

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Anästhesiologie
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. Kochs)

**Zerebrale Inflammationsreaktion und neurokognitive Defizite nach inkompletter
Vorderhirnischämie im Rattenmodell**

Wolfgang Waldeyer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. Kochs
2. apl. Prof. Dr. M. Blobner

Die Dissertation wurde am 02.12.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin
am 09.02.2011 angenommen.

Meiner Ehefrau

Gliederung

1.	Einleitung	1
1.1	Zerebrale Ischämie	3
1.2	Pathophysiologie der zerebralen Ischämie	5
1.3	Neuroinflammation.....	10
1.3.1	Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor kappa B (NFκB).....	10
1.3.2	Zytokin Tumornekrosefaktor alpha (TNF-α).....	13
1.3.3	Zyklooxygenase-2 (COX-2).....	16
1.4	Bilaterale Karotisokklusion (BCAO) als zerebrales Ischämiemodell der Ratte.....	18
1.5	Lernen und Gedächtnis	18
1.6	Evaluation neurokognitiver Defizite durch Verhaltenstests im Rattenmodell	23
2.	Material und Methoden	25
2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	25
2.2	Versuchsaufbau	26
2.3	Temporäre bilaterale Karotisokklusion (BCAO)	28
2.3.1	Anästhesie und Monitoring	29
2.3.2	Chirurgische Präparation.....	35
2.3.3	Bilaterale Karotisokklusion mit hämorrhagischer Hypotension	38
2.3.4	Reperfusion und Erholungsphase.....	39
2.3.5	Ausleitung und postoperative Nachbeobachtungsphase	39
2.4	Neurologische Untersuchung	40
2.5	Modifizierter Hole-Board-Test (mHBT).....	47
2.5.1	Testprinzip.....	47
2.5.2	Versuchsarena	48
2.5.3	Doppeltes Hole-Board.....	49
2.6	Histologische Untersuchungen	58
2.6.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)	59
2.6.2	Immunhistochemische Färbungen.....	61
2.7	Statistik	69
3.	Ergebnisse	70
3.1	Physiologische Parameter des operativen Versuchsabschnittes	70
3.2	Neurologische Parameter.....	74
3.3	Parameter des modifizierten Hole-Board-Test	79
3.3.1	Kognitive Parameter.....	79
3.3.2	Verhaltensparameter.....	83
3.4	Hirngewebsuntersuchungen.....	88
3.4.1	H.E.-Färbung	88

3.4.2	Immunhistochemische Färbungen.....	89
4.	Diskussion	92
4.1	Diskussion der Methoden	92
4.1.1	Tiermodell	92
4.1.2	Versuchstierauswahl und Haltung.....	93
4.1.3	Zerebrales Ischämiemodell	94
4.1.4	Narkose und Medikamentenauswahl	95
4.1.5	Diskussion der intraoperativen Messparameter	98
4.1.6	Neurologische Untersuchung	99
4.1.7	Modifizierter Hole-Board-Test.....	101
4.1.8	Hirngewebsuntersuchungen	108
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	110
4.2.1	Physiologische Messparameter	111
4.2.2	Überlebensrate.....	115
4.2.3	Neurologische Funktion	115
4.2.4	Kognitive Leistungsfähigkeit und Verhalten	116
4.2.5	Hirngewebsuntersuchungen	119
4.2.6	Ausblick	123
5.	Zusammenfassung	124
6.	Summary	126
7.	Literaturverzeichnis.....	128
8.	Tabellenverzeichnis.....	142
9.	Abbildungsverzeichnis	143
10.	Danksagung	147
11.	Lebenslauf	148

Abkürzungsverzeichnis

2-VO	Zwei-Gefäß-Okklusionsmodell (engl.: two-vessel occlusion)
16G	16 Gauge (Kanülenaußendurchmesser von 1,6 mm)
18G	18 Gauge (Kanülenaußendurchmesser von 1,2 mm)
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
ATP	Adenosintriphosphat
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionat
AS	Arachidonsäure
Bax	Apoptosefaktor (engl.: bcl-2-associated x protein)
BAFF	B-Zellen aktivierender Faktor (engl.: b-cell activating factor)
Bcl	Apoptosinhibitor (engl.: b-cell-lymphoma)
bds.	beidseits
bFGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl.: basic fibroblast growth factor)
BCAO	beidseitiger Verschluss der Arteria carotis communis (engl.: bilateral cerebral artery occlusion)
bzw.	beziehungsweise
C	Komplementfaktor
Ca ²⁺	Kalzium
CAT	Katalase
CD	Unterscheidungsgruppe, immunphänotypisches Zelloberflächenmerkmal (engl.: cluster of d ifferentiation)
COX	Zyklooxygenase (engl.: cyclooxygenase)
Co.	Compagnie
CRP	Kapsel-reaktives-Protein (engl.: c-reactive protein)
Da	Dalton = Masseinheit (= $1,6601 \times 10^{-27}$ kg)
DD	Todesdomäne (engl. : death domain)
d.h.	das heißt
DHCA	Tief hypothermer Kreislaufstillstand (engl. : deep hypothermic circulatory arrest)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.. desoxyribonucleic acid)
EEG	Elektroenzephalogramm (engl.: electoencephalography)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et	entidal
et al.	„und andere“ (lat.: et alii)
Fa.	Firma
FADD	zytosolisches Protein (engl. : FAS-associated death domain protein)
Fe	Eisen
Fi	eingatmete Gaskonzentration (engl.: fraction of inspired)
G	Gauge (hier: Außendurchmesser einer Kanüle)
g	Gramm
Glu	Glutamat
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GPX	Glutathionperoxidase
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde (engl.: Society for Laboratory Animals Science)
HCO ₃ ⁻	Bicarbonationen
H ₂ O ₂	Wasserstoffdioxid
HBT	Hole-Board-Test

Iap	Apoptoseinhibitor (engl.: inhibitor of apoptosis protein)
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül (engl.: inter-cellular adhesion molecule)
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (engl.: international statistical classification of diseases and related health problems)
IκB	inhibitorische Proteine des zytoplasmatischen spezifischen Transkriptionsfaktors NFκB (engl.: inhibitor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells)
IKK	IκB-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
Inc.	Kapitalgesellschaft (engl.: incorporated)
IP3	Inositoltriphosphat
K	Kalium
KG	Kommanditgesellschaft
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
LPS	Lipopolysaccharide
LTP	Langzeitpotenzierung (engl.: long-term potentiation)
METAB	metabotropher Rezeptor
mg	Milligramm
mHBT	modifizierter Hole-Board-Test
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
Mol	Maßeinheit für die Stoffmenge
mRNA	RNA-Transkript (engl.: messenger-RNA)
ms.	Millisekunden
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NEMO	NFκB-induzierenden Kinase (engl.: IKKγ- NFκB essential modulator)
NeuN	neuronaies Strukturprotein (engl.: neuronal nuclei)
NFκB	spezifischer Transkriptionsfaktor, der als nukleärer Faktor die Expression des κ-Leichtkettengenes in B-Lymphozyten [der Maus] reguliert (engl.: nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells)
NIK	NFκB-induzierenden Kinase
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickoxid
NOO·	Peroxyinitrit
NOS	Stickoxidsynthetase (engl.: nitric oxide synthase)
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ·	Sauerstoffradikal
OH ⁻	Hydroxidjon
·OH	Hydroxylradikal
OT	Objektträger
p	Protein
P	Partialdruck
Pa	arterieller Partialdruck
PAF	Plättchenaktivierender Faktor (engl.: platelet activating factor)
PaCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck

PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	gepuffertes Natriumphosphat (engl.: phosphored buffered sodium)
pH	pH-Wert = negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität (lat. pondus hydrogenii/potentia hydrogenii)
PFA	Paraformaldehyd
R	Rezeptor
rel-B	Kernfaktor des „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells 3 (engl.: reticuloendotheliosis viral oncogene homologe B) = v-rel
RIP	Adaptorprotein (engl.: receptor interacting protein)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
rt-PA	Fibrinolytikum = Alteplase (engl.: recombinant tissue-type plasminogen)
SaO ₂	arterielle Sauerstoffsättigung (engl. arterial oxygen saturation)
sec.	Sekunde
SEM	statistischer Standardfehler (engl.: standard error of the mean)
SOD	Superoxiddismutase
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl.: T-cell-receptor)
TLR	toll-like Rezeptor (engl.: toll-like-rezeptor)
TNF	Tumor Nekrose Faktor (engl.: tumor necrosis factor)
Trp	Apoptosefaktor (engl.: transformation related protein)
TRADD	zytosolisches TNF-Rezeptor assoziiertes Protein/Adaptorprotein (engl.: tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain protein)
u.a.m.	und andere mehr
USA	Vereinigten Staaten von Amerika (engl.: United States of America)
VCAM	intravaskuläres Adhäsionsmolekül (engl.: vascular-cellular adhesion molecule)
v-rel	Kernfaktor des „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells 3 (engl.: reticuloendotheliosis viral oncogene homologe B) = REL-B
XDH	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthinoxidase
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Der Schlaganfall ist eine der häufigsten und einschneidendsten vaskulären Erkrankungen.

Weltweit steht dieses Krankheitsbild an zweiter Stelle der Todesursachen [MURRAY et al. 1997 ^a] und stellt die dritthäufigste Ursache für eine dauerhafte Behinderung und vorzeitige Invalidität in Europa dar [MURRAY et al. 1997 ^b].

Die jährliche Neuerkrankungsrate beträgt in Deutschland nach den Daten des Erlanger Schlaganfallregisters 182 Erkrankungsfälle pro 100 000 Einwohner. Damit erleiden derzeit jedes Jahr etwa 165 000 Menschen einen Schlaganfall und etwa 44 000 werden an seinen Folgen versterben. Somit stellt der Schlaganfall in der Bundesrepublik gegenwärtig bei Männern die siebthäufigste und bei Frauen sogar die vierthäufigste Todesursache [STATISTISCHES BUNDESAMT 2009 ^a] dar. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass Todesursachenstatistiken aufgrund inhaltlicher und administrativer Unterschiede nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden können. Einfluss nehmen hier Trendbrüche (ICD-Revision: 1997/1998), unterschiedliche Arten der Bevölkerungserfassung, unrichtige Diagnosestellung und Grundleidenangabe (monokausal) bei gleichzeitig sinkenden Autopsiequoten. Dies führt zu methodisch bedingten Verzerrungen.

In etwa 85 % der Fälle lässt sich der Schlaganfall direkt auf eine zerebrale Ischämie infolge eines arteriellen Gefäßverschlusses zurückführen. In den übrigen Fällen handelt es sich entweder um die Folgen einer intrazerebralen oder subarachnoidalen Blutung [MUMMENTHALER et al. 1997]. Gegenwärtig leben etwa eine Million Bundesbürger mit den Folgen dieser Erkrankung [WIESNER et al. 1999]. So weisen circa 60 % der Betroffenen ein Jahr nach der Erkrankung Einschränkungen in den Aktivitäten des täglichen Lebens auf [WARD et al. 2005] mit entsprechend weitreichenden sozioökonomischen Folgen. Die direkten Krankheitskosten des Schlaganfalls (ICD-10: I64) betragen 2006 etwa 1735 Millionen Euro [STATISTISCHES BUNDESAMT 2009 ^a].

Der Schlaganfall kommt vornehmlich im höheren Lebensalter vor. So sind Männer bei einem erstmaligen Apoplex im Durchschnitt 70 Jahre, Frauen etwa 75 Jahre alt [KOLOMINSKY-RABAS et al. 2002]. Vor dem Hintergrund steigender Lebenserwartung und demographischer Verschiebung unserer Gesellschaft - so betrug der Anteil der über 65-jährigen in Deutschland im Jahre 2009 etwa 21 % der Gesamtbevölkerung und soll nach demographischer Hochrechnung im Jahre 2035 auf bereits 31 % anwachsen [STATISTISCHES BUNDESAMT 2009 ^b]- muss zukünftig mit einem weiteren Inzidenzanstieg gerechnet werden [BONITA et al. 2004].

Der Schlaganfall, bzw. die aus ihm resultierende zerebrale Ischämie rückt damit unweigerlich in das Zentrum wissenschaftlichen Interesses. Insbesondere durch ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen erhofft man sich die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze. Zurzeit existieren neben der Thrombolyse mittels gewebespezifischen Plasminogenaktivator (systemische und/oder lokale rt-PA Gabe innerhalb eines engen Zeitfensters von drei bis sechs Stunden) als einzig partiell wirksames Therapieverfahren und der Homöostase physiologischer Parameter (O₂-Sättigung, Blutdruck, Blutzuckerspiegel, Temperatur und Flüssigkeitsbilanz) kaum befriedigende Behandlungskonzepte für den akuten Schlaganfall. Dies wiederum unterstreicht die Bedeutung einer effektiven Primär- und Sekundärprävention [STÄHELIN et al. 1994]. Demgegenüber stellt die Infarktentwicklung selbst einen überaus dynamischen Prozess dar, der über Tage zu einer Zunahme der Läsionsgröße führen kann und stets in einer Defektheilung mit variablem neurologischem Defizit mündet. Entzündungsprozesse stellen dabei einen wichtigen Teil der postischämisch ablaufenden, kaskadenartigen Läsionspathogenese dar.

Obwohl die zumeist tierexperimentell gewonnenen Behandlungsansätze und neuroprotektiven Strategien, wie die Gabe von Glutamatantagonisten, Kalziumantagonisten oder Radikalfängern, ebenso wie antiinflammatorisch wirksame Substanzen, im Versuchsstadium vielversprechende Ergebnisse zeigten, konnten diese positiven Effekte jedoch in klinischen Studien am Menschen nicht reproduziert werden.

Diese abweichenden Ergebnisse können zum einen auf das sicherlich unterschiedliche Design tierexperimenteller und klinischer Studien zurückgeführt werden. So werden im Tierversuch die zu untersuchenden neuroprotektiven Substanzen unmittelbar vor oder während der zerebralen Ischämie gegeben und die postischämischen Beobachtungszeiträume eher kurz gewählt. Damit muss letztlich die Frage, ob die untersuchte Substanz den tatsächlichen Schaden wirklich dauerhaft reduziert hat oder nur über den Beobachtungszeitraum hinauszögerte, unbeantwortet bleiben. Zum anderen wurden neuroprotektive Effekte meist auf Basis rein morphologischer Untersuchungen, z.B. einer Infarktgrößenreduktion, beschrieben, ohne wirkliche funktionelle Parameter, wie motorische Einschränkungen oder die Gedächtnisleistung der Tiere zu erfassen.

Damit wird klar, daß experimentelle Modelle entwickelt werden müssen, die bei definierter Schädigung einerseits mit einem Langzeitüberleben der Versuchstiere vereinbar sind, andererseits die postischämischen Veränderungen anhand morphologischer und funktioneller Parameter erfassen können. Diesen Überlegungen Rechnung getragen wurde im Rahmen

einer Expertenkonferenz (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable = STAIR), in der Leitlinien zur präklinischen Testung potentieller neuroprotektiver Substanzen festgelegt wurden [STAIR 1999].

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war an einem Modell der inkompletten temporären Vorderhirnischämie der Ratte (BCAO), die postischämische zerebrale Inflammationsreaktion anhand ausgewählter Entzündungsparameter (NF κ B, TNF- α , COX-2), sowie neurokognitive Funktionseinschränkungen über einen Zeitraum von drei Wochen zu untersuchen.

1.1 Zerebrale Ischämie

Das menschliche Gehirn stellt den kraniorostralen Teil des Zentralnervensystems dar. Man unterscheidet das Endhirn (Telencephalon) mit seinen beiden Hemisphären, das Zwischenhirn (Diencephalon), zu dem der Hypothalamus gehört, das Mittelhirn (Mesencephalon) und das Rautenhirn (Rhombencephalon).

Die akute zerebrale Ischämie, als Unterform des „Schlaganfalls“, ist eine Erkrankung bei der es durch Sistieren der Blut- und Sauerstoffversorgung zu einem Funktionsverlust und schließlich zum Absterben von Hirngewebe kommt. Das Gehirn selbst benötigt mit einem Gewicht von durchschnittlich 1600 g etwa 16 – 17 % des Herzzeitvolumens an Blut (750-1000 ml/min ~ 80-120 ml/100g/min), um seinen im Vergleich mit anderen Organen hohen Energiebedarf zu decken. Hierbei ist es fast ausschließlich auf den oxidativen Abbau von Glukose angewiesen und verbraucht dabei etwa 3,3 ml/100g/min Sauerstoff und 5,3 mg/100g/min Glukose [SIEGENTHALER 2001]. Gerade deshalb führt eine Minderperfusion binnen kürzester Zeit zu reversiblen funktionellen und irreversiblen strukturellen Ausfällen. Die Aufrechterhaltung einer physiologisch konstanten Gehirndurchblutung ist essenziell für den Gesamtorganismus und unterliegt deshalb einer stringenten Autoregulation über muskuläre, neurale und chemische Regelmechanismen. So führt ein Blutdruckanstieg (< 160 mmHg) zu einer reaktiven Konstriktion der Gehirnarteriolen, ein fallender systemischer Blutdruck (< 60 mmHg) zu einer Vasodilatation. Jenseits dieser kritischen Grenzen steigt und fällt die zerebrale Durchblutung linear. Die zweite Form der Autoregulation erfolgt über eine Veränderung der CO₂-Konzentration in Blut (PaCO₂) und der hieraus resultierenden pH-Wert-Veränderung. Eine Hyperkapnie (z.B. im Rahmen einer Hypoventilation) führt zu einer Gefäßerweiterung, eine Hypokapnie verengt die Arteriolen und der zerebrale Blutfluss sinkt ab. Umgekehrt führt eine Erhöhung des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (PaO₂) zu einer

gegenläufigen wenn auch schwächer ausgeprägten Reaktion. Mit steigendem Sauerstoffangebot nimmt die Gehirndurchblutung ab, um bei einer fallenden Sauerstoffkonzentration anzusteigen [SIEGENTHALER 2001].

Diese Regulationsvorgänge schützen das Gehirn, in dem sie unter hypoxischen Bedingungen das Sauerstoffangebot vergrößern und gleichzeitig vermehrt anfallende saure Metabolite abtransportieren. Mit Abfall der Durchblutung auf Werte unter 55 ml/100g/min wird zunächst die zelluläre Proteinsynthese eingestellt, unter 20 ml/100g/min sistiert die spontane elektrische Aktivität des Kortex und exzitatorische Aminosäuren wie Glutamat akkumulieren. Die betroffenen Zellen schwellen an. Unterhalb von 18 ml/100g/min ist die so genannte Infarktschwelle erreicht und die neuronale Funktion erlischt infolge des ATP-Mangels. Sinkt die Durchblutung weiter auf Werte unter 10 ml/100g/min, setzt ein irreversibler Funktionsverlust durch strukturelle Defekte ein. Grundsätzlich lassen sich zwei Ischämieformen unterscheiden. Zum einen die globale, den gesamten Organismus betreffende Ischämie, wie sie z.B. im Rahmen eines Herz-Kreislauf-Stillstandes auftritt, zum anderen die fokale und damit lokal begrenzte Ischämie. Klassisches Beispiel für die fokale Ischämie ist der Schlaganfall. Dabei ist der resultierende Schaden abhängig von der Ischämiedauer [WERNER 1993].

Mit Unterbrechung der Substratzufuhr sind die Sauerstoffvorräte des Kortex binnen 6-8 Sekunden aufgebraucht und erste EEG-Veränderungen treten auf. Nach etwa 10 Sekunden folgt die Bewusstlosigkeit. Binnen weiteren 3-4 Minuten ist sämtliche Glukose abgebaut und das Absterben der Neurone setzt ein, um nach mehr als 9 Minuten im irreversiblen Hirntod zu enden [MUMMENTHALER et al. 1997].

In den ischämischen Arealen selbst sind jedoch sowohl die hämodynamischen und metabolischen Veränderungen als auch die Elektrolytverschiebungen unterschiedlich ausgeprägt. Im Zentrum (Core) des Perfusionsdefizits (< 18 ml/100g/min) setzt innerhalb von Minuten infolge des oben beschriebenen Substratmangels eine dauerhafte Depolarisation der Neurone ein, gefolgt vom irreversiblen Zelluntergang. Dieser unwiderruflich verlorene Kernbereich wird von einer so genannten Penumbra („Schatten“) umgeben. Jener Randbereich besitzt eine noch grenzwertige Durchblutung (> 18 - 40 ml/100g/min) und einen eingeschränkten Energiehaushalt. Dieses noch vitale Gewebe kann jedoch im weiteren Verlauf der Exzitotoxizität, Entzündungsreaktionen oder Apoptose zum Opfer fallen und absterben [SIEGENTHALER 2001].

Therapeutisches Ziel stellt hier die Aufrechterhaltung und wenn möglich Wiederherstellung eines suffizienten zerebralen Blutflusses in den betroffenen Gebieten dar (“Penumbra-Konzept“) um dieses Hirngewebe vor dem Untergang zu bewahren.

1.2 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

Die Schädigungskaskade, die durch den akuten Substratmangel nach einer zerebralen Ischämie in Gang gesetzt wird, stellt ein überaus komplexes Geschehen dar. Grundlegende Mechanismen sind hierbei Energiemangel, Exzitotoxizität, Ödembildung, Entzündungsreaktion und Apoptose, die in mehreren sich zum Teil zeitlich überlappenden Phasen ablaufen.

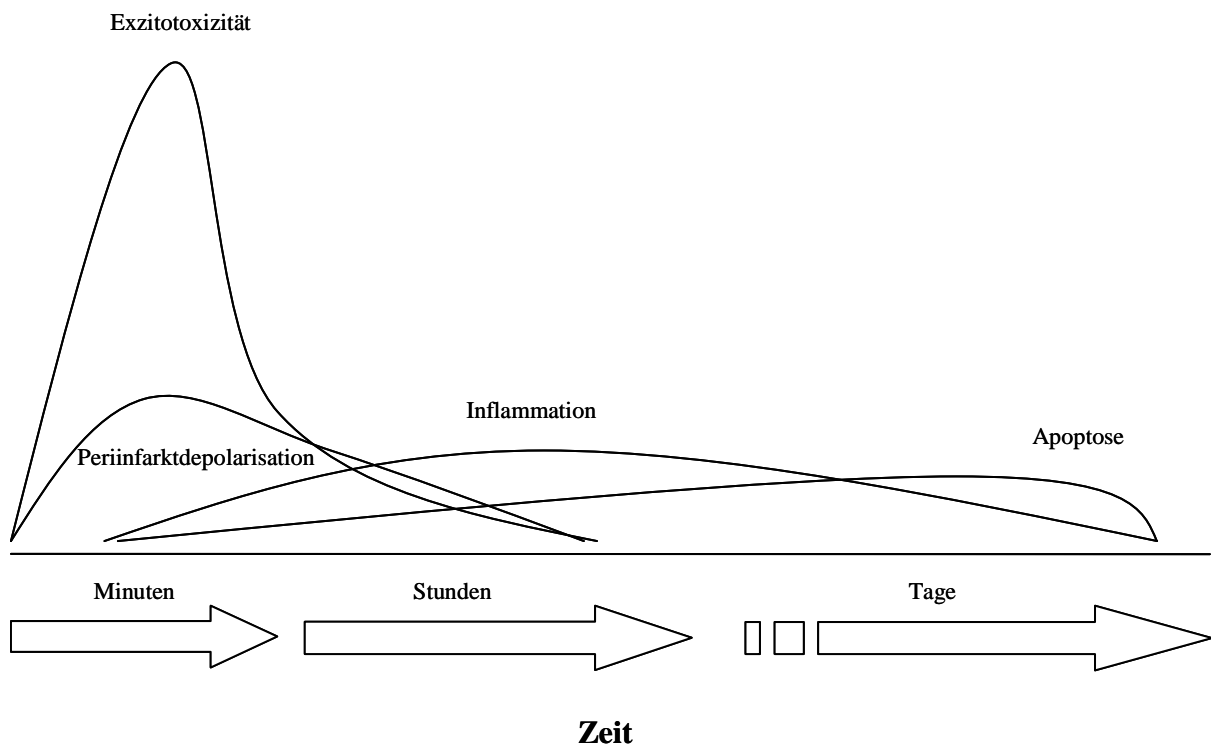


Abbildung 1 Zeitlicher Ablauf der Schädigungskaskade bei zerebraler Ischämie [modifiziert nach DIRNAGEL 1999]

Exzitotoxische Phase/Periinfarktdepolarisation

Sie setzt Minuten nach Beginn der akuten Ischämie ein und kann über Stunden anhalten. Die Beeinträchtigung des zellulären Energiemetabolismus führt durch die zwangsläufige Umstellung des aeroben Glukosemetabolismus auf die anaerobe Glykolyse zu einer

drastischen Abnahme der Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion (2 statt 36 Mol ATP/Mol Glukose), sowie durch die stoffwechselbedingte Akkumulation von Laktat zu einer fortschreitenden Azidose der Zelle. Diese schränkt wiederum zelleigene Reparaturmechanismen (Resynthese von Polysacchariden, Phospholipiden, Proteinen und Nukleinsäuren) ein und begünstigt die Bildung freier Radikale [SIESJÖ et al. 1995].

Durch diesen ATP-Mangelzustand nimmt die Funktion energieabhängiger Ionenpumpen (Na^+ - K^+ -ATPase) ab. Diese werden jedoch benötigt, um das Ruhemembranpotential der Nervenzelle aufrechtzuerhalten bzw. nach erfolgter Depolarisation wieder aufzubauen. Ebenso energieabhängig ist das Ruhemembranpotential der Gliazellen. Dieses unterstützt den Aufnahmemechanismus für exzitatorische Aminosäuren (Glutamat) [SIEGENTHALER 2001].

Versagen nun diese Ionenpumpen, strömen Natrium- und Chloridionen, gefolgt von Wassermolekülen in die Zelle. Das Ruhemembranpotential bricht zusammen und die infolge der glutaminergen Stimulation depolarisierten Neurone können nicht mehr repolarisieren. Im Zuge dieser anoxischen Depolarisation werden somatodendritische und präsynaptische spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle aktiviert, was wiederum zur weiteren Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren in den Extrazellularraum führt und gleichzeitig ihre präsynaptische Wiederaufnahme stört (Periinfarktdepolarisation). Der extrazellulär steigende Glutamat Spiegel aktiviert N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA), α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionat-Rezeptoren (AMPA) und metabotrope (ionenkanalunabhängige) Glutamatrezeptoren. Die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren führt direkt, die der AMPA-Rezeptoren indirekt, zu einem weiteren Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Da bei ATP-Mangelzuständen das Na^+ - Ca^{2+} -Austauschsystem versagt, vermag die Nervenzelle das einströmende Ca^{2+} nicht mehr auszuschleusen. Nun verschärft sich die Situation zusehends. Zum einen bleiben die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle länger offen, zum anderen nimmt die spannungsabhängige Mg^{2+} -Blockade des NMDA-Rezeptors ab.

Die Zellen brauchen nun ihre letzten zytoplasmatischen ATP-Reserven beim Versuch der Ca^{2+} -Ausschleusung auf.

Die Stimulation der metabotropen Glutamatrezeptoren führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C und der Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃). IP₃ bindet an seinen Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum, was wiederum zu einer nachhaltigen Mobilisierung von Ca^{2+} führt. Die intrazellulär erhöhte Ca^{2+} -Konzentration setzt eine ganze Reihe zytoplasmatischer und nukleärer Prozesse in Gang. Insbesondere werden nun Proteasen, Lipasen, Nukleasen, Proteinkinasen und Nitritoxidsynthetasen aktiv, welche die

Struktur- und Funktionsproteine der Zelle zerstören. Parallel hierzu werden unter dem steigenden Kalziumspiegel Zyklooxygenasen und Phospholipase A₂ aktiv, was wiederum zur Bildung freier Radikale führt. Besonders hervorzuheben ist dabei das kalziumabhängige Enzym neuronale Stickoxydsynthetase (NOS), welches Stickoxid (NO) mit Superoxidanionen (O₂⁻) koppelt. Das dabei gebildete Peroxynitrit (NOO⁻) stellt wiederum ein noch reaktiveres Radikal dar. Im Rahmen der fortschreitenden Membrandegeneration, beim Metabolismus des Stickoxid, wie auch beim Abbau der Adenosinphosphate über die Xanthinoxidase und bei der Eisen-katalysierten Haber-Weiss-Reaktion ($\text{Fe}^{3+} + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 / \text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$ (= Fenton-Reaktion)) werden freie Sauerstoffradikale gebildet, die nahezu mit jedem intrazellulären Molekül reagieren können. Insbesondere die innere Mitochondrienmembran wird durch den Überschuss freier Sauerstoffradikale geschädigt. Die Mitochondrien schwellen an und der zelluläre Energiestoffwechsel kommt zum Erliegen. Während dieses Vorgangs wird Cytochrom C - ein wichtiger Apoptoseauslöser - von den untergehenden Mitochondrien in das Zytoplasma freigesetzt [SIEGENTHALER 2001].

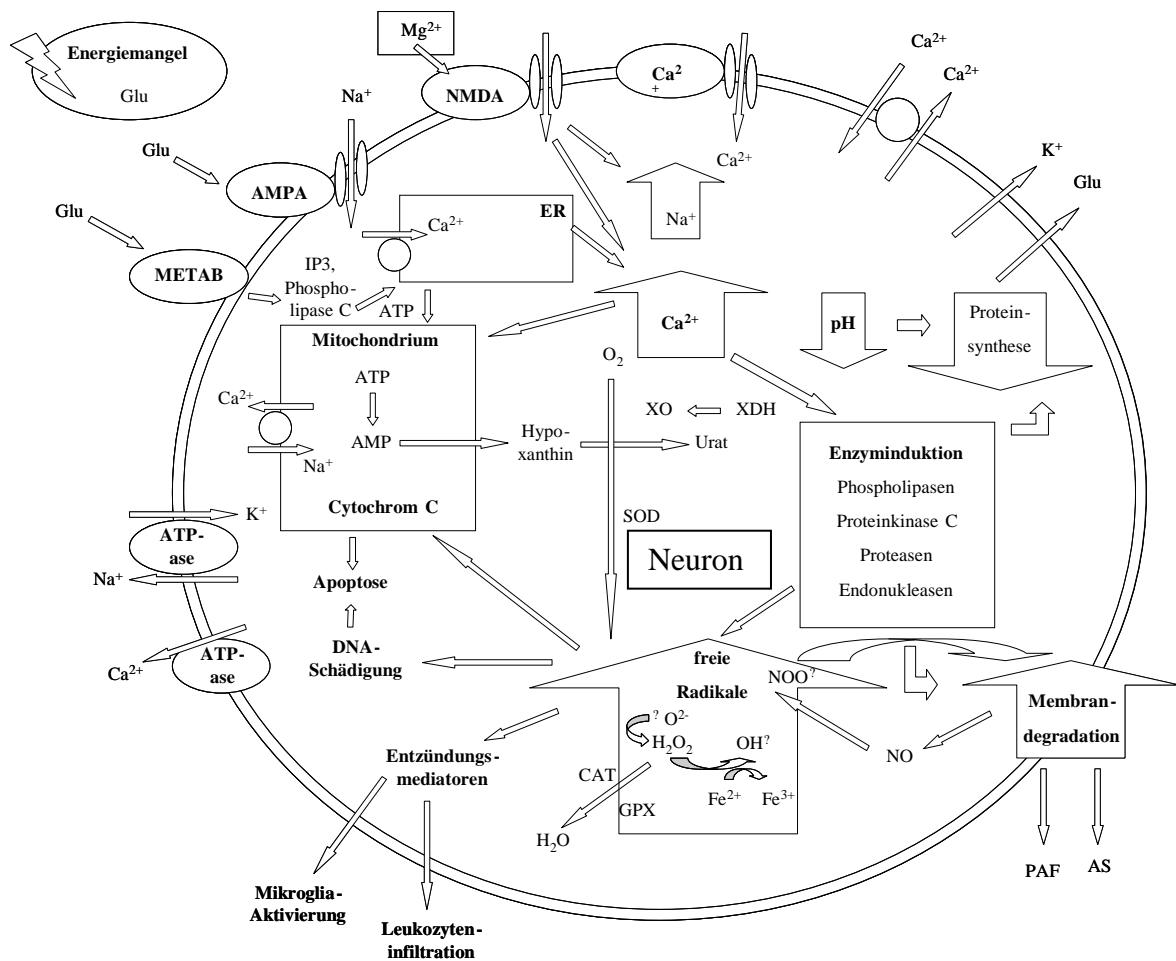


Abbildung 2 Mögliche Mechanismen des Zelltods bei zerebraler Ischämie (modifiziert nach SIEGENTHALER 2001)

Inflammation

Noch bis vor wenigen Jahren galt das zentrale Nervensystem als ein immunprivilegiertes Organ. Zum einen fehlt dem Gehirn ein eigenständiges lymphatisches System, zum anderen wird es durch die Blut-Hirn-Schranke scheinbar effektiv vom peripheren Immunsystem abgeschirmt. Bei Wirbeltieren wird diese besondere Barriere von den Astrozytenfortsätzen, den Endothelzellen der Kapillaren und der Basalmembran gebildet. Diese Endothelzellen schotten das Kapillarlumen gegen das Interstitium des Gehirns ab, da sie praktisch kaum transzelluläre Poren besitzen und untereinander über sogenannte „tight junctions“ verbunden sind. Unterstützt wird diese Barriere in zweiter Reihe durch einen dichten Besatz der Endothelien mit Perizyten und Astrozyten. Heute weiß man, dass trotz dieser Schutzmechanismen auch im Gehirn inflammatorische Prozesse ablaufen können, an denen antigenpräsentierende und antikörperproduzierende Zellen, phagozytoseaktive Zellen, Komplementfaktoren und Zytokine beteiligt sind [ROTHWELL et al. 1993]. Man nimmt an, dass sich eine ischämisch bedingte zerebrale Entzündungsreaktion aus dem Zusammenspiel von direkter Aktivierung der Mikroglia in ihrer Funktion als immunkompetenter Zellverband (mononukleäre Makrophagen) des ZNS, und Mobilisation und Einwanderung peripherer Entzündungszellen in das Gehirn entwickelt [STANIMIROVIC et al. 2000]. Die aktivierte Mikroglia setzt in einem ersten Schritt unter dem Einfluss der Hypoxie eine Kaskade proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren (z.B. NF κ B) und Zytokine (z.B. TNF- α , IL-1 β) frei, die wiederum die Expression von interzellulären Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1, E-Selectin) auf der endothelialen Zelloberfläche (=„Blut-Hirn-Schranke“) induzieren. Diese Adhäsionsmoleküle interagieren nun mit den korrespondierenden Rezeptoren neutrophiler Leukozyten, die sich an das Endothel heften, die Gefäßwand durchwandern und in das Hirnparenchym eindringen können. In einem zweiten Schritt transformiert die aktivierte Mikroglia zu intrinsischen Gehirnmakrophagen, die im weiteren Verlauf dazu in der Lage sind abgestorbene Zellen zu phagozytieren. Damit spielen die aktivierten Mikrogliazellen eine paradoxe Rolle in der zerebralen Ischämie. Einerseits unterhalten sie durch gezielte Mediatorfreisetzung die neuroinflammatorischen Abläufe und setzen zytotoxische Substanzen wie Sauerstoffradikale, Proteasen und Glutamat frei [KATO et al. 1999] was zum Untergang weiterer Neuronen führen kann. Auf der anderen Seite sezernieren sie neurotrophe Substanzen (z.B. IL-6, Plasminogen, bFGF) und ermöglichen durch Phagozytose der Zelltrümmer erst eine „Wundheilung“ [TOKU et al. 1998].

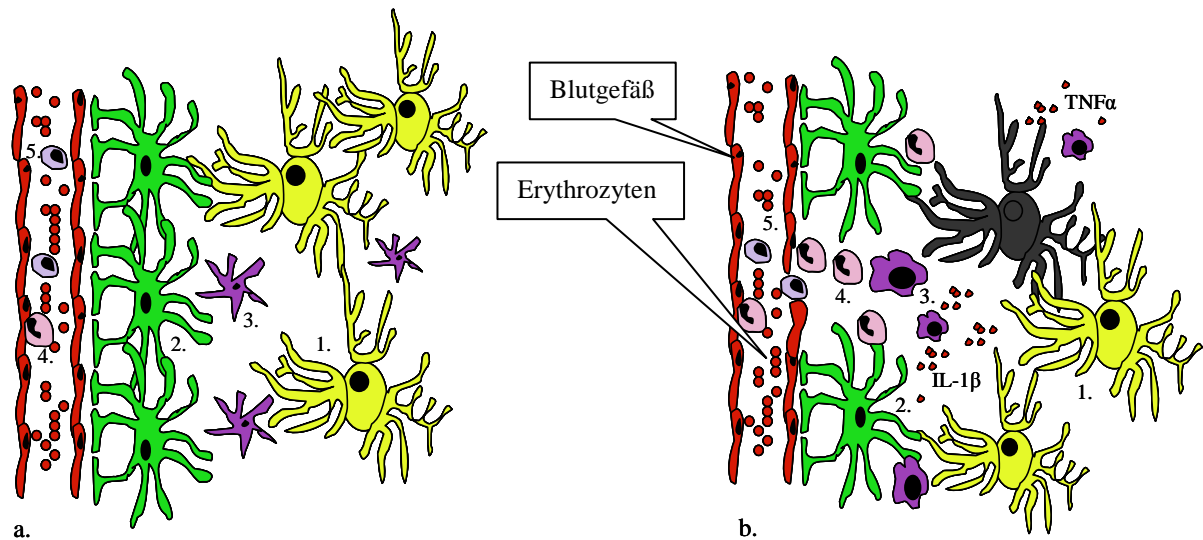


Abbildung 3 Mikroglium im gesunden Gehirn (a) und nach ischämischen Schaden (b)
1. Neuron (gelb = vital / schwarz = tot) 2. Astrozyt 3. Mikroglia 4. Monozyt
5. Lymphozyt

Kaskadenartig werden nun weitere Entzündungsmediatoren wie Phospholipide, Zytokine (z.B. TNF- α) und Interleukine (z.B. IL-1 β) freigesetzt [SIEGENTHALER 2001]. Diese wiederum induzieren eine Aktivierung von Thrombozyten und Neutrophilen, führen zu lokalen Veränderungen von zerebralem Blutfluss und Rheologie und erhöhen die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke [STANIMIROVIC et al. 2000].

Apoptose

Tage bis Wochen nach der Ischämie kommt es zum sogenannten programmierten Zelltod (Apoptose). Dieser unterscheidet sich rein morphologisch von einer akuten Nekrose. Im Gegensatz zu einer nekrotischen Zelle zeigen apoptotische Zellen eine Chromatinverdichtung an der Kernmembran, Zellschrumpfung unter Organellenerhalt, die Formierung von sogenannten „apoptotic bodies“ – bestehend aus membranständigen Zytoplasma- und Kernfragmenten und einer Absonderung aus dem umgebenden Zellverband. Nekrotische Zellen hingegen zeichnen sich, bedingt durch die Dilatation von Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums, durch Anschwellen aus. Dies führt letztendlich zur Zellruptur [KERR et al. 1972]. Ob eine bestimmte Nervenzelle im Rahmen einer akuten ischämischen Schädigung unmittelbar abstirbt (Nekrose), apoptotisch wird oder überlebt, hängt wiederum von verschiedenen Faktoren ab. Zu diesen zählt in erster Linie das Ausmaß der Ischämie. Ist die Perfusion nachhaltig eingeschränkt (< 18 ml/100g/min), stellt die Nekrose den dominierenden Mechanismus des Zelltods dar. Deshalb spielt sie sich überwiegend im Infarktzentrum („Core“) ab. Über der Infarktschwelle von 18 ml/100g/min gehen die Neurone in der Regel durch

Apoptose zugrunde. Diese apoptotischen Prozesse spielen sich überwiegend innerhalb der näheren Infarktumgebung („Penumbra“) und zeitlich verzögert ab. Mittlerweile sind eine ganze Reihe pro- und antiapoptotischer Gene bekannt, die den programmierten Zelltod regulieren. Eine Schlüsselrolle innerhalb dieser komplexen Abläufe kommt den Caspasen (Cysteinproteasen) zu, welche zunächst als inaktive Enzymvorstufen vorliegen. Im Zuge der ischämisch bedingten mitochondrialen Dysfunktion erfolgt die Freisetzung des Cytochrom C, das zu einer Caspasen-Aktivierung (Caspase-3) führt. Aktivierte Caspasen wiederum sind in der Lage, zahlreiche Proteine zu spalten. Ihre Zielstrukturen bilden DNA-Reparaturenzyme und zytoskelettale Strukturproteine der Zelle [SIEGENTHALER 2001]. Die Zelle büßt nun schrittweise ihre strukturelle Integrität ein, beginnt sich aus dem Zellverband abzulösen um schließlich phagozytiert zu werden.

1.3 Neuroinflammation

Neuroinflammation beschreibt die Gesamtheit entzündlicher Prozesse innerhalb des zentralen Nervensystems, die infolge neuronaler Schädigungen auftreten und zur Aktivierung der intrinsischen Immunabwehr des Gehirns führen. Sie dient der Schadensbegrenzung, indem sie die Folgen des zugrunde liegenden pathologischen Stimulus (z.B. Hypoxie) einzudämmen hilft und geschädigte Zellen beseitigt. Funktionelle Träger dieser Entzündungsreaktion sind hierbei die Mikroglia und Astrozyten. Diese Zelltypen bedienen sich dabei zahlreicher Signalstoffe (Zytokine) um die komplexen Reaktionsabläufe zu koordinieren.

1.3.1 Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor kappa B (NFκB)

Transkriptionsfaktoren stellen wichtige Bindeglieder zwischen extrazellulären Signalen und Veränderungen der Genexpression der betroffenen Zelle dar. Durch die spezifische Bindung eines Transkriptionsfaktors (trans-Element) an eine bestimmte Zielsequenz der DNA (cis-Element) wird eine Art „Kontaktsstelle“ für eine RNA-Polymerase geschaffen, von der aus dann die Transkription des entsprechenden Gens gestartet werden kann. NFκB stellt einen solchen induzierbaren Transkriptionsfaktor dar. Anders als die meisten anderen Transkriptionsfaktoren, die regelhaft in ihrer inaktiven Form im Zellkern an die DNA gebunden vorliegen, findet sich NFκB in seiner inaktiven Zustandsform im Zytoplasma der Zelle. Der

Prototyp dieser induzierbaren Form stellt ein Heterodimer aus zwei Proteinuntereinheiten (p65 und p50) dar. Mittlerweile sind weitere Untereinheiten beschrieben worden (v-rel und p53) die Teil des aktivierten Transkriptionsfaktorkomplexes sein können und dabei höchstwahrscheinlich unterschiedliche Zielgene anzusteuern vermögen [BAEUERLE et al. 1996] [SIEBENLIST et al. 1994]. Zytoplasmatisches NFκB ist an sogenannte inhibitorische Proteine (IκB) gebunden. Diese blockieren so die nukleäre Translokation des Faktors. Reaktiv auf proinflammatorische Stimuli (z.B. IL-1β, TNF-α, LPS, freie Sauerstoffradikale) wird dieser NFκB-IκB-Komplex durch zwei spezifische Kinasen (IKKα/IKKβ) zweifach phosphoryliert und IκB abgespalten. Jetzt gelangt der aktivierte Transkriptionsfaktorkomplex relativ rasch in den Zellkern, von wo aus er seine Zielgene ansteuern kann. Diese werden binnen Minuten transkriptionell aktiviert und weitere proinflammatorische Mediatoren wie etwa COX-2, ICAM-1 und induzierbare NOS werden freigesetzt [PAPARELLA et al. 2001]. Danach wird IκB poly-ubiquitinyliert und zuletzt durch 26S-Proteasomen degradiert [BAEUERLE et al. 1994]. Derzeit geht man davon aus, dass NFκB in die Regulation von mehr als 60 proinflammatorischen Genen eingreift, die unter anderem Zelladhäsion und Differenzierung, Chemotaxis, Redoxmetabolismus, Immunostimulation und Apoptose regulieren [BARNES et al. 1997][TAK et al. 2001].

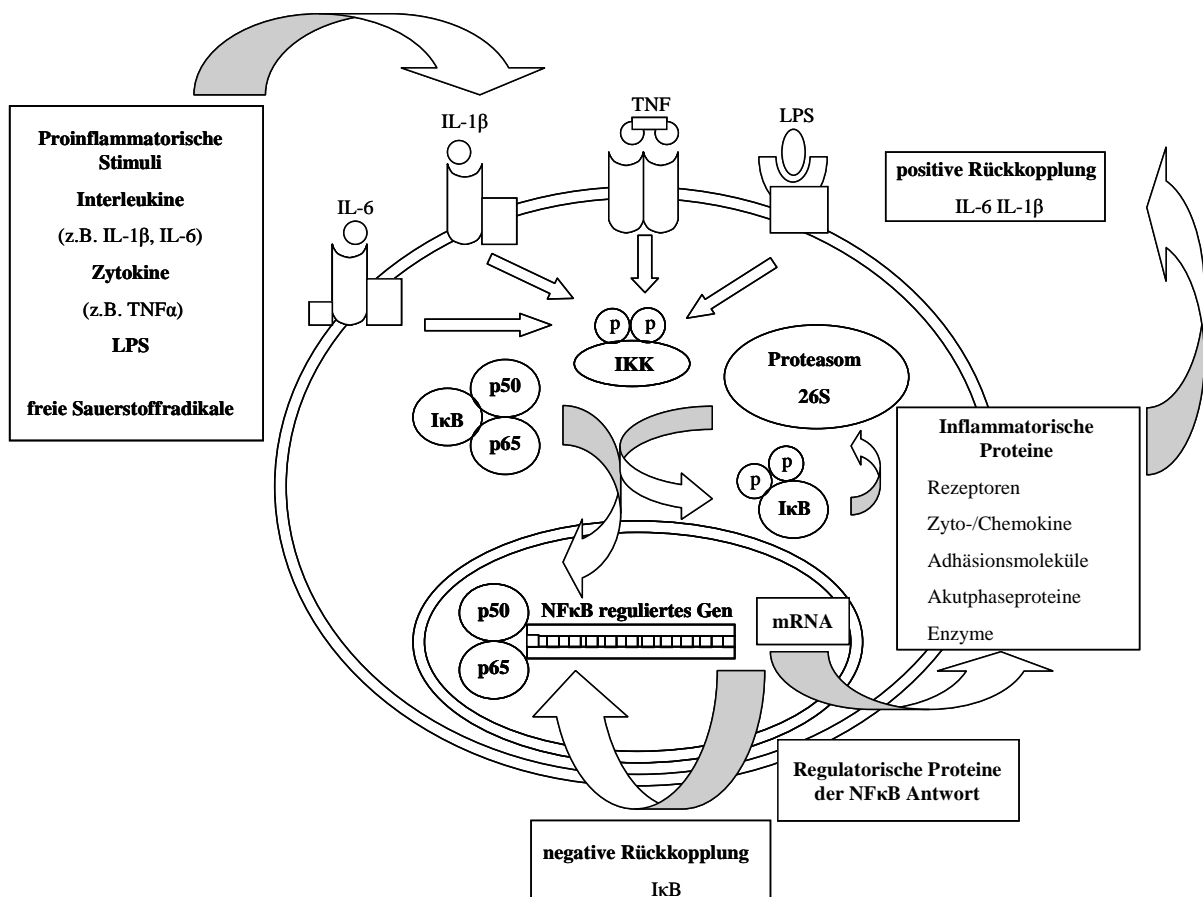


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Aktivierung von NFκB (p50/p65/IκB) als zentrale Schaltstelle der Inflammationsreaktion [modifiziert nach PAPARELLA 2001]

Unter anderem induziert NFκB das IκBα-Gen und hemmt durch einen negativen Feedback-Mechanismus seine eigene Aktivierung [LE BAIL et al. 1993]. Verschiedene Untersuchungen konnten die postischämische Aktivierung von NFκB in Neuronen [SCHNEIDER et al. 1999] [STEPHENSON et al. 2000] und Gliazellen [CARROLL et al. 1998] nachweisen.

Grundsätzlich können unterschiedliche Stimuli und Umgebungsbedingungen einer Zelle zur Aktivierung des NFκB-Signalweges führen. Man unterscheidet hierbei den klassischen (kanonischen) von einem alternativen (nicht-kanonischen) NFκB-Signalweg [HAYDEN et al. 2004]. Ersterer wird z.B. von TNF-α (Rezeptor: TNFR-1/TNFR-2), IL-1 (Rezeptor: TCR/IL-1R) und durch Lipopolysaccharide (LPS) (Rezeptor: TLR) (siehe Abb. 5) genutzt und führt durch die Phosphorylierung von IκB durch den IKKβ zur Freisetzung des aktivierten Transkriptionsfaktorkomplexes (p50/p65). Der alternative Signalweg ist von der NFκB-induzierenden Kinase (NIK), die ihrerseits IKKα zu aktivieren vermag, abhängig. Zielmolekül

des IKK α stellt das p100 dar, das als Heterodimer an Rel-B gebunden ist und seinerseits die inaktive Form des p52 darstellt. Durch seine Phosphorylierung kann das nun aktivierte p52/Rel-B-Heterodimer als Transkriptionsfaktorkomplex in den Zellkern einwandern und die entsprechenden Zielgene ansteuern. Dieser Signalweg wird von Lymphotoxin- β /TNF- β (LT β R), dem B-cell activating factor (BAFFR) und dem CD-40-Ligand/TNF auf B-Lymphozyten (CD40R) genutzt. [HAYDEN et al. 2004].

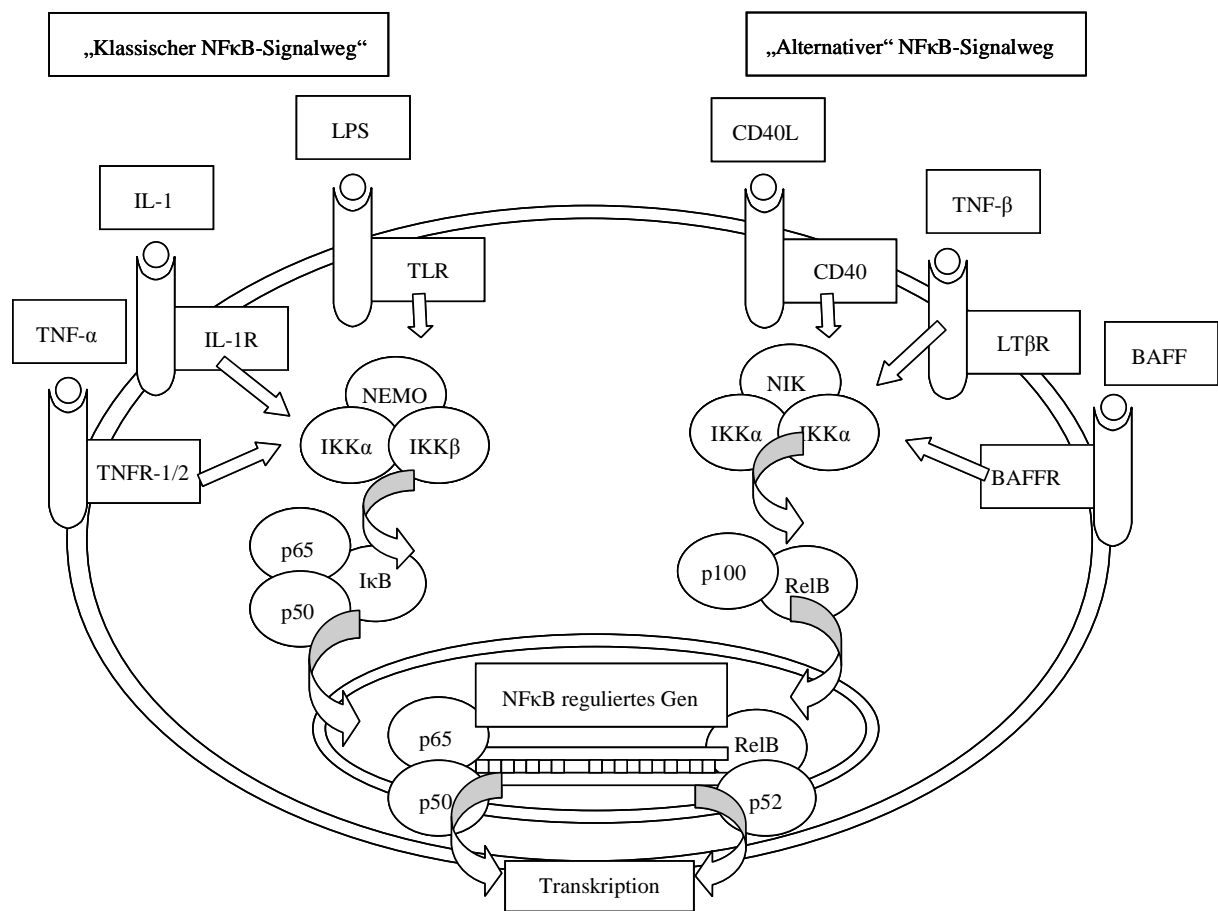


Abbildung 5 Klassischer und alternativer NFκB-Signalweg [modifiziert nach HAYDEN 2004]

1.3.2 Zytokin Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)

Der Tumornekrosefaktor wird der Gruppe der proinflammatorischen Zytokine zugerechnet, der unter anderem auch IL-1 und IL-6 angehören [SIEGENTHALER 2001^b]. Sie nehmen eine zentrale Rolle in der interzellulären Kommunikation im Rahmen der unspezifischen

Entzündungsantwort und der antigenspezifischen Immunantwort ein. Erstmals wurde der TNF 1985 beschrieben und erhielt damals seinen Namen aufgrund seiner zytotoxischen Wirkung auf Tumorzellen [AGGARWAL et al. 1985]. Heute ist das Zytokin unter anderem als Mediator des toxischen Schocksyndroms, z.B. im Rahmen einer gramnegativen Sepsis, bekannt [SIEGENTHALER 2001^b]. TNF- α ist ein 17 kDa-Protein, welches überwiegend von mononukleären Phagozyten (Mikroglia) gebildet wird und neben seiner proinflammatorischen Wirkung auch zahlreiche regulatorische Funktionen ausübt. So wird die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen induziert. Neutrophile Granulozyten werden aktiviert und Monozyten/Makrophagen zur weiteren Zytokinproduktion (IL-1, IL-6, TNF, Chemokine) angeregt. Eine T- und B-Zell-, wie auch Endothelzell-Aktivierung erfolgt. Wird TNF in großer Menge freigesetzt, tritt er in die Blutbahn über und entfaltet nun hormonähnliche systemische Wirkungen. So vermag er über den Hypothalamus endogenes Fieber und bei chronischer Exposition Appetitverlust (Tumorkachexie) zu induzieren. In der Leber stimuliert er, gemeinsam mit IL-1 und IL-6, die Hepatozyten zur gesteigerten Produktion von über 30 Akutphaseproteinen (z.B. Fibrinogen, Alpha-1-Antitrypsin, Kapsel-reaktives-Protein, Serum-Amyloid-A, saures Alpha-1 Glykoprotein, Haptoglobin, Caeruloplasmin, Komplementfaktor 3, Plasminogen, Ferritin u.a.m.). Der TNF hemmt darüber hinaus die Blutgerinnung und die Stammzellenaktivierung im Knochenmark. In extrem hohen Konzentrationen vermag er sogar eine negativ inotrope und peripher vasodilatierende Wirkung zu entfalten. Ebenso kann er eine diffuse intravasale Gerinnung mit Verbrauchskoagulopathie auslösen, sowie massive metabolische Störungen (Hypoglykämie) herbeiführen [SIEGENTHALER 2001^b].

Der Tumornekrosefaktor wirkt über zwei verschiedene Rezeptoren mit unterschiedlicher intrazellulärer Signalgebung: Zum einen dem TNF-Rezeptor-1 (TNFR-1), über den NF κ B-Aktivierung und Apoptose angestoßen werden, zum andern über den TNF-Rezeptor-2 (TNFR-2), der metabolische Veränderung und Zytotoxizität vermittelt [SIEGENTHALER 2001^b]. Die TNF-Rezeptorfamilie („Todesrezeptoren“) besteht aus transmembranösen Rezeptoren, die durch den Besitz einer zytoplasmatischen, sogenannten Todesdomäne (DD) charakterisiert werden. Die Bindung von TNF- α an TNFR-1 bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, die wiederum eine Anlagerung des TNFR-1-assoziierten „death domain“ Protein (TRADD) ermöglicht. Dies bildet nun eine Art Plattform für weitere Mediatorproteine - das „receptor-interacting protein 1“ (RIP1), das „FAS-associated death domain protein“ (FADD) und den „TNF-receptor-associated-factor 2“ (TRAF2). FADD rekrutiert über eine „death-effector domain“ (DED) die Caspase 8 [BARNHART et al. 2005].

Hierauf kommt es durch die autoproteolytische Aktivierung der Caspase 8 über nachgeschaltete Signaltransduktion zur Apoptoseinduktion.

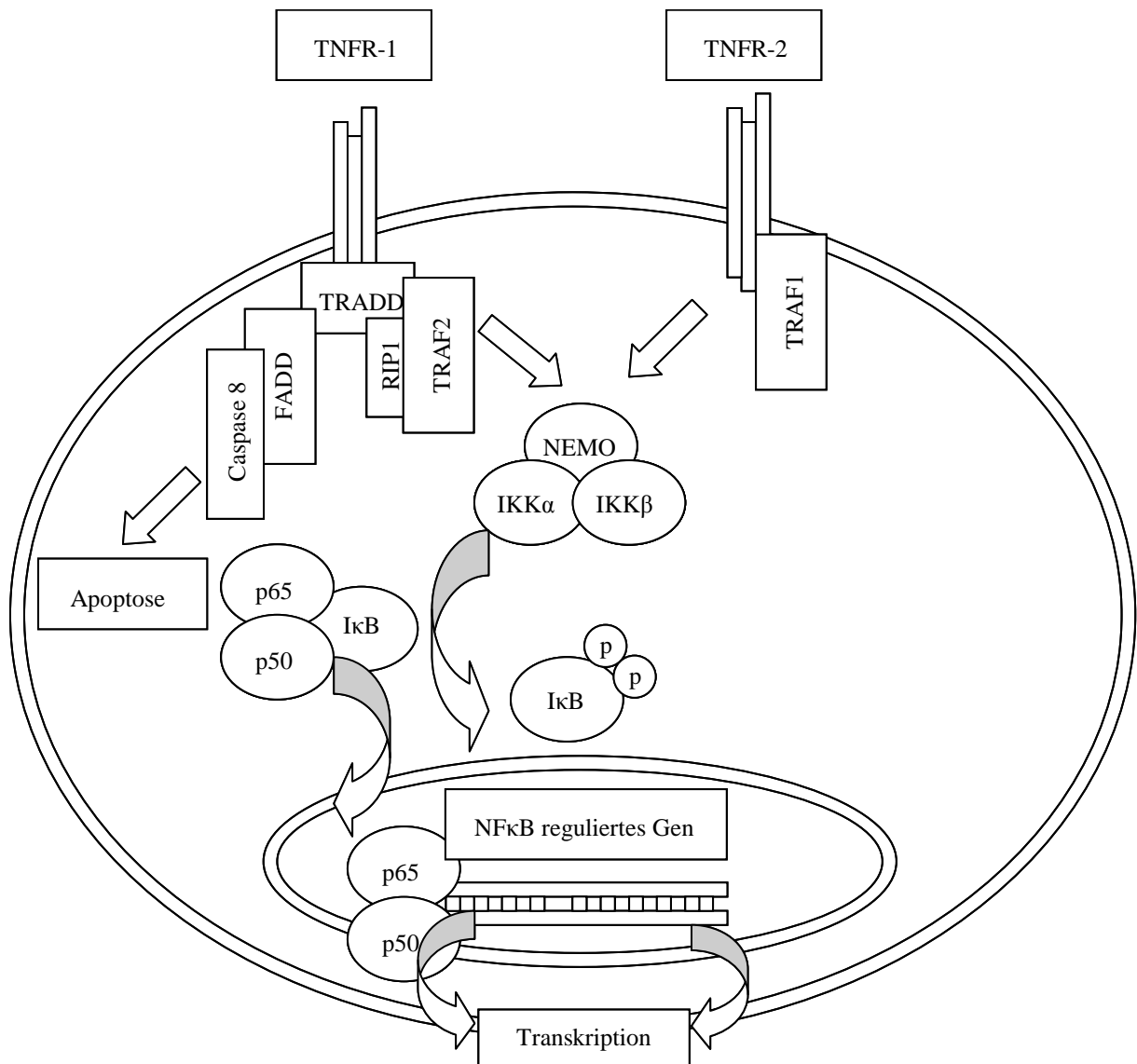


Abbildung 6 TNF- α Signaltransduktionsweg

Die immunkompetenten Zellen des ZNS (Astrozyten, Mikroglia, Neurone) können nach entsprechender Stimulation (Ischämie, Infektion) TNF- α freisetzen. Dies führt innerhalb eines Regelkreises zur Aktivierung der Mikroglia, die ihrerseits weitere proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1, IL-6, TNF- α) freisetzt. Unter physiologischen Bedingungen können jedoch lediglich Neurone geringe Mengen TNF- α synthetisieren [BREDER et al. 1993].

TNF- α übt im Gehirn selbst direkte Effekte auf die zentralnervösen Zellpopulationen (Oligodendrozyten, Astrozyten, Endothelzellen) aus. Er induziert eine Astrozytenproliferation [BENVENISTE 1992]. Infolge einer ischämischen Läsion kann sich so eine sogenannte Astroglieose entwickeln. Darüber hinaus induziert TNF- α in Astrozyten die Freisetzung zahlreicher Kolonie-stimulierende-Faktoren (GM-CSF, G-CSF, M-CSF). Diese Mediatoren wirken ihrerseits auf Leukozyten (Chemotaxis) und fördern die Leukodiapedese von Makrophagen und Granulozyten in den Entzündungsherd [BENVENISTE et al. 1995]. TNF- α führt zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) auf Astrozyten, Mikroglia und zerebralen Endothelzellen [BELLASTAS et al. 1995][OH et al, 1998]. Dies führt direkt zu einer Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke, indem der Eintritt von peripheren Entzündungszellen in das Gehirn erleichtert wird.

1.3.3 Zyklooxygenase-2 (COX-2)

Die membranständige Zyklooxygenase-2 ist das Schlüsselenzym der Prostaglandinsynthese. Das Enzym katalysiert hierbei die Umwandlung mehrfach ungesättigter Arachidonsäure (5, 8, 11, 14-Eicosatetraensäure) in die Prostaglandine mithilfe der Phospholipase A₂. Die Umwandlung der ungesättigten Fettsäuren in Prostaglandine geschieht schrittweise. Die Zyklooxygenase katalysiert zunächst die Synthese des kurzlebigen Prostaglandin G₂ (PGG₂) aus der Arachidonsäure, des wiederum in Prostaglandin H₂ (PGH₂) umgewandelt wird. PGH₂ bildet sowohl das Substrat der Prostaglandinbildung (PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} , PGI₂) durch zellspezifische Isomerasen, als auch der Thromboxanbildung (TXA₂) via spezifischer Synthetasen. Bei den gebildeten funktionellen Prostanoiden (PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} , PGI₂ und TXA₂) handelt es sich wiederum um auto- oder parakrine Lipidmediatoren kurzer Halbwertszeit (Sekunden- bis Minutenbereich), die rezeptorvermittelt in eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Abläufe regulierend eingreifen. Man geht heute davon aus, dass Prostanoiden nicht in Zellen gespeichert werden können, sondern auf einen entsprechenden Stimulus hin durch Aktivierung der Zielzelle jeweils neu synthetisiert werden [FUNK 2001]. Sie bestehen aus einem Zyklopentanring und zwei Seitenketten. Entsprechend ihrer Ringstruktur können die Prostaglandine in verschiedene Typen (A-I) eingeteilt werden. Natürlichem Ursprungs sind jedoch nur die Subtypen D-I (PGD, PGE, PGF, PGG, PGH, PGI). Wiederum anhand der Zahl der Doppelbindungen innerhalb ihrer Seitenketten werden drei Hauptgruppen unterschieden. Prostaglandine der 1. Gruppe werden aus γ -Homolinolensäure, der

2. Gruppe aus Arachidonsäure und die der 3. Gruppe aus Eicosapentaensäure synthetisiert. Die genannten Fettsäuren können mithilfe der Phospholipase A₂ direkt aus der Zellmembran gewonnen werden. Die jedoch mit Abstand häufigste Vorläufer-Fettsäure im menschlichen Körper ist die Arachidonsäure, womit die meisten Prostaglandine folglich der zweiten Gruppe angehören (PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGG₂, PGH₂, PGI₂).

Derzeit kennt man drei Isoformen der Zyklooxygenase: COX-1, COX-2 und COX-3.

Die COX-1 wird praktisch im gesamten Organismus (z.B. Magen, Milz, Niere, Lunge, Gefäßendothel und Thrombozyten) exprimiert und reguliert als so genanntes „house-keeping enzyme“ via Prostanoidsynthese physiologische Adaptionsvorgänge (z.B. Homöostase). So wird PGE₂ zur Aufrechterhaltung einer intakten Magenschleimhaut (Hemmung der Magensäuresekretion) ebenso wie für eine normale Nierenfunktion (Durchblutungssteigerung, Na⁺-Rückresorptionshemmung) benötigt. PGI₂ greift sowohl in das Entzündungsgeschehen (Gefäßpermeabilitätssteigerung, Schmerzverstärkung durch Sensibilisierung nozizeptiver Fasern) als auch in die Thrombozytenfunktion (Thrombozytenaggregationshemmung) ein, ebenso TXA₂ (Thrombozytenaggregation).

Die COX-2 hingegen übt als ein induzierbares Enzym, dessen Transkription überwiegend durch mitogene und inflammatorische Stimuli (z.B. TNF- α , IL-1) [BRUNE et al. 1998] angeregt wird [MORITA 2002], eine komplexere Funktion aus. So spielt es über die von ihm gebildeten Prostanoiden eine wesentliche Rolle in der Unterhaltung von Schmerzen, Fieber und entzündlichen Reaktionen. Unter den physiologischen Bedingungen einer ungestörten Homöostase lässt sich COX-2 in den meisten Körpergeweben praktisch nicht nachweisen. Die Exposition von Fibroblasten, Endothelzellen sowie Monozyten mit bakteriellen Endotoxinen, Zytokinen, Hormonen oder Wachstumsfaktoren (z.B. TNF- α , IL-1) induziert die Expression von COX-2 innerhalb von zwei bis sechs Stunden [SMITH et al 2000].

Bei der COX-3 wiederum handelt es sich um die erst kürzlich in neuronalem Gewebe identifizierte Spleißvariante der COX-1 [CHANDRASEKHARAN et al. 2002]. Über Expression, Funktion und Regulation dieser Isoform liegen erst wenige Erkenntnisse vor. Man geht jedoch davon aus, dass es sich um eine gehirnspezifische Isoform handelt.

Prostaglandine, als Syntheseprodukte der Zyklooxygenasen, wiederum üben vielfältige regulatorische Funktionen im zentralen Nervensystem aus. Sie sind unter anderem beteiligt an der Regulation von Hunger- und Sättigungsgefühl (PGE₂, PGF_{2 α}) [LEVINE et al. 1981], des

Schlaf-Wachrhythmus (PGD₂, PGE₂) [HAYAISHI 1991], der Schmerzwahrnehmung (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}) [HORIGUCHI et al. 1986] und des Fiebers [BLATTEIS 2000]. Eine Beeinflussung der synaptischen Übertragung durch Prostaglandine (PGE₂) konnte zudem im Hippokampus nachgewiesen werden [CHEN et al. 2002]. Diese Erkenntnis führte mitunter zu der Annahme, dass die COX-2 Aktivität im Hippokampus für die Gedächtnisfunktion eine wichtige Rolle spielt [RALL et al. 2003]. Insbesondere PGE₂ scheint eine regulative Rolle im Zusammenhang mit einem neuroinflammatorischen Geschehen zu spielen. So finden sich im Rahmen eines Schlaganfalls in ischämisch infarzierten Hirnarealen regelhaft erhöhte PGE₂-Spiegel [SAIRANEN et al. 1998].

1.4 Bilaterale Karotisokklusion (BCAO) als zerebrales Ischämiemodell der Ratte

In der vorliegenden Studie wurde das sogenannte „2-vessel-occlusion“ Modell (2-VO) mit Hypotension als Modell einer inkompletten temporären globalen Vorderhirnischämie der Ratte verwendet. Dieses Modell wurde 1973 erstmalig von B. Eklöf und B.K. Siesjö vorgestellt [EKLÖF et al. 1973]. Dabei wird ein temporäres, bilaterales Unterbinden der rechten und linken A. carotis communis (BCAO) kombiniert mit einer systemischen Hypotension (Blutentzug) durchgeführt. Letzteres ist entscheidend, da der alleinige Gefäßverschluss keine zerebrale Ischämie herbeizuführen vermag. Ursächlich hierfür ist die Ausbildung einer A. communicans posterior bei der Ratte, über die vorderes und hinteres Stromgebiet verbunden sind. So wird im Falle eines beidseitigen Verschlusses der Hauptschlagadern eine kollaterale Blutversorgung des Gehirns gewährleistet [MURAKAMI et al. 1998].

1.5 Lernen und Gedächtnis

Lern- und Gedächtnisprozesse zählen zu den neurokognitiven Leistungen des Organismus. Lernen kann in diesem Zusammenhang als die grundlegende Fähigkeit zur Aneignung neuer Kenntnisse und Fähigkeiten im Zuge eines stetigen Anpassungsprozesses an sich ändernde Umweltbedingungen verstanden werden. Diese Abläufe münden meist in stabile Verhaltensveränderungen (Fertigkeiten). Grundlage aller Lernprozesse wiederum stellt die Fähigkeit des zentralen Nervensystems zur plastischen Veränderung dar [WOODY 1986].

Neuronale Grundlagen des Lernens

Informationsaufnahme und -speicherung beruhen auf der Erregung von Nervenzellen, die im neuronalen Gesamtverband ein Muster hinterlassen, das als Engramm bezeichnet wird [BLISS et al. 1993]. Morphologisches Korrelat hierfür bildet ein Netzwerk synaptischer Verbindungen, die ihrerseits einen Gedächtnisinhalte repräsentieren. Wiederholte Aktivierungen dieser synaptischen Netzwerke führen zur Neuanlage solcher Verschaltungen auch unter Aufhebung alter, nicht mehr benötigter Verbindungen. Zur Realisierung dieser aktivitätsabhängigen, plastischen Veränderung neuronaler Netzwerke („Lernen“) nutzen die Nervenzellen verschiedene Mechanismen (z.B. Langzeitpotenzierung). Um Informationen langfristig als Gedächtnisengramme abspeichern zu können, müssen Synapsen neu gebildet werden. Grundlage dieser Prozesse stellt die neuronale Proteinbiosynthese dar. Die mehrfache Transmitterausschüttung aktiviert Proteinkinasen, die gemeinsam mit intrazellulären Aktivierungsprozessen zur Transkription bestimmter nukleärer Gensequenzen führt. Die sich anschließende Expression neuer Funktions- und Strukturproteine induziert die Verbindungsbildung [MILNER et al. 1998][KANDEL et al. 1999]. Die mitunter wohl am besten untersuchte Form einer solchen Langzeitpotenzierung (LTP) findet man an den Synapsen der Pyramidenzellen der Cornu ammonis regio superior (CA1-Region) des Hippokampus. Mehrere zusammenlaufende Erregungen führen hier zu einer längeren und stärkeren Depolarisation der Synapse, die wiederum deren Übertragungseigenschaften verändert (LTP). Hierbei spielen Glutamat-sensible NMDA-Rezeptoren eine wichtige Rolle [BLISS et al. 1993]. Zur Ausbildung einer neuen Verknüpfung müssen prä- und postsynaptische Neurone gleichzeitig aktiviert (NMDA-Rezeptor) werden [KANDEL et al. 1992].

Eine zentrale Rolle in Bezug auf Lern- und Gedächtnisprozesse nimmt der Hippokampus ein, der sich durch eine hohe neuronale Plastizität auszeichnet. Er ist Teil des Temporallappens und wird dem limbischen System zugerechnet. Die hippokampale Formation besteht aus Gyrus dentatus, Cornu ammonis (Cornu ammonis regio superior (CA1), Cornu ammonis regio inferior (CA3) und dem Subiculum (Brodmann Area 27). Der Gyrus dentatus ist dreischichtig aufgebaut (Lamina molecularis, Lamina granularis und Lamina plexiformis). Die Lamina granularis besteht aus dicht gepackten glutamatergen Körnerzellen, deren Axone auf das Cornu ammonis (Hippokampus) als sogenannte Moosfasern projizieren. Der Hippokampus selbst lässt sich in fünf Schichten unterteilen: Stratum lacunosum-moleculare (glutaminerge Pyramidenbahnzellen), Stratum radiatum, Stratum pyramidale, Stratum oriens und Alveus

(Axone). Vom entorhinalen Kortex werden die Signale über den Tractus perforans zum Gyrus dentatus übermittelt, wo sie synaptisch auf Dendriten der Körnerzellen umgeschaltet und weiter über spezielle Axone (Moosfasern) zur CA3-Region geleitet werden. Andere, spezialisierte Axone (Schaffner-Kollateralen) verbinden CA1- und CA3-Region. Besonders die Pyramidenbahnzellen der CA1-Region sind über die Schaffner-Kollateralen eng miteinander vernetzt und bilden damit wohl das anatomische Korrelat des deklarativen Gedächtnisses [MILLNER et al. 1998]. Über den Tractus alveans werden wiederum Signale der Neurone der CA1-Region auf Subiculum und Neokortex projiziert. Je nach Stärke und Repetition der Erregung sowie ihrer synaptischen Verschaltung kann eine Information unterschiedlich lange „erinnert“ werden. Nach dieser Modellvorstellung werden kurzfristig gespeicherte Informationen wohl durch kreisende Erregungen aufrechterhalten. Langzeiterinnerungen scheinen hingegen auf tiefgreifenderen Strukturveränderungen (Synapsenmodulation) zu beruhen. Die Gedächtnisengramme basieren demnach auf synaptischen Verbindungen zahlreicher und mitunter verstreut liegender Neuronen. Ein anatomisch greifbarer „Gedächtniskern“ existiert nicht. Neben dem Hippokampus als Teil des limbischen Systems ist der präfrontale Kortex von zentraler Bedeutung für Lern- und Erinnerungsprozesse. In ihm werden Handlungsabläufe und damit letztlich Verhalten strukturiert, Prioritäten gesetzt und räumliche Informationen gespeichert. Die Engrammbildung selbst unterliegt einer limbischen Kontrolle. Hippokampus und Amygdala scheinen hier eine Schlüsselrolle (Informationsbewertung) zu spielen [EICHENBAUM 2000].

Gedächtnis

Der Begriff „Gedächtnis“ umschreibt im Allgemeinen die Fähigkeit des zentralen Nervensystems Informationen aufzunehmen (Enkodierung), abzuspeichern (Transfer), zu modulieren (Konsolidierung) sowie diese im Bedarfsfall als „Erinnerung“ wieder abzurufen (Recall) [STECKLER 1996]. Die so gespeicherten Informationen stellen die Ergebnisse bewusster und unbewusster Lernprozesse dar. Damit bildet das Gedächtnis die kognitive Grundlage des Lernens, basierend auf der Plastizität seiner neuronalen Systeme. Es arbeitet zeitabhängig und lässt sich damit in drei unterschiedliche Speichertypen einteilen. Nur ein Bruchteil der aufgenommenen Informationen wird tatsächlich ausgewertet, gelernt und je nach ihrer Bedeutung, unterschiedlich lang erinnert.

Sensorisches Gedächtnis

Das sensorische Gedächtnis (Ultrakurzzeitgedächtnis/Immediatgedächtnis) zeichnet sich durch eine große Speicherkapazität bei gleichzeitig geringer Speicherdauer (500 -1000 ms) aus. Hier wird Gesehenes (ikonisches Gedächtnis), Gehörtes (echoisches Gedächtnis) und Gefühlt (taktiles Gedächtnis) in eigenen, unabhängigen Speichern hinterlegt.

Arbeitsgedächtnis

Das Arbeitsgedächtnis, auch als der gerade aktivierte Teil des Kurzzeitgedächtnis bekannt, besitzt eine begrenzte Speicherkapazität (7 ± 2 Informationseinheiten) bei gleichzeitig geringer Speicherdauer (Sekunden bis Minuten). Es kann mit dem Bewusstsein gleichgesetzt werden. In ihm erfolgt die bewusste Informationsverarbeitung im Sekundenbereich [MILLER 1956]. In den ersten Modellvorstellungen des Kurzzeitgedächtnisses ging man noch davon aus, dass Selbiges relativ einheitlich aufgebaut ist und stets nur zur Bewältigung einer einzelnen Aufgabe genutzt werden kann. Man erkannte jedoch rasch, dass es durchaus möglich ist, mehrere Informationen unterschiedlichen Typs (z.B. Rechnen und Merken von Wortreihen) gleichzeitig bereitzuhalten und zueinander in Beziehung zu setzen. Aufgaben des gleichen Typs können hingegen nur schlecht parallel bearbeitet werden. Aus diesen Befunden leitet sich das Mehrkomponentenmodell des Arbeitsgedächtnisses ab. So werden einerseits Informationen mithilfe einer phonologischen Schleife aufrechterhalten, andererseits kann dieselbe Information von einer visuell-räumlichen Komponente gespeichert werden. Unabhängig von beiden Speicherkomponenten wird eine zentrale Exekutive beschrieben, die beide kontrolliert [BADDELEY 1998].

Langzeitgedächtnis

Hauptaufgabe des Langzeitgedächtnisses stellt die Informationsspeicherung über einen längeren Zeitraum dar. Um eine Information lebenslang zu speichern, ist jedoch eine Konsolidierung nötig, die Tage bis Monate andauert. Die Speicherkapazität des Langzeitgedächtnisses scheint praktisch unbegrenzt und einmal dort abgelegte Erinnerungen sind überaus resistent gegenüber äußeren Einflüssen. L.R. Squire unterscheidet zwischen deklarativem (explizite, benennbare Fakten oder Ereignisse) und nicht-deklarativem (implizite, nicht benennbare Automatismen/Fähigkeiten) Wissen. Letzteres lässt sich weiter unterteilen in ein Ausführungswissen (prozeduales Gedächtnis), Bahnung (Priming), operante Konditionierung (assoziatives Gedächtnis) Habituation und Sensitivierung (nicht-assoziatives Gedächtnis). Beide Gedächtnisformen arbeiten gleichberechtigt nebeneinander [SQUIRE et al. 1991][GAZZANIGA 1995]. E. Tulving hingegen betrachtet Squires deklaratives und nicht-deklaratives Gedächtnis als zwei Ausdrucksformen des semantischen Gedächtnisses, die sich zum Teil auch überschneiden, und schlägt vor, von diesem ein so genanntes episodisches Gedächtnis (autobiographisches Gedächtnis) zu unterscheiden [TULVING 1995].

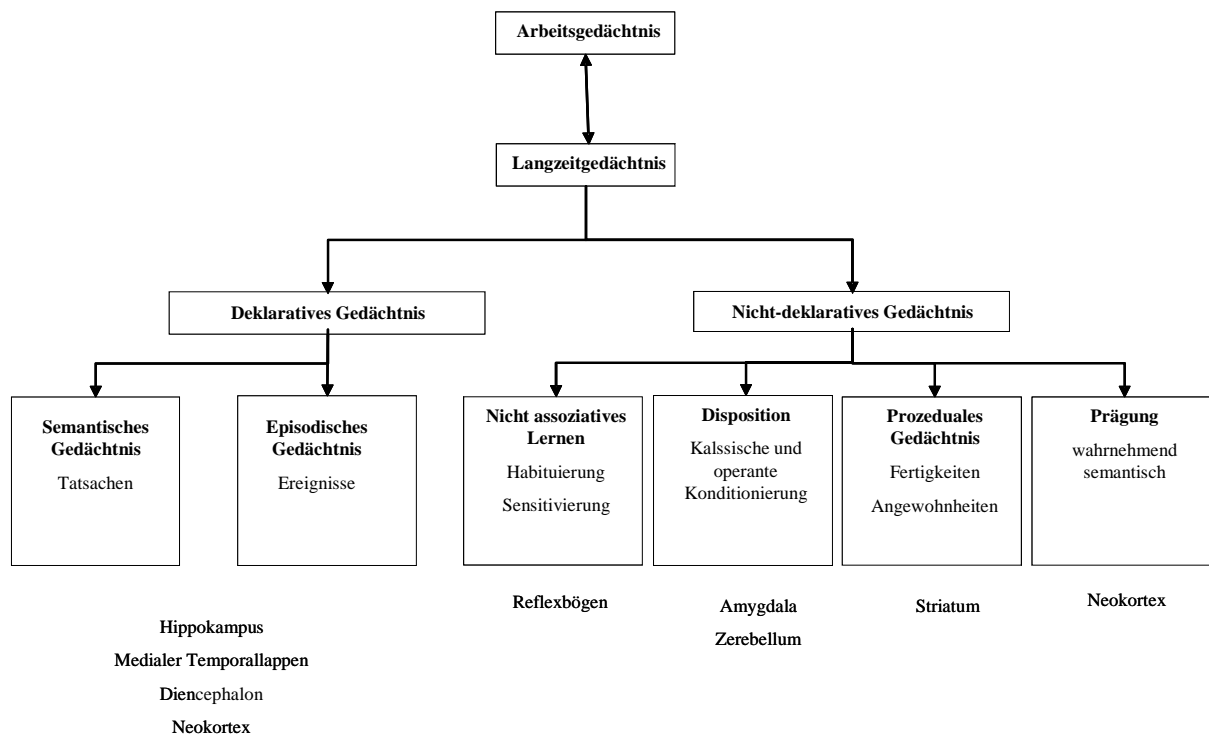


Abbildung 7 Aufbau des Gedächtnisses mit neuronalen Korrelaten (modifiziert nach SQUIRE 1998 und TULVING 1995)

1.6 Evaluation neurokognitiver Defizite durch Verhaltenstests im Rattenmodell

„Verhalten“ ist die durch Gene und Lernen gestaltete Anpassungsleistung eines intakten Organismus an seine Umwelt. Es beruht auf angeborenen Verhaltensweisen („Instinkt“) und erworbenen Erfahrungen. Ein Verhaltenstest ist ein ethologischer Funktionstest, bei dem aus abweichendem Verhalten auf eine neurologische Dysfunktion geschlossen werden kann. Die unterschiedlichen Verhaltensweisen der Säugetiere (Sozial-, Ernährungs-, Sexual-, Komfort-, Explorations-, Flucht- und Ausscheidungsverhalten) stellen durch Anpassung an eine veränderliche Umwelt die Überlebensstrategie des Individuums dar [OHL et al. 2001]. So nehmen alle Säugetiere sensorische Reize auf, verarbeiten diese in Bezug auf vorangegangene Erfahrungen und entwickeln hieraus Lösungsstrategien für komplexe Aufgaben („Lernen durch Erfolg“). Zur Beurteilung des Verhaltens der Versuchstiere muss jedoch eine vergleichbare (Alter, Geschlecht, Gewicht) Kontrollgruppe gebildet werden, die unter denselben Haltungsbedingungen jedoch keinem externen „Reiz“ ausgesetzt wird [ARCHER 1973]. Erst anhand dieser Kontrollgruppe („Nativtiere“) lässt sich von einer beobachteten Verhaltensänderung auf eine kognitive Dysfunktion infolge äußerer Einflüsse (z.B. ischämischer Schaden nach BCAO) schließen und entsprechend bewerten.

Open-Field-Test

Der grundsätzliche Versuchsaufbau besteht aus einer hell erleuchteten, runden Versuchsarena, die mittels Markierungslinien am Boden in ein Zentralfeld und ein Außenfeld unterteilt und von undurchsichtigen Wänden umgeben ist. Die Tiere werden mit einer ihnen unbekanntem Umgebung, dem offenen Feld, konfrontiert und dabei ihr unconditioniertes Verhalten über einen definierten Zeitraum hinweg beobachtet. Dieser Verhaltenstest diente ursprünglich der standardisierten Untersuchung der Lokomotionsaktivität der Versuchstiere [HALL 1934]. Ratten die sich mit einer ihnen unbekanntem Situation konfrontiert sehen, befinden sich im Spannungsfeld zwischen dem Drang ihre Umgebung erkunden zu wollen und dem Bedürfnis, potentielle Gefahren zu vermeiden. Im sogenannten Explorationsverhalten zeigen sie ein breites Spektrum unterschiedlicher Verhaltensmuster (Immobilität, Umherwandern, Aufrichten, Schnüffeln, Urin- und Kotabsatz, Putzaktionen), die entsprechend Rückschlüsse, etwa auf angstassoziiertes Verhalten, zulassen. So gilt das Vermeiden des Zentrums der Versuchsarena als Angstindikator [PRUT et al. 2003].

Hole-Board-Test

Ursprünglich entwickelt wurde dieser Verhaltenstest für Mäuse von J. R. Boissier und P. Simon 1962. Das eigentliche Hole-Board besteht aus einer Box mit mehreren, in deren Boden eingelassenen Löchern, die mit Futterbelohnungen befüllt werden können. Die Tiere werden im Zentrum der Box platziert und ihr Verhalten (z.B. Anzahl aller Lochbesuche, Lochbesuche am selben Loch, Zeit am Loch, Aufrichten, Putzaktionen) beobachtet. 1973 wurde dieses Testverfahren auch für Ratten etabliert und durch verschiedene Varianten (z.B. Anzahl der Löcher, Versuchszeit und Testwiederholungen) weiterentwickelt [FILE et al. 1975^a].

Modifizierter Hole-Board-Test (mHBT) nach Ohl

Dieser Verhaltenstest stellt eine Kombination aus einem Open-Field- und dem klassischen Hole-Board-Test dar. Entwickelt wurde dieses Testverfahren von F. Ohl 1998 ursprünglich zur Beurteilung kognitiver Funktionen von Spitzhörnchen [OHL et al. 1998^a]. Der mHBT besteht aus einem artspezifischen Heimtierkäfig (Homecage) mit integrierter Versuchsarena, die ein offenes Feld repräsentiert. Im Zentrum dieser Versuchsarena wird ein Hole-Board platziert. Dieses Testbrett ist mit mehreren Futtermulden versehen, die durch Deckel abgedeckt und damit nicht direkt eingesehen werden können. Die Tiere werden einzeln in die Versuchsarena gesetzt und sollen lernen markierte Löcher, in denen eine Futterbelohnung liegt, zu finden und zu öffnen. Direkt an den Testbereich angeschlossen und nur durch eine transparente, mit Löchern versehene Trennwand begrenzt, liegt das Tierabteil, in dem sich die Artgenossen des Versuchstieres befinden. Eine freie Kontaktaufnahme ist damit jederzeit möglich. An diesem komplexen Versuchsaufbau lassen sich zahlreiche Verhaltensparameter (z.B. Explorationsverhalten, Angst, Erregung, soziale Affinität) untersuchen [OHL et al. 2001^a]. Der Test ermöglicht damit zugleich Aussagen über kognitive Funktionen (Gedächtnisleistungen, Emotionalität, Motivation) als auch über motorische Leistungsfähigkeiten (Feinmotorik) und Allgemeinbefinden der Tiere [OHL et al. 1998^a].

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen 209.1/211-2531-107/04).

Die Untersuchungen wurden an 70 männlichen Sprague-Dawley Ratten vom Stamm CD[®] IGS (Charles River International Genetic Standard System, Charles River GmbH Deutschland, Niederlassung Sulzfeld) durchgeführt. Gemäß den Richtlinien für Versuchstierhaltung werden die Ratten in einem klimatisierten Tierstall bei einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 ± 15 % unter einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Dabei erstreckt sich die Hellphase von 0:00 bis 12:00 Uhr bei einer Lichtintensität von 60 Lux entsprechend den Richtlinien für albinotische Tiere [GV-SOLAS 2004]. Zur Gewöhnung an menschliche Geräusche werden die Tiere von leiser Hintergrundmusik (Radio) beschallt.

Futter (Altromin-Haltung 1324, Altromin GmbH, Lage) und Wasser (Trinkwasser bei täglichem Wechsel der Trinkflaschen) erhalten die Tiere ad libitum. Als Einstreu dient entstaubtes, entkeimtes Weichholzgranulat (AltrominFaser, Altromin GmbH, Lage). Daneben stehen den Tieren Zellstoff als Nestbaumaterial und sterilisiertes Heu zur Beschäftigung zur Verfügung.

Zur Adaption an ihre neue Umgebung werden die Ratten drei Wochen vor dem eigentlichen Versuchsbeginn in Gruppen zu maximal 4 Tieren in Standardkäfigen (Makrolon Typ IV) gehalten. Entsprechend der Randomisierung werden die Tiere, die für die Untersuchung im modifizierten Hole-Board-Test vorgesehen waren 11 Tage vor dem eigentlichen Versuchsbeginn gewichtsabhängig in Gruppen zu 6 – 8 Tieren in den hierfür entworfenen Versuchskäfig (80 × 60 × 50 cm, eigene Herstellung) umgesetzt.

Am Operationstag waren die Tiere 12 Wochen alt mit einem Ausgangsgewicht von 385 ± 35 g.

2.2 Versuchsaufbau

Der Versuch besteht aus einer operativen Phase, in der die Tiere einer zehnmütigen zerebralen Ischämie mit Reperfusion unterzogen werden und einer sich anschließenden neurokognitiven Testperiode (neurologischer Untersuchung und Verhaltenstestung). Die Studie endet mit der Euthanasie der Tiere und anschließender immunhistochemischer Bestimmung ausgewählter zerebraler Inflammationsparameter (NF κ B, TNF- α und COX-2).

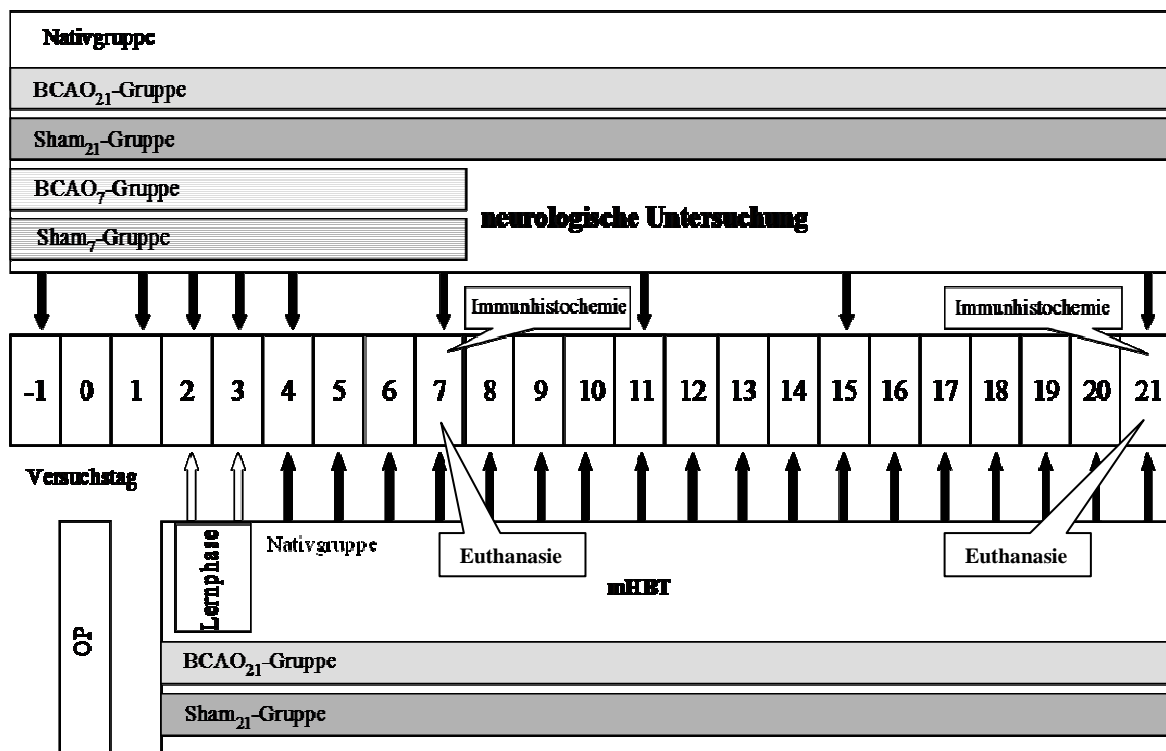


Abbildung 8 Zeitlicher Versuchsablauf: Operation, neurologische Untersuchung und mHBT in Abhängigkeit der gruppenspezifischen postoperativen Überlebenszeiten

Gruppeneinteilung

Die Versuchstiere werden randomisiert einer der unten aufgeführten Gruppen zugeteilt.

Tiere der Nativgruppe (n=17)

Diese Tiere durchlaufen keinen Versuch und dienen als unbehandeltes Kontrollkollektiv.

Die Ergebnisse ihrer neurokognitiven Testung sowie der immunhistochemischen Untersuchung ihres neuronalen Gewebes liefern die physiologischen Vergleichswerte zu den Tieren der BCAO- und Sham-Gruppe.

Um die Versuchstierzahl möglichst gering zu halten wurde hier zum Teil auf bereits bestehende Datensätze (10 Tiere) einer vergleichbaren Nativtiergruppe einer Vorläuferstudie der Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar, zur Evaluierung des modifizierten Hole-Board-Testes zurückgegriffen.

Tiere der BCAO-Gruppe (n=20)

Diese Tiere werden anästhesiert, chirurgisch präpariert und einer 10-minütigen bilateralen Karotisokklusion (BCAO) unter Hypotension (arterieller Druck = 30 ± 2 mmHg) mit anschließender Reperfusion unterzogen. Diese Gruppe dient dazu, die Auswirkungen einer inkompletten, temporären, globalen Vorderhirnischämie auf die neurokognitive Leistungsfähigkeit (neurologische Untersuchung, mHBT) der Tiere und auf ausgewählte zerebrale Entzündungsparameter (NFκB, TNF-α und COX-2) im Vergleich zur Sham- und Nativtiergruppe zu beurteilen.

Tiere der Sham-Gruppe (n=20)

Diese Tiere werden entsprechend anästhesiert und chirurgisch präpariert, jedoch keiner BCAO oder systemischen Hypotension ausgesetzt. Mit Hilfe dieser Gruppe sollen die Auswirkungen der rein operativen Maßnahmen und der Narkose („Operationseffekte“) sowohl auf die neurokognitive Leistungsfähigkeit, als auch auf die gewählten zerebralen Entzündungsparameter im Vergleich mit der BCAO- und Nativtiergruppe untersucht werden.

postoperative Überlebenszeit	Tiere der Nativgruppe	Tiere der BCAO-Gruppe	Tiere der Sham-Gruppe
7 Tage	7	10	10
21 Tage	17	10	10

Tabelle 1 Gruppeneinteilung und Versuchstieranzahl

2.3 Temporäre bilaterale Karotisokklusion (BCAO)

Der operative Teil des Versuches lässt sich in mehrere Schritte unterteilen. Nach Einleitung der Narkose, Intubation und kontrollierter Beatmung erfolgt die Präparation der Gefäße (A. sacralis mediana, V. jugularis externa dextra, Aa. carotis dextra et sinistra) und Platzierung der erforderlichen Katheter (arterieller Katheter in der A. sacralis mediana, venöser Drainagekatheter in der V. jugularis externa dextra). Der gesamte Anästhesieverlauf wird dabei engmaschig überwacht (Elektrokardiogramm (EKG), Elektroenzephalogramm (EEG), rektale und perikranielle Temperatur, mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), endtidaler Kohlendioxidpartialdruck ($P_{et}CO_2$), inspiratorische Sauerstoffkonzentration (F_1O_2)). Blutgasanalysen werden an drei festgelegten Zeitpunkten durchgeführt (Baseline nach Abschluss der Präparation, 10 und 60 Minuten nach Ischämie).

Bei allen Tieren der BCAO-Gruppe erfolgt nach Induktion einer Hypotension (arterieller Druck = 30 ± 2 mmHg) durch Blutentzug über den venösen Drainagekatheter ein temporärer (10 Minuten) beidseitiger Verschluss der Aa. carotis dextra et sinistra mittels eines Gefäßclips. Nach Abschluss der Ischämiephase durch entfernen der Gefäßclips und Retransfusion des entnommenen Blutes schließt sich eine einstündige Erholungsphase bei fortgesetzter Narkose an, in der die zuvor gelegten Katheter entfernt und die Wunden verschlossen werden. Durch Beendigung der Narkosegaszufuhr erwachen die Versuchstiere binnen weniger Minuten. Nach Wiedererlangung einer suffizienten Spontanatmung folgt die Extubation und die Tiere werden zur weiteren postoperativen Überwachung in eine mit Sauerstoff angereicherte Umgebung gebracht, um am folgenden Tag in ihre Käfige zurückzukehren. Die Tiere der Sham-Gruppe werden analog behandelt, jedoch weder einer BCAO noch einer Hypotension unterzogen.

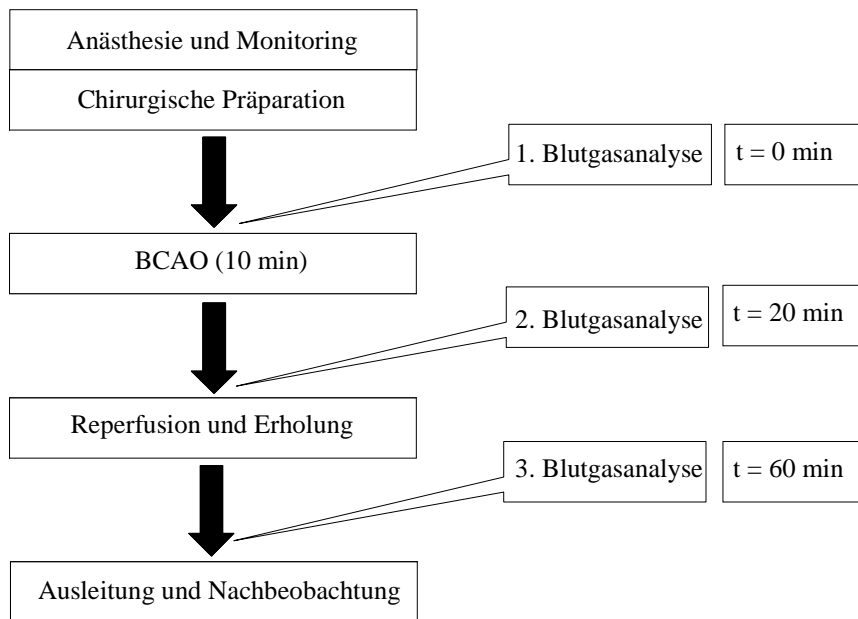


Abbildung 9 Schematische Übersicht der operativen Versuchsphase

2.3.1 Anästhesie und Monitoring

Einleitung

Zur Narkoseeinleitung am Operationstag werden die nicht nüchternen Versuchstiere in einer Ganzkörperkammer (Narkosebox aus Plexiglas[®]) mit 5 Vol% Isofluran (Forene[®], Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) und reinem Sauerstoff (100 Vol%) in Narkose gelegt.



Abbildung 10 Narkoseeinleitung am Operationstag in einer Ganzkörperkammer (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

Intubation

Nach Eintritt der Bewusstlosigkeit erfolgt die endotracheale Intubation unter Sicht mithilfe der direkten Laryngoskopie mittels eines modifizierten Kinderlaryngoskops. Als Tubus dient dabei eine Venenverweilkanüle (16-18 G, Fa. B. Braun AG, Melsungen).



Abbildung 11 Intubationshilfe aus Plexiglas („schiefe Ebene“) mit bereitliegendem modifiziertem Kinderlaryngoskop (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

Beatmung

Anschließend wird das Tier an ein Kleintierbeatmungsgerät (Modell A 1000, Aspect Medical Systems Inc., Natick, Massachusetts, USA) entsprechend einem Überschuss-System ohne Rückatmung mit konstanter Frischgaszufuhr von 2 l/min, Gasabsaugung und vorgeschaltetem Präzisionsverdampfer (Vapor 19.3 für Isofluran, Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck), angeschlossen und während der sich anschließenden chirurgischen Präparationsschritte mit 2 Vol% Isofluran in ca. 45 % Sauerstoff und 55 % Druckluft mit einer Frequenz von 50-60 /min druckkontrolliert beatmet.

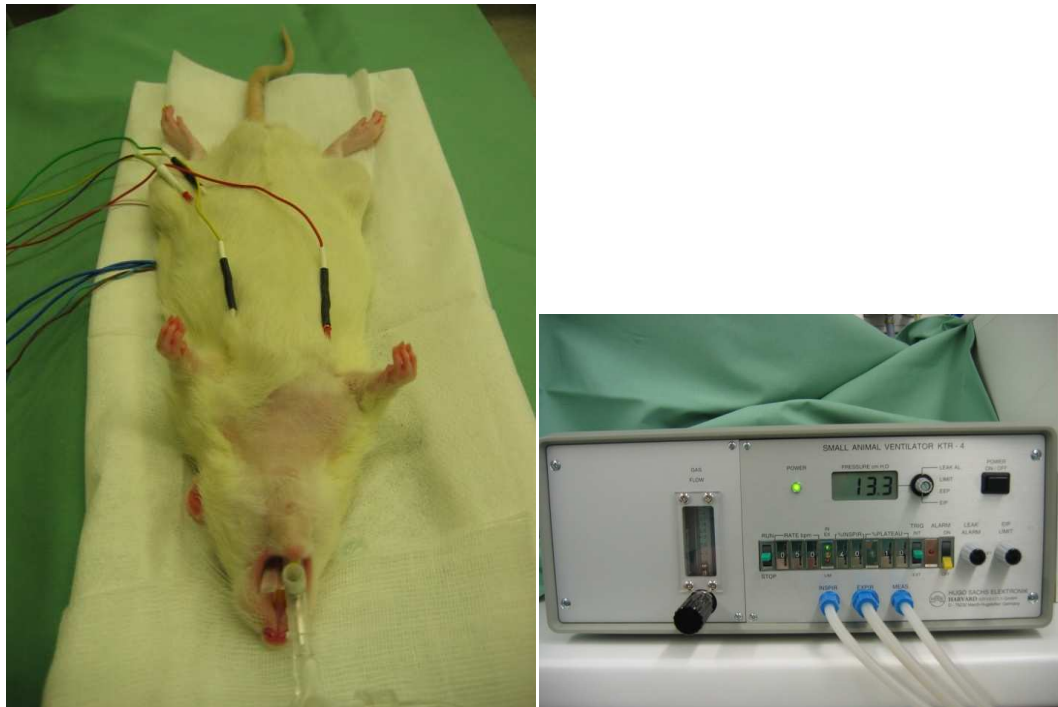


Abbildung 12 Bild links: Anästhesierte, endotracheal intubierte Ratte – Bild rechts: Kleintierbeatmungsgerät (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

Analgesie

Zur intraoperativen Analgesie erhält das Tier einen einmaligen Fentanylbolus ($0,05 \mu\text{g} = 0,14 \mu\text{g}/\text{kg}$) (Fentanyl, Janssen-Cilag GmbH, Neuss).

Monitoring

Vor Beginn des operativen Versuchsabschnittes wird zur Überwachung von Narkoseführung und Aufrechterhaltung konstanter Versuchsbedingungen ein einfaches Monitoring (EKG, EEG, Temperatur, Atmung) etabliert, welches im Zuge der chirurgischen Präparationsmaßnahmen erweitert wird (arterieller Blutdruck, BGA).



Abbildung 13 Bild links: Monitoraufnahme eines intraoperativ komplett überwachten Versuchstieres – Bild rechts: EEG-Monitoring mit „burst-suppression“-Muster im unteren Bildbereich (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

Elektrokardiographie (EKG)

Zur Bestimmung der Herzfrequenz und Rhythmuskontrolle während der Kanülierung der V. jugularis externa dextra und Blutentzug wird ein Elektrokardiogramm (EKG, Cardiocap II, Datex, Helsinki, Finnland) abgeleitet. Hierzu werden drei Nadelelektroden (hintere Axillarlinie bds. und inguinal linksseitig) subkutan platziert.

Elektroenzephalographie (EEG)

Um die Hirnaktivität des Versuchstieres während der nun folgenden Versuchsabschnitte zu überwachen wird kontinuierlich ein Elektroenzephalogramm (EEG, Oscilloscope, Hameg 20 Mhz, HM 205-3, Frankfurt) geschrieben und die Narkosetiefe über das Vorhandensein eines „burst-suppression“-Musters gesteuert. Hierzu werden je zwei Elektroden über der parietalen und frontalen Hirnregion jeder Schädelseite (bds. kaudal des lateralen Augenwinkels und über dem Ohransatzes der Tiere), sowie eine Erdungselektrode inguinal rechtsseitig subkutan eingestochen. Das hierbei gemessene EEG wird auf einen Monitor übertragen und kontinuierlich vom Untersucher visuell ausgewertet. Darüber hinaus kann die zerebrale Ischämiephase (BCAO) der Tiere durch ein in dieser Phase auftretendes isoelektrisches EEG („Nulllinie“) verifiziert werden.

Temperatur

Entscheidend über den gesamten Versuchsablauf ist zudem die Kontrolle und Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur. Diese wird über eine kontinuierliche perikranielle sowie rektale Temperaturmessung überwacht. Hierfür wird eine

Temperatursonde (Hypodermic needle probe, Omega Technologies Co., Stamford CT, USA) in den M. temporalis knochenah eingestochen. Eine zweite Messsonde zur Bestimmung der peripheren Körpertemperatur wird zusätzlich rektal platziert.

Reguliert wird die Körpertemperatur der Versuchstiere während der gesamten Narkosezeit über ein wärmbares Wasserbett (Eigenkonstruktion) sowie mittels Wärmegebläse (WarmTouch® 5200, Nellcor, USA).

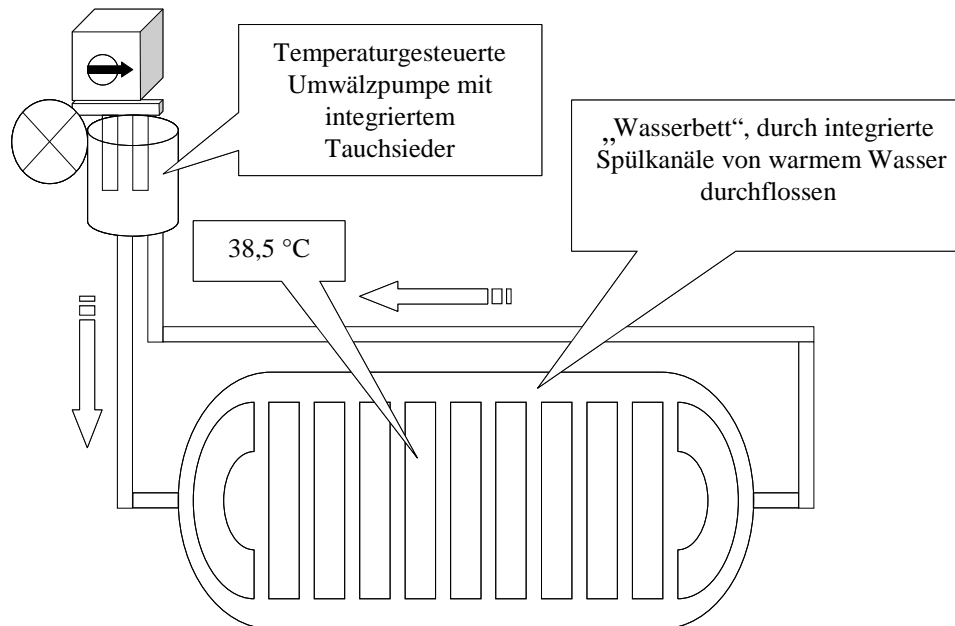


Abbildung 14 Schematischer Aufbau des wärmbaren Wasserbetts (Eigenkonstruktion der Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

Atmung (AF/etCO₂)

Während des Experimentes werden die endexpiratorischen Gaskonzentrationen von CO₂, O₂ und Isofluran neben Atemfrequenz und Beatmungsdruck über einen Atemgasmonitor (Capnomac, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) kontinuierlich überwacht. Entsprechend kann über eine Veränderung von Atemfrequenz bzw. des Beatmungsdrucks die endexpiratorische CO₂-Konzentration konstant (etCO₂: 30 ± 2 mmHg) gehalten werden.

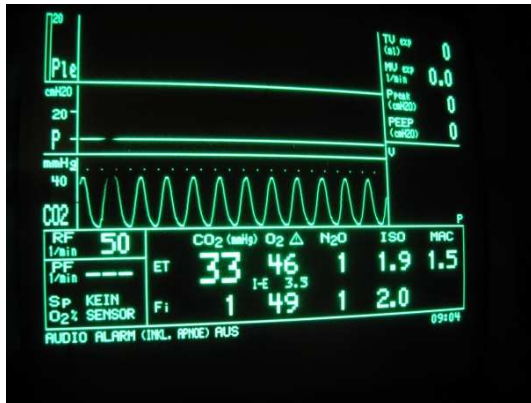


Abbildung 15 Monitoraufnahme des Atemgasmonitors während des laufenden Versuchs – im oberen Bildabschnitt deutlich die CO₂-Kurve erkennbar, im unteren Bildabschnitt die erhobenen Messparameter (Atemfrequenz: 50 min⁻¹, CO₂-Konzentration: 33 mmHg, O₂-Konzentration: 46 Vol%, Isofluran-Konzentration: 2,0 Vol%) (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

Blutdruck (RR/MAP)

Die Blutdruckmessung erfolgt in Echtzeit über einen arteriellen Katheter in der Schwanzarterie der Ratte (A. sacralis mediana). Dieser ist über einen so genannten Druckdom mit angeschlossenem Messsystem an den Überwachungsmonitor (Eagle 4000 Patient Monitor, Fa. Marquette Hellige GmbH, Freiburg) gekoppelt, der neben systolischen und diastolischen Blutdruckwerten auch den arteriellen Mitteldruck (MAP) anzeigt. Vor Versuchsbeginn wird diese Messeinheit gegen die äußeren Druckverhältnisse mittels Druckausgleich („nullen“) kalibriert.

Blutgasanalyse (BGA)

Während des laufenden Versuches wird zu drei Messzeitpunkten (Baseline, 10 min und 60 min nach Ischämie) eine arterielle BGA durchgeführt. Hierzu werden über den arteriellen Katheter jeweils etwa 200 µl Blut mittels heparinierter (Liquemin[®] N 25000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) Insulinspritze (Omnifix[®]-F 1ml 0,01 ml / 1,0ml, Fa. B. Braun AG, Melsungen) entnommen und mit Hilfe einer automatisierten pH/Blutgasanalyzers (Rapidlab[®] 860, Fa. Bayer Vital GmbH, Fernwald) die folgenden physiologischen Parameter bestimmt.

Die arteriellen Blutgase wie Sauerstoff- (paO₂ > 100 mmHg bei einem FiO₂ von 40 Prozent) und Kohlendioxidpartialdruck (paCO₂, Referenzbereich 30 bis 38 mmHg) werden überprüft und bei Bedarf durch Veränderung der Beatmungsfrequenz und des Atemzugvolumens korrigiert. Der pH-Wert des Blutes soll zwischen 7,35 und 7,45 liegen. Eventuell auftretende

Azidosen werden mit veränderter Beatmung (respiratorische Azidose oder Alkalose) bzw. mit Natriumhydrogenkarbonat (metabolische Azidose) (84 mg/ml DeltaSelect, Pfullingen, Formel: Menge Bikarbonat = $-BE \times 0,3 \times \text{kg KGW}$) therapiert. Elektrolyte wie Kalzium, Natrium, Kalium werden ebenfalls erfasst. Wenn die Kalziumkonzentration unter einen Wert von 1,0 mmol/l fällt, werden 0,1 bis 0,2 ml Kalziumglukonat substituiert (Calcium Braun 10%, Fa. B. Braun AG, Melsungen,). Der Hämatokrit soll einen Wert von 30 % nicht unterschreiten.

Die Bestimmung der Blutglukose erfolgt mithilfe eines Schnelltests (Glucometer Elite, Fa. Bayer Diagnostics, München). Eine eventuelle Hypoglykämie - beginnend bei einer Blutglukosekonzentration von unter 70 mg/ml - wird mit 0,1 bis 0,2 ml Glucose 50 %[®] (DeltaSelect GmbH, Pfullingen) behandelt.

2.3.2 Chirurgische Präparation

Zur chirurgischen Präparation wird das analgosedierte und nun kontrolliert beatmete Versuchstier auf den Rücken gelagert. Beide Augen werden mit Dexpanthenol (Bepanthen[®], Augen- und Nasensalbe, Fa. Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) bedeckt, um die Kornea vor Austrocknung zu schützen. Nach Etablierung des oben beschriebenen nicht invasiven Monitorings (EKG, EEG, Temperaturmessungen) beginnt die chirurgische Präparation.

Die im Folgendem beschriebenen Katheter werden mit heparinisiertem (Liquemin[®] N 25000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Germany) Sterofundin (Sterofundin, Fa. Braun AG, Melsungen) gespült, um einer Thrombosierung im weiteren Versuchsverlauf entgegenzuwirken.

Katheterisierung der A. mediana sacralis (arterieller Zugang)

Im ersten Präparationsschritt wird die geplante Präparationsstelle (proximale ventromediale Schwanzbasis) zunächst mit Desinfektionsmittellösung (Cutasept F, Fa. Bode, Hamburg) wischdesinfiziert und dann mit Lokalanästhetikum (Xylocain 2%) auf etwa 2 cm Länge infiltriert. Mit einer Skalpellklinge wird nun eine Inzision über der betäubten ventromedialen Schwanzhaut vorgenommen. Der Schnitt wird durch Spreizen mittels Präparationsschere erweitert und ausführlich blutgestillt. Die weitere Präparation in die Tiefe erfolgt stumpf bis zur Darstellung der A. sacralis mediana. Das Gefäß wird während der sich anschließenden

Präparationsschritte stets durch Betropfen mit heparinisierter Sterofundinlösung feucht gehalten. Die Arterie wird möglichst schonend mittels einer Pinzette unterfahren und von der sie begleitenden Vene auf etwa 2 cm Länge abpräpariert. Nun wird das Gefäß distal mit einem festen Faden (4-0 Perma-Hand-Seide, Ethicon[®], Fa. Ethicon-GmbH, Norderstedt) ligiert und proximal eine lockere Ligatur angelegt, ohne diese zuzuziehen. Das Gefäß kann nun zwischen beiden Ligaturen aufgespannt und mittels einer Mikroschere (Miltex 18-1625, Stainless Germany CE) mittig eröffnet werden. Ein stumpfer Polyethylen-Katheter (PE 50, Intramedic[™], Fa. Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg) wird nun unter Sicht eingebracht und etwa 2-3 cm im Gefäß vorgeschoben. Jetzt wird die proximale Ligatur zugezogen und der Katheter damit im Gefäß fixiert. Die Schwanzhaut wird mit einer Einzelknopfnahat darüber zum Schutz vor einer möglichen Austrocknung wieder verschlossen und mit einer befeuchteten Kompresse abgedeckt. Dieser Katheter dient später sowohl der invasiven Blutdruckmessung als auch der Entnahme arterieller Blutgasanalysen. Über diesen ersten Gefäßzugang erhält das Tier nun vor den weiteren Präparationsschritten zur Analgesie einen Fentanylbolus (0.05 µg i.a.) und wird heparinisiert (50 IU i.a.).

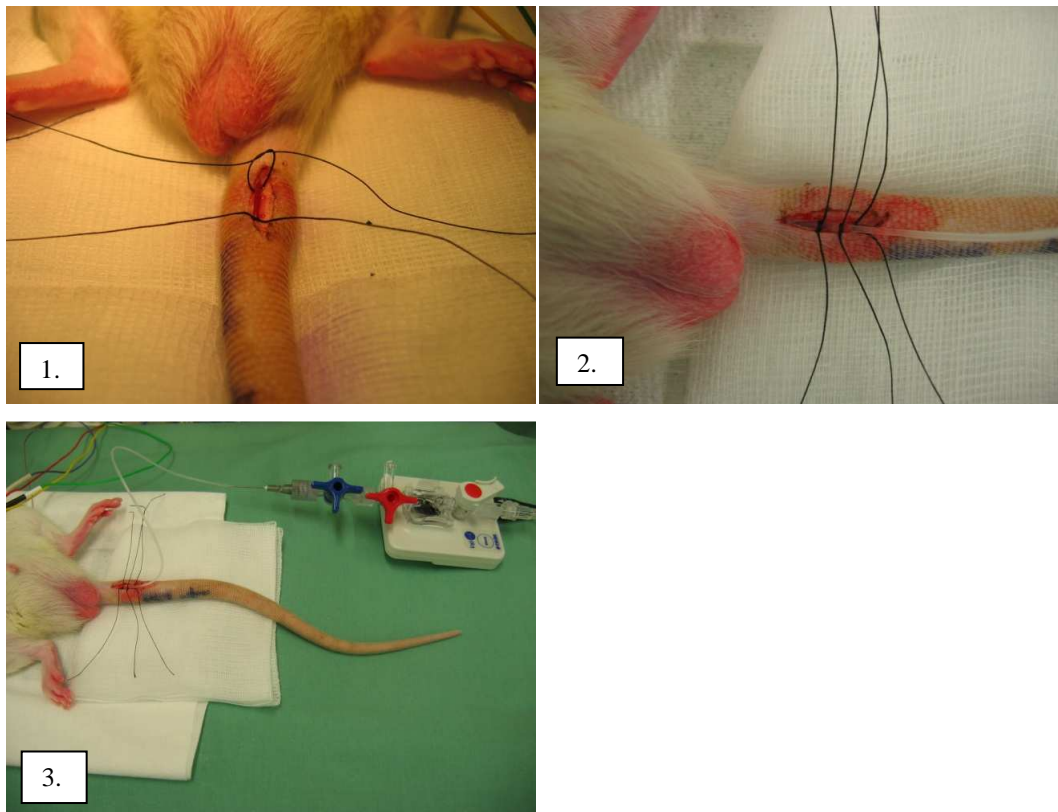


Abbildung 16 Katheterisierung der A. sacralis mediana – (1.) Anschlingen des Gefäßes, (2.) Katheter in Position fixiert und (3.) mit einem Druckdom konnektiert (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

Darstellung der A. carotis communis bds.

Im zweiten Präparationsschritt wird die geplante Präparationsstelle (medianer Hals) wie oben beschrieben rasiert, wischdesinfiziert und das Operationsfeld mit Lokalanästhetikum infiltriert. Nun folgen die Hautinzision und die stumpfe Präparation durch die Faszienlogen in die Tiefe, bis die Gefäßnervenscheide erreicht wird. Die A. carotis communis liegt hier ventrolateral der Trachea und ist intraoperativ durch deutliches Pulsieren leicht zu erkennen. Bei der Gefäßpräparation muss der Truncus vagosympathicus, der dem Gefäß direkt aufliegt, möglichst schonend abpräpariert werden. Das nun isolierte Gefäß wird dann ohne Unterbrechung der Durchblutung lose mit einem Faden (4-0 Perma-Hand-Seide, Ethicon[®], Fa. Ethicon-GmbH, Norderstedt) angeschlungen und spannungsfrei wieder in seine natürliche Ausgangsposition zurückgelegt.

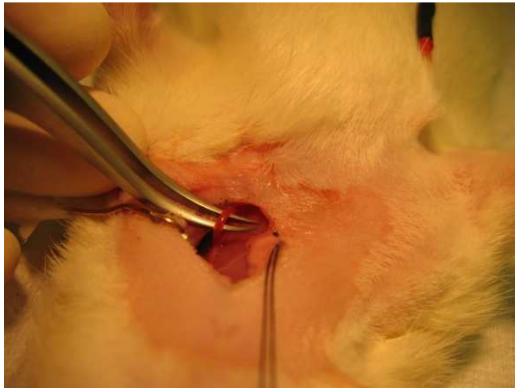


Abbildung 17 Intraoperativer Situs: A. carotis rechts bereits angeschlungen, A. carotis links auf Präparationspinzette mobilisiert (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

Katheterisierung der V. jugularis externa dextra (venöser Zugang/Blutentzug)

Im dritten und letzten Präparationsschritt erfolgt nach erneuter Vorbereitung des Operationsfeldes (rechte paramediane Halsseite) die Eröffnung der Haut, um so die Vena jugularis externa dextra im Sulcus jugularis zwischen dem M. brachiocephalicus und M. sternooccipitalis liegend darzustellen. Auch hier wird das Gefäß sorgfältig aus dem umgebenden Binde- und Fettgewebe freipräpariert, kranial mit einem Faden (4-0 Perma-Hand-Seide, Ethicon[®], Fa. Ethicon-GmbH, Norderstedt) abgebunden und kaudal mit einer Fadenligatur locker angeschlungen. Nun wird die Vene durch sanften Zug an beiden Fäden aufgespannt und mittels Mikroschere möglichst kranial eingeschnitten. Ein Silikonkatheter, an dessen Ende mehrere Drainagelöcher eingestanz sind (Außendurchmesser: 0,97 mm, Innendurchmesser 0,58 mm, Länge 33,5 mm Luer-Lock-Aufsatz aus eigener Herstellung) wird platziert. Dieser wird etwa 2 cm in das Gefäß eingeführt und mit der distalen Ligatur

gesichert. Über diesen Drainagekatheter erfolgt im weiteren Versuchsverlauf jede weitere Medikamentenapplikation (Muskelrelaxans), sowie der für die Ischämie unabdingbare Blutentzug und die Retransfusion mittels heparinierter Spritze.

Mit diesem Schritt ist die etwa 60-minütige Präparationsphase abgeschlossen und die Narkose auf eine inspiratorischen Isoflurankonzentration von 1,5 Vol% eingestellt. In diesem Zeitraum sollen sich die physiologischen Parameter stabilisieren.

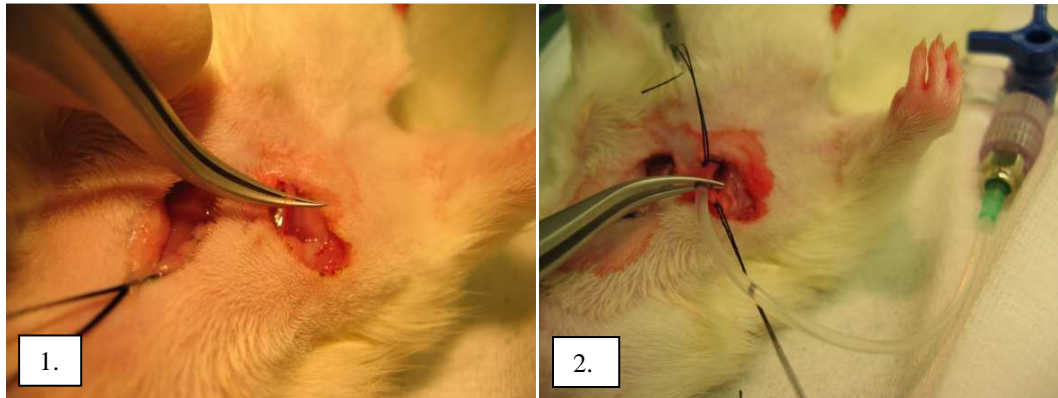


Abbildung 18 Intraoperativer Situs: (1.) V. jugularis rechts mobilisiert und (2.) während des Katheter-Anlegens (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

2.3.3 Bilaterale Karotisokklusion mit hämorrhagischer Hypotension

Nun werden vor der geplanten Ischämieinduktion die physiologischen Basisdaten (MAP_1 , perikranielle Temperatur₁, BGA₁, BZ₁) der Versuchstiere erhoben um sicherzustellen, dass vergleichbare Ausgangsbedingungen (Baseline) vorherrschen. Zu diesem Zeitpunkt erhalten die Tiere einmalig 0,2 mg Cisatracuriumbesilat (Nimbex[®] 10 mg, Fa. GlaxoSmithKline GmbH und Co KG, München) zur Relaxierung.

Durch Entzug von 7-10 ml Blut (interindividuell unterschiedlich) über den zentralen Drainagekatheter in zwei heparinisierte 5 ml Spritzen (Fa. B. Braun AG, Melsungen + 25 IU Heparin) wird der MAP binnen 30 – 60 Sekunden auf 27 – 30 mmHg abgesenkt. Mit Erreichen dieses Wertes wird die zerebrale Ischämie durch Verschluss der rechten und linken A. carotis communis mittels zweier Gefäßclips (UL 9310-03, Fa. Ulrich Germany) induziert. Der MAP wird während der 10-minütigen Ischämiephase (isoelektrisches EEG) manuell durch weiteren Entzug oder Rückgabe kleinster Blutmengen konstant gehalten.

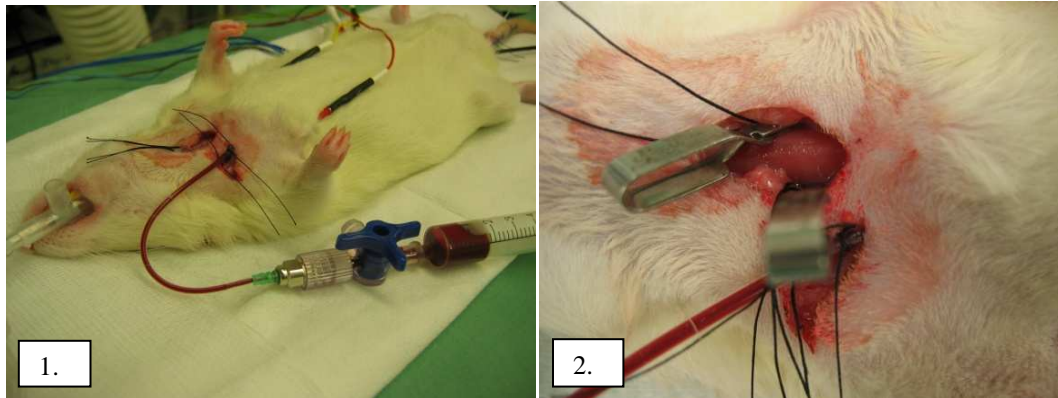


Abbildung 19 (1.)Bilaterale Karotisokklusion mit hämorrhagischer Hypotension mit (2.)Detailaufnahme der platzierten Gefäßclips (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

2.3.4 Reperfusion und Erholungsphase

Mit Entfernung der beiden Gefäßclips und Retransfusion der zuvor entzogenen Blutmenge über ein bis zwei Minuten beginnt die Reperfusionsphase. Um einer CO_2 -Erhöhung durch das venöse Blut entgegenzuwirken, kann die Beatmungsfrequenz bei entsprechend steigenden etCO_2 -Werten erhöht werden. Am Schluss der 10-minütigen Phase werden ein weiteres Mal die Messparameter ermittelt (MAP_2 , perikranielle Temperatur₂, BGA_2 , BZ_2).

Mit Abschluss der Reperfusionsphase beginnt eine 60-minütige Erholungsphase (Recovery-Phase), in welcher die Narkose durch Erhöhung der inspiratorischen Isoflurankonzentration auf 2 Vol% erneut vertieft wird. Am Ende dieser Erholungsphase werden ein letztes Mal die Messparameter erhoben (MAP_3 , perikranielle Temperatur₃, BGA_3 , BZ_3), bevor sämtliche Katheter gezogen und die Hautwunden mit nicht resorbierbaren Fäden (Ethicon® 4-0 Prolene, Fa. Ethicon-GmbH, Norderstedt) mittels Einzelknopfnahnt verschlossen werden. Auch werden nun die Temperatursonden (rektal/perikraniell) und sämtliche Nadelelektroden (EEG/EKG) entfernt.

2.3.5 Ausleitung und postoperative Nachbeobachtungsphase

Mit Ende der 60 minütigen Erholungsphase endet auch die Isofluranzufuhr und die inspiratorische Sauerstoffkonzentration wird auf 100 % erhöht. Bei Einsetzen der Spontanatmung wird das Tier extubiert und in eine mit Sauerstoff angereicherte Narkosebox

gebracht. Hier verbringt es die folgenden 12 Stunden bei freiem Zugang zu Wasser und Futter. Während der ersten sechs Stunden werden die Tiere kontinuierlich überwacht. Hierbei wird besonderes Augenmerk auf mögliche schwerwiegende neurologische Dysfunktionen (z.B. anhaltender Bewusstseinsverlust, weite lichtstarre Pupillen oder Apnoe) und Atemstörungen (z.B. Stimmbandlähmung) gelegt. Das Versuchsprotokoll sieht hier die umgehende Euthanasie des Tieres vor.

In der postoperativen Phase möglicherweise auftretende zerebrale Krampfanfälle werden mit repetitiven intramuskulären Midazolamgaben (0,25 mg) behandelt.

Mit Abschluss der Überwachungsphase werden die Tiere am ersten postoperativen Tag in ihre Käfige zurück gebracht.

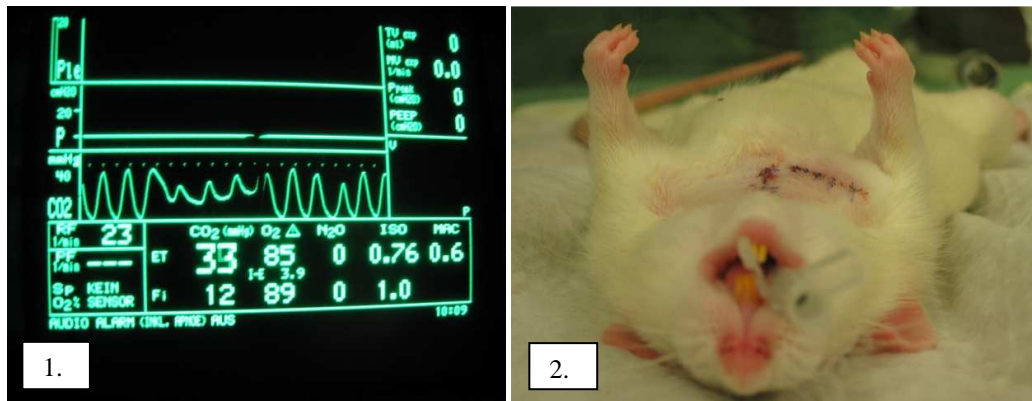


Abbildung 20 (1.)Einsetzende Spontanatmung während Ausleitung und (2.)Versuchstier unmittelbar vor Extubation (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

2.4 Neurologische Untersuchung

Alle Tiere werden während der Studiendauer zur Beurteilung ihrer neurologischen und motorischen Fähigkeiten verschiedenen Tests unterzogen. Der Testablauf überprüft dabei sowohl Bewusstsein, Pflegeverhalten und Laufvermögen der Tiere, als auch deren motorische (Gleichgewicht, Greif- und Haltevermögen, Koordination) und sensorische (Seh- und Hörvermögen, Propriozeption) Fähigkeiten, um Veränderungen (postoperative Defizite nach vorangegangener Schädigung) möglichst vollständig zu erfassen, die möglicherweise durch reine Beobachtung der Tiere übersehen würden [COMBS et al. 1987].

Zur Gewöhnung an die Handhabung und andersartige Bewegungsanforderungen in der Testsituation während des Untersuchungsablaufes werden alle Versuchstiere bereits zwei Tage vor dem jeweilig geplanten Operationstermin zum ersten Mal getestet.

Die am darauffolgenden Tag erhobenen Untersuchungsergebnisse gehen als Ausgangswert (Baseline), mit denen die postoperativ erhobenen Messwerte verglichen werden, in die Auswertung ein. Bei allen aktiv senso-motorischen Tests ist zum Schutz vor Verletzungen im Falle eines Sturzes stets eine Schaumstoffmatte (80 x 50 x 10 cm) untergelegt.

Entsprechend der randomisierten Gruppeneinteilung der Versuchstiere und den vorgesehenen postoperativen Überlebenszeiten werden die Untersuchungen postoperativ an den folgenden Tagen wiederholt (siehe Abbildung 7). Wenn das Studienprotokoll für das einzelne Tier am selben Tag einen mHB-Test vorsieht, erfolgt die neurologische Untersuchung standardisiert erst nach Abschluss des Verhaltenstests, um eine Interaktion zu vermeiden.

Der Untersucher ist bezüglich der Gruppenzugehörigkeit der Versuchstiere (BCAO/Sham) geblindet. Die Ergebnisse selbst werden standardisiert erhoben und in einem Punktesystem (Score) dokumentiert. Dabei entspricht eine Bewertung mit null Punkten stets der bestmöglichen Leistung. Dementsprechend weist eine hohe Gesamtpunktzahl (maximal 25) auf eine schlechte Performance hin.

Sensorische Fähigkeiten

Seh- und Hörvermögen

Da ein intaktes Seh- und Hörvermögen der Tiere entscheidenden Einfluss auf ihr Verhalten hat, wird Selbiges im Zuge der neurologischen Untersuchung überprüft.

Zur Beurteilung des Sehens wird ein Wattebausch laut- und berührungslos im äußeren rechten und linken Sehfeldes der Ratte fallen gelassen. Eine Kopfdrehung in Richtung des fallenden Wattebausches, wird als normales Sehvermögen gewertet (null Punkte). Zeigt sich einseitig keine Reaktion, wird dies als Beeinträchtigung gewertet (ein Punkt).

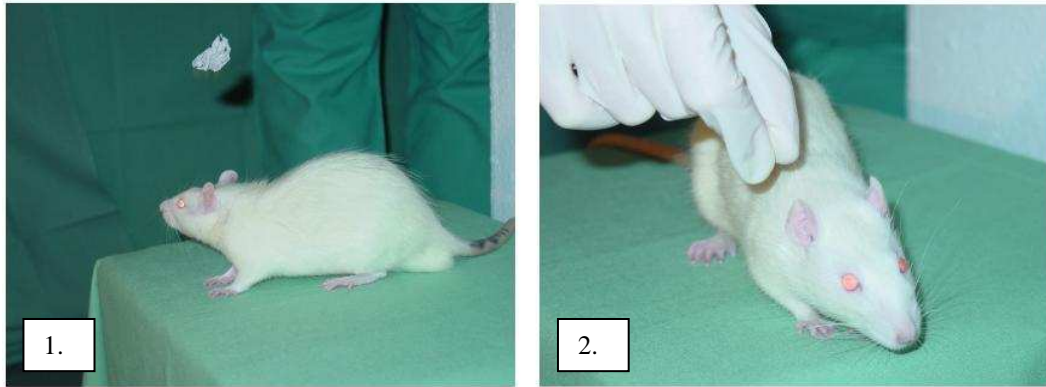


Abbildung 21 Versuchstier bei der Untersuchung des Seh- (1.) und Hörvermögens (2) (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

Das Hörvermögen wird anhand eines akustischen Reizes (Schnipsen) hinter dem Rücken des Tieres überprüft. Eine Kopfdrehung oder vergleichbare Reaktion (Ohrspiel) in Richtung des Signals wird wiederum als normal gewertet (null Punkte), keine Reaktion wird als eingeschränktes Hörvermögen gewertet (ein Punkt).

Vibrissenreaktion und Propriozeption

Die Vibrissenreaktion wie auch die Propriozeption gelten als Indikator der Sensibilität.

Mit dem Finger bestreicht der Untersucher, möglichst außerhalb des Sehfeldes der Ratte, seitlich die Vibrissen. Wendet das Tier hierauf den Kopf in die jeweilige Richtung, gilt die Vibrissenreaktion als normal (null Punkte). Zeigt sich lediglich eine angedeutete Reaktion auf einer Seite, gilt die Vibrissenreaktion als eingeschränkt (ein Punkt), sind beide Seiten betroffen, wird dies mit zwei Punkten bewertet. Bleibt die Reaktion auf einer Seite gänzlich aus erhält das Tier drei Punkte, bzw. vier Punkte, wenn die Reaktion auf beiden Seiten fehlt.

Ebenso lässt sich die Propriozeption der Ratte durch einen in Höhe der rechten und linken Flanke mittels eines Fingers gesetzten, kurzen Berührungsreiz („Anstupsen“) überprüfen. Dreht das Tier seinen Kopf oder Körper in die entsprechende Richtung, so wird dies als Normalreaktion gewertet und analog zur oben beschriebenen Vibrissenreaktion beurteilt.

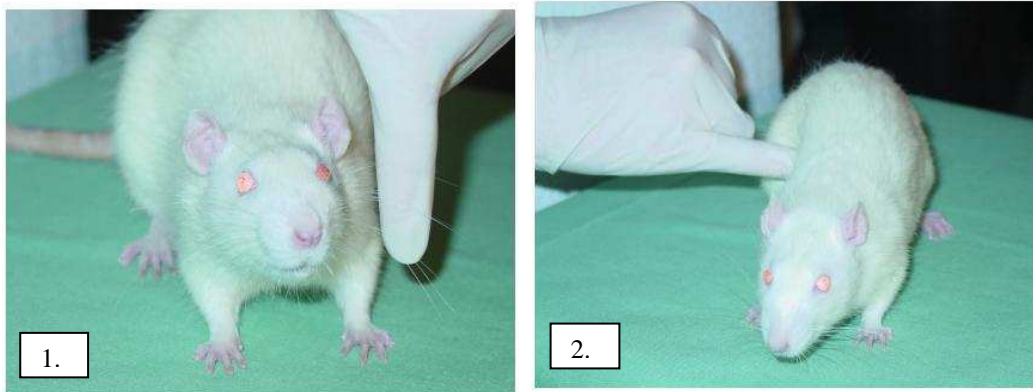


Abbildung 22 Versuchstier bei der Untersuchung der (1.) Vibrissenreaktion und (2.) Propriozeption (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

Bewusstsein und Pflegeverhalten

Die Bewertung von Bewusstsein und Pflegeverhalten des Versuchstieres kann sowohl durch Beobachtung seines Verhaltens im Käfig als auch während der Durchführung der folgenden Untersuchungen erfolgen.

Ein gesundes Tier verhält sich kontaktfreudig und erkundet seine Umwelt neugierig (Aufrichten an der Käfigwand). Sein äußeres Erscheinungsbild ist durch ein sauberes, glattes Fell gekennzeichnet. Ein Tier mit eingeschränktem Allgemeinbefinden fällt hingegen durch typische Verhaltensveränderungen auf. Es sondert sich von den Käfiggenossen ab, zeigt sich ruhelos (ungerichtete Aktivität) oder an seiner Umgebung desinteressiert bzw. spricht nicht auf Umgebungsreize (Lethargie) an, vernachlässigt seine Fellpflege (stumpfes, struppiges, rot verschmiertes Fell im Augenbereich durch Sekrete der Harderschen Drüsen) und verliert durch reduzierte Wasser- und Futteraufnahme Körpergewicht (tägliche Kontrolle). Auch kann sich seine Körperhaltung verändern (aufgekrümmte Rückenlinie). Da das Putzverhalten der Tiere stets auch von deren Bewusstseinszustand abhängt, werden beide Parameter gemeinsam beurteilt.

Ein ungetrübtes Bewusstsein und normales Pflegeverhalten wird mit jeweils null Punkten, ein gedämpftes oder ruheloses Erscheinungsbild mit eingeschränktem Pflegeverhalten mit je einem, Lethargie ohne sichtbare Fellpflege mit je zwei Punkten bewertet.

Motorische Fähigkeiten

Laufvermögen

Ebenso kann durch Beobachtung das Laufvermögen der Tiere beurteilt werden. Eine gesunde Ratte wird beim Absetzen auf einer ebenen Fläche alle Gliedmaßen dieser Fläche reflexartig

entgegenstrecken und relativ rasch mit der Exploration der neuen Umgebung beginnen. Dieses Verhalten wird als normal angesehen und folglich mit null Punkten bewertet.

Geschädigte Tiere können hier durch gestörte Stellreflexe (Adduktion der Vordergliedmaßen kontralateral zur Läsion), pathologische Bewegungsabläufe (Hypo-/Hypermobilität, Ataxie, Laufen im Kreis) oder verminderte Bewegungsfähigkeit (Paresen) auffallen. Jede Einschränkung der Motorik wird mit einem Punkt, Kreisbewegungen (ipsilaterale Drehung zur Läsion) der Tiere, die stets ein Hinweis auf schwerwiegende zentrale Schädigungen darstellen, werden mit zwei Punkten bewertet.

Kletterverhalten

Dieser Test beurteilt Greif- und Haltevermögen, Gleichgewichtsgefühl und Muskelkraft der Versuchstiere. Hierzu wird die Ratte mit den Vorderpfoten an die Außenkante einer Plattform gesetzt, die reflexartig ergriffen und dann wieder losgelassen wird. Gesunde Tiere ziehen sich jetzt unter Zuhilfenahme der Hinterbeine auf die Horizontale herauf, um einen Absturz zu vermeiden. Dieses Verhalten wird mit null Punkten bewertet. Bleibt das Tier länger als 5 Sekunden an der Kante hängen und zieht dabei beide Hinterbeine an, erhält es einen Punkt. Alleiniges Hängenbleiben über denselben Zeitraum wird mit zwei Punkten, unter 5 Sekunden mit drei Punkten bewertet. Zeigt das Tier keinerlei Greifreflex, erhält es vier Punkte.

Greif- und Haltevermögen

Drahtgitter- und Greif-Zug-Test mit Symmetrie der Bewegungen

Greif- und Haltevermögen aller Gliedmaßen des Versuchstieres können beurteilt werden, indem sich die Ratte auf einem horizontalen Drahtgitter (57 x 50 cm, Lochgitterabstand: 1 cm) mit ihren Vorder- und Hinterpfoten festhalten soll. Hat das Tier Halt gefunden, wird das Drahtgitter in etwa 60 cm Höhe zunächst in die Vertikale und dann in einer fließenden Bewegung um insgesamt 180° gedreht. Ein gesundes Tier wird sich problemlos kopfüber mindestens 5 Sekunden halten können (null Punkte). Ein Tier mit einer muskulären Schwäche kann sich in den verschiedenen Gradpositionen nicht oder weniger lange halten. Lässt es nach weniger als 5 Sekunden los, erhält es einen Punkt. Kann es sich lediglich in der Vertikalen (90°) halten, erhält es zwei Punkte, fällt es dabei bereits herunter, drei Punkte. Dieser Test wird nach einer kurzen Erholungspause wiederholt. Der Sturz selbst ist für das Tier ungefährlich und ermöglicht gleichzeitig die Beurteilung des physiologischen Umdrehreflexes.

1.



2.



Abbildung 23 Drahtgitter-Test in vertikaler (1.) und um 180 ° gedrehter (2.) Position (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

Der Greif-Zug-Test stellt eine Variante des Prehensile-Traction-Tests [COMBS et al. 1987] dar. Hier wird die Ratte an der Schwanzbasis angehoben und mit den Vorderpfoten an ein, in 40 cm Höhe horizontal gespanntes Drahtseil (60 cm x 0,3 x 0,3 cm), gesetzt, welches im Normalfall reflexartig von ihr ergriffen wird. Nun wird die Zeitdauer gemessen, bis das Tier sich nicht mehr halten kann. Ein gesundes Tier vermag sich mindestens 11 Sekunden festzuhalten (null Punkte). Unter 6 Sekunden erhält es einen Punkt, unter 1 Sekunde, zwei Punkte und vermag es sich überhaupt nicht zu halten, erhält es drei Punkte. Dieser Test wird nach einer kurzen Erholungspause wiederholt. Neben der Stärke der muskulären Kraft des Tieres, kann man normalerweise beim Anheben des Tieres den Stellreflex (Ausstrecken der Vordergliedmaßen unter Anspannung des Körpers) beobachten. So kann zugleich die Symmetrie der Bewegungen beurteilt werden.



Abbildung 24 Versuchstier während des Greif-Zug-Tests mit Zeitmessung (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

Gleichgewichts- und Koordinationsvermögen

Balken-Geh- und Balken-Gleichgewichts-Test

Zur Beurteilung von Gleichgewichtsverhalten und Koordination muss das Versuchstier im Balken-Geh-Test eine definierte Strecke (300 cm) auf einen 2,5 cm breiten Holzbalken zurücklegen und anschließend auf einem 1,5 cm breiten Balken im Balken-Gleichgewichts-Test einen definierten Zeitraum (60 Sekunden) Balancieren. Letzterer besteht aus drei Testdurchläufen in einminütigem Abstand. Die quadratischen Holzbalken befinden sich dabei in etwa 40 cm Höhe.

Im Balken-Geh-Test [FEENEY et al. 1982] werden nun Lokalisation (Vorder- oder Hintergliedmaße, rechts oder links) und Anzahl der Fehlritte bewertet. Für weniger als drei Fehlritte werden null Punkte, für vier bis zehn Fehlritte ein Punkt, für 11 bis 20 Fehlritte zwei Punkte, für über 20 Fehlritte drei Punkte und für Immobilität oder Sturz vier Punkte vergeben. Fällt das Tier vor Abschluss der Gesamtstrecke vom Balken, so werden die bis dato gemachten Fehlritte auf die Gesamtstrecke hochgerechnet.

Beim Balken-Gleichgewichts-Test [COMBS et al. 1987] wird die balancierte Gesamtzeit wie folgt bewertet. Für 50 bis 60 Sekunden erhält das Tier null Punkte, für 30 bis 49 Sekunden einen Punkt, für 10 bis 29 Sekunden zwei Punkte, für unter 10 Sekunden drei Punkte und vier Punkte für Loslassen und Sturz.

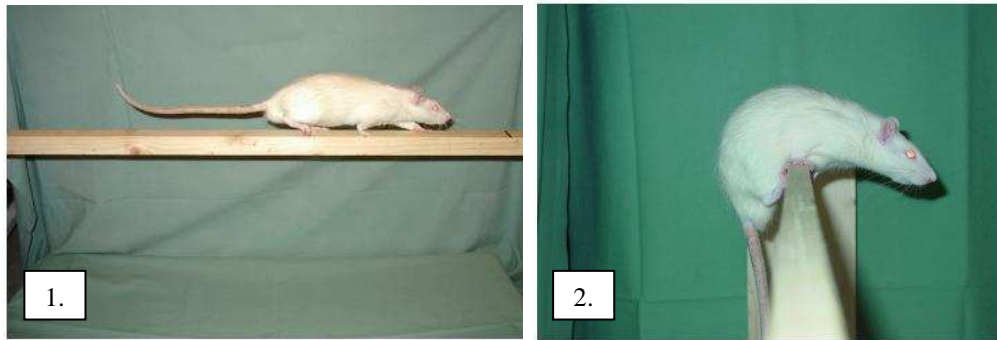


Abbildung 25 (1.) Versuchstier während des Balken-Geh- und (2.) Balken-Gleichgewichts-Test (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

2.5 Modifizierter Hole-Board-Test (mHBT)

2.5.1 Testprinzip

Der modifizierte Hole-Board-Test (mHBT) nach Ohl [OHL et al. 2001^b] ist ein visuell-räumlicher Verhaltenstest.

Der Versuchsaufbau besteht aus einer einem offenen Feld entsprechenden Versuchsarena [BOARDHURST 1957], die mittels Markierung in vier gleich große Sektoren unterteilt wird, in deren Mitte sich ein Brett mit 15 selbstverschließenden Löchern („Hole-Board“) [FILE et al. 1975^b][BELZUNG et al. 1994] befindet.

Die Tiere erlernen nun in einer standardisierten und möglichst stressfreien Versuchssituation unter Ausnutzung ihrer natürlichen Neugier, eine Futterbelohnung (Puffreis) mit einer Lochmarkierung zu assoziieren. Die Markierungen selbst werden nach einer randomisierten Liste täglich gewechselt. Das Verhalten der Versuchstiere wird computergestützt dokumentiert. Die dabei erhobenen Daten werden wiederum gemittelt (drei Testdurchläufe pro Tier und Versuchstag) und bilden ein breites Spektrum von Verhaltensparametern (Angst-/Erregungs- und Sozialverhalten, Explorations- und motivationales Verhalten), sowie die Bewegungsaktivität und kognitive Leistungsfähigkeit der Tiere ab. Zugleich erlauben sie eine Unterscheidung zwischen motorischen und kognitiven Defiziten.

Um möglichst konstante Testbedingungen zu gewährleisten, werden die Tiere immer vom gleichen Untersucher, der gegenüber der Versuchsgruppenzugehörigkeit geblindet ist,

gepflegt und entsprechend dem Versuchsprotokoll täglich zur selben Zeit zwischen 8:00 und 12:00 Uhr getestet.

2.5.2 Versuchsarena

Die Versuchsarena besteht aus einer nach oben offene Box (80 x 60 x 50 cm) aus grauem, undurchsichtigem PVC (Fa. Josef Weiss Plastik GmbH, München), dem sogenannten "Homecage". Als abnehmbare Abdeckung dient ein Metallgitter (61 x 81 cm) mit einer Quadratlochung von 1 x 1 cm (Lochfeldraster, Fa. Moradelli, Fabrik für Lochbleche, Kirchheim), da die Tiere sonst an der später eingeschobenen gelochten Trennwand aus dem Käfig klettern könnten. An einer Seite des Homecage befinden sich je drei Öffnungen für Tränkenippel und Futterraufen. Die Trinkflaschen (Classic-Pet Products: De-Lux Hamster-Drinking Bottle, Code: 0191, Großbritannien) und Futterspender sind außen an der Box befestigt.

Nach 10 Tagen Eingewöhnungsphase, in der den Versuchstieren der gesamte Homecage zur Verfügung steht, wird dann der Homecage in der Mitte durch eine 1 cm starke durchsichtige PVC-Trennwand (59 x 50 cm) (Firma Josef Weiss Plastik GmbH, München) in jeweils gleich große Tier- und Versuchsabteile (je 40 x 60 x 50 cm) getrennt. In dieser Trennwand befinden sich im Abstand von je 5 cm Löcher (Ø 2 cm), sodass die Tiere auch während der folgenden Testdurchläufe Gruppenkontakt aufnehmen können [OHL et al. 2001].



Abbildung 26 Homecage mit (1.) Wohnabteil und (2.) modifiziertem Hole-Board (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

2.5.3 Doppeldes Hole-Board

Das doppelte Hole-Board besteht aus zwei übereinander liegenden grauen PVC-Platten gleicher Abmessung (40 x 25 cm) mit 15 darin eingearbeiteten Löchern (Firma Josef Weiss Plastik GmbH, München). Die obere Platte ist jedoch etwas dünner (0,7 cm) als die untere (1,0 cm). Beide Platten werden mittels Steckverbindung über vier Metallstifte, die vertikal im unteren Brett eingelassen sind, verbunden. Die 15 Löcher des oberen Boards sind durchgebohrt (\varnothing 2 cm) und über ein feines Drahtgitter, welches zwischen beide Brettanteile gelegt wird, von den genau darunter liegenden Lochvertiefungen im unteren Brett (\varnothing 3 x 0,7 cm) abgetrennt. Das zusammengesteckte doppelte Hole-Board wird in eine Rahmenkonstruktion gelegt (Außenmaß: 39,5 x 49,5 cm / Innenmaß: 25,5 x 40,5 cm, Stärke 1 cm), die dann die Unterkante des oberen Brettes genau mit den Seitenwänden der Testarena verbindet. Damit entspricht die für die Ratte resultierende Bretthöhe des doppelten Hole-Board genau einem Zentimeter. Später wird auf der Oberseite des Rahmens mit weißen Klebestreifen (Leukoplast® hospital, BSN medical GmbH, Hamburg) die Arenaunterteilung vorgenommen.

Jedes der 15 Löcher wird von einem dünnen PVC-Deckel (\varnothing = 2,5 cm), der mittels einer exzentrisch angebrachten Schraube am oberen Board fixiert ist, bedeckt. Auf Deckel und Brett sind PVC-Klötzchen angebracht (1 x 1 cm), die über eine Stellfeder verbunden werden. Deren Federstärke ist dabei so gewählt, dass die Ratte problemlos den Deckel mit Pfote oder Schnauze aufschieben kann und selbiger wieder in seine ursprüngliche, geschlossene Position zurückgleitet, wenn das Versuchstier ihn loslässt.

Enthält das Loch für die Tiere eine erreichbare Futterbelohnung, wird das PVC-Klötzchen auf dem Deckel während der Testdurchläufe durch einen weißen Pflasterstreifen (Leukoplast® hospital, Fa. BSN medical GmbH, Hamburg) optisch markiert.

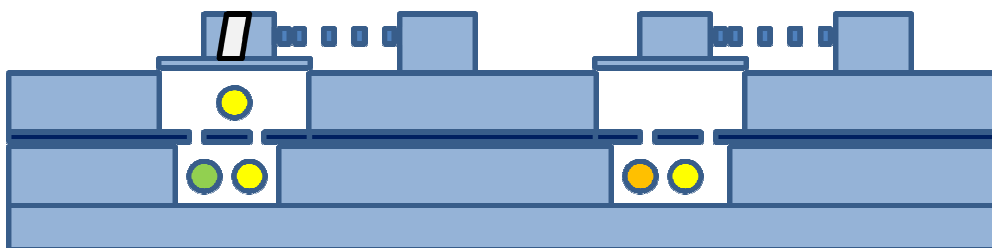


Abbildung 27 Schematischer Aufbau des doppelten Hole-Board

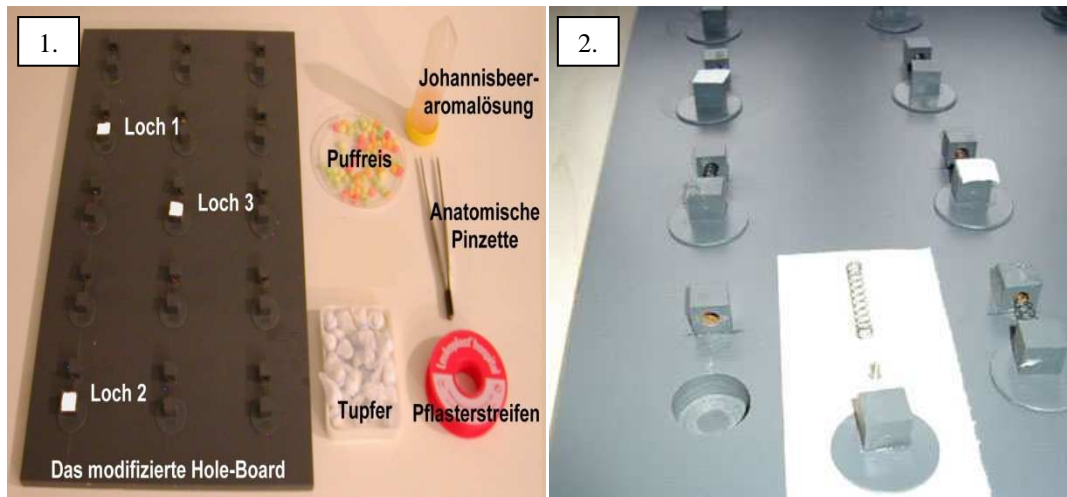


Abbildung 28 (1.)mHB mit den Utensilien die zum Befüllen benötigt werden und ein (2.)exemplarisch zerlegtes mHB (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

Da Ratten über einen ausgeprägten Geruchssinn verfügen, sich die Tiere im HBT aber rein visuell an den angebrachten Markierungen orientieren sollen, wird durch verschiedene Maßnahmen eine olfaktorische Orientierung verhindert.

Zum einen werden die Vertiefungen im unteren Board täglich vor Versuchsbeginn mit frischen Puffreisstückchen (Knusperpuffreis[®], Frigo-Werk, Remshalden) befüllt, bleiben für die Tiere jedoch aufgrund der Gitterabtrennung im Testverlauf selbst unerreichbar. Damit wird erreicht, dass alle Löcher immer gleichmäßig nach Puffreis riechen. Die eigentliche Futterbelohnung wird dann unter dem jeweils markierten Deckel auf dem Gitter und damit für die Tiere erreichbar platziert. Zum anderen soll der Eigengeruch des Puffreises durch Bestreichen der Lochränder mit Johannisbeeraroma (Mikro-Plus[®], Konzentrate GmbH, Stadtoldendorf, 0,1 g Reinsubstanz verdünnt in 50 ml Leitungswasser) überdeckt werden.

Aus ähnlichen Überlegungen heraus werden alle Deckel zwischen den Versuchstagen jeweils mit einer Markierung beklebt, die entsprechend der Randomisierungsliste am folgenden Tag wieder entfernt wird, um zu vermeiden, dass die im Test markierten Löcher möglicherweise für die Ratten stärker nach Kleber riechen als andere. Vor und nach dem Test wird das doppelte Hole-Board mit warmem Wasser und sauberem Zellstoff gereinigt.

3.5.4 Zeitliche Versuchsplanung und Durchführung

Habituation

Zur Adaption an ihre neue Umgebung und Haltungsbedingungen (Raumklima, Hell-/Dunkelphasen, Tierpfleger) werden die Ratten nach ihrer Ankunft aus dem Zuchtbetrieb drei Wochen vor dem eigentlichen Versuchsbeginn in Gruppen zu maximal 4 Tieren in Standardkäfigen (Makrolon Typ IV) gehalten. Entsprechend der Randomisierung werden die Tiere, die zur Teilnahme am modifizierten Hole-Board-Test vorgesehen sind, 11 Tage vor dem eigentlichen Versuchsbeginn in Gruppen zu 6 – 8 Tieren in den Homecage umgesetzt.

Da Ratten gegenüber neuartigem Futter zunächst misstrauisch sind, beginnt man vier Tage vor dem geplanten OP-Termin damit, allen Tieren täglich Puffreis in der geöffneten Hand des Untersuchers anzubieten. Hierbei erfolgt zugleich auch die Gewöhnung an die Hand des Untersuchers. Am letzten Tag vor der OP wird die durchsichtige PVC-Trennwand eingeschoben und die spezielle Rahmen-HB-Konstruktion in die Versuchsarena gelegt. Um den Tieren die Möglichkeit zur Erholung nach dem operativen Eingriff zu geben, wird der mHBT erst am zweiten postoperativen Tag begonnen.

Lernphase

1. Tag der Lernphase

Bereits am zweiten postoperativen Tag beginnt die Lernphase. Die Tiere sollen schrittweise erlernen, dass in manchen Löchern Futterbelohnungen zu finden sind, wenn sie die mit einem Deckel verschlossenen Löcher mit Pfote oder Schnauze öffnen. Es folgen nun drei Durchläufe ohne Klebeband-Markierungen bei herausgenommenen Rückstellfedern.

Durchlauf 1

Alle Löcher werden mit jeweils einem Puffreisstück befüllt und stehen halb offen (abwechselnd rechts und links). Die Ratte wird in die Versuchsarena eingesetzt und verbleibt dort so lange, bis sie entweder drei Futterbelohnungen gefunden und gefressen hat oder 10 Minuten vergangen sind. Dieser Durchlauf wird als Erstexposition aufgezeichnet und das Tier anschließend wieder in seine Gruppe zurückgesetzt.

Durchlauf 2

Nun werden zehn Löcher mit einer Futterbelohnung bestückt. Fünf davon werden geschlossen, fünf halb geöffnet. Die restlichen Löcher bleiben leer und stehen weit offen. Wie

im ersten Durchlauf wird die Ratte aus der Versuchsarena genommen, sobald sie drei Puffreiskörner gefressen hat oder zehn Minuten vergangen sind.

Durchlauf 3

Alle Löcher, die mit einer Futterbelohnung versehen sind werden nun geschlossen. Lediglich die fünf leeren Löcher bleiben geöffnet. Wie in den Durchläufen zuvor wird die Ratte aus der Versuchsarena genommen sobald sie drei Puffreiskörner gefressen hat oder zehn Minuten vergangen sind.

2. Tag der Lernphase

Am folgenden dritten Versuchstag, werden nun gemäß der Randomisierungsliste nur die Löcher 5, 9 und 10 mit einer Futterbelohnung versehen und anschließend mit einem weißen Pflasterstreifen auf dem Deckel markiert. Die ersten beiden Durchläufe finden dann mit geschlossenen Deckeln, aber ohne Rückstellfeder statt, die dann im dritten und einem zusätzlichen vierten Durchlauf eingesetzt wird. Entsprechend muss das Tier im 3. und 4. Durchlauf, um an die Futterbelohnung zu gelangen, die Löcher gegen einen geringen Widerstand öffnen und auch bei Entnahme des Puffreiskornes offen halten. Wie am Tag zuvor endet der Testdurchlauf, wenn die drei Futterbelohnungen gefunden und gefressen wurden oder 10 Minuten vergangen sind.

Ab dem dritten Tag der Lernphase (4. postoperativer Tag) wird ein computergestütztes Versuchsprotokoll (Jens Frühauf: Zeiterfassung für Ratten- und Mäuseversuche Version V 1.4 2000 – 2004) erstellt. Das mHB ist ab diesem Tag mit Federn versehen und die Lochkombinationen werden täglich gewechselt.

Tag	Lochkombination	Tag	Lochkombination
3.	5, 9, 10	13.	5, 6, 8
4.	2, 5, 8	14.	1, 10, 13
5.	4, 12, 13	15.	6, 13, 15
6.	3, 10, 12	16.	2, 10, 12
7.	1, 2, 15	17.	3, 4, 9
8.	4, 6, 9	18.	1, 5, 12
9.	9, 12, 13	19.	8, 10, 13
10.	2, 11, 14	20.	6, 11, 15
11.	3, 4, 10	21.	4, 7, 14
12.	3, 7, 14		

Tabelle 2 Randomisierungsliste mHB

Hole-Board-Protokoll

Für die Datenerfassung im mHB-Test steht ein selbst entwickeltes Computerprogramm (Jens Frühauf: Zeiterfassung für Ratten- und Mäuseversuche Version V 1.4 2000 – 2004) zur Verfügung, das vom Untersucher über eine geräuschlose Tastatur (Foldable Keyboard, Fold-2000, Taiwan) blind bedient werden muss, weil dessen ganzes Augenmerk auf das Tier in der Versuchsarena gerichtet ist. Um die einzelnen Durchgänge nachvollziehen zu können, findet eine zusätzliche Dokumentation mit einer an der Querseite der Versuchsarena über ein Stativ befestigten Kamera (Digital-Camcorder-Videokamera, GR-DV 1800, JVC, Japan) statt.

Während der Aufzeichnung befindet sich der Homecage direkt neben dem am Computertisch sitzenden Untersucher. Dabei ruht dessen eine Hand auf der Tastatur, und die andere hebt das jeweilige Versuchstier vorsichtig durch Griff unter Brust und Bauch aus dem Tierabteil über die Trennwand hinweg, und setzt es in der rechten Ecke der Versuchsarena ein. Gleichzeitig startet der Untersucher das Programm durch Druck des entsprechenden Tastenbefehls.

Das Programm besitzt eine Stoppuhrfunktion, mit der jeder Aktivität die dazugehörige Zeit zugeordnet wird. Der erste Druck auf die Tastatur startet die Zeitmessung. Bestimmte Tasten kodieren die verschiedenen Aktionen der Tiere. Beim Aktivieren der Tasten notiert das Programm die Aktion in einer Textdatei und überträgt die Daten automatisch in eine Exceldatei. Das Programm beendet das Untersuchungsprotokoll, wenn die Stoppuhr maximal zehn Minuten erreicht hat oder drei Mal die entsprechende Tastenkombination für den korrekten Lochbesuch mit Futteraufnahme eingegeben worden ist.

Parameter	Tastentaste	Beobachtetes Verhalten
Start	Enter	Beginn eines Durchlaufs
Betritt Board	r	Tier exploriert mHB
Verlässt Board	v	Tier verlässt mHB und exploriert die Versuchsarena
Korrektur Lochbesuch 1, 2, 3	f, g, h	Aktives Aufsuchen eines der drei markierten Löcher mit Futterbelohnung
Motor skill	d	Tier senkt die Nase unterhalb der oberen Lochebene
Fressen	x (in Box) c (auf Board)	Tier beginnt die Futterbelohnung zu fressen
Wiederholer	l	Wiederholter Besuch eines bereits geleerten, markierten Loches
Fehler	k	Besuch eines nicht markierten Loches
Kontaktaufnahme	z	Schnuppern an der Trennwand
Fellpflege	u	Ratte putzt sich
Immobilität	i	Tier verharrt über drei Sekunden regungslos
Männchen machen	t	Tier erhebt sich auf die Hinterbeine
Linienüberquerung	e	Tier übertritt eine auf den Boden geklebte Linie
Bolus	b	Kotabsatz
Urin	n	Urinabsatz
Beenden einer Phase	j	Beendet eine Aktivitätsphase

Tabelle 3 Tastaturbefehle und Bedeutung im mHBT

Qualitäten des modifizierten Hole-Board-Testes

Mithilfe des mHBT gelingt es sowohl die kognitiven als auch die motorischen Leistungen der Versuchstiere zu erfassen. Die mittels des mHBT erhobenen kognitiven Parameter lassen darüber hinaus Rückschlüsse auf die Funktion des deklarativen Gedächtnisses (Hippokampus), des Arbeitsgedächtnisses (präfrontaler Kortex) und auf die Lernleistung der Tiere zu.

1. Kognitive Parameter

Gesamtzeit des Durchlaufes: Die Gesamtzeit eines Durchlaufes (Sekunden) ergibt sich aus der gemessenen Zeitspanne vom Einsetzen in die Versuchsarena bis zum Auffinden und Fressen aller drei Futterbelohnungen. Für die dem Tier zur Verfügung stehende Versuchszeit besteht, unabhängig von der Anzahl der besuchten markierten Löcher, ein Limit von 600 Sekunden (10

Minuten). Das Versuchstier erlernt im Studienverlauf gezielt nur markierte Löcher aufzusuchen, da es nur hier eine Futterbelohnung erhält. Dies wird ihm im Normalfall immer rascher gelingen. Die Zeit, die das Tier insgesamt benötigt um den Test erfolgreich abzuschließen, lässt Rückschlüsse auf dessen Lernleistung und Motivation zu.

Fehler: Besuche von nicht markierten Löchern werden als Fehler gewertet (Anzahl pro Durchlauf) gewertet.

Auslassungsfehler: Sucht das Versuchstier während eines Versuchsdurchlaufes ein markiertes Loch nicht auf, so zählt dies als Auslassungsfehler.

Fehler und Auslassungsfehler lassen wiederum Rückschlüsse auf die Funktion des deklarativen Gedächtnisses (Kurzzeitgedächtnis) der Tiere zu. Diese Gedächtnisform umfasst bewusste Erinnerungen an Fakten und Ereignisse.

Wiederholungsfehler: Das erneute Aufsuchen eines durch das Tier bereits geleerten Loches wird innerhalb eines Versuchsdurchlaufs als Wiederholungsfehler gerechnet. Das Tier muss sich folglich daran erinnern, welches Loch während eines Versuchsdurchlaufes bereits von ihm aufgesucht wurde. So kann die Leistungsfähigkeit des Arbeitsgedächtnisses als Abruf zeitlich begrenzt gespeicherter Informationen des Tieres beurteilt werden.

Gedächtnissystem	Neurologisches Korrelat	Kognitiver Parameter
Lernleistung		Gesamtzeit des Durchlaufes
deklaratives Gedächtnis	Hippokampus	Fehler und Auslassungsfehler
Arbeitsgedächtnis	präfrontaler Kortex	Wiederholungsfehler

Tabelle 4 Kognitive Parameter im modifizierten Hole-Board-Test

2. Verhaltensparameter

Mit dem mHBT lässt sich eine Vielzahl verschiedener Verhaltensparameter erfassen, die sich auf unterschiedliche Verhaltensdimensionen beziehen, welche sich zum Teil auch gegenseitig überschneiden.

Angstverhalten: Angst spiegelt sich in der *Zahl der Hole-Board-Besuche* (Anzahl pro Durchlauf), der *Zeit die vergeht bis das Board erstmalig betreten wird* (Sekunden) und in der *insgesamt auf dem Bord verbrachten Zeit* bezogen auf die Gesamtzeit pro Durchlauf (%), wieder. Auch in der Dauer der *Immobilität* bezogen auf die Gesamtzeit pro Durchlauf (%) kann sich Angstverhalten ausdrücken. Gleichzeitig kann diese Dimension ganz allgemein auch Hinweise auf das Allgemeinbefinden des Tieres und seine Lokomotionsfähigkeit liefern.

Explorationsverhalten: Die *Gesamtzahl* aller durch das Versuchstier *besuchten Löcher* (Anzahl pro Durchlauf) und die *Zeit die vergeht bis das erste Loch aufgesucht wird* (Sekunden) sind Ausdruck des gerichteten Erkundungsverhalten. Ein *Aufrichten* des Tieres auf seine Hinterbeine (Anzahl pro Durchlauf) wird als ungerichtete Exploration gewertet. All diese Parameter haben auch eine Aussagekraft bezüglich motivationaler Verhaltensanteile der Tiere.

Sozialverhalten: Die soziale Affinität der Tiere drückt sich durch die Länge der Zeitspanne (%) aus, welche die Ratte während eines Durchlaufs dafür aufwendet durch die Löcher der Trennwand *Kontakt zu seinen Artgenossen* zu suchen.

Bewegungsaktivität: Diese Verhaltensdimension zeigt sich in der Anzahl der *Linienüberquerungen* (pro Minute) der Tiere.

Erregung: Der Erregungsgrad eines Versuchstieres wird beurteilt anhand *Kotabsatz* (Anzahl pro Durchlauf) und die Länge der Zeit während der die Ratte mit *Fellpflege* (%) beschäftigt ist.

3. Feinmotorische Parameter

Eine Beurteilung der Feinmotorik gelingt über die *Fresszeit* (Sekunden), welche die Ratte benötigt, um eine gefundene Futterbelohnung zu fressen, und anhand der *Zahl der vergeblischen Lochbesuche* (Anzahl pro Durchlauf) durch das Tier. Die Ratte sucht dabei ein markiertes Loch auf, es gelingt ihr jedoch nicht die Futterbelohnung zu erlangen. Hierfür muss das Tier mit einer Vorderpfote den Deckel über dem Loch gegen den leichten Widerstand des

Verschlussmechanismus offen halten, um mit der anderen Pfote und/oder seiner Schnauze an die Puffreiskugel zu kommen. Dieser relativ komplexe Bewegungsablauf setzt eine intakte Feinmotorik voraus.

Verhaltensdimension	Verhaltensparameter
Angst	Zahl der HB-Besuche Zeit bis zum erstmaligen betreten des HB Gesamtzeit auf dem HB Immobilität
Exploration	Gesamtzahl aller Lochbesuche Zeit bis zum ersten Lochbesuch (gerichtet) Aufsetzen (ungerichtet)
Soziale Affinität	Kontaktaufnahme mit der Gruppe
Bewegungsaktivität	Anzahl der Linienüberquerungen
Erregung	Kotabsatz Fellpflege
Feinmotorik	Fresszeit Zahl der frustranen Lochbesuche

Tabelle 5 Verhaltensparameter im modifizierten Hole Board Test

2.6 Histologische Untersuchungen

Gehirnentnahme

Entsprechend der im Versuchsplan vorgesehenen Überlebenszeit erfolgt die native Gehirnentnahme *in toto* am siebten bzw. 21 Tag, nach Abschluss der neurologischen und neurokognitiven Untersuchungen, in tiefer Isoflurannarkose mittels Dekapitation der Tiere. Das gewonnene Präparat wird in einen vorbereiteten Aluminiumzylinder gebracht, mit einem gewebsschützenden Einfriermedium (Tissue Tec, Fa. Leica Microsystems® GmbH, Nussloch) überschichtet und anschließend durch Eintauchen des Probenzylinders in ein auf Trockeneis gelagertes und mit flüssigem Methylbutan (2-Methylbutane, Aldrich, Milwaukee, USA) gefülltes Gefäß binnen weniger Minuten durchgefroren. Bis zu ihrer weiteren Aufbereitung werden die Gehirne nun bei -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

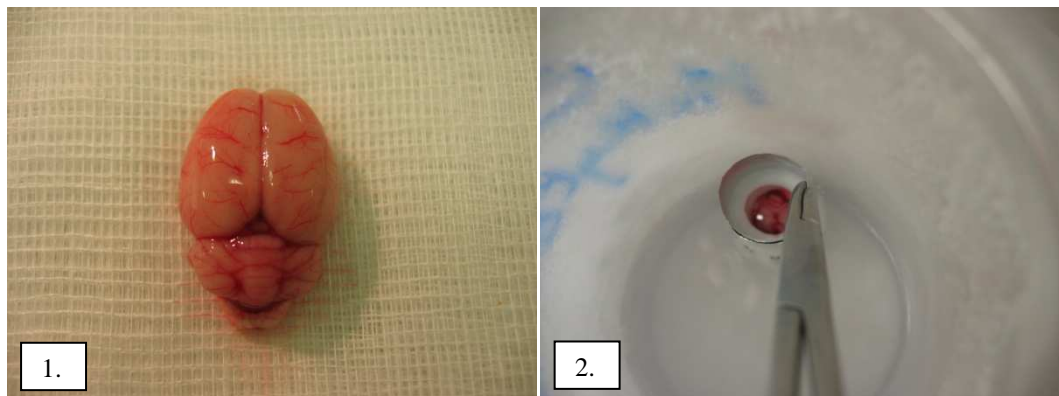


Abbildung 29 (1.) Präparat unmittelbar nach Entnahme und während des (2.) Gefriervorgangs (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)

Herstellung der Schnittpräparate

Die Gehirnschnitte werden mit einem Kryotom (Microtom-Kryostat, HM 500 QM, Fa. Microtom GmbH, Walldorf) angefertigt. Vor dem eigentlichen Schneiden wird dazu die Probe aus dem Aluminiumzylinder entnommen, das Einfriermedium entfernt, das Gehirn auf einem Objektisch aufgefroren und anschließend in den Objektischhalter des Kryotoms (Kammertemperatur -24°C) eingespannt. Nach der Äquilibrationszeit von 30 Minuten

(Probentemperatur ca. -20°C) werden von rostral beginnend Scheiben des Gehirns abgehobelt (Trimm-Schnitte ca. $80\ \mu\text{m}$ dick), um die Ausrichtung des Gewebelockes zum Messer zu kontrollieren und gegebenenfalls anzupassen. Ziel ist die Schnittebene 33 (Bregma $-3,3\ \text{mm}$) [PAXINOS et al. 1998]. In dieser Ebene werden 12 Schnitte à $7\ \mu\text{m}$ angefertigt und paarweise auf einen Superfrost-Objektträger (SuperFrost[®] Plus, Fa. Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig) aufgenommen. Die so gewonnenen Schnittpräparate werden in entsprechenden Objektträgerkästen zur weiteren Verarbeitung bei $-80\ ^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das verbleibende Hirnpräparat wird kryoasserviert um für mögliche zukünftige Nachuntersuchungen zur Verfügung zu stehen.

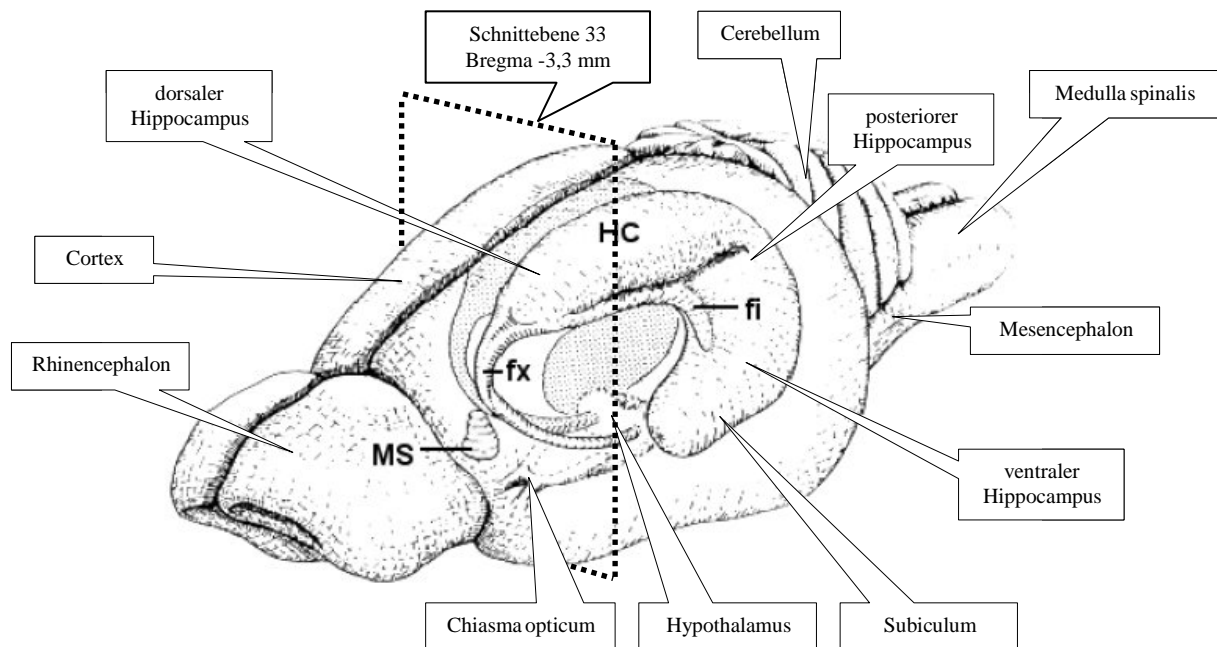


Abbildung 30 Schematische Darstellung eines Rattenhirns [modifiziert nach AMARAL et al. 1998]

2.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Durch die H.E.-Färbung kann eine mögliche Eosinophilie des Zellplasmas im Schnittpräparat sichtbar gemacht werden. Diese ist Ausdruck einer Stoffwechsellumstellung geschädigter Zellen auf die anaerobe Glykolyse in deren Folge vermehrt Laktat als saure Valenz gebildet und dann durch das Eosin rot angefärbt werden kann.

Die Färbung der Gefrierschnitte mit H.E. erfolgt nach einem Standardprotokoll [ROMEIS 2010].

Histologische Auswertung

Die H.E. gefärbten Gehirnschnitte werden von einem bezüglich der Versuchsgruppen geblindeten Untersucher lichtmikroskopisch ausgewertet. Dabei geht von den beiden Schnitten auf dem Objektträger nur der qualitativ hochwertigere in die Auswertung ein. Sämtliche eosinophil angefärbten Zellen des Hippokampus werden in diesem Gehirnschnitt nun seitengetreunt und jeweils entsprechend ihrer anatomischen Lage (CA1-, CA2-, CA3-, CA4-Region des Hippokampus, unterer und oberer Ast des Gyrus dentatus) visuell ausgewertet und die geschädigte Neuronen (eosinophil oder pyknotisch, sogenannte „dark neurons“) ausgezählt.

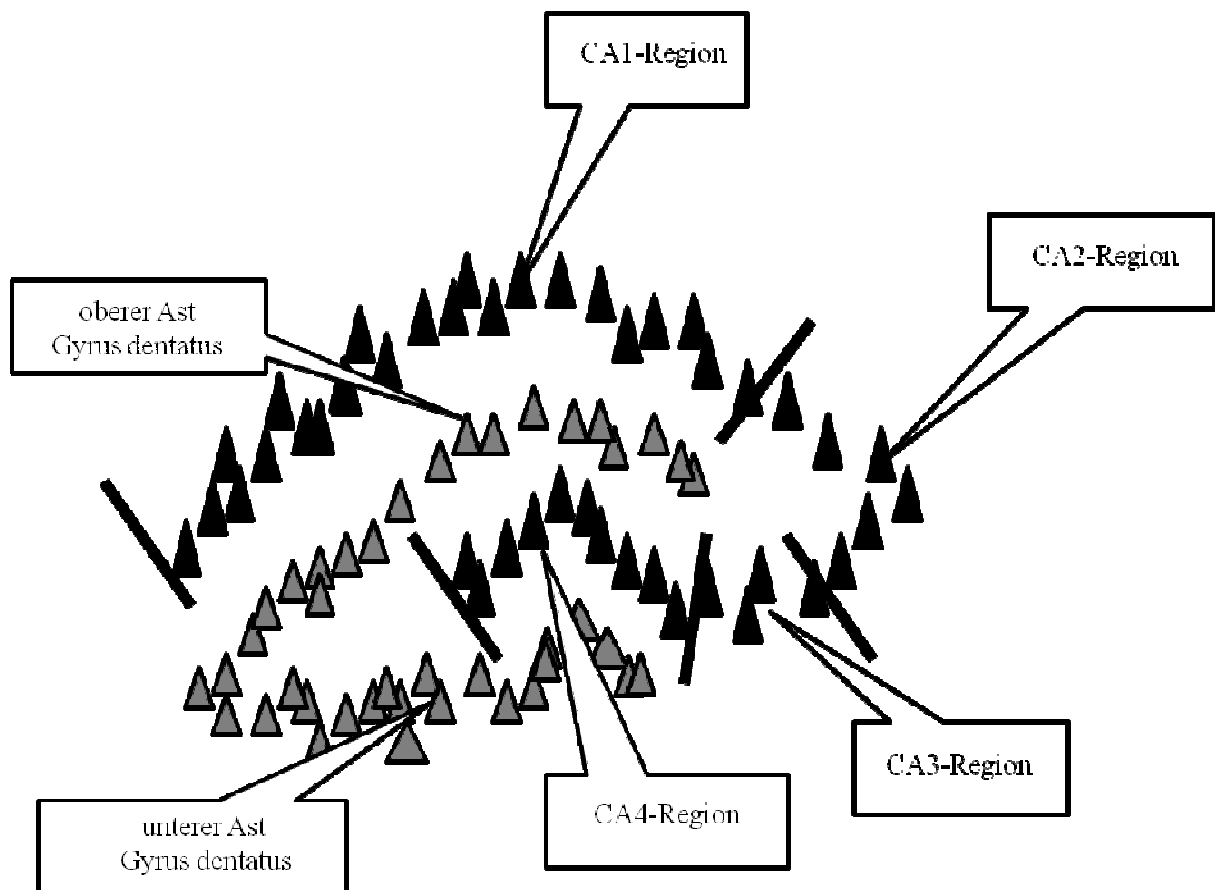


Abbildung 31 Schematischer Aufbau des rechten Hippokampus (CA1-, CA2-, CA3-, CA4-Region, unterer und oberer Ast des Gyrus dentatus)

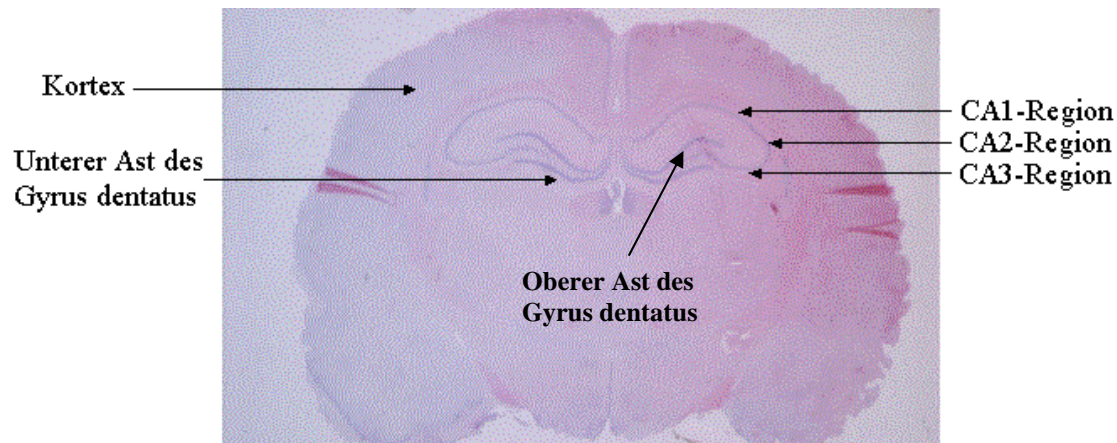


Abbildung 32 Koronarschnitt eines Rattengehirns (Höhe Bregma -3,3 mm) (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar, München)

2.6.2 Immunhistochemische Färbungen

2.6.2.1 Doppelfärbung NFκB

Da man nach einer einfachen immunhistochemischen Doppelfärbung auf NFκB nicht mit Sicherheit sagen kann, ob es sich bei der detektierten Zelle tatsächlich um ein Neuron und nicht etwa eine Gliazelle handelt, verwendet man zusätzlich zu dem ersten Primär-Antikörper gegen NFκB einen zweiten Antikörper gegen ein rein neuronales Strukturprotein (NeuN). Durch Enzymsysteme und Farbstoffe wird letztlich eine eindeutige lichtmikroskopische Unterscheidung möglich. Die Neurone erscheinen rot, NFκB färbt sich braun an.

Färbeprotokoll zur immunhistochemischen Doppelfärbung auf NFκB

1. Fixierung der Gefrierschnitte bei Raumtemperatur in Paraformaldehyd 4 % ⁽¹⁾ (5 min)
2. Waschen der Schnittpräparate mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (5 min)
3. Blockierung der endogenen Peroxidase des Präparates mit 3%-H₂O₂-Methanol-Lösung (10 min)
4. Waschen der Schnittpräparate mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
5. Blockierung durch Auftragung (40 µl/Präparat) einer serumfreien Blockierungs-Lösung ⁽³⁾ nach inerter Fettstiftumrandung des Präparates
6. Inkubation in der feuchten Kammer (20 min)

7. Auftragen des 1. Primär-Antikörpers ⁽⁴⁾ (80 µl) aus Kaninchenserum gegen NFκB, verdünnt (1:500) mit serumfreien Blockierungslösung ⁽³⁾
8. Inkubation in der feuchten Kammer (60 Minuten)
9. Waschen der Schnittpräparate mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
10. Aufbringen des mit Biotin konjugierten 1. Sekundärantikörper ⁽⁵⁾ (80 µl) gegen das Kaninchen-Antigen des 1. Primär-Antikörpers, verdünnt (1:100) mit serumfreien Blockierungslösung ⁽³⁾
11. Inkubation in der feuchten Kammer (45 Minuten)
12. Waschen der Schnittpräparate mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
13. Aufbringen von Horseradish Peroxidase konjugiertem Streptavidin ⁽⁶⁾ (3 Tropfen)
14. Inkubation (30 Minuten)
15. Waschen der Schnittpräparate mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
16. Zugabe des Farbstoffes Diaminobenzidin ⁽⁷⁾ und Umsetzung durch die Peroxidase in ein unlösliches braunes Farbstoffprodukt während der Inkubation in der feuchten Kammer (10 min)
17. Waschvorgang mit destilliertem Wasser (3 min)
18. Aufbringen des verdünnten (1:1000) 2. Primär-Antikörper ⁽⁸⁾ (100 µl) gegen NeuN
19. Inkubation (60 Minuten)
20. Waschen mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
21. Zugabe des verdünnten (1:200) biotinylierten anti-mouse Sekundär-Antikörpers ⁽⁹⁾ (100 µl)
22. Inkubation (45 Minuten)
23. Waschen mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
24. Zugabe (100 µl) verdünnter (1:200) alkalische Phosphatase konjugiertes Streptavidin ⁽¹⁰⁾
25. Inkubation (30 Minuten)
26. Waschen mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
27. Aufbringen des roten Farbstoffes Vector Red ⁽¹¹⁾
28. Inkubation (30 Minuten)
29. Waschen mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
30. Abwaschen der Präparate unter Leitungswasser
31. Eindecken

⁽¹⁾ PFA, eigene Herstellung

⁽²⁾ PBS, eigene Herstellung

- (2) DAKO: serum-free protein block; Fa. DakoCytomation, Denmark A/S, Glostrup, Denmark
- (4) NFκB phospho S276 antibody rabbit polyclonal to NFκB p65, BIOZOL, Eching
- (5) ECL Anti-rabbit IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
- (6) R.T.U. Horseradish Peroxidase Streptavidin, VECTOR Laboratories, Inc. California, USA
- (7) Diaminobenzidin, Fa. DAKO, Hamburg
- (8) Mouse anti-neuronal nuclei (NeuN) Monoclonal antibody; CHEMICON International Inc., Temecula, California, USA
- (9) ECL Anti-mouse IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody; Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
- (10) Alkaline Phosphatase Streptavidin; VECTOR Laboratories, Inc., California, USA
- (11) Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I; VECTOR Laboratories, Inc., California, USA



Neurone (rot) mit darin
angefärbtem NFκB (braun)

Abbildung 33 Immunhistochemische Doppelfärbung von NFκB in der CA1-Region des Hippokampus (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar, München)

2.6.2.2 Doppelfärbung COX-2

Analog zur oben beschriebenen immunhistochemischen Doppelfärbung auf NFκB kommt auch bei der immunhistochemischen Doppelfärbung auf COX-2 zusätzlich zu dem ersten Primär-Antikörper gegen COX-2 eine zweiter Antikörper gegen das neuronale Strukturprotein NeuN zum Einsatz. Neurone werden lichtmikroskopisch rot erscheinen, COX-2 exprimierende braun angefärbt.

Färbeprotokoll zur immunhistochemischen Doppelfärbung auf COX-2

1. Fixierung der Gefrierschnitte bei Raumtemperatur in Paraformaldehyd 4 % ⁽¹⁾ (10 min)
2. Waschen der Schnittpräparate mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (5 min)
3. Blockierung der endogenen Peroxidase des Präparates mit 3%-H₂O₂-Methanol-Lösung (10 min)
4. Waschen der Schnittpräparate mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
5. Blockierung durch Auftragung (80 µl/Präparat) einer serumfreien Blockierungslösung ⁽³⁾ nach inerter Fettstiftumrandung des Präparates
6. Inkubation in der feuchten Kammer (20 min)
7. Auftragen des 1. Primär-Antikörpers ⁽⁴⁾ (80 µl) gegen COX-2 aus Kaninchen-serum, verdünnt (1:300) mit serumfreien Blockierungslösung ⁽³⁾
8. Inkubation in der feuchten Kammer (50 Minuten)
9. Waschen der Schnittpräparate mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
10. Aufbringen des mit Biotin konjugierten 1.Sekundärantikörper ⁽⁵⁾ (80 µl) gegen das Kaninchen-Antigen des 1. Primär-Antikörpers, verdünnt (1:100) mit serumfreien Blockierungslösung ⁽³⁾
11. Inkubation in der feuchten Kammer (45 Minuten)
12. Waschen der Schnittpräparate mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
13. Aufbringen von Horseradish Peroxidase konjugiertes Streptavidin ⁽⁶⁾ (4 Tropfen)
14. Inkubation (30 Minuten)
15. Waschen der Schnittpräparate mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
16. Zugabe des Farbstoffes Diaminobenzidin ⁽⁷⁾ und Umsetzung durch die Peroxidase in ein unlösliches braunes Farbstoffprodukt während der Inkubation in der feuchten Kammer (10 min)
17. Waschvorgang mit destilliertem Wasser (3 min)
18. Aufbringen des verdünnten (1:1000) 2. Primär-Antikörper ⁽⁸⁾ (150 µl) gegen NeuN
19. Inkubation (50 Minuten)
20. Waschen mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
21. Zugabe des verdünnten (1:100) biotinylierten anti-mouse Sekundär-Antikörpers ⁽⁹⁾ (150 µl)
22. Inkubation (45 Minuten)
23. Waschen mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)

24. Zugabe (150 µl) verdünnter (1:200) alkalische Phosphatase konjugiertem Streptavidin ⁽¹⁰⁾
25. Inkubation (30 Minuten)
26. Waschen mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
27. Aufbringen des roten Farbstoffes Vector Red ⁽¹¹⁾
28. Inkubation (30 Minuten)
29. Waschen mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
30. Abwaschen der Präparate unter Leitungswasser
31. Eindecken

⁽¹⁾ PFA, eigene Herstellung

⁽²⁾ PBS, eigene Herstellung

⁽²⁾ DAKO: serum-free protein block; Fa. DakoCytomation, Denmark A/S, Glostrup, Denmark

⁽⁴⁾ COX2 [murine] Polyclonal Antibody; Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA

⁽⁵⁾ Vector Cat. S. 39; Cat# BA-1000; VECTOR Laboratories, Inc. California, USA

⁽⁶⁾ Vector Cat. S. 66; Cat# SA-5004 = concentrate bzw. als ready-to use solution Cat.# SA-5704; VECTOR Laboratories, Inc. California, USA

⁽⁷⁾ Diaminobenzidin, Fa. DAKO, Hamburg

⁽⁸⁾ Mouse anti-neuronal nuclei (NeuN) Monoclonal antibody; CHEMICON International Inc., Temecula, California, USA

⁽⁹⁾ Vector Cat. S. 39; Cat# BA-2001; VECTOR Laboratories Inc., California, USA

⁽¹⁰⁾ Alkaline Phosphatase Streptavidin; VECTOR Laboratories, Inc., California, USA

⁽¹¹⁾ Vector[®] Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I; VECTOR Laboratories, Inc., California, USA

2.6.2.3 Doppelfärbung TNF- α

Analog zu den oben beschriebenen immunhistochemischen Doppelfärbungen kommt auch bei der Doppelfärbung auf TNF- α erneut zusätzlich zu dem ersten Primär-Antikörper gegen TNF- α ein zweiter Antikörper gegen das neuronale Strukturprotein NeuN zum Einsatz. Neurone werden lichtmikroskopisch rot, TNF- α exprimierende braun erscheinen.

Färbeprotokoll zur immunhistochemischen Doppelfärbung auf TNF- α

1. Fixierung der Gefrierschnitte bei Raumtemperatur in Paraformaldehyd 4 % ⁽¹⁾ (5 min)
2. Waschen der Schnittpräparate mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (5 min)
3. Blockierung der endogenen Peroxidase des Präparates mit 3%-H₂O₂-Methanol-Lösung (10 min)
4. Waschen der Schnittpräparate mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
5. Blockierung durch Auftragung (40 μ l/Präparat) einer serumfreien Blockierungslösung ⁽³⁾ nach inerter Fettstiftumrandung des Präparates
6. Inkubation in der feuchten Kammer (20 min)
7. Auftragen des 1. Primär-Antikörpers ⁽⁴⁾ (40 μ l) aus Kaninchenserum gegen TNF- α , verdünnt (1:500) mit serumfreien Blockierungslösung ⁽³⁾
8. Inkubation in der feuchten Kammer (50 Minuten)
9. Waschen der Schnittpräparate mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
10. Aufbringen des mit Biotin konjugierten 1.Sekundärantikörper ⁽⁵⁾ (40 μ l) gegen das Kaninchen-Antigen des 1. Primär-Antikörpers, verdünnt (1:200) mit serumfreien Blockierungslösung ⁽³⁾
11. Inkubation in der feuchten Kammer (45 Minuten)
12. Waschen der Schnittpräparate mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
13. Aufbringen von Horseradish Peroxidase konjugiertes Streptavidin ⁽⁶⁾ (3 Tropfen)
14. Inkubation (30 Minuten)
15. Waschen der Schnittpräparate mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
16. Zugabe des Farbstoffes Diaminobenzidin ⁽⁷⁾ und Umsetzung durch die Peroxidase in ein unlösliches braunes Farbstoffprodukt während der Inkubation in der feuchten Kammer (20 min)
17. Waschvorgang mit destilliertem Wasser (3 min)
18. Aufbringen des verdünnten (1:1000) 2. Primär-Antikörper ⁽⁸⁾ (40 μ l) gegen NeuN
19. Inkubation (50 Minuten)
20. Waschen mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
21. Zugabe des verdünnten (1:100) biotinylierten anti-mouse Sekundär-Antikörpers ⁽⁹⁾ (40 μ l)
22. Inkubation (45 Minuten)
23. Waschen mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)

24. Zugabe (150 µl) verdünnter (1:200) alkalische Phosphatase konjugiertem Streptavidin ⁽¹⁰⁾
25. Inkubation (30 Minuten)
26. Waschen mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
27. Aufbringen des roten Farbstoffes Vector Red ⁽¹¹⁾
28. Inkubation (30 Minuten)
29. Waschen mit gepuffertem Natriumphosphat ⁽²⁾ (2 x 3 min)
30. Abwaschen der Präparate unter Leitungswasser
31. Eindecken

⁽¹⁾ PFA, eigene Herstellung

⁽²⁾ PBS, eigene Herstellung

⁽²⁾ DAKO: serum-free protein block; Fa. DakoCytomation, Denmark A/S, Glostrup, Denmark

⁽⁴⁾ rabbit anti-rattumor necrosis factor-alpha; Acris Antibodies GmbH, Herford

⁽⁵⁾ ECL Anti-rabbit IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

⁽⁶⁾ R.T.U. Horseradish Peroxidase Streptavidin, VECTOR Laboratories, Inc. California, USA

⁽⁷⁾ Diaminobenzidin, Fa. DAKO, Hamburg

⁽⁸⁾ Mouse anti-neuronal nuclei (NeuN) Monoclonal antibody; CHEMICON International Inc., Temecula, California, USA

⁽⁹⁾ Vector Cat. S. 39; Cat# BA-2001, VECTOR Laboratories, Inc., California, USA

⁽¹⁰⁾ Vector Cat. S.66; Cat# SA-5100; VECTOR Laboratories Inc., California, USA

⁽¹¹⁾ Vector[®] Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I; VECTOR Laboratories, Inc., California, USA

Tabelle 6 Immunhistochemische Doppelfärbung – Verwendete Antikörper

„braun“	NFκB	COX-2	TNF-α
1. Primärantikörper	NFκB phospho S276 antibody rabbit polyclonal to NFκB p65 ⁽¹⁾	COX2 [murine] Polyclonal Antibody ⁽⁴⁾	rabbit anti-rattumor necrosis factor-alpha ⁽⁶⁾
1. Sekundärantikörper	ECL Anti-rabbit IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody ⁽²⁾	Vector Cat. S. 39; Cat# BA-1000 ⁽⁵⁾	ECL Anti-rabbit IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody ⁽²⁾
„rot“	NeuN		
2. Primärantikörper	Mouse anti-neuronal nuclei (NeuN) Monoclonal antibody ⁽³⁾		
2. Sekundärantikörper	ECL Anti-mouse IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody ⁽²⁾	Vector Cat. S. 39; Cat# BA-2001 ⁽⁵⁾	

⁽¹⁾ BIOZOL, Eching ⁽²⁾ Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg ⁽³⁾ CHEMICON International Inc., Temecula, California, USA ⁽⁴⁾ Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA ⁽⁵⁾ VECTOR Laboratories, Inc. California, USA ⁽⁶⁾ Acris Antibodies GmbH, Herford

2.7 Statistik

Die physiologischen, neurologischen, kognitiven und das Verhalten betreffende Parameter werden mit hierarchisch gegliederten allgemeinen linearen Modellen (Zwei-Wege-Varianzanalyse) analysiert. Alle Parameter der Kognition und des Verhaltens, die man durch den mHBT erfasst, werden im Hinblick auf den zeitlichen Einfluss in einem linearen Modell (Zeit) untersucht. Alle Werte werden posthoc mit einer univariaten Varianzanalyse und gegebenenfalls mit einem Bonferroni t-Test untersucht. Die physiologischen Parameter (intraoperative Parameter, Körpergewicht) werden zu jedem Zeitpunkt posthoc analysiert, weil sie unter Umständen Einfluss auf die Leistungen der Tiere haben, während die neurologischen Werte nur am letzten Tag der Untersuchung (Tag 21) einer Posthoc-Analyse mit t-Test unterzogen werden, da vor allem ein langfristig verbleibender neurologischer Schaden von Bedeutung ist. Die histologischen Ergebnisse werden mit Hilfe einer Ein-Wege-Varianzanalyse und posthoc gegebenenfalls mit einem Bonferroni t-Test untersucht.

Signifikanzen bestehen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$. Zur Berechnung der statistischen Ergebnisse dient das PC-Programm SPSS[®] 16 (Copyright[©] SPSS Inc., an IBM Company Headquarters Chicago, Illinois, USA).

3. Ergebnisse

Die vorliegende Studie wurde an insgesamt 69 Ratten durchgeführt. In die Datenanalyse eingeschlossen werden konnten letztlich 50 Tiere. 19 Tiere mussten entsprechend zuvor festgelegter Ausschlusskriterien unberücksichtigt bleiben. 15 Tieren der BCAO-Gruppe mussten während der ersten postoperativen Tage aufgrund neurologischer Ausfallserscheinungen (z.B. therapieresistente zerebrale Krampfanfälle) getötet werden. Vier Tiere (drei aus der BCAO und eines aus der Shamgruppe) fielen aufgrund technischer Probleme während der OP aus. Um die angestrebte Gruppengröße von zehn Tieren zu erreichen, wurden die ausgefallenen Ratten ersetzt.

3.1 Physiologische Parameter des operativen Versuchsabschnittes

Während der operativen Phase wurden an drei festgelegten Zeitpunkten (Baseline nach Abschluss der Präparation 10 Minuten vor der Ischämie und 10 beziehungsweise 60 Minuten nach der Ischämie) arterielle Blutproben entnommen und verschiedene Messparameter zur Überwachung der Vitalfunktionen bestimmt.

Die **Körpertemperatur** (rektal und perikraniell) wurde kontrolliert im zuvor definierten Normbereich ($37,5 \pm 0,2$ °C) konstant gehalten (s. 2.3.1) und deshalb auch statistisch nicht analysiert.

Der **mittlere arterielle Blutdruck** (MAP) lag in allen Versuchsgruppen zehn Minuten vor der Ischämie auf einem einheitlichen Niveau (Baseline). Zehn Minuten nach der Ischämie stieg er nur bei den BCAO-Gruppen signifikant ($p < 0,05$) an. Eine Stunde nach der Ischämie zeigte sich bei allen Versuchstiergruppen ein Abfall des Blutdrucks, der signifikant ($p < 0,05$) gegenüber dem Ausgangswert war.

Gruppe	Baseline			10 min nach B CAO			60 min nach B CAO		
BCAO ₂₁	89	±	4	114	±	6*	76	±	3*
Sham ₂₁	86	±	5	87	±	5	75	±	4*
BCAO ₇	94	±	4	108	±	5*	73	±	3*
Sham ₇	99	±	4	94	±	5	81	±	2*

Tabelle 7 Physiologische Parameter: MAP (mmHg) (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Baseline)

Die **Blutglukosekonzentration** (mg/dl) lag zu Beginn der Untersuchung in allen Versuchsgruppen innerhalb des definierten Normalbereichs (MW = 146,3 mg/dl) [CHARLES RIVER 2006]. Im Versuchsverlauf stieg sie nur innerhalb der B CAO-Gruppen unmittelbar nach der Ischämie signifikant (p < 0,05) an. In der letzten Messung näherten sich die Werte wieder dem Normalbereich an.

Gruppe	Baseline			10 min nach B CAO			60 min nach B CAO		
BCAO ₂₁	144	±	5	185	±	7*	147	±	6
Sham ₂₁	140	±	6	146	±	9	140	±	6
BCAO ₇	146	±	8	175	±	12*	156	±	11
Sham ₇	137	±	8	135	±	7	148	±	12

Tabelle 8 Physiologische Parameter: Glukose (mg/dl) (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Baseline)

Blutgasanalyse

Es wurden arterielle Messungen des pH-Wertes, des Kohlendioxidpartialdrucks (paCO₂), des Sauerstoffpartialdrucks (paO₂), des Gesamthämoglobins (Hb) und des Hämatokrit (Hkt) vorgenommen. Sauerstoffsättigung (SaO₂), Basenüberschuss (BE) und Bicarbonatkonzentration (HCO₃⁻) wurden automatisch berechnet (s. 3.3.1 automatisierter pH/Blutgasanalyzer Rapidlab[®] 860). Dargestellt werden im Folgenden nur die Ergebnisse der Messungen des paCO₂, des paO₂ und des Hb. Der pH-Wert wurde gemäß Versuchsprotokoll kontrolliert und deshalb auch statistisch nicht analysiert.

Der **Kohlendioxidpartialdruck** (paCO₂) lag zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung bei allen Versuchsgruppen auf einem konstant einheitlichen Niveau.

Gruppe	Baseline	10 min nach BCAA	60 min nach BCAA
BCAO₂₁	35 ± 1	34 ± 0	35 ± 1
Sham₂₁	34 ± 1	35 ± 1	34 ± 1
BCAO₇	35 ± 1	33 ± 1	36 ± 1
Sham₇	35 ± 1	36 ± 1	35 ± 1

Tabelle 9 Physiologische Parameter: paCO₂ (mmHg) (MW ± SEM)

Im Verlauf stieg der arterielle **Sauerstoffpartialdruck** (paO₂) zwar bei allen Versuchsgruppen an, jedoch ergab sich nur in der BCAA₂₁-Gruppe 10 Minuten nach der Ischämie eine Signifikanz (p < 0,05).

Gruppe	Baseline	10 min nach BCAA	60 min nach BCAA
BCAO₂₁	152 ± 6	179 ± 9*	169 ± 5
Sham₂₁	152 ± 8	146 ± 6	160 ± 8
BCAO₇	159 ± 15	162 ± 13	164 ± 11
Sham₇	156 ± 8	155 ± 7	154 ± 5

Tabelle 10 Physiologische Parameter: pO₂ (mmHg) (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Baseline)

Die Mittelwerte der **Hämoglobinkonzentration** (Hb) lagen bei Untersuchungsbeginn in allen Versuchsgruppen innerhalb des Normalbereichs (MW_{Hb} = 15,07 mg/dl) [CHARLES RIVER 2006] und fielen in allen Versuchstiergruppen signifikant (p < 0,05) vom Ausgangswert bis zum Abschluss der operativen Versuchsphase hin ab.

Gruppe	Baseline	10 min nach B CAO	60 min nach B CAO
BCAO₂₁	14,6 ± 0,2	13,7 ± 0,3*	13,2 ± 0,3*
Sham₂₁	13,8 ± 0,2	13,2 ± 0,2*	12,6 ± 0,2*
BCAO₇	14,4 ± 0,3	13,8 ± 0,3*	13,2 ± 0,3*
Sham₇	14,4 ± 0,2	13,8 ± 0,2*	13,2 ± 0,2*

Tabelle 11 Physiologische Parameter: Hb (mg/dl) (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Baseline)

Körpergewicht

Alle Tiere verloren innerhalb der ersten beiden Versuchstage an Körpergewicht. Die Nativtiere nahmen anschließend kontinuierlich über den gesamten Untersuchungszeitraum an Gewicht zu. Bei den Tieren der B CAO-Gruppen hingegen setzt sich dieser Gewichtsverlust initial weiter fort. So verloren die Ratten der B CAO 7-Gruppe bis zum dritten, die der B CAO 21-Gruppe bis zum siebten postoperativen Tag kontinuierlich an Gewicht. Dieser Gewichtsverlust ist in der letztgenannten Gruppe signifikant gegenüber den Nativ und Sham-Tieren ($p < 0,05$). Ebenso verloren bis zum dritten postoperativen Tag die Scheinversuchstiere, die keiner ischämischen Schädigung unterzogen worden an Gewicht. Erst am 11. Untersuchungstag erreichen die Ratten der Sham 21-Gruppe wieder einen dem der Nativtiere vergleichbaren Gewichtszuwachs. Die Ratten der B CAO 21-Gruppe hingegen erreichen diesen bis zum Versuchsende nicht.

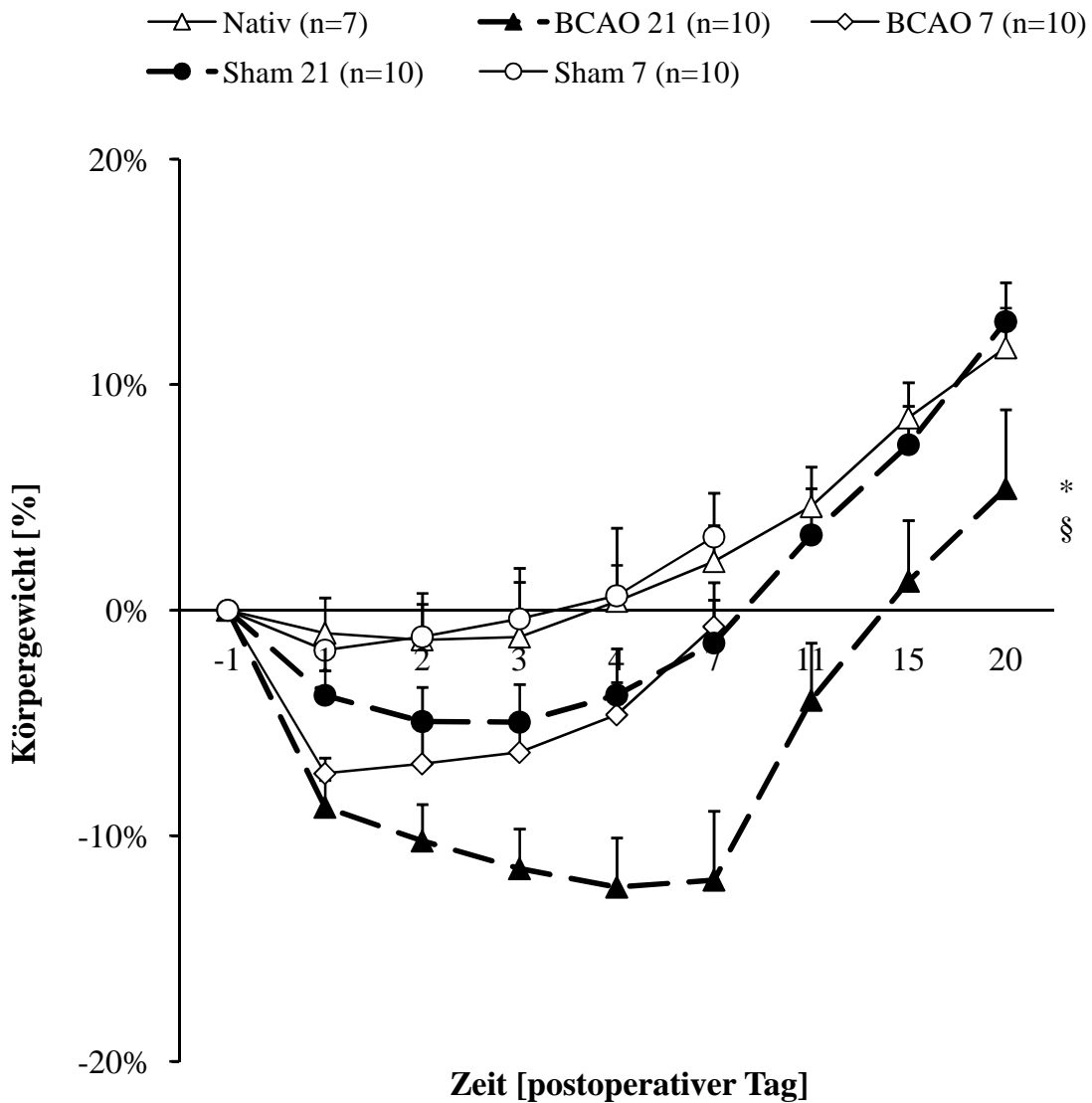


Abbildung 34 Grafische Darstellung des Körpergewichts der Versuchsgruppen (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Nativ / § p < 0,05 versus Sham)

3.2 Neurologische Parameter

Die Ergebnisse der prä- und postoperativen Untersuchungen der BCAA- und Sham-Tiere werden als MW ± SEM grafisch dargestellt.

Die neurologische Untersuchung beinhaltet die Beurteilung des Gleichgewichts- und Koordinationsvermögens sowie des Greif- und Haltevermögens beziehungsweise der Muskelkraft der Tiere. Die Ergebnisse der sensorische Tests (Seh- und Hörvermögen, Vibrissenreaktion, Propriozeption) der Versuchstiere kommen hier nicht zur Darstellung, da keine relevanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auftraten.

Motorik

Koordinationsvermögen und Gleichgewicht

Balken-Geh-Test

Während sich bei den Tieren der Nativ- und Sham-Gruppen (Sham 21/Sham 7) keine wesentlichen Veränderungen der Fehlritte im Versuchsverlauf zeigten, erreichten die Fehlritte der übrigen Versuchsgruppen (BCAO 21/BCAO 7) ihr signifikantes ($p < 0,05$) Maximum am ersten postoperativen Tag. Danach sanken diese Werte wieder ab, um sich nach dem siebten postoperativen Tag denen der übrigen Versuchsgruppen anzugleichen. Zudem fiel ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Fehlritte zwischen den beiden BCAO-Gruppen auf.

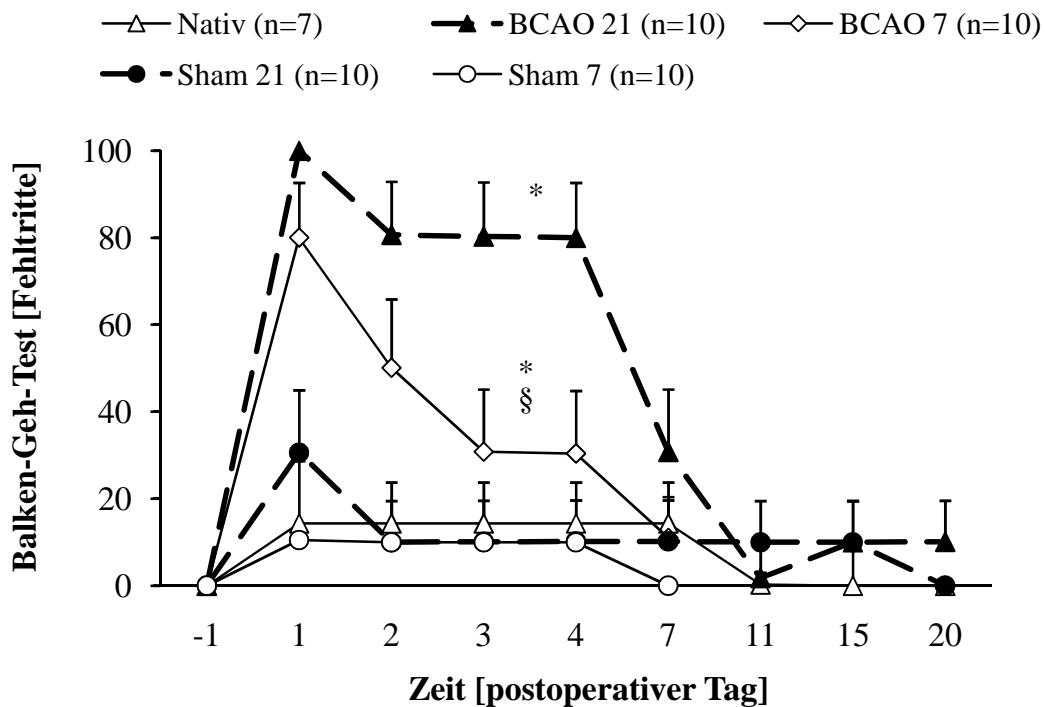


Abbildung 35 Grafische Darstellung der Fehlritte (Anzahl pro Meter) aller Versuchsgruppen im Balken-Geh-Test (MW ± SEM) (* $p < 0,05$ versus Nativ und Sham / § $p < 0,05$ versus BCAO 21)

Balken-Gleichgewichts-Test

Auch im Balken-Gleichgewichtstest zeigten sich bei den Tieren der Nativ- und Sham-Gruppen (Sham 21/Sham 7) keine signifikanten Veränderungen der balancierten Zeit im Versuchsverlauf. Die Tiere der BCAA-Gruppen konnten sich im Vergleich zur Baseline am ersten postoperativen Tag signifikant weniger lange auf dem Balken halten als die Nativ- und Sham-Tiere ($p < 0,05$). Die Gruppe der BCAA 21 – Tiere war dabei signifikant schlechter als die Gruppe der BCAA 7 – Tiere.

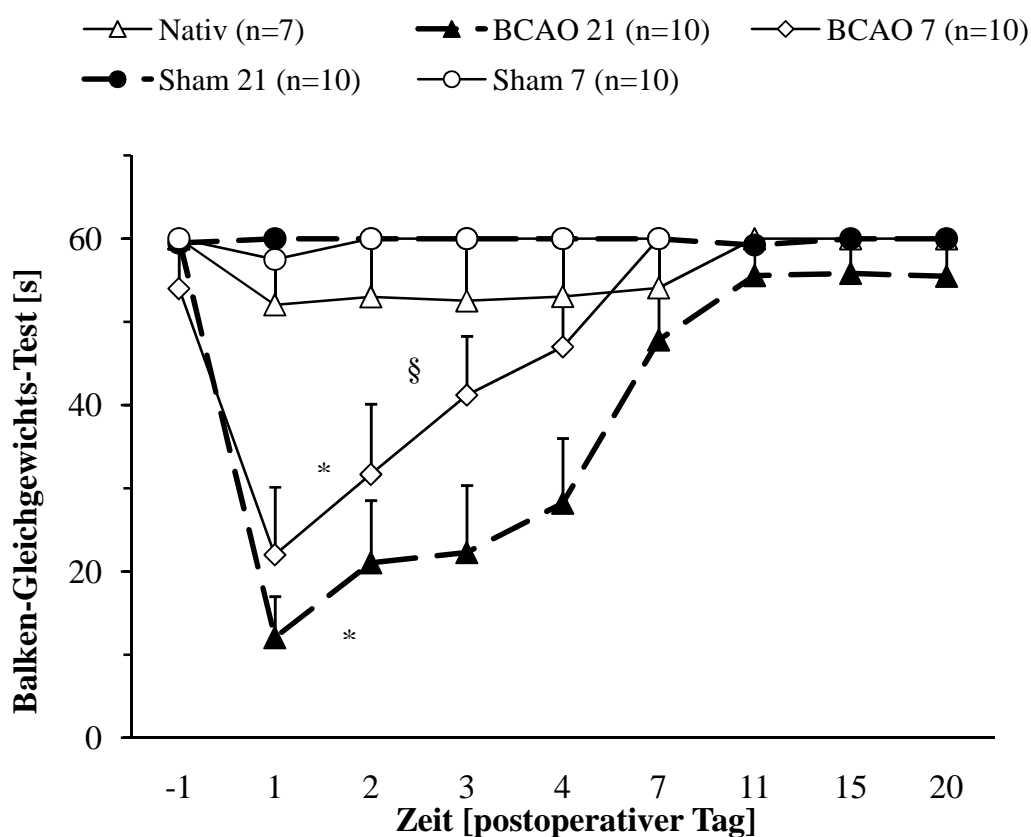


Abbildung 36 Grafische Darstellung der balancierten Zeit (Sekunden) aller Versuchsgruppen im Balken-Gleichgewichts-Test (MW \pm SEM) (* $p < 0,05$ versus Nativ und Sham / § $p < 0,05$ versus BCAA 21)

Greif- und Haltevermögen (Muskelkraft)

Drahtgitter-Test

Die Tiere beider BCAO-Gruppen konnten sich sowohl im Vergleich zur präoperativen Baseline als auch im Vergleich mit der Nativ- und Sham-Gruppe signifikant weniger lange am Drahtgitter festhalten; Die Gruppe BCAO 21 zudem signifikant schlechter als die BCAO 7 – Gruppe ($p < 0,05$).

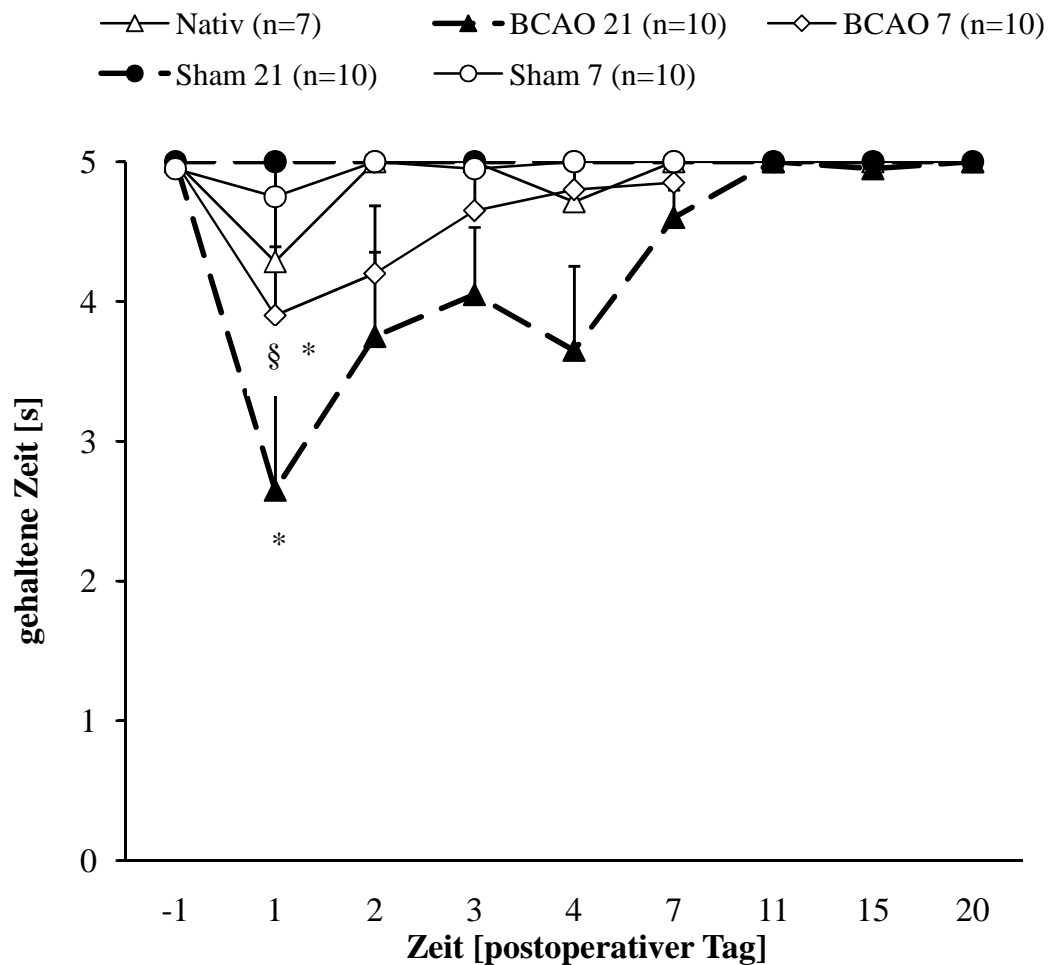


Abbildung 37 Grafische Darstellung der gehaltenen Zeit (Sekunden) aller Versuchsgruppen im Drahtgitter-Test (MW \pm SEM) (* $p < 0,05$ versus Nativ und Sham / § $p < 0,05$ versus BCAO 21)

Greif-Zug-Test

Beide BCAA-Gruppen konnten sich im Vergleich zur Baseline sowie den Nativ- und Sham-Gruppen signifikant weniger lang am Seil festhalten ($p < 0,05$). Dabei bestand erneut ein signifikanter Unterschied zwischen beiden BCAA-Gruppen.

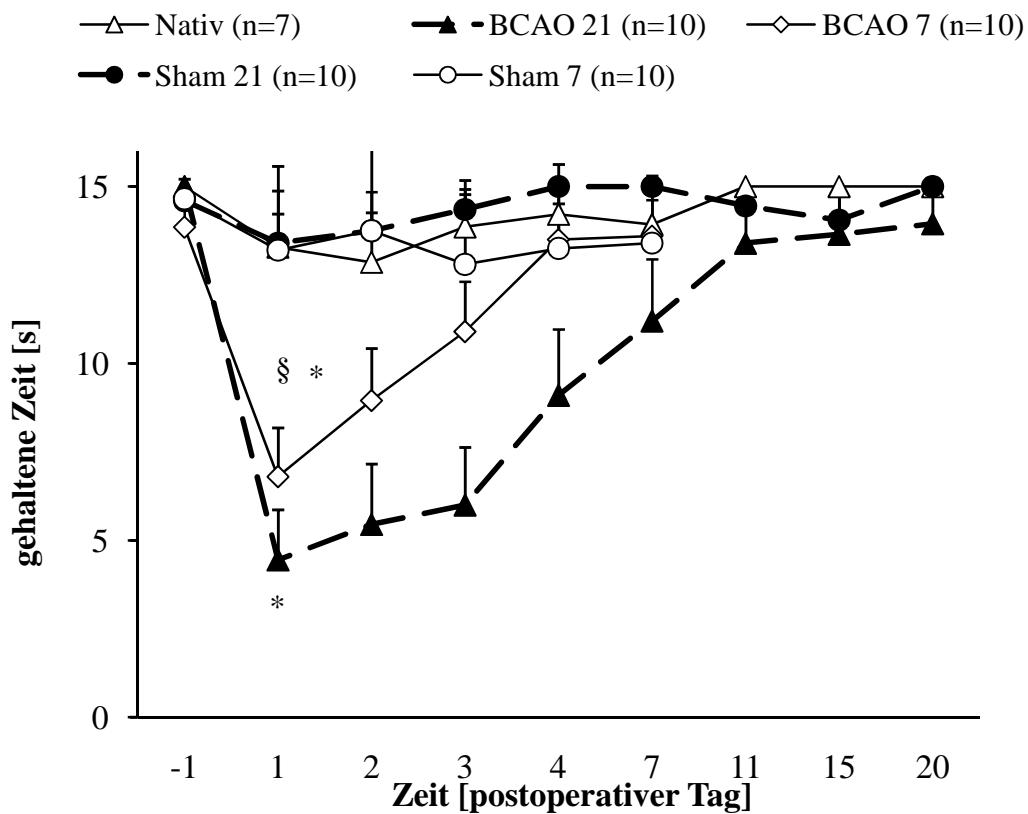


Abbildung 38 Grafische Darstellung der gehaltenen Zeit (Sekunden) aller Versuchsgruppen im Greif-Zug-Test (MW \pm SEM) (* $p < 0,05$ versus Nativ und Sham / § $p < 0,05$ versus BCAA 21)

3.3 Parameter des modifizierten Hole-Board-Test

3.3.1 Kognitive Parameter

Gesamtzeit des Durchlaufes

Die Zeit welche die Tiere der Nativ- und Sham-Gruppe zur Absolvierung des mHBT benötigten, nahm in allen Gruppen während des gesamten Beobachtungszeitraum von 21 Tagen kontinuierlich ab. Zwischen den Nativ- und Sham-Gruppen ergab sich kein Unterschied. Die Tiere der BCAO-Gruppe hingegen benötigten an allen Versuchstagen signifikant ($p < 0,05$) mehr Zeit zum Abschluss des Testes.

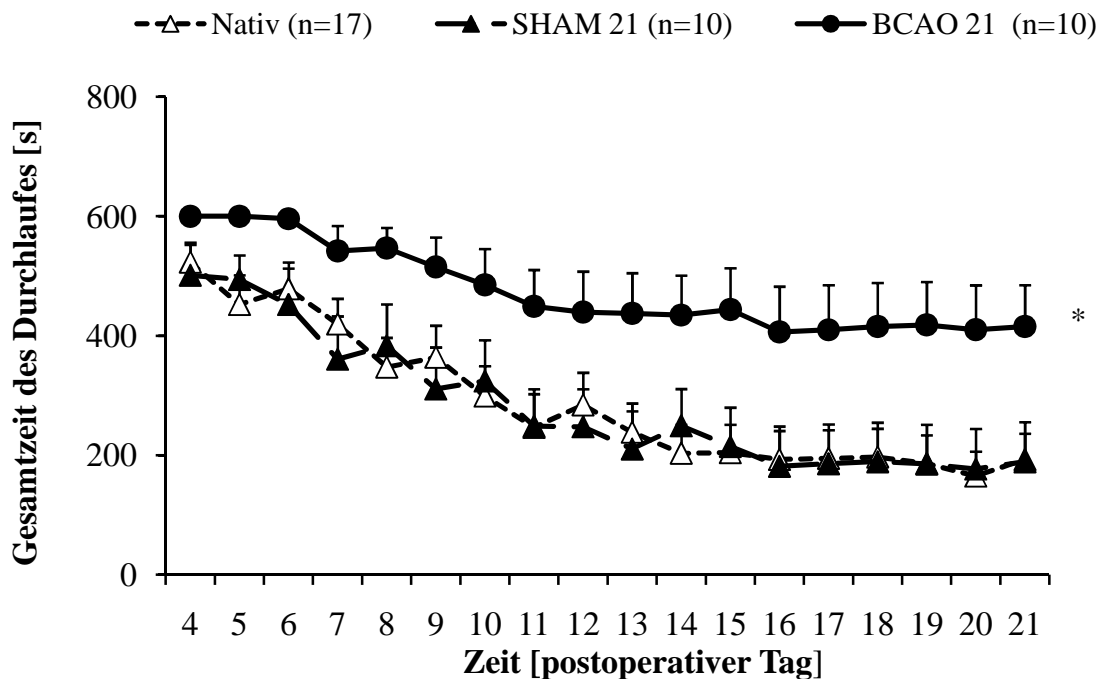


Abbildung 39 Grafische Darstellung der Gesamtzeit eines Testdurchlaufes (Sekunden) der Versuchsgruppen während Beobachtungszeitraumes (MW \pm SEM) (* $p < 0,05$ versus Nativ und Sham)

Auslassungsfehler

Zwischen den Tiere der Nativ- und Sham-Gruppe bestand über den Beobachtungszeitraum von 21 Tagen kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an Auslassungsfehlern. Deren Häufigkeit nahm mit zunehmender Versuchsdauer ab. Die Tiere der BCAO-Gruppe hingegen zeigten während des Beobachtungszeitraumes im Vergleich zu den Nativ- und Sham-Gruppen signifikant ($p < 0,05$) mehr Auslassungsfehler.

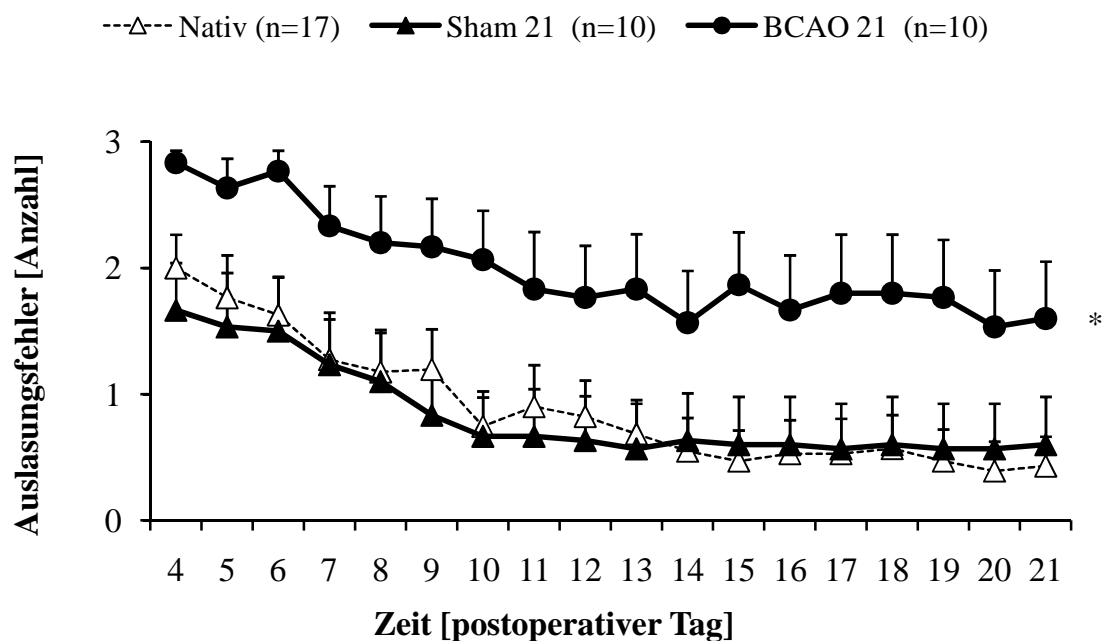


Abbildung 40 Grafische Darstellung der Auslassungsfehler (MW \pm SEM) (* $p < 0,05$ versus Nativ und Sham)

Fehler-Gesamtzahl

Bezüglich der Gesamtzahl der während des gesamten Beobachtungszeitraumes gemachten Fehler (Öffnen eines nicht markierten Loches), waren zwischen den einzelnen Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede zu beobachten.

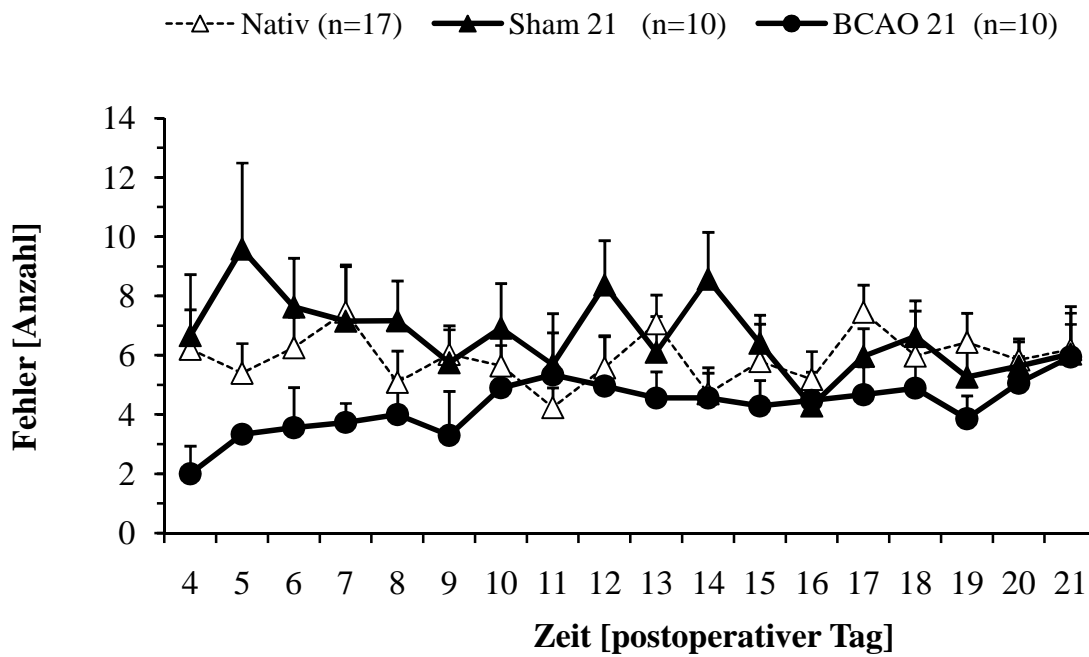


Abbildung 41 Grafische Darstellung der Fehler-Gesamtzahl (MW \pm SEM)

Wiederholungsfehler

Bezüglich der Gesamtzahl der während des gesamten Beobachtungszeitraumes begangenen Wiederholungsfehler (erneutes Aufsuchen eines bereits geleerten Loches), waren zwischen den einzelnen Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede zu beobachten.

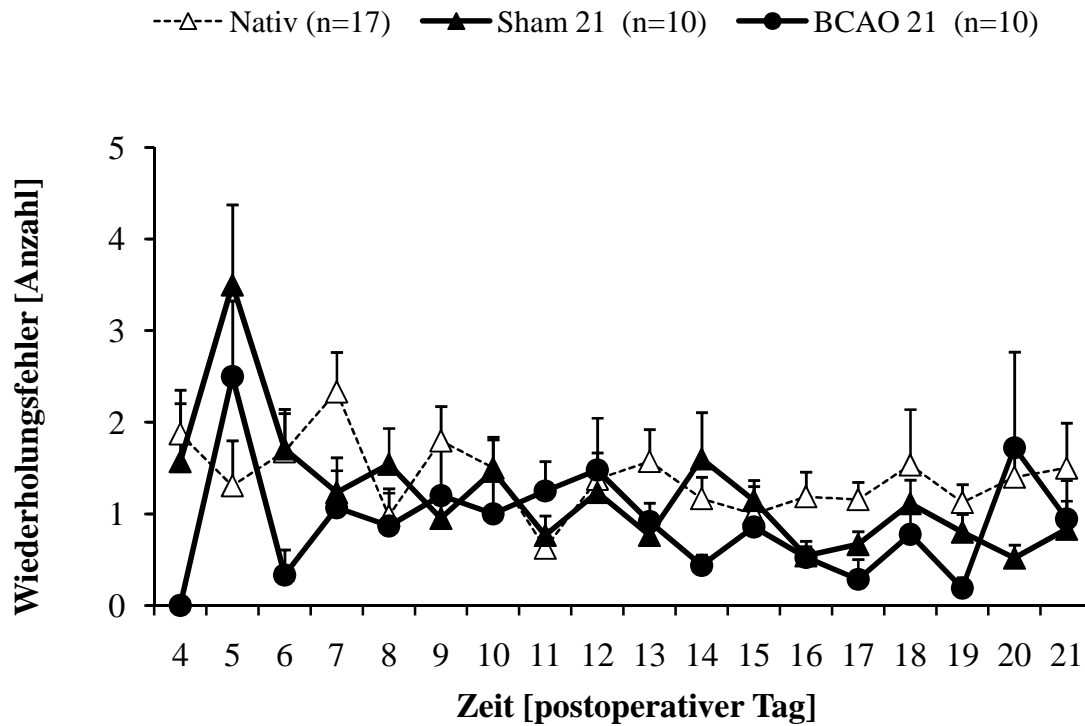


Abbildung 42 Grafische Darstellung der Wiederholungsfehler (MW \pm SEM)

3.3.2 Verhaltensparameter

Angstverhalten

Gesamtzeit auf dem Hole-Board

Die Tiere der BCAO-Gruppe verbrachten während des gesamten Beobachtungszeitraumes im Vergleich zu den Tieren der Nativ- und Sham-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) weniger Zeit auf dem Board.

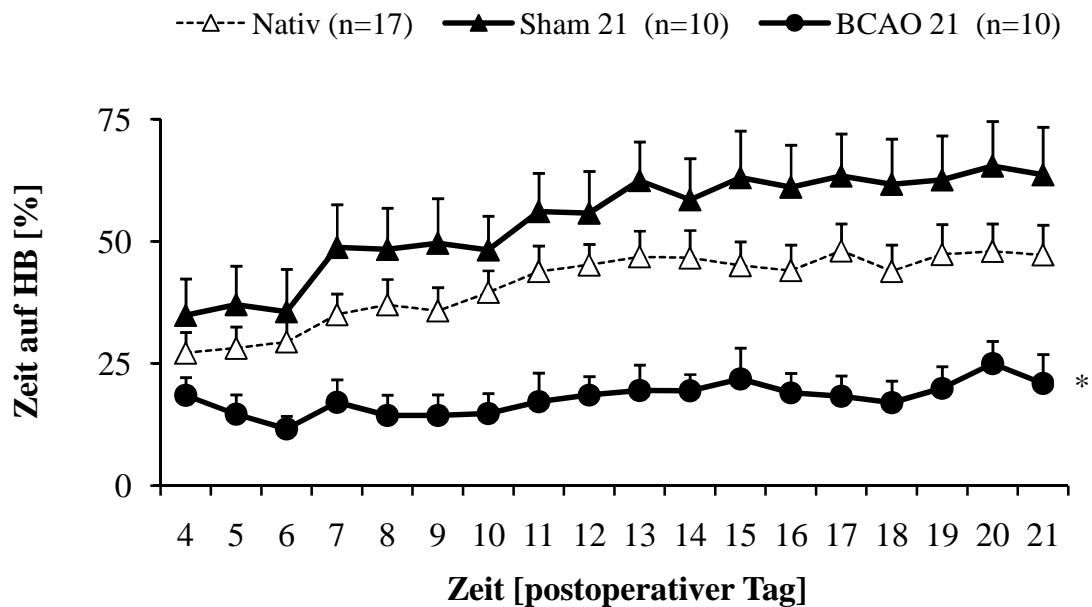


Abbildung 43 Grafische Darstellung der auf dem Bord verbrachten Zeit (%) der Gesamtversuchszeit eines Testdurchlaufs (600 s) der Versuchsgruppen während des Beobachtungszeitraums (MW \pm SEM) (* $p < 0,05$ versus Nativ und Sham)

Immobilität

Im Vergleich zu den Immobilitätsphasen von Nativ- und Sham-Gruppe, bewegten sich die Tiere der BCAO-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) weniger.

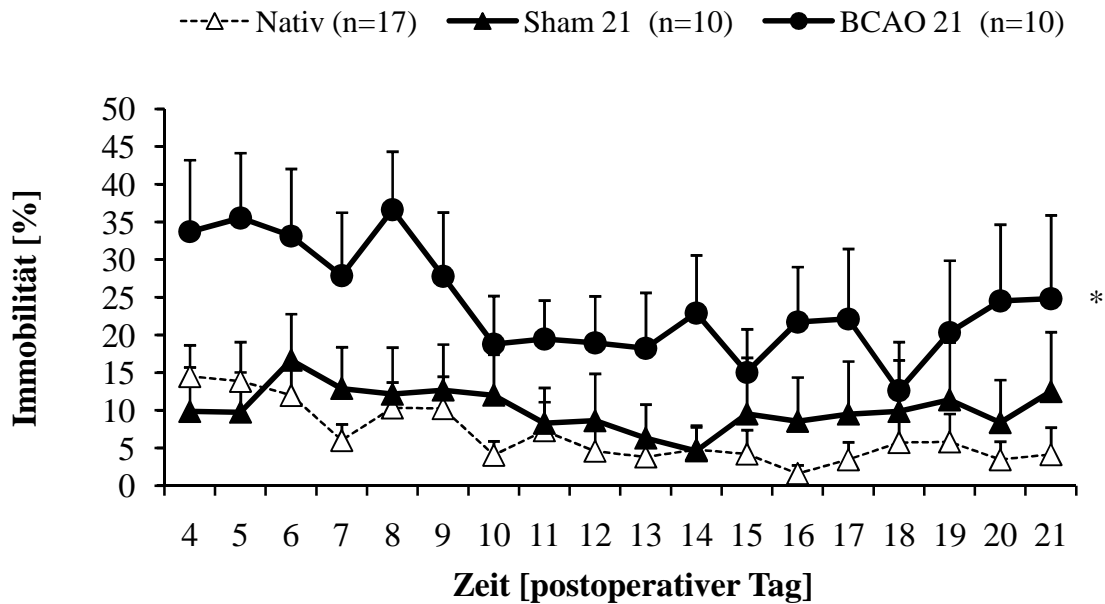


Abbildung 44 Grafische Darstellung Immobilität (%) bezogen auf die Gesamtversuchszeit (600 Sekunden) (MW \pm SEM) (* $p < 0,05$ versus Nativ und Sham)

Explorationsverhalten

Latenz bis zum ersten Betreten des Hole-Board

Die Tiere der BCAO-Gruppe ließen im Vergleich zu denen der Nativ- und Sham-Gruppe signifikant mehr Zeit verstreichen, bis sie das Board ($p < 0,05$) erstmalig betraten.

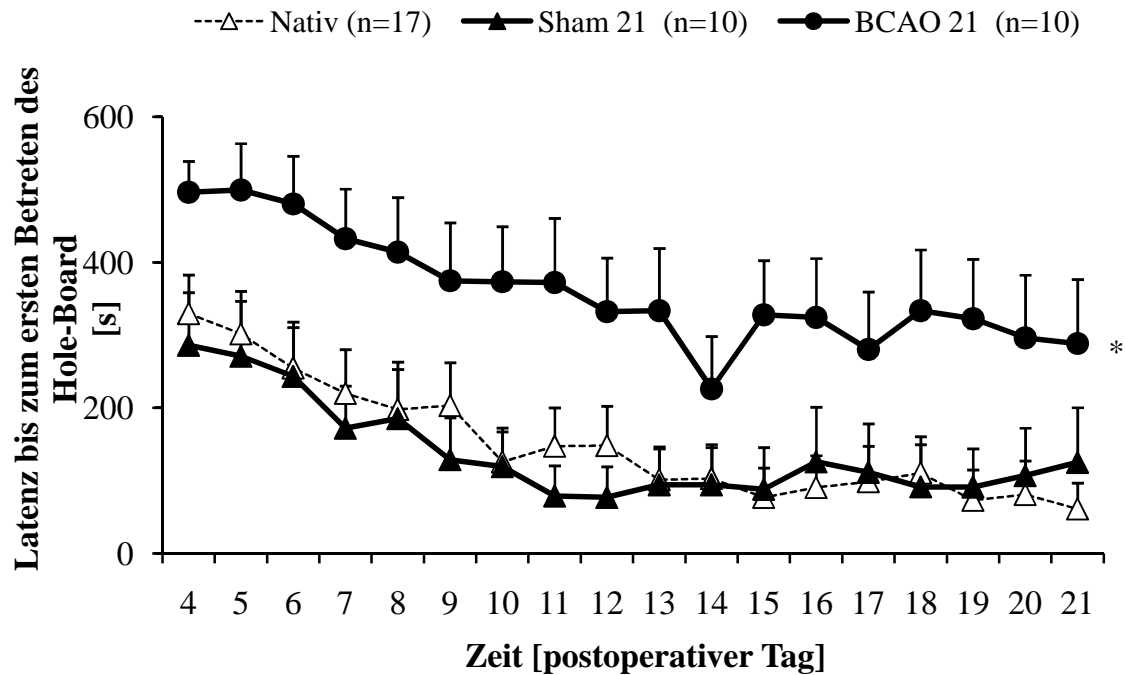


Abbildung 45 Grafische Darstellung der Zeit (Sekunden), die vergeht, bis das Board erstmalig vom Versuchstier betreten wird (MW \pm SEM) (* $p < 0,05$ versus Nativ und Sham)

Latenz bis zum Fressen der ersten Futterbelohnung

Die Tiere der BCAO-Gruppe benötigen im Vergleich zu den anderen Gruppen (Nativ / Sham), während des Beobachtungszeitraumes signifikant mehr Zeit, bis die erste Futterbelohnung von ihnen gefunden und gefressen wurde ($p < 0,05$).

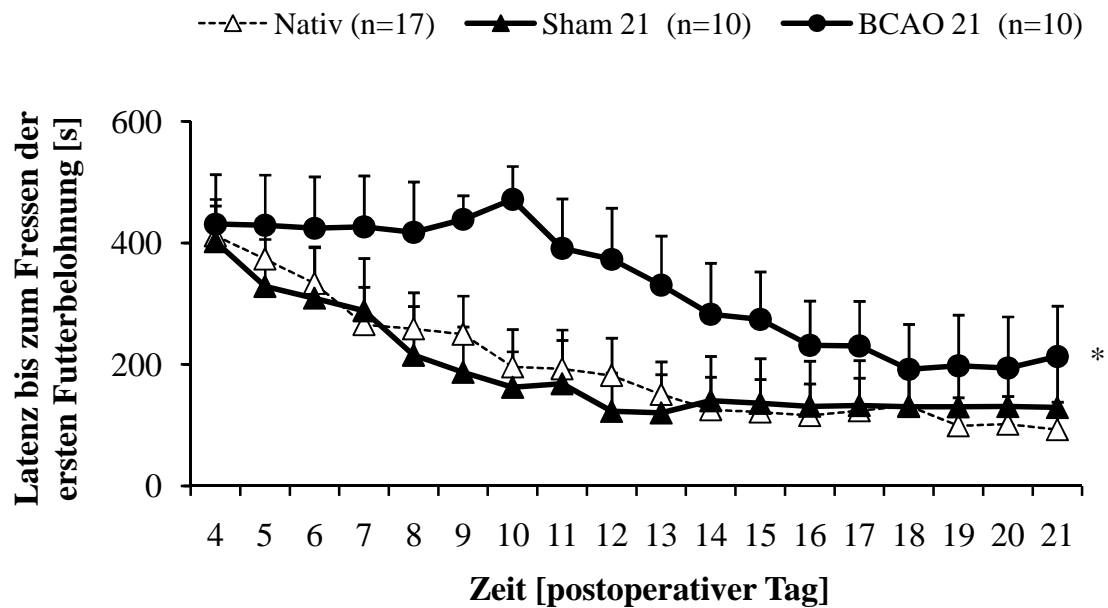


Abbildung 46 Grafische Darstellung der Zeit (Sekunden), die vergeht, bis die erste Futterbelohnung vom Versuchstier gefressen wird (MW \pm SEM) (* $p < 0,05$ versus Nativ und Sham)

Feinmotorik

Vergebliche Lochbesuche

Im Vergleich zu den Tieren der Nativ- und Sham-Gruppe fielen bei den Ratten der BCAA-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) mehr vergebliche Lochbesuche auf.

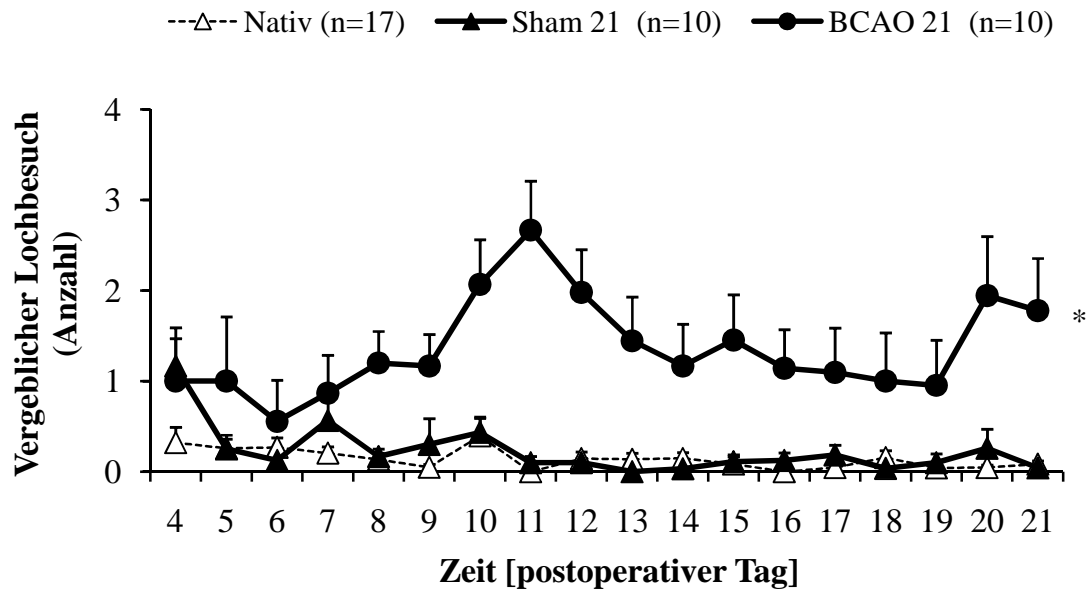


Abbildung 47 Grafische Darstellung der vergeblichen Lochbesuche (Anzahl) pro Durchlauf (MW \pm SEM) (* $p < 0,05$ versus Nativ und Sham)

3.4 Hirngewebsuntersuchungen

3.4.1 H.E.-Färbung

Bei allen operierten Tieren lag die Anzahl der eosinophilen Neurone signifikant ($p < 0,05$) über der der nicht operierten Nativtiere. Darüber hinaus bestand jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der BCAO- und zugehöriger Sham-Gruppen.

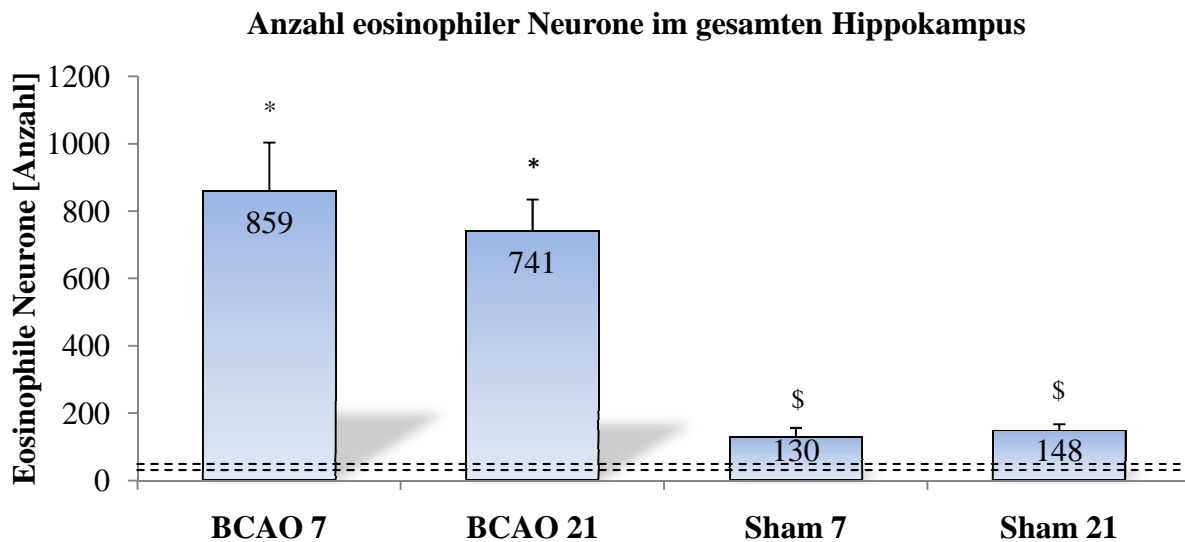


Abbildung 48 Grafische Darstellung der Anzahl eosinophiler Neurone im gesamten Hippokampus ($MW \pm SEM$) (* $p < 0,05$ versus Nativ und Sham / \$ $p < 0,05$ versus Nativ). Zwischen den gestrichelten Linien befindet sich das 95% Konfidenzintervall der unbehandelten Nativtiere.

3.4.2 Immunhistochemische Färbungen

3.4.2.1 Doppelfärbung NFκB

Bei allen operierten Tieren lag die Anzahl der NFκB-positiven Neurone über der der unbehandelten Nativtiere. Die Tiere der BCAA-Gruppe zeigten hierbei signifikant ($p < 0,05$) mehr NFκB-positiven Neurone als die Sham-Tiere.

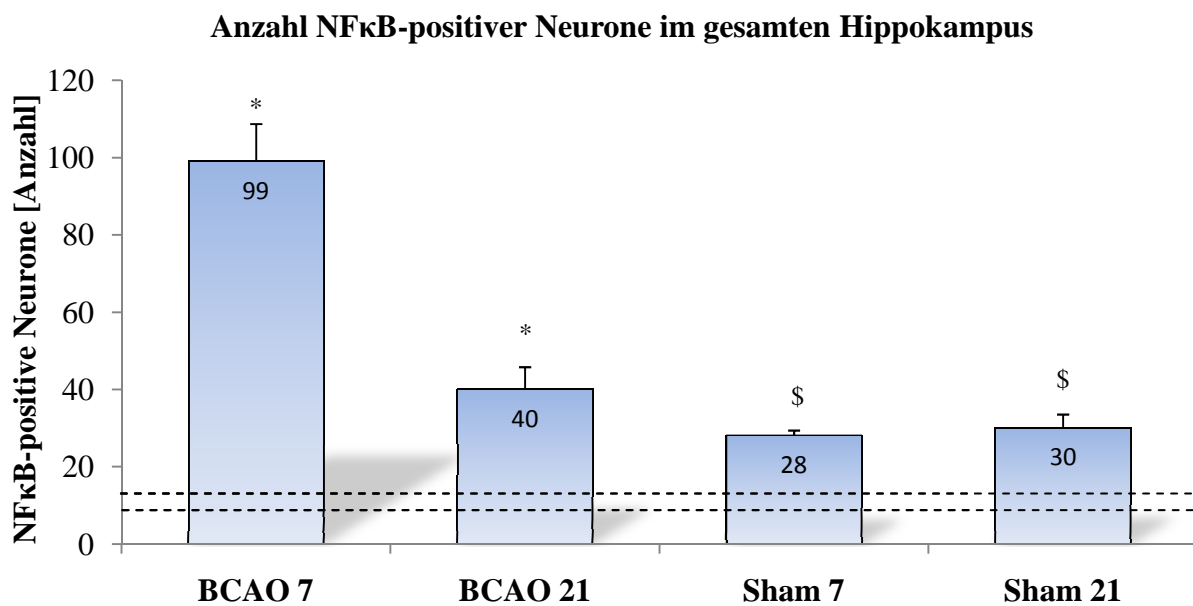


Abbildung 49 Grafische Darstellung der Anzahl NFκB-positiven Neurone im gesamten Hippokampus (MW ± SEM) (* $p < 0,05$ versus Nativ und Sham / \$ $p < 0,05$ versus Nativ). Zwischen den gestrichelten Linien befindet sich das 95% Konfidenzintervall der unbehandelten Nativtiere.

3.4.2.2 Doppelfärbung COX-2

Bei den Tieren der BCAA-Gruppe zeigte sich erneut am siebten Beobachtungstag ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) der COX-2-positiven Neurone im gesamten Hippokampus. Darüber hinaus bestand ein signifikanter Unterschied innerhalb dieser Tiergruppe zwischen dem siebten und 21 Beobachtungstag. Die Anzahl COX-2-positiver Neurone lag bei den Sham-Gruppen nach sieben Tagen im Bereich der unbehandelten Nativtiere. Am Tag 21 zeigte sich ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$).

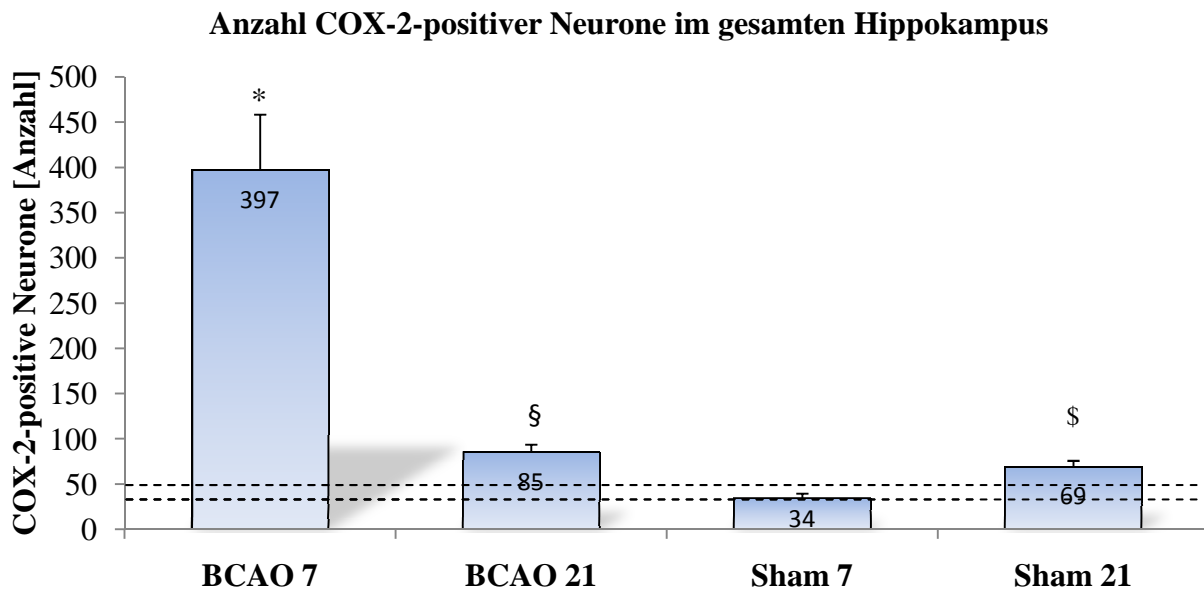


Abbildung 50 Grafische Darstellung der Anzahl COX-2-positiver Neurone im gesamten Hippokampus ($MW \pm SEM$) (* $p < 0,05$ versus Nativ und Sham / § $p < 0,05$ versus Nativ / § $p < 0,05$ versus Nativ) Zwischen den gestrichelten Linien befindet sich das 95% Konfidenzintervall der unbehandelten Nativtiere.

3.4.2.3 Doppelfärbung TNF- α

Bei den Tieren der BCAA-Gruppen zeigte sich am siebten Beobachtungstag ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) der TNF- α -positiven Neurone im gesamten Hippokampus gegenüber den Nativ- und Shamtieren. Darüber hinaus bestand ein signifikanter Unterschied am 21. Beobachtungstag zu den Sham- und Nativ-Gruppen.

Bei den scheinoperierten Tieren zeigte sich ebenso am siebten und am 21. Beobachtungstag ein signifikanter Anstieg, verglichen zu der Nativtiergruppe.

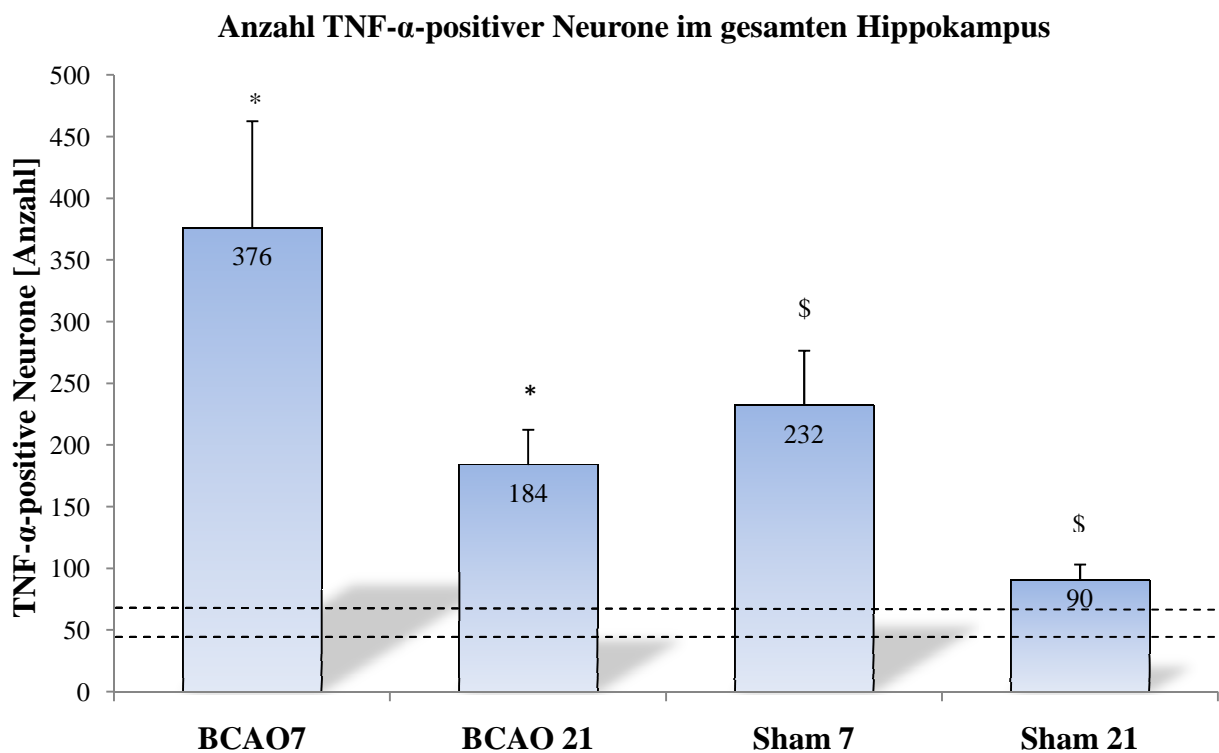


Abbildung 51 Grafische Darstellung der Anzahl TNF- α -positiver Neurone im gesamten Hippokampus (MW \pm SEM) (* $p < 0,05$ versus Nativ und Sham / \$ $p < 0,05$ versus Nativ) Zwischen den gestrichelten Linien befindet sich das 95% Konfidenzintervall der unbehandelten Nativtiere.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

Diese Studie untersucht den Zusammenhang zwischen der Ausprägung neurokognitiver Defizite und einer konsekutiv auftretenden zerebralen Inflammationsreaktion nach einer inkompletten zerebralen Ischämie mit Reperfusion im Rattenmodell. Um die zerebrale Inflammation untersuchen zu können, wurde Tag 7 der Schädigung gewählt, da die maximale inflammatorische Reaktion zwischen dem 1. und 7. postoperativen Tag zu erwarten ist [INTISO et al. 2004]. Um im selben Versuchsansatz die postischämische kognitive Leistung zu untersuchen, wurde eine Gruppe Tiere über 21 Tage neurokognitiv getestet.

4.1.1 Tiermodell

Zahlreiche einfache Untersuchungen zu Ursache-Wirkungsprinzipien ischämischer Schädigungen und deren Einfluss auf neuronale Gewebsverbände (z.B. Messungen der LTP) lassen sich rein zellkulturell verwirklichen. Entscheidender Nachteil all dieser In-vitro-Modelle ist zum einen die rein deskriptive Erfassung zellulärer Abläufe (z.B. Kanalaktivität) innerhalb eines vollständig aus seinem neuronalen Verband herausgelösten Gewebeschnittes, der in Kultur gehalten wird, d.h. keiner normalen Gewebsperfusion und Gefäßversorgung mehr unterworfen ist. Zum anderen können aus klar ersichtlichen Gründen komplexe Fragestellungen, wie der Einfluss einer ischämischen Schädigung auf neurokognitive Funktionen, nicht bearbeitet werden. Voraussetzung hierfür ist der intakte Gesamtorganismus. Aufgrund ethischer und moralischer Überlegungen verbietet sich eine experimentelle Grundlagenforschung der zerebralen Ischämie am Menschen. Zudem ist es praktisch unmöglich, einheitliche und damit vergleichbare Gruppen zu bilden. So variieren Ursache und entsprechende Schädigungsmuster eines Schlaganfalls beim Menschen abhängig von Lebensalter, Geschlecht, einer möglichen genetischen Disposition und den Vorerkrankungen des Patienten. Außerdem würden die erforderlichen eingehenden histopathologischen und biochemischen Untersuchungen einen direkten und damit invasiven Zugang zum Gehirn erfordern. Eine systematische Entnahme von Gehirngewebe verbietet sich aufgrund der damit verbundenen Schädigung des Gehirns völlig.

Diese Überlegungen schließen letztendlich vergleichende Studien zu ischämischen zerebralen Infarkten am Menschen aus, da die gewonnenen Erkenntnisse praktisch nicht reproduzierbar wären. Hier zeigen sich nun die Stärken des Tiermodelles. Es bietet die Möglichkeit, in einem entsprechenden Versuchsaufbau die Rahmenbedingungen zu standardisieren (vergleichbare Gruppen). Kontrolle und Überwachung des Ausmaßes der ischämischen Schädigung ist gut durchführbar und nach erfolgter Schädigung ist die direkte histopathologische Untersuchung des Hirngewebes jederzeit möglich.

4.1.2 Versuchstierauswahl und Haltung

Die vorliegende Untersuchung wurde an Ratten durchgeführt. Diese Nagetiere sind aufgrund ihrer geringen Körpergröße einfach und kostengünstig zu halten und werden allgemein unter ethisch-moralischen Gesichtspunkten als Versuchstier akzeptiert. Die geringe Größe erleichtert zudem die Probengewinnung, deren Verarbeitung sowie Lagerung und führt so zu einer erheblichen Kostenersparnis im Vergleich zu größeren Säugetieren (z.B. Schwein). Bezüglich ihrer Anatomie und Physiologie sind Ratten höheren Säugetieren vergleichbar [YAMORI et al. 1976]. Die für den tierexperimentellen Einsatz gezüchteten Auszuchtstämme zeichnen sich zudem durch ein hohes Maß an genetischer Homogenität aus. In dieser Studie wurden ausschließlich männliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Dieser Tierstamm wird von der Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesie“ schon seit mehreren Jahren verwendet, und es besteht eine entsprechend große Erfahrung bezüglich Haltung und Verhalten. Darüber hinaus lässt sich durch den Einsatz männlicher Tiere der Einfluss zyklusbedingter Hormonschwankungen, denen weibliche Ratten unterworfen sind, ausschließen. Die Tiergröße erlaubt zudem ein umfassendes intraoperatives Monitoring (EKG, EEG, arterielle Blutdruckmessung, venöser Gefäßzugang, BGA), welches bei einem Einsatz noch kleinerer Versuchstiere (z.B. Maus) deutlich erschwert wäre. So werden z.B. wiederholte arterielle Blutentnahmen von Mäusen, bei einem maschinell vorgegebenen kapillären Mindestvolumen von 200µl (Rapidlab® 860, Fa. Bayer Vital GmbH, Fernwald), aufgrund des im Vergleich zu Ratten deutlich geringeren Blutvolumens nicht möglich. Zudem ist die Ratte als Tiermodell in zahlreichen tierexperimentellen Untersuchungen bezüglich der Auswirkung zerebraler Ischämien auf die funktionelle Gesamtleistung und Überlebenszeit gut erforscht. Die Haltung der Tiere erfolgt gemäß den Richtlinien für Versuchstierhaltung in einem speziell klimatisierten Raum, der nur unter strengen Hygienemaßnahmen einem begrenzten Personenkreis zugänglich

ist. Das als Hintergrundgeräusch laufende Radio gewöhnt die Tiere an menschliche Stimmen und einen gewissen Lärmpegel und schirmt zudem Geräusche außerhalb des Tierraumes ab. Dies dient der Vermeidung von lärmbedingten Angst-/Schreckreaktionen der Tiere, die insbesondere die Leistungen in den neurokognitiven Verhaltenstests und damit deren Aussagekraft beeinträchtigen würden.

4.1.3 Zerebrales Ischämiemodell

In der vorliegenden Studie wurde eine so genannte Zwei-Gefäß-Okklusion (2-VO) mit Hypotension als Modell einer inkompletten temporären Vorderhirnischämie bei der Ratte verwendet [EKLÖF et al. 1973]. Da die zerebrale Gefäßversorgung des Rattenhirns der des Menschen deutlich stärker ähnelt, als die anderer Versuchstiere, eignet sich dieses Tiermodell besonders zur Untersuchung zerebraler Ischämien und ihrer Folgen [YAMORI et al. 1976]. Ein weiterer Vorteil des gewählten Modells liegt in der selektiven Vulnerabilität der hippokampalen Pyramidenbahnzellen der CA1-Region gegenüber hypoxischen Bedingungen. Einige Tage nach dem Insult degeneriert diese Zellgruppe regelhaft [PULSINELLI et al. 1982]. Damit kann eine inkomplette zerebrale Vorderhirnischämie mit hoher Reproduzierbarkeit herbeigeführt werden. Durch die rasche und einfache Blutentnahme kann zudem die Ischämiezeit (10 min.) präzise definiert werden. Diese zehnmütige Ischämiezeit wurde festgelegt, da bei einer kürzeren Dauer (< 4 -6 min.) der resultierende Zellschaden zu gering ausfällt [SMITH et al. 1984] und eine längere Ischämiezeit (12 min) mit einem deutlichen Mortalitätsanstieg der Tiere verbunden ist [GROGAARD et al. 1986]. Da diese Methode nur einen temporären Verschluss der Gefäße benötigt, ahmt sie die im Menschen bestehenden Verhältnisse einer hypoxisch bedingten Ischämie besser nach als Modelle mit einem permanenten Verschluss der hirnversorgenden Gefäße. Das Gefäßsystem bleibt dabei grundsätzlich intakt, eine wichtige Voraussetzung für Langzeitstudien neurokognitiver Defizite nach stattgefundenener zerebraler Ischämie. Ein Nachteil dieses Modells ist die ausgezeichnete Kollateralversorgung des Rattenhirns, die es erforderlich macht während des Verschlusses beider Aa. carotis communes zusätzlich den MAP auf Werte von 30 bis 35 mmHg abzusenken, um eine adäquate Schädigung der CA1-Region des Hippokampus herbeizuführen [SUGAWARA et al. 2000]. Damit sind jedoch der Einfluss des Blutzugs und die Retransfusion am Ende der Ischämie auf den neuronalen Schaden mit diesem Modell nicht klärbar. Ein besseres Modell wäre hier der Gerbil (mongolische Wüstenrennmaus), der anatomisch günstigere Gefäßverläufe besitzt. Diese Tiere besitzen keine

A. communicans posterior und damit auch nur einen unvollständig ausgebildeten Circulus arteriosus Willisii. Hier führt alleine der Verschluss beider Karotiden zu einer vollständigen globalen Ischämie. Nachteilig wiederum ist die Größe der Tiere (Körperlänge ~ 12 cm bei einem Körpergewicht ~ 75-110 g), die ein ausgiebiges Monitoring erschwert. Gerade das engmaschige Monitoring der physiologischen Parameter ist jedoch eine wichtige Voraussetzung zur Generierung reproduzierbarer Schädigungsmuster [TRAYSTMAN 2003].

4.1.4 Narkose und Medikamentenauswahl

Alle gebräuchlichen Anästhetika stehen unter dem Verdacht, entweder neuroprotektive (z.B. volatile Anästhetika) oder gar neurotoxische Effekte in Bezug auf die Folgen einer zerebralen Ischämie zu haben. Zahlreiche In-Vitro-Untersuchungen an Zellkulturen liefern hierzu jedoch zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Es erscheint somit sinnvoll, den Einfluss der verwendeten Anästhetika zum einen möglichst gering, zum anderen so konstant wie möglich zu halten.

Isofluran

Wir wissen heute, dass sich der Ablauf der postischämischen Schädigungskaskade über Tage erstreckt und somit geschädigte Neurone auch noch einige Zeit nach dem eigentlichen Insult absterben können. Hier stellt sich nun die Frage, wie lange vermutete neuroprotektive Effekte der während der Ischämie eingesetzten Anästhetika anhalten und ob sie überhaupt dauerhaft Neurone vor dem Untergang bewahren können. M. Kawaguchi versuchte diese Frage tierexperimentell zu klären. Er unterzog Ratten unter Isoflurannarkose einer fokalen zerebralen Ischämie und verglich die resultierende Infarktgröße mit der einer Kontrollgruppe, deren Anästhesie während der Ischämiephase unterbrochen wurde. Bei den Tieren der erstgenannten Gruppe zeigten sich 48 Stunden nach dem ischämischen Insult signifikant kleinere Infarktareale. Zwei Wochen später gab es zwischen beiden Gruppen jedoch keinen signifikanten Unterschied mehr bezüglich der Infarktgröße und damit der untergegangenen Neurone. Aus diesem Ergebnis folgte man, dass Isofluran den Zeitraum bis zum Absterben der geschädigten Nervenzelle zwar verlängert, deren Untergang jedoch letztendlich nicht gänzlich aufzuhalten vermag [KAWAGUCHI et al. 2000]. Entsprechend kann man allenfalls

von einem nur gering ausgeprägten neuroprotektiven Effekt der gewählten Isoflurannarkose in der vorliegenden Studie ausgehen, an dem letztlich alle Versuchstiere einheitlich partizipieren und somit weiterhin vergleichbar bleiben. Darüber hinaus war die Narkosedauer der Sham- und BCAO-Gruppen identisch.

Fentanyl

Zur intraoperativen Schmerztherapie erhielten die Versuchstiere einen Fentanylbolus ($0,05 \mu\text{g} = 0,14 \mu\text{g}/\text{kg}$). Dieses hochpotente Opioid (μ -Rezeptor-Agonist) stellt eine ausreichende Analgesie während der chirurgischen Präparation sicher. Auch zu diesem Medikament existieren, auf der Basis tierexperimenteller Untersuchungen, widersprüchliche Meinungen bezüglich neurotoxischer Effekte nach einer ischämischen Schädigung. So berichtet W.A. Kofke von einer Zunahme der ischämisch bedingten Vorderhirnschädigung im Rattenmodell durch Fentanyl. Dies wurde auf eine gesteigerte Hirnstoffwechselaktivität durch opioidinduzierte Krampfaktivität ($>400\mu\text{g}/\text{kg}$) zurückgeführt [KOFKE et al. 1992]. Y. Morimoto konnte wiederum belegen, dass selbst Hochdosisingaben von Fentanyl nicht zu einer Zunahme der Schädigung und damit zu einem verschlechterten Outcome führen [MORIMOTO et al. 1997]. Dies konnte durch eine weitere Studie von V. Soonthon-Brant bestätigt werden [SOONTHON-BRANT et al. 1999]. Damit kann davon ausgegangen werden, dass der Fentanyleinsatz im Rahmen dieser Studie aufgrund der deutlich niedrigeren Dosis keinen Einfluss auf das neurokognitive Outcome hat.

Cisatracurium

Studien, die einen möglichen negativen Effekt des Cisatracuriums auf das neurokognitive Outcome beschreiben, beziehen sich bei ihren Untersuchungen zumeist auf das Abbauprodukt Laudanosin. So können bei Ratten durch intravenöse Gaben von 10-20 mg/kg, entsprechend einer vielfachen Überdosierung, Krampfanfälle induziert werden, die mit einer neuronalen Schädigung einhergehen [CHAPPLE et al. 1987]. Cisatracurium ist das cis-Stereoisomer des Atracuriums und gehört zu den mittellang wirksamen (50 min) nicht depolarisierenden Muskelrelaxantien. Der Abbau des Cisatracuriums erfolgt zu über 95 % durch die Hoffmann-Elimination (= spontaner nicht enzymatischer Zerfall). Die Esterbindungen der Molekülfragmente werden dann von Carboxylesterasen hydrolytisch gespalten und so weiter abgebaut. Hauptmetabolit ist wie beim Atracurium das Laudanosin. Aufgrund der vier- bis

fünffach höheren neuromuskulär blockierenden Potenz des Cisatracuriums, fällt dieses jedoch in entsprechend geringerer Menge an. Die Laudanosinkonzentration nach Gabe des Cisatracuriums beträgt somit nur etwa 25 % derjenigen nach Gabe von Atracurium. Im Gegensatz zum Atracurium kommt es nur noch zu einer geringen dosisabhängigen Histaminfreisetzung. Vasodilatationsbedingte Kreislaufveränderungen (Blutdruckabfall, Tachykardie) treten praktisch nicht auf [KOCHS et al. 2001]. Zur Muskelrelaxation während der ischämischen Versuchsphase erhalten die Tiere einmalig 0,2 mg Cisatracuriumbesilat (~ 0,6 mg/kg). Dies verhindert effektiv ein Einsetzen der Spontanatmung während der zu diesem Zeitpunkt abgeflachten Narkose, und ermöglicht so eine Kontrolle der endexpiratorischen CO₂-Werte im vorgegebenen Normalbereich (etCO₂: 30 ± 2 mmHg) auch während dieser Versuchsphase. Es ist anzunehmen, dass in der gewählten Dosierung keine negativen Effekte auf das neurokognitive Outcome durch Erniedrigung der Krampfschwelle der Tiere zu erwarten sind; ebenso wenig eine noch am Versuchsende bestehende Relaxierung, da die Extubation stets beim wachen, suffizient spontan atmenden Tier in entsprechendem zeitlichem Abstand zur Applikation (>70 min) erfolgte.

Lidocain

Eine lokale Analgesie wird durch intraoperative Unterspritzung der Präparationsstellen mittels Lidocain erreicht. Auch zu diesem Medikament existieren tierexperimentelle Studien [LEI et al. 2004], die diesem Lokalanästhetikum (Bolus: 1,5 mg/kg + Infusion: 2 mg/kg/h) eine neuroprotektive Wirkung zusprechen. Eine Evaluation in humanmedizinischen Untersuchungen an kardiochirurgischen Patienten konnte einen Effekt auf eine postoperative kognitive Dysfunktion innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von einem Jahr wiederum nicht bestätigen [MATHEW et al. 2009]. Der Einsatz von Lidocain zur subkutanen Unterspritzung der Präparationsstellen (0,15 mg/kg) erscheint in der gewählten Dosierung somit bezüglich möglicher neuroprotektiver Effekte vertretbar und aus tierschutzrechtlichen Gründen für beide Versuchstiergruppen (BCAO/Sham) zwingend, um eine ausreichende Analgesie gewährleisten zu können. Von einer prolongierten postoperativen Wirkung kann zudem aufgrund seiner kurzen Wirkdauer (15-20 min) nicht ausgegangen werden [SCHNEIDER et al. 2008].

Heparin

Auch für Heparin (1,5 mg/kg) sind neuroprotektive Effekte beschrieben worden [MARY et al. 2001]. In aktuellen Studien konnten derartige Effekte jedoch nicht nachvollzogen werden [MATHEW et al. 2009]. Auf eine Vollheparinisierung beider Versuchstiergruppen (BCAO/Sham) wird in der vorliegenden Studie jedoch verzichtet. Eine Teilheparinisierung (50 IU) wird während der relativ kurzen Zeit (10 Minuten), in der das entnommene Blut extrakorporal in entsprechend heparinisierten Spritzen (25 IU) aufbewahrt wird, als ausreichend betrachtet um zuverlässig eine Koagulation zu verhindern. In dieser geringen Dosierung sind mögliche neuroprotektive Effekte vernachlässigbar.

4.1.5 Diskussion der intraoperativen Messparameter

Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb eines Modells und mit anderen Studien ist eine standardisierte Vorgehensweise, die eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb dieses Modells gewährleisten soll. Ein konstanter Versuchsablauf wird somit durch die regelmäßige Durchführung dieser Messungen zu vordefinierten und identischen Zeitpunkten durch denselben Untersucher gewährleistet.

Neben der Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks und des Blutzuckerspiegels wird eine Blutgasanalyse durchgeführt, um Aufschluss über den Gehalt an Hämoglobin, den arteriellen pCO_2 , pO_2 , und den pH-Wert des Blutes zu erhalten.

Darüber hinaus wird die Körpertemperatur der Tiere mittels Temperatursonden überwacht. Da die Versuchsdurchführung selbst entscheidend von einer kontinuierlichen Blutdruckkontrolle abhängt [EKLÖF et al. 1973] wird der arterielle Blutdruck entsprechend überwacht. Eine intraoperativ unbemerkt bleibende Hypotonie und konsekutiver Minderperfusion des Gehirns könnte z.B. den neurologischen Schaden aggravieren [SIEGENTHALER 2001] und die Untersuchungsergebnisse nachhaltig beeinflussen.

Die Glukosekonzentration wird bestimmt, da bekannt ist, dass eine erhöhte Blutglukosekonzentration bei zerebraler Ischämie eine Vergrößerung des Infarktgebietes durch einen vermehrten Anfall von Laktat und eine ausgeprägtere Azidose zur Folge hat [HOFFMANN et al. 1990].

Durch die regelmäßige Kontrolle der Blutgase war es möglich eine insuffiziente Beatmung zu erkennen und die Beatmungsparameter der metabolischen Situation der Tiere anzupassen, um konstante Versuchsbedingungen zu ermöglichen. Auf diese Weise konnte etwa eine Hypo- oder Hyperkapnie der Tiere im Zuge einer beatmungsbedingten Ventilationsstörung erkannt und behoben werden, bevor sie zu einer maßgeblichen Beeinflussung des zerebralen Schadens führen kann [VANICKY 1992].

Da sowohl intraoperative Temperaturabfälle einen neuroprotektiven Effekt haben könnten [WERNER 1997], als umgekehrt Temperaturanstiege neurotoxisch wirken können [REITH et al. 1996] kommt der kontinuierlichen Temperaturüberwachung und Kontrolle im Rahmen der operativen Versuchsphase entscheidende Bedeutung zu. Erschwerend kommt hinzu, daß Inhalationsanästhetika wie Isofluran die Körpertemperaturregelung beeinträchtigen können [DARDAI et al. 1987] und bei kleinen Nagern eine anästhesiebedingte Hypothermie besonders ausgeprägt auftreten kann, da das Verhältnis von Körperoberfläche zu Körpergewicht sehr groß und damit ungünstig ist.

4.1.6 Neurologische Untersuchung

Die neurologische Untersuchung der Versuchstiere dient primär der Erfassung grobmotorischer Defizite, die durch die aktive Teilnahme der Tiere besser als durch reine Beobachtung erfasst und quantifiziert werden können [COMBS et al. 1987]. In der so genannten Habituationsphase werden die Tiere mit dem Versuchsablauf vertraut gemacht. Die hierbei erhobenen Daten dienen dem Vergleich mit den nach Abschluss des operativen Versuchsteils erhobenen Werten. Leider existieren derzeit keine einheitlich standardisierten Testverfahren der neurologischen Untersuchung bei Nagetieren. Zwar werden einzelne Testbatterien (z.B. der Balken-Geh- und Balken-Gleichgewichts-Test) in verschiedenen Studien immer wieder eingesetzt [MARKGRAF et al. 2001], jedoch variieren diese oftmals in Aufbau (unterschiedliche Balkendicke und Form, Balkenlänge usw.) und Bewertung. Die Untersuchung und Bewertung der einzelnen Tiere ist in gewissem Umfang vom Untersucher abhängig und unterliegt damit subjektiven Einflussfaktoren. Deshalb wurden in dieser Studie alle Untersuchungen von qualifizierten Veterinärmedizinern unter den stets gleichen Bedingungen, zur gleichen Uhrzeit und in der gleichen Reihenfolge durchgeführt. Zur Reduktion möglicher Angstreaktionen der Tiere wurden die einzelnen Versuchsgruppen von ein und demselben geblindeten Untersucher betreut. Die Untersuchung selbst fand tagsüber, gegen Ende der Hellphase der nachtaktiven

Nagetiere statt, um den Untersuchern hierfür ausreichende Beobachtungsbedingungen zu bieten.

Die Testergebnisse der sensorischen Fähigkeiten (Seh- und Hörvermögen, Vibrissenreaktion, Propriozeption) der Versuchstiere zeigten einheitliche Werte in allen Versuchsgruppen. Dieses Ergebnis wurde erwartet, da Auffälligkeiten in diesem Bereich zumeist mit schwerstwiegenden zerebralen Schädigungen einhergehen würden, die mit dem Überleben des Tieres in der Regel nicht mehr vereinbar wären.

Balken-Geh-Test

Diese Testmethode dient dazu kortexbedingte Störungen in der Koordination der Vorder- und Hintergliedmaße zu identifizieren [FEENEY et al. 1982] und konnte bereits in anderen Studien erfolgreich zur Bewertung sensorisch-motorischer Störungen nach einer zerebralen Ischämie [OHLSSON 1995] eingesetzt werden. So würden Tiere mit einer einseitigen Hemisphärenschädigung durch Fehltritte auf der kontralateralen Seite auffallen [SOBLOSKY et al. 1996].

Der einfache Testaufbau bietet wenige Fehlerquellen und nutzt in seiner einfachen Aufgabenstellung den natürlichen Trieb der Ratte, in einer ihr unbekanntem Situation Schutz zu suchen. Das Tier wird versuchen, durch Ablaufen der Strecke Deckung zu finden.

Balken-Gleichgewichts-Test

Mit Hilfe dieses Tests wird speziell der Gleichgewichtssinn der Tiere überprüft und mögliche vestibulomotorische Defizite im Rahmen fokaler, zentralnervöser Schädigungsmodelle [BARONE et al. 1992] erkannt [COMBS et al. 1987].

Eine denkbare Fehlerquelle könnte in einer generellen Schwäche der Tiere während der ersten postoperativen Tagen zu suchen sein, d.h. die Ratte hat gar keine neurologischen Ausfallserscheinungen, sondern ist schlichtweg zu geschwächt, um sich auf dem Balken zu halten. Hier obliegt es dem erfahrenen Untersucher, dieses Verhalten entsprechend zu deuten.

Drahtgitter -Test

Dieser Test dient der Beurteilung der Muskelkraft nach Vorhirn- und fokaler zerebraler Ischämie der Tiere [COMBS et al. 1987]. Hierfür soll sich das Versuchstier auf einem variabel geneigten Gitter (0-90-180°) für eine definierte Zeitdauer (5 Sekunden) lang festhalten. Lässt sich eine Ratte aus der Rückenlage heraus fallen, so kann man zusätzlich den Stellreflex beim

Fallverhalten beurteilen. Dieser Reflex wird jedoch auf Ebene des Mittelhirns verschaltet [KOLB et al. 1985]. Damit kann der Test diesbezüglich keine Aussagen über die zu erwartenden hippokampalen Läsionen machen.

Eine mögliche Fehlerquelle der Untersuchung liegt in der erforderlichen Drehung des Drahtgitters. Erfolgt die Wendung zu abrupt, fällt das Tier trotz normaler Muskelkraft vom Gitter, erfolgt sie zu langsam, wird die Ratte unweigerlich versuchen, auf dem Gitter entlangzulaufen, anstatt sich festzuhalten. Diese Fehlerquelle kann jedoch aufgrund der Erfahrung der Untersucher ausgeschlossen werden.

Greif-Zug -Test

In diesem Test sollen sich die Tiere mit ihren Vorderpfoten an einem horizontal gespannten Drahtseil für eine definierte Zeitdauer (15 Sekunden) lang festhalten. Dabei werden die Muskelkraft der Vordergliedmaßen und auch der Greifvorgang als solcher beurteilt werden [COMBS et al. 1987]. Eine Parese der vorderen Extremitäten wird in diesem Test unmittelbar auffallen, wenn das Tier nur mit einer Gliedmaße nach dem Drahtseil greift.

Eine mögliche Fehlerquelle besteht in einer zu niedrigen Höhe des Drahtseiles, denn kommt es zu einem, wenn auch nur kurzen Kontakt des Rattenschwanzes mit dem Boden, werden einige Tiere vorzeitig loslassen, da die Höhe als ungefährlich erkannt wurde. Dieses Phänomen wurde in der obig zitierten Studie nicht beschrieben [COMBS et al. 1987].

4.1.7 Modifizierter Hole-Board-Test

Im modifizierten Hole-Board-Test werden im Wesentlichen die Testparadigmen des offenen Feldes (Lokomotionsaktivität und Angstverhalten) mit denen eines klassischen Hole-Boards (Explorationsaktivität) vereint. Ursprünglich als Kognitionstest für Tupaias (Spitzhörnchen) entwickelt [OHL et al. 1998] wurde er wenig später für Ratten modifiziert. Erstmals war es nun möglich neben Kognition und Erkundungsverhalten auch Angstverhalten, Erregung, soziale Affinität und lokomotorische Aktivität der Tiere mithilfe eines einzigen Tests zu erfassen [OHL et al. 2001^b]. Dies reduzierte zum einen den Zeitaufwand, zum anderen die benötigte Versuchstierzahl, da Tiere, die in einem Verhaltenstest untersucht werden sollen, über keinerlei Testerfahrung in anderen Verhaltenstests verfügen dürfen, um eine Beeinflussung der Testergebnisse auszuschließen [OHL et al. 2001^c]. Man weiß, dass Verhaltenstests sowohl von

den gewählten Testbedingungen als auch vom Testablauf („Versuchsstress“) selbst stark beeinflusst werden [BROADHURST 1957] und insbesondere kognitive Leistung bei Tieren gleichermaßen wie bei Menschen durch Stress negativ beeinflusst werden kann [MCEWEN et al. 1995][OHL et al. 1998^b].

In vielen bei Nagetieren eingesetzten Verhaltenstests werden die Tiere von ihren Artgenossen getrennt (Isolations- und Transportstress) in eine „Versuchsarena“ verbracht. Hier werden die Tiere dann weiteren aversionsbedingenden Reizen (z.B. vorangegangener Nahrungsentzug, Schmerzreiz) als „Motivatoren“ zur Lösung der Testaufgabe ausgesetzt [JARRARD et al. 1986] [HODGES 1996]. Die Ergebnisse dieser Versuche bilden dann vielfach jedoch nicht die Verhaltensveränderung durch eine bekannte spezifische Einflussgröße (z.B. Medikament, ischämische Schädigung) ab, sondern vielmehr die Reaktion (Vermeidungs- und Angstverhalten) der Versuchstiere auf den „Versuchsstress“ [PRUT et al. 2003].

Hier zeigen sich nun die Stärken des modifizierten Hole-Board-Tests. Transportstress entfällt, da die Tiere in ihrem Versuchskäfig leben (Homecage = Tierabteil und Versuchsarena). Die spezielle Konzeption des Homecage vermag zudem den Isolationsstress und damit angstassoziierte Verhaltensweisen zu minimieren. Während des eigentlichen Testdurchlaufes kann das Versuchstier jederzeit durch die mit Löchern versehene durchsichtige Trennwand Kontakt mit seinen Artgenossen im Tierabteil aufnehmen. Der Test nutzt zudem keinen Futterentzug, sondern lediglich den natürlichen Erkundungstrieb und das Futtersuchverhalten (Puffreis = besonderer, vertrauter Futterreiz) der Ratte. Denn in der Habituationsphase werden die Tiere mit dem Testaufbau und der Futterbelohnung (Puffreis) vertraut gemacht. Letzteres ist aufgrund der natürlichen Futterinhibition der Ratte erforderlich. Durch das Vertrautmachen mit dem neuen Futter kann sichergestellt werden, dass alle Tiere vor Testbeginn den Puffreis fressen. So soll es dem Versuchstier ermöglicht werden, im eigentlichen Versuch sein weitgehend natürliches, möglichst angstfreies Verhalten zu zeigen. Einschränkend muss jedoch festgestellt werden, dass die Ratte immer noch in die Testarena gesetzt wird und damit diese strenggenommen nicht aus eigenem Antrieb zum Testzeitpunkt betritt. Diesen störenden Einflussfaktor versucht jedoch die vorhergehende Habituationsphase zu minimieren: Die Ratte kennt in diesem Fall ihre „Test-Umwelt“ als Ort einer möglichen „Futtersuche“. Auf der Basis eines visuell-räumlichen Testmodells lernen die Ratten, eine Kennzeichnung (weißes Klebeband) mit einer erreichbaren Futterbelohnung, die nur in entsprechend markierten Löchern zu finden ist, zu assoziieren, anstatt die Löcher wahllos nach Futter abzusuchen. Dies ermöglicht eine Beurteilung der kognitiven Leistungsfähigkeit und Gedächtnisfunktion der

Tiere [OHL 2003]. Voraussetzung hierfür ist, dass die Ratte sich in ihrer Entscheidung für ein Loch nicht olfaktorisch orientiert. Deshalb werden die Vertiefungen im unteren Board täglich vor Versuchsbeginn mit frischen Puffreisstückchen befüllt, sodass alle Löcher immer gleichmäßig nach Puffreis riechen. Die tatsächlich erreichbare Futterbelohnung wird dann unter dem jeweils markierten Deckel auf dem Gitter platziert. Zusätzlich wird der Eigengeruch des Puffreises durch Bestreichen aller Lochränder mit einem konzentrierten Duftstoff (Johannisbeeraroma) überdeckt. Aus denselben Überlegungen heraus wurden sämtliche Lochabdeckungen des Hole-Boards zwischen den einzelnen Versuchstagen mit einem Klebestreifen versehen, der entsprechend der Randomisierungsliste am folgenden Tag wieder entfernt wurde. So riechen alle Löcher gleich intensiv nach Klebstoff. Dennoch ist eine gewisse Geruchsorientierung der Tiere beim Absolvieren des Tests nicht gänzlich auszuschließen.

Die besondere Rahmenkonstruktion des doppelten Hole-Boards verhindert ein Verrutschen während des Versuchsdurchlaufes und erscheint zudem den Tieren trotz seiner größeren Dicke optisch so „ebenerdig“. Dies ist wichtig, da eine erhöhte Ebene für Nagetiere wiederum einen angstbeladenen Reiz darstellt [OHL 2003]. Nach wie vor stellt sich bei jedem kognitiven Testparadigma und damit auch beim modifizierten Hole-Board-Test die Frage einer speziesübergreifenden Übertragbarkeit der mit seiner Hilfe detektierter kognitiver Defizite und der ihnen zugrunde liegenden neurobiologischen Mechanismen. Wir wissen, dass grundlegende neuronale Prozesse wie die synaptische Transmission oder die Langzeitpotenzierung evolutionsbedingt bei Ratte und Mensch ähnlich ablaufen. Dennoch wissen wir nicht, wie Tiere aufgrund der fehlenden Sprachentwicklung „denken“ und welchen Einfluss dieser Umstand auf die kognitive Leistungsfähigkeit hat. Nicht zu vernachlässigen sind zudem artspezifische Eigenheiten. So sehen Ratten im Vergleich zu Menschen deutlich schlechter, verfügen jedoch über einen ausgezeichneten Geruchssinn. Somit könnte das Tier je nach Versuchsanordnung scheinbar „kognitiv“ im Vor- oder Nachteil sein. Letztendlich bleibt die Frage der Übertragbarkeit ungeklärt, wenn auch Konsens darüber besteht, dass wohl einfache Lernprozesse (Habituation, Konditionierung), die auf den oben genannten grundlegenden neuronalen und evolutionsbedingt stabilen Prozessen beruhen, im Tiermodell abbildbar und damit vergleichbar sind.

Nachteil des modifizierten Hole-Board-Test ist hingegen seine Störanfälligkeit und der aufwendige Personaleinsatz. Insbesondere Untersuchungen der Arbeitsgedächtnisfunktion sind überaus leicht beeinflussbar (z.B. durch sogenannte „Schreckreaktionen“), da sie auf flexiblen Reiz-Reaktions-Assoziationen beruhen [OLTON 1979]. Aus diesem Grund muss während der

Testdurchführung auf eine möglichst störungsfreie (Geräusche) Umgebung geachtet werden. So wird versucht den externen Geräuschpegel im Tierraum durch Radiomusik zu dämpfen. Unter den gleichen Überlegungen kommt eine geräuschlose Weichtastatur zur Dateneingabe während der Versuchsbeobachtung zum Einsatz.

4.1.7.1 Kognitive Defizite im modifizierten Hole-Board-Test

Mithilfe der kognitiven Parameter lassen sich die Lernleistung der Versuchstiere beurteilen und verschiedene Gedächtnisfunktionen überprüfen. Da normale Gedächtnisfunktionen auf der strukturellen Integrität entsprechender neuronaler Strukturen fußen, können aus fehlerhaften Gedächtnisleistungen Rückschlüsse auf Schädigungen entsprechender neuronaler Strukturen (z.B. Hippokampus) gezogen werden.

Lernleistung

Die Lernleistung der Versuchstiere lässt sich relativ einfach aus der für den erfolgreichen Versuchsabschluss (Auffinden und Fressen der drei Futterbelohnungen) erforderlichen Gesamtzeit ableiten. Während der 21-tägigen Versuchsphase lernen die Tiere den Test und handeln folglich immer zielgerichteter und damit schneller. Dieser Parameter ist jedoch dem Einfluss bestimmter Verhaltensparameter unterworfen. So wird diese Gesamtzeit nicht nur davon bestimmt, wie lange die Ratte benötigt um das richtige Loch zu finden, sondern auch von ihrer Motivation (Latenz bis zum Fressen der ersten Futterbelohnung), von Angstverhalten (Immobilität, Gesamtzeit auf dem Hole-Board, Latenz bis zum ersten Hole-Board-Besuch) und allgemein motorischer Parametern und muss in diesem Kontext bewertet werden.

Deklaratives Gedächtnis

Deklarative Gedächtnisleistungen sind die Erinnerungen an Fakten und Ereignisse. Neurologische Grundlage der deklarativen Gedächtnisfunktion stellt der Hippokampus dar. Eine strukturelle Schädigung dieses Areals führen unweigerlich zu Ausfällen im deklarativen Gedächtnis [ZOLA-MORGAN et al. 1986] [SQUIRE 1998] und werden im mHBT durch die

Anzahl der Fehlbesuche und Auslassungsfehler erfasst. Die Tiere haben zum einen gelernt, die weiße Pflastermarkierung mit einer Futterbelohnung in Verbindung zu bringen, zum anderen, dass die nicht markierten Löcher leer sind und ein Besuch nicht zum Fresserfolg führt. Die Lochmarkierungen wechseln entsprechend einer Randomisierungsliste täglich. Denn nur so sind die Tiere gezwungen, ihr deklaratives Gedächtnis einzusetzen um die erlernten Informationen flexibel im Testkontext zu nutzen.

Arbeitsgedächtnis

Das Arbeitsgedächtnis, als gerade aktiver Teil des Kurzzeitgedächtnisses, kann mit dem Bewusstsein gleichgesetzt werden. Es vermag Informationen nur zeitlich begrenzt zu speichern und zu bearbeiten – gleichsam einer bewussten Informationsverarbeitung im Sekundenbereich [MILLER 1956]. Maßgeblich basiert es auf einem intakten präfrontalen Kortex [BADDELEY 2000].

Die Funktionalität des Arbeitsgedächtnisses wird danach bewertet, ob sich ein Tier während eines Versuchsdurchlaufs erinnert, welches markierte Loch von ihm bereits erfolgreich besucht wurde. Deshalb gilt ein erneuter Besuch eines bereits geleerten Loches als Indikator einer Arbeitsgedächtnisstörung [OHL et al 1998]. Um Fehler des Arbeitsgedächtnisses jedoch aussagekräftig bewerten zu können, bedarf es zuerst einer Lernphase, in dieser Studie drei Versuchstage lang, an deren Ende die Tiere stabile Ausgangswerte erreichen [STECKLER et al. 1996].

Damit liegt das Hauptaugenmerk in der Beurteilung der kognitiven Leistungsfähigkeit der Tiere auf dem Lernverhalten (Lernleistung) die eine Beurteilung subtiler Veränderungen erlaubt.

4.1.7.2 Verhaltensdefizite im modifizierten Hole-Board-Test

Der modifizierte Hole-Board-Test vermag neben der kognitiven Leistungsfähigkeit, umfassend das Verhaltensrepertoire der Ratte abzubilden. Hierbei ist zu bedenken, daß auch Verhaltensveränderungen die kognitive Leistung beeinflussen können [OHL et al. 2001^b].

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden mit seiner Hilfe Angst- und Explorationsverhalten sowie feinmotorische Funktionen der Tiere erfasst.

Angst

Dieser Verhaltensparameter spiegelt sich letztendlich im Vermeidungsverhalten der Versuchstiere wider. Wird die Ratte mit einer ihr unbekanntem offenen Fläche konfrontiert, sucht sie zunächst deren Randbereiche auf und vermeidet den zentralen Bereich. Die unbekanntem Situation wird dann aus diesem, dem Tier sicher erscheinenden Begrenzungsbereich heraus erkundet. Dieses Verhalten spiegelt sich in der Zeit, die das Tier auf dem Hole-Board verbringt wider. Die Zeit, die vergeht bis die Ratte das Hole-Board erstmalig betritt, wie auch die Anzahl der Hole-Board Besuche geben ebenfalls Aufschluss über das Angstverhalten. So kann die Zunahme der Zeit die das Tier auf dem zentralen Hole-Board verbringt als Zeichen für den schrittweisen Abbau dieser natürlichen Angst gewertet werden [PRUT et al. 2003]. Man weiß, dass mit einer Zunahme der Ängstlichkeit der Tiere deren kognitive Leistungsfähigkeit sinkt. Die Gewöhnung der Tiere an die Testsituation in der Habituationsphase soll deshalb dazu beitragen, diese Angst abzubauen [OHL et al. 2002]. Ein weiterer Angstindikator findet sich im Parameter Immobilität wieder. Diese Form der Inaktivität kann als ein passives Vermeidungsverhalten betrachtet werden [HO et al. 2002]. Problematisch ist hierbei jedoch die Unterscheidung zu einem entspannten Ruheverhalten der Tiere [WISHAW et al. 1999]. Der erfahrene Untersucher muss hier durch Beobachtung der Körperhaltung erkennen, ob ein Tier ängstlich erstarrt oder zwischen den kurzen Phasen intensiver Erkundung lediglich temporär innehält (Normalverhalten) [WISHAW et al. 1999]. Die Dauer der Immobilitätsphasen kann zudem als Hinweis auf ein verschlechtertes Allgemeinbefinden gewertet werden.

Explorationsverhalten

Das Interesse der Tiere an ihrer Umgebung lässt Rückschlüsse auf ihr Erkundungsverhalten und eine Einschätzung ihrer Motivationshaltung zu. Dieses Verhalten dient grundsätzlich dem Arterhalt, da nur Tiere, die ihre Umgebung sorgfältig erkunden (Futtersuche), sich an eventuelle Änderungen derselben anpassen und mögliche Gefahren rechtzeitig erkennen können (Fressfeinde). Im mHBT bildet die Latenz, bis zum ersten Lochbesuch das gerichtete

Explorationsverhalten der Tiere ab. Dieses Erkundungsverhalten basiert auf Hunger- oder Durstempfinden der Tiere sowie einer starken inneren Motivation („Neugier“), die Umwelt zu erkunden. In der Lernphase des mHBT steigt die zielgerichtete Exploration der Tiere an, da sie zunehmend mehr Löcher besuchen [OHL et al. 2003]. Für das Tier steigt mit der Anzahl der geöffneten Löcher die Wahrscheinlichkeit die Futterbelohnung (Puffreis) zu finden. Innerhalb der ersten Versuchstage erlernt die Ratte den Test, das heißt die Zahl der Lochbesuche sinkt wieder. Je öfter das Tier den Test durchlaufen hat, umso zielgerichteter geht es vor, und umso zielgerichteter wird sein Erkundungsverhalten.

Die Zeit, die vergeht, bis die Futterbelohnung gefressen wird, gilt ebenfalls als Motivationsparameter. In die Beurteilung des Explorationsverhaltens fließen darüber hinaus die Häufigkeit der Lochbesuche, und das Aufrichten der Tiere ein.

Feinmotorik

Die Beurteilung der motorischen Geschicklichkeit der Versuchstiere erlaubt Rückschlüsse auf komplexere feinmotorische Leistungen und diesbezügliche Defizite. Dies zeigt die Anzahl der vergeblichen Lochbesuche an. Mit Hilfe dieses Parameters lässt sich eine dauerhafte motorische Einschränkung der Tiere, die ein schlechteres kognitives Ergebnis zur Folge haben könnte, beurteilen. Die Fresszeit (Zeit, die vergeht bis das Tier die Futterbelohnung aufgefressen hat) ist ebenfalls ein wichtiger Indikator für die feinmotorischen Fähigkeiten der Ratten. Um die gefundene Futterbelohnung zu fressen, sind mehrere miteinander zu koordinierende Vorgänge nötig: Die Ratte muss den Puffreis greifen, festhalten, mit den Pfoten zum Maul führen, abbeißen, kauen und schlucken. Je eingeschränkter demnach das Tier in seinen feinmotorischen Fähigkeiten ist, desto mehr Zeit wird es für das Fressen der Futterbelohnung brauchen.

4.1.8 Hirngewebsuntersuchungen

4.1.8.1 H.E.-Färbung

Die histologische Bewertung des Gehirns nach ischämischer Schädigung lässt Schadensprozesse auf zellulärer Ebene erkennen und sie in Kontext mit klinischen Veränderungen bringen. Geschädigte Neurone erscheinen pink/eosinophil und lassen sich damit lichtmikroskopisch von ungeschädigten blau/basophilen Neuronen differenzieren. Dabei wird Eosinophilie als Zeichen einer gravierenden Zellstoffwechselstörung gewertet, die im Zelltod münden kann. Hier könnten somit auch Zellen detektiert werden, die sich unter Umständen wieder erholen könnten. Mit Hilfe der HE-Färbung ist jedoch keine Differenzierung zwischen Nekrose und Apoptose möglich.

4.1.8.2 Immunhistochemische Färbungen

Ziel dieser Untersuchung war die Detektion neuronaler Zellen und der von ihnen freigesetzten proinflammatorischen Proteine (NF κ B, COX-2, TNF- α). Dies gelang mit Hilfe der immunhistochemischen Doppelfärbung. Zwei verschiedene Enzymsysteme und Farbstoffe markieren dabei die Neurone rot, und neuronales NF κ B, COX-2 und TNF- α bräunlich um eine eindeutige lichtmikroskopische Unterscheidung zu gewährleisten. Der entscheidende Vorteil dieser Methode gegenüber z.B. Verfahren wie dem Western Blot, liegt in der quantitativen „Messung“, d.h. in der direkte Auszählung der entsprechenden Neurone innerhalb der interessierenden anatomischen Strukturen (Hippokampus). Außerdem ist eine eindeutige Zuordnung zum exprimierenden Zelltyp, in diesem Fall Neurone möglich, indem der neuronalen Markers NeuN, ein etablierter spezifischer Marker ausdifferenzierter Nervenzellen verwendet wird [WOLF et al. 1996].

Um das Ausmaß der postischämisch erwarteten Neuroinflammation beurteilen zu können wurden unterschiedliche Faktoren (NF κ B, COX-2, TNF- α) gewählt, die zentrale Rollen im Ablauf der Inflammationskaskade spielen. Zum einen der Transkriptionsfaktor NF κ B, der seinerseits eine entscheidende Rolle in der Regulation der Inflammationsreaktion auf proinflammatorische Stimuli (Zytokine) [PAPARELLA et al. 2001], sowie in der

Hochregulation weiterer inflammatorischer Mediatoren (COX-2, iNOS) spielt [PAPARELLA et al. 2001] [KHAN et al. 2005] [ZHANG et al 2005].

COX-2 stellt das Schlüsselenzym der Prostaglandinsynthese dar, dessen Transkription durch inflammatorische Stimuli (TNF- α , IL-1) angeregt wird [BRUNE et al. 1998][MORITA 2002] und seinerseits wiederum entzündliche Reaktionen unterhalten kann. Bei den von COX-2 synthetisierten Prostaglandine ist insbesondere PGE₂ von Interesse, welches einerseits durch eine Beeinflussung der synaptischen Übertragung im Hippokampus [CHEN et al. 2002] eine Rolle für die Gedächtnisfunktion spielen kann [RALL et al. 2003], andererseits regelhaft im Rahmen eines ischämischen Insults erhöht ist [SAIRANEN et al 1998].

TNF- α wird der Gruppe der proinflammatorischen Zytokine zugerechnet und nimmt eine zentrale Rolle im Rahmen der unspezifischen Entzündungsantwort (hepatische Akutphaseproteinfreisetzung) [SIEGENTHALER 2001^b] ein. Im Gehirn selbst vermag dieses Zytokin über Stimulation der Astrozyten und konsekutiver Mediatorfreisetzung (GM-CSF; G-CSF; M-CSF), die Leukodiapedese von Makrophagen und Granulozyten in Entzündungsherde fördern (ICAM-1/VCAM-1) [BELLASTAS et al. 1995] [BENVENISTE et al. 1995].

Mithilfe dieser Auswahl (Transkriptionsfaktor NF κ B; Prostaglandinsynthetase COX-2; proinflammatorischen Zytokin TNF- α) lassen sich die komplexen Vorgänge der Neuroinflammation auf verschiedenen Stufen der Entzündungskaskade abbilden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Unterzieht man Ratten einer zehnminütigen inkompletten temporären Vorderhirnischämie, kommt es zu einem signifikanten Anstieg der zerebraler Inflammationsparameter NF κ B, TNF- α und COX-2. Diese inflammatorische Reaktion des Gehirns (Maximum am siebten postoperativen Tag), ist verbunden mit einer über den gesamten Beobachtungszeitraum bestehenden Einschränkung der kognitiven Leistungsfähigkeit der Tiere und einer Störung ihres deklarativen Gedächtnisses, jedoch ohne Beeinflussung der Arbeitsgedächtnisfunktion. Dies geht mit einem passageren neurologischen Defizit einher.

Auch bei den Tieren der Sham-Gruppen lässt sich, mit Ausnahme von COX-2 in der Sham 7-Gruppe, ein signifikanter Anstieg der zerebralen Inflammationsparameter gegenüber den unbehandelten Nativtieren beobachten, der jedoch nicht mit einer Einschränkung der kognitiven Leistungsfähigkeit oder des deklarativen Gedächtnisses einhergeht. Dieser Anstieg ist jedoch im direkten Vergleich zu den Tieren der BCAO-Gruppe signifikant geringer ausgeprägt, d.h. auch bei den scheinoperierten Tieren kommt es zu einer Freisetzung zerebraler Inflammationsparameter, die jedoch nicht mit der postischämisch beobachteten zu vergleichen ist.

Das Auftreten von persistierendem neurokognitivem Defizit bei Tieren nach BCAO und erhöhter Anzahl NF κ B-, TNF- α - und COX-2- positiver Neurone im Hippokampus lässt letztendlich jedoch keinen Rückschluss darüber zu ob es zu einem neuroinflammatorisch verursachten Untergang von Neuronen und einer damit verbundenen verschlechtertem neurokognitivem Outcome kommt, oder ob es sich bei dem beobachteten Anstieg der zerebralen Inflammationsparameter im Rahmen einer ischämischer Schädigungen um ein Epiphänomen handelt. So konnte in einer anderen tierexperimentellen Untersuchung, dem kardiopulmonalen Bypass (CPB) im Rattenmodell, kein Zusammenhang zwischen Neuroinflammation und neurokognitivem Outcome gezeigt werden.[JUNGWIRTH et al. 2010].

4.2.1 Physiologische Messparameter

Körpertemperatur

Entsprechend dem Versuchsprotokoll wird die Körpertemperatur der Versuchstiere kontrolliert im zuvor definierten Normbereich ($37,5 \pm 0,2$ °C) konstant gehalten. Hierbei orientiert man sich primär an der perikraniellen Temperatur unter der Annahme einer Annäherung an die tatsächliche Körperkerntemperatur. Somit kann ein neuroprotektiver Effekt durch Hypothermie ausgeschlossen werden [WERNER 1997]. Gleiches gilt für Temperaturanstiege, die einen neurologischen Schaden aggravieren würden [REITH et al. 1996].

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Entsprechend dem Versuchsprotokoll erfolgt während der intraoperativen Ischämiephase (BCAO) durch Blutentzug eine Absenkung des MAP auf 30 mmHg. Hiervon ausgenommen werden jedoch die Tiere der Sham-Gruppe, wodurch sich die signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den übrigen Versuchsgruppen erklären. Bei den Tieren der BCAO 7 und BCAO 21- Gruppe steigt der MAP zehn Minuten nach Ende der ischämischen Phase an. Erklärlich ist diese physiologische Reaktion durch autoregulatorische Prozesse (z.B. Katecholaminausschüttung, Baroreflex) im Körper des Versuchstieres, um den Blutdruck und damit die zerebrale Perfusion wieder in physiologische Bereiche zu lenken. Diese autoregulatorischen Mechanismen sind weitgehend unabhängig vom MAP, was aber im Fall einer zerebralen Ischämie nicht mehr zutrifft. Diese Abläufe zeigen sich klassischerweise auch bei Schlaganfallpatienten [SYKORA 2010] und decken sich mit der klinischen Erfahrung (arterielle Hypertension nach zerebralem Gefäßverschluss) [ADAMS et al. 1996]. Mit dem Ende der ischämischen Phase nach lösen der Gefäßclips und Reperfusion zirkulieren im Gefäßsystem entsprechend große Mengen vasoaktiver Substanzen (Katecholamine), die zu der beobachteten Hypertension in den BCAO-Gruppen führen. Mit Abschluss der Erholungsphase, eine Stunde nach Ischämie, liegen die Blutdruckwerte aller Versuchsgruppen signifikant unterhalb der präoperativen Messungen. Dies ist erklärlich durch den intraoperativen Verbrauch körpereigener Ressourcen (Katecholamine, Blutverlust) und die erhöhte Isoflurankonzentration (postischämische Narkosevertiefung) in dieser Phase.

Blutglukose

Glukose stellt den wesentlichen Energieträger des zentralen Nervensystems dar. Unter physiologischen Bedingungen kann die Glukose im Rahmen der aeroben Abläufe in Citratzyklus und Atmungskette in Energie (38 Mol ATP aus einem Mol Glukose) umgesetzt werden. Während einer zerebralen Ischämie hingegen steht nicht ausreichend Sauerstoff zur Verfügung und die anaerobe Glykolyse setzt ein. Neben einer erheblich geringerer Energieausbeute (zwei Mol ATP aus einem Mol Glukose) fällt zudem das saure Stoffwechselendprodukt Laktat an [KOOLMAN et al. 2003]. Dieses akkumuliert unter hypoxischen Bedingungen im Gewebe, da es zum einen vermehrt gebildet, zum anderen aufgrund der verringerten Stoffwechselleistung verzögert abtransportiert wird [SIESJÖ 2002]. In dieser Situation reagiert der Organismus mit weiterer Glukosefreisetzung, da eine ansteigende Plasmaglukosekonzentration hilft, den bestehenden neuronalen „Energemangel“ durch eine „Angebotsenerweiterung“ auszugleichen mit dem Ziel, zumindest einen Strukturstoffwechsel aufrechterhalten zu können. Diese postischämische Hyperglykämie ist damit direkte Folge des erniedrigten Blutdrucks und der daraus resultierenden Katecholaminausschüttung aus der Nebenniere. Andererseits erhöht sich damit unweigerlich der Geweblaktatspiegel und der neurologische Schaden weitet sich aus [HOFFMANN et al. 1990]. Kurzfristig betrachtet kann also ein erhöhter Blutglukosespiegel den hypoxisch bedingten Zusammenbruch des neuronalen Zellstoffwechsel verzögern, langfristig gesehen führt die hieraus resultierende Gewebsazidose jedoch zu einer Ausweitung des Schadens. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, dass eine Hyperglykämie die Häufigkeit postischämischer zerebraler Krampfanfälle erhöht, ein Zeichen schwerer neuronaler Schädigung [WARNER et al. 1992]. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen einen postischämischen Blutglukoseanstieg (BCAO-Gruppen). Binnen einer Stunde nach Ischämie normalisieren sich die Blutzuckerwerte jedoch wieder. Inwieweit dieser temporäre Anstieg zum Ausmaß der Gesamtschädigung beiträgt, lässt sich mit dieser Studie nicht abschließend beurteilen.

Blutgasanalyse

pH

Der pH-Wert wurde in allen vier Gruppen während des gesamten Versuchs konstant im physiologischen Bereich gehalten. Damit lässt sich eine Beeinflussung der Gewebsschädigung aufgrund unterschiedlicher pH-Werte ausschließen.

Kohlendioxidpartialdruck (mmHg)

Der paCO_2 (mmHg) ist entscheidend an der Kontrolle der zerebralen Perfusion durch Autoregulation beteiligt. Eine Hyperkapnie im Zuge einer Hypoventilation führt zu einer zerebralen Vasodilatation, eine Hypokapnie als Folge einer Hyperventilation wiederum induziert eine ausgeprägte Vasokonstriktion, der neuroprotektive Wirkung zugeschrieben wird [HOFF, 1986]. Da dies unweigerlich das Ausmaß des zerebralen Schadens beeinflussen würde [VANICKY 1992], werden die Kohlendioxidkonzentrationswerte durch die druckkontrollierte Beatmung der Versuchstiere in engen physiologischen Grenze (etCO_2 : 30 ± 2 mmHg) gehalten. Sie werden kontinuierlich kapnometrisch überwacht und zu den drei Messzeitpunkten mithilfe der BGA verifiziert. Entsprechend zeigen sich zwischen den Versuchsgruppen keine Unterschiede, und es kann davon ausgegangen werden, dass die Studienergebnisse hiervon unbeeinflusst bleiben.

Sauerstoffpartialdruck (mmHg)

Der paO_2 (mmHg) steigt signifikant unmittelbar postischämisch lediglich bei den Tieren der BCAO 21-Gruppen an. Ursächlich hierfür kann eine Steigerung der Beatmungsfrequenz nach Abschluss der Retransfusionsphase sein, die dazu dient einen Anstieg der Kohlendioxidpartialdrucks durch die Rückgabe des desoxygenierten Blutes auszugleichen. Dies ist in den Sham-Gruppen nicht erforderlich. Warum sich ein vergleichbarer Effekt nicht auch bei den Tieren der BCAO 7-Gruppe zeigt, ist damit aber nicht erklärlich. Hohe Sauerstoffpartialdruckwerte und damit verbundene ATP-Bereitstellung können entscheidend für das Überleben ischämisch geschädigter Neurone sein [LIU et al. 2010]. Dies könnte zu einer Verringerung des ischämischen Schadens führen. Dies konnte so jedoch für die Tiere der BCAO 21-Gruppen in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden. Wahrscheinlich ist der beobachtet Anstieg in seiner Dauer zu kurz um einen positiven Einfluss auf den Gesamtschaden zu haben.

Gesamthämoglobin (mg/dl)

Im Versuchsverlauf bewegen sich die gemessenen Werte aller Versuchstiere innerhalb physiologischer Bereiche [CHARLES RIVER 2006]. Der hierbei beobachtete signifikante Abfall unter die Ausgangswerte lässt sich mit einem präparationsbedingten intraoperativen Blutverlust erklären, da der beschriebene Abfall bei allen operierten Versuchsgruppen (BCAO-/Sham-Gruppen) vergleichbar ist.

Unter den Bedingungen der kontrollierten Beatmung kam es zu keinem der gewählten Messzeitpunkte zu einem Abfall der arteriellen Sauerstoffättigung (SaO_2). Damit lässt sich eine intraoperative Hypoxie ($\text{SaO}_2 < 90\%$) weitgehend ausschließen und das entsprechende intrazerebral gesehene Schädigungsmuster als Folge des temporären Gefäßverschlusses beurteilen. Dies wird durch den Untersuchungsbefund des signifikanten Hb-Wert-Abfalls gegenüber der Baseline unterstützt. Damit hat der Hb-Wert in dieser Studie keinen Einfluss auf die Schädigung.

Körpergewicht (g)

Gewichtsverlust kann ein Anzeichen für Krankheit, Verletzung oder Ernährungsmangel, aber auch für erhöhte körperliche Aktivität oder Stress sein. Auch die Rangposition einzelner Tiere innerhalb einer Tiergruppe spielt eine Rolle bei der Gewichtsentwicklung. So nehmen rangniedrigere Ratten weniger zu und sind damit leichter als ihre ranghöheren Artgenossen [WHISHAW et al. 1999]. Alle Versuchstiergruppen zeigen am ersten postoperativen Tag einen Gewichtsverlust oder einen stagnierenden Gewichtszuwachs. Dies kann als Folge versuchsbedingter erhöhter Aktivität („Stress“) gewertet werden. Entsprechend nehmen die Nativtiere, die nur in den Laborbereich gebracht wurden, jedoch weder einer Narkose noch einem chirurgischen Eingriff oder ischämischer Schädigung ausgesetzt waren, im weiteren Verlauf wie erwartet kontinuierlich an Gewicht zu. Die Trennung der Tiere von ihren Artgenossen und der erfolgte Transport scheinen damit allenfalls geringen Einfluss auf das Körpergewicht zu haben. Die Tiere der BCAO 21-Gruppen verlieren im Vergleich zu den Sham- und Nativtieren postoperativ signifikant an Körpergewicht. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen vergleichbarer Studien über die Folgen einer zerebralen Ischämie bei der Ratte [ZHAO et al. 2005][MAIER et al. 2006]. Bemerkenswerterweise ist dieser Gewichtsverlust bei den Tieren der BCAO 21-Gruppe im Vergleich zu denen der BCAO 7-Gruppe stärker ausgeprägt, und die Tiere der erstgenannten Gruppe erholen sich hiervon nur langsamer (Wiedererreichen des Ausgangsgewichtes: BCAO 21-Gruppe – Tag 15; BCAO 7-

Gruppe – Tag 7). Einflussfaktoren wie eine verbessertes operatives Geschick und eine damit für die Tiere schonendere Operationstechnik, bedingt durch zunehmende Erfahrung im Studienverlauf, sind bedingt durch die Randomisierung auszuschließen. Andererseits mussten die Tiere der BCAO 7-Gruppe nicht am mHBT teilnehmen, sondern waren postoperativ in einem Standardkäfig (Makrolon Typ IV) untergebracht. Hier könnte sich eine bei kleinerem Platzangebot deutlich geringere körperliche Aktivität niederschlagen. Diesen Erklärungsansatz unterstützt der Kurvenverlauf, der erst am zweiten postoperativen Tag, mit Beginn des HB-Tests, einen Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen zeigt. Der Gewichtsverlust selbst erklärt sich als Folge der intraoperativ erlittenen inkompletten temporären globalen Vorderhirnischämie der Tiere in Kombination mit dem operativen Trauma. Allerdings ist der Einfluss des letztgenannten eher gering einzuordnen, wie der praktisch deckungsgleiche Kurvenverlauf der Sham 7-Gruppe mit dem Gewichtsverlauf der Nativtiergruppe nahelegt. Hier zeigt sich erneut, wie körperlich fordernd die Teilnahme am mHBT für die Tiere sein muss, denn auch die Ratten der Sham 21-Gruppe verlieren während der ersten drei postoperativen Tage an Körpergewicht. Ihr Ausgangsgewicht können diese Tiere, wie die der BCAO 7-Gruppe, erst am siebten postoperativen Tag wiedererlangen.

4.2.2 Überlebensrate

In der vorliegenden Studie liegt die Überlebensrate bei 87 %. Dieser Wert deckt sich erwartungsgemäß mit dem vergleichbarer Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe experimentelle Anästhesie und liegt sogar deutlich über dem bereits veröffentlichter Untersuchungen (63%) [GRØGAARD 1986].

4.2.3 Neurologische Funktion

Neurologische Defizite waren erwartungsgemäß bei den Tieren der BCAO-Gruppen zu beobachten. Betroffen waren hier Gleichgewicht, Koordination und Muskelkraft. Ihre maximale Ausprägung zeigt sich am ersten postoperativen Tag. Binnen der ersten Tage erholen sich die Tiere und präsentieren am siebten postoperativen Tag bereits wieder ein den anderen Versuchsgruppen vergleichbar gutes Ergebnis. Dies zeigt zum einen, daß infolge der zerebralen Ischämie eine neurologische Beeinträchtigung im Sinne eines grobmotorischen Defizits auftritt.

Dieses Defizit ist allerdings nur temporär und binnen einer Woche nicht mehr nachweisbar. Diese relativ rasche Regeneration könnte Ausdruck einer größeren Regenerationsfähigkeit der Ratte im Vergleich zum Menschen sein, da vergleichbare zerebrale Läsionen meist zu dauerhafter Funktionseinschränkung führen [WARD et al. 2005]. Es fällt dabei jedoch auf, dass sich bei den Tieren der BCAO 7-Gruppe, die nicht am Hole-Board-Protokoll teilnahmen, die neurologische Funktion scheinbar rascher erholt hat als die der Vergleichsgruppe – BCAO 21: In beiden Gruppen war am ersten postoperativen Tag die Beeinträchtigung gleichermaßen stark. Bereits ab dem zweiten Tag hingegen, mit Beginn des Hole-Board-Protokolls, zeigten die Tiere der BCAO 21-Gruppe in allen neurologischen Tests tendenziell eine schlechtere Leistung – trotz gleicher Schädigung. Ursächlich hierfür könnte prinzipiell eine stärkere Ausprägung des ischämischen Schadens sein. Dem entgegenzuhalten ist, dass der Anteil eosinophiler Neurone im Hippokampus in der H.E.-Färbung sowohl in der BCAO 21- als auch in der BCAO 7-Gruppe vergleichbar hoch war. So daß wir davon ausgehen, daß die zerebrale Schädigung in beiden Gruppen vergleichbar ist. Eine mögliche Erklärung für das bessere Abschneiden der BCAO 7-Gruppe könnte sein, dass diese Tiere nicht zusätzlich zu ihrer neurologischen Testung zuvor am Hole-Board-Test teilnahmen und somit leistungsfähiger waren. Ob dieser Effekt jenseits des siebten postoperativen Beobachtungstages weiterhin eine Rolle spielt, lässt sich aufgrund des Studiendesigns nicht abschließend beurteilen: Es existiert keine entsprechende Vergleichsgruppe, die über einen Zeitraum von 21 Tagen lediglich einer neurologischen Untersuchung unterzogen wurde.

4.2.4 Kognitive Leistungsfähigkeit und Verhalten

4.2.4.1 Kognitive Defizite im modifizierten Hole-Board-Test

Lernleistung

Die Tiere der Nativ- und Sham-Gruppe benötigen über den Beobachtungszeitraum von 21 Tagen annähernd die gleiche Zeit zur Absolvierung des mHBT. Dieser Zeitbedarf nimmt erwartungsgemäß gegen Ende der Studie ab. Die Tiere der BCAO-Gruppe hingegen benötigen erwartungsgemäß signifikant mehr Zeit. Bis zum 13. Untersuchungstag findet keines der Tiere dieser Gruppe die Futterbelohnung unter 300 Sekunden. Dieser Gruppenunterschied bleibt bis zum 21. Versuchstag unverändert erhalten und zeigt eine deutliche Einschränkung der kognitiven Leistungsfähigkeit. Interessanterweise zeigen die Tiere dieser Versuchsgruppe nach

erfolgter ischämischer Schädigung auch ein neurologisches Defizit. So wäre es durchaus denkbar, dass neurologisch geschädigte Tiere alleine aufgrund einer eingeschränkten motorischen Funktion deutlich länger zur erfolgreichen Bewältigung der Testaufgabe brauchen als die Tiere der Vergleichsgruppen. Gegen diese Überlegungen spricht, dass die beschriebenen neurologischen Defizite binnen sieben Tagen nicht mehr nachweisbar waren, die Tiere der BCAO-Gruppe hingegen bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes eine signifikant schlechtere kognitive Leistung zeigten als die Vergleichsgruppen.

Deklaratives Gedächtnis

Indikator dieser Gedächtnisform ist die Anzahl der gemachten Fehler: der Besuch eines nicht markierten und damit nicht mit einer Futterbelohnung gefüllten Loches und die der unterlassene Besuch eines markierten Lochs (Auslassungsfehler). Je mehr Fehler dieser Art einem Versuchstier unterlaufen, umso eingeschränkter wird seine deklarative Gedächtnisfunktion beurteilt [OHL et al. 1998]. Insgesamt zeigen lediglich die Auslassungsfehler einen Unterschied zwischen den Gruppen. Die scheinoperierten Tiere und die Nativtiere machen dabei anfangs, während der Lernphase, mehr Fehler und stabilisieren sich diesbezüglich ab Tag 10 bis zum Versuchsende. Die Gruppe der BCAO-Tiere zeigt dabei schon während der Lernphase insgesamt mehr Auslassungsfehler, die bis zum Versuchsende auf nahezu Ausgangsniveau bleiben. Es nimmt zwar auch in dieser Gruppe die Fehlerhäufigkeit ab, erreicht jedoch erst am Studienendpunkt das Ausgangsniveau der Nativ- und Sham-Gruppe. Bezieht man in diese Bewertungen die Daten der Verhaltensveränderung (Gesamtzeit auf dem Hole-Board; Immobilität) dieser Tiergruppe mit ein, so erkennt man jedoch, dass die Tiere nach einer zehnminütigen Ischämie unter dem deutlichen Einfluss von Angstverhalten stehen [OHL et al. 2001^a]. Auch dies scheint in Zusammenhang mit der ischämischen Schädigung zu stehen, da sich vergleichbares Verhalten bei den scheinoperierten Tieren nicht nachweisen lässt. Somit handelt es sich beim Angstverhalten um einen Einflussfaktor auf die gezeigte Gedächtnisleistung [OHL et al. 1998] [OHL et al. 2001^a], der jedoch nur bei den tatsächlich auch geschädigten Tieren auftrat und damit die folgende Schlussfolgerung erlaubt: Die zerebrale Ischämie der Tiere der BCAO-Gruppe zieht eine Schädigung der deklarativen Gedächtnisfunktionen nach sich, die über den gesamten Beobachtungszeitraum anhält.

Arbeitsgedächtnis

Ein Indikator der Leistungsfähigkeit des Arbeitsgedächtnisses stellt die Anzahl der Wiederholungsfehler dar. Die Tiere der Nativ- und Sham-Gruppe beginnen am zweiten

Versuchstag mit einer annähernd gleichen Zahl von Wiederholungsfehlern. Die Tiere der BCAO-Gruppe liegen deutlich darunter. Dies erklärt sich dadurch, dass diese Tiere zu Versuchsbeginn deutlich stärker motorisch eingeschränkt sind und entsprechend weniger Löcher in einem längeren Zeitintervall aufsuchen; folgerichtig begehen sie damit auch weniger Wiederholungsfehler. Tendenziell sinkt in allen Versuchsgruppen im weiteren Versuchsverlauf die Wiederholungsfehleranzahl und unterscheidet sich nicht signifikant, was auf eine einheitlich gute Funktion des Arbeitsgedächtnisses schließen lässt. Damit scheint sich die ischämische Schädigung nicht in einer Störung der Funktion des Arbeitsgedächtnisses abzubilden.

4.2.4.2 Verhaltensdefizite im modifizierten Hole-Board-Test

Angst

Die Zeit, die die Versuchstiere auf dem Hole-Board verbringen, nimmt in allen Versuchsgruppen im Untersuchungsverlauf zu. Dies kann als die Folge der Gewöhnung an die Testsituation und eine damit verbundene Reduktion der natürlichen Ängstlichkeit der Tiere gewertet werden [OHL et al. 1998]. Hierbei fällt jedoch auf, dass die Tiere der BCAO-Gruppe insgesamt signifikant weniger Zeit auf dem Hole-Board verbringen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Tiere in den ersten Beobachtungstagen nach Ischämie noch von den Folgen der Operation geschwächt und nicht in der Lage sind, ihre Umgebung entsprechend zu explorieren. Dann müsste dieser Effekt jedoch mit dem Nachlassen der neurologischen Defizite am siebten Untersuchungstag und der konsekutiven Erholung der Tiere im Verlauf der Untersuchung ebenso verschwinden. Gleiches gilt für die beobachteten Immobilitätsphasen. Diese nehmen zwar im Untersuchungsverlauf auch bei den Tieren der BCAO-Gruppe ab, erreichen dabei jedoch nie das Aktivitätsniveau der Vergleichsgruppen. Damit zeichnen sich die ischämisch geschädigten Tiere durch eine erhöhte Ängstlichkeit über den gesamten postoperativen Beobachtungszeitraum aus.

Explorationsverhalten

Sowohl die Nativtiere als auch die scheinoperierten Tiere beginnen nach einer Eingewöhnungsphase ihre Umgebung immer zielgerichteter zu explorieren und benötigen immer weniger Zeit bis zum ersten Lochbesuch. Sie betreten immer rascher das Hole-Board und versuchen, an die Futterbelohnungen zu gelangen. Bei den Tieren der BCAO-Gruppe

dauert es signifikant länger, bis erstmalig ein Loch aufgesucht wird. Diese Latenz wird zwar auch in dieser Versuchstiergruppe im Laufe der Zeit weniger, erreicht jedoch nie die der Vergleichsgruppen. Grund hierfür könnte in den ersten postoperativen Tagen eine allgemeine Schwächung der ischämisch geschädigten Tiere sein. Dieser Effekt wurde bereits beim Angstverhalten diskutiert, und auch in diesem Fall zeigt sich dessen Persistenz über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg. Auch die Zeit, die vergeht, bis die erste Futterbelohnung gefunden und gefressen werden kann, nimmt bei den Tieren der Nativ- und Sham-Gruppe tendenziell ab und erreicht etwa zwei Wochen nach der Operation eine stabile Plateauphase, die bis zum Versuchsende gehalten werden kann. Anders jedoch bei den Tieren der BCAO-Gruppe. Hier besteht erneut ein signifikanter Unterschied zu den anderen Versuchsgruppen. Ihnen gelingt es praktisch bis zum zehnten Versuchstag nicht, ihre Explorationsleistung zu steigern. Zusammenfassend zeigt sich, dass die ischämisch geschädigten Tiere die ängstlicheren und zugleich diejenigen mit einer geringeren Explorationsneigung sind.

Feinmotorik

Vergebliche Lochbesuche treten signifikant häufiger bei den Tieren der BCAO-Gruppe auf. Dies zeigt, dass die ischämisch geschädigten Tiere sich in ihrer grobmotorischen Funktion zwar erholen (Tag 7), ein feinmotorisches Defizit hingegen bestehen bleibt.

4.2.5 Hirngewebsuntersuchungen

H.E.-Färbung

In vorangehenden Studien zur zerebralen Ischämie konnte bereits ein selektiver Verlust an Neuronen in der besonders vulnerablen CA1-Region des Hippokampus zusammen mit einer Beeinträchtigung kognitiver Funktionen nachgewiesen werden [AUER et al. 1989]. Dieser Befund konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Bei den Tieren, die einer zerebralen Ischämie unterzogen wurden (BCAO-Gruppen), lag die Anzahl eosinophiler Neurone signifikant über der nicht operierter Nativtiere. Scheinoperierte Tiere haben ebenfalls signifikant mehr eosinophile Neuronen, jedoch im direkten Vergleich zu der Anzahl eosinophiler Neurone der ischämisch geschädigten Tiere etwa um den Faktor 6 weniger.

Diese Befunde verdeutlichen, dass die ischämische Schädigung tatsächlich zu einem Nervenzelluntergang im Hippokampus der Tiere führte. Der Unterschied zu den Tieren der

Sham-Gruppe erklärt sich aus der nicht stattgefundenen ischämischen Schädigung. Dennoch zeigten auch die scheinoperierten Tiere einen Anstieg des Anteils eosinophiler und damit geschädigter Neurone. Dieser Anstieg kann dem operativen Trauma als solchem angelastet werden, da eine intraoperative Ischämie durch die engmaschige Kontrolle der Vitalparameter (BGA) ausgeschlossen werden kann. Inwieweit dieser Effekt als Folge der Isofluran-Narkose gewertet werden muss, kann mit diesem Studiendesign nicht abschließend beantwortet werden. Für Isofluran gibt es zudem widersprüchliche Berichte in der Literatur. So beschreibt M. Kawaguchi neuroprotektive Wirkungen [KAWAGUCHI et al. 2000], G.Zhang konnte jedoch beispielsweise eine Neurotoxizität von Isofluran nachweisen [ZHANG et al. 2008]. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang zwar eine perioperative Hypoxie z.B. aufgrund einer noch bestehenden Narkosenachwirkung und konsekutiver Hypoventilation der Tiere. Dies kann jedoch ausgeschlossen werden, da vor der Extubation der Tiere auf die Etablierung einer stabilen Spontanatmung geachtet wurde. Durch die standardisierte postoperative Nachbeobachtung können zudem akute Atemstillstände innerhalb dieser Phase ebenfalls ausgeschlossen werden. Welchem Faktor der somit beschriebene Schaden, der hier im Gegensatz zur BCAO-Gruppe nicht mit einer neurokognitiven Beeinträchtigung der Tiere einherging, innerhalb der scheinoperierten Versuchstiergruppe zugerechnet werden kann, bleibt letztlich ungeklärt. Denkbar wären jedoch, dass es sich um eine vorübergehende Erscheinung handelt, die mit motorischen und neurokognitiven Beeinträchtigungen nicht ursächlich in Zusammenhang steht. Es lässt sich feststellen, dass sich die Tiere, die einer ischämischen Schädigung ausgesetzt wurden, durch eine deutlich höhere Anzahl eosinophiler Zellen im Bereich des gesamten Hippokampus auszeichnen. Eben diese Tiere zeigten zudem in der vorliegenden Untersuchung auch eine schlechtere Lernleistung und eine Einschränkung ihrer deklarativen Gedächtnisfunktion im Hole-Board-Test.

Immunhistochemische Doppelfärbung

NFκB

In den als Negativkontrolle mitgefärbten Präparaten der unbehandelten Nativtiere konnten wie erwartet nur wenige NFκB-positive Neurone nachgewiesen werden (0,12%). Dieser Befund deckt sich mit dem in der H.E.-Färbung nachgewiesenen relativ geringen Anteil eosinophiler Neurone in dieser Gruppe. Bei allen Tieren, die einem operativen Eingriff unterzogen wurden, zeigte sich ein Anstieg des Anteils NFκB-positiver Neurone an der Gesamtneuronenzahl des

Hippokampus. Besonders deutlich ausgeprägt war dieser Effekt zum ersten Untersuchungszeitpunkt (Tag 7). Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg bei den Tieren, die einer zerebralen Ischämie unterzogen wurden. Tiere die am 21. Beobachtungstag getötet wurden zeigten im Vergleich zu BCAA 7 deutlich niedrigere NFκB-Werte.

Die erhöhten Werte bei den Tieren der Sham-Gruppen könnten mit dem operativen Trauma und einer konsekutiven neuroinflammatorischen Reaktion erklärt werden (siehe HE-Färbung). Somit kann man feststellen, dass die Tiere der BCAA-Gruppe durch eine erhöhte Anzahl NFκB exprimierender Neurone am siebten und 21 Versuchstag auffallen. Dies bestätigt Voruntersuchungen die eine postischämische Aktivierung von NFκB in Neuronen [SCHNEIDER et al. 1999] [STEPHENSON et al. 2000] und Gliazellen [CARROLL et al. 1998] nachweisen konnten. Diese Ergebnisse spiegeln zudem den zeitlichen Verlauf einer neuroinflammatorischen Reaktion im Gehirn der Tiere wieder. Diese zeichnet sich in der vorliegenden Untersuchung mit einem Maximum am siebten postoperativen Tag aus und nimmt bis zum Versuchsende am 21. Beobachtungstag wieder ab. Diese Beobachtungen decken sich mit Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf einer zerebralen NFκB-Expression nach einem tief hypothermen Kreislaufstillstand im Rattenmodell (DHCA). In dieser Studie zeigte sich ein maximaler Anstieg am ersten postoperativen Untersuchungstag und eine anhaltende Erhöhung im Bereich des motorischen Kortex bis zum Versuchsende (Tag 28) [KELLERMANN et al. 2009].

COX-2

Erneut zeigt sich bei den als Negativkontrolle gefärbten Hirnschnitten der Nativtiere ein relativ geringer Anteil COX-2 exprimierender Neurone (0,47 %). Anders verhält es sich hingegen in den Schnittpräparaten der ischämisch geschädigten Tiere (BCAA). Hier kommt es nach der ersten postoperativen Woche zu einem signifikanten Anstieg mit einer praktischen Verzehnfachung COX-2 exprimierender Neurone [AHAMAD et al. 2009]. Zu Studienende (Tag 21) ist dieser Wert im Vergleich zu Tag 7 nach der Ischämie zwar bereits wieder stark abgefallen, bleibt jedoch im Vergleich zu den Nativtieren signifikant erhöht. Der hier beschriebene Verlauf, der für COX-2 auf eine im Zeitverlauf abfallende Aktivierungsreaktion hinweist, lässt sich an den scheinoperierten Tieren (Sham) hingegen nicht nachvollziehen und liegt bei diesen nach sieben Tagen sogar innerhalb des Konfidenzintervalls der Werte der Nativtiere. Hier zeigt sich, dass die hippokampalen Neurone der Tiere der BCAA-Gruppe am

Tag 7 und 21 der Untersuchung signifikant mehr COX-2 freisetzen, und dass diese Tiere, wie bereits gezeigt, gleichzeitig eine deutliche kognitive Beeinträchtigung aufweisen. Dies deckt sich mit Berichten über einen möglichen Zusammenhang zwischen erhöhter COX-2-Aktivität im Hippokampus und einer eingeschränkten Gedächtnisfunktion [RALL et al. 2003]. In diesem Kontext könnten nun die Syntheseprodukte der Zyklooxygenasen, die Prostaglandine und insbesondere PGE₂, regelhaft erhöht im Rahmen eines Schlaganfalls in den infarzierten Hirnarealen [SAIRANEN et al. 1998], von Interesse sein.

TNF- α

In den als Negativkontrolle mitgefärbten Präparaten der unbehandelten Nativtiere findet sich erwartungsgemäß nur ein relativ geringer Anteil TNF- α positiver Neurone (0,5 %). Dies deckt sich mit Ergebnissen von C.D. Breder, der zeigen konnte das Neurone unter physiologischen Bedingungen lediglich geringe Mengen TNF- α synthetisieren können [BREDER et al. 1993]. Erneut zeigt sich bei den ischämisch geschädigten Tieren ein signifikanter Anstieg am 7. und 21. postoperativen Tag. Die Tiere der Sham-Gruppen weisen gleichermaßen signifikant erhöhte Werte auf. Im direkten Vergleich zu der Anzahl TNF- α positiver Neurone der ischämisch geschädigten Tiere liegt diese jedoch etwa um den Faktor 2 darunter.

Auch dieser Befund deutet darauf hin, dass die hippokampalen Neurone der Tiere der BCAA-Gruppe am 7. und 21. Beobachtungstag mehr TNF- α freisetzen als die der scheinoperierten und Nativtiere zu diesem Zeitpunkt, erneut verbunden mit einer deutlichen kognitiven Beeinträchtigung. Da die immunkompetenten Zellen des ZNS (Astrozyten, Mikroglia, Neurone) nach entsprechender Stimulation (hier Ischämie) TNF- α freisetzen können, war der beschriebene Anstieg erwartet [BERTORELLI et al. 1998] [DAWSON et al. 1996] und konnte in der vorliegenden Studie selektiv an den Neuronen des Hippokampus untersucht und in seinem zeitlichen Verlauf, entsprechend nachgewiesen werden. Ein derartiger zeitlicher Verlauf der Freisetzung des TNF- α nach entsprechender Stimulation (Inflammation) lässt sich auch anhand anderer tierexperimenteller Modelle, wie etwa dem eines kardiopulmonalen Bypass an der Ratte nachweisen. Hier zeigt sich eine verstärkte TNF- α -Expression sowohl in der frühen (Tag 1) als auch späten (Tag 10) postoperativen Phase [JUNGWIRTH et al 2009].

Der leichte Anstieg TNF- α -exprimierender Neurone innerhalb der Sham-Gruppe könnte mit dem operativen Trauma an sich und der daraus folgenden Entzündungsreaktion erklärt werden.

Dies verdeutlicht das grundsätzliche Problem der gewählten inflammatorischen Parameter und deren Beurteilung bezüglich ihres möglichen Einflusses auf neurokognitive Prozesse. Alle sollten sich spezifisch in neuronalem Gewebe nachweisen lassen und dabei gleichzeitig die Schlüsselstellen der neuroinflammatorischen Kaskade abbilden. In eben dieser zentralen Position üben sie überaus komplexe und mannigfache Wechselwirkungen aus - etwa durch einen negativen Feedback-Mechanismus ihrer eigenen Aktivierung wie im NFκB-Signalweg [LE BAIL et al. 1993]. Dies bildet sich auch in den zum Teil widersprüchlichen Beobachtungen bezüglich erwarteter pro- und antiinflammatorischer Effekte ab [PAPARELLA et al. 2001]. Auch könnten sie anderweitig durch nicht ischämische Reize auf zellulärer Ebene durch andere Stoffwechselfvorgänge stimuliert worden sein. Diese „Beeinflussung“ ließe sich nur durch In-vitro-Versuche ausschließen, die eben eine Kontrolle dieser Vorgänge erlauben, würde dann jedoch eine Beurteilung kognitiver Funktionen, die nun einmal einen intakten und damit komplexen Gesamtorganismus voraussetzen, unmöglich machen. Hier stellt sich nun die Frage, zu welchem Teil die beobachteten Erhöhungen der inflammatorischen Parameter Folge der ischämischen Schädigung sind. Dies muss wohl differenziert betrachtet werden. So sieht man auch bei den scheinoperierten Tiergruppen einen Anstieg aller gewählten inflammatorischen Parameter (NFκB, TNF-α und COX-2), offensichtlich unabhängig einer ischämischen Schädigung – besonders deutlich bei TNF-α.

4.2.6 Ausblick

Das gleichzeitige Auftreten von persistierenden neurokognitiven Defiziten bei Tieren nach BCAO und der Nachweis einer erhöhten Anzahl NFκB-, TNF-α- und COX-2- positiver Neurone im Hippokampus lässt einen ursächlichen Zusammenhang zwischen verschlechterten neurokognitivem Outcome und postischämischer zerebraler Inflammationsreaktion vermuten. Allerdings kann ein solcher Zusammenhang auch in der vorliegenden Untersuchung nicht von einem Epiphänomen unterschieden werden. Zur Klärung dieser Fragestellung sind weitere Folgestudien erforderlich, die durch Verabreichung spezifischer Antagonisten die beobachtete zerebrale Inflammationsreaktion hemmen, um dann ihren Einfluss auf das postischämische neurokognitivem Outcome abschließend beurteilen zu können.

5. Zusammenfassung

Zerebrale Inflammationsreaktion und neurokognitive Defizite nach inkompletter Vorderhirnischämie im Rattenmodell

Neurokognitive Defizite nach einem Schlaganfall sind häufig und haben für die Betroffenen meist weitreichende und langfristige Folgen. Die Infarktentwicklung ist dabei ein dynamischer Prozess, der über Tage zu einer Zunahme der Läsionsgröße führen kann und stets in einer Defektheilung mit variablem neurologischem Defizit mündet. Entzündungsprozesse stellen dabei neben Exzitotoxizität, Radikalbildung und Apoptose einen wichtigen Teil der Läsionspathogenese dar. Ziel dieser Studie war, die zerebrale Inflammationsreaktion und neurokognitive Defizite nach inkompletter temporärer globaler Vorderhirnischämie am Rattenmodell anhand morphologischer und funktioneller Parameter nach 7 beziehungsweise 21 Tagen zu erfassen.

Methoden: Nach Einverständnis der Tierschutzkommission wurden 47 männliche Sprague-Dawley-Ratten randomisiert einer von drei Gruppen zugeteilt: Die Tiere der BCAA-Gruppe (n=20) wurden einer 10-minütigen bilateralen Karotisokklusion (BCAO) mit Hypotension (MAP=30 mmHg) unterzogen, die Tiere der Sham-Gruppe (n=20) wurden analog anästhesiert und katheterisiert, aber weder einer BCAA noch einer Hypotension ausgesetzt. Die Nativgruppe (n=7) wurde weder anästhesiert noch katheterisiert. Die Gruppen wurden weiter unterteilt in eine kurze und eine lange Überlebensgruppe. Die kurze Überlebensgruppe (n=10) wurde während sieben postoperativer Tage neurologisch untersucht. Danach wurden die Inflammationsparameter NFκB, TNF-α und COX-2 im Hippokampus immunhistochemisch bestimmt. Die lange Überlebensgruppe (n=10), wurde postoperativ über 21 Tage mit dem modifizierten Hole-Board-Test kognitiv untersucht, bevor auch in dieser Gruppe NFκB, TNF-α und COX-2 im Hippokampus immunhistochemisch bestimmt wurde. Die Gruppen wurden mit ANOVAs verglichen (p<0.05).

Ergebnisse: Alle BCAA-Tiere zeigen einen transienten neurologischen Schaden sowie ein über 21 Tage andauerndes kognitives Defizit. Dieses schlechtere neurokognitive Ergebnis nach BCAA geht im Vergleich zu den Kontrolltieren mit einer signifikant höheren Anzahl eosinophiler Neurone und einer signifikant erhöhten Anzahl NFκB-, COX-2- und TNF-α-positiver Neurone einher. Auch bei den Tieren der Sham-Gruppe kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Inflammationsparameter gegenüber den unbehandelten Nativtieren,

der aber deutlich geringer ausgebildet ist als bei den Tieren der BCAO-Gruppen. Die Sham-operierten Tiere zeigen kein kognitives Defizit.

	BCAO 7	BCAO 21	Sham 7	Sham 21
eosin. [Zellzahl]	859 ± 145*	741 ± 94*	130 ± 27*	148 ± 20*
NFκB [Zellzahl]	99 ± 10*	40 ± 6*	28 ± 4*	30 ± 4*
COX-2 [Zellzahl]	397 ± 62*	85 ± 9*	34 ± 6	69 ± 7*
TNF-α [Zellzahl]	376 ± 87*	184 ± 29*	323 ± 44*	90 ± 13*

Anzahl eosinophiler, NFκB-, COX-2- und TNF-α-positiver Neurone im gesamten Hippokampus (MW ± SEM)(MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Nativ)

Schlussfolgerung: Das Auftreten von persistierendem neurokognitivem Defizit bei Tieren nach BCAO und der Nachweis einer erhöhten Anzahl NFκB-, TNF-α- und COX-2- positiver Neurone im Hippokampus lässt einen ursächlichen Zusammenhang zwischen verschlechterten neurokognitivem Outcome und postischämischer zerebraler Inflammationsreaktion vermuten. Ob es hierbei letztendlich zu einen neuroinflammatorisch verursachten Untergang von Neuronen und einem damit verbundenen verschlechtertem neurokognitivem Outcome kommt, oder ob es sich bei dem beobachteten Anstieg der zerebralen Inflammationsparameter um ein reines Epiphänomen handelt, lässt sich aufgrund des Studiendesigns nicht abschließend beurteilen.

6. Summary

Cerebral inflammatory reaction and neuro-cognitive deficits after incomplete temporary global ischemia of the forebrain in the rat model

Neuro-cognitive deficits after an apoplexy are frequent and lead in many cases to a permanent handicap for the patient. The development of the infarct itself is a dynamic process, which can lead to a growth of the lesion area during several days and always ends in a healing of the defects involving variable neurological deficits. Inflammatory processes, excitotoxicity, the formation of radicals and apoptosis play an important part in the pathogenesis of the lesion. This study has aimed at comprehending the cerebral inflammatory reaction and neuro-cognitive deficits after transient cerebral hypoperfusion on the basis of the rat model with the help of morphological and functional parameters, after 7 and 21 days.

Methods: With the permission of the commission for animal welfare male Sprague Dawley rats were at random put into one of three groups: The animals of the BCAA group (n=20) were subjected to a 10-minute BCAA with hypotension (MAP=30mmHg), the animals of the sham group (n=20) were equally anesthetized and catheterized, yet without being subjected to a BCAA nor a hypotension, and the animals of the control group (n=7) were neither anesthetized nor catheterized. The groups were further divided into a group with short survival time and a group with longer survival time. The short survival group (n=10) was neurologically tested during 7 days after the surgery. Then the inflammatory parameters NFκB, COX-2- and TNF-α in the hippocampus were immunohistochemically stained. The longer survival group (n=10) was cognitively tested with the modified hole board test until the 21st day after the surgery, followed by an analysis of the inflammatory parameters NFκB, COX-2- and TNF-α. The groups were compared with ANOVAs (p<0.05).

Results: All BCAA animals show a transient neurological damage and a disturbance of cognitive functions over 21 days. The inferior neuro-cognitive result after BCAA is accompanied by a significantly higher number of eosinophil neurons and a significantly higher number of NFκB, COX-2- and TNF-α-positive neurons as compared to control group. The animals of the sham group also show a significant increase of these inflammatory parameters in comparison to the animals of the untreated control group. This increase is, however, manifestly

lower than in the animals of the BCAA groups. The animals of the sham group show no neuro-cognitive deficit.

	BCAO 7	BCAO 21	Sham 7	Sham 21
eos. [nr.]	859 ± 145*	741 ± 94*	130 ± 27*	148 ± 20*
NFκB [nr.]	99 ± 10*	40 ± 6*	28 ± 4*	30 ± 4*
COX-2 [nr.]	397 ± 62*	85 ± 9*	34 ± 6	69 ± 7*
TNF-α [nr.]	376 ± 87*	184 ± 29*	323 ± 44*	90 ± 13*

Total number of eosinophilic, NFκB-, COX-2- and TNF-α-positiv neurons in the hippocampus (MW ± SEM) (MW ± SEM) (* p < 0.05 versus native animals)

Conclusion: The occurrence of a persistent neuro-cognitive deficit in animals after BCAA and an increased number of NFκB-, COX-2- and TNF- α -positive neurons in the hippocampus in BCAA as well as in animals of the sham group show a correlation between the inferior neurological results and the cerebral inflammation. It is not possible to assess whether the inflammatory processes lead to the dying of neurons and thus to the deficits in the neurological tests, or if the increase of these inflammatory parameters is a pure epiphenomenon.

7. Literaturverzeichnis

ADAMS HP, BROTT TG, FURLAN AJ, GOMEZ CR, GROTTA J, HELGASON CM, KWIATKOWSKI T, LYDEN PD, MARLER JA, TORNER J, FEINBERG W, MAYBERG M, THIES W

Guidelines for thrombolytic therapy for acute stroke: a supplement to the guidelines for the management of patients with acute ischemic stroke. A statement for healthcare professionals from a Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association
Circulation. 1996; 94(5): 1167-1174

AGGARWAL BB, KOHR WJ, HASS PE, MOFFAT B, SPENCER SA, HENZEL WJ, BRINGMAN TS, NEDWIN GE, GOEDDEL DV, HARKINS RN

Human tumor necrosis factor: production, purification and characterization
J Biol Chem. 1985; 260(4): 2345-2354

AHMAD M, ZHANG Y, LIU H, ROSE ME, GRAHAM SH.

Prolonged opportunity for neuroprotection in experimental stroke with selective blockade of cyclooxygenase-2 activity
Brain Res. 2009; 1279: 168-173

AMARAL DG, WITTER MP

Hippocampal formation In: PAXINOS G (Hrsg.) The Rat Nervous System
Academic Press, San Diego, USA 1995; 443-493

ARCHER J

Tests for emotionality in rats and mice: a review
Anim Behav. 1973; 21(2): 205-235

AUER RN, JENSEN ML, WHISHAW IQ

Neurobehavioral deficit due to ischemic brain damage limited to half of the CA1 sector of the hippocampus
J Neurosci. 1989; 9(5): 1641-1647

BADDELEY A

Working memory
C R Acad Sci. III. 1998; 321(2-3): 167-173

BADDELEY A

The episodic buffer: a new component of working memory?
Trends Cogn Sci. 2000; 4(11): 417-423

BAEUERLE PA, BALTIMORE D

NF-kappa B: ten years after
Cell. 1996; 87(1): 13-20

BAEUERLE PA, HENKEL T

Function and activation of NF-kappa B in the immune system
Annu Rev Immunol. 1994; 12: 141-179

BALLESTAS ME, BENVENISTE EN

Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of ICAM-1 gene expression in astrocytes requires protein kinase C activity
Glia. 1995; 14(4): 267-278

BARNES PJ, KARIN M

Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases
N Engl J Med. 1997; 336(15): 1066-1071

BARNHART BC, PIETRAS EM, ALGECIRAS-SCHIMNICH A, SALMENA L, SAYAMA K, HAKEM R, PETER ME

CD95 apoptosis resistance in certain cells can be overcome by noncanonical activation of caspase-8
Cell Death Differ. 2005; 12(1): 25-27

BARONE FC, PRICE WJ, WHITE RF, WILLETTE RN, FEUERSTEIN GZ

Genetic hypertension and increased susceptibility to cerebral ischemia
Neurosci Biobehav Rev. 1992; 16(2):219-233

BELZUNG C, LE PAPE G

Comparison of different behavioural test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety
Physiol Behav. 1994; 56(3): 623-628

BENVENISTE EN

Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action
Am J Physiol. 1992; 263(1): C1-C16

BENVENISTE EN, BENOS DJ

TNF- α - and IFN- γ -mediated signal transduction pathways: effects on glial cell gene expression and function
FASEB J. 1995; 9(15): 1577-1584

BERTORELLI R, ADAMI M, DI SANTO E, GHEZZI P

MK 801 and dexamethasone reduce both tumor necrosis factor levels and infarct volume after focal cerebral ischemia in the rat brain
Neurosci Lett. 1998; 246(1): 41-44

BLATTEIS CM

The afferent signalling of fever
J Physiol. 2000; 526(3): 470

BLISS TV, COLLINGRIDGE GL

A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus
Nature. 1993; 361(6407): 31-39

BONITA R, MENDIS S, TRUELSEN T, BOGOUSSLAVSKY J, TOOLE J, YATSU F

The global stroke initiative
Lancet Neurol. 2004; 3(7): 391-393

BREDER CD, TSUJIMOTO M, TERANO Y, SCOTT DW, SAPER CB

Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system

J Comp Neurol. 1993; 337(4): 543-567

BROADHURST PL

Determinants of emotionality in the rat: I. Situational factors

Brit J Psychol. 1957; 48(1): 1-12

BRUNE K, HINZ B

Zum aktuellen Stand der Zyklooxygenase-Forschung

Dtsch Arztebl Int. 1998; 95(35): A-343-346

CARROLL JE, HOWARD EF, HESS DC, WAKADE CG, CHEN Q, CHENG C

Nuclear factor-kappa B activation during cerebral reperfusion: effect of attenuation with N-acetylcysteine treatment

Brain Res Mol Brain Res. 1998; 56(1-2): 186-191

CHANDRASEKHARAN NV, DAI H, ROOS KL, EVANSON NK, TOMSIK J,

ELTON TS, SIMMONS DL

COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen

and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression

Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(21): 13926-13931

CHAPPLE DJ, MILLER AA, WARD JB, WHEATLEY PL

Cardiovascular and neurological effects of laudanosine. Studies in mice and rats, and in conscious and anaesthetized dogs

Br J Anaesth. 1987; 59(2): 218-225

CHARLES RIVER

Clinical Laboratory Parameters for Crl: CD (SD) Rats (2006)

www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_r_clinical_parameters_cd_rat_06.pdf

Stand: 07.03.2010

CHEN C, MAGEE JC, BAZAN NG

Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signalling in hippocampal long-term synaptic plasticity

J Neurophysiol. 2002; 87(6): 2851-2857

COMBS DJ, D'ALECY LG

Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butanediol

Stroke. 1987; 18: 503-511

DARDAI E, HEAVNER J

Respiratory and cardiovascular depressant effects of inhalation anesthetic delivered via the Jackson-Rees breathing system

Veterinary Surgery 1987; 16: 319-321

DAWSON DA, MARTIN D, HALLENBECK JM

Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces focal cerebral ischemic injury in the spontaneously hypertensive rat
Neurosci. Lett. 1996; 218(1): 41-44

DIRNAGEL U, IADECOLA C, MOSCOWITZ MA

Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view
Trends Neurosci. 1999; 22(9): 391-397

EICHENBAUM H

A cortical-hippocampal system for declarative memory
Nat Rev Neurosci. 2000; 1(1): 41-50

EKLÖF B, SIESJÖ BK

Cerebral blood flow in ischemia caused by carotid artery ligation in the rat
Acta Physiol Scand. 1973; 87(1): 69-77

FEENEY DM, GONZALEZ A, LAW WA

Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury
Science. 1982; 217(4562): 855-857

FILE SE, WARDILL AG

The reliability of the hole-board apparatus
Psychopharmacologia. 1975^a; 44(1): 47-51

FILE SE, WARDILL AG

Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board
Psychopharmacologia. 1975^b; 44(1): 53-59

FUNK CD

Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology
Science. 2001; 294 (5548): 1871-1875

GAZZANIGA MS

The Cognitive Neurosciences
MIT-Press Massachusetts 1995: 825-837

GRØGAARD B, GERDIN B, ARFORS KE

Forebrain ischemia in the rat. Relation between duration of ischemia, use of adjunctive ganglionic blockade and long term recovery
Stroke. 1986; 17: 1010-1015

GV-SOLAS

Tiergerechte Haltung von Laborratten
Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung 2004: 1-12

HALL CS

Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality
Journal of Comparative & Physiological Psychology 1934; 18(3): 385-403

HAYAISHI O

Molecular mechanisms of sleep-wake regulation: roles of prostaglandins D2 and E2
FASEB J. 1991; 5: 2575-2581

HAYDEN MS, GHOSH S

Signaling to NF- κ B
Genes Dev. 2004; 18: 2195-2224

HO YJ, EICHENDORFF J, SCHWARTING RK

Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression
Behav Brain Res. 2002; 136(1): 1-12

HODGES H

Maze procedures: the radial-arm and watermaze compared
Brain Res Cogn Brain Res. 1996; 3(3-4):167-181

HOFF JT

Cerebral protection
J Neurosurg. 1986; 65(5): 579-591

HOFFMAN WE, BRAUCHER E, PELLIGRINO DA, THOMAS C, ALBRECHT RF, MILETICH DJ

Brain lactate and neurologic outcome following incomplete ischemia in fasted, nonfasted and glucose-loaded rats
Anesthesiology. 1990; 72: 1045-1050

HORIGUCHI S, UENO R, HYODO M, HAYAISHI O

Alterations in nociception after intracisternal administration of prostaglandin D2, E2 or F2 alpha to conscious mice
Eur J Pharmacol. 1986; 122(2): 173-179

INTISO D, ZARELLI MM, LAGIOIA G, DI RIENZO F, CHECCHIA DE AMBROSIO FC; SIMONE P, TONALI P, CHIOFFI DAGGER RP

Tumor necrosis factor alpha serum levels and inflammatory response in acute ischemic stroke patients
Neurol Sci. 2004; 24(6): 390-396

JARRARD LE, FELDON J, RAWLINS JN, SINDEN JD, GRAY JA

The effects of intrahippocampal ibotenate on resistance to extinction after continuous or partial reinforcement
Exp Brain Res. 1986; 61(3): 519-530

JUNGWIRTH B, ECKEL B, BLOBNER M, KELLERMANN K, KOCHES EF, MACKENSEN GB

The impact of cardiopulmonary bypass on systemic interleukin-6 release, cerebral nuclear factor-kappa B expression, and neurocognitive outcome in rats
Anaesth Analg. 2010; 110(2): 312-320

JUNGWIRTH B, KELLERMANN K, QING M, MACKENSEN GB, BLOBNER M; KOCHS EF

Cerebral tumor necrosis factor alpha expression and long-term neurocognitive performance after cardiopulmonary bypass in rats
J Thorac and Cardiovasc Surg. 2009; 138(4): 1002-1007

KANDEL ER, HAWKINS RD

The biological basis of learning and individuality
Sci Am. 1992; 267(3): 78-86

KANDEL ER, PITTENGER C

The past, the future and the biology of memory storage
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1999; 354(1392): 2027-2052

KATO H, KOGURE K

Biochemical and molecular characteristics of the brain with developing cerebral infarction
Cell Mol Neurobiol. 1999; 19(1): 93-108

KAWAGUCHI M, KIMBRO JR, DRUMMOND JC, COLE DJ, KELLY PJ, PATEL PM

Isoflurane delays but does not prevent cerebral infarction in rats subjected to focal ischemia
Anesthesiology. 2000; 92(5): 1335-1342

KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics
Br J Cancer. 1972; 26(4): 239-257

KELLERMANN K, GORDAN ML, NOLLERT G, BLOBNER M, KOCHS EF, JUNGWIRTH B

Long-term assessment of NFkappaB expression in the brain and neurologic outcome following deep hypothermic circulatory arrest in rats
Perfusion. 2009; 24(6) 429-436

KHAN M, SEKHON B, GIRI S, JATANA M, GILG AG, AYASOLLA K, ELANGO C, SINGH AK, SINGH I

S-Nitrosoglutathione reduces inflammation and protects brain against focal cerebral ischemia in a rat model of experimental stroke
J Cereb Blood Flow Metab. 2005; 25(2):177-192

KOCHS E, KRIER C, BUZELLO W, ADAMS HA

Anästhesiologie – ains Band 1
Thieme Verlag Stuttgart 2001; 249

KOFKE WA, GARMAN RH, TOM WC, ROSE ME, HAWKINS RA

Alfentanil-induced hypermetabolism, seizure, and histopathology in rat brain
Anesth Analg. 1992; 75(6): 953-964

KOLB B, WHISHAW IQ

An observer's view of locomotor asymmetry in the rat
Neurobehav Toxicol Teratol. 1985; 7(1):71-78

KOLOMINSKY-RABAS PL, HEUSCHMANN PU
Incidence, etiology and long-term prognosis of stroke
Fortschr Neurol Psychiatr. 2002; 70(12): 657-662

KOOLMAN J, RÖHM KH
Taschenatlas der Biochemie
Thieme Verlag Stuttgart 2003; 3 Auflage: 146

LE BAIL O, SCHMIDT-ULLRICH R, ISRAËL A
Promoter analysis of the gene encoding the I kappa B-alpha/MAD3 inhibitor of
NF-kappa B: positive regulation by members of the rel/NF-kappa B family
EMBO J. 1993; 12(13): 5043-5049

LEI B, POPP S, CAPUANU-WATERS C, COTTRELL JE, KASS IS
Lidocaine attenuates apoptosis in the ischemic penumbra and reduces infarct size after
transient focal cerebral ischemia in rats
Neuroscience. 2004; 125 (3): 691-701

LEVINE AS, MORLEY JE
The effect of prostaglandins (PGE2 and PGF2 alpha) on food intake in rats
Pharmacol Biochem Behav. 1981; 15(5): 735-738

LIU S, LEVINE SR, WINN HR
Targeting ischemic penumbra: part I – from pathophysiology to therapeutic strategy
J Exp Stroke Transl Med. 2010; 3(1): 47-55

MAIER CM, YU F, NISHI T, LATHROP SJ, CHAN PH
Interferon-beta fails to protect in a model of transient focal stroke
Stroke. 2006; 37(7): 1116-1119

MARKGRAF CG, CLIFTON GL, AGUIRRE M, CHANEY SF, KNOX-DU BOIS C,
KENNON K, VERMA N
Injury severity and sensitivity to treatment after controlled cortical impact in rats
J Neurotrauma. 2001; 18(2): 175-86

MARY V, WAHL F, UZAN A, STUTZMANN JM
Enoxaparin in experimental stroke: neuroprotection and therapeutic window of opportunity
Stroke. 2001; 32(4): 993-999

MATHEW JP, MACKENSEN GB, PHILLIPS-BUTE B, GROCOTT HP, GLOWER DD,
LASKOWITZ DT, BLUMENTHAL JA, NEWMAN MF
Randomized, double-blinded, placebo controlled study of neuroprotection with Lidocaine in
cardiac surgery
Stroke. 2009; 40(3): 880-887

MCEWEN BS, SAPOLSKY RM
Stress and cognitive function
Curr Opin Neurobiol. 1995; 5(2): 205-216

MILLER GA

The magical number seven, plus or minus two: some limits in our capacity for processing information

Psychol Rev. 1956; 63(2): 81-97

MILNER B, SQUIRE LR, KANDEL ER

Cognitive neuroscience and the study of memory

Neuron. 1998; 20(3): 445-468

MORIMOTO Y, MORIMOTO Y, BART RD, PEARLSTEIN RD, DEXTER F, WARNER DS

High-dose fentanyl does not adversely affect outcome from forebrain ischemia in the rat

J Neurosurg Anesthesiol. 1997; 9(4): 316-323

MORITA I

Distinct functions of COX-1 and COX-2

Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002; 68-69: 165-175

MUMMENTHALER M, MATTLE H

Neurologie

Thieme Verlag 1997; 10. Auflage: 218-220

MURAKAMI K, KONDO T, KAWASE M, CHAN PH

The development of a new mouse model of global ischemia: focus on the relationships between ischemia duration, anesthesia, cerebral vasculature, and neuronal injury following global ischemia in mice

Brain Res. 1998; 780(2): 304-310

MURRAY CJL, LOPEZ AD

Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study

Lancet. 1997 ^a; 349(9061): 1269-1276

MURRAY CJL, LOPEZ AD

Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study

Lancet. 1997 ^b; 349(9064): 1498-1504

OH JW, VAN WAGONER NJ, ROSE-JOHN S, BENVENISTE EN

Role of IL-6 and the soluble IL-6 receptor in inhibition of VCAM-1 gene expression

J Immunol. 1998; 161(9): 4992-4999

OHL F

Testing for anxiety

Clin Neurosci Res. 2003; 3(4-5): 233-238

OHL F, FUCHS E

Memory performance in tree shrews: effects of stressful experiences

Neurosci Biobehav Rev. 1998 ^b; 23(2): 319-323

OHL F, HOLSBOER F, LANDGRAF R

The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents
Behav Res Methods Instrum Comput. 2001^b; 33(3): 392-397

OHL F, KECK ME

Behavioral screening in mutagenised mice - in search for novel animal models of psychiatric disorders
Eur J Pharmacol. 2003; 480(1-3): 219-228

OHL F, OITZL MS, FUCHS E

Assessing cognitive functions in tree shrews: visuo-spatial and spatial learning in the home cage
J Neurosci Methods. 1998^a; 81(1-2): 35-40

OHL F, ROEDEL A, STORCH C, HOLSBOER F, LANDGRAF R

Cognitive performance in rats differing in their inborn anxiety
Behav Neurosci. 2002; 116(3): 464-471

OHL F, SILLABER I, BINDER E, KECK ME, HOLSBOER F

Differential analysis of behaviour and diazepam-induced alterations in C57Bl/6N and BALB/c mice using the modified hole board test
J Psychiatr Res. 2001^c; 35(3): 147-154

OHL F, TOSCHI N, WIGGER A, HENNIGER MS, LANDGRAF R

Dimensions of emotionality in a rat model of innate anxiety
Behav Neurosci. 2001^a; 115(2): 429-36

OHLSSON AL, JOHANSSON BB

Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats
Stroke. 1995; 26:644-649

OLTON DS, BECKER J, HANDELMANN G

Hippocampus, space and memory
Behav Brain Sci. 1979; 2:313-65

PAPARELLA D, YAU TM; YOUNG E

Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update.
Eur J Cardiothorac Surg. 2002; 21(2): 232-244

PAXINOS G, WATSON C

The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates
Academic Press, San Diego, 1998

PRUT L, BELZUNG C

The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review
Eur J Pharmacol. 2003; 463(1-3): 3-33

PULSINELLI WA, BRIERLEY JB, PLUM F

Temporal profile of neuronal damage in model of transient forebrain ischemia
Ann Neurol. 1982; 11(5): 491-498

RALL JM, MACH SA, DASH PK

Intrahippocampal infusion of a cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates memory acquisition in rats
Brain Res. 2003; 968(2): 273-276

REITH J, JØRGENSEN HS, PEDERSEN PM, NAKAYAMA H, RAASCHOU HO, JEPPESEN LL, OLSEN TS

Body temperature in acute stroke: relation to stroke severity, infarct size, mortality and outcome
Lancet. 1996; 347(8999): 422-425

ROMEIS

Mikroskopische Technik

Mulisch M, Welsch U (Hrsg.)

Spectrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010; 18. Auflage; 181-293

ROTHWELL NJ, RELTON JK

Involvement of cytokines in acute neurodegeneration in the CNS
Neurosci Biobehav Rev. 1993; 17(2): 217-227

SAIRANEN T, RISTIMÄKI A, KARJALAINEN-LINDSBERG ML, PAETAU A; KASTE M, LINDSBERG PJ

Cyclooxygenase-2 is induced globally in infarcted human brain
Ann Neurol. 1998; 43(6): 738-747

SCHNEIDER D, RICHLING F

Checkliste Arzneimittel A-Z

Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2008

SCHNEIDER A, MARTIN-VILLALBA A, WEIH F, VOGEL J, WIRTH T, SCHWANINGER M

NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia
Nat Med. 1999; 5(5): 554-559

SIEBENLIST U, FRANZOSO G, BROWN K

Structure, regulation and function of NF-kappa B

Ann Rev Cell Biol. 1994; 10: 405-455

SIEGENTHALER W

Klinische Pathophysiologie

Thieme Verlag Stuttgart 2001; 1087-1104

SIEGENTHALER W

Klinische Pathophysiologie

Thieme Verlag Stuttgart 2001^b; 540-541

SIESJÖ BK

Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia; Part I: Pathophysiology
J Neurosurg. 1992; 77(2): 169-184

SIESJÖ BK, KATSURA K, ZHAO Q, FOLBERGROVÁ J, PHALMARK K, SIESJÖ P, SMITH ML

Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis
J Neurotrauma. 1995; 12(5): 943-56

SMITH ML, AUER RN, SIESJÖ BK

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

Acta Neuropathol. 1984; 64(4): 319-332

SMITH WL, DEWITT DL, GARAVITO RM

Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology

Annu Rev Biochem. 2000; 69: 145-182

SOBLOSKY JS, MATTHEWS MA, DAVIDSON JF, TABOR SL, CAREY ME

Traumatic brain injury of the forelimb and hindlimb sensorimotor areas in the rat: physiological, histological and behavioral correlates.

Behav Brain Res. 1996; 79(1-2):79-92

SOONTHON-BRANT V, PATEL PM, DRUMMOND JC, COLE DJ, KELLY PJ, WATSON M

Fentanyl does not increase brain injury after focal cerebral ischemia in rats

Anesth Analg. 1999; 88(1): 49-55

SQUIRE LR (1998)

Memory systems

C R Acad Sci III. 1998; 321(2-3): 153-156

SQUIRE LR, ZOLA-MORGAN S

The medial temporal lobe memory system

Science. 1991; 253(5026): 1380-1386

STAIR

Stroke Therapy Academic Industry Roundtable – Special Report

Recommendations for Standards Regarding Preclinical

Neuroprotective and Restorative Drug Development

Stroke. 1999; 30: 2752-2758

STÄHELIN HB, EVISON J, SEILER WO

Prävention des zerebrovaskulären Insults

Schweiz Med Wochenschr. 1994; 124(45): 1995-2004

STANIMIROVIC D, SATHO K

Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation

Brain Pathol. 2000; 10(1): 113-126

STATISTISCHES BUNDESAMT

Bevölkerungsentwicklung in Deutschland bis 2060 – Pressekonferenz am 18.11.2009

www.destatis.de/bevoelkerungspyramide

Stand: 07.12.2009^b

STATISTISCHES BUNDESAMT
Gesundheitswesen
Statistisches Jahrbuch 2009^a; 9: 236-261

STECKLER T, MUIR JL
Measurement of cognitive function: relating rodent performance with human minds
Brain Res Cogn Brain Res. 1996; 3(3-4): 299-308

STEPHENSON D, YIN T, SMALSTIG EB, HSU MA, PANETTA J, LITTLE S,
CLEMENS J
Transcription factor nuclear factor-kappa B is activated in neurons after focal
cerebral ischemia
J Cereb Blood Flow Metab. 2000; 20(3): 592-603

SUGAWARA T, KAWASE M, LEWEN A, NOSHITA N, GASCHÉ Y, FUJIMURA M,
CHAN PH
Effect of hypotension severity on hippocampal CA1 neurons in a rat global ischemia model
Brain Res. 2000; 877(2): 281-287

SYKORA M, DIEDLER J, POLI S, RUPP A, TURCANI P, STEINER T
Blood pressure course in acute stroke relates to baroreflex dysfunction
Cerebrovasc Dis. 2010; 30(2): 172-179

TAK PP, FIRESTEIN GS
NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases
J Clin Invest. 2001; 107(1): 7-11

TOKU K, TANAKA J, YANO H, DESAKI J, ZHANG B, YANG L, ISHIHARA K,
SAKANAKA M, MAEDA N
Microglial cells prevent nitric oxide-induced neuronal apoptosis in vitro
J Neurosci Res. 1998; 53(4): 415-425

TRAYSTMAN RJ
Animal models of focal and global cerebral ischemia
ILAR J. 2003; 44(2): 85-95

TULVING E
Organisation of memory, quo vadis
In: GAZZANIGA MS (Hrsg.)
The Cognitive Neurosciences
MIT-Press Massachusetts 1995; 839-850

VANICKY I, MARSALA M, MURÁR J, MARSALA J
Prolonged postischemic hyperventilation reduces acute neuronal damage after 15 min of
cardiac arrest in the dog
Neurosci Lett. 1992; 135(2): 167-170

WARD A, PAYNE KA, CARO JJ, HEUSCHMANN PU, KOLOMINSKY-RABAS PL
Care needs and economic consequences after acute ischemic stroke: the Erlangen Stroke
Project
Eur J Neurol. 2005; 12(4): 264-267

WARNER DS, GIONET TX, TODD MM, MCALLISTER A
Insulin-induced normoglycemia improves ischemic outcome in hyperglycemic rats
Stroke. 1992; 23(12): 1775-1781

WERNER C
Wirken Anästhetika hirnpotektiv?
Anästhesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie (AINS) 1993; 28: 92-97

WERNER C
Milde und moderate Hypothermie in der Anästhesie und Intensivmedizin – Neuroprotektive Ansätze
Deutsche Akademie für Anästhesisten (Hrsg.)
Refresher Course – Aktuelles Wissen für Anästhesisten
Springer Verlag 1997; 189-197

WHISHAW IQ, HAUN F, KOLB B
Analysis of behavior in laboratory rodents
In: WINDHORST U, JOHANSSON H (Hrsg.)
Modern Techniques in Neuroscience Research
Springer-Verlag 1999: 1243-71

WIESNER G, GRIMM J, BITTNER E
Schlaganfall: Prävalenz, Inzidenz, Trend, Ost-West-Vergleich. Erste Ergebnisse aus dem Bundes-Gesundheitssurvey 1998
Gesundheitswesen 1999; 61 (2): 79-84

WOLF HK, BUSLEI R, SCHMIDT-KASTNER PK, PIETSCH T, WIESTLER OD, BLÜMCKE I
NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology
J Histochem Cytochem. 1996; 44(10): 1167-1171

WOODY CD
Understanding the cellular basis of memory and learning
Ann Rev Psychol. 1986; 37: 433-493

YAMORI Y, HORIE R, HANDA H, SATO M, FUKASE M
Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans
Stroke. 1976; 7(1): 46-53

ZHANG G, DONG Y, ZHANG B, ICHINOSE F; WU X, CULLEY DJ, CROSBY G, TANZI RE, XIE Z
Isoflurane-induced caspase-3 activation is dependent on cytosolic calcium and can be attenuated by memantine
J Neurosci. 2008; 28(17): 4551-4560

ZHANG W, POTROVITA I, TARABIN V, HERRMANN O, BEER V, WEIH F, SCHNEIDER A, SCHWANINGER M
Neuronal activation of NF-kappaB contributes to cell death in cerebral ischemia
J Cereb Blood Flow Metab. 2005; 25(1): 30-40

ZHAO X, LIU SL, ZHANG J, STRONG R, ARONOWSKI J, GROTTA JC

Combining insulin-like growth factor derivatives plus caffeine produces robust neuroprotection after stroke in rats

Stroke. 2005; 36(1): 129-134

ZOLA-MORGAN S, SQUIRE LR, AMARAL DG

Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus

J Neurosci. 1986; 6(10): 2950-2967

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Gruppeneinteilung und Versuchstierzahl	27
Tabelle 2	Randomisierungsliste mHB.....	53
Tabelle 3	Tastaturbefehle und Bedeutung im mHBT	54
Tabelle 4	Kognitive Parameter im modifizierten Hole-Board-Test.....	55
Tabelle 5	Verhaltensparameter im modifizierten Hole Board Test	57
Tabelle 6	Immunhistochemische Doppelfärbung – Verwendete Antikörper.....	68
Tabelle 7	Physiologische Parameter: MAP (MW ± SEM) (mmHg) (* p < 0,05 versus Baseline).....	71
Tabelle 8	Physiologische Parameter: Glukose (mg/dl) (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Baseline).....	71
Tabelle 9	Physiologische Parameter: paCO ₂ (mmHg) (MW ± SEM)	72
Tabelle 10	Physiologische Parameter: pO ₂ (mmHg) (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Baseline).....	72
Tabelle 11	Physiologische Parameter: Hb (mg/dl) (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Baseline).....	73

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Zeitlicher Ablauf der Schädigungskaskade bei zerebraler Ischämie [modifiziert nach DIRNAGEL 1999]	5
Abbildung 2	Mögliche Mechanismen des Zelltods bei zerebraler Ischämie (modifiziert nach SIEGENTHALER 2001)	7
Abbildung 3	Mikroglia im gesunden Gehirn (a) und nach ischämischem Schaden (b).....	9
Abbildung 4	Schematische Darstellung der Aktivierung von NFκB (p50/p65/IκB) als zentrale Schaltstelle der Inflammationsreaktion [modifiziert nach PAPARELLA 2001]	12
Abbildung 5	Klassischer und alternativer NFκB-Signalweg [modifiziert nach HAYDEN 2004]	13
Abbildung 6	TNF-α Signaltransduktionsweg.....	15
Abbildung 7	Aufbau des Gedächtnisses mit neuronalen Korrelaten (modifiziert nach SQUIRE 1998 und TULVING 1995).....	22
Abbildung 8	Zeitlicher Versuchsablauf: Operation, neurologische Untersuchung und mHBT in Abhängigkeit der gruppenspezifischen postoperativen Überlebenszeiten ...	26
Abbildung 9	Schematische Übersicht der operativen Versuchsphase.....	29
Abbildung 10	Narkoseeinleitung am Operationstag in einer Ganzkörperkammer (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar) .	29
Abbildung 11	Intubationshilfe aus Plexiglas („schiefe Ebene“) mit bereitliegendem modifizierten Kinderlaryngoskop (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)	30
Abbildung 12	Bild links: Anästhesierte, endotracheal intubierte Ratte – Bild rechts: Kleintierbeatmungsgerät (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)	31
Abbildung 13	Bild links: Monitoraufnahme eines intraoperativ komplett überwachten Versuchstieres – Bild rechts: EEG-Monitoring mit „burst-suppression“-Muster im unteren Bildbereich (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)	32
Abbildung 14	Schematischer Aufbau des wärmbaren Wasserbetts (Eigenkonstruktion der Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar) .	33
Abbildung 15	Monitoraufnahme des Atemgasmonitors während des laufenden Versuchs – im oberen Bildabschnitt deutlich die CO ₂ -Kurve erkennbar, im unteren Bildabschnitt die erhobenen Messparameter (Atemfrequenz: 50 min ⁻¹ , CO ₂ -Konzentration: 33 mmHg, O ₂ -Konzentration: 46 Vol%, Isofluran-Konzentration: 2,0 Vol%) (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)	34
Abbildung 16	Katheterisierung der A. sacralis mediana – (1.) Anschlingen des Gefäßes, (2.) Katheter in Position fixiert und (3.) mit einem Druckdom konnektiert (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)	36
Abbildung 17	Intraoperativer Situs: A. carotis rechts bereits angeschlungen, A. carotis links auf Präparationspinzette mobilisiert (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)	37

Abbildung 18	Intraoperativer Situs: (1.) V. jugularis rechts mobilisiert und (2.) während des Katheter-Anlegens (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)	38
Abbildung 19	(1.)Bilaterale Karotisokklusion mit hämorrhagischer Hypotension mit (2.)Detailaufnahme der platzierten Gefäßclips (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)	39
Abbildung 20	(1.)Einsetzende Spontanatmung während Ausleitung und (2.)Versuchstier unmittelbar vor Extubation (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)	40
Abbildung 21	Versuchstier bei der Untersuchung des Seh-(1.) und Hörvermögens (2.) (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar).....	42
Abbildung 22	Versuchstier bei der Untersuchung der (1.)Vibrissenreaktion und (2.)Propriozeption (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar).....	43
Abbildung 23	Drahtgitter-Test in vertikaler (1.) und um 180 ° gedrehter (2.) Position (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)	44
Abbildung 24	Versuchstier während des Greif-Zug-Tests mit Zeitmessung (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar) .	46
Abbildung 25	(1.) Versuchstier während des Balken-Geh- und (2.) Balken-Gleichgewichts-Test (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)	47
Abbildung 26	Homecage mit (1.) Wohnabteil und (2.) modifiziertem Hole-Board (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar) .	48
Abbildung 27	Schematischer Aufbau des doppelten Hole-Board	49
Abbildung 28	(1.)mHB mit den Utensilien die zum Befüllen benötigt werden und ein (2.)exemplarisch zerlegtes mHB (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar)	50
Abbildung 29	(1.) Präparat unmittelbar nach Entnahme und während des (2.) Gefriervorgangs (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar).....	58
Abbildung 30	Schematische Darstellung eines Rattenhirns [modifiziert nach AMARAL et al. 1998]	59
Abbildung 31	Schematischer Aufbau des rechten Hippokampus (CA1-, CA2-, CA3-, CA4-Region, unterer und oberer Ast des Gyrus dentatus).....	60
Abbildung 32	Koronarschnitt eines Rattengehirns (Höhe Bregma -3,3 mm) (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar, München).....	61
Abbildung 33	Immunhistochemische Doppelfärbung von NFκB in der CA1-Region des Hippokampus (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar, München).....	63
Abbildung 34	Grafische Darstellung des Körpergewichtsverlauf der Versuchsgruppen (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Nativ / § p< 0,05 versus Sham).....	74

Abbildung 35 Grafische Darstellung der Fehlritte (Anzahl pro Meter) aller Versuchsgruppen im Balken-Geh-Test (MW ± SEM) (*p < 0,05 versus Nativ und Sham / § p < 0,05 versus BCAO 21).....	75
Abbildung 36 Grafische Darstellung der balancierten Zeit (Sekunden) aller Versuchsgruppen im Balken-Gleichgewichts-Test (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Nativ und Sham / § p < 0,05 versus BCAO 21).....	76
Abbildung 37 Grafische Darstellung der gehaltenen Zeit (Sekunden) aller Versuchsgruppen im Drahtgitter-Test (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Nativ und Sham / § p < 0,05 versus BCAO 21).....	77
Abbildung 38 Grafische Darstellung der gehaltenen Zeit (Sekunden) aller Versuchsgruppen im Greif-Zug-Test (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Nativ und Sham / § p < 0,05 versus BCAO 21).....	78
Abbildung 39 Grafische Darstellung der Gesamtzeit eines Testdurchlaufes (Sekunden) der Versuchsgruppen während Beobachtungszeitraumes (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Nativ und Sham).....	79
Abbildung 40 Grafische Darstellung der Auslassungsfehler (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Nativ und Sham).....	80
Abbildung 41 Grafische Darstellung der Fehler-Gesamtzahl (MW ± SEM).....	81
Abbildung 42 Grafische Darstellung der Wiederholungsfehler (MW ± SEM).....	82
Abbildung 43 Grafische Darstellung der auf dem Bord verbrachten Zeit (%) der Gesamtversuchszeit eines Testdurchlaufs (600 s) der Versuchsgruppen während des Beobachtungszeitraums (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Nativ und Sham).....	83
Abbildung 44 Grafische Darstellung Immobilität (%) bezogen auf die Gesamtversuchszeit (600 Sekunden) (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Nativ und Sham).....	84
Abbildung 45 Grafische Darstellung der Zeit (Sekunden), die vergeht, bis das Board erstmalig vom Versuchstier betreten wird (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Nativ und Sham).....	85
Abbildung 46 Grafische Darstellung der Zeit (Sekunden), die vergeht, bis die erste Futterbelohnung vom Versuchstier gefressen wird (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Nativ und Sham).....	86
Abbildung 47 Grafische Darstellung der vergeblichen Lochbesuche (Anzahl) pro Durchlauf (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Nativ und Sham).....	87
Abbildung 48 Grafische Darstellung der Anzahl eosinophiler Neurone im gesamten Hippokampus (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Nativ und Sham / § p < 0,05 versus Nativ). Zwischen den gestrichelten Linien befindet sich das 95% Konfidenzintervall der unbehandelten Nativtiere.....	88
Abbildung 49 Grafische Darstellung der Anzahl NFκB-positiven Neurone im gesamten Hippokampus (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Nativ und Sham / § p < 0,05 versus Nativ). Zwischen den gestrichelten Linien befindet sich das 95% Konfidenzintervall der unbehandelten Nativtiere.....	89
Abbildung 50 Grafische Darstellung der Anzahl COX-2-positiver Neurone im gesamten Hippokampus (MW ± SEM) (* p < 0,05 versus Nativ und Sham / § p < 0,05 versus Nativ / § p < 0,05 versus Nativ) Zwischen den gestrichelten Linien befindet sich das 95% Konfidenzintervall der unbehandelten Nativtiere.	90

Abbildung 51 Grafische Darstellung der Anzahl TNF- α -positiver Neurone im gesamten Hippokampus (MW \pm SEM) (* p < 0,05 versus Nativ und Sham / \$ p < 0,05 versus Nativ) Zwischen den gestrichelten Linien befindet sich das 95% Konfidenzintervall der unbehandelten Nativtiere..... 91

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich herzlich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dipl. Phys. Eberhard Kochs, Direktor der Klinik für Anästhesiologie der TU München, für die Übernahme meiner Doktorarbeit und die Möglichkeit, diese wissenschaftliche Arbeit an seiner Klinik durchführen zu können, danken.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. med. Bettina Jungwirth, Oberärztin in der Klinik für Anästhesiologie der TU-München, für die hervorragende Betreuung, stets freundliche Unterstützung, Beratung und Durchsicht der Arbeit.

Vielen Dank auch an Frau Doris Droese, Frau Anne Frye und Frau Dr. med. Lucia Gordan für ihre große Hilfe, ebenso den Kolleginnen der Forschungsgruppe „Kognition und Verhalten“ in der Klinik für Anästhesiologie der TU München: Frau Dr. med. vet. Kristine Kellermann, Frau Dr. med. vet. Laura Starker und Frau Dr. med. vet. Nadja Dertinger.

Bei den Tierpflegerinnen und Tierpflegern möchte ich mich sehr für die stets reibungslose Zusammenarbeit bei der verantwortungsvollen Pflege der Tiere bedanken.

Und schließlich ein herzliches Dankeschön an meine Ehefrau und an meine Eltern für ihre Unterstützung in den letzten Jahren.

11. Lebenslauf

Wolfgang Waldeyer

Geboren: 28. April 1976 in München

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Eltern: Heinz-Theo Waldeyer (Dipl.-Ingenieur)
Marianne Waldeyer, geborene Heinrich (Arzthelferin)

Schulbildung:

1982-1986 Volksschule Nord in Fürstenfeldbruck

1986-1995 Viscardi-Gymnasium in Fürstenfeldbruck

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

1995-1996 Deutsches Herzzentrum des Freistaates Bayern in München

Hochschulausbildung:

1996-1999 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München (vorklinischer Studienabschnitt)

1999-2003 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität in München (klinischer Studienabschnitt)

2002-2003 Praktisches Jahr am Klinikum rechts der Isar in München

2003-2004 Arzt im Praktikum am Klinikum rechts der Isar in München

2004 Approbation als Arzt

Berufliche Weiterbildung:

2009 Fachkundenachweis Rettungsdienst

2009 Facharzt für Anästhesiologie

Berufliche Tätigkeit:

2004 Assistenzarzt der Klinik für Anästhesiologie am Klinikum rechts der Isar in München