

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Der Einfluss von Hypothermie oder Dexmedetomidin
auf den neuronalen Zelluntergang nach
inkompletter zerebraler Hemisphärenischämie und Reperfusion
bei der Ratte**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt
von Dieter Winner
aus Straubing

Mainz, 2004

Dekan: N. N.
1. Gutachter: N. N.
2. Gutachterin: N. N.
Tag der Promotion: 13.12.2005

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG.....	3
1.1 Anatomie des Gehirns.....	3
1.1.1 Übersicht	3
1.1.2 Gefäßversorgung und Stoffwechsel.....	4
1.1.3 Hippokampus.....	5
1.2 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie.....	7
1.2.1 Pathophysiologie des Gehirnstoffwechsels.....	7
1.2.2 Neuronaler Zelluntergang nach zerebraler Ischämie	8
1.2.2.1 Nekrose	9
1.2.2.2 Apoptose.....	9
1.2.2.3 Caspasen und ihre Substrate.....	12
1.3 Klinische Bedeutung von zerebraler Ischämie.....	14
1.3.1 Definitionen.....	14
1.3.2 Risikofaktoren	14
1.3.3 Typische Symptome	15
1.4 Therapieansätze bei zerebraler Ischämie	16
1.4.1 Aktuelle Standards.....	16
1.4.2 Bedeutung von Hypothermie und Dexmedetomidin	17
2 FRAGESTELLUNG UND HYPOTHESEN.....	19
2. 1 Bisherige Untersuchungen an Modellen mit inkompletter Hemisphärenischämie	19
2.2 Fragestellung und Studienziele	20
3 MATERIALIEN UND METHODEN.....	21
3.1 Tierexperimentelles Modell	21
3.2 Versuchstiere	21
3.3 Versuchsaufbau	22
3.4 Versuchsdurchführung.....	24
3.4.1 Narkoseeinleitung und Beatmung.....	24
3.4.2 Katheterisierung der Gefäße.....	24
3.4.3 Chirurgische Präparation und Installation der Messgeräte	25
3.4.4 Versuchsprotokoll.....	26

3.5 Physiologische Variablen.....	30
3.6 Präparation, Entnahme und Einfrieren des Gehirns	32
3.7 Dissektionsschema zur Gewinnung von Gewebeschnitten.....	33
3.8 Histologische Untersuchungen.....	35
3.8.1 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE).....	35
3.8.1.1 Durchführung der Färbung	35
3.8.1.2 Auswertung der Färbung	36
3.8.2 Immunhistochemische Färbung zur Detektion aktivierter Caspase-3	38
3.8.2.1 Durchführung der Färbung	38
3.8.2.2 Auswertung der Färbung	40
3.8.3 Doppelfärbung zur Detektion aktivierter Caspase-3 und von NeuN.....	41
3.8.3.1 Durchführung der Färbung	41
3.8.3.2 Auswertung der Färbung	42
3.9 Statistische Berechnung und Dokumentation	44
4 ERGEBNISSE.....	45
4.1 Physiologische Variablen.....	45
4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	54
4.3 Immunhistochemische Färbung zur Detektion aktivierter Caspase-3	62
4.4 Doppelfärbung zur Detektion aktivierter Caspase-3 und von NeuN.....	65
5 DISKUSSION	67
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	67
5.2 Diskussion der Ergebnisse	69
5.2.1 Physiologische Variablen.....	69
5.2.2 Histologische Untersuchungen.....	73
5.3 Methodenkritik	81
5.4 Diskussion des Tiermodells	85
6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	87
7 LITERATURVERZEICHNIS	88

8 ANHANG	97
8.1 Bildtafel I	97
8.2 Bildtafel II	98
8.3 Bildtafel III.....	100

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
dl	Deziliter
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
Fa.	Firma
Fi	inspiratorische Fraktion
g	Gramm
I. E.	Internationale Einheiten
i. v.	intravenös
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
M.	Musculus
mg	Milligramm
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm
n	Anzahl
N ₂ O	Stickoxydul (Lachgas)

O ₂	Sauerstoff
pa	Partialdruck arteriell
s.	siehe
S.	Seite
SD	Standardabweichung
Sek.	Sekunden
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
V.	Vena
vgl.	vergleiche
Vol. %	Volumenprozent
%	Prozent

1 EINLEITUNG

1.1 Anatomie des Gehirns

1.1.1 Übersicht

Aus morphologischer, entwicklungsgeschichtlicher und funktioneller Sicht lässt sich das erwachsene Gehirn untergliedern in Medulla oblongata (verlängertes Mark), Pons (Brücke), Mesenzephalon (Mittelhirn), Diencephalon (Zwischenhirn), Zerebellum (Kleinhirn) und Telencephalon (Großhirn). Im Bereich des Foramen magnum geht das Gehirn über in die Medulla spinalis, das Rückenmark.

Von außen ist das Gehirn von allen Seiten vom knöchernen Schädel begrenzt. Drei Hirnhautschichten mesodermalen Ursprungs, die Dura mater, die Arachnoidea und die Pia mater umhüllen sowohl Gehirn als auch Rückenmark.

Medulla oblongata, Pons und Mesenzephalon, zusammen auch als Hirnstamm bezeichnet, beinhalten neben Hirnnervenkernen unter anderem auch den Olivenkernkomplex, der große Bedeutung für die Bewegungskoordination hat sowie die Substantia nigra als wesentlichen Funktionsträger beim Bewegungsantrieb. Dass der Ausfall oder schwerwiegende Läsionen des Hirnstamms mit dem Leben nicht vereinbar sind, ist damit zu erklären, dass in der *Formatio reticularis* das Atem- und das Kreislaufzentrum lokalisiert sind.

Das Diencephalon, das sich in Epithalamus, Thalamus, Hypothalamus und Subthalamus untergliedern lässt, übernimmt wichtige Funktionen in der Verschaltung sensibler und motorischer Impulse, ist aber gleichzeitig auch oberstes Integrationsorgan vegetativer Funktionen wie Stoffwechsel-, Kreislauf- oder Wärmeregulation (TREPEL 1999).

Die drei Hauptaufgaben des Zerebellums bestehen in der Steuerung der Willkürmotorik, in der Bewegungskontrolle sowie in der Gleichgewichtskontrolle (LANG 1998).

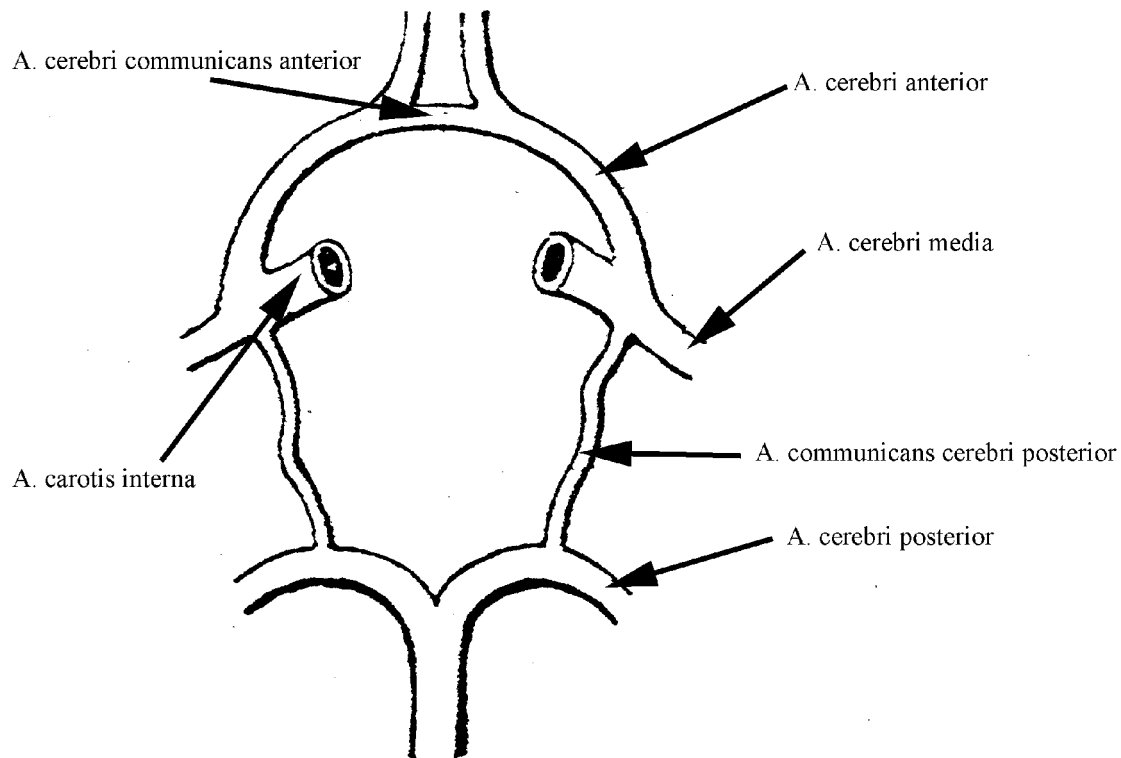
Das Telencephalon lässt sich morphologisch in Großhirnrinde, Großhirnmark mit Basalganglien und Balken als Verbindungsstruktur der beiden Hemisphären sowie Bulbus und Tractus olfactorius einteilen. Das Großhirn ist Zentrum der Wahrnehmung sämtlicher

Sinnesreize und der Entstehung motorischer Programme, ist aber auch verantwortlich für Gedächtnis, Emotionen und Persönlichkeitsmerkmale (TREPEL 1999).

1.1.2 Gefäßversorgung und Stoffwechsel

Die Versorgung des Gehirns erfolgt durch vier große extrakranielle Arterien, nämlich durch die rechte und linke A. carotis interna, die aus der A. carotis communis entspringen sowie durch die rechte und linke A. vertebralis, die aus der A. subclavia abzweigen. Die beiden Aa. vertebrales treten durch das Foramen magnum in die Schädelhöhle ein und vereinigen sich am Oberrand der Medulla oblongata zur A. basilaris, die sich am Oberrand der Brücke in die beiden Aa. cerebri posteriores aufteilt. Die A. carotis interna durchläuft die Schädelbasis im Canalis caroticus und teilt sich nach Abgabe mehrerer kleiner Äste in die A. cerebri anterior und die A. cerebri media auf. Die Aa. communicantes posteriores verbinden auf jeder Seite die A. cerebri posterior mit der A. cerebri media. Die beiden Aa. cerebri anteriores sind durch die A. communicans anterior miteinander verknüpft. Durch diese Verbindungsarterien entsteht ein ringförmig geschlossenes arterielles System, der Circulus arteriosus cerebri (Willisii), der den Blutstrom der Karotiden mit dem der Vertebralarterien kommunizieren lässt (s. Abb. 1.1.). Auf diese Weise kann beispielsweise eine Stenose der A. carotis interna bis zu 90 % symptomlos bleiben (TREPEL 1999; KAHLE 2001).

Obwohl das Gehirn nur etwa 2 % des Körpergewichts ausmacht, verbraucht es als einziges Substrat etwa 25 % der dem gesamten Organismus zur Verfügung stehenden Glukose. Lediglich bei einer starken Erhöhung der Plasmakonzentration an Ketonkörpern können diese den Energiebedarf des Gehirns bis maximal zur Hälfte decken. Die Hirndurchblutung beträgt unter normalen Bedingungen ca. 50 ml/ 100 g Hirngewebe/ Minute, also ca. 15 % des Herzminutenvolumens, wobei der Sauerstoff-Verbrauch bei ca. 3 ml/ 100 g Hirngewebe/ Minute liegt, was ca. 20 % des Sauerstoffverbrauchs des gesamten Organismus entspricht (KUSCHINSKY 1996; MAGISTRETTI 1999).



*Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Circulus arteriosus cerebri (Willisii)
 Modifizierte Darstellung nach FENEIS 1970*

1.1.3 Hippokampus

Den Hauptanteil des Archikortex, der zusammen mit Palaeokortex und Neokortex die Großhirnrinde bildet, nimmt die Hippokampus-Formation ein, die sich aus folgenden Strukturen zusammensetzt: Hippokampus oder Ammonshorn, Gyrus parahippokampalis, Fornix, Gyrus dentatus und Fimbria hippocampi. Als Bestandteil des limbischen Systems kommen dem Hippokampus wesentliche Funktionen in der Gedächtnisbildung, aber auch im Zustandekommen von Aggression, Affektverhalten, Bewusstsein und Motivation zu (TREPEL 1999; KAHLE 2001). Der Hippokampus lässt sich nach einer Einteilung von PAXINOS und WATSON (1998) in folgende Abschnitte gliedern: CA-1-, CA-2-, CA-3- und CA-4-Region, die kappenartig vom oberen und unteren Ast des Gyrus dentatus umschlossen wird (s. Abb. 3.3)

Wegen der selektiven Vulnerabilität der Neurone der Hippokampus-Formation ist diese Struktur zur Beurteilung neuronalen Zelltodes nach zerebraler Ischämie sehr geeignet. Sowohl im Tiermodell als auch bei Menschen mit zerebraler Ischämie kann post mortem ein

selektiver verzögerter Untergang von Pyramidenzellen der CA-1-Region nachgewiesen werden (NITATORI 1995).

1.2 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

1.2.1 Pathophysiologie des Gehirnstoffwechsels

Das Gehirn ist als einziges Organ des Körpers streng auf die Zufuhr von Glukose angewiesen und unter physiologischen Bedingungen zu ca. 20 % am Sauerstoffverbrauch des gesamten Organismus beteiligt. Da es weder für Glukose noch für Sauerstoff relevante zerebrale Speicher gibt, führt bereits eine komplette Unterbrechung des Blutflusses nach etwa fünf Minuten zum irreversiblen Untergang vulnerabler Neurone (KUSCHINSKY 1996; LEE 2000).

Ein akuter Sauerstoffmangel im Gehirn bewirkt eine Aktivierung der anaeroben Glykolyse, deren "Ausbeute" im Gegensatz zur aeroben Glykolyse nur bei 2 Mol Adenosintriphosphat (ATP) statt 38 Mol ATP pro Mol Glukose liegt. Zusätzlich kommt es bei dieser Form der Energiegewinnung zu einer Laktatazidose, die über eine veränderte Membranpermeabilität zur Denaturierung von Membranproteinen und Enzymen führt (SIESJÖ 1992; MEHMET 1998; HOSSMANN 2001). Der ATP-Mangel verursacht über eine Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase die zelluläre Akkumulation von Na⁺, die eine Depolarisation der Zellmembran mit konsekutivem Kalziumeinstrom zur Folge hat. Dieser Kalziumeinstrom bewirkt in der Zelle eine Freisetzung von Glutamat, was über die Aktivierung der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren und der α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure (AMPA)-Rezeptoren zu einem weiteren Einströmen von Kalzium führt. Dieser massive Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert die Stickoxid-Synthetase, Proteasen, Phospholipasen, Proteinkinasen, Lipidkinasen und Endonukleasen. Die von der Phospholipase A₂ aus Phospholipiden freigesetzte Arachidonsäure wird durch Zyklooxygenasen und Lipooxygenasen zu den proinflammatorischen Prostaglandinen, Prostazyklinen und Leukotrienen metabolisiert. Die Bildung freier Sauerstoffradikale während der Reperfusionphase führt über eine direkte DNS-Schädigung sowie über eine Aktivierung von Entzündungsmediatoren zum Zelluntergang (SIESJÖ 1992; LANG 1998; LEE 1999; LEE 2000; HOSSMANN 2001).

Ob eine zerebrale Ischämie zum Infarkt, also zum Untergang von Hirngewebe führt, ist im Wesentlichen von der Dauer und der Intensität der ischämischen Phase abhängig. So entsteht der aus irreversibel geschädigten Zellen bestehende Infarktkern erst bei einer Durchblutung

von weniger als 10-12 ml/ 100g Hirngewebe/ Minute. Die den Infarktkern ringförmig umschließende Grenzzone (Penumbra) entsteht in oligämischen Gewebearealen bei einer Durchblutung von weniger als 12-18 ml/ 100g Hirngewebe/ Minute und ist im Gegensatz zum Infarktkern über längere Zeit überlebensfähig (s. Abb. 1.2). Primäres Ziel jeder Ischämitherapie ist die Wiederherstellung der Funktionen in der Penumbra, da das Gewebe dieser Zone im Gegensatz zum irreversibel geschädigten Gewebe des Infarktkerns potenziell reversible Schädigung aufweist und somit durch pharmakologische Interventionen oder relativ schnelle Reperfusion eine gute Erholungstendenz besitzt (WESTER et al. 1995; HOSSMANN 2001).

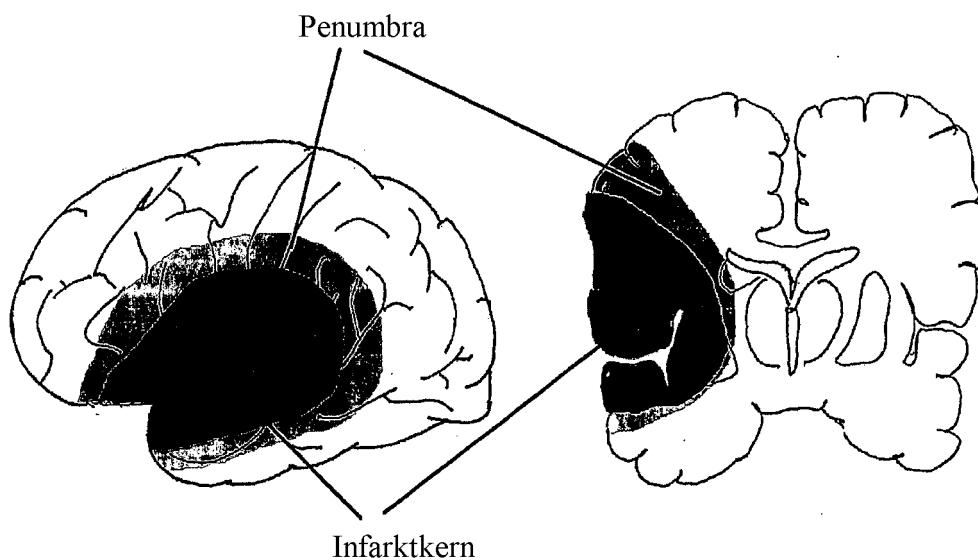


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der beiden Komponenten des Infarktgebietes, Infarktkern und Penumbra. Modifizierte Darstellung nach NAGAIRO et al. 1998

1.2.2 Neuronaler Zelluntergang nach zerebraler Ischämie

Neuronaler Zelltod nach zerebraler Ischämie, nach Schädel-Hirn-Trauma und bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen kommt pathophysiologisch auf zwei völlig unterschiedlichen Wegen zustande, nämlich durch Nekrose oder durch Apoptose.

1.2.2.1 Nekrose

Der Begriff Nekrose, der schon vor etwa 2000 Jahren verwendet worden ist, um drastische Gewebsveränderungen, die mit bloßem Auge zu erkennen sind, zu bezeichnen und auf Griechisch ‚Tod‘ bedeutet, ist einem Wandel unterworfen: Aktuell bezeichnet Nekrose die Veränderungen, die erst einige Stunden nach dem Tod von Zellen mikroskopisch sichtbar sind (MAJNO und JORIS 1995). Generell unterscheidet man zwei Arten von Nekrose, nämlich die Koagulations- oder Gerinnungsnekrose, die durch Denaturierung von Proteinen beispielsweise einige Stunden nach einem Myokardinfarkt auftritt, und die Kolliquations- oder Erweichungsnekrose, die durch autolytische Vorgänge zur einer Verflüssigung von Zellen zum Beispiel infolge einer zerebralen Hypoperfusion entstehen kann (DENK 2001). Nekrose von Neuronen steht normalerweise mit einer direkten Schädigung von außen, also durch Hypoxie nach zerebraler Ischämie oder durch die Verletzung nach einem Schädel-Hirn-Trauma in Zusammenhang (PETTMANN und HENDERSON 1998).

Morphologisch findet während der Nekrose ohne Energieverbrauch ein Verlust von Zellverbänden statt. In der Folge kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion des umgebenden Gewebes. Typische morphologische Veränderungen sind unter anderem die durch den Permeabilitätsverlust der Zellmembran bedingte Zellschwellung, zerstörte und größtenteils funktionslose Zellorganellen sowie defekte, geschwollene und rupturierte Mitochondrien. Das Zytoplasma der nekrotischen Zelle erscheint lichtmikroskopisch nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung stark eosinophil. Nach einer anfänglichen Schrumpfung des Zellkerns (Kernpyknose) kommt es im weiteren Verlauf entweder zu dessen Auflösung (Karyolyse) oder zum Zerfall in einzelne Bruchstücke (Karyorrhesis). Pathobiochemisch kommt es einerseits durch die gestörte Bildung von ATP zu einer Störung ATP-abhängiger Zellfunktionen, andererseits werden durch reaktive Sauerstoffintermediärprodukte Membranlipide, Membranproteine und auch die DNS zerstört (GRANVILLE 1998; DENK 2001).

1.2.2.2 Apoptose

Da im Herbst die Blätter von Bäumen zu Gunsten des Gesamtorganismus absterben und herabfallen, haben 1972 KERR et al. den Begriff der Apoptose (= griechisch Abfallen, Abtropfen) für das altruistische Verhalten einzelner geschädigter Zellen zu Gunsten des

intakten Zellverbandes geprägt. Dieser sog. programmierte Zelltod steht im Gegensatz zur Nekrose, dem akzidentellen Zelltod (COHEN 1993).

Histopathologisch und biochemisch sind folgende Veränderungen für die Apoptose charakteristisch: die Schrumpfung und Verdichtung der Zelle, die Kernpyknose und der Zerfall der DNS in Fragmente, wobei die Zellen im Gegensatz zur Nekrose nach dem Schaden relativ lange intakt bleiben können (DENK 2001). Ein tendenzieller Unterschied zur Nekrose besteht darin, dass bei der Apoptose individuelle Zellen energieabhängig ohne Entzündungszeichen in einem sonst gesunden Organ einen aktiven, autonomen Zelltod erfahren und dann phagozytotisch abgebaut werden (VAUX 1993; FARBER 1994; LÖFFLER und MONTENARH 2003).

Durch besonders intensive Untersuchungen zur Aufklärung der Apoptose an dem Rundwurm *Caenorhabditis elegans* hat man festgestellt, dass 131 der 1090 somatischen Zellen zu genau definierten Zeitpunkten der Entwicklung zugrunde gehen. Dadurch hat man den Ursprung dieses "geplanten Selbstmordes", nämlich genetische Mechanismen, aufzeigen können (YUAN et al. 1993). Während Apoptose in der Embryonalentwicklung, in der zum Beispiel funktionslose Neurone zerstört werden, eine wichtige Rolle in der Entwicklung verschiedenster Gewebe spielt, übernimmt sie im weiteren Leben eine Schlüsselrolle in der Homöostase des Organismus, wenn es beispielsweise um die Ausschaltung autoreaktiver T-Lymphozyten oder um die Eliminierung von Tumorzellen geht (VAUX 1993; CHOPP und LI 1996; LÖFFLER und MONTENARH 2003).

CHOPP und LI haben 1996 (S. 23) in einem Tiermodell mit Ratten nachgewiesen, dass Apoptose auch Neurone nach einer fokalen zerebralen Ischämie nach Okklusion der A. zerebralis media betrifft. Dabei ist Apoptose in den Vorgang der sogenannten sekundären Schädigung involviert (PETTMANN und HENDERSON 1998).

Zwei Aktivierungswege der Apoptose sind bisher bekannt, nämlich der extrinsische und der intrinsische Weg (s. Abb. 1.3).

Der extrinsische Weg wird durch Bindung an membranständige Todesrezeptoren gestartet, die sich der Tumor-Nekrose-Faktor- (TNF-) oder Nerve Growth Factor- (NGF-) Superfamilie zuordnen lassen und zu denen beispielsweise der TNF-Rezeptor 1 oder der CD-95-Rezeptor gehören. Die Bindung des jeweiligen Liganden an den Rezeptor löst eine Konformationsänderung aus und führt zur Ankopplung eines Adaptermoleküls an die Todesdomäne, an das dann Pro-Caspase-8 oder Pro-Caspase-10 binden können. Nach der Aktivierung zu Caspase-8 oder Caspase-10 können diese beiden Proteine zur Aktivierung der sog. CED-3-Caspasen (vgl. Kap. 1.2.2.3) führen.

Der intrinsische Weg wird durch Mitochondrien aktiviert, die nach Aufnahme apoptotischer Reize Zytochrom C in das Zytosol abgeben. Zytochrom C bindet an Apoptotic Protease Activating Factor-1 (APAF-1), der durch eine Konformationsänderung in der Lage ist, Pro-Caspase-9 zu binden und zu aktivieren. Caspase-9 wirkt dann, ähnlich wie Caspase-8 oder Caspase-10, aktivierend auf eine Reihe weiterer Pro-Caspasen (ELDADAH und FADEN 2000).

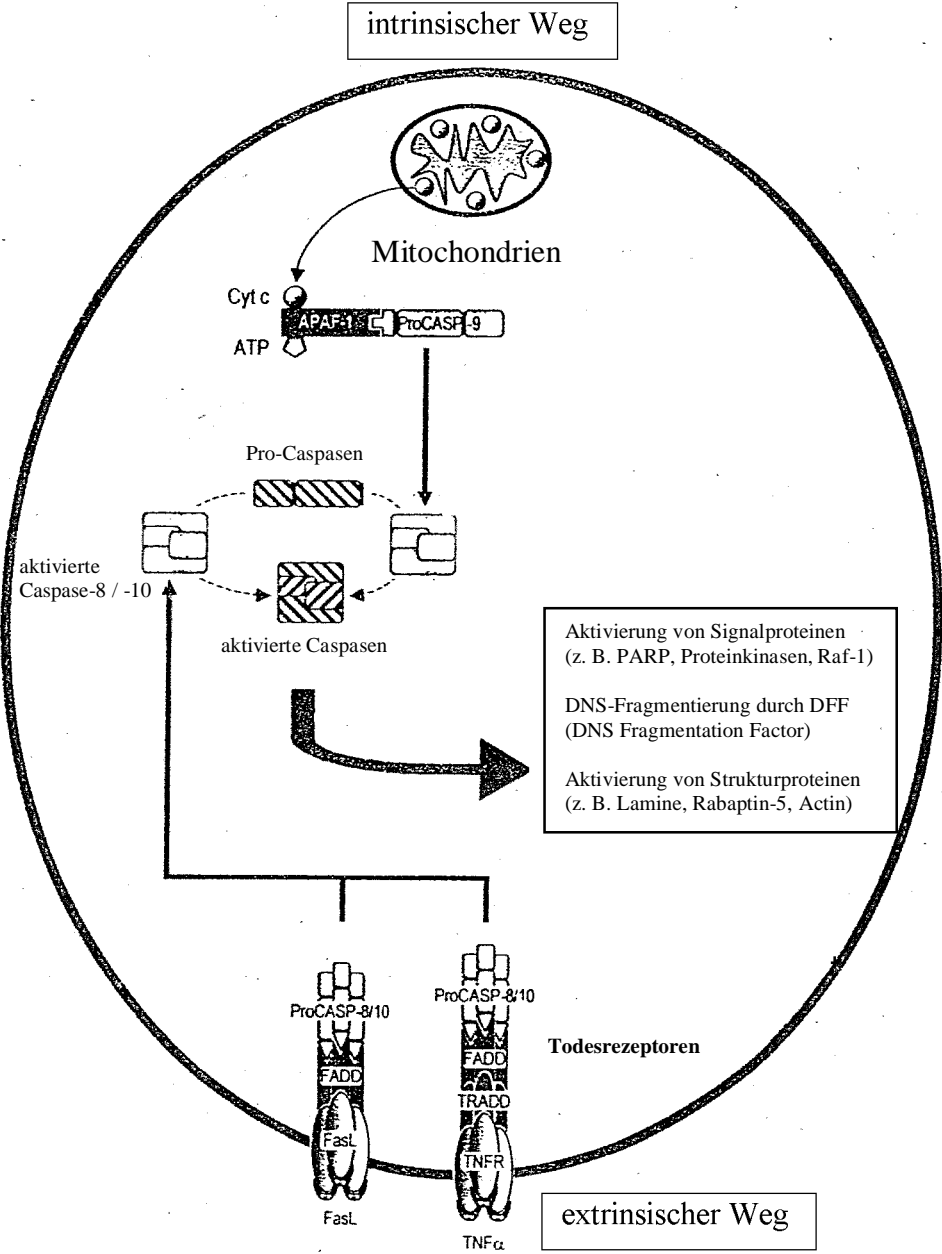


Abb. 1.3: Darstellung der Aktivierungswege der Caspase: extrinsischer und intrinsischer Weg. Modifizierte Darstellung nach ELDADAH und FADEN 2000

1.2.2.3 Caspasen und ihre Substrate

Caspasen (engl. caspases = Cysteiny Aspartate-specific proteinases), spezifische intrazelluläre Proteasen, die als Pro-Caspasen im Zytoplasma der meisten Zellen vorliegen, gehören zu denjenigen Genprodukten, die eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Apoptose spielen (GREEN 1998; BENCHOUA 2001). Zur Zeit sind 14 verschiedene Caspasen in der Literatur beschrieben, von denen besonders die Caspase-3 und die Caspase-9 eine herausragende Rolle in Neuronen zu spielen scheinen (MACMANUS und BUCHAN 2000; PETTMANN 1998). Phylogenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die Caspasen in zwei große Gruppen untergliedern lassen: während man die Caspasen-1, -4 und -5, die eine Rolle bei proinflammatorischen Prozessen spielen, der Familie der sog. ICE-Caspasen zugeordnet hat, gehören die Caspasen-2, -3, -6, -7, -8, -9 und -10 zur Familie der CED-3-Caspasen und sind primär in die Apoptose involviert (GRANVILLE et al. 1998). Die molekularbiologische Aktivierung von Caspasen erklärt man zur Zeit folgendermaßen: einerseits können zum Beispiel die Caspasen-3, -6 und -7 innerhalb einer Kaskade von anderen Caspasen aktiviert werden, weshalb sie auch als "downstream caspases" bezeichnet werden, andererseits geht man davon aus, dass beispielsweise Caspase-8 durch die Aggregation der Pro-Caspase-8 aktiviert wird (GREEN 1998).

In den letzten Jahren hat man einige Caspase-Substrate beschrieben, darunter Signalproteine wie zum Beispiel Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), DNS-abhängige Proteinkinase, Proteinkinase C oder Raf-1. Bei aktivierter Caspase-3 hat man nachweisen können, dass sie durch die Spaltung von DNS Fragmentation Factor (DFF) in direktem Zusammenhang mit der DNS-Fragmentierung steht. Die morphologischen Veränderungen, die man während der Apoptose beobachten kann, können dadurch erklärt werden, dass auch Strukturproteine wie etwa Actin, α -Fodrin, Lamin A, Lamin B, Rabaptin-5 oder Gelsolin Ziele aktivierter Caspasen sind (GRANVILLE et al. 1998).

Caspase-3 wird als eines der Schlüsselmoleküle bei apoptotischen Prozessen betrachtet, das durch die Spaltung von Proteinen wichtige strukturelle und reparative Prozesse außer Gefecht setzt. In nicht-apoptotischen Zellen kann Caspase-3 sowohl zytoplasmatisch als auch mitochondrial nachgewiesen werden (GRANVILLE et al. 1998). Während bei Mäusen, denen das Gen CPP32 zur Synthese von Caspase-3 fehlt, die nicht vorhandene Apoptose zu einer Verdoppelung der Gehirngröße und einem verfrühten Tod geführt hat, hat man in einem Rattenmodell nachweisen können, dass der Anstieg von Caspase-3-Aktivität nach einer

zerebralen Ischämie sowohl im Kerngebiet als auch in der Penumbra des geschädigten Areals eine entscheidende Rolle beim neuronalen Zelluntergang spielt (BENCHOUA et al. 2001).

1.3 Klinische Bedeutung von zerebraler Ischämie

1.3.1 Definitionen

Zerebrale Ischämie, die Verminderung oder Unterbrechung der Durchblutung des Gehirns, kann pathogenetisch in die große Gruppe der Herz-Kreislauf-Erkrankungen eingeteilt werden, die laut Statistischem Bundesamt in Wiesbaden im Jahr 2003 zweithäufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland waren. Der Schlaganfall oder Apoplex, nach chronisch ischämischer Herzkrankheit, akutem Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz an vierter Stelle der Todesursachen in Deutschland, entsteht in ca. 15 % der Fälle durch eine akute Blutung und ist in ca. 85 % der Fälle ischämisch bedingt (BERLIT 1998). Die Inzidenz dieser Erkrankung liegt zur Zeit bei etwa 250/ 100.000 Einwohner/ Jahr, von denen ca. 20 % innerhalb der ersten vier Wochen versterben. Von den Überlebenden erreicht ca. ein Drittel die gleiche Lebensqualität wie vor dem Schlaganfall, ein Drittel ist im Lebensalltag und in der Berufsfähigkeit tendenziell eingeschränkt, und ein weiteres Drittel bleibt dauerhaft pflegebedürftig. Somit ist der Schlaganfall die häufigste Ursache dauerhafter Behinderung in den westlichen Industrieländern und die teuerste Krankheitsgruppe überhaupt (POECK 2001).

1.3.2 Risikofaktoren

Da die zerebrale Ischämie zu der großen Gruppe der Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehört, sind deren Risikofaktoren ausschlaggebend für die Pathogenese. Dazu zählen als nicht modifizierbare Risikofaktoren das männliche Geschlecht, das Alter und eine genetische Disposition. Bei den modifizierbaren Faktoren stehen idiopathisches Vorhofflimmern mit einem relativen Risiko von ca. zehn und arterielle Hypertonie mit einem relativen Risiko von ca. fünf an oberster Stelle. Herzkrankheiten, Diabetes mellitus, Alkohol- bzw. Nikotinabusus, Hyperlipidämie und Karotisstenosen stellen weitere bedeutende Risikofaktoren dar (POECK 2001).

1.3.3 Typische Symptome

Da sich, abhängig von der Lokalisation, dem Schweregrad und der Dauer der zerebralen Ischämie, im Verlauf von wenigen Minuten bis zu einigen Tagen, ja sogar Jahren, sehr unterschiedliche Symptome entwickeln können, soll hier nur auf das große Spektrum der möglichen Symptome hingewiesen werden. Während flüchtige Ischämien wie die Transitorisch-Ischämische Attacke (TIA) oder das Prolongiert Reversible Ischämische Neurologische Defizit (PRIND) mit Amaurosis fugax oder reversiblen Paresen und Parästhesien einhergehen, findet sich eine motorische Aphasie in Kombination mit einer kontralateralen Hemiparese typischerweise beim linksseitigen Infarkt im Versorgungsgebiet der A. cerebri media (BERLIT 1998; KLEIHUES 2001).

1.4 Therapieansätze bei zerebraler Ischämie

1.4.1 Aktuelle Standards

Entsprechend der Leitlinie "Akute Zerebrale Ischämie" der Deutschen Gesellschaft für Neurologie sollte der Schlaganfall-Patient bereits präklinisch als absoluter Notfall behandelt werden. Eine sog. "Stroke Unit" sollte spätestens drei Stunden nach Beginn der ersten Symptome erreicht sein, damit der Patient sowohl in der Akutphase als auch in der Sekundärprophylaxe möglichst kompetent und effektiv behandelt werden kann. Abhängig von Geschlecht und Alter des Betroffenen sowie vom Typ des Schlaganfalls kann durch die Therapie auf einer Schlaganfallstation die Mortalität um 18-46 %, Tod oder Pflegebedürftigkeit um bis zu 29 % reduziert werden (1).

Die Akuttherapie des Patienten mit Schlaganfall setzt sich aus vier Bestandteilen zusammen:

1) Bei der Behandlung allgemein-medizinischer Parameter achtet man besonders auf die Funktion von Atmung und Kreislauf. Dabei sollte man durch die Insufflation von Sauerstoff oder durch endotracheale Intubation eine adäquate Oxygenierung des arteriellen Blutes anstreben. Störungen der kardialen Auswurfleistungen und Herzrhythmusstörungen sollten möglichst frühzeitig medikamentös behandelt werden. Da Schlaganfall-Patienten oftmals an einer arteriellen Hypertonie leiden, können Blutdruckwerte bis zu 180 mmHg systolisch und bis zu 100 mmHg diastolisch innerhalb der ersten drei Tage durchaus akzeptiert werden, da eine rasche Senkung des Blutdrucks mit einer verminderten Perfusion des Gehirns einhergehen kann. Da es Hinweise dafür gibt, dass hyperglykämische Zustände ungünstig für die weitere Prognose sind, sollten Blutzuckerwerte über 200 mg/ dl mit Alt-Insulin gesenkt werden. Temperaturen über 37,5 °C sollte man mit antipyretischen Medikamenten wie Paracetamol senken. Parameter des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes sollten kontinuierlich überprüft und bei Bedarf entsprechend substituiert werden.

2) An zweiter Stelle in der Behandlung der akuten zerebralen Ischämie steht die rekanalisierende Therapie. Ein signifikant verbessertes Endergebnis zeigt sich - unter Beachtung bestimmter Kontraindikationen - bei der Therapie mit recombinant tissue Plasminogen Activator (rtPA) innerhalb eines Zeitraumes von drei Stunden. Bei einem Verschluss der A. cerebri media führt die intra-arterielle thrombolytische Behandlung mit pro-Urokinase zu einer tendenziellen Verbesserung des Endergebnisses.

3) Zu den Prinzipien der frühen Sekundärprophylaxe zählt die Gabe von Acetylsalicylsäure oder anderen Thrombozytenaggregationshemmern.

4) Die vierte Säule der Akuttherapie der zerebralen Ischämie besteht in der Vorbeugung und Behandlung von Komplikationen wie zum Beispiel Aspirationspneumonie oder Harnwegsinfekt (1).

1.4.2 Bedeutung von Hypothermie und Dexmedetomidin

Laut den Leitlinien "Akute zerebrale Ischämie" der Deutschen Gesellschaft für Neurologie konnte bisher für kein Neuroprotektivum ein günstiger Effekt auf das Endergebnis beim Schlaganfall-Patienten nachgewiesen werden (1). Neuere Therapieansätze wie zum Beispiel die Hemmung der Stickoxid-induzierten Aktivierung von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) durch 3-Aminobenzamid befinden sich zur Zeit noch im experimentellen Stadium oder in klinischer Erprobung (COUTURIER et al. 2003; HORTOBAGYI et al. 2003).

Die Applikation moderater Hypothermie (32 °C - 33 °C) bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie findet derzeit nur im Rahmen klinischer Studien statt. Dabei hat sich bei mehreren Untersuchungen gezeigt, dass Hypothermie offensichtlich zu einer Reduzierung des intrakraniellen Druckes führt. Eine Verbesserung des neurologischen Endergebnisses, eine Senkung der Mortalität oder der mit akuter zerebraler Ischämie verbundenen Komplikationen konnte bisher nicht eindeutig belegt werden. Mit der Anwendung von moderater Hypothermie assoziierte Komplikationen sind einerseits das Wiederanstiegen des intrakraniellen Druckes während der Erwärmungsphase, andererseits direkt durch die Erniedrigung der Körpertemperatur verursachte Phänomene wie zum Beispiel Pneumonien, Hypotonie oder Herzrhythmusstörungen (SCHWAB et al. 1998; KRIEGER et al. 2001; GEORGIADIS et al. 2002; JIAN et al. 2003).

Dexmedetomidin, das D-Enantiomer von Medetomidin, ist ein zur Zeit nur in den USA zugelassener, hochselektiver α_2 -Agonist, dessen Anwendung sich jedoch auf die postoperative intensivmedizinische Sedierung beschränkt. In einer vergleichenden Studie haben VENN und GROUNDS 2001 gezeigt, dass die sedativen Eigenschaften von Propofol und Dexmedetomidin gleich gut sind, dass jedoch Dexmedetomidin gegenüber Propofol den postoperativen Bedarf an Opioiden tendenziell reduziert. In einer Doppelblindstudie konnten SCHEININ et al. 1987 sedierende und kardiovaskuläre Effekte von Medetomidin an gesunden, freiwilligen Probanden nachweisen. So führt diese Substanz dosisabhängig zu einer Reduktion des systolischen und diastolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz und weist

sowohl sedierende als auch analgetische Komponenten auf. In einer Studie mit Dexmedetomidin hat sich darüberhinaus eine dosisunabhängige Verringerung des CBF um ca. 30 % gegenüber dem Ausgangswert beim Menschen zeigen lassen (PRIELIPP et al. 2002).

2 FRAGESTELLUNG UND HYPOTHESEN

2. 1 Bisherige Untersuchungen an Modellen mit inkompletter Hemisphärenischämie

Mit Hilfe des Modells einer inkompletten Hemisphärenischämie versucht man, neuroprotektive Wirkungen von Pharmaka und Mechanismen des neuronalen Zelltodes zu erkennen und zu verstehen. Ein Tiermodell ist deshalb von so großer Relevanz, weil die bisherige klinische Erfahrung mit Neuroprotektiva relativ gering ist (s. Kap. 1.4.2). Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass verschiedene Substanzen zerebroprotektiv wirken können. So hat sich bei Versuchstieren, die mit dem ACE-Hemmer Captopril (WERNER et al. 1991), mit den volatilen Anästhetika Halothan, Isofluran und Desfluran (BAUGHMAN et al. 1988 a; ENGELHARD et al. 1999) und mit dem Injektionsnarkotikum Ketamin (REEKER et al. 2000) behandelt worden sind, eine deutliche Verbesserung des neurologischen Endergebnisses nachweisen lassen. Durch Verwendung des Injektionsnarkotikums Propofol ließ sich der histopathologische Schaden deutlich reduzieren (KOCHS et al. 1992).

Vorangehende Studien haben gezeigt, dass die postischämische Behandlung mit Hypothermie nach inkompletter zerebraler Ischämie bei der Ratte das neurologische Endergebnis verbessert (HOFFMAN 1991 b). Auch die Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax kann durch Hypothermie reduziert werden (EBERSPÄCHER et al. 2003). Eine deutliche Verbesserung des neurologischen Endergebnisses lässt sich auch durch die Gabe des α_2 -Agonisten Dexmedetomidin erreichen (HOFFMAN 1991 a). ENGELHARD et al. haben 2002 eine signifikant verminderte Adrenalin- und Noradrenalin-Plasma-Konzentration durch den Einsatz dieses Medikamentes nach inkompletter zerebraler Hemisphärenischämie nachgewiesen.

2.2 Fragestellung und Studienziele

Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen soll in der vorliegenden Studie der Einfluss von Hypothermie und Dexmedetomidin auf den nekrotischen und apoptotischen Zelltod 1, 3, 7 und 28 Tage nach inkompletter zerebraler Hemisphärenischämie mit Reperfusion bei der Ratte untersucht werden.

Unumstritten ist, dass sowohl Nekrose als auch Apoptose am neuronalen Zelluntergang nach zerebraler Ischämie beteiligt sind (MACMANUS und BUCHAN 2000). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob 1) Hypothermie und 2) Dexmedetomidin a) an der Aktivierung von Caspase-3, die die Apoptose reguliert, beteiligt sind und ob b) darin ein neuroprotektiver Effekt liegt.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Tierexperimentelles Modell

Ziel des Experiments ist es, den Einfluss von postischämischer Hypothermie bzw. der Gabe von Dexmedetomidin auf den neuronalen Zellschaden nach inkompletter zerebraler Ischämie mit Reperfusion an der Ratte zu untersuchen.

3.2 Versuchstiere

In die Studie gehen 104 männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River GmbH, Sulzfeld) mit einem Gewicht von 400 ± 50 g ein. 12 Stunden präoperativ erfolgt Nahrungskarenz, damit sich prä- und intraoperativ ein normoglykämischer Zustand einstellt; Wasser erhalten die Tiere ad libitum.

Die Tiere sind gemäß den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes (Bundesgesetzblatt, Jahrgang 1986, Teil I) gehalten worden. Das Tierversuchsvorhaben ist gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG i. d. F. 25.05.1998; BGBl I S. 1105) durch die Tierschutzkommission der Regierung von Oberbayern genehmigt worden (Aktenzeichen 211-2531-29/ 99, Genehmigungsbescheid vom 22.06.1999, Zusatzgenehmigungsbescheid vom 26.04.2000).

3.3 Versuchsaufbau

Die Untersuchung lässt sich in einen operativen Teil, bestehend aus Präparations- (Tab. 3.2, 1-4), Ischämie- (Tab. 3.2, 5-7) und Reperfusionsphase (Tab. 3.2, 8-11) mit unterschiedlicher Überlebensdauer der Tiere und anschließender Analyse der Gehirnschnitte zur Beurteilung des neuronalen Zellschadens gliedern.

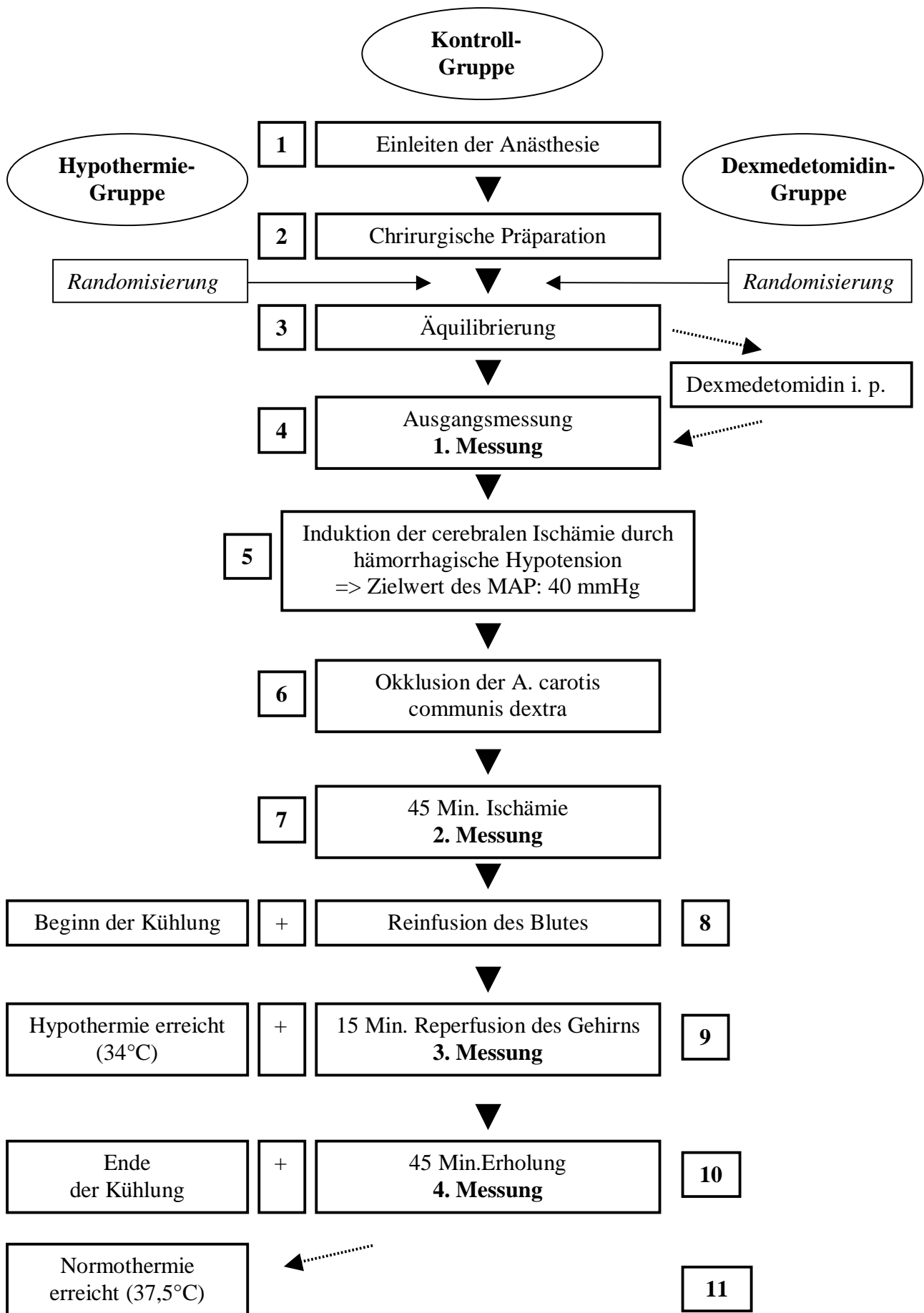
Am Versuch nehmen insgesamt 104 Ratten in vier Gruppen teil. Die Randomisierung der Tiere in eine Versuchsgruppe (Kontroll-Gruppe, Dexmedetomidin-Gruppe, Hypothermie-Gruppe) erfolgt nach der chirurgischen Präparation. Die Nativ-Gruppe setzt sich aus gesunden Ratten zusammen, denen vor der Dekapitation in tiefer Narkose keinerlei chirurgische Intervention zuteil geworden ist.

Für den Versuch ergibt sich folgender Gruppenplan:

	Überlebenszeiten			
	1d	3d	7d	28d
Kontroll-Gruppe (n=32)	n=8	n=8	n=8	n=8
Dexmedetomidin-Gruppe (n=32)	n=8	n=8	n=8	n=8
Hypothermie-Gruppe (n=32)	n=8	n=8	n=8	n=8
Nativ-Gruppe (n=8)	n=8			

Tab. 3.1: Gruppenplan

Es wird folgendes Protokoll zur Operation der Tiere angewandt:



Tab. 3.2: Verlaufsprotokoll der operativen Phase

3.4 Versuchsdurchführung

3.4.1 Narkoseeinleitung und Beatmung

Die Narkose wird bei allen Tieren in einem mit Halothan (Halothan ASID, Rüscher Hospital Vertriebs GmbH, Böblingen) versehenem Glaszylinder eingeleitet, in dem die Ratten nach ca. 30-45 Sekunden das Bewusstsein verlieren. Mit Hilfe eines modifizierten Kinderlaryngoskops werden die Tiere mit einem abgestumpften Cavakatheter (Cavafix Certo 1,5 x 2,0 mm/ 16G, 5 cm, Fa. Braun, Melsungen) endotracheal intubiert und anschließend volumengesteuert (Beatmungsmaschine Harvard Rodent Ventilator, Model 683, Harvard Apparatus Inc., South Natick, Massachusetts, USA) beatmet. Nach der Intubation werden die Augen mit Augensalbe (Bepanthen, Roche, Mannheim) und Gaze bedeckt, um eine Hornhautschädigung durch Austrocknen zu verhindern.

Während der chirurgischen Präparation wird die Narkose mit 2,0 - 2,5 Vol. % Isofluran (Forene, Abbot GmbH, Wiesbaden) in einem Sauerstoff-Lachgas-Gemisch ($FiO_2 = 0,33$) fortgeführt. Dabei werden die Atemfrequenz und das Atemzugvolumen so gewählt, dass der arterielle Kohlenstoffdioxid-Partialdruck ($paCO_2$) konstant zwischen 38 und 42 mmHg (Atemgasmonitor Capnomac, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) gehalten wird.

Nach Beendigung der chirurgischen Präparation (vgl. Kap. 3.4.3) wird die Isofluranzufuhr beendet und das Narkoseregime entsprechend dem Randomisierungsplan (s. Kap. 3.4.4) fortgeführt.

3.4.2 Katheterisierung der Gefäße

Zur Katheterimplantation (PE-Katheter 33,5 cm lang, Außendurchmesser 0,97 mm, Innendurchmesser 0,58 mm, eigene Herstellung) werden die rechte A. und V. femoralis sowie die rechte V. jugularis interna freigelegt. Außerdem wird die A. carotis communis nach Präparation mit einer losen Ligatur (1 mm dickes Gummiband, Fa. Ethicon, Norderstedt) nicht-okkludierend angeschlungen.

Der Katheter der A. femoralis dient zur invasiven Messung des arteriellen Blutdruckes sowie zur Entnahme arterieller Blutproben. Über zwei Katheter in der V. jugularis interna können Pharmaka appliziert werden.

Zur Prophylaxe von Thrombenbildung werden alle Katheter vor der Implantation heparinisiert (2 I. E. Heparin/ ml, 25000 I. E. Liquemin® N 25000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen; Sterofundin, Fa. Braun AG, Melsungen).

3.4.3 Chirurgische Präparation und Installation der Messgeräte

Die Schädelkalotte wird im Bereich des Os frontale freipräpariert und beidseits der Sutura sagittalis mit einem Diamantbohrer (Diamant-Schleifstift Kugelform, Durchmesser 1 mm, Fa. Proxxon, Niersbach) bis auf die innere Knochenlamelle aufgefräst. Mit Hilfe eines stereotaktischen Rahmens (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) werden zwei Laser-Doppler-Messsonden zur Messung des CBF auf die gefrästen Flächen zentriert.

Die Körperkerntemperatur wird rektal über eine Temperatursonde, die perikranielle Temperatur über eine im rechten M. temporalis lokalisierte Sonde (Hypodermic Needle Probes Hyp f-30-1/2-T-G-60-SMP-M, Omega, Stamford, Connecticut, USA) gemessen. Der Zielwert der perikraniellen Temperatur von $37,5\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$ wird über ein mit einer Infrarotlampe gekoppeltes Temperaturmessgerät (Gerät für Temperaturmessung Gehirn, Omega, Stanford, Connecticut, USA) reguliert.

Über zwei perkutane Nadelelektroden am ventralen Brustkorb wird ein konstantes EKG-Monitoring (Cardiicap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) gewährleistet. Die Herzfrequenz, die unter anderem der Überprüfung der Narkosetiefe dient, wird durch Anlegen eines EKG-Lineales am kurzzeitig gestoppten EKG-Monitor ausgemessen. Dies ist erforderlich, da die Ruheherzfrequenz bei Ratten etwa 400 Schläge pro Minute beträgt und ein so hoher Messwert mit der numerischen Anzeige, die auf 256 begrenzt ist, nicht erfasst werden kann.

Während des gesamten Versuches wird zur Beurteilung der Narkosetiefe und der physiologischen Hirnaktivität ein EEG (Oscilloscope für EEG-Messung, Hameg 20 MHz HM205-3, Frankfurt) abgeleitet. Hierzu werden fünf Elektroden an definierten Messpunkten (je zwei Elektroden rechts und links perikraniell und eine Erdungselektrode in der Schwanzwurzel) angelegt. Eine weitere Auswertung des EEG erfolgt nicht.



Abb. 3.1: Versuchsaufbau während der ischämischen Phase

3.4.4 Versuchsprotokoll

Nach Beendigung der chirurgischen Präparation (vgl. Kap. 3.4.3) wird die Narkose nach einem Randomisierungsplan fortgeführt:

Kontroll-Gruppe	10 µg/ kg KG Fentanyl i. v. als Bolus und 25 µg/ kg KG/ h Fentanyl i. v. als Dauerinfusion und Beatmung mit einem Sauerstoff-Lachgas-Gemisch (FiO ₂ = 0,33)
Hypothermie-Gruppe	25 µg/ kg KG/ h Fentanyl i. v. als Dauerinfusion und Beatmung mit einem Sauerstoff-Lachgas-Gemisch (FiO ₂ = 0,33) postischämische Hypothermie von 34 °C über eine Stunde (die Abkühlung von Normothermie (37,5 °C) auf 34 °C über 30 Min. wird mit dem Beginn der Reperfusion eingeleitet, die Aufwärmphase erstreckt sich ebenfalls über 30 Min.).
Dexmedetomidin-Gruppe	intraperitoneale Injektion von 1 ml Dexmedetomidin 4 mg/ml 30 Min. vor Beginn der Ischämie 25 µg/ kg KG/ h Fentanyl i. v. als Dauerinfusion und Beatmung mit einem Sauerstoff-Lachgas-Gemisch (FiO ₂ = 0,33)

Tab. 3.3: Randomisierungsplan

Bei einer weiteren Gruppe, der Nativ-Gruppe, werden die Tiere ohne vorherige chirurgische Intervention in tiefer Narkose dekapitiert und das Gehirn als physiologischer Vergleichswert eingefroren.

Bis zur Induktion der zerebralen Ischämie wird das Muskelrelaxans Rocuronium (Esmeron, Organon, Oss, Niederlande) in der Dosierung 4 mg/ kg KG/ h i. v. verabreicht. Mit Beginn der Induktion der zerebralen Ischämie wird die Applikation des Muskelrelaxans beendet. Die Äquilibrationsphase dauert 52 Minuten.

Blutentzug

Kurz vor dem Blutentzug wird statt des Muskelrelaxans 8,4%iges Natriumbikarbonat (Delta-Pharma GmbH, Pfullingen) zur Stabilisierung des Säure-Basen-Haushalts über den Venenkatheter infundiert und während der gesamten Ischämiezeit je nach Bedarf appliziert, so dass der Blut-pH-Wert stets im physiologischen Bereich liegt. Über den Katheter in der rechten V. femoralis wird über einen Zeitraum von 8 Minuten durch Blutentnahme eine hämorrhagische Hypotension mit dem Zielparameter Mittlerer Arterieller Blutdruck (MAP) = 40 mmHg induziert. Das entnommene Blut wird in heparinisierten Spritzen (Fa. Braun AG, Melsungen) bei 37 °C aufbewahrt.

Ischämiephase

Nach Erreichen des Zieldruckes wird die erste Messung von rektaler und perikranieller Temperatur, Blutdruck, Herzfrequenz, Hb-Konzentration, Blutglukosekonzentration, arteriellem Sauerstoff-Partialdruck (paO_2), arteriellem paCO_2 , pH-Wert und Basenabweichung (BE) ("Ausgangswert") vorgenommen und sofort im Anschluss daran die rechte A. carotis communis mit einem Clip für 45 Minuten okkludiert, wobei der MAP während der Ischämiephase konstant bei 40 mmHg gehalten wird.

Die zweite Messung erfolgt gegen Ende der 45-minütigen Ischämiephase ("45 Min. Ischämie").

Reinfusion und Reperfusion

Am Ende der Ischämiephase ersetzt man die Infusion von Natriumbikarbonat durch das Muskelrelaxans Rocuronium. Der Clip wird entfernt und das entnommene Blut während der folgenden 15 Minuten reinfundiert. Es folgt die dritte Messung ("15 Min. Reperfusion"). Während der folgenden Reperfusionsphase werden die Tiere über einen Zeitraum von mindestens zwei Stunden weiterbeobachtet. Während dieses Zeitraums erfolgt eine weitere Messung ("75 Min. Erholung").

Hypothermiephase

Bei den Tieren der Hypothermie-Gruppe wird mit Beginn der Reinfusion und Reperfusion die Hypothermiephase eingeleitet, indem die Tiere über 30 Minuten von ihrer physiologischen Körperkerntemperatur (37,5 °C) durch Ausschalten der Infrarotlampe und durch Kälteapplikation langsam auf 34 °C abgekühlt werden. Der Zustand der Hypothermie bei 34 °C wird dann eine Stunde lang konstant gehalten, und nach dieser Zeit werden die Ratten langsam per intervallweise angeschalteter Infrarotlampe erwärmt, so dass sie nach einer halben Stunde wieder normotherm sind.

Versuchsende

90 Minuten nach Abschluss der Reinfusion und Reperfusion beginnt man mit dem Entfernen der Sonden und Katheter. Nach Unterspritzen der Wundränder mit einem langwirkenden Lokalanästhetikum (Bucain 0,5 %, Curasan Pharma AG, Kleinostheim) werden die Wunden verschlossen. Die Narkose wird beendet und das Tier bis zum Einsetzen der Spontanatmung mit einem Sauerstoff-Luft-Gemisch beatmet. Nach Extubation wird das Tier noch weiterhin sorgfältig beobachtet und dann wieder in den Tierstall verbracht.

Dekapitation

Je nach randomisierter Überlebenszeit wird den Tieren das Gehirn nach 1, 3, 7 oder 28 Tagen entnommen, nachdem die Tiere vorher in tiefer Narkose dekapitiert worden sind.

3.5 Physiologische Variablen

Zu den Messzeitpunkten (s. Tab. 3.4) werden als hämodynamische Parameter jeweils der arterielle Blutdruck (systolischer, diastolischer und mittlerer Blutdruck) über invasive Messung in der A. femoralis dextra über den Katheter, der über einen Druckdom (MX 960, Fa. Medex, Lancashire, England) mit der Messapparatur (Cardiicap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) verbunden ist, sowie die Herzfrequenz durch Anlegen eines EKG-Lineales am kurzzeitig gestoppten EKG-Monitor (Cardiicap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) gemessen. Außerdem führt man mit Hilfe heparinisierten Kapillaren (MultiCap 175 µl, Chiron Diagnostics GmbH, Fernwald) zu den Messzeitpunkten jeweils eine arterielle Blutgasanalyse durch und bestimmt folgende Laborparameter: den arteriellen paO_2 und paCO_2 , den pH-Wert, die Basenabweichung (BE) und die Hb-Konzentration (pH/ Blutgasanalyser 1306 Instrumentation Laboratory, Mailand, Italien) sowie die Blutglukosekonzentration (Glucometer Elite, Bayer Diagnostics, München). Die während der chirurgischen Präparation (s. Kap. 3.4.3) installierten Messsonden dienen der Messung der Körperkern- bzw. perikraniellen Temperatur.

Physiologische Variablen	Messungen	Beschreibung der Messzeitpunkte
Temperatur (rektal und perikraniell)	1. Messung	"Ausgangswert"
Blutdruck/ Herzfrequenz	2. Messung	"45 Minuten Ischämie"
Hb/ Blutglukosekonzentration	3. Messung	"15 Minuten Reperfusion"
paO_2 / paCO_2 / pH/ BE	4. Messung	"75 Minuten Erholung"

Tab. 3.4: Physiologische Variablen und Messzeitpunkte. Pro Messung werden jeweils alle genannten physiologischen Variablen bestimmt.

Zur Beurteilung der zerebralen Perfusion wird der CBF kontinuierlich über Laser-Doppler-Flussmessung (PeriFlux 4001 Master, Fa. Perimed, Järfalla, Schweden) detektiert. Als Kontrolle der korrekten Platzierung der Sonden wird nach der chirurgischen Präparation der Tiere ein CO_2 -Provokationstest durchgeführt. Dabei hyperventiliert man die Tiere kurzfristig unter Reduktion der Isoflurankonzentration von 2 Vol. % auf 1 Vol. %: die durch den Abfall des paCO_2 bedingte zerebrale Vasokonstriktion muss bei richtiger Platzierung der Sonden zu einem Abfallen des CBF um ca. 10 % führen.

Ebenfalls leitet man während des gesamten Versuches zur Beurteilung der Narkosetiefe und der physiologischen Hirnaktivität ein EEG (Oscilloscope für EEG-Messung, Hameg 20 MHz HM205-3, Frankfurt) ab, das nach Versuchsende nicht weiter ausgewertet wird.

3.6 Präparation, Entnahme und Einfrieren des Gehirns

Nach der Tötung der Tiere in tiefer Narkose werden die Kopfschwarte und die Muskulatur vorsichtig von der Schädelkalotte abpräpariert und die Schädeldecke mit einer Hohlmeiselzange entfernt, ohne das Gehirn zu beschädigen. Mit einem Spatel werden vor der Gehirnentnahme die Hirnnerven durchtrennt und das Gehirn von basal aus dem knöchernen Schädel gehoben. Das Gehirn wird in einen Aluminiumzylinder (ca. 1,5 cm Durchmesser x ca. 2,5 cm Höhe) platziert, und der Zylinder wird mit Einfriermedium (Tissue Freezing Medium, Fa. Jung, Leica Instruments, Nussloch) so weit gefüllt, bis das Gehirn gut bedeckt ist. Das eingebettete Gewebe wird mit auf Trockeneis stehendem 2-Methylbutan (Fa. Merck, Darmstadt) durchgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70 °C gelagert. Zur Gewinnung von Nativtier-Gehirnen entnimmt man unbehandelten, gesunden Ratten nach ihrer Tötung in tiefer Narkose das Gehirn in der oben beschriebenen Weise.

3.7 Dissektionsschema zur Gewinnung von Gewebeschnitten

Für die histologische Untersuchung benötigt man Gefrierschnitte mit einer Dicke von 7 μm in koronarer Schnittebene. Vor der Dissektion befreit man das Gehirn weitgehend von Einfriermedium und Aluminiumfolie und verbringt es auf den Objektisch des Kryotoms (Microtom-Kryostat, HM 500 OM, Firma Microm GmbH, Walldorf). Bei einer Objekttemperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einer Kammertemperatur von $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ werden zuerst Probeschnitte angefertigt und das Gehirn dann bis zu der festgelegten Schnittebene, Bregma (Schnittpunkt der Sutura coronalis und sagittalis) $-2,3\text{ mm}$ geschnitten. Hat man die Schnittebene erreicht, werden jeweils 7 μm dicke Hirnschnitte angefertigt und jeweils zwei auf einem Objektträger (Objektträger Super Frost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgenommen (s. Abb. 3.2).

Als Positiv- und Negativkontrollen für die immunhistochemischen Färbungen werden von Tieren der Nativ-Gruppe jeweils 7 μm dicke Schnitte von Gehirn (Negativkontrolle) und von gesunden, juvenilen Ratten vom Thymus (Positivkontrolle) angefertigt.

Sämtliche Gewebeschnitte werden sofort nach der Dissektion bis zur weiteren Verarbeitung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

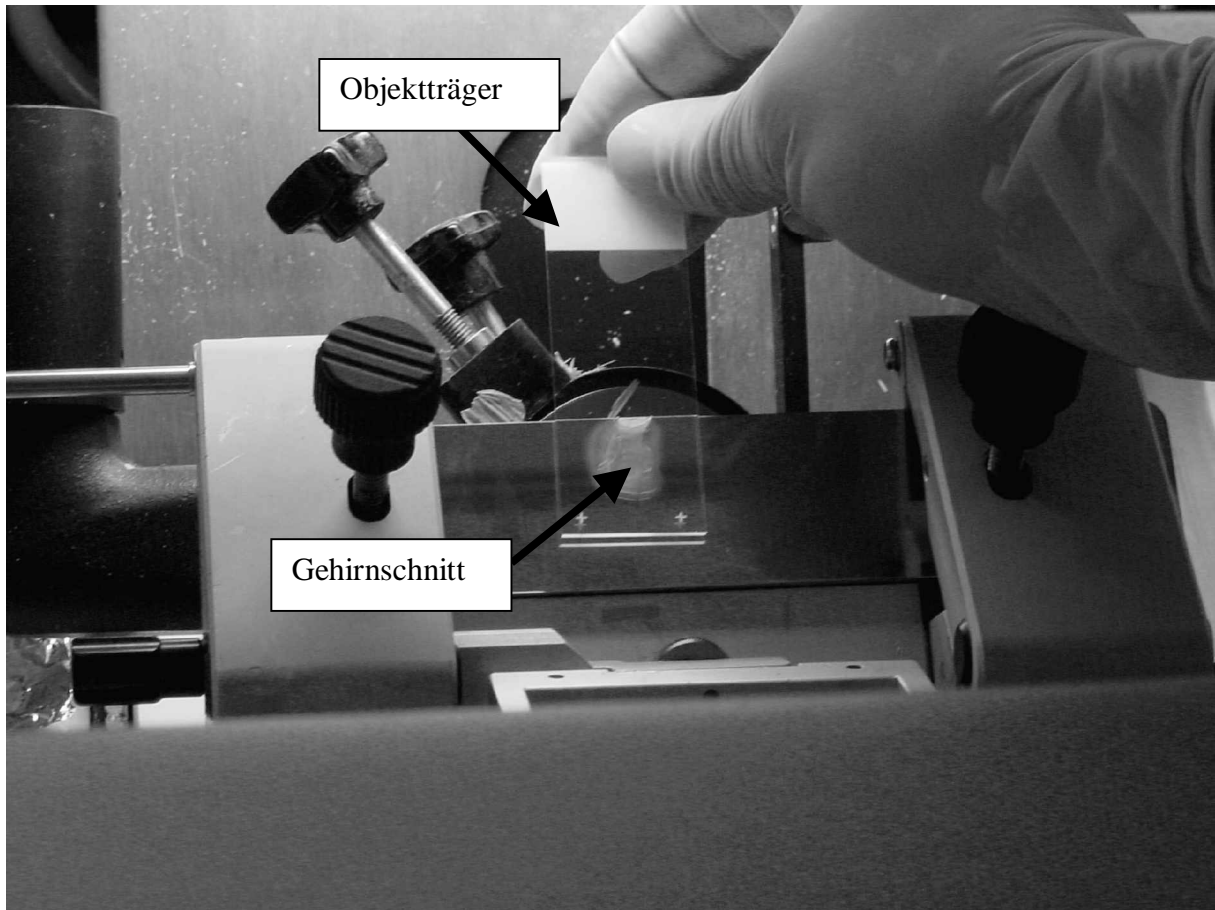


Abb. 3.2: Aufnahme eines mit dem Kryotom angefertigten Gehirnschnittes

3.8 Histologische Untersuchungen

3.8.1 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE)

3.8.1.1 Durchführung der Färbung

Zunächst durchlaufen die bei -70°C gelagerten Objektträger zum Rehydrieren eine absteigende Alkoholreihe: 10 Minuten in Ethanol 100 % (Ethanol pro analysi, Merck, Darmstadt), jeweils 1 Minute zunächst in Ethanol 96 % (Ethanol 96 %, Merck, Darmstadt), dann in Ethanol 70 % (Ethanol 70 %, Merck, Darmstadt). Danach folgt die Färbung mit 4°C kaltem Farbstoff Hämatoxylin (Saures Hämatoxylin nach Mayer, Zusammensetzung: 1,0 g Hämatoxylin; 0,2 g Natriumjodat; 50,0 g Kaliumaluminiumsulfat-12-Hydrat; 50,0 g Chloralhydrat; 0,91 g Zitronensäure wasserfrei in 1 Liter Aqua destillata (Aqua dest.), Apotheke des Klinikums rechts der Isar der TU München) für 5 Minuten. Sofort im Anschluss daran werden die Objektträger für 10 Minuten in kaltem Leitungswasser gewaschen, das in diesem Zeitraum so oft gewechselt wird, bis keine Farbwolken mehr zu sehen sind. Jetzt führt man die Gegenfärbung mit Eosin durch, indem die Objektträger für 30 Sekunden in 4°C kaltes Eosin (wässrige Eosin-Dinatriumlösung 0,5 %, Zusammensetzung: Eosin G Pharm. Franc. 0,5 g, Zitronensäurelösung in 100 ml Aqua dest., Apotheke des Klinikums rechts der Isar der TU München) eingebracht werden. Nach diesem Färbeschritt werden die Objektträger jeweils für wenige Sekunden nacheinander in zwei mit destilliertem Wasser (Aqua Spüllösung, Delta Select, Pfullingen) gefüllte Standküvetten eingetaucht. In einer aufsteigenden Konzentrationsreihe werden die Objektträger für jeweils 1 Minute in 70%igem Ethanol, in 96%igem Ethanol und in 100%igem Ethanol dehydriert. Anschließend verbringt man die Objektträger zur Fixierung je 2 und 5 Minuten lang in Roti-Histol (Roti-Histol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Da die Präparate dauerhaft haltbar gemacht werden sollen, wird ein mit 2 Tropfen Roti-Histokitt (Roti-Histokitt, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) versehenes Deckglas (Menzel, Braunschweig) ohne den Einschluss von Luftbläschen über die Schnitte gelegt. Die eingedeckten Objektträger werden für ca. 24 Stunden zum Trocknen gelagert.

3.8.1.2 Auswertung der Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung benötigt man, um Aussagen über Ödementwicklung, Zystenbildung und Entzündungszeichen in der gesamten Schnittebene bzw. über nekrotische Zellveränderungen im Bereich der Hippokampus-Formation treffen zu können. Die Anzahl eosinophiler Zellen in der Hippokampus-Formation als absoluter Wert bzw. im Vergleich zur Gesamtzellzahl des Hippocampus dient als Parameter zur Aussage über nekrotischen Zellschaden.

Die gefärbten Schnitte werden unter dem Mikroskop (Axiolab, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) zunächst bei 25-facher Vergrößerung zur Klassifizierung des Schadens betrachtet. Die Schadensklassifizierung (s. Tab. 3.5) differenziert nach Grad und nach Lokalisation der Schädigung in der geschädigten, also der rechten Hemisphäre. Dabei bedeutet beispielsweise die Klassifizierungsstufe B2: eosinophile Zellschädigung mit Ödem im kompletten Hippokampus. Die Tabelle zur Schadensklassifizierung ist eine eigens für diese Fragestellung mit Hilfe spezieller Literatur (DAVID 1970; REMMELE 1984) entworfene Einteilung. Die Einteilung in die verschiedenen Schadensklassen wird später aus statistischen Gründen in nur vier Gruppen zusammengefasst: Grad 0 entspricht keiner Schädigung, Grad 1 (leichte Schädigung) fasst A1 bis A4 zusammen, Grad 2 (mittelschwere Schädigung) besteht aus B1 bis B4 und Grad 3 (schwere Schädigung) aus C1 bis D4 (s. Bildtafel I, A-D; Bildtafel II, E; Bildtafel III, K und L).

Grad	0	keine Schädigung
	A	nur eosinophile Zellschädigung ohne Gewebeödem
	B	eosinophile Zellschädigung mit Gewebeödem
	C	Organisation/ Makrophageneinwanderung
	D	Pseudozyste/ Gewebsverlust
Lokalisation	1	nur Teile des Hippokampus
	2	kompletter Hippokampus
	3	Hippokampus und Kortex
	4	Hippokampus, Kortex und Basalganglien

Tab. 3.5: Klassifizierung des Zell- und Gewebes Schadens nach zerebraler Ischämie

Bei 200-facher Vergrößerungsstufe wird anschließend die Anzahl der basophilen bzw. eosinophilen Zellen in der Hippokampus-Formation (eingeteilt in die Regionen CA-1, CA-2, CA-3 und CA-4) sowie im Gyrus dentatus (s. Abb. 3.3) durch Auszählen bestimmt.

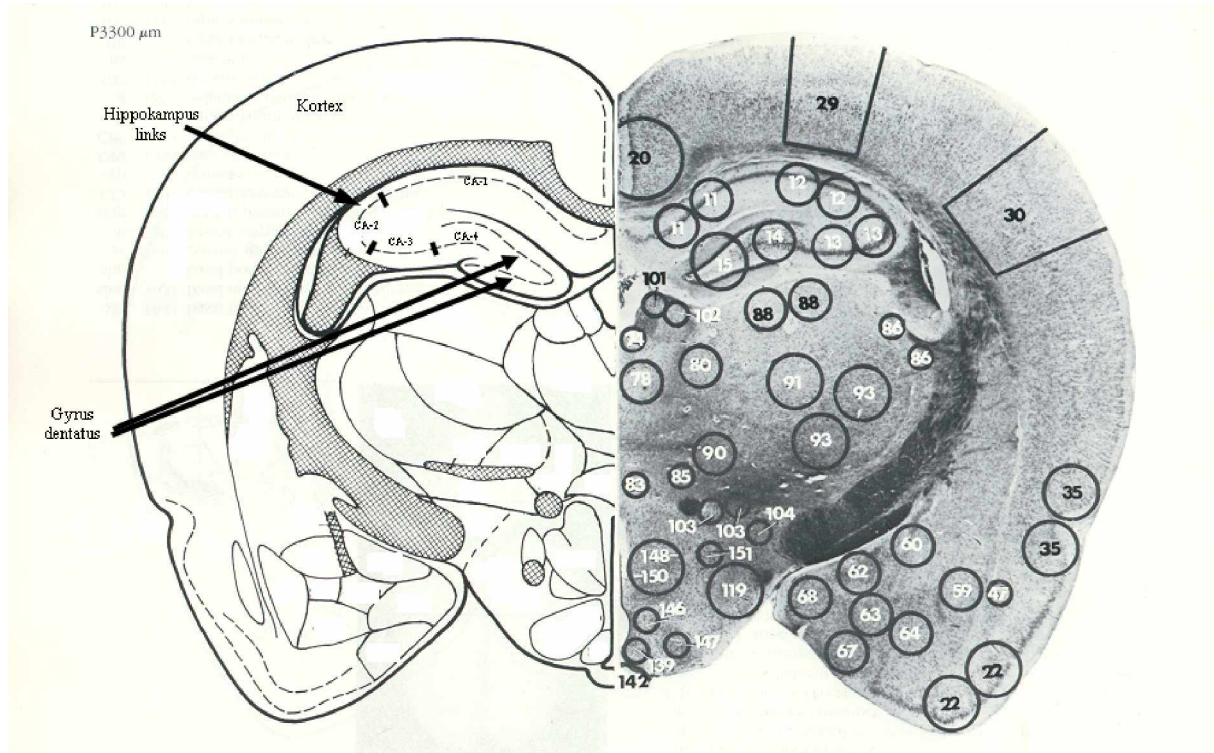


Abb. 3.3: Schematische (linke Seite) und lichtmikroskopische (rechte Seite) Darstellung eines koronaren Schnittes eines Rattengehirns. Auf der linken Seite ist die Einteilung des Hippokampus in die Regionen CA-1, CA-2, CA-3, CA-4 sowie oberen und unteren Ast des Gyrus dentatus gekennzeichnet. Lokalisation im Gehirn: Ebene 33. Modifizierte Abbildung nach PAXINOS und WATSON 1998

3.8.2 Immunhistochemische Färbung zur Detektion aktivierter Caspase-3

3.8.2.1 Durchführung der Färbung

Alle Objektträger werden sofort nach Entnahme aus dem -70 °C kalten Gefrierschrank zum Fixieren der Schnitte für 5 Minuten in 4%iges, auf 4 °C gekühltes Paraformaldehyd (4 g Paraformaldehyd, Merck, Darmstadt, in 100 ml PBS, 80 µl 1-molares NaOH, eigene Herstellung) verbracht, wodurch ein Ablösen der Schnitte von den Objektträgern verhindert werden soll. Im nächsten Schritt werden die Objektträger für 5 Minuten in PBS (320 g NaCl, 57,6 g NaHPO₄, 9,6 g KH₂PO₄, 8 g KCl ad 2000 ml Aqua dest.) gewaschen. Danach werden sie zur Hemmung der endogenen Peroxidase für 10 Minuten in 3%iges H₂O₂-Methanol (Merck, Darmstadt) gestellt. Es folgen zwei weitere Waschschrte mit PBS für jeweils 3 Minuten. Anschließend wird von jedem Objektträger jeweils 1 Schnitt mit einem inerten Fettstift (Liquid Blocker, Daido Sangyo Co. Ltd., Tokyo, Japan) so umfahren, dass darauf getropfte Lösungen später nicht wegfließen können. Die Objektträger werden, um ein Austrocknen der Flüssigkeit auf dem Schnitt zu verhindern, in eine mit ca. 100 ml Wasser gefüllte feuchte Kammer verbracht, und auf den mit dem Fettstift umkreisten Schnitt wird jeweils 50 µl einer Proteinblockierungslösung (DAKO Protein Block serum-free, Ready-to-use, DAKO Co., Carpinteria, USA) zur Hemmung unspezifischer Bindungen beim Auftragen des Primärantikörpers pipettiert. Nach 20 Minuten wird das Blockierserum ohne Waschen durch Abschütteln entfernt. Jetzt werden auf jeden Schnitt 50 µl des mit Proteinblockierungslösung im Verhältnis 1:200 verdünnten Primärantikörpers (Purified rabbit anti-active caspase-3 monoclonal antibody, Lot-Nummer MO62369, BD Pharmingen, San Diego, USA) pipettiert, die Inkubationszeit in der Inkubationskammer beträgt 50 Minuten. Nach dieser Zeit werden die Objektträger durch vorsichtiges Ausschütteln von dem Antikörper befreit und jeweils für 3 Minuten zweimal hintereinander in PBS gewaschen. Die Objektträger werden wiederum in die feuchte Kammer verbracht und der Schnitt mit jeweils 50 µl des gebrauchsfertigen Sekundärantikörpers (DAKO LSAB 2 System HRP, DAKO Co., Carpinteria, USA) versehen. Wenn die Inkubationszeit von 45 Minuten erreicht ist, werden die Objektträger durch vorsichtiges Ausschütteln von dem Sekundärantikörper befreit und zweimal hintereinander für jeweils 3 Minuten in PBS gewaschen. Erneut werden die Objektträger in die feuchte Kammer gelegt und jetzt mit gebrauchsfertigem Streptavidin (DAKO LSAB 2 System HRP, DAKO Co., Carpinteria, USA) für 30 Minuten inkubiert.

Nach dem erneuten Ausschütteln der Objektträger folgen zwei weitere Waschschrirte mit PBS für jeweils 3 Minuten. Die Diaminobenzidin (DAB)-Pufferlösung (DAKO Liquid DAB Substrate-Chromogen-System, DAKO Co., Carpinteria, USA) zur Markierung der Antigen-Antikörperreaktion, die kurz vor Gebrauch mit H₂O₂ versetzt worden ist, wird jetzt auf die Objektträger aufgetragen und dort für 2 Minuten belassen. Nach dieser Zeit wird der Objektträger vorsichtig ausgeschüttelt und dann drei Mal hintereinander für jeweils 10 Minuten in Aqua destillata (Aqua Spüllösung, Delta Select, Pfullingen) gewaschen. Anschließend folgt die Gegenfärbung zur Darstellung der Zellkerne, indem die Objektträger in eine mit 4 °C kaltem Hämatoxylin gefüllte Standküvette verbracht werden. Nach ca. 45 Sekunden werden die Objektträger herausgenommen und in kaltem Leitungswasser so lange gewaschen, bis keine Farbwolken mehr von den Objektträgern abgehen. Als nächstes lässt man die Objektträger kurz bei Raumtemperatur trocknen und beginnt dann mit der aufsteigenden Alkoholreihe zur Dehydrierung der Schnitte: 2 Minuten 70%iger Ethanol, 1 Minute 96%iger Ethanol und 1 Minute 100%iger Ethanol. Anschließend werden die Objektträger zur Fixierung in Roti-Histol verbracht, und zwar zunächst 2 Minuten, dann 5 Minuten. Da die Präparate dauerhaft haltbar gemacht werden sollen, wird ein mit 2 Tropfen Roti-Histokitt versehenes Deckglas ohne den Einschluss von Luftbläschen über die Schnitte gelegt. Die eingedeckten Objektträger werden für ca. 24 Stunden zum Trocknen gelagert. Insgesamt werden in einem Färbedurchgang randomisiert Schnitte von 17 verschiedenen Tieren aus der Dexmedetomidin-, Hypothermie- bzw. Kontroll-Gruppe sowie ein Thymusschnitt als Positivkontrolle und ein Nativtierschnitt als Negativkontrolle zur Qualitätssicherung (vgl. Kap. 3.8.2.2) gefärbt. Das entspricht einer Gesamtzahl von 19 Objektträgern pro Färbedurchgang.

3.8.2.2 Auswertung der Färbung

Bevor die Schnitte von Tieren aus den eigentlichen Versuchs-Gruppen untersucht werden, überzeugt man sich anhand folgender Kriterien, dass in dem immunhistochemischen Färbedurchgang eine aussagekräftige, spezifische Anfärbung des Antigens (aktivierte Caspase-3) erfolgt ist:

- Die Positivkontrolle (Thymus) muss eindeutig Caspase-positive Zellen mit intrazellulärer Braunfärbung enthalten (URBAN 2002).
- Die Negativkontrolle (Nativtier) darf keine Caspase-3-positiven Zellen aufweisen (s. Bildtafel II, Bilder F, I, J).

Nur wenn diese beiden Voraussetzungen gegeben sind, wird mit der Auswertung der übrigen Schnitte aus einer Färbung begonnen. Die gefärbten Schnitte werden unter dem Lichtmikroskop zunächst bei 25-facher Vergrößerung mit eingeklappter Lupe in der Übersicht betrachtet. Dann wird mit 400-facher Vergrößerung die Hippokampus-Formation, unterteilt in die Regionen CA-1, CA-2, CA-3 und CA-4 sowie Gyrus dentatus (s. Abb. 3.3) auf Caspase-3-positive Zellen untersucht. Dabei wird zwischen schwach und stark Caspase-3-positiven Zellen unterschieden (s. Bildtafel III, M und N).

3.8.3 Doppelfärbung zur Detektion aktivierter Caspase-3 und von NeuN

3.8.3.1 Durchführung der Färbung

Alle Objektträger werden sofort nach Entnahme aus dem -70 °C kalten Gefrierschrank zum Fixieren der Schnitte für 5 Minuten in 4%iges, auf 4° C gekühltes Paraformaldehyd verbracht, wodurch ein Ablösen der Schnitte von den Objektträgern verhindert werden soll. Im nächsten Schritt werden die Objektträger für 5 Minuten in PBS gewaschen. Danach werden sie zur Hemmung der endogenen Peroxidase für 10 Minuten in 3%iges H₂O₂-Methanol gestellt. Es folgen zwei weitere Waschschrte mit PBS für jeweils 3 Minuten. Anschließend wird von jedem Objektträger jeweils 1 Schnitt mit einem Fettstift so umfahren, dass darauf getropfte Lösungen später nicht wegfließen können. Die Objektträger werden in eine mit ca. 100 ml Wasser gefüllte feuchte Kammer verbracht, und auf den mit dem Fettstift umkreisten Schnitt wird jeweils 50µl einer Proteinblockierungslösung pipettiert, die das Auftreten von unspezifischen Bindungen beim Auftragen des Primärantikörpers verhindern soll. Nach 20 Minuten wird das Blockierserum ohne Waschen durch Abschütteln entfernt. Jetzt werden auf jeden Schnitt 50 µl des mit der Proteinblockierungslösung im Verhältnis 1:200 verdünnten Primärantikörpers (Purified rabbit anti-active caspase-3 monoclonal antibody) pipettiert, die Inkubationszeit in der feuchten Kammer beträgt 50 Minuten. Nach dieser Zeit werden die Objektträger durch vorsichtiges Ausschütteln von dem Antikörper befreit und jeweils für 3 Minuten zweimal hintereinander in PBS gewaschen. Die Objektträger werden wiederum in die Inkubationskammer verbracht und der Schnitt mit jeweils 50 µl des im Verhältnis 1:200 verdünnten Sekundärantikörpers (Biotinylated anti-rabbit IgG, Vector Laboratories, Burlingame, USA) versehen. Wenn die Inkubationszeit von 45 Minuten erreicht ist, werden die Objektträger durch vorsichtiges Ausschütteln von dem Sekundärantikörper befreit und zweimal hintereinander für jeweils 3 Minuten in PBS gewaschen. Erneut werden die Objektträger in die feuchte Kammer gelegt und jetzt mit gebrauchsfertigem Streptavidin (Horseradish Peroxidase Streptavidin Concentrate, Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 30 Minuten inkubiert. Nach dem erneuten Ausschütteln der Objektträger folgen zwei weitere Waschschrte mit PBS für jeweils 3 Minuten. Die Diaminobenzidin (DAB)-Pufferlösung zur Markierung der Antigen-Antikörperreaktion, die kurz vor Gebrauch mit H₂O₂ versetzt worden ist, wird jetzt auf die Objektträger aufgetragen und dort für 20 Minuten belassen. Anschließend werden die Objektträger für 3 Minuten in Aqua destillata gewaschen.

Nachdem die Objektträger noch kurz in PBS gestellt worden sind, wird als zweiter Primärantikörper der Antikörper gegen Neuron-specific nuclear protein (NeuN) (Mouse anti-neuronal nuclei monoclonal antibody, Chemicon International, Temecula, USA) aufgetragen, der mit Proteinblockierungslösung im Verhältnis 1:500 verdünnt ist. Nach 50 Minuten Inkubationszeit in der feuchten Kammer werden die Schnitte für jeweils 3 Minuten zweimal hintereinander in PBS gewaschen. Die Objektträger werden wieder in die feuchte Kammer verbracht, mit dem Sekundärantikörper (Biotinylated anti-mouse IgG, Vector Laboratories, Burlingame, USA) versehen, der im Verhältnis 1:200 mit Proteinblockierungslösung verdünnt ist und 45 Minuten lang inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für jeweils 3 Minuten in PBS wird alkalische Phosphatase-konjugiertes Streptavidin (Alkaline Phosphatase Streptavidin, Vector Laboratories, Burlingame, USA) in der Verdünnung 1:200 aufgetragen. Nach 30 Minuten Inkubationszeit in der feuchten Kammer folgen wiederum zwei Waschschritte à 3 Minuten in PBS. Zum Entwickeln der roten Farbe wird dann Vector Red (Vector Red Substrate Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) aufgetragen, und nach 30 Minuten in der feuchten Kammer werden die Schnitte jeweils für 3 Minuten zweimal hintereinander in PBS gewaschen. Nach kurzem Trocknenlassen der Schnitte bei Raumtemperatur werden die Objektträger in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe für 2 Minuten in Ethanol 70 % und für jeweils 1 Minute in Ethanol 96 % bzw. Ethanol 100 % dehydriert. Durch Inkubation in Roti-Histol für je 2 und 5 Minuten werden die Schnitte fixiert. Um das Gewebe dauerhaft haltbar zu machen, werden die Objektträger anschließend mit Deckgläschen und 2 Tropfen Roti-Histokitt blasenfrei eingedeckt. Die eingedeckten Objektträger werden für ca. 24 Stunden zum Trocknen gelagert.

Insgesamt werden in einem Färbedurchgang randomisiert Schnitte von 17 verschiedenen Tieren aus der Dexmedetomidin-, Hypothermie- bzw. Kontroll-Gruppe sowie ein Thymusschnitt als Positivkontrolle und ein Nativtierschnitt als Negativkontrolle zur Qualitätssicherung (vgl. Kap. 3.8.3.2) gefärbt. Das entspricht einer Gesamtzahl von 19 Objektträgern pro Färbedurchgang.

3.8.3.2 Auswertung der Färbung

Bevor die Schnitte von Tieren aus den eigentlichen Versuchs-Gruppen untersucht werden, überzeugt man sich anhand der in Kap. 3.8.2.2 dargelegten Kriterien, dass in dem immunhistochemischen Färbedurchgang eine aussagekräftige, spezifische Anfärbung des Antigens (aktivierte Caspase-3) erfolgt ist:

Bei der 400-fachen Vergrößerung wird die Hippokampus-Formation, unterteilt in die Regionen CA-1, CA-2, CA-3 und CA-4 sowie Gyrus dentatus (s. Abb. 3.3), auf Caspase-positive Zellen und NeuN-positive Zellen untersucht. Dabei wird zwischen schwach und stark Caspase-positiven Zellen sowie zwischen schwach Caspase-positiven und NeuN-positiven Zellen und stark Caspase-positiven Zellen und NeuN-positiven Zellen unterschieden. Zellen, die sowohl Caspase- als auch NeuN-positiv sind, zeigen sich unter dem Mikroskop als braun gefärbte Zellen mit rotem Randsaum (s. Bildtafel III, O und P).

3.9 Statistische Berechnung und Dokumentation

Man vergleicht die Ergebnisse aller Tiere aus den drei Versuchs-Gruppen (Hypothermie, Dexmedetomidin und Kontrolle) zu den vier Zeitpunkten (1, 3, 7, und 28 Tage) untereinander. Außerdem werden Hypothermie- und Kontroll-Gruppe bzw. Dexmedetomidin- und Kontroll-Gruppe gegenübergestellt.

Mittels einer 2-Wege-ANOVA werden die Ergebnisse auf signifikante Unterschiede hin überprüft.

Mit Hilfe der Studie sollen zwei potentiell neuroprotektive Therapieansätze (Hypothermie bzw. die Gabe von Dexmedetomidin) mit einer Anästhetikakombination (Fentanyl/ Lachgas) verglichen werden, die während einer zerebralen Ischämie nachweislich keine neuroprotektive Wirkung zeigt (BAUGHMAN et al. 1988 b; MORIMOTO et al. 1997). Aus diesem Grund werden die Gabe von Dexmedetomidin bzw. die Induktion einer Hypothermie mit der Kontroll-Gruppe verglichen und kein direkter Vergleich von Dexmedetomidin mit Hypothermie vorgenommen.

Ziel des Vergleichs der verschiedenen Zeitpunkte ist die Untersuchung des Einflusses der Reperusionszeit des Gehirns auf die Ausprägung des neuronalen Schadens und auf die Aktivierung des Proteins Caspase-3 und dessen zeitliche Verteilung.

Durch den Vergleich der Kontroll-Gruppe mit der Dexmedetomidin- bzw. Hypothermie-Gruppe lässt sich eine Aussage über den Einfluss von Dexmedetomidin bzw. Hypothermie auf den Ausmaß des Schadens und die Aktivierung der Caspase-3 im Vergleich zu Fentanyl/ Lachgas treffen.

Ausgewertet werden die Ergebnisse der intraoperativ zu den vier Messzeitpunkten ermittelten physiologischen Variablen, der HE-Färbung sowie der Einfach- und Doppeldetektion aktivierter Caspase-3 aller Tiere aus den drei Versuchs-Gruppen.

Aus den ermittelten Einzelwerten errechnet man das arithmetische Mittel (MW) mit der Standardabweichung (SD).

Eine Signifikanz von $p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$ wird als signifikant bzw. hoch signifikant definiert.

4 ERGEBNISSE

Insgesamt gehen 104 Tiere, die während des Tierversuchs randomisiert in 4 Gruppen eingeteilt worden sind (vgl. Kap. 3.4.4), in die hier vorliegende Studie ein.

In den folgenden Kapiteln werden die bereits in Kapitel 3.4.4 eingeführten und dort näher erläuterten Gruppenbezeichnungen verwendet.

4.1 Physiologische Variablen

Die im folgenden Kapitel dargestellten Ergebnisse setzen sich aus den während der operativen Phase gewonnenen Daten zusammen. Dabei vergleicht man einerseits die Ergebnisse der Dexmedetomidin- bzw. Hypothermie-Gruppe mit denen der Kontroll-Gruppe, andererseits die während des Versuchs ermittelten Daten mit den Ausgangswerten innerhalb einer Gruppe.

Blutglukosekonzentration und hämodynamische Parameter

In der folgenden Tabelle findet sich, aufgeteilt nach den drei Versuchs-Gruppen, eine Darstellung von Blutglukosekonzentration, MAP und Herzfrequenz.

<i>Variable</i>	<i>Gruppe</i>	<i>AW</i>	<i>45 Isch</i>	<i>15 Rep</i>	<i>45 Erh</i>	<i>Beh : Kon</i>
Glukose [mg/ dl]	Kontrolle	64 ± 9	55 ± 9	67 ± 9	85 ± 19	p < 0,001
	Dexmed	82 ± 18	80 ± 20*	81 ± 18	83 ± 18 [§]	
	Hypo	65 ± 10	55 ± 13	68 ± 12	89 ± 15	
MAP [mmHg]	Kontrolle	130 ± 12	40 ± 1 ^{*k}	126 ± 10	119 ± 12	
	Dexmed	143 ± 16	40 ± 1 ^{*k}	139 ± 11	94 ± 18 [§]	
	Hypo	127 ± 9	40 ± 0 ^{*k}	129 ± 11	121 ± 9	
HF [Min. ⁻¹]	Kontrolle	406 ± 37	447 ± 32	386 ± 40	414 ± 40	p < 0,001
	Dexmed	326 ± 35	355 ± 41*	295 ± 41	327 ± 37 [§]	
	Hypo	393 ± 33	445 ± 43	376 ± 49	387 ± 37	

Tab. 4.1: Darstellung der Blutglukosekonzentration (**Glukose**), des mittleren arteriellen Blutdrucks (**MAP**) und der Herzfrequenz (**HF**) der Tiere der drei Versuchs-Gruppen (je n=32) zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten (MW ± SD).

Kontrolle Kontroll-Gruppe/ **Dexmed** Dexmedetomidin-Gruppe/ **Hypo** Hypothermie-Gruppe
AW Ausgangswert/ **45 Isch** 45 Minuten Ischämie

15 Rep 15 Minuten Reperfusion/ **45 Erh** 45 Minuten Erholung

k = kontrollierter Parameter

Beh : Kon Gesamt-Signifikanz Behandlungs-Gruppe (Dexmedetomidin- oder Hypothermie-Gruppe) vs. Kontroll-Gruppe

Signifikanzen: * = p < 0,05 Ischämie vs. Ausgangswert; § = p < 0,05 Erholung vs. Ausgangswert

Da bei den Tieren bereits 12 Stunden vor Versuchsbeginn Nahrungskarenz erfolgt (vgl. Kap. 3.2), kann man bei allen drei Gruppen beim Ausgangswert Blutglukosekonzentrationen im niedrigen physiologischen Bereich messen, die dann allerdings im Verlauf des Versuches tendenziell ansteigen.

Bei der Dexmedetomidin-Gruppe besteht ein signifikanter Unterschied der Blutglukosekonzentration nach 45-minütiger Ischämie gegenüber dem Ausgangswert und ein signifikanter Unterschied aller Tiere dieser Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe. Da sich

jedoch die Messwerte stets im physiologischen Bereich bewegen, wird diesen Abweichungen keine klinische Bedeutung zugemessen.

Bei der Hypothermie-Gruppe lassen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen.

Während bei den Tieren der Kontroll-, Dexmedetomidin- und Hypothermie-Gruppe die Ausgangswerte des mittleren arteriellen Blutdrucks keine signifikanten Unterschiede aufweisen, ist protokollgemäß ein signifikanter Abfall des MAP bei den Tieren aller Gruppen zum Messzeitpunkt "45 Minuten Ischämie" als Ausdruck der kontrollierten Ischämie nachweisbar.

In der Dexmedetomidin-Gruppe ist der MAP nach der 45-minütigen Erholungsphase gegenüber dem Ausgangswert signifikant reduziert.

Die Herzfrequenz liegt bei den Tieren aller Gruppen stets im physiologischen Bereich.

Bei den Tieren der Dexmedetomidin-Gruppe lassen sich sowohl nach der 45-minütigen Ischämie als auch nach der 45-minütigen Erholung signifikante Unterschiede gegenüber dem Ausgangswert erkennen. Außerdem sind die Werte der Herzfrequenz in dieser Gruppe gegenüber den Werten der Kontroll-Gruppe signifikant erniedrigt.

Blutgasanalyse

Zu den vier Messzeitpunkten bestimmt man durch arterielle Messungen jeweils die Werte des paO_2 , des paCO_2 , des pH-Wertes (pH) sowie der Hb-Konzentration. Mit Hilfe der Blutgasanalyse und der respiratorischen Parameter können eventuell auftretende Schwankungen sofort ausgeglichen und somit der Einfluss auf das Ausmaß des ischämischen Schadens möglichst konstant gehalten werden.

<i>Variable</i>	<i>Gruppe</i>	<i>AW</i>	<i>45 Isch</i>	<i>15 Rep</i>	<i>45 Erh</i>	<i>Beh : Kon</i>
paO₂ [mmHg]	Kontrolle	139 ± 19	143 ± 20	142 ± 21	125 ± 30	
	Dexmed	143 ± 15	125 ± 26	116 ± 18 [#]	113 ± 37 [§]	p = 0,001
	Hypo	146 ± 18	144 ± 18	148 ± 28	133 ± 24	
paCO₂ [mmHg]	Kontrolle	37,4 ± 3,6	40,1 ± 5,1	39,7 ± 3,8	40,2 ± 8,7	
	Dexmed	39,6 ± 3,9	41,1 ± 5,5	44,4 ± 4,9 [#]	44,1 ± 4,9 [§]	p = 0,001
	Hypo	37,1 ± 3,1	39,3 ± 5,6	42,5 ± 4,4 [#]	45,2 ± 4,9 [§]	p < 0,05
pH	Kontrolle	7,42 ± 0,03	7,39 ± 0,06	7,40 ± 0,05	7,43 ± 0,05	
	Dexmed	7,41 ± 0,03	7,44 ± 0,05	7,42 ± 0,04	7,41 ± 0,04	
	Hypo	7,42 ± 0,04	7,39 ± 0,06	7,38 ± 0,04	7,38 ± 0,03	
Hb [g/ dl]	Kontrolle	13,3 ± 1,1	9,5 ± 0,9 ^{*k}	12,8 ± 1,0	12,7 ± 1,0	
	Dexmed	13,5 ± 1,0	9,7 ± 0,8 ^{*k}	12,6 ± 1,0 [#]	12,3 ± 1,1 [§]	
	Hypo	12,9 ± 0,8	9,2 ± 0,7 ^{*k}	12,7 ± 0,7	12,3 ± 1,0	p < 0,05

Tab. 4.2: Darstellung der aus den Blutgasanalysen gewonnenen physiologischen Variablen Sauerstoff-Partialdruck (**paO₂**), Kohlendioxidpartialdruck (**paCO₂**), pH-Wert (**pH**) und Hämoglobinkonzentration (**Hb**) der Tiere der drei Versuchs-Gruppen (je n=32) zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten (MW ± SD).

Kontrolle Kontroll-Gruppe/ **Dexmed** Dexmedetomidin-Gruppe/ **Hypo** Hypothermie-Gruppe
AW Ausgangswert/ **45 Isch** 45 Minuten Ischämie

15 Rep 15 Minuten Reperfusion/ **45 Erh** 45 Minuten Erholung

k = kontrollierter Parameter

Beh : Kon Gesamt-Signifikanz Behandlungs-Gruppe vs. Kontroll-Gruppe

Signifikanzen: * = p < 0,001 Ischämie vs. Ausgangswert; # = p < 0,001 Reperfusion vs.

Ausgangswert; § = p < 0,001 Erholung vs. Ausgangswert

Die Mittelwerte des arteriellen paO_2 liegen während des gesamten Versuches bei allen Gruppen im physiologischen Bereich. Während der Erholungsphase ist bei allen drei Versuchstier-Gruppen eine leichte Erniedrigung des paO_2 erkennbar.

In der Dexmedetomidin-Gruppe sind die paO_2 -Werte sowohl bei der Messung "15 Minuten Reperfusion" als auch bei der Messung "45 Minuten Erholung" gegenüber den Ausgangswerten signifikant reduziert. Die Messwerte in dieser Gruppe sind gegenüber der Kontroll-Gruppe insgesamt signifikant reduziert.

In der Hypothermie-Gruppe sind keinerlei signifikante Unterschiede erkennbar.

Die Mittelwerte des arteriellen paCO_2 liegen während des gesamten Versuches bei allen Gruppen im physiologischen Bereich.

Der paCO_2 ist in der Dexmedetomidin-Gruppe sowohl zum Messzeitpunkt "15 Minuten Reperfusion" als auch zum Messzeitpunkt "45 Minuten Erholung" gegenüber dem Ausgangswert signifikant erhöht. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten dieser Gruppe und denen der Kontroll-Gruppe.

In der Hypothermie-Gruppe ist der paCO_2 sowohl in der Reperfusions- als auch in der Erholungsphase gegenüber dem Ausgangswert signifikant erhöht. Auch in dieser Gruppe ist im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ein signifikanter Unterschied erkennbar.

Da mit Beginn der Ischämie Natriumbikarbonat als Puffersubstanz zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Säure-Basen-Haushaltes je nach Bedarf injiziert wird (vgl. Kap. 3.4.5), liegen die pH-Werte bei allen Gruppen während der gesamten Versuchsphase im physiologischen Bereich.

Die Hb-Konzentrationen sind bei den Tieren aller Gruppen bei der zweiten Messung ("45 Minuten Ischämie") gegenüber dem Ausgangswert protokollgemäß signifikant erniedrigt. In der Dexmedetomidin-Gruppe ist die Hb-Konzentration zusätzlich auch während der dritten ("15 Minuten Reperfusion") und der vierten Messung ("45 Minuten Ischämie") gegenüber dem Ausgangswert signifikant reduziert.

Bei den Tieren der Hypothermie-Gruppe ist die Hb-Konzentration gegenüber der Kontroll-Gruppe insgesamt signifikant reduziert.

Periphere und perikranielle Temperatur

Die periphere und die perikranielle Temperatur werden während der gesamten Versuchsdurchführung sowohl bei der Kontroll- als auch bei der Dexmedetomidin-Gruppe mittels einer rückgekoppelten Wärmelampe konstant bei $37,5\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$ gehalten (vgl. 3.4.3). Bei der Hypothermie-Gruppe wird mit Ende der 45-minütigen Ischämiephase die perikranielle Temperatur über 30 Minuten auf 34 °C abgesenkt, dann eine Stunde konstant bei 34 °C gehalten und anschließend über 30 Minuten wieder auf $37,5\text{ °C}$ erhöht (vgl. Kap. 3.4.4).

Zerebraler Blutfluss (CBF)

Mit Hilfe eines Laser-Dopplers wird die lokale kortikale Durchblutung beider Hemisphären bei allen Versuchstieren kontinuierlich ermittelt und zu den vier definierten Messzeitpunkten aufgezeichnet.

Die gemessenen Durchblutungsintensitäten sind dabei nicht als Absolutwerte, sondern als relative Werte in bezug auf den Ausgangswert zu verstehen, der als 100%ige Hirndurchblutung definiert wird.

<i>Variable</i>	<i>Gruppe</i>	<i>AW</i>	<i>45 Isch</i>	<i>15 Rep</i>	<i>45 Erh</i>
CBF rechts [%]	Kontrolle	496 ± 141	244 ± 149*	455 ± 163	406 ± 152
	Dexmed	353 ± 156	275 ± 138*	378 ± 187	354 ± 179
	Hypo	442 ± 201	206 ± 129*	395 ± 182	293 ± 144
CBF links [%]	Kontrolle	492 ± 168	344 ± 111*	449 ± 154	492 ± 189
	Dexmed	320 ± 125	301 ± 115*	343 ± 136	352 ± 131
	Hypo	454 ± 176	347 ± 191*	494 ± 231	436 ± 211

Tab. 4.3: Darstellung des zerebralen Blutflusses (CBF) in der rechten (ischämischen) und linken (nicht-ischämischen) Hemisphäre der Tiere der drei Versuchs-Gruppen (je n=32) zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten (MW ± SD).

Kontrolle Kontroll-Gruppe/ **Dexmed** Dexmedetomidin-Gruppe/ **Hypo** Hypothermie-Gruppe
AW Ausgangswert/ **45 Isch** 45 Minuten Ischämie

15 Rep 15 Minuten Reperfusion/ **45 Erh** 45 Minuten Erholung

*Signifikanzen: * = p < 0,001 Ischämie vs. Ausgangswert*

In der Ausgangsmessung bestehen zwischen den drei Gruppen in beiden Hemisphären keine signifikanten Unterschiede im CBF.

In der linken, nicht-ischämischen Hemisphäre sinken die Mittelwerte der Durchblutung während der Ischämie auf 70 % (Kontroll-Gruppe), 94 % (Dexmedetomidin-Gruppe) oder 76 % (Hypothermie-Gruppe) des Ausgangswertes. Die Werte zum Messzeitpunkt "45 Minuten Ischämie" sind also bei allen drei Gruppen gegenüber dem Ausgangswert signifikant reduziert.

In der rechten, ischämischen Hemisphäre sinken die Mittelwerte der Durchblutung während der Ischämie auf 49 % (Kontroll-Gruppe), 78 % (Dexmedetomidin-Gruppe) oder 47 % (Hypothermie-Gruppe) des Ausgangswertes. Die Werte zum Messzeitpunkt "45 Minuten

Ischämie" sind also bei allen drei Gruppen gegenüber dem Ausgangswert signifikant reduziert.

Nach der Reperfusion nähert sich der CBF in allen Versuchs-Gruppen den Ausgangswerten an.

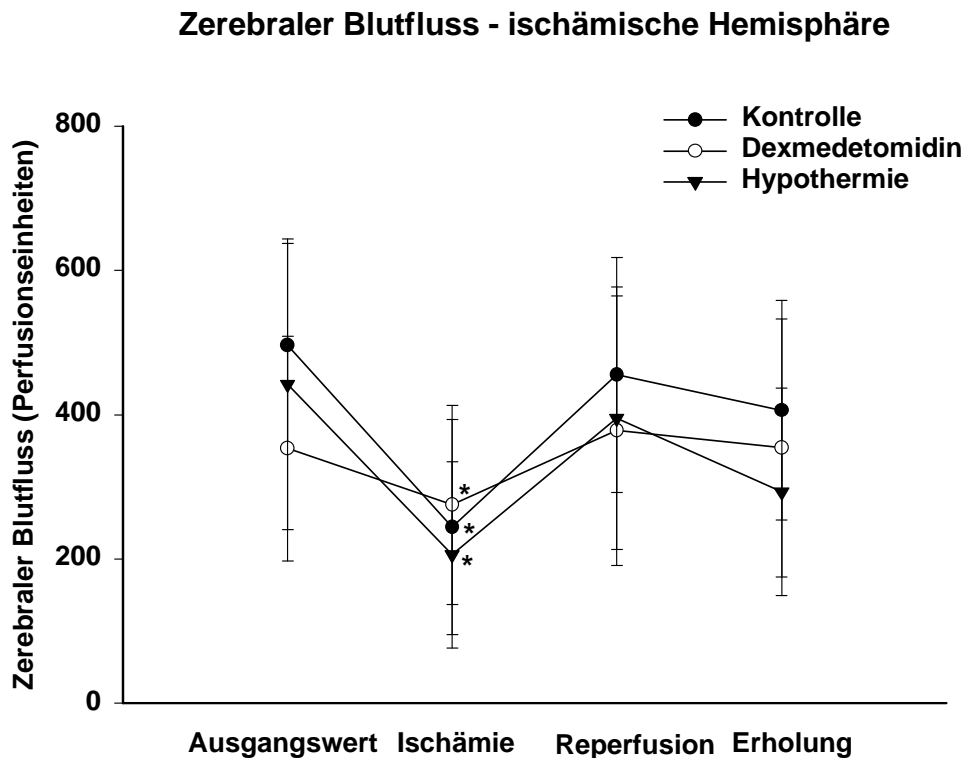


Abb. 4.1: Graphische Darstellung der Durchblutung der rechten, ischämischen Hemisphäre der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32) zu den vier definierten intraoperativen Messzeitpunkten (MW ± SD).

Kontrolle Kontroll-Gruppe/ **Dexmedetomidin** Dexmedetomidin-Gruppe/ **Hypothermie** Hypothermie-Gruppe

Ischämie 45 Minuten Ischämie/ **Reperfusion** 15 Minuten Reperfusion

Erholung 45 Minuten Erholung

Signifikanzen: * = $p < 0,001$ Ischämie vs. Ausgangswert

Zerebraler Blutfluss - nicht-ischämische Hemisphäre

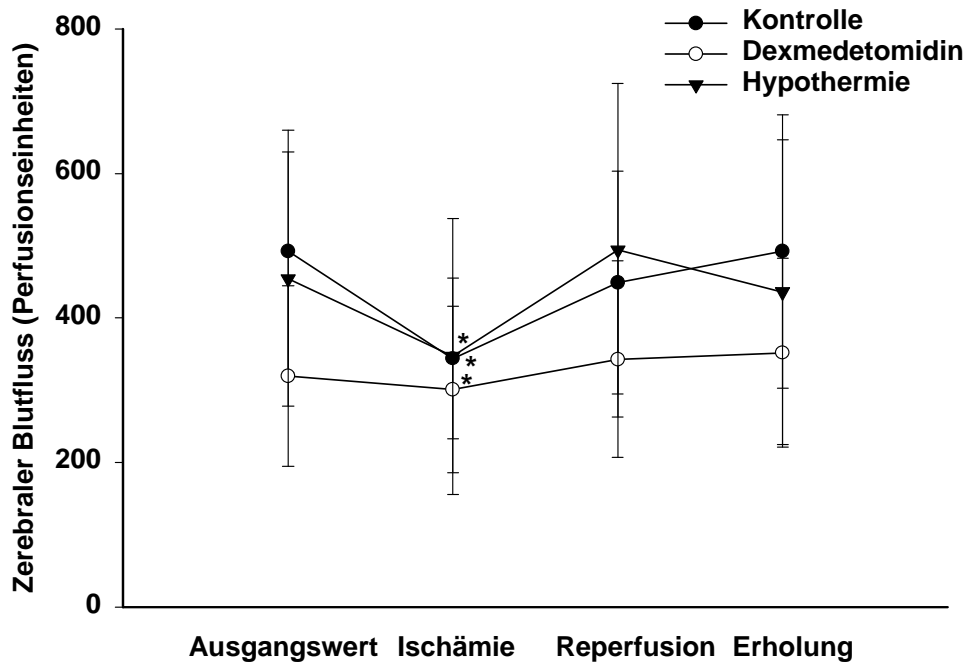


Abb. 4.2: Graphische Darstellung der Durchblutung der linken, nicht-ischämischen Hemisphäre der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je $n=32$) zu den vier definierten intraoperativen Messzeitpunkten ($MW \pm SD$).

Kontrolle Kontroll-Gruppe/ **Dexmedetomidin** Dexmedetomidin-Gruppe/ **Hypothermie** Hypothermie-Gruppe

Ischämie 45 Minuten Ischämie/ **Reperfusion** 15 Minuten Reperfusion

Erholung 45 Minuten Erholung

Signifikanzen: * = $p < 0,001$ Ischämie vs. Ausgangswert

4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Hirnschnitte (s. Kap. 3.8.1) werden unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Dabei beurteilt man zunächst in beiden Hemisphären den durch die zerebrale Ischämie induzierten Schaden und ordnet ihn entsprechend einer Schadensklassifizierung (s. Kap. 3.8.1.2) einer Schadensgruppe zu (s. Bildtafel I, A-D). Dann zählt und notiert man die einzelnen Zellen, die sich im Bereich des Hippokampus und des Gyrus dentatus zum sog. Zellband formieren, wobei man eosinophile (rot angefärbte) von nicht-eosinophilen (blau-lila angefärbten) Zellen unterscheidet.

Schädigungsgrad und Gesamtzellzahl

	Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3
Kontrolle (n=32)	14	1	10	7
Dexmedetomidin (n=32)	20	1	4	7
Hypothermie (n=32)	9	9	9	5
Nativ (n=8)	8	0	0	0

Tab. 4.4: Verteilung der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32) und der Nativ-Gruppe (n=8) auf die vier Schweregrade 0-3 der Schädigung gemäß den Erläuterungen im Text in Kap. 3.8.1.2

Kontrolle Kontroll-Gruppe/ **Dexmedetomidin** Dexmedetomidin-Gruppe/ **Hypothermie** Hypothermie-Gruppe/ **Nativ** Nativ-Gruppe

In der Dexmedetomidin-Gruppe ist bei der Schadensklassifizierung zu beobachten, dass die Anzahl mittelschwer oder schwer geschädigter Tiere (Grad 2 oder 3) gegenüber der Kontroll-Gruppe tendenziell reduziert ist. Bei mehr als der Hälfte aller Tiere der Dexmedetomidin-Gruppe ist keine Schädigung nachweisbar.

Bei der Hypothermie-Gruppe sind die Tiere relativ gleichmäßig über die vier Schadensgruppen verteilt. Im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ist die Anzahl von Tieren mit mittelschwerem oder schwerem Schaden (Schädigungsgruppe 2 oder 3) bei der Hypothermie-Gruppe leicht reduziert.

	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 28
Kontrolle (n=32)	1585 ± 586	1784 ± 478	1502 ± 448	1019 ± 503
Dexmedetomidin (n=32)	1642 ± 314	1667 ± 153	1469 ± 202	1648 ± 326
Hypothermie (n=32)	1958 ± 398	1623 ± 468	1757 ± 316	1475 ± 571
Nativ (n=8)	1411 ± 189			

Tab. 4.5: Darstellung der Gesamtzellzahl des jeweils rechten, ischämischen Hippokampus der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32) und der Nativ-Gruppe (n=8) zu den vier festgelegten Untersuchungszeitpunkten (MW ± SD).

Kontrolle Kontroll-Gruppe/ **Dexmedetomidin** Dexmedetomidin-Gruppe/ **Hypothermie**

Hypothermie-Gruppe/ **Nativ** Nativ-Gruppe

Signifikanzen: keine

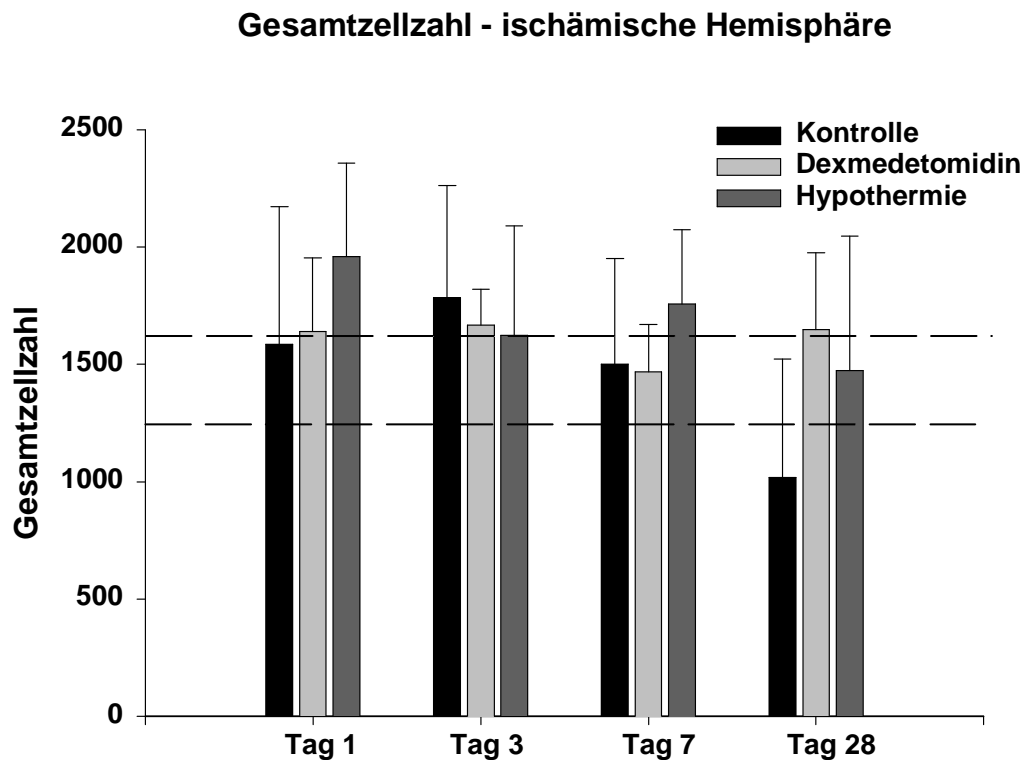


Abb. 4.3: Graphische Darstellung der Gesamtzellzahl des jeweils rechten, ischämischen Hippokampus der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je $n=32$) und der Nativ-Gruppe (horizontale gestrichelte Linien) zu den vier festgelegten Untersuchungszeitpunkten (1, 3, 7, 28 Tage) ($MW \pm SD$).

Kontrolle Kontroll-Gruppe/ **Dexmedetomidin** Dexmedetomidin-Gruppe/ **Hypothermie**

Hypothermie-Gruppe

Signifikanzen: keine

In der Gesamtzellzahl des rechten, ischämischen Hippokampus bestehen bei der Dexmedetomidin-Gruppe bei den einzelnen Untersuchungszeitpunkten weder innerhalb der Gruppe noch im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikante Unterschiede. An den Tagen 1, 3 und 7 ist der Mittelwert der Gesamtzellzahl in der Dexmedetomidin-Gruppe vergleichbar mit dem der Kontroll-Gruppe. An Tag 28 lässt sich eine tendenziell erhöhte Gesamtzellzahl im Vergleich zur Kontroll-Gruppe feststellen. Innerhalb der Dexmedetomidin-Gruppe sind die Mittelwerte der Gesamtzellzahl zu den Untersuchungszeitpunkten relativ konstant.

In der Gesamtzellzahl des rechten, ischämischen Hippokampus bestehen bei der Hypothermie-Gruppe bei den einzelnen Untersuchungszeitpunkten weder innerhalb der Gruppe noch im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikante Unterschiede. Tendenziell lässt sich jedoch gegenüber der Kontroll-Gruppe eine geringfügig höhere Gesamtzellzahl in der Hypothermie-Gruppe an Tag 1, 7 und 28 feststellen. Insgesamt ist innerhalb der Hypothermie-Gruppe eine leichte Reduktion der Gesamtzellzahl über den Beobachtungszeitraum erkennbar.

	Schadensgruppen					
	1:2	1:3	1:4	2:3	2:4	3:4
Dexmedetomidin-Gruppe						
Gesamtzellzahl	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Anzahl eosinophile Zellen	ns	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
% eosinophile Zellen an Gesamtzellzahl	ns	<0,001	<0,001	<0,001	ns	ns
% eosinophile Zellen Region CA-1/ CA-2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns
Hypothermie-Gruppe						
Gesamtzellzahl	<0,001	<0,001	ns	ns	<0,001	<0,001
Anzahl eosinophile Zellen	ns	<0,001	<0,001	ns	ns	ns
% eosinophile Zellen an Gesamtzellzahl	ns	ns	<0,001	ns	<0,05	ns
% eosinophile Zellen Region CA-1/ CA-2	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tab. 4.6: Darstellung der Signifikanzwerte beim Vergleich von verschiedenen Schadensgruppen mit der Gesamtzellzahl, der Anzahl eosinophiler Zellen, dem prozentualen Anteil eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl oder dem prozentualen Anteil eosinophiler Zellen an den Regionen CA-1 und CA-2 des Hippokampus in der HE-Färbung.
ns nicht signifikant

Bei der Dexmedetomidin-Gruppe bestehen signifikante Unterschiede zwischen der Anzahl eosinophiler Zellen einerseits und den Schadensgruppen 1 und 3, 1 und 4, 2 und 3, 2 und 4 sowie 3 und 4 andererseits. Zwischen dem prozentualen Anteil eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl und den Schadensgruppen 1 und 3, 1 und 4 sowie 2 und 3 sind signifikante Unterschiede erkennbar. Es zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen dem prozentualen Anteil eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl in den Regionen CA-1 und CA-2 und den Schadensgruppen 1 und 2, 1 und 3, 1 und 4, 2 und 3 sowie 2 und 4.

Bei der Hypothermie-Gruppe bestehen signifikante Unterschiede zwischen der Gesamtzellzahl und den Schadensgruppen 1 und 2, 1 und 3, 2 und 4 sowie 3 und 4. Außerdem lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl eosinophiler Zellen einerseits und den Schadensgruppen 1 und 3 sowie 1 und 4 andererseits feststellen. Zwischen dem prozentualen Anteil eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl und den Schadensgruppen 1 und 4 sowie 2 und 4 zeigen sich signifikante Unterschiede. Beim prozentualen Anteil eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl in den Regionen CA-1 und CA-2 sind bei keiner Schadensgruppe signifikante Unterschiede erkennbar.

Eosinophile Zellen

	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 28
Kontrolle (n=32)	9 ± 21	25 ± 28	21 ± 33	21 ± 38
Dexmedetomidin (n=32)	29 ± 34	12 ± 24	0 ± 0	1 ± 2
Hypothermie (n=32)	16 ± 17	36 ± 36	7 ± 8	8 ± 10
Nativ (n=8)	0 ± 0			

Tab. 4.7: Darstellung des prozentualen Anteils eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl des jeweils rechten, ischämischen Hippokampus der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32) und der Nativ-Gruppe (n=8) zu den vier festgelegten Untersuchungszeitpunkten (MW ± SD).

Kontrolle Kontroll-Gruppe/ **Dexmedetomidin** Dexmedetomidin-Gruppe/ **Hypothermie**

Hypothermie-Gruppe/ **Nativ** Nativ-Gruppe

Signifikanzen: keine

Anteil eosinophile Zellen an Gesamtzellzahl - ischämische Hemisphäre

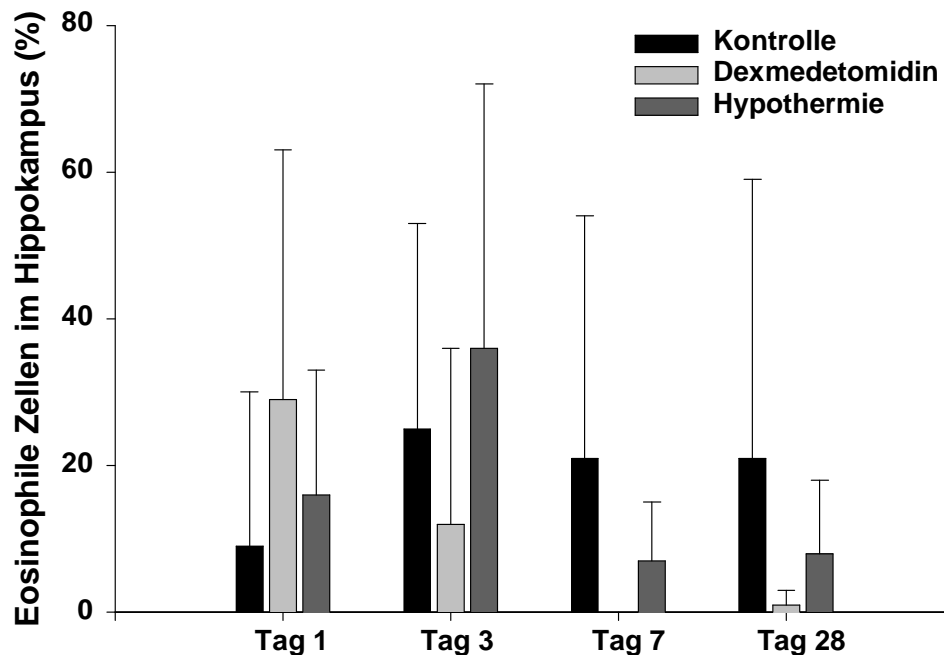


Abb. 4.4: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl des jeweils rechten, ischämischen Hippokampus der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je $n=32$) zu den vier festgelegten Untersuchungszeitpunkten (1, 3, 7, 28 Tage) ($MW \pm SD$).

Kontrolle Kontroll-Gruppe/ **Dexmedetomidin** Dexmedetomidin-Gruppe/ **Hypothermie** Hypothermie-Gruppe
Signifikanzen: keine

Bei keinem der untersuchten Tiere finden sich in der linken, nicht-ischämischen Hemisphäre eosinophile Zellen. Bei Gehirnschnitten aus der Nativ-Gruppe lassen sich weder in der linken noch in der rechten Hemisphäre eosinophil angefärbte Zellen nachweisen.

In der Dexmedetomidin-Gruppe lassen sich zu den vier Untersuchungszeitpunkten weder innerhalb der Gruppe noch im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe signifikante Unterschiede beobachten. Tendenziell lässt sich jedoch ein stetiger Abfall des Anteils eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl im Verlauf des Untersuchungszeitraums feststellen. Der Anteil eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl in der Dexmedetomidin-Gruppe ist zu jedem Untersuchungszeitpunkt mit Ausnahme von Tag 1 gegenüber dem Anteil der Kontroll-Gruppe tendenziell reduziert.

In der Hypothermie-Gruppe lassen sich zu den vier Untersuchungszeitpunkten weder innerhalb der Gruppe noch im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe signifikante Unterschiede beobachten. Tendenziell lässt sich ein erhöhter Anteil eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl gegenüber der Kontroll-Gruppe an den Tagen 1 und 3 feststellen. An den Tagen 7 und 28 dagegen ist der Anteil eosinophiler Zellen in der Hypothermie-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe tendenziell reduziert. Mit einem Mittelwert von 36 % weisen die Tiere der Hypothermie-Gruppe mit einer Überlebenszeit von 3 Tagen den größten Anteil eosinophil angefärbter Zellen auf.

4.3 Immunhistochemische Färbung zur Detektion aktivierter Caspase-3

Nach der Färbung zur immunhistochemischen Detektion aktivierter Caspase-3 erfolgt ebenfalls eine Auswertung mit dem Lichtmikroskop.

Dabei ermittelt und dokumentiert man die Anzahl der aktivierten Caspase-3-positiven Zellen, die sich unter dem Mikroskop als braun angefärbte Zellen darstellen, durch Auszählen im Bereich der rechten Hippokampus-Formation. Die Gesamtzellzahl der Neurone bestimmt man durch Auszählen des konsekutiven Schnittes in der HE-Färbung.

Anteil Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl

	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 28
Kontrolle (n=32)	0,23 ± 0,44	1,24 ± 1,60	0,42 ± 0,55	1,30 ± 2,07
Dexmedetomidin (n=32)	0,60 ± 0,63	0,38 ± 0,38	0,0 ± 0,0	0,65 ± 0,67
Hypothermie (n=32)	0,30 ± 0,47	0,37 ± 0,36	0,22 ± 0,23	0,17 ± 0,19
Nativ (n=8)	0 ± 0			

Tab. 4.8: Darstellung des prozentualen Anteils aktivierter Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl (%) der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32) und der Tiere der Nativ-Gruppe (n=8) zu den vier definierten Untersuchungszeitpunkten (MW ± SD).

Kontrolle Kontroll-Gruppe/ **Dexmedetomidin** Dexmedetomidin-Gruppe/ **Hypothermie** Hypothermie-Gruppe/ **Nativ** Nativ-Gruppe

Signifikanzen: keine

Anteil Caspase-3-positive Zellen an Gesamtzellzahl - ischämische Hemisphäre

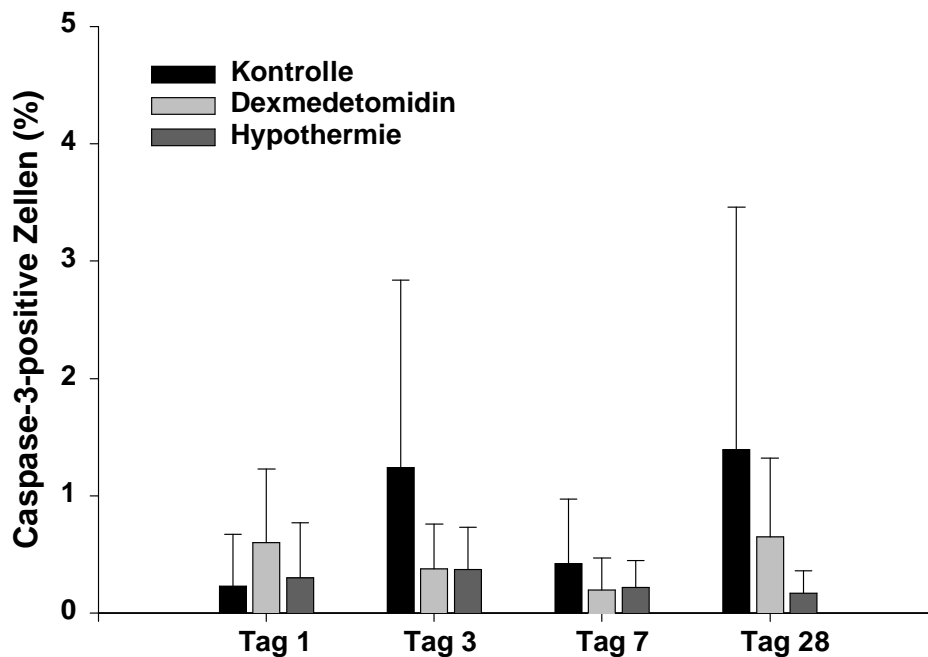


Abb. 4.5: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils aktivierter Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl des jeweils rechten, ischämischen Hippokampus der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je $n=32$) zu den vier festgelegten Untersuchungszeitpunkten (1, 3, 7, 28 Tage) ($MW \pm SD$).

Kontrolle Kontroll-Gruppe/ **Dexmedetomidin** Dexmedetomidin-Gruppe/ **Hypothermie** Hypothermie-Gruppe

Signifikanzen: keine

Es lassen sich sowohl in der Kontroll-Gruppe als auch in den beiden Behandlungs-Gruppen (Dexmedetomidin und Hypothermie) aktivierte Caspase-3-positive Zellen nachweisen. In der Nativ-Gruppe finden sich erwartungsgemäß in keiner der beiden Hemisphären braun angefärbten Zellen.

Die größte Anzahl aktivierter Caspase-3-positiver Zellen findet sich bei den Tieren der Kontroll-Gruppe mit einer Überlebenszeit von 28 Tagen ($1,30 \pm 2,07$ aller zählerisch erfassten Zellen). Die geringste Anzahl aktivierter Caspase-3-positiver Zellen lässt sich bei den Tieren der Hypothermie-Gruppe mit 28 Tagen Überlebenszeit feststellen. Dort liegt der Anteil braun gefärbter Zellen an der Gesamtzellzahl bei durchschnittlich $0,17 \pm 0,19$.

In der Dexmedetomidin-Gruppe lassen sich zu den vier Untersuchungszeitpunkten weder innerhalb der Gruppe noch im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe signifikante Unterschiede beobachten. Innerhalb der Gruppe ist bis Tag 7 ein tendenzieller Rückgang Caspase-3-

positiver Zellen an der Gesamtzellzahl zu erkennen, an Tag 28 dann wieder ein tendenzieller Anstieg. Im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ist der Anteil Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl zu den Untersuchungszeitpunkten 3, 7 und 28 Tage tendenziell reduziert. In der Hypothermie-Gruppe lassen sich zu den vier Untersuchungszeitpunkten weder innerhalb der Gruppe noch im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe signifikante Unterschiede beobachten. Innerhalb der Gruppe ist an Tag 3 zunächst ein leichter Anstieg, ab Tag 7 eine tendenzielle Reduktion des Anteils Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl zu erkennen. Im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ist der Anteil Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl zu den Untersuchungszeitpunkten 3, 7 und 28 Tage tendenziell reduziert.

<i>Dexmedetomidin-Gruppe</i>	Schadensgruppen					
	<i>1:2</i>	<i>1:3</i>	<i>1:4</i>	<i>2:3</i>	<i>2:4</i>	<i>3:4</i>
<i>% Caspase-pos. Zellen an Gesamtzellzahl</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>% Caspase-pos. Zellen Region CA-1/ CA-2</i>	ns	<0,001	<0,05	ns	ns	ns
<i>Hypothermie-Gruppe</i>	<i>1:2</i>	<i>1:3</i>	<i>1:4</i>	<i>2:3</i>	<i>2:4</i>	<i>3:4</i>
<i>% Caspase-pos. Zellen an Gesamtzellzahl</i>	ns	ns	<0,05	ns	ns	ns
<i>% Caspase-pos. Zellen Region CA-1/ CA-2</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tab. 4.6: Darstellung der Signifikanzwerte beim Vergleich von verschiedenen Schadensgruppen mit dem prozentualen Anteil Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl oder dem prozentualen Anteil Caspase-3-positiver Zellen an den Regionen CA-1 und CA-2 des Hippokampus in der Caspase-3-Färbung.

ns nicht signifikant

Bei der Dexmedetomidin-Gruppe bestehen signifikante Unterschiede zwischen dem prozentualen Anteil Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl in den Regionen CA-1 und CA-2 einerseits und den Schadensgruppen 1 und 3 sowie 1 und 4 andererseits. Bei der Hypothermie-Gruppe zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen dem prozentualen Anteil Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl und den Schadensgruppen 1 und 4.

4.4 Doppelfärbung zur Detektion aktivierter Caspase-3 und von NeuN

Nach der Doppelfärbung mit Antikörpern gegen aktivierte Caspase-3 und NeuN (Neuron-specific nuclear protein) erfolgt die Auswertung mit dem Lichtmikroskop. Dabei zählt man im Zellband des rechten Hippokampus Zellen, die durch eine rot-braune Färbung auffallen und aktivierte Caspase-3-positive Neurone darstellen.

Caspase-3-positive und NeuN-positive Zellen

	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 28
Kontrolle (n=32)	6 ± 10	6 ± 7	2 ± 4	4 ± 7
Dexmedetomidin (n=32)	6 ± 5	3 ± 3	1 ± 2	3 ± 4
Hypothermie (n=32)	6 ± 5	3 ± 3	1 ± 2	2 ± 3
Nativ (n=8)	0 ± 0			

Tab. 8: Darstellung der Gesamtzahl aktivierter Caspase-3-positiver und NeuN-positiver Zellen der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32) und der Tiere der Nativ-Gruppe (n=8) zu den vier definierten Untersuchungszeitpunkten (MW ± SD).

Kontrolle Kontroll-Gruppe/ **Dexmedetomidin** Dexmedetomidin-Gruppe/ **Hypothermie**

Hypothermie-Gruppe/ **Nativ** Nativ-Gruppe

Signifikanzen: keine

Caspase-3- und NeuN-positive Zellen - ischämische Hemisphäre

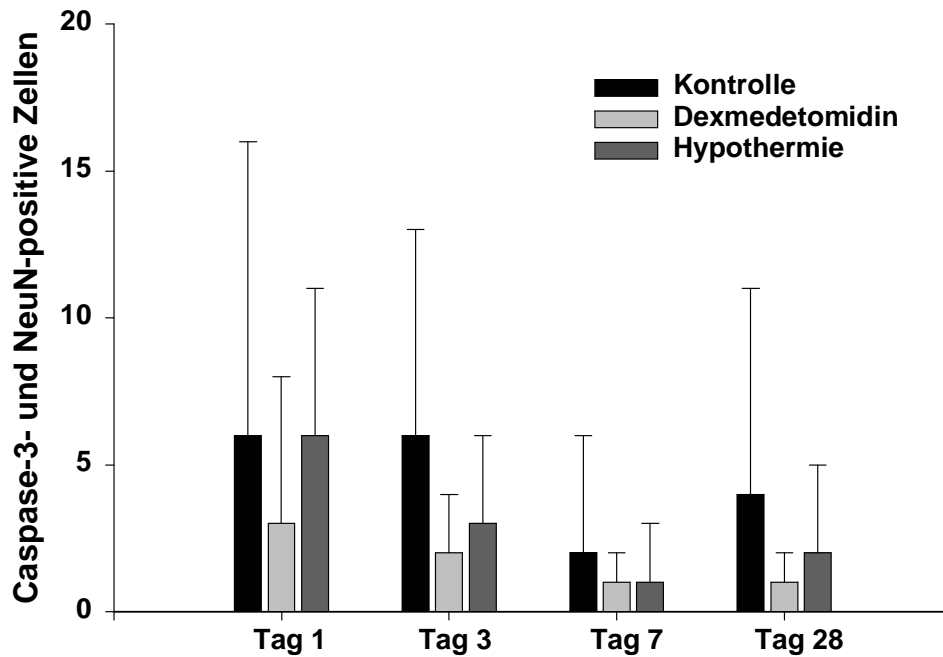


Abb. 4.6: Graphische Darstellung der Gesamtzahl aktivierter Caspase-3-positiver und NeuN-positiver Zellen des jeweils rechten, ischämischen Hippokampus der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32) zu den vier festgelegten Untersuchungszeitpunkten (1, 3, 7, 28 Tage) (MW \pm SD).

Kontrolle Kontroll-Gruppe/ **Dexmedetomidin** Dexmedetomidin-Gruppe/ **Hypothermie** Hypothermie-Gruppe
 Signifikanzen: keine

Es lassen sich sowohl in der Kontroll-Gruppe als auch in den beiden Behandlungs-Gruppen (Dexmedetomidin und Hypothermie) Caspase-3- und NeuN-positive Zellen nachweisen. In der Nativ-Gruppe finden sich in keiner der beiden Hemisphären rot-braun angefärbte Zellen. Weder in der Hypothermie- noch in der Dexmedetomidin-Gruppe lassen sich signifikante Unterschiede nachweisen. Die Anzahl doppelt-gefärbter Neurone ist in den beiden Behandlungs-Gruppen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe zu allen Beobachtungszeitpunkten tendenziell reduziert. In allen drei Versuchs-Gruppen ist eine tendenzielle Reduktion der Anzahl Caspase-3- und NeuN-positiver Zellen von Tag 1 bis Tag 28 erkennbar.

5 DISKUSSION

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei Betrachtung der physiologischen Variablen fällt vor allem beim MAP, bei der Hb-Konzentration und beim CBF in allen drei Versuchs-Gruppen eine signifikante Reduktion der Messwerte während 45-minütiger Ischämie gegenüber den Ausgangswerten als Ausdruck der induzierten Ischämie auf.

Periphere und perikranielle Temperatur sind bei der Hypothermie-Gruppe nach der ischämischen Phase protokollgemäß eine Stunde lang auf 34 °C reduziert.

Die Messwerte der physiologischen Variablen Blutglukosekonzentration, Herzfrequenz, paO_2 , paCO_2 und pH weisen zwar zum Teil sowohl innerhalb der Behandlungs-Gruppen als auch im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe signifikante Abweichungen auf, liegen jedoch zu allen Messzeitpunkten stets im physiologischen Bereich.

In der HE-Färbung zum Nachweis der neuronalen Schädigung und des neuronalen Zelluntergangs zeigen sich beim Vergleich der Schädigungsgrade keinerlei signifikante Unterschiede, jedoch zeigt sich eine tendenzielle Reduktion des Schadens in beiden Behandlungs-Gruppen gegenüber der Kontroll-Gruppe. Auch beim Vergleich der Gesamtzellzahlen zu den vier festgelegten Untersuchungszeitpunkten sind keinerlei signifikante Unterschiede erkennbar, allerdings ist an Tag 28 eine tendenziell erhöhte Gesamtzellzahl in beiden Behandlungs-Gruppen gegenüber der Kontroll-Gruppe erkennbar. Zum Teil signifikante Korrelationen ergeben sich beim Vergleich von Gesamtzellzahl, Anzahl eosinophiler Zellen, prozentualem Anteil eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl sowie prozentualem Anteil eosinophiler Zellen in den Regionen CA-1 und CA-2 mit verschiedenen Schadensgruppen. Bei Betrachtung des Anteils eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl sind keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Jedoch zeigt sich, dass zu den Untersuchungszeitpunkten Tag 7 und 28 der Anteil eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl in den beiden Behandlungs-Gruppen gegenüber der Kontroll-Gruppe tendenziell reduziert ist.

In der immunhistochemischen Färbung zur Detektion apoptotischer Zellen zeigen sich beim Anteil Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl keine signifikanten Unterschiede. In

beiden Behandlungs-Gruppen ist der Anteil derartiger Zellen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe an den Tagen 3, 7 und 28 tendenziell reduziert. Signifikante Korrelationen sind beim Vergleich des Anteils Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl mit verschiedenen Schadensgruppen erkennbar.

Bei Betrachtung der Doppelfärbung zur Detektion aktivierter Caspase-3 und von NeuN lassen sich weder innerhalb der Gruppen noch im Vergleich der Behandlungs-Gruppen mit der Kontroll-Gruppe signifikante Unterschiede erkennen. Jedoch zeigt sich in allen drei Gruppen eine Reduktion der Anzahl doppelt gefärbter Neurone von Tag 1 bis Tag 28. Zu allen Beobachtungszeitpunkten ist die Anzahl doppelt gefärbter Neurone in beiden Behandlungs-Gruppen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe reduziert.

Somit zeigt sich ein geringgradiger neuroprotektiver Effekt sowohl bei der Behandlung der Ratten mit Dexmedetomidin als auch mit Hypothermie im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Physiologische Variablen

Zur Gewährleistung eines konstanten Versuchsablaufs werden vor, während und nach der operativen Phase eine Reihe von Messungen vorgenommen.

Um die Ergebnisse des vorliegenden Modells vergleichbar und reproduzierbar zu machen, ist es von größter Wichtigkeit, standardisierte Ausgangsbedingungen und standardisierte Bedingungen während des Versuchs zu schaffen.

Während des Tierversuchs ermittelt man die Blutglukosekonzentration, den MAP, die Herzfrequenz und mit Hilfe einer Blutgasanalyse den $p\text{aO}_2$ und den $p\text{aCO}_2$ sowie die Hb-Konzentration und den pH-Wert. Mit dem Laser-Doppler erfasst man den zerebralen Blutfluss, und spezielle Sonden messen sowohl die periphere als auch die perikranielle Temperatur.

Die Ergebnisse dieser Messdaten zeigen, dass das vorliegende Experiment unter standardisierten Bedingungen protokollgemäß durchgeführt worden ist.

Körpergewicht (g)

Bei den Tieren aller drei Versuchs-Gruppen (Kontroll-, Hypothermie- und Dexmedetomidin-Gruppe) bestehen keine signifikanten Unterschiede im Körpergewicht. Untersuchungen haben ohnehin gezeigt, dass eine zerebrale Ischämie bei konstant gehaltenem Kohlenstoffpartialdruck ($p\text{aCO}_2$) bei jeder Ratte gleich welchen Körpergewichts, das ja direkt vom Alter abhängt, zu gleicher neurologischer Schädigung führt (BAUGHMAN et al. 1988 b).

Blutglukosekonzentration (mg/ dl)

Die Blutglukosekonzentration der Tiere aller Versuchs-Gruppen (Kontrolle, Dexmedetomidin, Hypothermie) liegt während der gesamten Versuchsdurchführung stets im physiologischen Bereich. Daher sollen die signifikanten Unterschiede der Blutglukosekonzentration der Dexmedetomidin-Gruppe nach 45-minütiger Ischämie gegenüber dem Ausgangswert sowie der Dexmedetomidin-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nicht weiter diskutiert werden.

Während 1 Mol Glukose im Gehirn unter physiologischen Umständen durch aerobe Energiegewinnung zu 38 Mol ATP umgesetzt wird, entstehen bei Sauerstoffmangel lediglich 2 Mol ATP und das saure Stoffwechselprodukt Laktat. Eine Sauerstoffunterversorgung führt sowohl zu einer vermehrten Bildung als auch zu einem verlangsamten Abtransport von Laktat (MEHMET et al. 1998). Da sich nach HOFFMAN et al. (1990) ein zu hoher Glukosespiegel während einer zerebralen Ischämie durch einen Anstieg des Laktatspiegels negativ auf das Ausmaß des neurologischen Schadens auswirken kann, setzt man die Versuchstiere 12 Stunden präoperativ nüchtern. Dadurch erreicht man, dass die Ratten während des gesamten Versuches niedrige normoglykämische Werte aufweisen. HOFFMAN et al. haben 1990 gezeigt, dass eine während einer Ischämie bestehende Hyperglykämie weitreichendere negative Folgen auf das Ausmaß des neuronalen Schadens und auf das neurologische Endergebnis als eine Hypoglykämie hervorruft.

Mittlerer arterieller Blutdruck, MAP (mmHg)

Während der 45-minütigen Ischämiephase sind die MAP-Werte der Tiere aller Versuchs-Gruppen protokollgemäß gegenüber dem Ausgangswert signifikant erniedrigt. Der gegenüber den beiden anderen Gruppen tendenziell erhöhte Ausgangswert des mittleren arteriellen Blutdrucks in der Dexmedetomidin-Gruppe lässt sich auf die bei höherer Dosis initial eintretende blutdrucksteigernde Wirkung von Dexmedetomidin zurückführen (HOFFMAN 1991 a). Der gegenüber dem Ausgangswert signifikant erniedrigte MAP-Wert zum Messzeitpunkt "45 Minuten Erholung" ist auf die α_2 -agonistische Wirkung von Dexmedetomidin zurückzuführen.

Herzfrequenz (Schläge/ Min.)

Bei den Tieren aller Versuchs-Gruppen liegt während des gesamten Versuchs die Herzfrequenz im physiologischen Bereich.

Jedoch lassen sich die signifikant erniedrigten Werte der Dexmedetomidin-Gruppe nach 45-minütiger Ischämie im Vergleich zum Ausgangswert als Regulation gegen den in dieser Gruppe anfangs erhöhten MAP-Wert interpretieren (KUSCHINSKY 1996). Die signifikant erniedrigten Werte zum Messzeitpunkt "45 Minuten Erholung" sowohl im Vergleich zum Ausgangswert als auch im Vergleich zur Kontroll-Gruppe sind als sympatholytischer Effekt von Dexmedetomidin zu verstehen.

Blutgasanalyse

Die Werte des paO_2 liegen bei allen drei Versuchs-Gruppen stets im physiologischen Bereich. Eine signifikante Erniedrigung des paO_2 gegenüber dem Ausgangswert ist bei der Dexmedetomidin-Gruppe zu den Messzeitpunkten "15 Minuten Reperfusion" und "45 Minuten Erholung" erkennbar. Da jedoch das arterielle Blut stets ausreichend mit Sauerstoff gesättigt ist, nehmen diese Messwerte keinen Einfluss auf den Versuch.

Auch wenn bei den beiden Behandlungs-Gruppen der paCO_2 zu den Messzeitpunkten "15 Minuten Reperfusion" und "45 Minuten Erholung" gegenüber den Ausgangswerten signifikant erhöht ist, liegt er bei allen Versuchstieren während des gesamten Versuchs konstant im physiologischen Bereich. Diese Erhöhung des paCO_2 ist auf die Reduktion metabolischer Prozesse durch Hypothermie bzw. auf die kardiodepressive Wirkung von Dexmedetomidin zurückzuführen (SCHEININ et al. 1987; KEMPSKI 1994).

Da VANICKY et al. 1992 die neuroprotektive Wirkung einer Hyperventilation mit nachfolgender Reduktion des paCO_2 nachgewiesen haben, versucht man, diesen Zustand während des restlichen Versuchsablaufs zu vermeiden. Da andererseits eine Hypokapnie zu einer Vergrößerung des ischämischen Schadens führen kann, hält man den paCO_2 während der gesamten Beatmungsphase im Bereich von 38 bis 42 mmHg (RUTA et al. 1993). Somit lässt sich eine Beeinflussung des Ergebnisses durch den paCO_2 weitgehend ausschließen. In früheren Untersuchungen ist gezeigt worden, dass eine Reduktion des pH-Wertes negative Auswirkungen auf geschädigtes Gewebe haben kann (KEMPSKI 1994), während man vermutet, dass pH-Werte, die im alkalischen Bereich liegen, potentiell neuroprotektive Fähigkeiten besitzen (ANDERSON und MEYER 2002). Daher werden die pH-Werte aller Tiere während des gesamten Versuchs im physiologischen Bereich gehalten und besitzen somit keinen Einfluss auf das Ausmaß des zerebralen Schadens.

Die Ausgangswerte der Hb-Konzentration liegen bei allen Tieren im physiologischen Bereich. Da es bei den Tieren aller drei Versuchs-Gruppen durch den Blutentzug während der Ischämiephase protokollgemäß zu einer signifikanten, aber in gleichem Maße stattfindenden Reduktion der Hb-Konzentration kommt, nimmt diese Variable keinen Einfluss auf die Aussagekraft der Studie. 15 Minuten nach Beginn der Reperfusion haben sich die Hb-Konzentrationen bei den Tieren aller Versuchs-Gruppen wieder normalisiert. Die signifikante Erniedrigung der Hb-Konzentration gegenüber dem Ausgangswert in der Dexmedetomidin-Gruppe zu den Messzeitpunkten "15 Minuten Erholung" und "45 Minuten Reperfusion" ist wohl am ehesten auf den gegenüber den anderen beiden Gruppen leicht erhöhten

Ausgangswert in dieser Gruppe zurückzuführen und nimmt keinen Einfluss auf das Ausmaß des zerebralen Schadens.

Periphere und perikranielle Temperatur

In der Hypothermie-Gruppe zeigt sich 30 Minuten nach Ende der Ischämiephase eine Reduktion sowohl der perikraniellen als auch der peripheren Temperatur von $37,5\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$ auf 34 °C . Damit besteht ein signifikanter Unterschied sowohl gegenüber dem Ausgangswert als auch gegenüber den Werten der Kontroll-Gruppe. Diese Temperaturerniedrigung ist wesentlicher Teil der Studie, wird doch der Applikation von Hypothermie nach zerebraler Ischämie ein neuroprotektiver Effekt zugeschrieben (BUSTO et al. 1987; WERNER 1997). In der Dexmedetomidin-Gruppe sind während des gesamten Versuches keinerlei signifikante Unterschiede erkennbar, da sowohl die periphere als auch die perikranielle Temperatur konstant bei $37,5\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$ gehalten werden. BUSTO et al. haben 1987 gezeigt, dass während eines ischämisch-hypoxischen Zustandes periphere und perikranielle Temperatur voneinander abweichen können. Deshalb werden während des gesamten Versuches beide Messwerte bestimmt.

Zerebraler Blutfluss (CBF)

In der Hypothermie-Gruppe zeigt sich in der linken, nicht-ischämischen Hemisphäre während der Ischämiephase eine signifikante Reduktion des zerebralen Blutflusses um ca. 25 % gegenüber dem Ausgangswert. In der rechten, ischämischen Hemisphäre ist eine Verringerung um ca. 50 % nachweisbar. Signifikante Unterschiede zwischen Hypothermie- und Kontroll-Gruppe sind zu keinem Messzeitpunkt ersichtlich. Auf die Korrelation eines erniedrigten CBF mit dem Ausmaß des ischämischen Schadens haben vorangehende Studien bereits hingewiesen (BAUGHMAN et al. 1988 b).

Der zerebrale Blutfluss während der Ischämiephase ist bei den Tieren der Dexmedetomidin-Gruppe sowohl in der nicht-ischämischen Hemisphäre (10%) als auch in der ischämischen Hemisphäre (20%) gegenüber dem Ausgangswert signifikant erniedrigt. Der relativ geringe Abfall des CBF während der Ischämiephase lässt sich durch die bereits beim Ausgangswert stark erniedrigten CBF-Werte erklären. Diese enorme Reduktion ist wohl am ehesten auf die stark vasokonstriktorisches Eigenschaften von Dexmedetomidin auf zerebrale Gefäße zurückzuführen (KUSCHINSKY 1996).

5.2.2 Histologische Untersuchungen

Schädigungsgrad und Gesamtzellzahl

In der Dexmedetomidin-Gruppe fällt eine nicht-signifikante, jedoch tendenziell reduzierte neuronale Schädigung gegenüber der Kontroll-Gruppe auf. Die Gesamtzellzahl ist an Tag 28 im Vergleich zur Kontroll-Gruppe tendenziell erhöht.

Bei einem Modell beinahe kompletter zerebraler Ischämie durch bilaterale Karotis-Okklusion und hämorrhagischer Hypotension über 10 Minuten zeigen sich in der mit 100 µg/ kg behandelten Dexmedetomidin-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ähnliche Ergebnisse, nämlich eine nicht-signifikante Reduktion der neuronalen Schädigung (KARLSSON et al. 1995).

Deutlichere Ergebnisse werden in einer 1991 veröffentlichten Studie beobachtet: nach einer zerebralen Ischämie durch Okklusion der rechten A. carotis communis und gleichzeitiger hämorrhagischer Hypotension über 30 Minuten zeigt sich bei einer präischämischen Gabe von 10 µg/ kg oder 100 µg/ kg Dexmedetomidin histopathologisch eine signifikante, dosisabhängige Verbesserung der neuronalen Schädigung im Hippokampus (HOFFMAN 1991 a). Der zerebroprotektive Effekt des α_2 -Agonisten wird bestätigt, indem man einer weiteren Versuchs-Gruppe neben 100 µg/ kg Dexmedetomidin 1 mg/ kg des α_2 -Antagonisten Atipamezol injiziert. Dadurch kommt es zu einer völligen Auslöschung der durch die alleinige Gabe von Dexmedetomidin erreichten Verbesserung des neurologischen Endergebnisses und des histopathologischen Schadens. Der Grund für das insgesamt wesentlich signifikantere Ergebnis bezüglich neuronaler Schädigung in der Studie von HOFFMAN (1991 a) liegt möglicherweise auch darin, dass in der vorliegenden Studie die 100-fache Dosierung von Dexmedetomidin gewählt worden ist, nämlich 10 mg/ kg.

KUHMÖNEN et al. (1997) haben Tieren mit zerebraler Ischämie durch eine 5-minütige bilaterale Karotis-Okklusion Dexmedetomidin in einer Dosierung von 3 µg/ kg oder 30 µg/ kg entweder 30 Minuten vor und 3, 12, 24 und 48 Stunden nach oder nur 3, 12, 24 und 48 Stunden nach der Ischämie injiziert. Die histologischen Ergebnisse nach Silberfärbung, bei der nicht die Gesamtzellzahl, sondern die Anzahl geschrumpfter, argyrophiler Neurone bestimmt wird, an Tag 7 lassen sich folgendermaßen beschreiben: während bei einer Dosierung von 3 µg/ kg die Anzahl geschädigter Zellen signifikant reduziert ist, zeigt sich bei Gabe von 30 µg/ kg Dexmedetomidin oder nur postischämischer Applikation kein Effekt bezüglich der Anzahl von Neuronen im Hippokampus, wie auch in der vorliegenden Studie.

In der Hypothermie-Gruppe bestehen bei den einzelnen Untersuchungszeitpunkten weder innerhalb der Gruppe noch im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikante Unterschiede in der Gesamtzellzahl. Tendenziell lässt sich jedoch gegenüber der Kontroll-Gruppe eine geringfügig höhere Gesamtzellzahl in der Hypothermie-Gruppe an Tag 1, 7 und 28 feststellen. Die Gesamtzahl mittelschwer oder schwer geschädigter Tiere ist im Vergleich zur Kontroll-Gruppe bei der Hypothermie-Gruppe leicht reduziert.

Der Unterschied im Schädigungsgrad zwischen Tieren der Kontroll- und der Behandlungs-Gruppe lässt sich durch die neuroprotektive Wirkung von Hypothermie erklären. Der größere Schaden ist in der mit Fentanyl und N₂O behandelten Gruppe zu erwarten, da diese Anästhetika die Folgen der Ischämie nicht beeinflussen (MORIMOTO et al. 1997).

Die in der vorliegenden Studie durchgeführte, nach DAVID (1970) und REMMELE (1984) modifizierte Schadensklassifizierung beruht auf dem Grad (Zellschädigung, Gewebeödem, Einwanderung von Zellen, Gewebeverlust) und auf der Lokalisation (Hippokampus, Kortex, Basalganglien) der Schädigung (vgl. Kap. 3.8.1.2). Eine semiquantitative Methode zur Beurteilung des ischämischen Schadens nehmen MINAMISAWA et al. (1990) sowie GREEN et al. (1992) vor: sie beziehen sich lediglich auf die Neurone und unterscheiden normale, wenige beschädigte, viele beschädigte und sehr viele beschädigte Neurone (0-3 Punkte). WASS et al. (1995) bedienen sich bei der Analysierung des Schadens nach zerebraler Ischämie, ähnlich wie in der vorliegenden Studie, einer Einteilung bezüglich der Kriterien Infarzierung, Einwanderung von Zellen und Ödem, die mit unterschiedlichen Faktoren in die Berechnung einer histopathologischen Schadensklassifizierung in verschiedenen Hirnregionen eingehen.

Ein Beobachtungsintervall von 28 Tagen ermöglicht eine exakte Beobachtung der zellulären Reaktion als Zeichen neuronaler Schädigung: die Einwanderung von Granulozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen beginnt unmittelbar im Anschluss an die zerebrale Ischämie, erreicht ihren Höhepunkt am etwa siebten Tag und nimmt im Laufe der nächsten Tage kontinuierlich ab (STOLL 1998). Bei einem Modell der zerebralen Ischämie durch Okklusion der A. cerebialis media lässt sich die Einwanderung Fibroblasten-ähnlicher Zellen nachweisen, die ab dem 15. Tag im Zeitraum von etwa zwei Wochen ein grobmaschiges, narbiges Ersatzgewebe bilden (CLARK 1994).

Die Reduktion neuronaler Schädigung durch die intra- oder postischämische Applikation von Hypothermie ist in vielen Studien festgestellt worden, jedoch zeigten sich im Vergleich zur hier vorliegenden Studie meist stark signifikante Unterschiede gegenüber der Normothermie-Gruppe. Diese Beobachtung könnte folgende Gründe haben:

Die Anwendung von Hypothermie führt bei einer zerebralen Ischämie von 30 Minuten durch Okklusion der rechten A. carotis communis und gleichzeitiger hämorrhagischer Hypotension bei einer postischämischen Kühlung nur zu signifikanten histopathologischen Unterschieden im Vergleich zur Normothermie-Gruppe bei einer Temperatur von 31 °C, nicht jedoch bei 34 °C (HOFFMAN 1991 b; HOFFMAN und CHINAMMA 1996). Auch GREEN et al. (1992) haben nach einer intranschämischen Hypothermie von 30 °C während einer 12,5 Minuten andauernden zerebralen Ischämie durch Vier-Gefäß-Okklusion eine signifikante Reduktion der neuronalen Schädigung feststellen können.

Neben der Stärke der Hypothermie könnte aber auch der Beginn der Hypothermie-Applikation eine entscheidende Rolle in der neuroprotektiven Wirkung spielen. So haben BUSTO et al. 1989 bei einem Modell mit 10-minütiger bilateraler Karotis-Okklusion und gleichzeitiger systemischer Hypotension zeigen können, dass eine Abkühlung der Tiere 5 Minuten nach Reperfusion gegenüber einer Abkühlung nach erst 30 Minuten einen signifikanten Unterschied bezüglich der Zellzahl in der CA-1-Region bringt.

Die Ursache für die relativ geringen histopathologischen Unterschiede zwischen Tieren der Kontroll- und der Hypothermie-Gruppe könnte allerdings auch in der Länge der induzierten Ischämie begründet liegen. LIN et al. (1998) betrachten eine Ischämiedauer von 10 Minuten als eine Art Schwellenwert und gehen davon aus, dass bereits geringfügig längere Ischämiezeiten zu durchweg schwerer neuronaler und glialer Schädigung führen können. Während sich die Ischämiedauer bei vielen Studien im Bereich von 10 Minuten bis 30 Minuten bewegt (BUSTO et al. 1989; WASS et al. 1995; HOFFMAN 1991 b), sind in der vorliegenden Studie 45 Minuten gewählt worden.

Sowohl bei der Dexmedetomidin- als auch bei der Hypothermie-Gruppe bestehen signifikante Korrelationen zwischen der Gesamtzellzahl, der Anzahl eosinophiler Zellen, dem prozentualen Anteil eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl sowie dem prozentualen Anteil eosinophiler Zellen in den Regionen CA-1 und CA-2 einerseits und verschiedenen Schadensgruppen andererseits. Diese Korrelationen deuten darauf hin, dass die etwas gröbere Einteilung der neuronalen Schädigung durch Bestimmung der Faktoren Ödem, Einwanderung von Zellen und Gewebeverlust in großem Maße mit der feineren Einteilung des zerebralen Schadens, nämlich der Bestimmung der Gesamtzellzahl oder eosinophiler Zellen, übereinstimmt.

Anteil eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl

In der Dexmedetomidin-Gruppe lassen sich weder innerhalb der Gruppe noch im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe signifikante Unterschiede beobachten. Tendenziell lässt sich jedoch ein stetiger Abfall des Anteils eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl und ein zu jedem Untersuchungszeitpunkt erniedrigter Anteil gegenüber der Kontroll-Gruppe als Hinweis auf reduzierte neuronale Schädigung feststellen.

In der Hypothermie-Gruppe lassen sich weder innerhalb der Gruppe noch im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe signifikante Unterschiede beobachten. Während der Anteil eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl an Tag 1 und 3 gegenüber der Kontroll-Gruppe eher erhöht ist, ist er an Tag 7 und 28 eher reduziert.

Die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin und die Quantifizierung eosinophiler Zellen dienen in der vorliegenden Studie der Analyse geschädigter Zellen, vor allem in dem selektiv vulnerablen Hippokampus. Ob Eosinophilie als Zeichen irreversibler Zellschädigung in Form der Nekrose gewertet werden darf, wird nach wie vor kontrovers diskutiert (CHANG und BARAM 1994). GARCIA et al. (1993) beispielsweise halten die 12 bis 24 Stunden nach einer Ischämie auftretende zytoplasmatische Eosinophilie, die sowohl Neurone als auch Gliazellen betrifft, für einen Ausdruck beeinträchtigten Zellstoffwechsels und interpretieren diese als Vorboten der Nekrose. WHYLLIE et al. (1980) gehen davon aus, dass nicht allein Eosinophilie, sondern auch die Morphologie derartiger Zellen das entscheidende Unterscheidungskriterium zwischen Nekrose und Apoptose darstellt: während nekrotische Zellen Zellschwellung und Karyolysis aufweisen, sind apoptotische durch Zellschrumpfung und Karyopyknose charakterisiert. MINAMISAWA et al. (1990) fassen pinke, eosinophile Zellen im Hippokampus als beschädigte Neurone auf, die laut ITO et al. (1975) aufgrund intensiver enzymatischer Aktivität dennoch überlebensfähig sind. Dagegen bezeichnen GARCIA et al. (1993) derartig angefärbte Zellen als bereits abgestorben.

Die Untersuchung von durch zerebrale Ischämie geschädigten Tieren auf Eosinophilie nach erst 24 Stunden erscheint sinnvoll, da frühestens nach 12 Stunden, aber in maximaler Ausprägung nach etwa 24 Stunden, eosinophile Zellen nachweisbar sind (GARCIA et al. 1993).

Der sowohl in der Dexmedetomidin- als auch in der Hypothermie-Gruppe ab Tag 7 tendenziell erniedrigte Anteil der eosinophilen Zellen an der Gesamtzellzahl deutet auf eine neuroprotektive Wirkung von Dexmedetomidin bzw. Hypothermie hin. Bei der Bestimmung des Anteils pink gefärbter Zellen an der Gesamtzellzahl in der CA-1-Region 1 oder 7 Tage nach zerebraler Ischämie durch Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP) über 20 Minuten

beim Hund erhält man folgendes Ergebnis: während an Tag 1 nur ein relativ geringer zytopathologischer Schaden sichtbar ist, steigt der Anteil eosinophil gefärbter Zellen an Tag 7 auf über 50 % (MARTIN 2000). NAKANO et al. (1990) haben bei durch Okklusion der A. cerebralis media (MCAO) geschädigten, ungeschützten Ratten in der Phase der sog. langsamen Schädigung einen Anstieg der Anzahl eosinophil geschädigter Zellen eine Woche nach Induktion der zerebralen Ischämie gefunden. Dieser extreme Anstieg wird in der vorliegenden Studie durch die Behandlung mit Dexmedetomidin oder Hypothermie unterdrückt.

Die unterschiedlichen Ergebnisse innerhalb gleicher Überlebenszeiten in der Kontroll-Gruppe, aber auch in den beiden Behandlungs-Gruppen liegen möglicherweise in den unterschiedlichen anatomischen Strukturen und der Ausbildung von kollateralen Gefäßen der verschiedenen Tiere und ihren unterschiedlichen physiologischen Reaktionen auf die Okklusion einer großen Arterie begründet (GARCIA 1995).

Immunhistochemische Detektion aktivierter Caspase-3

Die immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 erlaubt eine selektive Detektion apoptotischer Zellen mit Zeichen von DNS-Schädigung (ZHU et al. 2000; NIWA et al. 2001). In dieser Studie werden vor allem die besonders empfindlichen, selektiv vulnerablen Neurone des Hippokampus untersucht (PULSINELLI et al. 1982). Der lange Beobachtungszeitraum von 28 Tagen ermöglicht die genaue Analyse des zeitlichen Ablaufs apoptotischer Vorgänge, denn bei verschiedenen Modellen inkompletter zerebraler Ischämie kommt es nach einem frühen nekrotischen Zellverlust erst mit Verzögerung zu einer Eliminierung von Neuronen mit DNS-Schaden und Caspase-Aktivierung. Apoptose als andauernder dynamischer Prozess ist auch 4 Wochen nach zerebraler Schädigung gut nachweisbar (CHOPP und LI 1996; VELIER et al. 1999).

Sowohl in der Dexmedetomidin- als auch in der Hypothermie-Gruppe ist der Anteil Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl zu den Untersuchungszeitpunkten 3, 7 und 28 Tage tendenziell erniedrigt, was auf eine mögliche neuroprotektive Wirkung der beiden Behandlungsmethoden hinweist. Der insgesamt im Verlauf des Beobachtungszeitraums ansteigende Anteil Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl in der Kontroll-Gruppe zeigt, dass der Einsatz neuroprotektiver Maßnahmen möglicherweise auch zu späteren Zeitpunkten sinnvoll sein kann, da die Apoptose ein sich über Tage bis Wochen weiterentwickelnder Prozess ist.

Bei der Dexmedetomidin-Gruppe fällt eine signifikante Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl in den Regionen CA-1 und CA-2 einerseits und den Schadensgruppen 1 und 3 sowie 1 und 4 andererseits auf. Bei der Hypothermie-Gruppe korreliert der prozentuale Anteil Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl signifikant mit den Schadensgruppen 1 und 4. Dass bei dieser Betrachtung nur relativ wenige Korrelationen zu finden sind, mag in der hohen Spezifität der Caspase-3-Färbung begründet liegen, die ja nur einen Teil geschädigter Zellen detektiert. Jedoch bestätigt diese Beobachtung, ähnlich wie beim Vergleich der HE-Auswertung mit den Schadensgruppen, dass die grobe Einteilung in Schadensgruppen durchaus Auskunft gibt über den Grad der Schädigung auf zellulärer Ebene.

Auffällig ist der insgesamt sehr geringe Anteil Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl, der in der Kontroll-Gruppe bei 28 Tagen mit einem Mittelwert unter 1,5 % am höchsten liegt. In einer von LI et al. 1998 veröffentlichten Studie, bei der die Tiere durch zweistündige Okklusion der A. cerebralis media geschädigt und 46 Stunden nach Ende der Ischämie getötet worden sind, liegt der Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl bei 5,4 % im Kerngebiet und bei 0,8 % im äußeren Grenzbereich der Ischämie. Bei einer Studie mit dem selben Schädigungsmechanismus liegt der Anteil apoptotischer Zellen nach 24 und 48 Stunden bei etwa 4 % (CHOPP und LI 1996). Eine mögliche Erklärung für diese Abweichung könnte die fehlende Antikörper-Spezifität gegen aktivierte Caspase-3 in der vorliegenden Studie sein. Um die Spezifität der Antikörper-Reaktion zu überprüfen, führt man in jedem Färbedurchgang als Positivkontrolle einen Thymus-Schnitt mit. Da im juvenilen Thymus ständig Apoptose stattfindet, führt die Detektion aktivierter Caspase-3 hier immer zu einem positiven Ergebnis (UCKER et al. 1994; URBAN et al. 2002). Die Färbung in dieser Studie kann also als erfolgreich gelten, weil im Thymus braun angefärbte Zellen sichtbar und im Schnitt eines völlig unbehandelten Tieres keine Caspase-3-positiven Zellen nachweisbar sind.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die relativ geringe Anzahl Caspase-3-positiver Zellen bei den Tieren aller Versuchs-Gruppen in vorliegender Studie könnte in der kurzen Halbwertszeit apoptotischer Zellen verglichen mit nekrotischen sein. So sind die Untersuchungszeitpunkte (1, 3, 7 oder 28 Tage nach der Ischämie) jeweils nur Momentaufnahmen eines komplexen, sich über Wochen hinziehenden Prozesses (CHOPP und LI 1996).

Möglicherweise ist aber auch durch die verwendete Methode eine zu starke neuronale Schädigung induziert worden, so dass ein Großteil des geschädigten Gewebes direkt durch Nekrose untergangen ist.

Immunhistochemische Detektion aktivierter Caspase-3 in Kombination mit NeuN

Um die Art der apoptotischen Zellen genauer zu analysieren, ist in vorliegender Studie neben der Einfachfärbung zur Detektion aktivierter Caspase-3 eine Doppelfärbung zur Anfärbung apoptotischer Neurone durchgeführt worden.

Die Funktionalität der Antikörper zeigt sich dadurch, dass in Thymus-Schnitten lediglich Caspase-3-positive Reaktionen sichtbar sind, während sich das neuronale Zellband in der Hippokampus-Formation bei Schnitten unbehandelter Nativ-Tiere NeuN-positiv anfärbt (BRECHT et al. 2001; URBAN et al. 2002).

Die Frage, ob Caspase-3 ausschließlich in Neuronen aktiviert wird oder aber zusätzlich auch in Astrozyten oder Mikroglia zu finden ist, wird laut BRECHT et al. (2001) immer noch kontrovers diskutiert. Andere Autoren haben aktivierte Caspase-3 auch in nicht-neuronalen Zellen nachweisen können, beispielsweise in Astrozyten oder Oligodendrozyten (BEER et al. 2000). Als gesichert gilt die Erkenntnis, dass NeuN ein spezifischer Marker für differenzierte Neurone sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ist (MULLEN et al. 1992). Mit Hilfe der immunhistochemischen Doppelfärbung ist es möglich, unter den möglicherweise vielfältigen Zellen, die nach zerebraler Ischämie aktiviert werden, die neuronalen Zellen herauszufiltern, die möglicherweise eine entscheidende Rolle für das spätere Endergebnis spielen (STOLL et al. 1998).

Möglicherweise wäre eine spezielle Anfärbung von Astrozyten mit GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) sinnvoll, um weitere Aussagen über die neuroprotektive Wirkung von Dexmedetomidin und Hypothermie in dieser Studie treffen zu können. Während einer Ischämie kommt es zu einer tendenziellen Zunahme von Astrozyten im geschädigten Gewebe, die mit einer späteren irreversiblen Gliose des Infarktareals assoziiert ist (KINDY et al. 1992). CHEN et al. (1992) haben nachweisen können, dass diese Einwanderung von Astrozyten in der CA-1- und CA-2-Region bei Hypothermie-behandelten Ratten nach zerebraler Ischämie signifikant reduziert ist.

Neben den doppelt positiv markierten Neuronen lassen sich in allen drei Versuchs-Gruppen Zellen nachweisen, die lediglich Caspase-3-positiv angefärbt sind. Weder in der Hypothermie- noch in der Dexmedetomidin-Gruppe lassen sich signifikante Unterschiede nachweisen. Die Anzahl apoptotischer Neurone ist in beiden Behandlungs-Gruppen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe zu allen Beobachtungszeitpunkten tendenziell reduziert. In allen drei Versuchs-Gruppen ist eine tendenzielle Reduktion der Anzahl Caspase-3- und NeuN-positiver Zellen von Tag 1 bis Tag 28 erkennbar. Ob es sich bei dieser Beobachtung jedoch tatsächlich um eine echte Reduktion apoptotischer Neurone aufgrund der

neuroprotektiven Wirkung von Dexmedetomidin oder Hypothermie handelt oder ob dieses Phänomen auf einen Verlust neuronaler Strukturproteine schließen lässt, der dazu führt, dass diese von dem Antikörper NeuN nicht mehr detektiert werden können, müsste Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5.3 Methodenkritik

Modell der zerebralen Ischämie

Von den vielen, zur Zeit angewandten Methoden zur Induktion einer zerebralen Ischämie (GINSBERG und BUSTO 1989) ist in vorliegender Studie das 1984 von MENDELOW et al. etablierte Modell gewählt worden. Dabei induziert man eine transiente, inkomplette Hemisphärenischämie durch unilaterale Okklusion der A. carotis communis, kombiniert mit einer hämorrhagischen Hypotension (MAP = 40 mmHg) für 45 Minuten. Während eine alleinige Reduktion des mittleren arteriellen Blutdrucks zwar keinen ischämischen Schaden induziert, jedoch eine signifikante Reduktion des zerebralen Blutflusses zur Folge hat, führt die Kombination mit der Okklusion sowohl zu einem unilateralen ischämischen Schaden als auch zu einer signifikanten Reduktion des Blutflusses. Dabei haben sich bei diesem Modell vor allem der Neokortex, der Nucleus caudatus, der Thalamus und der in vorliegender Studie im Vordergrund der Untersuchungen stehende Hippokampus als besonders vulnerable Regionen herausgestellt.

Um histologisch eine Aussage über die neuroprotektive Wirkung von Hypothermie oder Dexmedetomidin treffen zu können, wird bei der Kontroll-Gruppe eine nachweislich das neurologische und histopathologische Endergebnis nicht beeinflussende Lachgas-Fentanyl-Narkose eingesetzt (MORIMOTO et al. 1997).

Zur Erforschung apoptotischer Vorgänge in Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) werden zur Zeit unter anderem Modelle traumatischer Hirnschädigung, neurodegenerativer Erkrankungen und entzündlicher Prozesse des ZNS eingesetzt (PENDER et al. 1991; DESHMUKH 1998; CLARK et al. 2000).

Das in vorliegender Studie benutzte Modell der zerebralen Ischämie ist vor allem deshalb gewählt worden, weil es annähernd die Situation eines anästhesiologischen, intraoperativen Zwischenfalls simuliert, nämlich eine Thrombembolie einer A. carotis communis unter hypotensiven Bedingungen.

Einteilung des Schadens anhand der HE-Färbung

Die HE-Färbung ist eine preiswerte, relativ schnell durchführbare (Arbeitsaufwand ca. eine Stunde pro Färbedurchgang) und eine der am häufigsten eingesetzten Untersuchungsmethoden in der Histologie. Die Schadenseinteilung mit Hilfe der HE-Färbung ist lichtmikroskopisch ohne Verwendung aufwändiger Apparaturen möglich.

Während das Hämatoxylin basophile Strukturen, also vor allem den Zellkern, blau anfärbt, ist das Eosin für die rote bis pinke Anfärbung azidophiler Strukturen im Zytoplasma verantwortlich.

Ein Vergleich von HE-Färbung mit TTC (Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid)-Färbung hat gezeigt, dass eine Schadensklassifizierung mit Hilfe der HE-Färbung nach einer Reperfusionzeit größer als 4 Stunden eine eindeutig genauere Annäherung verspricht als mit Hilfe der TTC-Färbung (PARK et al. 1988).

Im Gegensatz zur Kresylviolett-Färbung, einer ebenfalls relativ unkomplizierten histologischen Technik, bei der selektiv Nissl-Substanz von Perikarien lebensfähiger Neurone dargestellt wird, bietet die HE-Färbung einen guten Überblick über eine Vielzahl zellulärer Veränderungen, sowohl in den verschiedenen Untersuchungs-Gruppen als auch im zeitlichen Verlauf (DAVOLI et al. 2002).

Eine Alternative zu der in vorliegender Studie verwendeten, modifizierten Schadensklassifizierung nach REMMELE (1984) und DAVID (1970) ist die quantitative Bestimmung des Infarkt Volumens, bei der auf einzelnen Schnitten die Infarktfläche gemessen wird und die einzelnen Infarktflächen anschließend unter Einbeziehen der Anzahl aller Schnitte mit sichtbarem Infarkt zu einem Volumen integriert werden. Allerdings findet man dieses technisch aufwändige Verfahren in der Literatur nur in einem relativ engen Zeitrahmen der Reperfusionzeit, nämlich von etwa 4 Stunden bis 10 Tagen (MARKARIAN et al. 1996; PHANITI et al. 2000). Da sich ab dem etwa 15. Tag nach der Ischämie durch Einwanderung Fibroblasten-ähnlicher Zellen ein narbiges Ersatzgewebe in der Peripherie des Infarktkerns bildet und so zu einer Schrumpfung des Infarktgebietes führt, wäre die Bestimmung des Infarkt Volumens aufgrund des langen Beobachtungszeitraumes von maximal 28 Tagen hier nicht sinnvoll (CLARK et al. 1994).

Immunhistochemische Detektion

Da das Hauptaugenmerk in vorliegender Studie auf der Quantifizierung und Diskriminierung des Zelltodes, im engeren Sinne des neuronalen Zelltodes nach zerebraler Ischämie liegt, ist eine immunhistochemische Färbung zur Detektion aktivierter Caspase-3 unerlässlich.

WHYLLIE et al. (1980) gehen zwar davon aus, dass Eosinophilie in der HE-Färbung als ein Zeichen des Zelltodes gewertet werden darf, jedoch sind zur Unterscheidung von Apoptose und Nekrose elektronenmikroskopische Untersuchungen erforderlich. Die Detektion aktivierter Caspase-3 ist zumindest nach aktuellem Stand der Wissenschaft ein sicheres Zeichen für das Auftreten von Apoptose, dem morphologischen Korrelat von

programmiertem Zelltod (ELDADAH und FADEN 2000). In vorliegender Studie kommt ein polyklonaler Antikörper gegen die p18-Untereinheit aktivierter Caspase-3 zur Anwendung (SRINIVASAN et al. 1998).

Die Aktivierung der Caspase-3 liegt in der apoptotischen Kaskade relativ weit "stromabwärts", denn vor der Aktivierung dieses Proteins werden sicherlich die Caspasen 1, 8, 9 und 10 aktiviert (ELDADAH und FADEN 2000; BENCHOUA et al. 2001). Somit ist der Nachweis aktivierter Caspase-3 mit großer Wahrscheinlichkeit ein Indiz dafür, dass der Prozess des apoptotischen Zelluntergangs relativ weit fortgeschritten ist.

Als eine weitere Möglichkeit zur Darstellung apoptotischer Zellen ist vor einigen Jahren die Terminal transferase dUTP Nick End Labelling (TUNEL)-Färbung zur Darstellung fragmentierter DNS beschrieben worden (GAVRIELI et al. 1992). Jedoch haben BRECHT et al. 2001 festgestellt, dass aktivierte Caspase-3 einen dynamischen degenerativen Prozess anzeigt, während TUNEL den Endzustand schwerer, irreversibler Zellschädigung färbt. Daher sollte die TUNEL-Färbung nicht mehr als spezifischer Marker für Apoptose, sondern allenfalls als Möglichkeit der allgemeinen Darstellung von Zelltod angesehen werden (CHARRIAUT-MARLANGUE und BEN-ARI 1995).

Die in vorliegender Studie gewählte Antigen-Nachweismethode, die Labeled Streptavidin-Biotin (LSAB)-Methode ist eine Abwandlung der Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Methode und wird als sog. indirekte Methode bezeichnet. Dabei ist nicht der spezifische Primär-Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 mit dem später farbgebenden Enzymsystem gekoppelt, sondern ein sekundärer, mit Biotin konjugierter Brücken-Antikörper, der sich spezifisch gegen die Tierart richtet, aus der der erste Antikörper stammt. Der Einsatz von LSAB-Systemen gilt derzeit als eine der spezifischsten und durch seine einfache Handhabung am meisten bevorzugten Methoden. Anderen zur Zeit gängigen immunhistochemischen Nachweistechiken ist die LSAB-Methode eindeutig überlegen (HSU et al. 1981; NOLL und SCHAUBKUHNEN 2000).

Da aktivierte Caspase-3 nicht nur in Neuronen, sondern auch in Astrozyten und Oligodendrozyten lokalisiert ist, wird in vorliegender Studie eine Doppelfärbung zur sicheren Detektion apoptotischer Neurone eingesetzt (BEER et al. 2000). Dabei wird nach der Anfärbung aktivierter Caspase-3 ein Antikörper gegen NeuN aufgetragen. NeuN gilt als spezifischer Marker für Neurone sowohl des zentralen als auch des peripheren Nervensystems. Das Protein erscheint bereits in der Entwicklung des Nervensystems, persistiert aber auch im späteren Leben und ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachweisbar (MULLEN et al. 1992). Im Vergleich zur Färbung mit Kresyl-Violett, die als spezifisches

Verfahren zur Darstellung des rauhen endoplasmatischen Retikulums von Neuronen, der sog. Nissl-Substanz gilt, können Läsionen in geschädigten Arealen mit Hilfe der NeuN-Färbung noch genauer hervorgehoben werden (JONGEN-RELO und FELDON 2002).

Weitere Vorteile sowohl der Einfach- als auch der Doppelfärbung sind die jeweils relativ schnelle Durchführung (etwa 5 bzw. 8 Stunden) und die technisch unkomplizierte lichtmikroskopische Auswertung.

5.4 Diskussion des Tiermodells

Um die Pathophysiologie und die Therapiemöglichkeiten der zerebralen Ischämie systematisch erforschen zu können, ist es von größter Wichtigkeit, ein physiologisch kontrolliertes, reproduzierbares *in-vivo*-Tiermodell zu benützen. Dafür sprechen folgende Gründe:

Zerebrale Ischämien beim Menschen sind in ihrer Ausprägung, ihren Ursachen und in anatomischer Hinsicht sehr vielfältig. Diese Faktoren können durch die Vorgabe eines Ischämie-Modells weitgehend vereinheitlicht werden.

Bei am Menschen durchgeführten Studien mit neuartigen Medikamenten oder Methoden interessiert vor allem die Verbesserung des neurologischen Endergebnisses, das als prognostischer Faktor für spätere Lebensqualität gelten darf. Histopathologische, biochemische oder physiologische Untersuchungen sind also nicht oder nur in begrenztem Maße durchführbar.

Während beim Menschen oft Stunden bis zur Erstdiagnostik einer akuten zerebralen Ischämie vergehen, können im Tiermodell Geschehnisse beobachtet werden, die nach Sekunden oder Minuten ablaufen.

Die Frage, warum nicht Gewebeschnitte oder Zellkulturen ausreichen, um die Forschung rund um die zerebrale Ischämie voranzutreiben, erscheint im ersten Moment als durchaus berechtigt. Da jedoch im Mittelpunkt der Ischämie eine abnormale Perfusion steht, die bei *in-vitro*-Modellen nur eingeschränkt darstellbar ist, ist das Vorhandensein einer intakten Gefäßstruktur zur Versuchsdurchführung unabdingbar (GINSBERG und BUSTO 1989; SCHWAB 1998).

Obwohl in einigen Studien auch andere Säugetiere wie Hunde oder Schweine zum Zwecke von Tierversuchen eingesetzt worden sind, hat sich die Verwendung von Nagetieren, vornehmlich Ratten als sehr sinnvoll herauskristallisiert.

Ein wesentlicher Vorteil von Nagetieren gegenüber größeren Säugetieren liegt sicherlich im preislichen Unterschied, sowohl bei der Anschaffung als auch bei den Haltungskosten.

Im Vergleich zu höheren Säugetieren besitzen Nagetiere eine große Ähnlichkeit bezüglich der zerebrovaskulären Anatomie und Physiologie, selbst wenn auch bei Ratten große individuelle Unterschiede bei der Reaktion auf induzierte zerebrale Ischämie beobachtet werden können.

Schließlich besteht, beispielsweise im Vergleich mit Primaten, sowohl hinsichtlich ökologischer als auch ethischer Standpunkte, eine größere Akzeptanz bei der Verwendung

von Nagetieren (GINSBERG und BUSTO 1989; GARCIA et al. 1995; MEHMET et al., 1998; MARTIN et al. 2000).

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen über die neuroprotektive Wirkung von Dexmedetomidin und Hypothermie treffen:

- 1) Die neuronale Schädigung wird tendenziell durch die Behandlung mit Dexmedetomidin oder Hypothermie reduziert.
- 2) Der Zelltod kann durch die Anwendung der beiden Methoden im zeitlichen Verlauf tendenziell verringert werden.
- 3) Der Anteil apoptotischer Neurone an der Gesamtzellzahl wird durch die Gabe von Dexmedetomidin oder die Applikation von Hypothermie verringert.
- 4) Die Anzahl apoptotischer Neurone nimmt bei den beiden Behandlungsgruppen im zeitlichen Verlauf ab.

Daraus lässt sich folgern, dass sowohl Dexmedetomidin als auch Hypothermie durch ihre neuroprotektive Wirkung in der Lage sind, neuronale Schädigung nach inkompletter Hemisphärenischämie tendenziell zu reduzieren.

Da die verschiedenen Schadensgruppen signifikant mit der Gesamtzellzahl, der Anzahl eosinophiler Zellen, dem Anteil eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl oder dem Anteil Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl korrelieren, lässt sich außerdem eine weitere Aussage treffen: durch die einfache Einteilung HE-gefärbter Schnitte nach zerebraler Ischämie in verschiedene Schadensgruppen lässt sich die neuronale Schädigung relativ genau quantifizieren.

Während der Anfertigung dieser Studie sind zwei weitere, möglicherweise wissenschaftlich sehr bedeutsame Ansätze potentieller therapeutischer Neuroprotektion im Zusammenhang mit zerebraler Ischämie etabliert worden. In einer von KANG et al. (2003) veröffentlichten Arbeit wird auf die Verbesserung des neurologischen Defizits nach zerebraler Ischämie bei Ratten durch intrazerebrale Transplantation humaner Stromazellen, die sich aus dem Fettgewebe ableiten, hingewiesen. ONTENIENTE et al. haben 2003 nachgewiesen, dass die Applikation anti-apoptotischer Moleküle bei einem Modell fokaler zerebraler Ischämie vor Zelltod zu schützen vermag und somit in Zukunft eine interessante Alternative zur Reduktion der dramatischen Konsequenzen von Schlaganfall darstellen könnte.

7 LITERATURVERZEICHNIS

AFFORD S und RANDHAWA S. Apoptosis. *J Clin Pathol: Molecular Pathology* 53: 55-63 (2000)

ANDERSON RE und MEYER FB. Protection of focal cerebral ischemia by alkalinization of system pH. *Neurosurgery* 51(5): 1256-1265 (2002)

BAUGHMAN VL, HOFFMAN WE, MILETICH DJ, ALBRECHT RF, THOMAS C. Neurologic outcome in rats following incomplete cerebral ischemia during halothane, isoflurane or N₂O. *Anesthesiology* 69: 192-198 (1988 a)

BAUGHMAN VL, HOFFMAN WE, THOMAS C, MILETICH DJ, ALBRECHT RF. Neurologic outcome in aged rats after incomplete cerebral ischemia. *Anaesth Analg* 67: 677-682 (1988 b)

BEER R. Temporal profile and cell subtype distribution of activated caspase-3 following experimental traumatic brain injury. *J Neurochem* 75: 1264-1273 (2000)

BENCHOUA A. Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci* 21: 7127-7134 (2001)

BERLIT P. *Basiswissen Neurologie*. Springer Verlag. Berlin - Heidelberg, 3. Auflage (1998)

BRECHT S, GELDERBLOM M, SRINIVASAN A, MIELKE K, DITYATEVA G, HERDEGEN T. Caspase-3 activation and DNA fragmentation in primary hippocampal neurons following glutamate excitotoxicity. *Brain Res Mol Brain Res* 94: 25-34 (2001)

BUSTO R, DIETRICH D, GLOBUS MYT, VALDES I, SCHEINBERG P, GINSBERG MD. Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 7: 729-738 (1987)

BUSTO R. Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic neuronal injury. *Neurosci Lett* 101: 299-304 (1989)

CHANG D und BARAM TZ. Status epilepticus results in reversible neuronal injury in infant rat hippocampus: novel use of a marker. *Brain Res Dev Brain Res* 77: 133-136 (1994)

CHARRIAUT-MARLANGUE C und BEN-ARI Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 7(1): 61-64 (1995)

CHEN H. Neuronal damage, glial response and cerebral metabolism after hypothermic forebrain ischemia in the rat. *Acta Neuropathol (Berlin)* 84: 184-189 (1992)

CHOPP M. Apoptosis in focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir(Wien) [Suppl]* 66: 21-26 (1996)

CLARK RK, LEE EV, WHITE RF, JONAK ZL, FEUERSTEIN GZ, BARONE FC. Reperfusion following focal stroke hastens inflammation and resolution of ischemic injured tissue. *Brain Res Bull* 35(4): 387-392 (1994)

CLARK S. Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats. *J Neurochem* 74: 740-753 (2000)

COHEN JJ. Apoptosis. *Immunology* 14(3): 126-130 (1993)

COUTURIER JY, DING-ZHOU L, CROCI N, PLOTKINE M, MARGAILL I. 3-Aminobenzamide reduces brain infarction and neutrophil infiltration after transient focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol* 184(2): 973-80 (2003)

DAVID E Das Gehirn und das Rückenmark nebst ihren Häuten, Kreislaufstörungen. In Kettler LH (Hrsg.) *Lehrbuch der speziellen Pathologie*. Gustav Fischer Verlag. Jena, 1. Auflage. 631-632 (1970)

DAVOLI MA. Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat. *Neuroscience* 115(1): 125-136 (2002)

DENK H und ZATLOUKAL K Zell- und Gewebsreaktionen. In Böcker W, Denk H, Heitz PhU (Hrsg.) *Pathologie*. Urban & Fischer Verlag. München - Jena, 2. Auflage. 35-68 (2001)

DESHMUKH M. Caspases in ischaemic brain injury and neurodegenerative disease. *Apoptosis* 3: 387-394 (1998)

ELDADAH BA und FADEN AI. Caspase pathways, neuronal apoptosis and CNS injury. *J Neurotrauma* 17(10): 811-829 (2000)

ENGELHARD K, WERNER C, REEKER W, LU H, MÖLLENBERG O, MIELKE L, KOCHS E. Desflurane and isoflurane improve neurological outcome after incomplete cerebral ischemia in rats. *Br J Anaesth* 83(3): 415-421 (1999)

ENGELHARD K, WERNER C, KASPAR S, MÖLLENBERG O, BLOBNER M, BACHL M, KOCHS E. Effect of the alpha-2-agonist Dexmedetomidine on cerebral neurotransmitter concentrations during cerebral ischemia in rats. *Anesthesiology* 96: 450-457 (2002)

FARBER E Ideas in Pathology

Programmed cell death: Necrosis versus Apoptosis. *Mod Pathol* 7: 605-609 (1994)

FENEIS H Anatomische Bildnomenklatur

Georg Thieme Verlag. Stuttgart, 2. Auflage (1970)

GARCIA JH, YOSHIDA Y, CHEN H, LI Y, ZHANG ZG, LIAN J, CHEN S, CHOPP M.

Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 142(2): 623-635 (1993)

GARCIA JH, WAGNER S, LUI KF, HU XJ. Neurological deficit and extent of neuronal

necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 26(4): 627-635 (1995)

GAVRIELI Y, SHERMAN Y, BEN-SASSON SA. Identification of programmed cell death in

situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119(3): 493-501 (1992)

GEORGIADIS D, SCHWARZ S, ASCHOFF A, SCHWAB S. Hemicraniectomy and

moderate hypothermia in patients with severe ischemic stroke. *Stroke* 33: 1584-1588 (2002)

GINSBERG MD und BUSTO R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 20(12): 1627-1642 (1989)

GRANVILLE DJ, CARTHY CM, HUNT DWC, MACMANUS BM. Apoptosis: Molecular

aspects of cell death and diseases. *Lab Invest* 78(8): 893-913 (1998)

GREEN DR. Apoptotic pathways: The roads to ruin. *Cell* 94: 695-698 (1998)

GREEN EJ. Protective effects of brain hypothermia on behavior and histopathology following

global cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 580: 197-204 (1992)

HOFFMAN WE, BRAUCHER E, PELLIGRINO D, CHINAMMA T, ALBRECHT RF,

MILETICH DJ. Brain lactate and neurologic outcome following incomplete ischemia in fasted, nonfasted and glucose-loaded rats. *Anesthesiology* 72: 1045-1050 (1990)

HOFFMAN WE Dexmedetomidine improves neurologic outcome from incomplete ischemia in the rat. *Anesthesiology* 75: 328-332 (1991 a)

HOFFMAN WE. Postischemic treatment with hypothermia improves outcome from incomplete cerebral ischemia in rats. *J Neurosurg Anesthesiol* 3(1): 34-38 (1991 b)

HOFFMAN WE und CHINAMMA T. Effects of graded hypothermia on outcome from brain ischemia. *Neurol Res* 18: 185-189 (1996)

HORTOBAGYI T, GORLACH C, BENYO Z, LACZA Z, HORTOBAGYI S, WAHL M, HARKANY T. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase-mediated activation of poly(ADP-ribose) polymerase in traumatic brain injury: neuroprotection by 3-aminobenzamide. *Neuroscience* 121(4): 983-90 (2003)

HOSSMANN KA Experimentelle Pathophysiologie cerebraler Durchblutungsstörungen. In Hartmann A und Heiss W-D (Hrsg.) *Der Schlaganfall*. Steinkopff Verlag. Darmstadt, 1. Auflage. 89-102 (2001)

HSU SM, RAINE L, FANGER H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29(4): 577-580 (1981)

ITO U, SPATZ M, WALKER JT, KLATZO I. Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropathol(Berlin)* 32(3): 209-223 (1975)

JIAN S, YONGMING Q, ZHIHUA C, YAN C. Feasibility and safety of moderate hypothermia after acute ischemic stroke. *Int J Dev Neurosci* 21: 353-356 (2003)

JONGEN-RELO AL und FELDON J. Specific neuronal protein: a new tool for histological evaluation of excitotoxic lesions. *Physiol Behav* 76: 449-456 (2002)

KAHLE W und FROTSCHER M *Taschenatlas der Anatomie Band 3 Nervensystem und Sinnesorgane*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart - New York, 7. Auflage (2001)

KANG SK, LEE DH, BAE YC, KIM HK, BAIK SY, JUNG JS. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol* 183: 355-366 (2003)

KARLSSON BR, LÖBERG EM, STEEN PA. Dexmedetomidine, a potent alpha-2-agonist, does not affect neuronal damage following severe forebrain ischemia in the rat. *Eur J Anaesthesiol* 12: 281-285 (1995)

KEMPSKI OS Neuroprotektion: Modelle und Grundprinzipien. *Anaesthesist* 43 [Suppl 2]: 25-33 (1994)

KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257 (1972)

KINDY MS Transient ischemia stimulates glial fibrillary acid protein and vimentin gene expression in the gerbil neocortex, striatum and hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 13: 199-206 (1992)

KLEIHUES P, KIESSLING M, WIESTLER OD, AGUZZI A Zerebrovaskuläre Erkrankungen. In Böcker W, Denk H, Heitz PhU (Hrsg.) *Pathologie*. Urban & Fischer Verlag. München - Jena, 2. Auflage. 35-68 (2001)

KOCHS E, HOFFMAN WE, WERNER C, THOMAS C, ALBRECHT RF, SCHULTE AM ESCH J. The effects of propofol on brain electrical activity, neurologic outcome and neuronal damage following incomplete ischemia in rats. *Anesthesiology* 76: 245-252 (1992)

KRIEGER DW, DE GEORGIA MA, ABOU-CHEBL A, ANDREFSKY JC, SILA CA, KATZAN IL, MAYBERG MR, FURLAN AJ. Cooling for acute ischemic brain damage. *Stroke* 32: 1847-1854 (2001)

KUHMENEN J Neuroprotective effects of dexmedetomidine in the gerbil hippocampus after transient global ischemia. *Anesthesiology* 87: 371-377 (1997)

KUSCHINSKY W Blut-Hirn-Schranke, Liquor cerebrospinalis, Hirndurchblutung und Hirnstoffwechsel. In Klinke R und Silbernagel S (Hrsg.) *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart - New York, 2. Auflage. 721-732 (1996)

LANG F Nervensystem, Muskel, Sinne. In Silbernagel S und Lang F (Hrsg.) *Taschenatlas der Pathophysiologie*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart - New York, 1. Auflage 298-361 (1998)

LEE JM. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature [Suppl]* 399: A7-A14 (1999)

LEE JM. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* 106(6): 723-731 (2000)

LI Y. Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat Journal of Neuological Sciences. *J Neuro Sci* 156: 119-132 (1998)

LIN B, GINSBERG MD, BUSTO R, DIETRICH WD. Sequential analysis of subacute and chronic neuronal, astrocytic and microglial alterations after transient global ischemia in rats. *Acta Neuropathol(Berlin)* 95: 511-523 (1998)

LÖFFLER G und MONTENARH M Replikation und Gentechnik. In: Löffler G and Petrides P (Hrsg.) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag. Berlin - Heidelberg - New York, 7. Auflage. 209-242 (2003)

MACMANUS JP. Apoptosis after experimental stroke: fact or fashion? *J Neurotrauma* 17(10): 899-914 (2000)

MAGISTRETTI PJ und PELLERIN L Regulation of cerebral energy metabolism. In Zigmond M, Bloom FE, Landis S, Roberts J, Squire L (Hrsg.) *Fundamental Neuroscience*. Academic Press. Oxford, 1. Auflage. 25-34 (1999)

MAJNO G und JORIS I. Apoptosis, oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 146(1): 3-15 (1995)

MARKARIAN GZ. Mild hypothermia: Therapeutic window after experimental cerebral ischemia. *Neurosurgery* 38(3): 542-551 (1996)

MARTIN LJ. Apoptosis and necrosis occur in separate neuronal populations in hippocampus and cerebellum after ischemia and are associated with differential alterations in metabotropic glutamate receptor signaling pathways. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 153-167 (2000)

MEHMET H, YUE X, PENRICE J, CADY E, WYATT JS, SARRAT C, SQUIER M, EDWARDS AD. Relation of impaired energy metabolism to apoptosis and necrosis following transient cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ* 5: 321-329 (1998)

MENDELOW AD, GRAHAM DI, MCCULLOCH J, MOHAMED AA. The distribution of ischaemic damage and cerebral blood flow after unilateral carotid occlusion and hypotension in the rat. *Stroke* 15(4): 704-710 (1984)

MINAMISAWA H. The influence of mild body and brain hypothermia on ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 10: 365-374 (1990)

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* 9(4): 316-323 (1997)

MULLEN R, BUCK CR, SMITH AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116: 201-211 (1992)

NAKANO S, KOGURE K, FUJIKURA H. Ischemia-induced slowly progressive neuronal damage in the rat brain. *Neuroscience* 38(1): 115-124 (1990)

NITATORI T. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 15(2): 1001-1011 (1995)

NIWA M, HARA A, IWAI T, WANG S, HOTTA K, MORI H, UEMATSU T. Caspase activation as an apoptotic evidence in the gerbil hippocampal CA1 pyramidal cells following transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett* 300: 103-106 (2001)

NOLL S und SCHAUB-KUHNEN S *Praxis der Immunhistochemie*. Urban & Fischer Verlag. München - Jena, 1. Auflage (2000)

ONTENIENTE B, COURIAUD C, BRAUDEAU J, BENCHOUA A, GUEGAN C. The mechanisms of cell death in focal cerebral ischemia highlight neuroprotective perspectives by anti-caspase therapy. *Biochem Pharmacol* 66: 1643-1649 (2003)

PARK CK, MENDELOW AD, GRAHAM DI, MCCULLOCH J, TEASDALE GM. Correlation of triphenyltetrazolium chloride perfusion staining with conventional neurohistology in the detection of early brain ischaemia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 14(4): 289-298 (1988)

PAXINOS G, WATSON C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press. San Diego, 4. Auflage (1998)

PENDER MP, NGUYEN KB, MCCOMBE PA, KERR JFR. Apoptosis in the nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 104: 81-87 (1991)

PETTMANN B. Neuronal cell death. *Neuron* 20: 633-647 (1995)

PHANITHI PB, YOSHIDA Y, SANTANA A, KAWAMURA S, YASUI N. Mild hypothermia mitigates post-ischemic neuronal death following focal cerebral ischemia in rat brain: immunohistochemical study of Fas, caspase-3 and TUNEL. *Neuropathology* 20(4): 273-282 (2000)

POECK K und HACKE W *Neurologie*. Springer Verlag. Berlin - Heidelberg, 11. Auflage (2001)

PRIELIPP RC Dexmedetomidine-induced sedation in volunteers decreases regional and global cerebral blood flow. *Anaesth Analg* 95: 1052-1059 (2002)

PULSINELLI WA, BRIERLEY JB, PLUM F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11: 491-498 (1982)

REEKER W, WERNER C, MÖLLENBERG O, MIELKE L, KOCHS E. High-dose S(+)-ketamine improves neurological outcome following incomplete cerebral ischemia. *Can J Anesth* 47(6): 572-578 (2000)

REMMELE W Nekrotestadien und -muster. In Remmele W (Ed.) *Pathologie 4: Neuropathologie, Sinnesorgane, Stoffwechselkrankheiten*. Springer Verlag. Berlin, 1. Auflage. 55-63 (1984)

RUTA TS, DRUMMOND JC, COLE DJ. The effect of acute hypocapnia on local cerebral blood flow during middle cerebral artery occlusion in isoflurane anesthetized rats. *Anesthesiology* 78(1): 134-40 (1993)

SCHEININ M. Sedative and cardiovascular effects of medetomidine, a novel selective alpha-2-adrenoceptor agonist, in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 24: 443-451 (1987)

SCHWAB S, SCHWARZ S, SPRANGER M, KELLER E, BERTRAM M, HACKE W. Moderate hypothermia in the treatment of patients with severe middle cerebral artery infarction. *Stroke* 29: 2461-2466 (1998)

SIESJÖ BK. Pathophysiology and treatment of focal ischemia; Part I: pathophysiology. *J Neurosurg* 77: 169-184 (1992)

SRINIVASAN A, ROTH KA, SAYERS RO, SHINDLER KS, WONG AM, FRITZ LC, TOMASELLI KJ. In situ immunodetection of activated caspase-3 in apoptotic neurons in the developing nervous system. *Cell Death Differ* 5(12): 1004-1016 (1998)

STOLL G, JANDER S, SCHROETER M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 56: 149-171 (1998)

TREPEL M *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*. Urban & Fischer Verlag. München - Jena, 2. Auflage (1999)

UCKER DS, HERSHI LD, BLOMQUIST JF, TORBETT BE. Physiological T-cell death: susceptibility is modulated by activation, aging, and transformation, but the mechanism is constant. *Immunol Rev* 142: 273-299 (1994)

URBAN L, BESENYEI B, MARKA M, SEMSEI I. On the role of aging in the etiology of autoimmunity. *Gerontology* 48: 179-184 (2002)

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

VAUX DL. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 786-789 (1993)

VELIER JJ, ELLISON JA, KIKLY KK, SPERA PA, BARONE FC, FEUERSTEIN GZ. Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J Neurosci* 19(14): 5932-5941 (1999)

VENN RM und GROUNDS RM. Comparison between dexmedetomidine and propofol for sedation in the intensive care unit: patient and clinical perceptions. *Br J Anaesth* 87(5): 684-690 (2001)

WASS CT. Temperature changes of ≥ 1 °C after functional neurologic outcome and histopathology in a canine model of complete cerebral ischemia. *Anesthesiology* 83: 325-335 (1995)

WERNER C, HOFFMAN WE, KOCHS E, RABITO SF, MILETICH DJ. Captopril improves neurologic outcome from incomplete cerebral ischemia in rats. *Stroke* 22(7): 910-914 (1991)

WERNER C Milde und moderate Hypothermie als neues Therapiekonzept in der Behandlung der cerebralen Ischämie und des Schädel-Hirn-Traumas
Pathophysiologische Grundlagen. *Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 32: 210-218 (1997)

WESTER P, WATSON BD, PRADO R, DIETRICH D. A photothrombotic ring model of rat stroke-in-evolution displaying putative penumbral inversion. *Stroke* 26: 444-450 (1995)

WHYLIE AH, KERR JFR, CURRIE AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306 (1980)

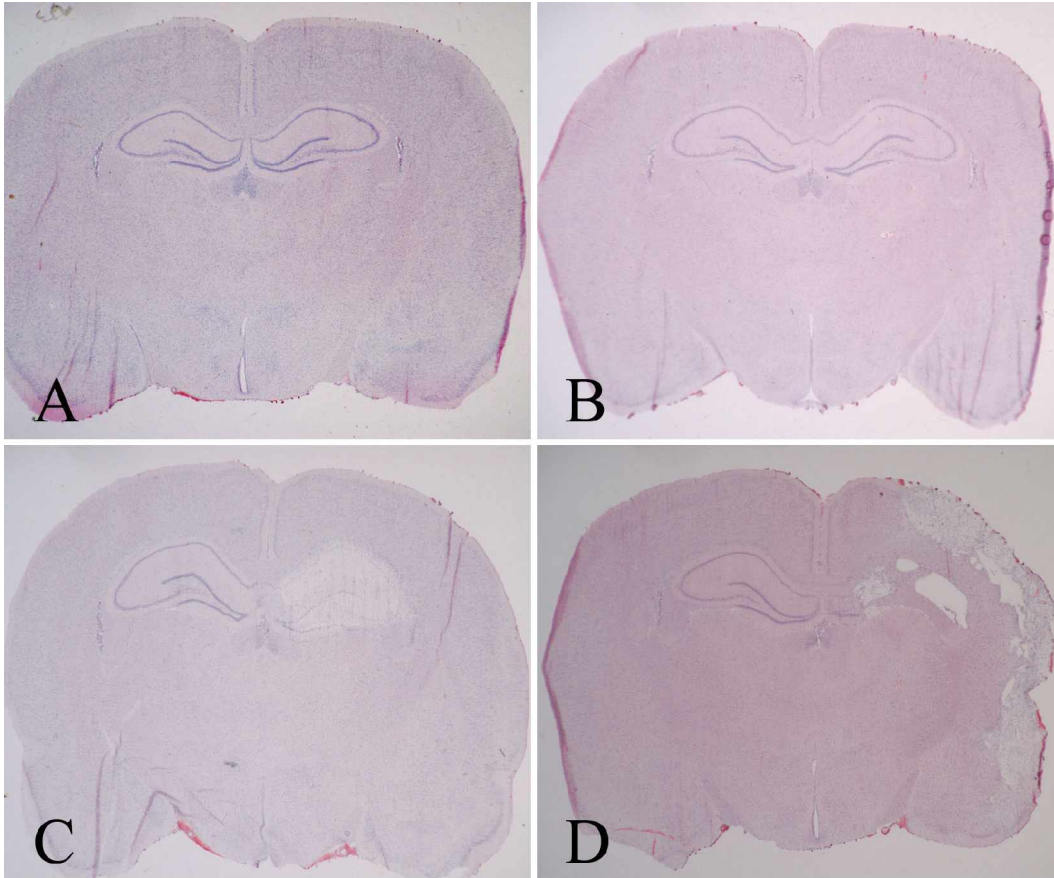
YUAN J, SHAHAM S, LEDOUX S, ELLIS HM, HORVITZ HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75(4): 641-652 (1993)

ZHU C, WANG X, HAGBERG H, BLOMGREN K. Correlation between caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *J Neurochem* 75: 819-829 (2000)

1 Deutsche Gesellschaft für Neurologie
<http://www.dgn.org/59.0.html>
(Stand 2000)

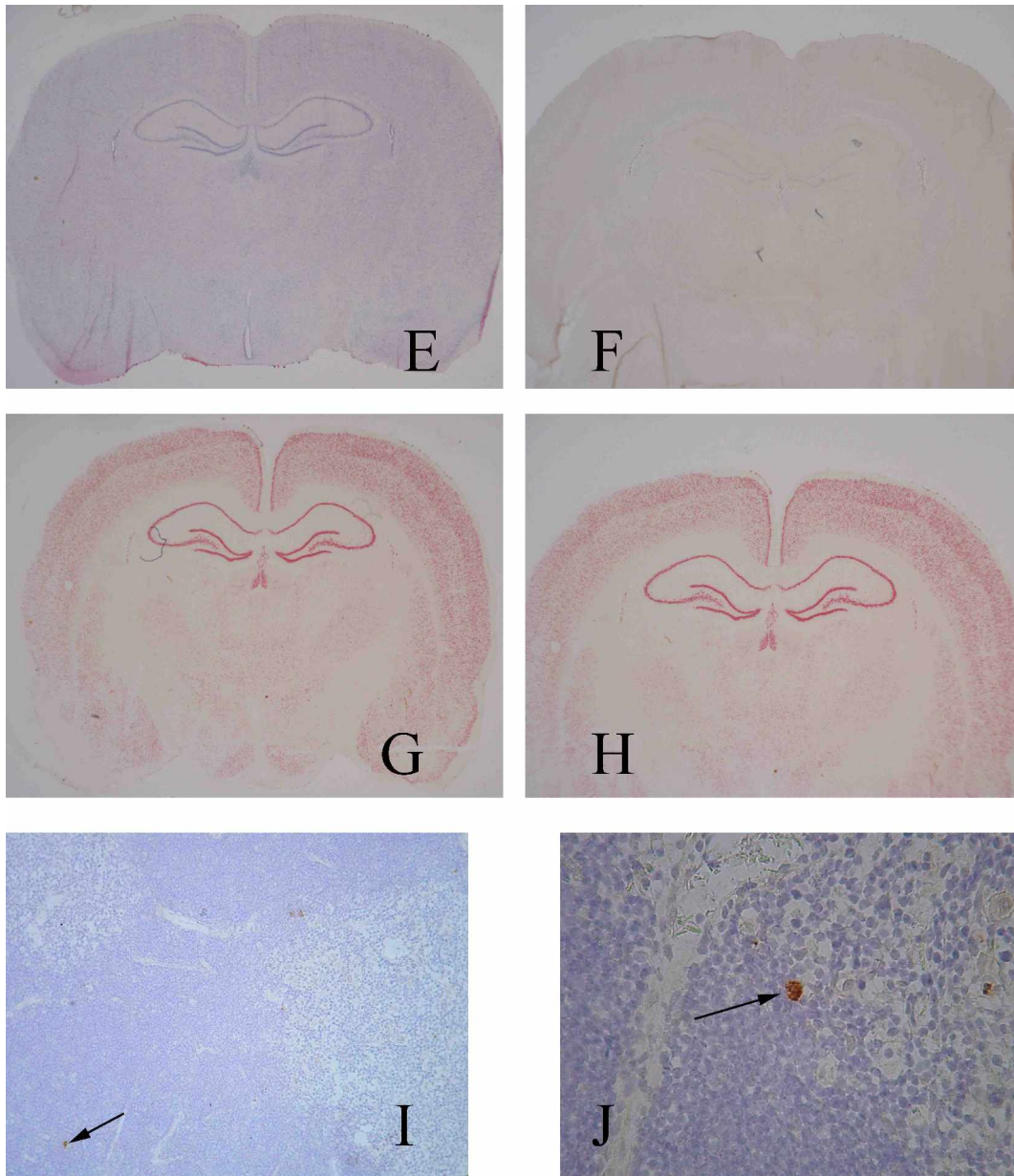
8 ANHANG

8.1 Bildtafel I



Bildtafel I zeigt in 25-facher Vergrößerung Beispiele für die Schadensklassifikation: Bild A zeigt die Schadensgruppe 0 (entspricht keiner Schädigung), Bild B zeigt die Schadensgruppe 1 (leichte Schädigung) mit nur vereinzelten eosinophilen Zellen im Bereich der rechten Hemisphäre. Bild C zeigt die Schadensgruppe 2 (mittelschwere Schädigung) mit eosinophiler Zellschädigung und Gewebeödem in der rechten Hemisphäre. Bild D zeigt die Schadensgruppe 3 (schwere Schädigung) mit Gewebeverlust und der Bildung von Pseudozysten in der rechten Hemisphäre; betroffen sind bei diesem Tier vor allem der Kortex und die Hippokampus-Formation.

8.2 Bildtafel II



Bildtafel II zeigt Beispiele für die gefärbten Negativ-Kontrollen (E-H) sowie die Positiv-Kontrollen (I und J).

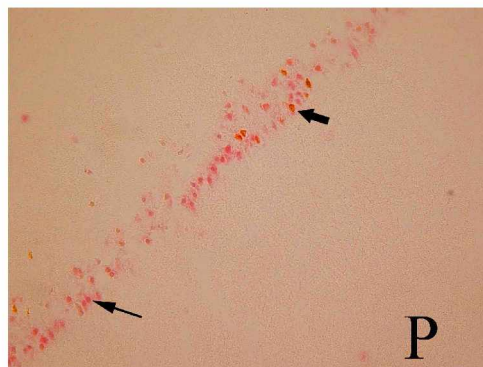
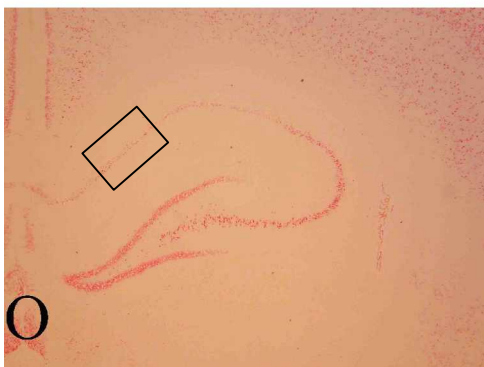
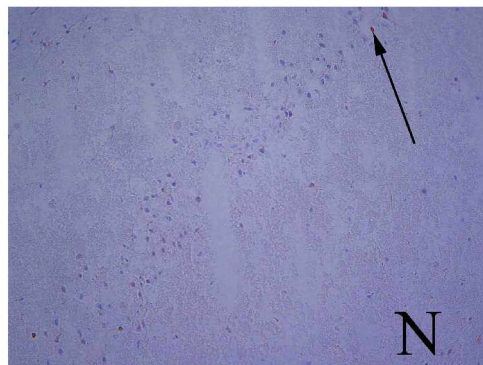
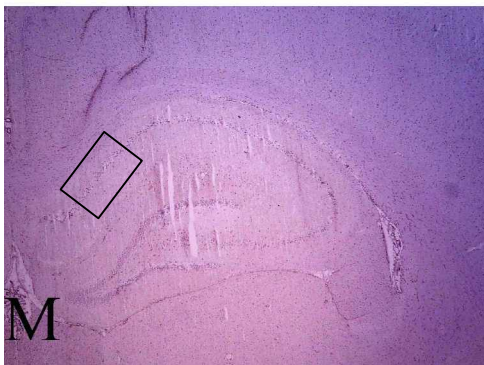
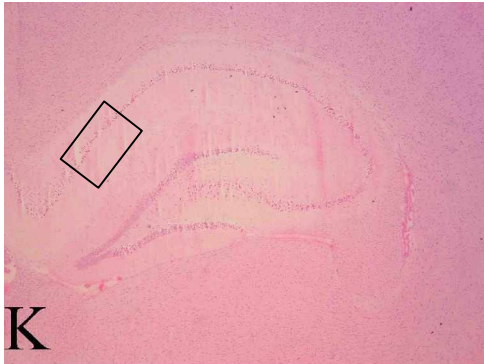
Bild E zeigt einen HE-gefärbten Schnitt eines Nativtieres bei 25-facher Vergrößerung. Die Zellen sind nur basophil, also mit Hämatoxylin angefärbt, eosinophile Zellen lassen sich nicht finden.

Bild F zeigt einen mit Caspase-3-Antikörper gefärbten Schnitt eines Nativtieres bei 25-facher Vergrößerung. Es lassen sich keine Caspase-3-positiven Zellen nachweisen.

Bild G und H zeigen bei 25-facher bzw. 40-facher Vergrößerung doppelt gefärbte Schnitte (Antikörper gegen Caspase-3 und gegen NeuN) eines Nativtieres. Besonders in Bild H sind die Neuronen der Hippokampus-Formation der rechten und linken Hemisphäre durch den Antikörper gegen NeuN eindrucksvoll dargestellt.

Bild I und J zeigen die in der Caspase-3-Einfachfärbung sowie in der Doppelfärbung mitgeführten Positiv-Kontrollen in Form eines Thymus-Schnittes bei 25-facher bzw. 200-facher Vergrößerung. Das Auffinden braun gefärbter Zellen im Thymus (Pfeile) gilt als Zeichen für eine erfolgreiche Färbung.

8.3 Bildtafel III



Bildtafel III zeigt Beispiele für Färbungen eines durch zerebrale Ischämie geschädigten Tieres (K-P). Das Tier gehört zur Dexmedetomidin-Gruppe und weist einen mittelschweren Schaden (Schadensgruppe 2) auf.

Bild K zeigt bei 25-facher Vergrößerung die rechte Hippokampus-Formation in HE-Färbung. Dabei sind ein Gewebsödem sowie eine eosinophile Anfärbung, vor allem der Zellen der CA-1-Region, erkennbar. Bild L zeigt bei 200-facher Vergrößerung einen Ausschnitt der CA-1-Region aus Bild K. Dabei sind eosinophile Zellen (Pfeil) im Zellband zu erkennen.

Bild M zeigt bei 25-facher Vergrößerung die rechte Hippokampus-Formation in Caspase-3-Färbung. Bild N zeigt bei 200-facher Vergrößerung einen Ausschnitt der CA-1-Region aus Bild M. Dabei sind Caspase-3-positive, braun angefärbte Zellen (Pfeil) im Zellband zu erkennen.

Bild O zeigt bei 25-facher Vergrößerung die rechte Hippokampus-Formation in Caspase-3- und NeuN-Doppelfärbung. Bild P zeigt bei 200-facher Vergrößerung einen Ausschnitt der CA-1-Region aus Bild O. Dabei sind neben den nur NeuN-positiven Zellen (Pfeil) auch doppelt gefärbte Zellen (dicker Pfeil) im Zellband zu erkennen.