

## **2. Methoden**

### **2.1 Versuchsplan**

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden Versuche an männlichen Wistar bzw. Long Evans Ratten durchgeführt.

#### **2.1.1 Ein- und Ausschlußkriterien**

##### **Einschlußkriterien:**

Es wurden nur Ratten verwendet, bei denen am Tag der Versuchsdurchführung keine offensichtlichen Krankheitssymptome feststellbar waren und die ein Gewicht zwischen 260 und 350 g aufwiesen.

##### **Ausschlußkriterien:**

Von der Auswertung ausgeschlossen wurden alle Tiere, wenn bei der Versuchsdurchführung technische Probleme auftraten. Dies war der Fall, wenn die mittlere Zerebralarterie (MCA) nicht verschlossen werden konnte (z.B. weil der Faden nicht geschoben werden konnte), das Tier während der Operation starb oder wenn bei der Hirnentnahme an der Schädelbasis eine Blutung zu erkennen war, was auf eine Perforation der A. cerebialis anterior (ACA) hindeutet. Desweiteren wurden solche Tiere nicht ausgewertet, bei denen sich die Hirninfarktgröße wegen fehlender Anfärbung nicht bestimmen ließ.

### 2.1.2 Versuchsreihen

In allen Versuchsreihen wurden die Tiere 24 Stunden nach Beginn der Okklusion getötet.

#### **Versuchsreihe I – Unterschiedliche Okklusionszeiten**

**Versuchstiere:** Wistar-Ratten

97 Ratten wurden fünf verschiedenen Gruppen zugeteilt:

- 1) **permanente Okklusion** über 24 Stunden
- 2) **1 stündige Okklusion**, mit anschließender 23stündiger Reperfusion
- 3) **2 stündige Okklusion**, mit anschließender 22stündiger Reperfusion
- 4) **3 stündige Okklusion**, mit anschließender 21stündiger Reperfusion
- 5) **4 stündige Okklusion**, mit anschließender 20stündiger Reperfusion

## Versuchsreihe II Vergleich unterschiedlicher Dosierungen von Ebselen

### 1) Gabe von Ebselen i.p. bei Wistar-Ratten

**Versuchstiere** : Wistar-Ratten

58 Ratten wurden sechs verschiedenen Gruppen zugeteilt:

In allen Gruppen wurde die Substanz bzw. das Vehikel 30 Minuten vor der Okklusion i.p. gegeben.

- 1) **permanente Okklusion** über 24h mit Vehikel-Gabe (Cremophor)
- 2) **permanente Okklusion** über 24h mit Ebselen-Gabe (30 mg/kg)
- 3) **2stündige Okklusion** mit 22stündiger Reperfusion und Vehikel-Gabe (Cremophor), Kontrolle zu (4)
- 4) **2stündige Okklusion** mit 22stündiger Reperfusion und Ebselen-Gabe (30 mg/kg)
- 5) **2stündige Okklusion** mit 22stündiger Reperfusion und Vehikel-Gabe (Cremophor), Kontrolle zu (6)
- 6) **2stündige Okklusion** mit 22stündiger Reperfusion und Ebselen-Gabe (100 mg/kg)

## Versuchsreihe II Vergleich unterschiedlicher Dosierungen von Ebselen

### 2) Gabe von Ebselen i.p. bei Long-Evans-Ratten

**Versuchstiere** : Long-Evans-Ratten

30 Tiere wurden 3 verschiedenen Gruppen zugeteilt

In allen Gruppen wurde die Substanz bzw. das Vehikel 30 Minuten vor der Okklusion i.p. gegeben.

- 1) **2stündige Okklusion** mit 22stündiger Reperfusion und Vehikel-Gabe (Cremophor), Kontrolle zu 2)
- 2) **2stündige Okklusion** mit 22stündiger Reperfusion und Ebselen-Gabe (100 mg/kg)
- 3) **permanente Okklusion** über 24h mit Vehikel-Gabe (Cremophor)

## Versuchsreihe II Vergleich unterschiedlicher Dosierungen von Ebselen

### 3) Gabe von Ebselen oral bei Wistar-Ratten

**Versuchstiere** : Wistar-Ratten

42 Ratten wurden vier verschiedenen Gruppen zugeteilt:

In allen Gruppen wurde die Substanz bzw. das Vehikel 1 Stunde vor der Okklusion oral gegeben

- 1) **2stündige Okklusion** mit 22stündiger Reperfusion und Vehikel-Gabe (Cremophor), Kontrollgruppe
- 2) **2stündige Okklusion** mit 22stündiger Reperfusion und Ebselen-Gabe (30 mg/kg)
- 3) **2stündige Okklusion** mit 22stündiger Reperfusion und Ebselen-Gabe (100 mg/kg)

### **2.1.3 Zuordnung zu den Versuchsgruppen**

Nach einer Vorauswahl, die sich am Gewicht orientierte (siehe Einschlußkriterien), wurden die Tiere randomisiert einer Behandlungsgruppe zugeteilt. Dies geschah, indem vor dem Versuch alle Tiere durchnummeriert wurden. Dann wurden die einzelnen Tiere anhand von Zufallszahlen auf die einzelnen Versuchsgruppen verteilt. Aufgrund der Vorauswahl ist dieses Verfahren nicht streng randomisiert (CAVALLI-SFORZA 1969).

## **2.2 Material**

### **2.2.1 Tiere und Tierhaltung**

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Tieren handelte es sich entweder um männliche Wistar SPF (specific pathogen free) Ratten, die in der Tierzucht und -haltung der Schering AG unter standardisierten Bedingungen aufgezogen wurden (12ständiger Tag/Nacht-Rhythmus, Temperatur constant 18° C) oder um Long-Evans Ratten, die von Harlan Winkelmann bezogen wurden und dann für eine Woche unter den gleichen Bedingungen wie die Wistar-Tiere gehalten wurden. Sie erhielten Futter (Altromin<sup>®</sup>, Zusammensetzung siehe Anhang) und Wasser ad libitum und standen unter ständiger tierärztlicher Kontrolle. Sie wogen am Versuchstag zwischen 260 und 350 Gramm. Nach Abschluß der Versuche wurden die Tiere getötet.

## 2.3 Versuchsdurchführung

### 2.3.1 Anfertigung des Fadens zur Okklusion der A. cerebri media

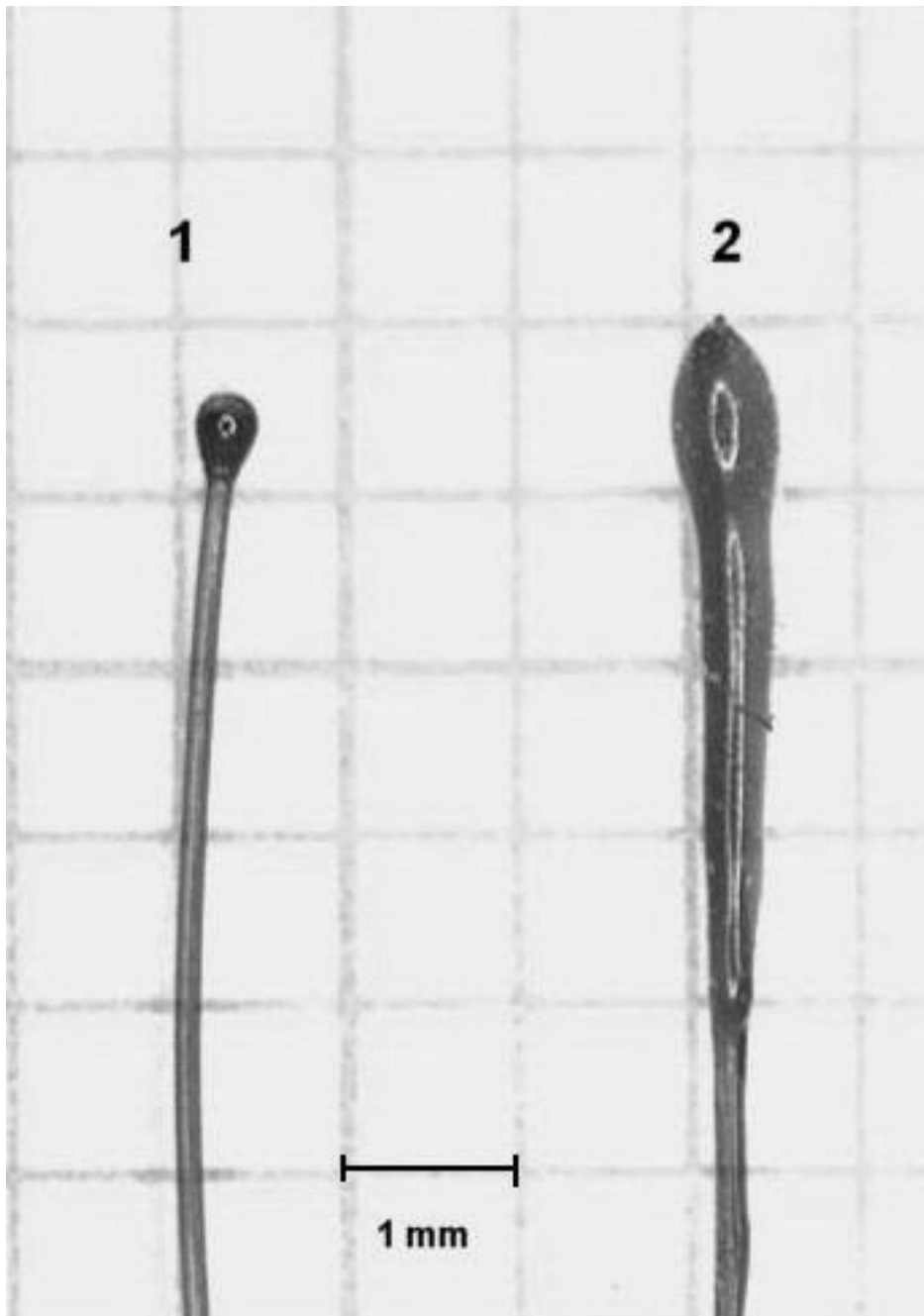
Von einem monofilen Nylonfaden (Dafilon 4-0<sup>®</sup>, Braun; entspricht einer Fadendicke von 0,150-0,199 mm) wurden etwa 3 cm lange Fadenstücke abgeschnitten. Das eine Fadenstückende wurde durch folgende Methoden verdickt:

a) Der Faden wurde an einem Ende über einer Flamme erhitzt, so daß sich eine Kugel formt. Alle Fadenstücke, bei denen sich ein zu großer oder zu kleiner Kopf (Kopfdicke mit einer Mikrometerschraube gemessen, Kopf muß zwischen 0,3 und 0,4 mm Dicke haben) gebildet hatte, wurden verworfen.

b) Es wurde eine Silikonmasse angerührt (Xantopren VL<sup>®</sup> 6ml, gemischt mit 12 Tropfen Optosil<sup>®</sup>), in die ein Fadenende eingetaucht wurde. Überschüssige Silikonmasse wurde abgestreift, bis die erwünschte Dicke erreicht wurde. Zum Trocknen wurden die Fäden aufgehängt. Um ein besseres Haften des Xantoprens zu erreichen, wurde das zu beschichtende Fadenende in ein Universaladhäsiv getaucht (siehe Abbildung 3).

Aus folgenden Gründen wurde bei den Versuchen die Fäden verwendet, deren Ende durch Hitze verdickt wurde:

- die silikonbeschichteten Fäden waren unregelmäßig in der Dicke,
- beim Zurückziehen des silikonverdickten Fadens löste sich das Silikon ab (dies ließ sich zwar durch die Verwendung eines Universaladhäsivs verhindern, dann wurden jedoch die Fäden zu dick, so daß sie sich nicht mehr schieben ließen),
- es bildete sich bei den silikonverdickten Fäden oft kein runder Kopf, so daß die A. cerebri anterior durchstoßen wurde,
- es ließen sich sehr gleichmäßige Fäden mit Hilfe von Hitze herstellen.



**Abbildung 3: Vergleich der Fadenpräparation**

Auf dieser Abbildung sind die unterschiedlichen Arten der in dieser Arbeit verwendeten Fadenpräparation zu erkennen. Bei (1) wurde das Fadenende mit Hitze verdickt und bei (2) mit einer Silikonmasse.

### 2.3.2 Durchführung der Operation

**Narkose:** Narkosegerät: Dräger

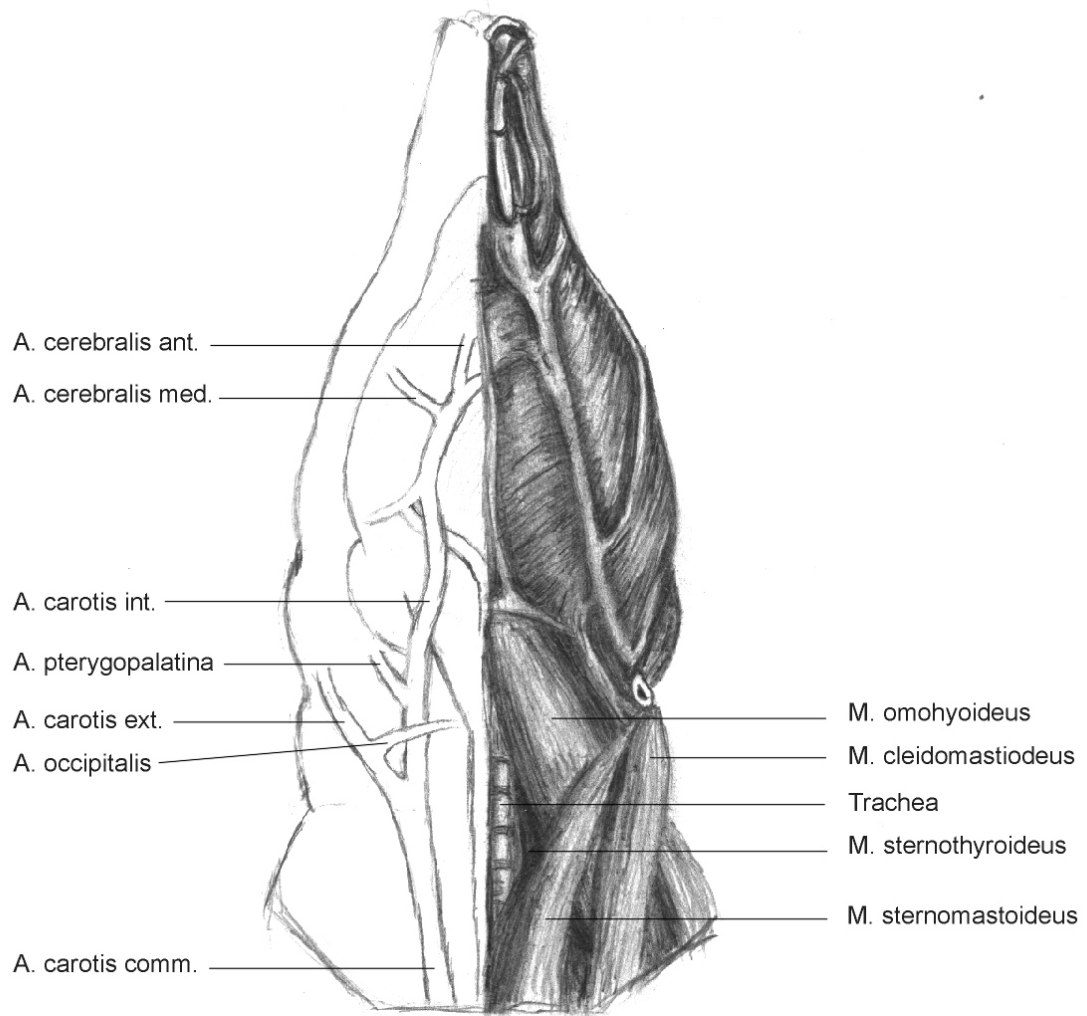
Einleitung: 4% Halothan; 2/1 N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> (0,8 l/min N<sub>2</sub>O und 0,4 l/min O<sub>2</sub>) in einem abgeschlossenen Plexiglasgefäß

Erhaltung: 1,5-2% Halothan; 2/1 N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> (0,8 l/min N<sub>2</sub>O und 0,4 l/min O<sub>2</sub>) über eine Maske

#### **Operationstechnik:**

Nach Erreichen des Toleranzstadiums wurde das Tier in Rückenlage auf einem OP-Tisch fixiert und über eine Atemmaske weiterhin mit dem Narkosegasgemisch versorgt. Mit Hilfe einer rektal eingeführten Thermosonde wurde die Körpertemperatur kontrolliert und mit einer rückgekoppelten Wärmematte auf 37,5 °C gehalten. Nach Rasur und Desinfektion der Halsregion wurde ein ca. 3cm langer medianer Schnitt am Hals in der Regio pharyngea und der Regio colli ventralis durchgeführt. Durch Haltefäden wurden die Hautlappen am Tisch fixiert. Die A. carotis comm., ext. und int. wurden unter Schonung des Tr. vagosympathicus in einem aus den Muskeln M. digastricus, M. sternomastoideus und dem M. sternohyoideus gebildeten Dreieck stumpf freipräpariert. Anschließend wurde die von der A. carotis ext. abzweigende A. occipitalis mit Seide 4-0 doppelt ligiert und durchtrennt (Abbildung 4 und Abbildung 5, Nummer (1) und (2)). Die A. carotis ext. wurde distal mit Seide 4-0 ligiert. Nun wurden Microclips auf die A. carotis comm. und die A. carotis int. gesetzt (Abbildung 5, Nummer (3)). Die A. carotis ext. wurde angeschnitten und ein vorbereitetes Fadenstück (Dafilon 4-0, Braun) wurde in das Lumen geschoben. Der Nylonfaden wurde in der A. carotis ext. mit Seidenfaden (4-0) locker fixiert, so daß er noch verschieblich war und dann wurde die A. carotis ext. durchtrennt. Jetzt wurde der Microclip auf der A. carotis int. gelöst und die A. pterygopalatina nah an der Aufzweigung mit einem Microclip verschlossen. Der Nylonfaden wurde etwa 1,8 -2 cm vorgeschoben, bis man einen Widerstand fühlte (Abbildung 5, Nummer (4)). Der Seidenfaden am Stumpf der A. carotis ext.





**Abbildung 4: Anatomische Verhältnisse bei der Ratte**

Auf der Abbildung sind schematisch die anatomischen Verhältnisse am Hals und am Kopf der Ratte zu sehen. Auf der linken Seite sind die arteriellen Gefäße und auf der rechten Seite die tieferen Muskelschichten dargestellt.

wurde nachgezogen und dann werden die Microclips von der A. carotis comm. und der A. pterygopalatina entfernt.

Bei der permanenten Okklusion wurde die Wunde vernäht, bei der Okklusion mit Reperfusion wurde die Wunde vorübergehend mit Klammern verschlossen. Zum Zeitpunkt der Reperfusion wurde die Wunde geöffnet. Anschließend wurde der Okklusionsfaden zurückgezogen, so daß der verdickte Kopf im Stumpf der A. carotis externa zu liegen kam. Das Überstehende Fadenstück wurde abgeschnitten und dann wurde die Wunde vernäht.

Die Prüfsubstanzen wurden intraperitoneal oder per os verabreicht.

Während der Aufwachphase wurde das Tier in auf einer bei 37 °C angewärmten Wärmeplatte stehende Einzelkäfige gesetzt.

### 2.3.3 Auswertung des Neurologischen Status

Der neurologische Status wurde mit einer nach einem von BEDERSON et al. (1986), ZEA LONGA et al. (1989) und ROGERS et al. (1997) modifizierten Schlüssel mit einer Zahl zwischen 0 und 5 beurteilt. Dabei zeigen die Ratten bei 0 keinen neurologisches Defizit und ein Score von 5 bedeutet Schlaganfallbedingter Tod. Da die Ergebnisse nicht immer eindeutig waren, konnten auch Zwischenwerte (z.B. 2,5) vergeben werden. Die Seitenstabilität wurde durch seitlichen Druck getestet.

Die Bedeutung der Zahlen im einzelnen:

Neurologischer Score	Bedeutung
0	Normal
1	Vorderpfotenflexion
2	1 + verminderte Seitenstabilität
3	2 + Drehbewegung um paretische Seite
4	3 + Unfähig spontan zu gehen
5	Schlaganfallbedingter Tod

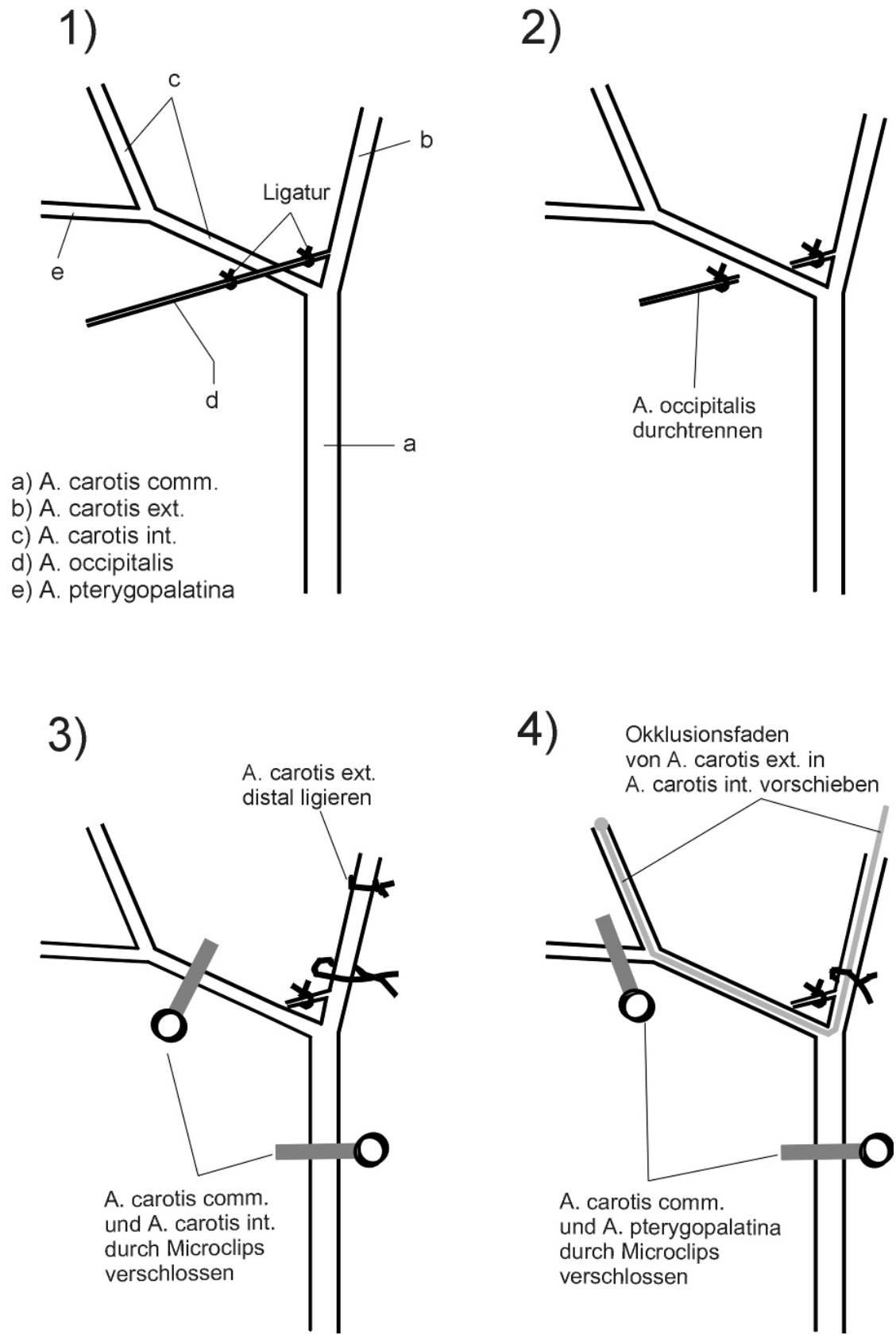


Abbildung 5: Operationsdurchführung

### 2.3.4 Entnahme des Gehirns

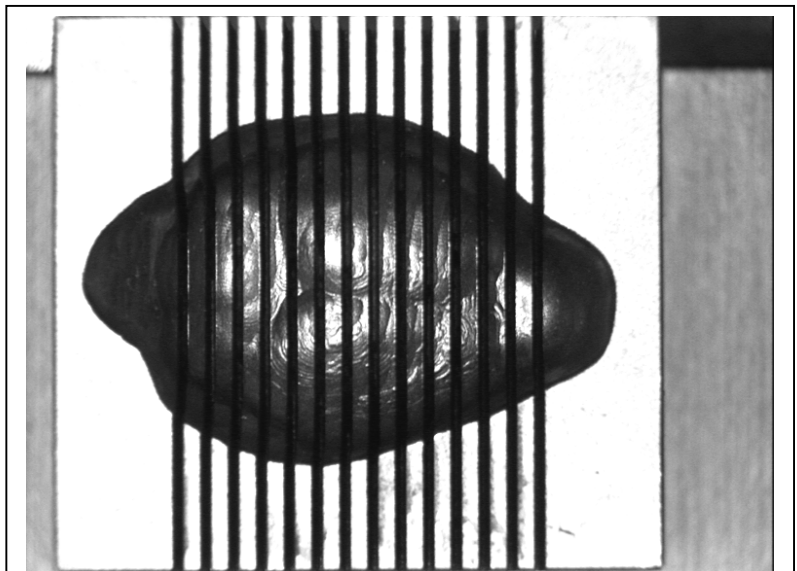
24 Stunden nach dem Verschließen der MCA wurde der neurologische Status der Tiere untersucht. Anschließend wurde das Tier in Narkose versetzt. Zur Darstellung des Hirninfarktes wurde der Brustkorb geöffnet und Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) 10 % (in NaCl-Lösung 0.9 %, 1 ml/Tier) in die linke Herzkammer injiziert. Der Farbstoff TTC wird durch Mitochondrien umgebaut, so daß sich alle Regionen rot anfärben in denen die Mitochondrien noch funktionstüchtig sind, Infarktgewebe jedoch seine ursprüngliche Farbe behält. Nach ca. 5 min (Rötung von Pfoten und Nase) wurde der Kopf abgetrennt und das Gehirn entnommen. Anschließend wurde das Hirn in einer Paraformaldehydlösung 4 % für eine Woche bei 4° C fixiert. Durch das TTC wurden alle gesunden Hirnteile rot angefärbt, der Infarkt wurde nicht angefärbt.

### 2.3.5 Infarktauswertung

#### 2.3.5.1 Schneiden der Gehirne

Die in Paraformaldehyd fixierten Gehirne wurden mit einem Hirnschneider in 1 mm dicke Scheiben geschnitten (siehe Abbildung 6)

Anschließend wurden die einzelnen Hirnscheiben in 12-Loch Zellkulturplatten in destilliertem Wasser aufbewahrt.

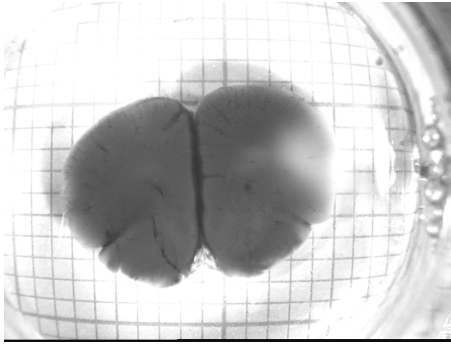


**Abbildung 6: Hirnschneider**

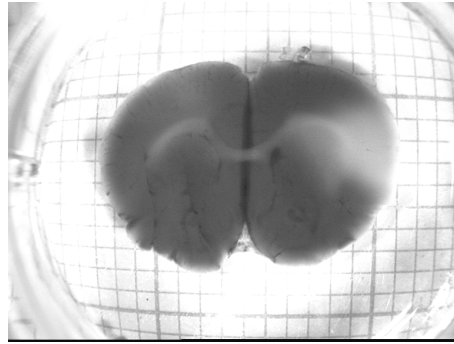
Dargestellt ist die Aufsicht des Hirnschneiders. In die große Vertiefung in Form des Rattengehirns wird das Hirn gelegt und dann mit Klingen, die im Abstand von 1 mm angeordnet sind, geschnitten

### **2.3.5.2 Auswertung des Hirninfarktolumens**

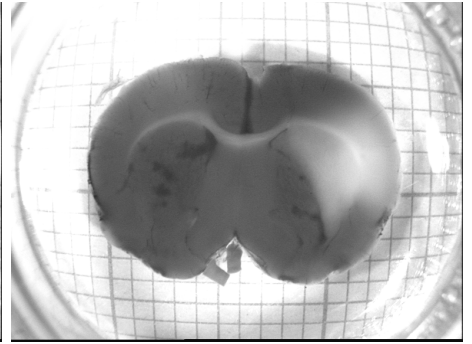
Die Auswertung wurde durch rechnergestützte Vermessung beider Großhirnhälften und des Infarktgebietes durchgeführt (Ermittlung des Infarktolumens): Die Abbildungsgröße auf dem Monitor wurde mittels Milimeterpapier kalibriert. Dann wurden die einzelnen, 1 mm dicken Hirnschnitte mit Hilfe einer Kamera aufgenommen, digitalisiert und gespeichert. Anschließend wurde auf jedem Hirnschnitt die Flächen beider Hirnhälften und des Infarktes bestimmt. Dies wurde mittels Umfahren des jeweiligen Bezirks mit der Computermaus und anschließender Berechnung durch den Computers erreicht. Dabei wurde das komplette Großhirn durchgemessen. Danach wurde das Volumen der Gehirnhälften und des Infarktes aus der Dicke der einzelnen Hirnschnitte (1 mm) und den jeweiligen Flächen durch Berechnung bestimmt (Abbildung 7).



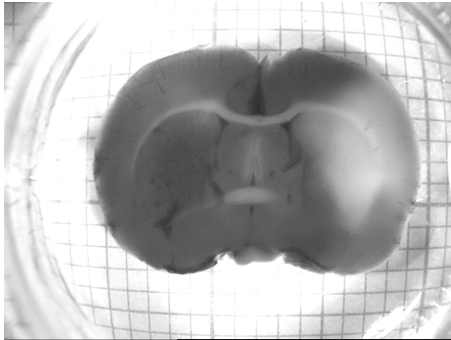
Schnitt 3



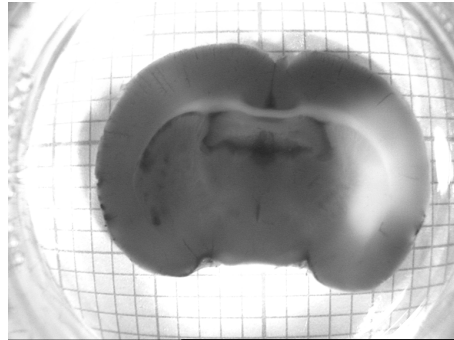
Schnitt 4



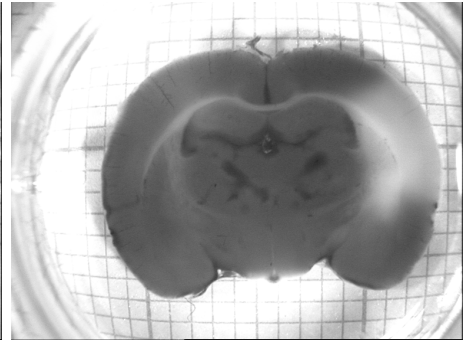
Schnitt 5



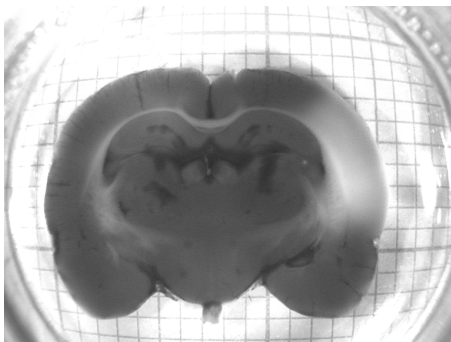
Schnitt 6



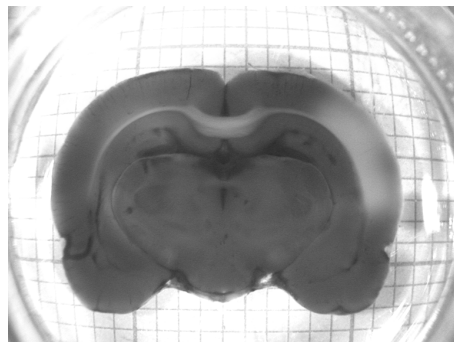
Schnitt 7



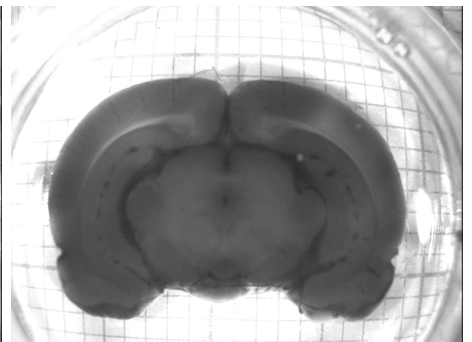
Schnitt 8



Schnitt 9



Schnitt 10



Schnitt 11

### **Abbildung 7: Darstellung des zerebralen Infarktes**

Diese Abbildung zeigt das Beispiel eines in Scheiben geschnittenen Rattenhirnes. Durch die Vitalfärbung mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) ist das intakte Hirngewebe rot angefärbt, das Infarktgewebe färbt sich nicht an.

## 2.4 Zur Auswertung

### 2.4.1 Ausgewertete Versuche

Von den Versuchstieren der verschiedenen Gruppen wurden folgende Tiere eingesetzt und unter Berücksichtigung der Ausschlußkriterien ausgewertet:

#### Versuchsreihe I:

Versuchsgruppe	Eingesetzte Tiere	Ausgewertete Tiere
1) Einstündige Okklusion	18	12
2) Zweistündige Okklusion	21	16
3) Dreistündige Okklusion	22	13
4) Vierstündige Okklusion	20	14
5) Permanente Okklusion	16	12

#### Versuchsreihe II:

##### 1 Gabe von Ebselen i.p. bei Wistar-Ratten

Versuchsgruppe	Eingesetzte Tiere	Ausgewertete Tiere
1) Permanente Okklusion Kontrolle	10	9
2) Permanente Okklusion Ebselen (30 mg/kg)	11	11
3) Zweistündige Okklusion Kontrolle zu 4)	10	9
4) Zweistündige Okklusion Ebselen (30 mg/kg)	11	8
5) Zweistündige Okklusion Kontrolle zu 6)	13	10
6) Zweistündige Okklusion Ebselen (30 mg/kg)	14	10

## 2 Gabe von Ebselen i.p. bei Long-Evans-Ratten

Versuchsgruppe	Eingesetzte Tiere	Ausgewertete Tiere
1) Zweistündige Okklusion Kontrolle zu 2)	10	8
2) Zweistündige Okklusion Ebselen (30 mg/kg)	10	8
3) Permanente Okklusion Vehikel (Cremophor)	10	9

## 3 Gabe von Ebselen oral bei Wistar-Ratten

Versuchsgruppe	Eingesetzte Tiere	Ausgewertete Tiere
1) Zweistündige Okklusion Kontrolle zu 2) und 3)	14	11
2) Zweistündige Okklusion Ebselen (30 mg/kg)	16	11
3) Zweistündige Okklusion Ebselen (100 mg/kg)	12	10

### 2.4.2 Statistische Methoden

In den durchgeführten Versuchen konnte nicht gewährleistet werden, daß bei allen Tieren ein Infarkt erzeugt werden konnte. Aufgrund dessen ergab sich keine Normalverteilung, sondern es bildete sich eine schiefe Verteilung. Deshalb wurde die statistische Datenuntersuchung mit Rangtests durchgeführt.

Um einen besseren Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen zu haben, wurden zusätzlich zum Median im Anhang auch der Mittelwert der einzelnen Versuchsergebnisse und der Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

#### Verwendete statistische Tests

Die einzelnen Versuchsgruppen wurden gegeneinander mit Hilfe der Einwegklassifizierung der Varianzanalyse nach Rängen (Kruskal-Wallis-Analyse) verglichen (SACHS 1997) und danach wurden, bei einem signifikanten Unterschied, die einzelnen Versuchsgruppen mit dem Dunn-Test miteinander verglichen. Beim



Vergleich von nur zwei Versuchsgruppen wurden diese mit dem Mann-Whitney Rangsummentest verglichen (SACHS 1997).

Um Zusammenhänge zwischen zwei Faktoren zu ermitteln, wurde der Spearmanschen Rang-Korrelationskoeffizienten bestimmt.

In einigen Versuchen starben Tiere an den Auswirkungen des Infarktes. Aufgrund der geringen Anzahl gestorbener Tiere wurden die Gruppen mit der niedrigsten Mortalität und der höchsten Mortalität mit Hilfe des Fisher-Tests miteinander verglichen (SACHS 1997). Im Verlauf der Versuche konnte trotz offensichtlich gelungener Versuchsdurchführung bei einigen Tieren kein Infarkt erzeugt werden. Um herauszufinden, ob dies in einer der Versuchsgruppen überdurchschnittlich häufig vorkam, wurden in den Versuchsreihen immer die Gruppe mit den meisten infarktlosen Tieren mit der Gruppe mit den wenigsten infarktlosen verglichen. Auch hierbei wurde der Fisher-Test verwendet.

Alle Tests wurden mit dem Statistikprogramm SigmaStat durchgeführt. Die Ergebnisse galten als signifikant, wenn die Wahrscheinlichkeit P kleiner als 5 % war.