (20mg/kg/h) und Fentanyl (2µg/kg/min). In weiteren Schritten wurde Xenon in einer Konzentration von 70% als Inhalationsanästhetikum allein oder gemeinsam mit Hypothermie eingesetzt. Als Zieltemperatur wurden 34°C ausgewählt. Das Edelgas wurde zusätzlich zur Basisanästhesie eingeleitet und in Ein- und Auswaschversuchen auf seine Anwendbarkeit und Verträglichkeit überprüft. Der Einfluss der Hypothermie auf die Tiere wurde auch auf diesem Weg untersucht.

Zur Auswertung wurden die während der Versuche am Tier erhobenen Daten sowie die Ergebnisse verschiedener histologischer Untersuchungen herangezogen. Zu den ausgewählten Parametern gehörten Blutgasmessungen, Blutzuckerbestimmungen und Blutdruckmessungen sowie Messungen der Körpertemperatur und der Herzfrequenz.

Der feingewebliche Nachweis des Traumas sollte mit verschiedenen histologischen Methoden geführt werden. Geplant war zunächst eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Darstellung nekrotischer Zellen und des weiteren eine Färbung gegen einen Apoptosemarker. Da die so gewonnenen Färbeergebnisse nicht eindeutig waren, wurden

Summary

weitere immunhistochemische Methoden beziehungsweise Immunfluoreszenzfärbungen herangezogen. Als Zielantigen im Gewebe sollte Caspase-3 dienen. Zunächst wurde versucht, diesen Apoptosemarker mit lichtmikroskopisch darstellbaren Farbstoffen sichtbar zu machen. Eine zweite Färbekomponente mit einem neuronalen Strukturprotein sollte eine Unterscheidung von geschädigten Neuronen und der Glia ermöglichen. Als Alternative wurde nach dem Scheitern dieser Versuche eine Färbemethode mit Fluoreszenzmarkern herangezogen die, trotz verschiedener Variationen in der Durchführung, nicht erfolgreich war.

Ein Rota-Rod-Test zur Untersuchung eines motorischen Defizits kam nur probenhalber zum Einsatz. Hierfür müssen die Tiere auf einem Laufrad laufen und die Leistungen vor und nach dem Schädelhirntrauma-Versuch werden miteinander verglichen.

Die Etablierung des Traumamodells und des Narkoseregimes mit und ohne Xenon beziehungsweise Kühlung funktionierte relativ problemlos. Die Tiere verkrafteten die Narkose sowie das induzierte Trauma und stehen für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Die Einwaschversuche beweisen die Anwendbarkeit von Xenon und Hypothermie im Rahmen von Schädelhirntrauma-Versuchen. Dagegen war das erzeugte Gehirntrauma zu diffus, um eine eindeutige histologische Auswertung zu erlauben.

10 Summary

Every year approximately 200.000 persons in Germany sustain a traumatic brain injury. About 20.000 of them die as a result of the injury and further 40.000 will suffer an impairment of their quality of life due to permanent neurologic deficits up to irreversible coma. Early treatment of patients suffer from an impairment has a decisive influence on the outcome. Neuroprotective measures may help to diminish sequelae of the injury. Unfortunately, none of the neuroprotective substances tested until now has proved to be entirely effective. Recent experiments seem to indicate that Xenon, an inert gas, may reduce the sequelae of diffuse axonal brain trauma.

The objective of the present study was first to assemble an experimental device for producing a diffuse axonal trauma in experiments on Sprague Dawley rats. The experimental device was composed of a drain pipe through which a weight (454 g) was

Summary

dropped from different heights on the fixed head of the animal positioned beneath in deep general anesthesia. Basal anesthesia was standardized anesthesia with propofol (20mg/kg/h) and fentanyl (2 μ g/kg/min). Further proceeding consisted in administering 70% Xenon as an inhalation anesthetic alone or combined with hypothermia (target temperature 34°C). The rare gas was given in addition to the basal anesthesia and its applicability and compatibility were tested by passing into the system and elution. The influence of hypothermia on the animals was tested likewise.

The study was evaluated by means of the data from the animal experiments and from the results of various histological studies. The parameters investigated were blood gases, blood sugar, and blood pressure as well as body temperature and heart rate. Different histological methods were used to identify the trauma microscopically. First the necrotic cells were colored with hematoxylin-eosin and a marker of apoptosis was used. Since the results of the staining were not clear, additional immuno histochemical methods and immunofluorescence tests respectively were done. Caspase-3 was used as a target antigen. This marker of apoptosis could be identified by lightmicroscopic dyes. A dye to stain a neuronal structural protein was used to distinguish damaged neurons from neuroglia. After failure of these experiments fluorescence staining was tried, but was unsuccessful too.

Rota-Rod-Test was tried to investigate motor deficiency. The animals must run in a trailing wheel before and after sustaining the brain trauma and their respective performance was compared.

The trauma experiment and anesthesia with and without Xenon and cooling respectively did work quite problem-free. The animals coped with anesthesia and the induced trauma and could be used in further experiments. The pilot trials proved the practicability of Xenon anesthesia show that Xenon and hypothermia can be used in experimental traumatic brain injury. However, the brain injury produced was too diffuse to permit definite histological evaluation.

11 Anhang

11.1 Maligne Hyperthermie

Bei der malignen Hyperthermie handelt es sich um einen autosomal dominant vererbten Gendefekt. Von einem der veränderten Gene ist ein ligandengesteuerter Kalziumkanal in Skelettmuskelzellen betroffen. Ausgelöst wird der lebensbedrohende Zustand durch volatile Anästhetika und depolarisierenden Muskelrelaxantien. In den Muskelzellen erhöht sich die Kalziumkonzentration durch Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum verursacht durch die genannten Medikamente. Dies führt zu starken Muskelkontraktionen und erhöhter Stoffwechselaktivität. Bei beiden Vorgängen entsteht Wärme, die bei einem betroffenen Patienten zu einer lebensgefährlichen Hyperthermie des ganzen Körpers führt (Engelhardt *et al.*, 2000).

11.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Gleichung des Bikarbonat-Kohlensäure-Puffers	12
Abbildung: 2	Vereinfachte Übersicht der vorgestellten Tiermodelle	31
Abbildung 3	Zeitlicher Verlauf der geplanten Versuche	45
Abbildung 4:	Mittelwerte von Xenonein- und –auswasch, angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (Gruppe B, n = 8).....	84
Abbildung 5:	Verlauf der Xenonkonzentration (Beispiel) über einen längeren Zeitraum.....	85
Abbildung 6:	Mittelwerte der perikraniellen Hypothermieinduktion, angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (Gruppe C, n = 9).....	86
Abbildung 7:	Rektalen Temperatur während der Hypothermieinduktion, angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (Gruppe C, n = 9)	87
Abbildung 8:	Mittelwerte der perikraniellen Wiedererwärmung, angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (Gruppe C, n = 9).....	88

Anhang

Abbildung 9:	Mittelwerte der rektalen Wiedererwärmung, angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (Gruppe C, n = 9).....	89
Abbildung 10:	Beispiel eines Hypothermie Langzeitversuches, die roten Kreise stehen für die perikranielle Temperatur, die schwarzen Quadrate für die rektal gemessene Temperatur	90
Abbildung 11:	Darstellung der Mittelwerte des Körpergewichts. Die schwarzen Quadrate stehen für alle Tiere (n = 53), die roten Kreise für die Traumatiere (n = 39), die blauen Symbole für die gekühlten Traumatiere (n = 3) und die grünen Dreiecke für die Kontrollgruppe (n = 11).....	94
Abbildung 12:	Schematische Zeichnung des Hippokampus.....	95
Abbildung 13:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Region CA1-CA4 (Experiment 07626), Vergrößerung 50-fach, kein Trauma	97
Abbildung 14:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Region CA1 (Experiment 071112), Vergrößerung 50-fach, Trauma	97
Abbildung 15:	DAB-Färbung, Gefäßendothel Kleinhirn mit braunem Niederschlag (Experiment 06821), Vergrößerung 400-fach, Trauma.....	98
Abbildung 16:	Lichtmikroskopische Doppelfärbung, Gyrus dentatus (Experiment 061106), Vergrößerung 100-fach, Trauma	99
Abbildung 17:	Lichtmikroskopische Doppelfärbung, Gyrus dentatus (Experiment 07626), Vergrößerung 10-fach, kein Trauma	99
Abbildung 18:	Immunfluoreszenzfärbung, Region CA1 (Experiment 071105), Vergrößerung 200-fach, kein Trauma, Neurone Cy3 (orange), FITC (grün)	100
Abbildung 19:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Region CA1-CA3 (Experiment 071102), Vergrößerung 100-fach, kein Trauma	101
Abbildung 20:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Region CA1-CA3 (Experiment 071112), Vergrößerung 100-fach, Trauma	102
Abbildung 21:	Präabsorption Immunfluoreszenz-Färbung, Darm Ratte (Experiment 57508D), Bild links mit Primärantikörper, Bild rechts mit Primärantikörper und Antigen (Präabsorption)	103
Abbildung 22:	Verwendete Schaumstoffe, zum Teil wurden sie miteinander kombiniert, auf den Fotos ist jeweils die Schaumstoffhöhe angegeben	105
Abbildung 23:	Versuch mit Evans Blue, Experiment A80919, Trauma aus 80 cm Höhe, Schaumstoff C2.....	105

Anhang

Abbildung 24: Versuch mit Evans Blue, Experiment 080822, Trauma aus 100 cm Höhe, Schaumstoff A.....	106
Abbildung 25: Ratte auf dem Rota-Rod	108

11.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Glasgow Coma Scale, modifiziert nach Roche Lexikon Medizin (Roche Lexikon Medizin, 1998)	17
Tabelle 2: Gegenüberstellung der wichtigsten Merkmale von Nekrose und Apoptose (Zusammenfassung aus dem Text)	25
Tabelle 3: Die Versuchsgruppen im Überblick.....	46
Tabelle: 4 Ergebnisse der Blutgas- und Temperaturmessungen von Tieren mit Standardnarkose (Propofol und Fentanyl) bei Normothermie (Gruppe 0 und Gruppe A)	81
Tabelle 5: Die Messergebnisse mit Standardnarkose (Propofol und Fentanyl) bei Normothermie (Gruppe 0 und Gruppe A)	82
Tabelle 6: Ergebnisse der Blutgas- und Temperaturmessungen von Tieren mit Standardnarkose (Propofol und Fentanyl) bei Hypothermie (Gruppe C).....	91
Tabelle 7: Die Messergebnisse mit Standardnarkose (Propofol und Fentanyl) bei Hypothermie (Gruppe C)	92
Tabelle 8: Ergebnisse der Versuche mit Farbstoff und verschiedenen Fallhöhen	104
Tabelle 9: Ergebnisse des Laufradtests, angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte und in Klammern darunter die Zahl der Versuchsdurchgänge	107

11.4 Färbeprotokolle

11.4.1 HE-Färbeprotokoll Gefrierschnitte

1. Schnitte für 2 Minuten in Aqua dest. stellen
2. 10 Minuten in Hämalalaun färben
3. kurz in Aqua dest. stellen
4. 10 Minuten unter fließendem Wasser Bläuen
5. kurz in Aqua dest. stellen
6. 30 Sekunden in Eosin 0,5%ig (mit Eisessig) gegenfärben
7. 2 Minuten in Aqua dest.
8. aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100% für je 2 Minuten)
9. RotiHistol 2 x 3 Minuten (in zwei Gefäßen)
10. 1 Tropfen RotiHistoKitt, Deckgläschen

11.4.2 HE-Färbeprotokoll Paraffinschnitte

1. Schnitte 2 x 5 Minuten in Xylol (Xylol reinst Isomerengemisch, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; Lösungsmittel) stellen
2. absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 70% für je 2 Minuten)
3. Schnitten für 2 Minuten in Aqua dest. stellen
4. 10 Minuten in Hämalalaun färben
5. kurz in Aqua dest. stellen
6. 10 Minuten unter fließendem Wasser Bläuen
7. kurz in Aqua dest. stellen
8. 30 Sekunden in Eosin 0,5%ig (mit Eisessig) gegenfärben
9. 2 Minuten in Aqua dest.
10. aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100% für je 2 Minuten)
11. RotiHistol 2 x 3 Minuten (in zwei Gefäßen)
12. 1 Tropfen RotiHistoKitt, Deckgläschen

11.4.3 Färbeprotokoll der Caspase-3-Färbung mit der Avidin-Biotin Komplexmethode

1. Schnitte antrocknen lassen
2. 10 Minuten in 3% H₂O₂ in Methanol
3. Schnitte mit Fettstift umgeben (Super Pap Pen IM3580, Immunotech Beckman Coulter Company, Marseille, Frankreich)
4. 2 x 3 Minuten PBS (Phosphatpuffer) waschen; absaugen
5. 20 Minuten Proteinblockierungsreagenz von DAKO (je einen Tropfen pro Schnitt aus Tropfflasche); ohne waschen entfernen
6. Primärantikörper BD PharMingen Purified Rabbit Anti-Active Caspase-3 Monoclonal Antibody (Klon C92-605, Katalognummer 559565), Verdünnung mit Proteinblockierungsreagenz (DAKO siehe oben) 1:200, Inkubation über Nacht
7. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen (Kontroll-Objektträger getrennt); absaugen
8. 30 Minuten Inkubation mit 2. Antikörper gebrauchsfertig vorverdünnt (DAKO Detektionskit: Universal-LSAB TM 2Kits; Katalognummer K0609, Kaninchen/Maus), je einen Tropfen pro Schnitt aus Tropfflasche; absaugen
9. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen; absaugen
10. 45 Minuten Inkubation Streptavidin-HRP (-horseradish peroxidase) gebrauchsfertig vorverdünnt (DAKO Detektionskit: Universal-LSAB TM 2Kits; Katalognummer K0609, Kaninchen/Maus), je einen Tropfen pro Schnitt aus Tropfflasche
11. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen; absaugen
12. Färben mit DAB Chromogen (DAKO, Chromogensubstrat, Katalognummer K3465) bis ausreichende Intensität erreicht ist, zirka 2 Minuten, dabei dunkel stellen, Verdünnung DAB 1Tropfen auf 1ml Puffer
13. Schnitte 3 x 10 Minuten in Aqua dest. waschen
14. Gegenfärbung Sekunden mit 4°C kaltem Hämalan
15. waschen mit Leitungswasser (Bläuen) für 10 Minuten
16. aufsteigende Alkoholreihe (in 70% für 2 Minuten, in 96% für 1 Minute, in 100% für eine Minute)
17. RotiHistol (Fa. Roth, Karlsruhe) in zwei verschiedenen Gefäßen 2 und 5 Minuten
18. Eindecken mit RotiHistoKitt

11.4.4 Färbeprotokoll der lichtmikroskopischen Doppelfärbung gegen Caspase-3 und NeuN

1. Schnitte antrocknen lassen
2. 10 Minuten in 3% H₂O₂ in Methanol
3. Schnitte mit einem Fettstift umranden (Super Pap Pen IM3580, Immunotecj Beckman Coulter Company, Marseille, Frankreich)
4. 2 x 3 Minuten in PBS waschen; absaugen
5. 20 Minuten Proteinblockierungsreagenz von DAKO (je einen Tropfen pro Schnitt aus Tropfflasche); ohne waschen entfernen
6. Primärantikörper BD PharMingen Rabbit Anti-Active Caspase-3 Monoclonal Antibody (Klon C92-605, Katalognummer 559565), Verdünnung mit Proteinblockierungsreagenz von DAKO 1:100, Inkubation für 50 Minuten in der feuchten Kammer
7. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen (Kontroll-Objektträger getrennt); absaugen
8. biotinylierten ant-rabbit Sekundärantikörper BA-100 (VectorLabs, Burlingame, USA) auftragen, Verdünnung mit Proteinblock von DAKO 1:200, Inkubation für 45 Minuten
9. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen; absaugen
10. 30 Minuten Inkubation mit Horseradish Peroxidase konjugiertem Strepravidin SA-5704 rtu (ready to use; VectorLabs)
11. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen; absaugen
12. färben mit DAB Chromogen (DAKO, Chromogensubstrat, Katalognummer K3465) bis ausreichende Intensität erreicht ist, zirka 20 Minuten, dabei dunkel stellen, Verdünnung 1 Tropfen auf 1 ml Puffer
13. Schnitte 3 Minuten in Aqua dest. waschen
14. kurz in PBS stellen
15. Primärantikörper Mouse Anti-Neuronal Nuclei (NeuN) Monoclonal Antibody MAB377 (Chemicon International/Millipore, Temecula, USA), Verdünnung mit Proteinblock von DAKO 1:500, Inkubation für 50 Minuten
16. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen; absaugen
17. biotinylierten anti-mouse Sekundärantikörper BA-2001 (VectorLabs), Verdünnung mit Proteinblock von DAKO 1:200, Inkubation für 45 Minuten

Anhang

18. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen; absaugen
19. 30 Minuten Inkubation mit Alkalischer Phosphatase konjugiertem Streptavidin SA-5100 (VectorLabs), Verdünnung mit HEPES-Puffer (Im Labor vorhanden) 1:200
20. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen
21. Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I (VectorLabs, Katalognummer SK-5100) anmischen, zu 5 ml 100 mM Tris-HCL-Puffer (pH 8,2 bis 8,5; im Labor vorhanden) 2 Tropfen von Reagenz 1, 2 Tropfen von Reagenz 2 und 2 Tropfen von Reagenz 3 geben, Inkubation für 30 Minuten
22. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen
23. kurz mit Leitungswasser abspülen
24. aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100% für je eine Minute)
25. RotiHistol (2 und 5 Minuten)
26. Eindecken mit RotiHistoKitt

11.4.5 Färbeprotokoll der Immunfluoreszenzdoppelfärbung gegen Caspase-3 und NeuN

1. Schnitte anfertigen und in Isopropanol (bzw. Aceton, 4% PFA oder Zamboni) fixieren, 1 Stunde trocknen
2. Schnitte mit Fettstift umgeben (Super Pap Pen IM3580, Immunotech Beckman Coulter Company, Marseille, Frankreich)
3. 1 Stunde blocken mit Horseserum 1:1 in PBS; ohne waschen entfernen
4. Primärantikörper BD PharMingen Purified Rabbit Anti-Active Caspase-3 Monoclonal Antibody (Klon C92-605, Katalognummer 559565), Verdünnung 1:100 mit PBS+S; Primärantikörper Mouse Anti-Neuronal Nuclei (NeuN) Monoclonal Antibody (MAB377, Chemicon International, Temecula, USA), Verdünnung 1:100 mit PBS+S; Inkubation über Nacht
5. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen (Kontroll-Objektträger getrennt); absaugen
6. 1 Stunde Inkubation (dunkel) mit den Sekundärantikörpern FITC gt-a-rb-Ig (Cappel), Verdünnung 1:400 mit PBS+S und Cy-3 dk-a-ms-Ig (Dianova), Verdünnung 1:1000 mit PBS+S
7. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen; absaugen

Anhang

8. 10 Minuten Nachfixation in 4% PFA
9. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen; halb trocken saugen
10. gepuffertes Glycerol auftragen, Deckgläschen darüber gleiten lassen
11. kühl und dunkel lagern

11.4.6 Färbeprotokoll der Immunfluoreszenzdoppelfärbung gegen Caspase-3 und NeuN an Paraffinschnitten

1. Schnitte 2 x 5 Minuten in Xylol stellen
2. Absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 70% für je 2 Minuten)
3. Schnitte für 2 Minuten in Aqua dest. stellen
4. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen
5. Schnitte mit einem Fettstift umranden (Super Pap Pen IM3580, Immunotech Beckman Coulter Company, Marseille, Frankreich)
6. 1 Stunde blocken mit Horseserum 1:1 in PBS; ohne waschen entfernen
7. Primärantikörper BD PharMingen Purified Rabbit Anti-Active Caspase-3 Monoclonal Antibody (Klon C92-605, Katalognummer 559565), Verdünnung 1:100 mit PBS+S; Primärantikörper Mouse Anti-Neuronal Nuclei (NeuN) Monoclonal Antibody (MAB377, Chemicon International, Tencula, USA), Verdünnung 1:100 mit PBS+S; Inkubation über Nacht
8. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen (Kontroll-Objektträger getrennt); absaugen
9. 1 Stunde Inkubation (dunkel) mit den Sekundärantikörpern FITC gt-a-rb Ig (Cappel), Verdünnung 1:400 mit PBS+S und Cy-3 dk-a-ms Ig (Dianova), Verdünnung 1:1000 mit PBS+S
10. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen; absaugen
11. 10 Minuten Nachfixation in 4% PFA
12. Schnitte 2 x 3 Minuten in PBS waschen; halb trocken saugen
13. gepuffertes Glycerol auftragen, Deckgläschen darüber gleiten lassen
14. kühl und trocken lagern

11.5 Lösungen

11.5.1 Vorspüllösung

- 25 g Polyvinylpyrrolidon (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- 9 g NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 5 g Procainhydrochlorid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
- pro Tier zirka 200 ml verwenden, vor Perfusion 0,5 ml Heparin (25. 000 IE in 5 ml) hinzufügen

11.5.2 Fixationslösung

- 20 g Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland)
- 250 ml Aqua dest.
- auf 70°C erwärmen
- einige Tropfen NaOH hinzufügen (bis sich die Lösung klärt)
- 250 ml 0,2 M Phosphatpuffer nach dem Abkühlen dazugeben

11.5.3 Lösung A

- 31,2 g Natriumdihydrogenphosphat-2-hydrat (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland)
- auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

11.5.4 Lösung B

- 71,2 g di-Sodiumhydrogenphosphat-Dihydrat (Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- auf 2000 ml mit Aqua dest. auffüllen

Anhang

11.5.5 Phosphatpuffer 0,2 M

- 230 ml Lösung A (Natriumdihydrogenphosphat-2-hydrat)
- 770 ml Lösung B (di-Sodiumhydrogenphosphat-Dihydrat)
- halbe ml-Zahl anschließend mit 500 ml Aqua dest. aufgefüllt ergibt 0,1 M Puffer

11.5.6 PBS-Lösung

- 28,75 ml Lösung A
- 96,20 ml Lösung B
- 22,4 g NaCl
- auf 5000 ml mit Aqua dest. auffüllen
- pH-Wert auf 7,4 einstellen, wenn nötig mit Natronlauge (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) oder Salzsäure (Merck)

11.5.7 PBS+S-Lösung

- 26,75 ml Lösung A
- 96,20 ml Lösung B
- 44,8 g NaCl
- auf ml mit Aqua dest. auffüllen

11.5.8 Sucrose-Lösung 30%ige

- 300 g Sucrose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- auf 1000 ml mit 0,1 M Phosphatpuffer auffüllen

11.5.9 Histoblocklösung

- 10% Horseserum
- 0,5% Tween 20 (Polyethylene-Sorbitan-Monolaurate, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)
- 0,1% Serumalbumin

Anhang

- in PBS

11.5.10 Faulhammer-Blocklösung

- 5% BSA
- 5% NGS
- in PBS

11.5.11 Fixierlösung nach Zamboni

- 2000 ml Aqua dest.
- 350 ml gesättigter Pikrinsäure (Pikrinsäure krist. Reinst, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- 80 g Paraformaldehyd
- Phosphatpuffer

11.5.12 Tris-HCl-Puffer

- 12,1 g Tris
- 1000 ml Aqua dest.
- gewünschten pH-Wert mit Salzsäure (Merck) einstellen

11.5.13 HEPES-Puffer

- 10 mM HEPES 99,5% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- 0,15 mM NaCl
- auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen
- Zugabe des bovinen Serum-Albumins BSA 0,1 mg/ml (Albumine from bovine serum, minimum 98% electrophoresis, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Anhang

11.5.14 10 mM Zitronensäure pH 6,0

- 200 ml 50 mM Zitronensäure (Herstellung im Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen)
- 800 ml Aqua dest.

11.5.15 Triton X 100

- 0,1% Triton X 100 (Serva Feinbiochemica GmbH u. Co., Heidelberg, Deutschland)
- in PBS

11.5.16 Eosin

- 0,5 g Eosin gelblich (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 100 ml Aqua dest.
- vor Gebrauch ansäuern mit Essigsäure 100% (Merck, Darmstadt, Deutschland)

12 Literatur

1. Alessandri B & Bullock R (1998). Glutamate and its receptors in the pathophysiology of brain and spinal cord injuries. *Prog Brain Res* **116**, 303-330.
2. Alessandri B, Nishioka T, Heimann A, Bullock RM, & Kempinski O (2006). Caspase-dependent cell death involved in brain damage after acute subdural hematoma in rats. *Brain Res* **1111**, 196-202.
3. Amess JA, Burman JF, Rees GM, Nancekievill DG, & Mollin DL (1978). Megaloblastic haemopoiesis in patients receiving nitrous oxide. *Lancet* **2**, 339-342.
4. Arrich J, Holzer M, Herkner H, & Mullner M (2009). Hypothermia for neuroprotection in adults after cardiopulmonary resuscitation. *Cochrane Database Syst Rev* CD004128.
5. Arrowsmith JE, Harrison MJ, Newman SP, Stygall J, Timberlake N, & Pugsley WB (1998). Neuroprotection of the brain during cardiopulmonary bypass: a randomized trial of remacemide during coronary artery bypass in 171 patients. *Stroke* **29**, 2357-2362.
6. Baetgen R, Engelhard K, Hennes H-J, Jantzen J-P, Menzel M, & Werner C (2009). Innerklinische Akutversorgung des Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma. *Anästhesiologie und Intensivmedizin* **50**, 489-501.
7. Balboa MA & Balsinde J (2006). Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochemica et Biophysica Acta* 385-391.
8. Bambakidis NC, Theodore N, Nakaji P, Harvey A, Sonntag VK, Preul MC, & Miller RH (2005). Endogenous stem cell proliferation after central nervous system injury: alternative therapeutic options. *Neurosurg Focus* **19**, E1.
9. Bath CP, Farrell LN, Gilmore J, Ward MA, Hicks CA, O'Neill MJ, & Bleakman D (1996). The effects of ifenprodil and eliprodil on voltage-dependent Ca²⁺ channels and in gerbil global cerebral ischaemia. *Eur J Pharmacol* **299**, 103-112.

Literatur

10. Baur CP, Klingler W, Jurkat-Rott K, Froeba G, Schoch E, Marx T, Georgieff M, & Lehmann-Horn F (2000). Xenon does not induce contracture in human malignant hyperthermia muscle. *Br J Anaesth* **85**, 712-716.
11. Bayrhuber H & Kull U (1998). *Linder Biologie*, 21. Auflage ed. Schroedel Verlag GmbH, Hannover.
12. Bedi A, Murray JM, Dingley J, Stevenson MA, & Fee JP (2003). Use of xenon as a sedative for patients receiving critical care. *Crit Care Med* **31**, 2470-2477.
13. Beer R, Franz G, Srinivasan A, Hayes RL, Pike BR, Newcomb JK, Zhao X, Schmutzhard E, Poewe W, & Kampfl A (2000). Temporal profile and cell subtype distribution of activated caspase-3 following experimental traumatic brain injury. *J Neurochem* **75**, 1264-1273.
14. Benavides R, Maze M, & Franks NP (2006). Expansion of gas bubbles by nitrous oxide and xenon. *Anesthesiology* **104**, 299-302.
15. Benninghoff A & Goertler K (1960a). *Lehrbuch der Anatomie des Menschen 1. Band*, 2. Auflage ed. Urban und Schwarzenberg, München, Berlin.
16. Benninghoff A & Goertler K (1960b). *Lehrbuch der Anatomie des Menschen 3. Band*, 6. Auflage ed. Urban und Schwarzenberg, München und Berlin.
17. Bickler PE & Donohoe PH (2002). Adaptive responses of vertebrate neurons to hypoxia. *J Exp Biol* **205**, 3579-3586.
18. Bigelow, Lindsay, & Greenwood (1950). Hypothermia; its possible role in cardiac surgery: an investigation of factors governing survival in dogs at low body temperatures. *Ann Surg* **132**, 849-866.
19. Brockhaus Enzyklopädie (1974). *Brockhaus Enzyklopädie*, 17. Auflage ed. F.A. Brockhaus, Wiesbaden.
20. Burov NE, Dzhabarov DA, Ostapchenko DA, Kornienko LI, & Shulunov MV (1993). [Clinical stages and subjective sensations in xenon anesthesia]. *Anesteziol Reanimatol* 7-11.
21. Busto R, Globus MY, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, & Ginsberg MD (1989). Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* **20**, 904-910.

Literatur

22. Celik SE, Ozturk H, & Tolunay S (2006). Therapeutic effect of hypothermia and dizocilpine maleate on traumatic brain injury in neonatal rats. *J Neurotrauma* **23**, 1355-1365.
23. Cernak I (2005). Animal models of head trauma. *NeuroRx* **2**, 410-422.
24. Cernak I, Vink R, Zapple DN, Cruz MI, Ahmed F, Chang T, Fricke ST, & Faden AI (2004). The pathobiology of moderate diffuse traumatic brain injury as identified using a new experimental model of injury in rats. *Neurobiol Dis* **17**, 29-43.
25. Charriaut-Marlangue C, Ggoun-Zouaoui D, Represa A, & Ben-Ari Y (1996). Apoptotic features of selective neuronal death in ischemia, epilepsy and gp 120 toxicity. *Trends Neurosci* **19**, 109-114.
26. Chen HS & Lipton SA (2006). The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* **97**, 1611-1626.
27. Chen L & Huang LY (1991). Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a mu opioid. *Neuron* **7**, 319-326.
28. Cheng G & Wei L (2009). Atorvastatin ameliorates cerebral vasospasm and early brain injury after subarachnoid hemorrhage and inhibits caspase-dependant apoptosis pathway. *BMC Neuroscience* **10**.
29. Clifton GL (2004). Is keeping cool still hot? An update on hypothermia in brain injury. *Curr Opin Crit Care* **10**, 116-119.
30. Clifton GL, Miller ER, Choi SC, Levin HS, McCauley S, Smith KR, Jr., Muizelaar JP, Wagner FC, Jr., Marion DW, Luerssen TG, Chesnut RM, & Schwartz M (2001). Lack of effect of induction of hypothermia after acute brain injury. *N Engl J Med* **344**, 556-563.
31. Cohen EN, Bellville JW, & Brown BW, Jr. (1971). Anesthesia, pregnancy, and miscarriage: a study of operating room nurses and anesthetists. *Anesthesiology* **35**, 343-347.
32. Cullen & Gross (1951). The anesthetic properties of xenon in animals and human beings, with additional observations on krypton. *Science* **113**, 580-582.

Literatur

33. Dahme E & Weiss E (1999). *Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*, 5. Auflage ed. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
34. Dietrich WD, Busto R, Valdes I, & Loor Y (1990). Effects of normothermic versus mild hyperthermic forebrain ischemia in rats. *Stroke* **21**, 1318-1325.
35. Dietz O & Litzke L-F (2004). *Lehrbuch der Allgemeinen Chirurgie für Tiermediziner*, 6. Auflage ed. Enke Verlag, Stuttgart.
36. Dingley J, Ivanova-Stoilova TM, Grundler S, & Wall T (1999). Xenon: recent developments. *Anaesthesia* **54**, 335-346.
37. Dirnagl U, Iadecola C, & Moskowitz MA (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**, 391-397.
38. Duprat F, Lesage F, Patel AJ, Fink M, Romey G, & Lazdunski M (2000). The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *Mol Pharmacol* **57**, 906-912.
39. Dutton RP & McCunn M (2003). Traumatic brain injury. *Curr Opin Crit Care* **9**, 503-509.
40. Eberspacher E, Heimann K, Hollweck R, Werner C, Schneider G, & Engelhard K (2006). The effect of electroencephalogram-targeted high- and low-dose propofol infusion on histopathological damage after traumatic brain injury in the rat. *Anesth Analg* **103**, 1527-1533.
41. Engelhard K, Werner C, Eberspacher E, Pape M, Stegemann U, Kellermann K, Hollweck R, Hutzler P, & Kochs E (2004). Influence of propofol on neuronal damage and apoptotic factors after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats: a long-term observation. *Anesthesiology* **101**, 912-917.
42. Engelhard K, Winkelheide U, Werner C, Kluge J, Eberspacher E, Hollweck R, Hutzler P, Winkler J, & Kochs E (2007). Sevoflurane affects neurogenesis after forebrain ischemia in rats. *Anesth Analg* **104**, 898-903.
43. Engelhardt Wv, Breves, & G. (2000). *Physiologie der Haustiere* Enke Verlag, Stuttgart.
44. Erhardt W, Henke J, & Haberstroh J (2004). *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier* Schattauer, Stuttgart, New York.

Literatur

45. Ewringmann A & Glöckner B (2008). *Leitsymptome bei Hamster, Ratte, Maus und Rennmaus* Enke Verlag, Stuttgart.
46. Fix AS, Horn JW, Wightman KA, Johnson CA, Long GG, Storts RW, Farber N, Wozniak DF, & Olney JW (1993). Neuronal vacuolization and necrosis induced by the noncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist MK(+)-801 (dizocilpine maleate): a light and electron microscopic evaluation of the rat retrosplenial cortex. *Exp Neurol* **123**, 204-215.
47. Foda MA & Marmarou A (1994). A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg* **80**, 301-313.
48. Franks NP, Dickinson R, de Sousa SL, Hall AC, & Lieb WR (1998). How does xenon produce anaesthesia? *Nature* **396**, 324.
49. Fries M, Bickenbach J, Beckers S, Henzler D, Rossaint R, & Kuhlen R (2004). Neuromonitoring with S-100 protein in the intensive care unit. *Anaesthetist* **53**, 959-964.
50. Fukuda S & Warner DS (2007). Cerebral protection. *Br J Anaesth* **99**, 10-17.
51. Gao Y, Ding X, Xy S, Wang W, Zuo Q, & Kuai F (2009). Neuroprotective effects of edaravone on early brain injury in rats after subarachnoid hemorrhage. *Chinese Medical Journal* **122**, 1935-1940.
52. Gasser S, Khan N, Yonekawa Y, Imhof HG, & Keller E (2003). Long-term hypothermia in patients with severe brain edema after poor-grade subarachnoid hemorrhage: feasibility and intensive care complications. *J Neurosurg Anesthesiol* **15**, 240-248.
53. Goldstein SA, Bockenbauer D, O'Kelly I, & Zilberberg N (2001). Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* **2**, 175-184.
54. Grigore AM, Mathew J, & Grocott HP (2001). Prospective randomized trial of normothermic versus hypothermic cardiopulmonary bypass on cognitive function after coronary artery bypass graft surgery. *Anesthesiology* **95**, 1110-1119.
55. Gruss M, Bushell TJ, Bright DP, Lieb WR, Mathie A, & Franks NP (2004). Two-pore-domain K⁺ channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. *Mol Pharmacol* **65**, 443-452.

Literatur

56. Gunn AJ, Bennet L, Gunning MI, Gluckman PD, & Gunn TR (1999). Cerebral hypothermia is not neuroprotective when started after postischemic seizures in fetal sheep. *Pediatr Res* **46**, 274-280.
57. Gupta AK, Al-Rawi PG, Hutchinson PJ, & Kirkpatrick PJ (2002). Effect of hypothermia on brain tissue oxygenation in patients with severe head injury. *Br J Anaesth* **88**, 188-192.
58. Gupta RC, Milantovic S, Dettbarn W-D, Aschner M, & Milantovic D (2007). Neuronal oxidative injury and dendritic damage induced by carbofuran: Protection by memantine. *Toxicology and Applied Pharmacology* **219**, 97-105.
59. Harders A, Kakarieka A, & Braakman R (1996). Traumatic subarachnoid hemorrhage and its treatment with nimodipine. German tSAH Study Group. *J Neurosurg* **85**, 82-89.
60. Hatashita S & Hoff JT (1990). Brain edema and cerebrovascular permeability during cerebral ischemia in rats. *Stroke* **21**, 582-588.
61. Helmy A, Vizcaychipi M, & Gupta AK (2007). Traumatic brain injury: intensive care management. *Br J Anaesth* **99**, 32-42.
62. Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776.
63. Henker RA, Brown SD, & Marion DW (1998). Comparison of brain temperature with bladder and rectal temperatures in adults with severe head injury. *Neurosurgery* **42**, 1071-1075.
64. Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, Lang-Lazdunski L, Widmann C, Zanzouri M, Romey G, & Lazdunski M (2004). TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* **23**, 2684-2695.
65. Himmelseher S & Pfenninger E (2000). [Neuroprotection in neuroanesthesia: current practices in Germany]. *Anaesthesist* **49**, 412-419.
66. Himmelseher S & Werner C (2004). Therapeutic hypothermia after traumatic brain injury or subarachnoid hemorrhage. Current practices of German anaesthesia departments in intensive care. *Anaesthesist* **53**, 1168-1176.
67. Hoeger H, Engidawork E, Stolzlechner D, Bubna-Littitz H, & Lubec B (2006). Long-term effect of moderate and profound hypothermia on morphology,

Literatur

- neurological, cognitive and behavioural functions in a rat model of perinatal asphyxia. *Amino Acids* **31**, 385-396.
68. Hoffman SW, Moore S, & Ellis F (1997). Isoprostanes: Free radical-generated prostaglandines with constrictor effects on cerebral arterioles. *Stroke* **28**, 844-849.
 69. Hogue CW, Jr., Palin CA, & Arrowsmith JE (2006). Cardiopulmonary bypass management and neurologic outcomes: an evidence-based appraisal of current practices. *Anesth Analg* **103**, 21-37.
 70. Homi HM, Yokoo N, Ma D, Warner DS, Franks NP, Maze M, & Grocott HP (2003). The neuroprotective effect of xenon administration during transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Anesthesiology* **99**, 876-881.
 71. Hsu SM, Raine L, & Fanger H (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* **29**, 577-580.
 72. Huh PW, Belayev L, Zhao W, Koch S, Busto R, & Ginsberg MD (2000). Comparative neuroprotective efficacy of prolonged moderate intraischemic and postischemic hypothermia in focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* **92**, 91-99.
 73. Hutchison JS, Ward RE, Lacroix J, Hebert PC, Barnes MA, Bohn DJ, Dirks PB, Doucette S, Fergusson D, Gottesman R, Joffe AR, Kirpalani HM, Meyer PG, Morris KP, Moher D, Singh RN, & Skippen PW (2008). Hypothermia therapy after traumatic brain injury in children. *N Engl J Med* **358**, 2447-2456.
 74. Inamasu J, Suga S, Sato S, Horiguchi T, Akaji K, Mayanagi K, & Kawase T (2000). Post-ischemic hypothermia delayed neutrophil accumulation and microglial activation following transient focal ischemia in rats. *J Neuroimmunol* **109**, 66-74.
 75. Irwin S (1968). Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* **13**, 222-257.
 76. Jiang JY (2009). Clinical study of mild hypothermia treatment for severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* **26**, 399-406.
 77. Jungwirth B, Gordan ML, Blobner M, Schmehl W, Kochs EF, & Mackensen GB (2006). Xenon impairs neurocognitive and histologic outcome after cardiopulmonary bypass combined with cerebral air embolism in rats. *Anesthesiology* **104**, 770-776.

Literatur

78. Karibe H, Zarow GJ, Graham SH, & Weinstein PR (1994). Mild intraschemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **14**, 620-627.
79. Kerr JF, Wyllie AH, & Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257.
80. Kil HY, Zhang J, & Piantadosi CA (1996). Brain temperature alters hydroxyl radical production during cerebral ischemia/reperfusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **16**, 100-106.
81. Koerner IP & Brambrink AM (2006). Brain protection by anesthetic agents. *Curr Opin Anaesthesiol* **19**, 481-486.
82. König HE & Liebich H-G (1999). *Anatomie der Haussäugetiere Band II* Schattauer Verlag, Stuttgart und New York.
83. Korzhevskii DE, Gilerovich EG, Zin'kova NN, Grigor'ev IP, & Otellin VA (2006). Immunocytochemical detection of brain neurons using the selective marker NeuN. *Neurosci Behav Physiol* **36**, 857-859.
84. Krajewska M, Smith LH, Rong J, Huang X, & Hyer M (2009). Image analyses algorithms for immunohistochemical assessment of cell death events and fibrosis in tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **57**, 649-663.
85. Laitio RM, Kaisti KK, Laangsjo JW, Aalto S, Salmi E, Maksimow A, Aantaa R, Oikonen V, Sipila H, Parkkola R, & Scheinin H (2007). Effects of Xenon Anesthesia on Cerebral Blood Flow in Humans: A Positron Emission Tomography Study. *Anesthesiology* **106**, 1128-1133.
86. Lane GA, Nahrwold ML, Tait AR, Taylor-Busch M, Cohen PJ, & Beaudoin AR (1980). Anesthetics as teratogens: nitrous oxide is fetotoxic, xenon is not. *Science* **210**, 899-901.
87. Lang-Lazdunski L, Blondeau N, Jarretou G, Lazdunski M, & Heurteaux C (2003). Linolenic acid prevents neuronal cell death and paraplegia after transient spinal cord ischemia in rats. *J Vasc Surg* **38**, 564-575.
88. Larsen R (2006). *Anästhesie*, 8 Auflage ed. Elsevier Urban und Fischer, München.

Literatur

89. Lawrence JH, Loomis WF, Tobias CA, & Turpin FH (1946). Preliminary observations on the narcotic effect of xenon with a review of values for solubilities of gases in water and oils. *J Physiol* **105**, 197-204.
90. Layzer RB (1978). Myeloneuropathy after prolonged exposure to nitrous oxide. *Lancet* **2**, 1227-1230.
91. Lipton SA & Nicotera P (1998). Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. *Cell Calcium* **23**, 165-171.
92. Lockwood GG, Franks NP, Downie NA, Taylor KM, & Maze M (2006). Feasibility and safety of delivering xenon to patients undergoing coronary artery bypass graft surgery while on cardiopulmonary bypass: phase I study. *Anesthesiology* **104**, 458-465.
93. Luttrupp HH, Rydgren G, Thomasson R, & Werner O (1991). A minimal-flow system for xenon anesthesia. *Anesthesiology* **75**, 896-902.
94. Ma D, Hossain M, Chow A, Arshad M, Battson RM, Sanders RD, Mehmet H, Edwards AD, Franks NP, & Maze M (2005). Xenon and hypothermia combine to provide neuroprotection from neonatal asphyxia. *Ann Neurol* **58**, 182-193.
95. Ma D, Wilhelm S, Maze M, & Franks NP (2002). Neuroprotective and neurotoxic properties of the 'inert' gas, xenon. *Br J Anaesth* **89**, 739-746.
96. Ma D, Williamson P, Januszewski A, Nogaro MC, Hossain M, Ong LP, Shu Y, Franks NP, & Maze M (2007). Xenon mitigates isoflurane-induced neuronal apoptosis in the developing rodent brain. *Anesthesiology* **106**, 746-753.
97. Ma D, Yang H, Lynch J, Franks NP, Maze M, & Grocott HP (2003). Xenon attenuates cardiopulmonary bypass-induced neurologic and neurocognitive dysfunction in the rat. *Anesthesiology* **98**, 690-698.
98. Marion D & Bullock MR (2009). Current and future role of therapeutic hypothermia. *J Neurotrauma* **26**, 455-467.
99. Marmarou A, Foda MA, van den BW, Campbell J, Kita H, & Demetriadou K (1994). A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* **80**, 291-300.
100. Marshall LF, Maas AI, Marshall SB, Bricolo A, Fearnside M, Iannotti F, Klauber MR, Lagarrigue J, Lobato R, Persson L, Pickard JD, Piek J, Servadei F, Wellis

Literatur

- GN, Morris GF, Means ED, & Musch B (1998). A multicenter trial on the efficacy of using tirilazad mesylate in cases of head injury. *J Neurosurg* **89**, 519-525.
101. Martin JL, Ma D, Hossain M, Xu J, Sanders RD, Franks NP, & Maze M (2007). Asynchronous administration of xenon and hypothermia significantly reduces brain infarction in the neonatal rat. *Br J Anaesth* **98**, 236-240.
102. McIntosh TK, Vink R, Soares H, Hayes R, & Simon R (1989). Effects of the N-methyl-D-aspartate receptor blocker MK-801 on neurologic function after experimental brain injury. *J Neurotrauma* **6**, 247-259.
103. McIntyre LA, Fergusson DA, Hebert PC, Moher D, & Hutchison JS (2003). Prolonged therapeutic hypothermia after traumatic brain injury in adults: a systematic review. *JAMA* **289**, 2992-2999.
104. Morris, Knott, & Pittinger (1955). Electro-encephalographic and blood gas observations in human surgical patients during xenon anesthesia. *Anesthesiology* **16**, 312-319.
105. Morris GF, Bullock R, Marshall SB, Marmarou A, Maas A, & Marshall LF (1999). Failure of the competitive N-methyl-D-aspartate antagonist Selfotel (CGS 19755) in the treatment of severe head injury: results of two phase III clinical trials. The Selfotel Investigators. *J Neurosurg* **91**, 737-743.
106. Morris R (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* **11**, 47-60.
107. Mortimer CE (2000). *Chemie*, 6. Auflage ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart und New York.
108. Mosbacher J, Schoepfer R, Monyer H, Burnashev N, Seeburg PH, & Ruppertsberg JP (1994). A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. *Science* **266**, 1059-1062.
109. Moskopp D & Wassmann H (2005). *Neurochirurgie* Schattauer Verlag, Stuttgart, New York.
110. Mullen RJ, Buck CR, & Smith AM (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* **116**, 201-211.

Literatur

111. Murray GD, Teasdale GM, & Schmitz H (1996). Nimodipine in traumatic subarachnoid haemorrhage: a re-analysis of the HIT I and HIT II trials. *Acta Neurochir (Wien)* **138**, 1163-1167.
112. Nakashima K & Todd MM (1996). Effects of hypothermia on the rate of excitatory amino acid release after ischemic depolarization. *Stroke* **27**, 913-918.
113. Nakata Y, Goto T, & Morita S (2001). Clinical pharmacology of xenon. *Int Anesthesiol Clin* **39**, 63-75.
114. Narayan RK, Michel ME, Ansell B, Baethmann A, Biegon A, Bracken MB, Bullock MR, Choi SC, Clifton GL, Contant CF, Coplin WM, Dietrich WD, Ghajar J, Grady SM, Grossman RG, Hall ED, Heetderks W, Hovda DA, Jallo J, Katz RL, Knoller N, Kochanek PM, Maas AI, Majde J, Marion DW, Marmarou A, Marshall LF, McIntosh TK, Miller E, Mohberg N, Muizelaar JP, Pitts LH, Quinn P, Riesenfeld G, Robertson CS, Strauss KI, Teasdale G, Temkin N, Tuma R, Wade C, Walker MD, Weinrich M, Whyte J, Wilberger J, Young AB, & Yurkewicz L (2002). Clinical trials in head injury. *J Neurotrauma* **19**, 503-557.
115. Nickel R, Schummer A, & Seiferle E (1992a). *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band I*, 6. Auflage ed. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
116. Nickel R, Schummer A, & Seiferle E (1996). *Lehrbuch der Anatomie der Haussäugetiere Band III*, 3. Auflage ed. Verlag Paul Parey, Berlin.
117. Nickel R, Schummer A, & Seiferle E (1992b). *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band IV*, 3. Auflage ed. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
118. O'Connor C, Heath DL, Cernak I, Nimmo AJ, & Vink R (2003). Effects of daily versus weekly testing and pre-training on the assessment of neurologic impairment following diffuse traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* **20**, 985-993.
119. Olsen TS, Weber UJ, & Kammergaard LP (2003). Therapeutic hypothermia for acute stroke. *Lancet Neurol* **2**, 410-416.
120. Patel AJ & Honore E (2001b). Molecular physiology of oxygen-sensitive potassium channels. *Eur Respir J* **18**, 221-227.
121. Patel AJ & Honore E (2001a). Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci* **24**, 339-346.

Literatur

122. Patel PM, Drummond JC, Cole DJ, & Goskowitz RL (1995). Isoflurane reduces ischemia-induced glutamate release in rats subjected to forebrain ischemia. *Anesthesiology* **82**, 996-1003.
123. Petzelt C, Blom P, Schmehl W, Muller J, & Kox WJ (2003). Prevention of neurotoxicity in hypoxic cortical neurons by the noble gas xenon. *Life Sci* **72**, 1909-1918.
124. Polderman KH, Tjong Tjin JR, Peerdeman SM, Vandertop WP, & Girbes AR (2002). Effects of therapeutic hypothermia on intracranial pressure and outcome in patients with severe head injury. *Intensive Care Med* **28**, 1563-1573.
125. Quesenberry KE & Carpenter JW (2004). *Ferrets, Rabbits and Rodents*, Second Edition ed. Saunders/Elsevier, St. Louise.
126. Rasis AL (2005). Skeletal muscle blood flow in anaesthetized horses. Part I: measurement techniques. *Vet Anaesth Analg* **32**, 324-330.
127. Rajakumaraswamy N, Ma D, Hossain M, Sanders RD, Franks NP, & Maze M (2006). Neuroprotective interaction produced by xenon and dexmedetomidine on in vitro and in vivo neuronal injury models. *Neurosci Lett* **409**, 128-133.
128. Rex S, Schaefer W, Meyer PH, Rossaint R, Boy C, Setani K, Bull U, & Baumert JH (2006). Positron emission tomography study of regional cerebral metabolism during general anesthesia with xenon in humans. *Anesthesiology* **105**, 936-943.
129. Reyle-Hahn M & Rossaint R (2000a). [Xenon--a new anesthetic]. *Anaesthesist* **49**, 869-874.
130. Reyle-Hahn M & Rossaint R (2000b). [Xenon--a new anesthetic]. *Anaesthesist* **49**, 869-874.
131. Reyle-Hahn M & Rossaint R (2000c). [Xenon--a new anesthetic]. *Anaesthesist* **49**, 869-874.
132. Reyle-Hahn M & Rossaint R (2000d). [Xenon--a new anesthetic]. *Anaesthesist* **49**, 869-874.
133. Roche Lexikon Medizin H-LRA (1998). *Roche Lexikon Medizin*, 4. Auflage ed. Urban u. Schwarzenberg, München - Wien - Baltimore.

Literatur

134. Romeis B (1989). *Mikroskopische Technik*, 17. Auflage ed. Urban und Schwarzenberg (P. Böck), München, Wien, Baltimore.
135. Royo NC, Shimizu S, Schouten JW, Stover JF, & McIntosh TK (2003). Pharmacology of traumatic brain injury. *Curr Opin Pharmacol* **3**, 27-32.
136. Rumana CS, Gopinath SP, Uzura M, Valadka AB, & Robertson CS (1998). Brain temperature exceeds systemic temperature in head-injured patients. *Crit Care Med* **26**, 562-567.
137. Ruscher K, Isaev N, Trendelenburg G, Weih M, Iurato L, Meisel A, & Dirnagl U (1998). Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett* **254**, 117-120.
138. Sanders RD, Franks NP, & Maze M (2003). Xenon: no stranger to anaesthesia. *Br J Anaesth* **91**, 709-717.
139. Santhakumar V, Bender R, Frotscher M, Ross ST, Hollrigel GS, Toth Z, & Soltesz I (2000). Granule cell hyperexcitability in the early post-traumatic rat dentate gyrus: the 'irritable mossy cell' hypothesis. *J Physiol* **524 Pt 1**, 117-134.
140. Schmidt M, Marx T, Kotzerke J, Luderwald S, Armbruster S, Topalidis P, Schirmer U, & Reinelt H (2001). Cerebral and regional organ perfusion in pigs during xenon anaesthesia. *Anaesthesia* **56**, 1154-1159.
141. Schmidt M, Marx T, Papp-Jambor C, Schirmer U, & Reinelt H (2002). Effect of xenon on cerebral autoregulation in pigs. *Anaesthesia* **57**, 960-966.
142. Sharangpani A, Takanohashi A, & Bell MJ (2008). Caspase activation in fetal rat brain following experimental intrauterine inflammation. *Brain Res* **1200**, 138-145.
143. Silbernagl S & Despopoulos A (2001). *Taschenatlas der Physiologie*, 5. Auflage ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart und New York.
144. Soukup J, Zauner A, Doppenberg EM, Menzel M, Gilman C, Young HF, & Bullock R (2002). The importance of brain temperature in patients after severe head injury: relationship to intracranial pressure, cerebral perfusion pressure, cerebral blood flow, and outcome. *J Neurotrauma* **19**, 559-571.

Literatur

145. Spence AA (1987). Environmental pollution by inhalation anaesthetics. *Br J Anaesth* **59**, 96-103.
146. Sta MN & Eckmann DM (2003). Model predictions of gas embolism growth and reabsorption during xenon anesthesia. *Anesthesiology* **99**, 638-645.
147. Stünzi H & Weiss E (1990). *Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin*, 8. Auflage ed. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
148. Teasdale G & Jennett B (1976). Assessment of coma after head injury. *Acta Neurochir (Wien) 5th European Congress of Neurosurgery* **34**, 45-55.
149. Teasdale G & Jennett B (1974). Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* **2**, 81-84.
150. Thornberry NA & Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.
151. Trepel M (1995). *Neuroanatomie* Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.
152. Vaisman AI (1967). [Working conditions in the operating room and their effect on the health of anesthetists]. *Eksp Khir Anesteziol* **12**, 44-49.
153. Werner C & Engelhard K (2007). Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth* **99**, 4-9.
154. Wilhelm S, Ma D, Maze M, & Franks NP (2002). Effects of xenon on in vitro and in vivo models of neuronal injury. *Anesthesiology* **96**, 1485-1491.
155. Wunderlich MT, Ebert AD, Kratz T, Goertler M, Jost S, & Herrmann M (1999). Early neurobehavioral outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* **30**, 1190-1195.
156. Xu L, Yenari MA, Steinberg GK, & Giffard RG (2002). Mild hypothermia reduces apoptosis of mouse neurons in vitro early in the cascade. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 21-28.
157. Xu X, Pan Y, & Wang X (2004). Alterations in the expression of lipid and mechano-gated two-pore domain potassium channel genes in rat brain following chronic cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* **120**, 205-209.

Literatur

158. Yakovlev AG, Knoblach SM, Fan L, Fox GB, Goodnight R, & Faden AI (1997). Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J Neurosci* **17**, 7415-7424.
159. Yamakura T & Harris RA (2000). Effects of gaseous anesthetics nitrous oxide and xenon on ligand-gated ion channels. Comparison with isoflurane and ethanol. *Anesthesiology* **93**, 1095-1101.

13 Danksagung

Herrn PD Dr. M. Gruß danke ich für die Überlassung des interessanten und facettenreichen Themas. An der Ausrichtung der Arbeit und der Zusammenstellung der Versuchsgruppen waren auch Prof. Nicholas P. Franks und Prof. Mervyn Maze vom Imperial College in London beteiligt, denen ich für ihre Denkanstöße dankbar bin.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Personen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Besonders meiner Betreuerin im Fachbereich Veterinärmedizin, Frau PD Dr. med. vet. Sabine P. Tacke, verdanke ich viel. Sie hat mich fachlich beraten und darüber hinaus mit ihrem Engagement immer unterstützt.

Zu danken habe ich auch Herrn Prof. Dr. W. Kummer und Frau Prof. Dr. M. Wimmer sowie den Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppen am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität für ihre fachliche Unterstützung in allen Bereichen der Histologie. Mein besonderer Dank gilt Frau Tamara Papadakis und Herrn Martin Bodenbenner für die Einarbeitung in die Schneide- und Färbetechniken. Herrn Becker und seinen Mitarbeitern der Werkstatt im Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität danke ich für den Aufbau des Modells und ihrer Geduld bei allen Änderungswünschen. Der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. C. Werner in der Klinik für Anästhesiologie an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz verdanke ich einen Einblick in die grundlegenden Techniken des Versuchaufbaus. Dem Team von PD Dr. T. Gerriets aus der Neurologie der Justus-Liebig-Universität verdanke ich interessante Einblicke in die MRT-Bildgebung. Den Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität danke ich für ihre Unterstützung bei Fragen zur histologischen Auswertung.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. vet. V. Hach, der mir eine Hospitanz in seiner Tierklinik am Stadtwald neben der Dissertation ermöglicht hat, sowie seinen Mitarbeitern. Meinen Freunden und Bekannten danke ich für ihre Hilfe und ihren Rat. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir nach dem Studium die Arbeit an der Dissertation ermöglicht haben. Sie haben mich während der ganzen Zeit unermüdlich unterstützt.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

A handwritten signature in blue ink, reading "S. Galow". The signature is written in a cursive style with a large, looped initial 'S'.

Sonja Galow

Kardhoff Klinik
ref. Brain, stroke
08.07.08
T1: Jan 1900
M 5.0 kg



BRUKER PharmaScan
Date: 2 Jun 2008
Time: 14:01

Kardhoff Klinik
ref. Brain, stroke
08.07.08
T1: Jan 1900
M 5.0 kg



BRUKER PharmaScan
Date: 2 Jun 2008
Time: 14:01

Kardhoff Klinik
ref. Brain, stroke
08.07.08
T1: Jan 1900
M 5.0 kg



BRUKER PharmaScan
Date: 2 Jun 2008
Time: 14:01



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG STAUFENBERGRING 15 D-35396 GIESSEN	ISBN: 978-3-8359-5715-2
Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890 redaktion@doktorverlag.de www.doktorverlag.de	