

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Gemäß Tierschutzgesetz wurde die Nutzung der Tiere im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen vom Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein als zuständige Behörde genehmigt (Vers.-Nr. 21/1b/00).

Es wurden erwachsene männliche Sprague Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 200 bis 400 g verwendet. Die Tiere wurden bis unmittelbar vor Versuchsbeginn mit Futter und Wasser ad libitum versorgt und befanden sich in einem gesundheitlich einwandfreien Zustand.

2.2 Versuchsvorbereitung

Die Ratten wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 50 mg Pentobarbital pro Kilogramm Körpergewicht narkotisiert und in Rückenlage auf eine Wärmeplatte gelegt. Die Konstanzhaltung der Körpertemperatur auf 37,5°C wurde mittels Rektalsonde überwacht.

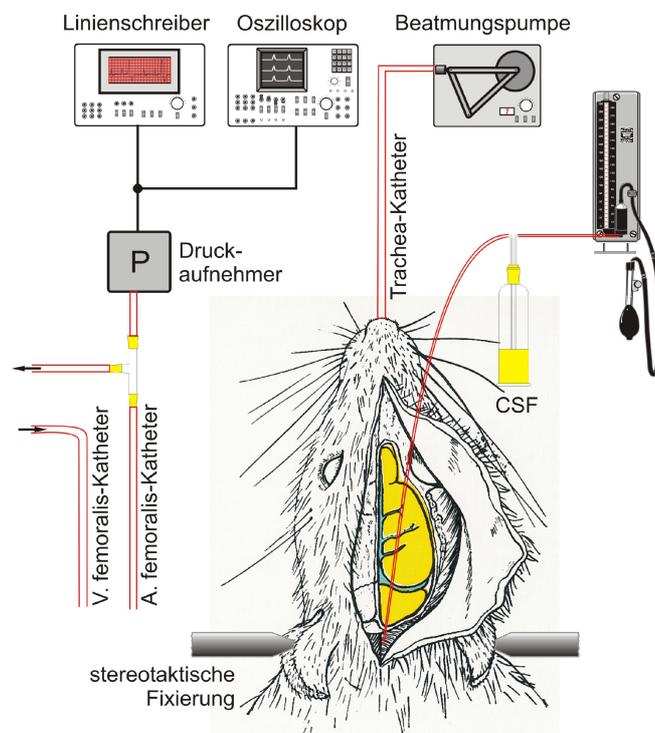


Abb.1 Schema des Versuchsaufbaus

Um eine konstante Sauerstoff-Versorgung zu gewährleisten, wurden die Tiere einer Tracheotomie unterzogen, um sie dann, je nach Versuchsgruppenzugehörigkeit, mit Raumluft oder Sauerstoff über einen Trachealtubus zu beatmen (Ugo Basile Rodent Ventilator UB 7025; Atemzugvolumen 2,5 ml, Atemfrequenz 80 min^{-1}). Die Effektivität der Beatmung wurde mittels stündlich durchgeführter Blutgasanalysen überwacht.

Damit gegebenenfalls Pharmaka appliziert werden konnten (Pentobarbital als i.v.-Bolus bei zu geringer Narkose-Tiefe, Dopamin bei einem Abfall des arteriellen Mitteldruckes unter 80 mmHg [60], Volumensubstitution mittels HAES/NaCl-Lösung [60]), wurde eine Vena femoralis der Ratten katheterisiert. Für die regelmäßigen Blutentnahmen (Blutgasanalysen, Erythropoietin-Konzentrationsbestimmungen) wurde ein weiterer Katheter in einer Arteria femoralis plaziert. Die Katheter (PE-50) wurden vor dem Einsetzen heparinisiert, um ein vorzeitiges Verschließen durch Blutkoagula zu verhindern.

Anschließend wurden die Ratten in Bauchlage gebracht und mit dem Kopf in die Halterung eines stereotaktischen Tisches positioniert. Der Kopf wurde um ca. 45° nach unten abgewinkelt und in dieser Haltung fixiert, so dass die Cisterna magna (= Cisterna cerebellomedullaris) maximal exponiert war.

Die Herzfrequenz wurde über einen Oszillographen dargestellt. Der arterielle Mitteldruck wurde mit einem Druckaufnehmer registriert und kontinuierlich aufgezeichnet.

2.3 Versuchsdurchführung

2.3.1 Hirndruckerhöhung

Nach Entnahme einer Blutprobe (Blutgasanalyse, Ausgangs-Erythropoietinkonzentration) wurde am okzipitalen Ende des Schädeldaches ein ca. 1 cm langer Hautschnitt gesetzt. Die Muskelschichten über der Cisterna magna wurden stumpf zur Seite präpariert und mittels Fäden rechts und links am stereotaktischen Tisch fixiert. Die so freigelegte Membrana atlantooccipitalis posterior wurde mit einer Kanüle der Stärke 14 ($0,60 \times 30 \text{ mm}$) perforiert.

Daraufhin konnte ein Katheter in die Cisterna magna eingeführt werden (Länge 3-4 mm, Außendurchmesser 0,96 mm, Innendurchmesser 0,58 mm). Der Katheter wurde mit Sekundenkleber fixiert und mit einer Flasche verbunden, in der eine Cerebrospinalflüssigkeits-Ersatzlösung vorgelegt war (Na^+ 150 mM, K^+ 3 mM, Ca^{2+} 1,4 mM, Mg^{2+} 0,8 mM, Cl^- 155 mM in Phosphat-Puffer pH 7,4; nach Ross und Duhaime [61]).

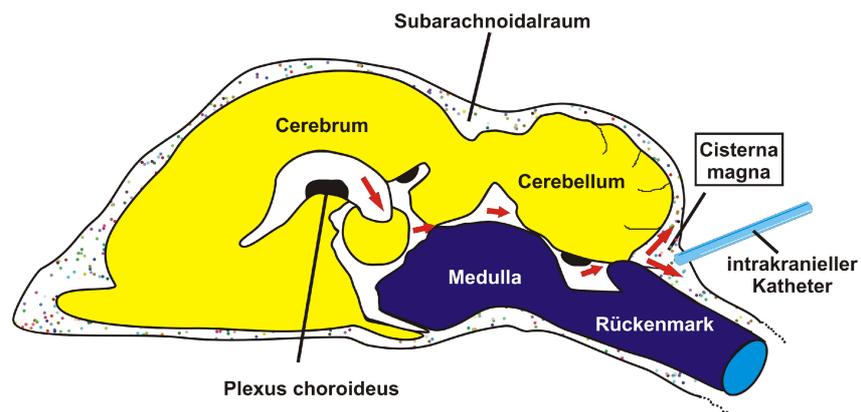


Abb.2 Sagittalschnitt durch das Rattenhirn mit intrakraniellm Katheter

Eine Erhöhung des intrakraniellen hydrostatischen Druckes wurde erzielt, indem druckkontrolliert die synthetische Cerebrospinalflüssigkeit in die Cisterna magna eingefüllt wurde.

2.3.2 Versuchsgruppen

Folgende Versuchsreihen wurden durchgeführt:

Gruppe I: (Luft-Beatmung, je n = 4)

- A - intrakranielle Druckerhöhung auf 60 mmHg für 10 Minuten
- B - intrakranielle Druckerhöhung auf 80 mmHg für 10 Minuten
- C - intrakranielle Druckerhöhung auf 100 mmHg für 10 Minuten
- D - intrakranielle Druckerhöhung auf 120 mmHg für 10 Minuten

Gruppe II: (Luft-Beatmung, je n = 4)

- A - intrakranielle Druckerhöhung auf 100 mmHg für 5 Minuten
- B - intrakranielle Druckerhöhung auf 100 mmHg für 10 Minuten
- C - intrakranielle Druckerhöhung auf 100 mmHg für 15 Minuten
- D - intrakranielle Druckerhöhung auf 100 mmHg für 30 Minuten

Gruppe III: (Sauerstoff-Beatmung, n = 3)

- intrakranielle Druckerhöhung auf 100 mmHg für 15 Minuten

Gruppe IV: (Nephrektomie, n = 4)

- intrakranielle Druckerhöhung auf 100 mmHg für 10 Minuten

Zur Kontrolle diente je eine Gruppe von Tieren mit Luft- (n = 5) bzw. Sauerstoff-Beatmung (n = 4) ohne intrakranielle Druckintervention.

2.3.3 Probenentnahme

Nach einem 1stündigen Vorlauf wurden insgesamt vier Blutproben in stündlichen Abständen aus der A. femoralis zur Blutgasanalyse sowie Erythropoietin-Bestimmung genommen. Es wurden jeweils 0,5 ml Blut abgenommen, von denen 0,2 ml für die Blutgasanalyse benötigt wurden. Vom Rest jeder Blutprobe wurde durch Zentrifugation (4000×g) das Plasma gewonnen, das bis zur Bestimmung der jeweiligen Erythropoietin-Konzentration bei -80°C eingelagert wurde.

Nach jeder Blutabnahme wurden den Ratten 0,5 ml 10%ige HAES- in 0,9%iger NaCl-Lösung (1+1) zur Volumensubstitution verabreicht [60].

In der Abbildung 3 ist der Versuchsablauf schematisch zusammengefasst.

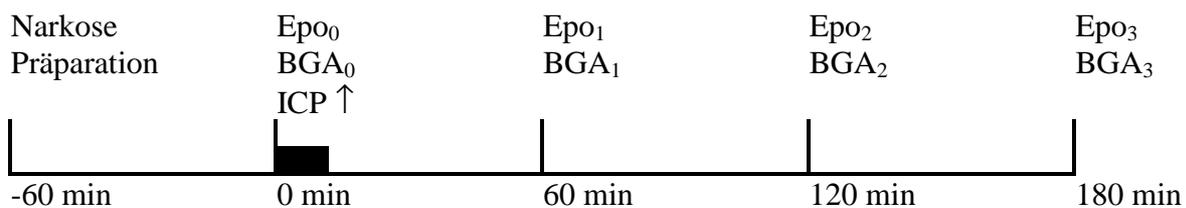


Abb.3 Schema des zeitlichen Versuchsablaufes. Epo_{0...3} - Blutproben zur Bestimmung der Erythropoietin-Plasmakonzentration, BGA_{0...3} - Blutgasanalysen, ICP ↑ - druck- bzw. zeitabhängige Erhöhung des intrakraniellen hydrostatischen Drucks.

2.4 Analytik

Die Erythropoietin-Konzentrationen in den Plasmaproben wurden mittels eines kommerziellen ELISA (medac, Hamburg) gemäß den Instruktionen des Herstellers ermittelt. Anstatt eines humanen Erythropoietin-Standards wurde ein Ratten-Erythropoietin-Standard verwandt, der mit Hilfe der In-vivo-Methode nach Cotes und Bangham ([62], modifiziert nach Jelkmann und Bauer [7]) kalibriert worden ist.

Die Glukose-Plasmakonzentrationen wurden ebenfalls mit einem kommerziellen Besteck bestimmt (Hexokinase-Methode; Roche, Darmstadt).

2.5 Statistik

Die Ergebnisse wurden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardirrtum angegeben. Zum Vergleich einer Kontrollgruppe mit verschiedenen Versuchsgruppen wurde der Dunnetts-Test verwandt. Mit Hilfe des Tukey-Kramer-Tests wurden Vergleiche zwischen Versuchsgruppen untereinander erstellt. Das Signifikanz-Niveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt.