

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Vergleich der Belastungen durch
Kohlendioxid (CO₂), Isofluran und Sevofluran
in der Phase der Narkoseeinleitung bei Mäusen –
ein Beitrag zum Refinement von Tierversuchen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Nicole Marquardt
Tierärztin
aus Pforzheim

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3634

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink
Zweiter Gutachter: PD Dr. André Rex
Dritter Gutachter: PD Dr. Christa Thöne-Reinecke

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

carbon dioxide, isofluran, inhaled anaesthetics, anaesthesia, mice, animal welfare, epinephrine, norepinephrine, behaviour, histopathology

Tag der Promotion: 10.09.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-395-0

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Coverbild vorne © mgkuijpers - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Man sieht nur, was man weiß.

Goethe

Inhaltsverzeichnis

0	Verwendete Abkürzungen	IX
1	Literatur	1
1.1	Begriffserläuterungen.....	1
1.1.1	Das Konzept der 3Rs	1
1.1.2	Wohlbefinden und Belastung.....	1
1.1.2.1	Wohlbefinden	1
1.1.2.2	Belastung	2
1.1.3	Bewusstsein, Narkose, Tod.....	3
1.1.3.1	Bewusstsein, Bewusstseinsverlust	3
1.1.3.2	Narkose, Allgemeinanästhesie und Anästhesietiefe	4
1.1.3.3	Tod, Euthanasie	6
1.2	Tierschutzgerechtes Töten von Labormäusen	7
1.2.1	Gründe für eine Tötung	7
1.2.2	Definitionen und Kriterien einer tierschutzgerechten Tötung.....	8
1.2.3	Derzeitige Tötungspraxis.....	9
1.2.3.1	Tötung mit CO ₂	9
1.2.3.2	Tötung mit einer Überdosis von Inhalationsanästhetika	9
1.2.3.3	Weitere Tötungsmethoden	10
1.2.4	Regelungen zum Tierschutz.....	11
1.2.4.1	Regelungen in Deutschland.....	11
1.2.4.2	Vergleich internationaler Leitlinien und Empfehlungen zur Tötung von Labornagern	12
1.3	Anästhesie- und Euthanasiestudien mit CO₂.....	13
1.4	Wirkungen von CO₂ und der Inhalationsnarkotika Isofluran und Sevofluran auf den Organismus	19
1.4.1	Schmerzauslösung über die Wirkung an Schleimhäuten.....	19
1.4.2	Wirkung auf die Atmung und den Säuren-Basen-Haushalt sowie narkotische Wirkung	21
1.4.3	Wirkung auf das sympathische Nervensystem	23
1.4.4	Wirkung auf das Erleben der Atmung, Dyspnoe	29
1.4.5	Wirkung auf die Gewebe des Atemtraktes.....	30
1.4.6	Wirkung auf das Verhalten	32
1.4.6.1	Wirkung auf das Angstverhalten	32
1.4.6.2	Wirkung auf das Meideverhalten und olfaktorische Aversion	35
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit	37

2	Tiere, Material und Methoden	39
2.1	Versuchstiere	39
2.1.1	Mausstämme	39
2.1.2	Tierzahl	39
2.1.3	Haltungsbedingungen	39
2.1.4	Verwendete Substanzen, Applikationsformen und Expositionszeit	40
2.2	Versuchsaufbau und -ablauf	42
2.2.1	Versuchsaufbau	42
2.2.2	Versuchsablauf	43
2.3	Untersuchungsmethoden und -parameter	46
2.3.1	Körpergewichtsmessung	46
2.3.2	Reflexausfälle	46
2.3.3	Wirksamkeit und Zuverlässigkeit der Narkosebehandlung	46
2.3.4	Phasen der Narkoseeinleitung	47
2.3.5	Errechneter Narkosegas-Konzentrationsverlauf	47
2.3.6	Blutanalyse	47
2.3.6.1	Glukosebestimmung aus dem Vollblut	48
2.3.6.2	Katecholaminbestimmung aus dem Plasma	48
2.3.7	Verhaltensanalyse	49
2.3.7.1	Körperhaltung	49
2.3.7.2	Motorische Aktivität	49
2.3.7.3	Konvulsionen	50
2.3.7.4	Hypotoner Gang und Ataxie	51
2.3.7.5	Vokalisationen	52
2.3.8	Untersuchung des Atmungssystems	52
2.3.8.2	Atembewegungen	52
2.3.8.3	Makroskopische Untersuchung des Atemtraktes	53
2.3.8.4	Mikroskopische Untersuchung des Atemtraktes	56
2.4	Auswertung und Statistik	59
3	Ergebnisse	61
3.1	Reflexausfälle	61
3.2	Phasen der Narkoseeinleitung und ihre Latenzzeiten	63
3.3	Errechneter Narkosegas-Konzentrationsverlauf	72
3.4	Blutanalyse	74
3.4.1	Glukosebestimmung aus dem Vollblut	74
3.4.2	Katecholaminbestimmung aus dem Plasma	76
3.5	Verhaltensanalyse	81

3.5.1	Körperhaltung.....	81
3.5.2	Motorische Aktivität	81
3.5.3	Konvulsionen.....	88
3.5.1	Hypotoner Gang und Ataxie	93
3.5.1	Vokalisationen.....	95
3.6	Untersuchung des Atmungssystems	96
3.6.1	Atembewegungen	96
3.6.2	Makroskopische Untersuchung des Atemtraktes.....	96
3.6.3	Mikroskopische Untersuchung des Atemtraktes	108
3.6.3.1	Histologische Untersuchung	108
3.6.3.2	Morphometrische Untersuchung: Luftgehalt	120
3.6.4	Vergleich der makroskopischen und mikroskopischen Untersuchung	121
4	Diskussion.....	123
4.1	Methodenkritik.....	123
4.1.1	Zeitpunkt bzw. Zeitraum der Messungen.....	123
4.1.2	Narkosebox und Reflexprüfung	124
4.1.3	Video- und Tonaufnahmen.....	124
4.1.4	Probennahme.....	125
4.2	Wirksamkeit der Narkosegase.....	126
4.3	Narkoseverlauf, Schnelligkeit und Gaskonzentrationen	128
4.3.1	Exposition mit CO ₂	128
4.3.2	Exposition mit Isofluran und Sevofluran.....	131
4.3.1	<i>Erste Bewertung</i>	133
4.4	Blutwerte.....	134
4.4.1	Katecholamine im Plasma	134
4.4.2	<i>Zweite Bewertung</i>	138
4.4.3	Blutglukose	139
4.5	Verhaltensanalyse.....	142
4.5.1	Körperhaltung.....	142
4.5.2	Motorische Aktivität	142
4.5.3	Konvulsionen.....	144
4.5.4	Hypotoner Gang und Ataxie	145
4.5.5	Vokalisationen.....	146
4.5.6	<i>Dritte Bewertung</i>	147
4.6	Untersuchung des Atmungssystems	148
4.6.1	Atembewegungen und Dyspnoe	148
4.6.2	Makroskopische und mikroskopische Untersuchung	149

Inhaltsverzeichnis

4.6.3	<i>Vierte Bewertung</i>	153
4.7	Arbeitssicherheit	154
5	Schlussfolgerung	155
6	Zusammenfassung	159
7	Summary	161
8	Zitierte Literatur	163
8.1	Wissenschaftliche Literatur	163
8.2	Verordnungen, Gesetze und Sonstiges	185
9	Anhang	187
9.1	Narkosebox und Deckel	187
9.2	Histologie	189
9.2.1	Grundlegende Arbeitsschritte	189
9.2.1.1	Einbettung der Proben in Paraplast®	189
9.2.1.2	Entparaffinieren: Xylol und absteigende Alkoholreihe	189
9.2.1.3	Entwässern: aufsteigende Alkoholreihe und Xylol	190
9.2.1.4	Harzeinschluss	190
9.2.2	Färbungen.....	190
9.2.2.1	Doppelfärbung mit Hämalaun-Eosin (HE-Färbung).....	190
9.2.2.2	Bindegewebsfärbung nach Ladewig	192
9.2.2.3	Elastika-Färbung mit Resorcinfuchsin-Thiazinrot-Pikrinsäure	194
9.3	Tabellarische Übersicht aller Ergebnisse	196
9.3.1	Phasen der Narkoseeinleitung und ihre Latenzzeiten bei NMRI-Mäusen	196
9.3.2	Phasen der Narkoseeinleitung und ihre Latenzzeiten bei C57Bl/6-Mäusen...	196
9.3.3	Errechnete Narkosegaskonzentrationen bei NMRI-Mäusen	197
9.3.4	Errechnete Narkosegaskonzentrationen bei C57Bl/6-Mäusen.....	197
9.3.5	Blutwerte bei NMRI-Mäusen.....	198
9.3.6	Blutwerte bei C57Bl/6-Mäusen	198
9.3.7	Verhaltensparameter bei NMRI-Mäusen	199
9.3.8	Verhaltensparameter bei C57Bl/6-Mäusen.....	200
9.3.9	Makroskopische Untersuchung des Atemtraktes bei NMRI-Mäusen	202
9.3.10	Makroskopische Untersuchung des Atemtraktes bei C57Bl/6-Mäusen.....	204
9.3.11	Mikroskopische Untersuchung des Atemtraktes bei NMRI-Mäusen.....	207
9.3.12	Mikroskopische Untersuchung des Atemtraktes bei C57Bl/6-Mäusen	209
10	Danksagung	211
11	Erklärung	213

0 Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACLAM	American College of Laboratory Animal Medicine (Amerikanische Akademie der Labortiermedizin)
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AHAW	Scientific Panel on Animal Health and Welfare (Wissenschaftliches Gremium für Tiergesundheit und Tierschutz)
ANZCCART	Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching (Rat von Australien und Neuseeland zur Haltung und Pflege von Tieren in Forschung und Lehre)
APC	Animal Procedure Committee (Ausschuss für Tierversuche, in Großbritannien)
ASA	American Society of Anaesthesiologists (Amerikanische Gesellschaft der Anästhesiologen)
ASIC	acid-sensing ion channel (säureempfindlicher Ionenkanal)
ATP	Adenosintriphosphat
AVMA	American Veterinary Medical Association (Amerikanische Veterinärmedizinische Gesellschaft)
AVP	Arginin-Vasopressin
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
CCAC	Canadian Council on Animal Care (Kanadischer Rat zur Haltung und Pflege von Tieren)
CRH	Corticotropin-releasing hormone (Corticotropin-freisetzendes Hormon)
CT	chirurgische Toleranz
EFSA	European Authority for Food Safety (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit)
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
HPA-Achse	hypothalamic pituitary adrenocortical (Hypothalamus- Hypophysen-Nebennierenrinden-) Achse
HPLC	high-performance liquid chromatography (Hochleistungs- flüssigkeitschromatografie)
KV%/min	Prozent des Kammervolumens pro Minute

0 Verwendete Abkürzungen

LORR	loss of righting reflex (Verlust des Stellreflexes)
MAC	minimal alveolar concentration (minimale alveoläre Konzentration)
p_{CO_2}	Kohlendioxid-Partialdruck
PET_{CO_2}	partial endtidal CO_2 (Kohlendioxid-Partialdruck in der Ausatemluft)
REACH	Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals (Registrierung, Bewertung und Zulassung von Chemikalien)
SAM-Achse	sympathetic adrenal medullary (Sympathikus-Nebennierenmark-) Achse
Tab.	Tabelle
TRPV1-Kanal	transient receptor potential (transientes Rezeptorpotential)-Kanal, auch Vanilloidrezeptor 1 genannt
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Literatur

1.1 Begriffserläuterungen

1.1.1 Das Konzept der 3Rs

In den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts bildete sich die Versuchstierkunde als ein multidisziplinäres Fachgebiet heraus, das sich zum einen um die Qualität von Tierversuchen und zum anderen um das Wohlergehen von Versuchstieren kümmert (Baumans, 2004). Schon vor über 50 Jahren stellten Russel und Burch (1959) entsprechende Leitsätze, die als die 3Rs bekannt sind, auf. Baumans (2004) fasst sie folgendermaßen zusammen:

- **Replacement:** Vermeidung von Tierversuchen durch *in vitro* und *in silico* Alternativen, wie z. B. Zell- und Gewebekulturen und computergestützte Modelle
- **Reduction:** Verminderung der Tierzahl durch Standardisierung, die das Tier selbst, seine Haltung und die experimentelle Durchführung betrifft, sowie durch statistische Methoden, die schon vor dem Versuch angewendet werden, z. B. Festlegung des Versuchsdesign und der Tierzahl
- **Refinement:** Verbesserung des Wohlbefindens der Versuchstiere durch adäquate Haltung und Pflege, durch angemessene Anästhesie, Analgesie und Tötung, durch geschulte und erfahrene Durchführende, durch verbesserte experimentelle Methoden und durch Festlegung von sog. humanen Endpunkten, an denen ein Experiment beim Überschreiten von vorher festgelegtem Leidensausmaß vorzeitig abgebrochen werden muss.

Die vorliegende Arbeit will einen Beitrag zum Refinement hinsichtlich der Tötung von Labormäusen leisten.

1.1.2 Wohlbefinden und Belastung

1.1.2.1 Wohlbefinden

Wohlbefinden (engl. welfare) bezieht sich auf den Zustand eines Individuums in Relation zu seiner Umwelt und seinen Anstrengungen, sich dieser Umwelt anzupassen (Broom, 1991). Man geht bei Tieren von Wohlbefinden aus, wenn ihr Normalverhalten oder eine Verhaltensanpassung zur Bedürfnisbefriedigung, Bedarfsdeckung und/oder Schadensvermeidung führt. Das Tier ist zur Bewältigung der Situation fähig und erfährt erwünschtes Erleben (Broom, 1991; Pollmann und Tschanz, 2006). Wohlbefinden kann als Gegenteil von Distress betrachtet werden und resultiert aus der Bewertung des Ausgangs einer Situation durch das Tier (Veissier und Boissy, 2007). Wohlbefinden wird im Allgemeinen mit einem Gefühl von Freude und Zufriedenheit assoziiert (Broom, 2011). Es ist

ein Zustand körperlicher und seelischer Harmonie des Tiers in sich und mit der Umwelt (Lorz und Metzger, 1999).

1.1.2.2 Belastung

Als Belastung wird in dieser Arbeit jegliche Empfindung und Reaktion eines Tieres verstanden, die dessen Wohlbefinden entgegenwirken. Dazu zählen Distress, Schmerzen, Angst, Leiden und Schäden. Nicht immer sind diese Begriffe klar voneinander abzugrenzen. Sie gehen in einander über oder bedingen sich. So erzeugt Schmerz auch eine Stressreaktion.

- **Stress, Distress**

Moberg (2000) findet, dass Stress zum Leben gehört und an sich nicht negativ ist. Er definiert Stress als biologische Antwort, die hervorgerufen wird, wenn ein Individuum die Bedrohung der eigenen Homöostase (Konstanthaltung des inneren Körpermilieus durch Selbstregulation) wahrnimmt. Die Bedrohung stellt den Stressor dar. Wenn sie das Wohlbefinden wirklich beeinträchtigt, empfindet das Tier Distress (Moberg, 2000). Hier fällt es schwer, zu unterscheiden, wann eine Reaktion auf einen Stressor pathologisch oder noch natürlich, lebenserhaltend ist. Das US Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals (US-amerikanischer Ausschuss zur Erkennung und Linderung von Stress bei Labortieren) verfeinert diese Definition, indem es von einer wirklichen oder wahrgenommenen Störung der physiologischen Homöostase oder des psychischen Wohlbefindens spricht und Distress zusammenfassend als einen aversiven, negativen Zustand beschreibt, in dem Coping (Stressbewältigungs-) und Anpassungsprozesse scheitern, um die physiologische und psychologische Homöostase wiederherzustellen (National Research Council, 2008).

- **Schmerz**

Schmerz beim Menschen ist eine unangenehme sensorische und emotionale Erfahrung, die durch tatsächliche oder mögliche Gewebsschädigung verursacht wird oder wie solch eine beschrieben wird (IASP Task Force on Taxonomy, 1994). Im Gegensatz zum Menschen, der sich verbal oder mithilfe von Analogskalen äußern kann, ist die Schmerzerfassung oder Schmerzmessung bei Tieren so nicht möglich. Es scheint angebracht, deshalb bei Tieren von Schmerzäußerungen und Schmerzreaktionen, die wir erkennen können, zu sprechen, da der Schmerz an sich, so wie ihn das Tier erlebt, uns verborgen bleibt. Aufgrund von Analogien des Nerven- und Muskuloskeletalsystems von Mensch und (Wirbel-)Tier kann davon ausgegangen werden, dass Tiere Schmerzen ähnlich wie Menschen empfinden (Lorz und Metzger, 1999).

- **Angst**

Angst ist ein „unangenehmer emotionaler Zustand in Erwartung eines stark negativen Ereignisses“ (Sambraus, 1997). Sie stellt einen evolutionär konservierten Ablauf dar, der das Überleben sichert, indem er die Vermeidung von oder die Flucht vor Beutefängern oder bedrohlichen Situationen auslöst (Öhman und Mineka, 2001). Angst wird in echten oder scheinbar bedrohlichen Situationen empfunden und ist von einer vegetativen Symptomatik begleitet.

Auch hier gelten die unter Schmerz erläuterten Prinzipien, dass wir die wahre Angst eines Tieres nicht erfassen können, nur die Angstreaktionen und Angstäußerungen, jedoch mittels Analogieschluss durchaus vom Mensch auf das Tier extrapolieren können.

- **Leiden**

Leiden ist ein Zustand, der aus Schmerzen und/oder Distress resultieren kann, wenn diese eine genügend lange Dauer und/oder genügend hohe Intensität aufweisen. Ein Tier leidet, wenn es Schmerzen oder Stress nicht mehr ertragen kann (FELASA, 1994). Wenn ein Tier leidet, ist es nicht mehr fähig, seine Situation zu bewältigen und es erfährt unerwünschtes Erleben (Pollmann und Tschanz, 2006).

- **Schäden**

Man spricht von Schäden, wenn der körperliche oder seelische Zustand eines Tieres vorübergehend oder dauerhaft zum Schlechteren hin verändert wird (Hirt et al., 2003). Als Beispiele können Abmagerung, Verletzung, Störung des Verhaltens und Gesundheitsschäden genannt werden. Schmerzen und Leiden können damit einhergehen, sind aber keine Voraussetzung für Schäden (Hackbarth und Lückert, 2002).

1.1.3 **Bewusstsein, Narkose, Tod**

1.1.3.1 **Bewusstsein, Bewusstseinsverlust**

In dieser Arbeit wird unter Bewusstsein ein gradueller Zustand der Wachheit verstanden, in dem ein Organismus zur Wahrnehmung (Sinnesreiz, Emotion), Intentionalität und Handlung fähig ist. Dieser Bewusstseinszustand kann fließend durch eine Allgemeinanästhesie in einen Narkosezustand mit Bewusstseinsverlust übergehen.

Beim Menschen kann der Bewusstseinsverlust als Ausbleiben einer Antwort auf einen sinnvollen verbalen Befehl gemessen werden. Diese fehlende Reaktion korreliert sehr gut mit dem Verlust des Stellreflexes (loss of righting reflex = LORR) bei Tieren (Franks, 2008). Der LORR wird deshalb als Zeichen des Bewusstseinsverlusts bei Studien zur Inhalationsanästhesie an Ratten und Mäusen verwendet (Imas et al., 2004; Imas et al., 2005). Beim LORR kann das Tier sich nicht mehr selbsttätig aus einer Seiten- oder

Rückenlage in die aufrechte Position bringen.

1.1.3.2 Narkose, Allgemeinanästhesie und Anästhesietiefe

Narkose ist ein Zustand, der durch Bewusstlosigkeit und eine Aufhebung aller muskulärer Bewegungen, eine Muskelrelaxation, eine langsame flache Atmung und eine fehlende Reflexaktivität gekennzeichnet ist (Buxton, 1911).

Als Ziel der Allgemeinanästhesie kann die Narkose gelten. Die Allgemeinanästhesie des Menschen ist ein medikamentös induzierter Bewusstseinsverlust, in dem der Patient keine gezielten Reaktionen zeigt, auch nicht bei schmerzhaften Reizen (Gross et al., 2002). Ein ideales Narkotikum soll im Rahmen einer Allgemeinanästhesie Amnesie, Anxiolyse, Muskelrelaxation, Immobilität, kardiovaskuläre und respiratorische Stabilität, Unterdrückung von Reaktionen auf noxische Reize und Bewusstlosigkeit erzeugen (Urban und Bleckwenn, 2002). Weiterhin sollen beim Einsatz eines idealen Narkotikums Erbrechen, Zittern, Exzitationen und Krampfanfälle nicht auftreten (Urban und Bleckwenn, 2002). Hinsichtlich der Analgesie gehen die Meinungen verschiedener Autoren auseinander. Für einige ist die Schmerzempfindungslosigkeit bei Verlust des Bewusstseins erreicht (Antognini und Carstens, 2002), für andere bei der Unterdrückung von Reflexen auf chirurgische Reize/Schmerzreize (Hug, 1990) ohne Gabe von Muskelrelaxantien. Ein Allgemeinanästhetikum erzeugt Bewusstlosigkeit und außerdem in unterschiedlichem Grad eine Unterdrückung der Schmerzwahrnehmung (Flecknell, 2009a).

Guedel (1951) beobachtete Ethernarkosen am Menschen und stellte ein Schema der Anästhesiestadien auf (s. Tab. 1.1). Mit zunehmender Etherkonzentration im Blutplasma werden die einzelnen Stadien der Reihe nach durchlaufen (Urban und Bleckwenn, 2002). Nimmt die Narkosemittelkonzentration bei abklingender Narkose ab, findet der umgekehrte Vorgang statt. Die Zuordnung zu einem Stadium orientiert sich am Erregungs- bzw. Dämpfungszustand des zentralen Nervensystems. Dieses Schema trifft in dieser Form nur auf Inhalationsnarkosen mit einer Substanz zu. Der Anästhesieverlauf stellt ein Kontinuum dar, es können keine festen „Haltestellen“ ausgemacht werden (Buxton, 1911; Gross et al., 2002).

In vorliegender Arbeit werden unter dem Begriff der Narkosegase die hier verwendeten Substanzen Kohlendioxid (CO₂), Isofluran und Sevofluran verstanden. Mit Inhalationsanästhetika sind hier nur die Substanzen Isofluran und Sevofluran gemeint.

Tab. 1.1 Anästhesiestadien

Stadien modifiziert nach Guedel (1951), Merkmale nach Rang und Mitarbeiter (2003)

*Guedel (1927) beschreibt die Bewusstlosigkeit innerhalb der Exzitationsphase, Rang und Mitarbeiter (2003) ordnen sie der ersten Stufe des Toleranzstadiums zu. Die Übergänge der einzelnen Phasen sind fließend.

Anästhesiestadium		Merkmale	
I	Analgesie	Psychische Dämpfung, verminderte Reaktion auf Schmerzreize abhängig vom verwendeten Narkotikum	
II	Exzitation	Tiefe Sedation, Exzitationen (unkoordinierte Reaktionen, die z. B. bis zu Konvulsionen, Opisthotonus und ungerichteten Fluchtreaktionen reichen können), Bewusstlosigkeit*	
III	Toleranz	Stufe 1: Hypnose	Bewusstlosigkeit*, Muskelentspannung, keine Reaktion auf Umweltreize, auf schmerzhaft Reize wird reflexartig geantwortet
		Stufe 2: Chirurgische Toleranz	Keine Reaktion auf Schmerzreize, regelmäßige Atmung, mit zunehmender Narkosetiefe wird die Atmung flacher
		Stufe 3: Depression	Massive Atem- und Kreislaufdepression
IV	Asphyxie	Atemstillstand, kein fühlbarer Puls, Bradykardie und Arrhythmie, führt bei Herzstillstand zum Tod	

Die Bestimmung der Anästhesietiefe stellt bis heute ein noch nicht zufriedenstellend gelöstes Problem dar. Beim Menschen kommen während einer Allgemeinnarkose in der Regel aufwändige Überwachungsapparaturen zum Einsatz, die z. B. die Gehirnströme und klinische Parameter der Herz-Kreislauf- und Atmungsfunktionen messen. Die Werte müssen kontinuierlich überprüft und interpretiert werden. Eine Weiterentwicklung stellt die Einführung eines Narkoseindex, wie z. B. Narcotrend Index oder Bispectral Index, dar, dessen fortlaufende computergestützte Berechnung jedoch ebenfalls die Messungen der Gehirnströme zur Grundlage hat (Schultz et al., 2008). Das Analgesiamonitoring während eines operativen Eingriffs kann mittels elektromyografischer Aufzeichnung des RIII-Reflexes, der die zweite Komponente des nozizeptiven Flexorreflexes darstellt und der nur durch intensive Stimulation ausgelöst wird, durchgeführt werden. Beim Schwein korreliert dieser Reflex sehr gut mit dem Zwischenklauenreflex (Rintisch, 2010). Als probate und ohne apparativen Aufwand durchzuführende Methode bewährt sich in der Tiermedizin noch immer die Testung bestimmter Reflexe, die in fester Reihenfolge mit zunehmender Narkose erlöschen. Die nachstehende Tab. 1.2 gibt eine kleine Auswahl wieder.

Tab. 1.2 Reflexe zur Bestimmung der Anästhesietiefe
modifiziert nach Westhues und Fritsch (1961)

Reflex	Beschreibung	Anästhesiestadium und Phase des Reflexausfalls	Bemerkung
Pharynx- und Larynxreflexe	Würgen, Erbrechen, Schlucken, Husten bei Berührung der Pharynx- bzw. Larynxschleimhaut	Stadium III, Ende Stufe 1	
Lidreflex	Lidschluss bei Betupfen der Wimpern oder des Lidrandes	Stadium III, Ende Stufe 1	Nicht verlässlich bei Barbituratnarkosen
Kornealreflex	Lidschluss bei Betupfen der Kornea	Stadium III, Ende Stufe 2	
Zwischenzehen/-klauenreflex	Zurückziehen der Extremität bei kräftigem Kneifen der Zwischenzehen/-klauenhaut	Stadium III, Stufe 2-3	Beugereflex auf Rückenmarkebene
Pupillarreflex	Pupillenverengung bei Lichteinfall ins Auge	Stadium IV	wird schon im Stadium III schwächer

1.1.3.3 Tod, Euthanasie

Der Tod bedeutet den irreversiblen Verlust des Bewusstseins kombiniert mit dem Verlust der Fähigkeit zu atmen. Tod ist die Folge des irreversiblen Ausfalls dieser Funktionen im Gehirn (Gardiner et al., 2012).

Euthanasie setzt sich aus den griechischen Wortstämmen *eu* mit der Bedeutung „gut“ und *thanatos* als der „Gott des Todes“ zusammen. In der vorliegenden Arbeit wird unter Euthanasie das Herbeiführen des Todes bei einem Tier verstanden. Es liegt in der Verantwortung des Menschen, die Tötung mit dem höchsten Maß an Respekt und so tierschutzgerecht wie möglich durchzuführen.

1.2 Tierschutzgerechtes Töten von Labormäusen

1.2.1 Gründe für eine Tötung

Laut aktueller Statistik des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz wurden im Jahr 2011 in Deutschland über 2,4 Millionen Labornager für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet (BMELV, 2012). Labormäuse stehen mit über 2 Millionen zahlenmäßig an der Spitze. Trotz erfolgreicher Bemühungen, Tierversuche einzuschränken oder durch tierfreie Alternativen zu ersetzen, steigt die verwendete Anzahl an Mäusen kontinuierlich. Dies ist hauptsächlich auf die Erzeugung und den Einsatz von neuen transgenen Mauslinien in der Forschung sowie auf die Umsetzung der Verordnung (EG) Nr. 2006/1907/EG zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien (REACH), die viele Tierversuche vorschreibt, zurückzuführen. Am Ende des Versuches steht meist die Tötung, entweder für die Gewinnung von Zellen und Geweben für die *in vitro*-Forschung, für die Gewinnung von Blut- und anderen Proben, für die pathologische und weitere Diagnostik oder an humanen Endpunkten (Charbonneau et al., 2010). Diese wissenschaftlichen und ethischen Gründe werden auch in den § 4 und § 9 Abs. 2 Nr. 6 des deutschen Tierschutzgesetzes aufgeführt. Die Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere fordert nach Versuchsende die Tötung, wenn nach Versuchende zu erwarten ist, dass ein Tier mittel- oder schwergradige Schmerzen, Leiden oder Ängste empfinden oder mittelschwere oder schwere dauerhafte Schäden erleiden wird. In entsprechender Weise findet man diese Pflicht, Tiere zu töten, auch im § 9 Abs. 2 Nr. 8 TSchG. Des Weiteren ist es nach §10 des Tierschutzgesetzes für Lehrzwecke legitim, Tiere zu töten. Überdies kann bei der Zucht von Labortieren eine beträchtliche Anzahl an überzähligen Tieren anfallen, besonders, wenn nur Tiere eines Geschlechtes oder Tiere mit spezifischen genetischen Eigenschaften benötigt werden. Obwohl wirtschaftliche Gründe dahinter zu vermuten sind und diese laut § 9 Abs. 2 Nr. 3 TSchG keine vernünftigen Gründe für eine Tötung darstellen, duldet die zuständige Landesbehörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin) momentan das Töten dieser überzähligen Tiere. Sind die Haltungskapazitäten eines Unternehmens erschöpft, ergibt sich daraus grundsätzlich kein vernünftiger Grund zur Tötung (Hirt et al., 2007). Sollen Tiere getötet werden, weil man eine Abgabe nicht für möglich hält, muss man erst alle zumutbaren Bemühungen unternommen haben, zum einen die Tiere verhaltensgerecht unterzubringen und zum anderen ein zukünftiges Entstehen überzähliger, nicht weitervermittelbarer Versuchstiere auszuschließen (Hirt et al., 2007). Ein Teil dieser überzähligen Tiere wird jedoch auch als Futtertiere getötet.

1 Literatur

1.2.2 Definitionen und Kriterien einer tierschutzgerechten Tötung

Von Mickwitz (1976) definiert tierschutzgerechtes Töten folgendermaßen:

„Eine tierschutzgerechte Tötung muß zu einer synchron mit dem schmerzlosen Erlöschen des Bewußtseins einsetzenden oder unmittelbar folgenden totalen, irreversiblen Aufhebung der Lebensfunktion eines Tieres führen.“

In der englischsprachigen Literatur wird oft der Begriff „humane euthanasia“ als tierschutzgerechtes Töten verwendet. Der Canadian Council on Animal Care definiert tierschutzgerechte Euthanasiemethoden als solche, die Schmerz und Stress minimieren und die zuverlässig, reproduzierbar, irreversibel, einfach, sicher und schnell sind (Charbonneau et al., 2010).

In Tab. 1.3 sind die Punkte zusammengefasst, die bei der Beurteilung einer Tötungsmethode beachtet werden sollten. Sie umfassen Faktoren, die sowohl das Tierbefinden direkt betreffen, als auch solche, die sich indirekt auf das Tierwohlergehen auswirken. Nicht zu vernachlässigen sind Faktoren, die den die Tötung Durchführenden betreffen. Auch der Tierversuch selbst muss Beachtung finden. Die ideale Tötungsmethode, die allen geforderten Kriterien gerecht wird, gibt es bisher nicht.

Tab. 1.3 Kriterien einer tierschutzgerechten Tötung

nach Erläuterungen der American Veterinary Medical Association (AVMA, 2007)

Bereich	Kriterien
Tier	<ul style="list-style-type: none">• Erzeugung der Bewusstlosigkeit und des Todes so schmerz-, stress-, angst- und furchtlos wie möglich• Dauer bis Eintreten der Bewusstlosigkeit• Zuverlässigkeit• Irreversibilität• Kompatibilität mit der Tierart, dem Alter und Gesundheitszustand
Durchführende/r	<ul style="list-style-type: none">• Sicherheit und Arbeitsschutz• Verfügbarkeit der Substanz und Potential zum Substanzmissbrauch• Emotionale Effekte auf Durchführende und Zuschauer• Leicht zu wartende Ausrüstung• Relation zwischen erforderlicher Ausrüstung und Zweck
Tierversuch	<ul style="list-style-type: none">• Kompatibilität mit nachfolgender Auswertung, Untersuchung oder Verwendung der Gewebeprobe
Sonstiges	<ul style="list-style-type: none">• Sicherheit für Beutefänger und Aasfresser bei Verfütterung der Karkasse

Von Mickwitz (1976) wirft ergänzend folgende Fragen auf:

- Ist eine vollkommenerere technische Lösung möglich?
- Wie ist die wirtschaftliche Durchführbarkeit der Methode?
- Besteht die Möglichkeit der Verschleppung von Tierseuchen?
- Wird die Umwelt durch eine Tötungsmethode beeinträchtigt?

Des Weiteren sollte die Tötung in einem vom Tierhaltungsraum getrennten Raum stattfinden (CCAC, 1993).

1.2.3 Derzeitige Tötungspraxis

Die nachfolgend vorgestellten Methoden werden in der Tierversuchsrichtlinie 2010/63/EU als angemessene und anzuwendende Tötungsmethoden für Nagetiere aufgelistet. Sie stellen in der EU den Standard dar. Die Erläuterungen zu den einzelnen Punkten sind dem Dokument EFSA-Q-2004-105 „Gutachten des Wissenschaftlichen Gremiums für Tiergesundheit und Tierschutz auf Ersuchen der Kommission zur Biologie und zum Wohlergehen von Tieren, die für Versuchszwecke und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden“ der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority) entnommen.

Beim Einsatz von zur Inhalation geeigneten Substanzen können mehrere Tiere gleichzeitig, vorzugsweise in ihrem Heimatkäfig, und ohne Fixierung euthanasiert werden. Alle anderen Methoden erfordern eine Einzeltierbehandlung. Der Durchführende muss geübt und sicher in der Handhabung sein, um eine korrekte und tierschutzkonforme Tötung zu gewährleisten.

1.2.3.1 Tötung mit CO₂

Die Tötung mit CO₂ ist die wohl am weitesten verbreitete Tötungsmethode bei Labormäusen. Grundsätzlich werden zwei Arten der CO₂-Verabreichung unterschieden (s. a. Tab.1.4):

- *Einleitungsmethode:*

CO₂ (häufig 100%, aber auch Zusatz von Sauerstoff möglich) wird mit einer definierten Füllungsrate (zwischen 10% und 125% des Kammervolumens pro Minute) direkt in die Kammer, in der sich das Tier befindet, eingeleitet. Auch ist ein stufenweiser Anstieg der CO₂-Konzentration, z. B. von 20 auf 40 auf 60 auf 90%, möglich.

- *Vorflutungsmethode:*

Die Kammer wird mit einer letalen CO₂-Konzentration (zwischen 30% und 100%) vorgefüllt und anschließend das Tier hineingesetzt.

CO₂ führt eine Narkose herbei, die bei großer Tiefe im Asphyxiestadium durch Atem- und Kreislaufdepression zum Tod führt. Die narkotische Wirkung beruht nicht auf Erzeugung einer Hypoxie (Erhardt et al., 1989).

1.2.3.2 Tötung mit einer Überdosis von Inhalationsanästhetika

Auch hier bewirkt eine weitergeführte tiefe Narkose den Tod. Inhalationsanästhetika (z. B. Isofluran) werden häufig ähnlich der „Äthertopfmethod“ angewandt, d. h. das flüssige Anästhetikum wird auf einen Wattebausch in der Tötungskammer getropft und das Tier nach einiger Zeit dazugesetzt. Bei dieser Methode entstehen sehr hohe Konzentrationen durch

Spontanverdampfung (bei Isofluran bis 30% und bei Sevofluran bis 40%). Mit der Verwendung von geeigneten Präzisionsverdampfern können niedrige, aber wirksame Konzentrationen eingestellt werden (bei Isofluran bis 5% und bei Sevofluran bis 8%). Es kann Sauerstoff oder Luft als Trägergas eingesetzt werden. Diese Bedingungen sind standardisierbar.

1.2.3.3 Weitere Tötungsmethoden

- **Stumpfes Schädeltrauma**

Durch einen gezielten Betäubungsschlag mit einem stumpfen Gegenstand auf den Schädel oder auch durch Aufschlag des Schädels auf die Tischkante wird Bewusstlosigkeit durch massive Störung des zentralen Nervensystems (ZNS) hervorgerufen.

- **Zervikale Dislokation**

Mithilfe des Daumens und Zeigefingers oder eines stumpfen Gegenstandes (z. B. Stift) wird die Schädelbasis des Tieres von oben und beidseits des Halses fixiert. Durch einen kurzen, kräftigen Zug an den Hinterbeinen oder der Schwanzbasis werden die (Hals-)Wirbel voneinander getrennt und es tritt eine massive ZNS-Störung durch einen neurogenen Schock ein.

- **Dekapitation**

Das fixierte Tier wird mit einer scharfen Guillotine oder, bei zu früh geborenen und neonatalen Tieren, mit einer scharfen Schere enthauptet.

- **Überdosis von Injektionsnarkotika, z. B. Barbiturate**

Das Medikament kann gemäß Beipackzettel intravenös, intraperitoneal oder nach vorheriger Sedation intrakardial injiziert werden.

- **Inertgase, z. B. Argon**

Das Tier wird in eine Kammer gesetzt, die mindestens 98% Argon enthält. Dadurch werden Bewusstlosigkeit und Tod durch Hypoxie bewirkt.

Gemäß der Tierversuchsrichtlinie 2010/63/EU gilt die Tötung erst als abgeschlossen, wenn eine der folgenden Methoden durchgeführt wurde: Bestätigung des endgültigen Kreislaufstillstandes, Zerstörung des Gehirns, Genickbruch, Entbluten oder Bestätigung des Eintretens der Totenstarre.

Im Weiteren soll nur noch auf die Tötungsmethoden mit CO₂ und Inhalationsanästhetika eingegangen werden.

1.2.4 Regelungen zum Tierschutz

Über die Tierschutzgerechtigkeit der einzelnen Tötungsmethoden herrscht Uneinigkeit. Der Gesetzgeber, nationale und internationale Tierschutz- und Tierversuchsorganisationen geben zur Tötung mit CO₂ widersprüchliche Angaben, besonders darüber, was als angemessene Verabreichung gelten soll. Obwohl es noch nicht ausreichend untersucht worden ist, geht man allgemein davon aus, dass die Überdosierung volatiler Anästhetika ein minimales Maß an Belastung bei Nagern verursacht.

1.2.4.1 Regelungen in Deutschland

Gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz darf ein Wirbeltier nur von einer Person getötet werden, die die dazu notwendigen Kenntnisse und Fähigkeiten besitzt (§ 4 Abs.1 TSchG).

Wer ein Wirbeltier ohne vernünftigen Grund tötet, handelt strafbar (§ 17 TSchG). Wie im obigen Unterkapitel 1.2.1 erläutert, ist die Tötung von Labornagern legitimiert und in vielen Fällen gesetzlich gefordert. § 4 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes legt fest, dass ein Wirbeltier nur unter Betäubung oder sonst, soweit nach den gegebenen Umständen zumutbar, nur unter Vermeidung von Schmerzen getötet werden darf. Inwiefern die Betäubung selbst schmerzarm oder -frei sein sollte, wird nicht näher erläutert. Jedoch gilt nach § 9 Abs. 1 Nr. 3 TSchG, dass Schmerzen, Leiden oder Schäden den Tieren nur in dem Maße zugefügt werden dürfen, als es für den verfolgten Zweck unerlässlich ist; insbesondere dürfen sie nicht aus Gründen der Arbeits-, Zeit- oder Kostenersparnis zugefügt werden. Dieser Paragraph regelt weiterhin, dass nach Abschluss eines Tierversuchs jede verwendete und überlebende Ratte oder Maus unverzüglich schmerzlos zu töten ist, wenn dies nach dem Urteil der Person, die den Tierversuch durchgeführt hat, erforderlich ist, d. h. wenn das Tier nur unter Schmerzen oder Leiden weiterleben kann (§ 9 Abs. 2 Nr. 8 TSchG).

Die EU-Tierversuchsrichtlinie 2010/63/EU, die bis zum 10. November 2012 in nationale Rechts- und Verwaltungsvorschriften umgesetzt werden muss, fordert im Artikel 6, dass Tiere unter geringstmöglichen Schmerzen, Leiden und Ängsten von einer sachkundigen Person mit angemessenen Tötungsmethoden getötet werden. Im Anhang IV dieser Richtlinie werden die Methoden zur Tötung erläutert. Für Nagetiere werden unter anderem die Überdosis eines Betäubungsmittels (gegebenenfalls in Verbindung mit einer vorherigen Sedierung) und die schrittweise Befüllung eines Behältnisses mit CO₂ als angemessene Tötungsmethode angegeben. Föten und Neugeborene von Nagetieren dürfen nicht mit CO₂ getötet werden.

1.2.4.2 Vergleich internationaler Leitlinien und Empfehlungen zur Tötung von Labornagern

Der Working Party Bericht der Europäischen Kommission empfiehlt, die Tiere in eine mit mindestens 70% CO₂ vorgefüllte Kammer zu setzen (Close et al., 1996, 1997). Auch empfehlen die Autoren, Inhalationsanästhetika in Überdosis einzusetzen (Close et al., 1996, 1997). Darauf basiert unter anderem auch der Bericht der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) des Animal Health and Welfare (AHAW) Panel „Gutachten des Wissenschaftlichen Gremiums für Tiergesundheit und Tierschutz auf Ersuchen der Kommission zur Biologie und zum Wohlergehen von Tieren, die für Versuchszwecke und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden“ aus dem Jahr 2005. Die CO₂-Konzentration soll der Spezies angepasst sein (EFSA, 2005). Die EFSA (2005) empfiehlt CO₂, wenn das Tier schon bewusstlos ist. Es soll jedoch nicht zur alleinigen Tötung verwendet werden, da das Risiko, das Tierschutzgesetz dabei zu verletzen, als zu hoch eingeschätzt wird (EFSA, 2005).

Nach den Richtlinien über das fachgerechte und tierschutzkonforme Töten von Versuchstieren des Bundesamts für Veterinärwesen der Schweiz (1993) können Versuchstiere in einer vorgefüllten Kammer mit mindestens 80% CO₂ oder in einer Kammer mit steigender CO₂-Konzentration getötet werden. Diese Richtlinien sind zurzeit unter Bearbeitung.

Das Animal Procedure Committee in Großbritannien (APC) spricht sich in seinem Bericht für das Jahr 2006 unter „Report on schedule 1 - Appropriate methods of humane killing“ für niedrige Einfüllraten aus, da CO₂-Konzentrationen von über 50% in der Einatemluft wahrscheinlich Schmerzen erzeugen (UK Home Office, 2006). Inhalationsanästhetika, z. B. Isofluran, werden zwar als aversiv eingeschätzt, jedoch weniger als CO₂ (UK Home Office, 2006). Die Autoren weisen zudem darauf hin, dass nur mit CO₂ getötete Tiere noch verfüttert werden können und dass es Speziesunterschiede gibt: Mäuse werden wohl aufgrund einer höheren Stoffwechselrate schneller bewusstlos (UK Home Office, 2006).

Auf dem New Castle Consensus Meeting on Carbon Dioxide Euthanasia of Laboratory Animals kommt man zu dem Schluss, dass es keinen idealen Weg gibt, Tiere mit CO₂ zu töten, da die Tötung mit 100% CO₂ mit einer Einfüllrate von 20% des Kammervolumens pro Minute mit Anzeichen von Dyspnoe einhergeht (Hawkins et al., 2006). Als Alternative werden Inhalationsanästhetika vorgeschlagen (Hawkins et al., 2006). Diesen Empfehlungen schließt sich das Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching (ANZCCART) an (Dandie, 2006).

Die Leitlinien des American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) (Arthwohl et al., 2006) schlagen dagegen vor, 100% CO₂ mit einer Einfüllrate von 20% des Kammervolumens pro Minute zu benutzen und stützen sich dabei auf eine einzige Untersuchung von Hornett

und Haynes (1984).

Die American Veterinary Medical Association (AVMA) empfiehlt für Nager, CO₂ mit einer Einfüllrate von mindestens 20% des Kammervolumens pro Minute zur tierschutzgerechten Tötung zu verwenden (AVMA, 2007).

Das Canadian Council on Animal Care (CCAC) listet CO₂ als bedingt akzeptable Tötungsmethode. Es sollte nicht eingesetzt werden, wenn andere Methoden für das Experiment und die Spezies praktikabel sind. Falls CO₂ bei nicht-narkotisierten Nagern eingesetzt wird, sollte eine schrittweise Füllung zwischen 20 und 30% des Kammervolumens pro Minute erfolgen. Die Anwendung von Inhalationsanästhetika gilt als akzeptabel. Es ist darauf zu achten, dass die Narkose zügig und kontrolliert mit Hilfe von kalibrierten Verdampfern eingeleitet wird. Da hierbei die Dauer bis zum Todeseintritt lang sein kann, sollte eine zweite Methode zur Tötung angeschlossen werden, sobald das Tier durch die Narkose bewusstlos geworden ist (Charbonneau et al., 2010).

Generell ist CO₂ nicht zur Tötung von Föten und Neugeborenen (bis zum Alter von 10 Tagen) geeignet, da sie eine weitaus höhere Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel aufgrund des fetalen Hämoglobins und eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber CO₂ aufweisen (Close et al., 1997; Charbonneau et al., 2010).

1.3 Anästhesie- und Euthanasiestudien mit CO₂

Die Bewertung der Tierschutzgerechtigkeit nach Anästhesie- und Euthanasieuntersuchungen mit CO₂ an Labor- und Nutztieren fällt ebenfalls sehr unterschiedlich aus. In ihrer Übersichtsarbeit geben Conlee und Mitarbeiter (2005) einen Überblick über die aversiven Wirkungen von CO₂, diskutieren eine schrittweise gefüllte Kammer versus einer vorgefüllten Kammer sowie den Zusatz von Sauerstoff, Maximalkonzentrationen und Expositionszeiten. Die Autoren finden Hinweise, dass der Einsatz von CO₂ mit Schmerzen und Distress verbunden ist und neu überdacht werden soll. So lehnen auch einige Autoren CO₂ zur Tötung in jedem Fall ab, andere nur unter bestimmten Bedingungen, andere sehen es als geeignet (s. Tab. 1.4). Es muss allerdings bedacht werden, dass in den Studien meist einzelne Parameter, die nur Teilaspekte der Belastung widerspiegeln, wie Verhaltensbeobachtung, Kreislauf- und Atemfunktionen, Gehirnaktivität, Stresshormone und hämatologische und serologische Blutwerte, die Histologie der Lunge, zur Bewertung herangezogen wurden (s. Tab. 1.4). Nicht immer stand die Frage der Tierschutzgerechtigkeit im Mittelpunkt der Studien. Problematisch ist hierbei auch, dass sich die Untersuchungs- und Messzeitpunkte in den einzelnen Studien unterscheiden. Oftmals wurden Messungen erst zum Zeitpunkt des Todes bzw. nach Eintritt des Todes durchgeführt (s. Tab. 1.4). Für die Beurteilung der Tierschutzgerechtigkeit ist jedoch nur die Zeit von Beginn der Narkoseeinleitung bis zum Eintritt einer tiefen Narkose, wie sie im chirurgischen Toleranzstadium (keine Reaktion auf Schmerzreize) erreicht wird,

1 Literatur

entscheidend. Für die akute Stressbewertung ist das oftmals bestimmte Stresshormon Corticosteron nicht geeignet, da sein Maximalwert erst ca. 30 min nach Stressexposition erreicht ist (Jones und Stockham, 1966), die Messung aber spätestens nach Todeseintritt stattfand, d. h. maximal 10 min nach Exposition (z. B. Corbach, 2006). Weiterhin erfolgte die Verhaltensbeobachtung oft nicht differenziert genug oder nicht anhand eines bestehenden Verhaltenskataloges. Die Interpretierbarkeit des Verhaltens hinsichtlich der Tierschutzgerechtigkeit wird dadurch erschwert und ist stark von der persönlichen Einschätzung des Beobachters abhängig. Eine Zusammenfassung dazu gibt folgende Tab. 1.4.

Tab. 1.4 Übersicht zu Anästhesie- und Euthanasiestudien mit CO₂

Autor	Tierart	Anästhesie-/ Euthanasie- methode	Verhaltens- beurteilung	Physiolog. Parameter	Blutparameter	Bewertung der CO ₂ - Verwendung durch die Autoren	Bemerkungen
Ambrose et al. (2000)	M	CO ₂ steigend 30 KV%/min 30 KV%/min + O ₂ 60 KV%/min + O ₂	ja	Atmung, Histologie der Lunge		nicht geeignet	60 KV%/min u. Zusatz von O ₂ nicht empfohlen, 30 KV%/min weniger stresshaftes Verhalten Stammesunterschiede!
Cartner et al. (2007)	M	100% CO ₂ 70% CO ₂ + O ₂	nein	EEG, VEP		k. A.	Rascher Verlust der Hirnrinden- aktivität bei 100% CO ₂
Corbach, (2006)	M	CO ₂ steigend 20-84 KV%/min	ja		Corticosteron, ACTH	geeignet	Verhaltenskatalog nach Gärtner und Militzer (1993) u. a. Probleme mit Blutabnahme
McIntyre et al. (2007)	M	CO ₂ steigend 20 KV%/min	ja			geeignet	Subjektive Einschätzung des Stressverhaltens u. der Fluchtversuche
Pritchett et al. (2005)	M	100% CO ₂	nein	Zeit bis Be- wusstlosigkeit u. Todeseintritt		k. A.	Untersuchung an neugeborenen und jungen Mäusen
Pecaut et al. (2000)	M	CO ₂ steigend + O ₂ 100% CO ₂	nein	Körper- u. Organgewicht	Rotes u. weißes Blutbild	k. A.	
Shipp and Woodward (1998)	M	100% CO ₂	nein		Corticosteron	geeignet bei bekannter Routine und Umgebung	
Thomas et al. (2012)	M	CO ₂ steigend 20 KV%/min Isofluran 5%, steigend Beide auch in Kombi. mit N ₂ O	ja	Zeit bis Be- wusstlosigkeit	Laktat, Blut-pH, p _{CO2}	N ₂ O reduziert die Zeit bis Eintritt der Bewusstlosigkeit, CO ₂ -Euthanasie könnte in Kombi damit geeigneter sein	
Traslavina et al. (2010)	M	100% CO ₂ steigend	nein		Kalium, Laktat, Blut-pH, p _{CO2}	nicht geeignet, um korrekte Kaliumwerte zu erhalten	
Valentine et al. (2012)	M	100% CO ₂ steigend, 20 u. 100 KV%/min Isofluran 5%, steigend	ja	Zeit bis Be- wusstlosigkeit u. Todeseintritt, USV, c-fos mRNA im Gehirn	ACTH, Corticosteron	20 KV%/min am besten geeignet, Isofluran zur Narkoseinduktion vor CO ₂ nicht geeignet	Gravierende methodische Mängel!

1 Literatur

Autor	Tierart	Anästhesie-/ Euthanasie- methode	Verhaltens- beurteilung	Physiolog. Parameter	Blutparameter	Bewertung der CO ₂ - Verwendung durch die Autoren	Bemerkungen
Blackshaw et al. (1988)	M, R	97% CO ₂	ja			geeignet für M u. R	
Kohler et al. (1999)	M, R, MS	80% CO ₂	ja			geeignet	Keine definierten Verhaltensparameter
Altholtz et al. (2006)	R	70% CO ₂ + O ₂ Isofluran 5%, dann 2%	nein		Corticosteron	geeignet, aber bei Mehrfachnarkosen besser Isofluran	Bei beiden Narkosen kein aversives Verhalten, Mehrfachnarkosen
Burkholder et al. (2010)	R	CO ₂ steigend 10 KV%/min Argon steigend 50 KV%/min	ja	Herzfrequenz Histologie der Lunge		CO ₂ könnte weniger aversiv als Argon sein	
Coenen et al. (1995)	R	100% CO ₂ CO ₂ steigend + O ₂ rasch u. langsam	ja	EEG Herzfrequenz		geeignet bei Zusatz von O ₂	Keine definierten Verhaltensparameter
Deckardt et al. (2007)	R	100% CO ₂ 80% CO ₂ + O ₂ 60% CO ₂ + O ₂ Isofluran 4,5%	nein		Blutchemie Rotes, weißes Blutbild Blut-pH-Wert	80% CO ₂ + O ₂ geeignet, Isofluran geeignet	
Fenwick and Blackshaw (1989)	R	85% CO ₂ 80% CO ₂ + O ₂ 50% CO ₂ + O ₂	nein	Mortalität bei Anästhesie, Zeit bis Bewusstlosigkeit		50% CO ₂ + O ₂ geeignet zur Kurzanästhesie	Ratten mit subklinischer Atemwegserkrankung
Fitzner Toft et al. (2006)	R	80% CO ₂ Isofluran 3,5%	nein	Herzfrequenz, Blutdruck, Körpertemperatur		Isofluran zur Anästhesie wird vorgezogen	
Fomby et al. (2004)	R	70% CO ₂ steigend + O ₂	nein		Corticosteron	geeignet, wenn im Heimatkäfig durchgeführt	
Forslid et al. (1986)	R	80% CO ₂	nein	EEG, Herzfrequenz, Blutdruck		als Anästhesie für Schlachtschweine geeignet	

Autor	Tierart	Anästhesie-/ Euthanasie- methode	Verhaltens- beurteilung	Physiolog. Parameter	Blutparameter	Bewertung der CO ₂ - Verwendung durch die Autoren	Bemerkungen
Fowler et al. (1980)	R	50% CO ₂ steigend + O ₂ 50 KV%/min	nein		Blutchemie	geeignet im Vergleich zu Ether	Leicht erhöhte Glukosewerte bei CO ₂
Gos et al. (2002)	R	CO ₂ steigend bis 20 KV%/min	nein	Glutamat im Gehirn		hohe CO ₂ -Einfüllraten nicht geeignet	
Hackbarth et al. (2000)	R	CO ₂ steigend ca. 30 KV%/min	ja		Glukose ACTH, Corticosteron	geeignet	Verhaltenskatalog nach Gärtner und Militzer (1993) Corticosteron als Kurzzeit-Stress- parameter nicht geeignet
Hewett et al. (1993)	R	≥ 90% CO ₂ CO ₂ steigend + O ₂ 20 KV%/min	ja		Blutgase	beides geeignet	
Pritchett-Corning (2009)	R	100% CO ₂	nein	Zeit bis Be- wusstlosigkeit u. Todeseintritt		k. A.	Untersuchung an neugeborenen Ratten (0 bis zu 10 Tage alt)
Reed et al. (2009)	R	Vorgefüllt mit CO ₂	nein		ACTH, AVP, Oxytocin	k. A.	Anstieg von AVP und Oxytocin nach 25 s Exposition
Sharp et al. (2006)	R	30% u. 100% CO ₂	nein	Herzfrequenz, Blutdruck		geeignet, um Be- wusstlosigkeit zu erzeugen	Aussagen über die Stresshaftigkeit der Anästhesie bzw. Euthanasie mit dieser Studie nicht möglich
Smith and Harrap (1997)	R	CO ₂ steigend langsame und schnelle Füllung	ja	Herzfrequenz, Blutdruck		geeignet	Nur 4 bzw. 5 Tiere pro Gruppe

1 Literatur

Autor	Tierart	Anästhesie-/ Euthanasie- methode	Verhaltens- beurteilung	Physiolog. Parameter	Blutparameter	Bewertung der CO ₂ - Verwendung durch die Autoren	Bemerkungen
Stutler et al. (2007)	R	CO ₂ steigend schnelle Füllung Enfluran, Halothan, Isofluran, Sevofluran	nein	Spermien- beweglichkeit		k. A.	

Abkürzungen der Tab. 1.4 Übersicht zu Anästhesie- und Euthanasiestudien mit CO₂

M	Maus	KV%/min	Einfüllrate in % des Kammervolumens pro Minute			EEG	Elektroenzephalogramm
R	Ratte	s	Sekunde			USV	Ultraschallvokalisation
MS	Meerschwein	CO ₂ steigend	100% CO ₂ wird mit einer bestimmten Einfüllrate in die Kammer eingeleitet			p _{CO2}	CO ₂ -Partialdruck
CO ₂	Kohlendioxid	ACTH	Adrenocorticotropes Hormon (Stresshormon)			VEP	Visuell evozierte Potentiale
N ₂ O	Stickoxid	AVP	Arginin-Vasopressin (Stresshormon)			k. A.	keine Angabe
O ₂	Sauerstoff	c-fos mRNA	c-fos (Protein) Boten-Ribonukleinsäure (hier: indirekter Stressmarker)				

1.4 Wirkungen von CO₂ und der Inhalationsnarkotika Isofluran und Sevofluran auf den Organismus

Die Belastung der Tiere durch CO₂, Isofluran und Sevofluran wird unterschiedlich eingestuft und stützt sich auch auf Befunde beim Menschen. Dies ist insbesondere der Fall, wenn Schmerzen und Dyspnoe eingeschätzt werden sollen, da Tiere ihre Missempfindung nicht verbalisieren können. Im Folgenden sollen die bisher bekannten Wirkungen der drei genannten Narkosegase erläutert werden. Vorweg gestellt sind jeweils Begriffsdefinitionen bzw. eine kurze Erläuterung der physiologischen Zusammenhänge.

Es sei darauf hingewiesen, dass die Wirkungen zwar getrennt aufgeführt werden, sie jedoch gleichzeitig oder voneinander abhängig auftreten.

1.4.1 Schmerzauslösung über die Wirkung an Schleimhäuten

- **Allgemeines**

Nozizeptoren kodieren noxische Reize und leiten die Informationen über aufsteigende Bahnen an das Gehirn weiter, in dem die Wahrnehmung und emotionelle Verarbeitung des Schmerzes erfolgt. Nozizeptoren finden sich in den Schleimhäuten, die mit den Narkosegasen in Kontakt kommen. Zu nennen sind die Konjunktiven und die Schleimhäute der oberen Luftwege und der Bronchien. Schmerzafferenzen, die Nasen-, Maul- und Rachenraum versorgen, ziehen entlang der Glossopharyngeal- und Trigeminierven (Ruch, 1979). Nozizeptive Afferenzen bilden über Verschaltung mit Interneuronen im Rückenmark mit Motoneuronen polysynaptische Reflexbögen, die für die respiratorischen Reflexe wie Husten verantwortlich sind. Der Kehlkopf und die Luftröhre werden sensibel durch die oberen Laryngealnerven und durch die oberen thorakalen Vagusäste innerviert (Ruch, 1979). Die Inhalation oder Aspiration von Säure (H⁺-Ionen) stimuliert vagale bronchopulmonäre Nerven über ASIC- (acid-sensing ion channel, säureempfindlicher Ionenkanal) und TRPV1- (transient receptor potential, transientes Rezeptorpotential) Kanäle und löst Reaktionen wie Husten und Reflexbronchokonstriktion aus (Gu und Lee, 2010).

- **CO₂-Inhalation**

Für Menschen ist CO₂ ein geruchloses Gas, das ab einer Konzentration von ca. 30% zu einer stechenden Empfindung führt, ab einer mittleren Konzentration von ca. 46% wird es als schmerzhaft wahrgenommen (Anton et al., 1992). CO₂ reagiert auf den Schleimhäuten mit Wasser zu Kohlensäure (H₂CO₃), die als schwache Säure leicht Protonen abgeben kann. Durch die pH-Wert-Änderung werden Nozizeptoren des Trigeminierven aktiviert. Peppel und Anton (1993) schlagen intranasale CO₂-Stimulation als Modell für die Chemonozeption vor. Sie benutzten CO₂ (25-100%) als intranasale Noxe bei Ratten und zeigten, dass der

Reiz über A δ - und/oder C-Fasern zu den Zellen des dorsalen Rückenmarkhorns geleitet wird. In der Schmerzforschung am Menschen wird CO₂ als kurzfristiger Schmerzstimulus angewendet. Die empfundenen Schmerzen sind abhängig von der Dauer und der Konzentration der CO₂-Exposition bzw. der damit einhergehenden pH-Wert-Änderung der Schleimhaut (Hari et al., 1997; Hummel et al., 2003). Freiwillige Personen bewerten das direkte Einatmen von 50% CO₂ gemischt mit Sauerstoff als „sehr unangenehm“ und mit steigender Konzentration bis 100% CO₂ als „schmerzhaft“ (Danneman et al., 1997). Bei kontinuierlicher Verabreichung findet nach 3 min eine starke Abnahme der empfundenen Intensität des Schmerzes bis hin zur Schmerzlosigkeit statt, da eine Desensibilisierung und reflektorische Zunahme der Schleimsekretion eintreten (Hummel et al., 2003).

Es gibt mehrere Berichte, bei denen einzelne oder mehrere Personen unbemerkt bzw. ohne vorherige Warnzeichen durch CO₂-Exposition bewusstlos wurden, z. B. nach unsachgemäßem Umgang mit Trockeneis (Hsieh et al., 2005; Dunford et al., 2009), nach Betreten von Kellerräumen und unbelüfteten Frachträumen, bei denen durch alkoholische Gärung gasförmiges CO₂ entstanden war (Williams, 1958), oder nach Naturkatastrophen, z. B. 1986 nach dem Freisetzen von riesigen CO₂-Mengen aus dem Vulkansee Nyos in Kamerun, West Afrika. Bei letzterem Vorfall berichtete allerdings ein Teil der Überlebenden Kurzatmigkeit und Schwindel (Kling et al., 1987). Bei einem weiteren Teil der Betroffenen, die wieder aus der durch CO₂ verursachten Bewusstlosigkeit erwachten, wurden Husten, Bluthusten, erschwerte Atmung, Augenreizung, Kopfschmerzen und Schwäche festgestellt (Baxter et al., 1989). In Fällen, bei der die Bewusstlosigkeit unbemerkt bzw. ohne Vorwarnung eintrat, lag die CO₂-Konzentration wohl unter der für Menschen wahrnehmbaren Schwelle von ca. 30%. Nager besitzen eine deutlich niedrigere CO₂-Detektionsgrenze (s. a. 1.4.6.2).

- **Inhalation von Isofluran und Sevofluran**

Isofluran hat einen ätherartigen, stechenden Geruch. Es wird beschrieben, dass nach Einatmen von Isofluran die Schleimhäute des Atemtraktes gereizt sind und verstärkte Bronchosekretion, Salivation, Husten und Kehlkopfkrämpfe ausgelöst werden (Cregg et al., 1996).

Sevofluran dagegen wird ein fruchtig milder Geruch zugeschrieben. Es scheint die Schleimhäute des Atemtraktes kaum zu reizen und wird daher in der Humanmedizin bevorzugt bei Kleinkindern und Säuglingen zur direkten Maskeneinleitung der Narkose eingesetzt (Lerman et al., 1994).

Zwei Studien verglichen die unerwünschten Wirkungen von equieffektiven Konzentrationen von Isofluran (2,3%) und Sevofluran (4%) bei freiwilligen Probanden und registrierten das Auftreten von Husten, Beschwerden über Brennen und Irritation der Atemwege und die

Dauer der Einatemtoleranz. In beiden Studien wurde Sevofluran weniger reizend als Isofluran eingestuft (Doi und Ikeda, 1993; TerRiet et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass unter Isofluranexposition TRPV1-Kanäle von nozizeptiven Neuronen empfindlicher auf schädigende Reize wie Hitze, Capsaicin und niedrigen pH-Wert reagieren (Harrison und Nau, 2008).

1.4.2 Wirkung auf die Atmung und den Säuren-Basen-Haushalt sowie narkotische Wirkung

• Allgemeines

Der physiologische Bereich des pH-Wertes der extrazellulären Flüssigkeit liegt zwischen 7,35-7,45. Eine Senkung unter 7,0 (Azidose) oder ein Anstieg über 7,8 (Alkalose) haben schwere Dysfunktionen bis hin zum Tod als Folge. Die Zelle stellt den pH-Wert über Puffersysteme und über Membranproteine, die Protonen oder Bicarbonat aufnehmen oder ausscheiden können, ein. Der Organismus reguliert sehr schnell pH-Schwankungen über Puffersysteme im Blut (z. B. Hämoglobinat/Hämoglobin-, Proteinat/Protein-, Hydrogenphosphat/Dihydrogenphosphat- und Bicarbonat/Kohlensäure (CO₂)-Puffer). Die Nieren und die Leber sind an der langfristigen Regulierung beteiligt. Die Lunge ist zentrales Organ bei der pH-Wert-Einstellung im Plasma, da sie sehr effektiv und sehr rasch CO₂ abgeben kann (Ayers und Dixon, 2012). Zusätzlich bewirkt eine Erhöhung des CO₂-Partialdrucks bzw. eine Senkung des pH-Wertes im Blut eine erhöhte Ansprechbarkeit der Chemorezeptoren im Glomus caroticum und Glomus aorticum auf Hypoxie (Duffin, 2010) und eine Stimulation der Chemorezeptoren in der Medulla oblongata, was zur Aktivierung des Atemzentrums führt (Ayers und Dixon, 2012).

Steigt die CO₂-Konzentration in der Einatemluft, so führt dies zu einer Zunahme des Atemzeitvolumens, hauptsächlich durch eine Steigerung des Atemzugvolumens. Eine Erhöhung des arteriellen CO₂-Partialdrucks um 2 mmHg steigert die Atmung auf das Doppelte (Nattie, 1999). Bei einer weiteren Erhöhung des CO₂-Partialdrucks nimmt die Ventilation aufgrund der narkotischen Wirkung des CO₂ wieder ab (Hill und Flack, 1908; Ikeda et al., 1989).

• CO₂-Inhalation

Bei Einatmung bewirkt CO₂ über die Entstehung von Kohlensäure (H₂CO₃) eine respiratorische Azidose mit Senkung des arteriellen pH-Wertes auf unter 7, bei Crl:WI (Glx/BRL/HAN) BR-Ratten auf pH 6,79 (Deckardt et al., 2007), bei ICR- oder MF1-Mäusen auf pH 6,74 (Angus et al., 2007) und bei C57Bl/6-Mäusen auf pH 6,9 (Traslavina et al., 2010). Ein Anstieg des arteriellen CO₂-Partialdrucks (p_{CO₂}) bzw. eine Senkung des arteriellen Blut-pH-Wertes erhöht die Ansprechbarkeit peripherer Chemorezeptoren auf Hypoxie (Duffin, 2010) und reizt zentrale Chemosensoren (Nattie, 1999; Feldman et al., 2003; Dohle

1 Literatur

und Richerson, 2010) (s. a. 1.4.4 und 1.4.6.1). Dies bewirkt eine Stimulation der Atmung (Dohle und Richerson, 2010), was in diesem Fall jedoch nicht zum Abatmen des überschüssigen CO₂ und Normalisierung des Säuren-Basen-Gleichgewichts führt, sondern einen *circulus vitiosus* (CO₂-Inspiration → erhöhter p_{CO₂} → Stimulation des Atemzentrums → vermehrte CO₂-Inspiration) in Gang setzt. Die weiteren Puffersysteme versagen, das Blutpuffersystem kann den pH-Wert zwar innerhalb von Sekunden kontrollieren, ist jedoch rasch erschöpft, die renale Kompensation kann 3-5 Tage benötigen (Ayers und Dixon, 2012). Ein weiterer Anstieg des CO₂-Partialdruckes wirkt aufgrund der narkotischen Wirkung des CO₂ atemlähmend (Hill und Flack, 1908; Ikeda et al., 1989). Hewett und Mitarbeiter (1993) zeigten an Ratten die Abhängigkeit der Narkosetiefe von einem fallenden pH-Wert und von einem zunehmenden CO₂-Partialdruck im Blut während der Narkoseeinleitung mit 100% CO₂ mit einer Einfüllrate von 20% des Kammervolumens pro Minute. Auch bei Schweinen führte eine 60-sekündige Inhalation von 90% CO₂ zu einer sehr schnellen (nach 15 s) Absenkung des arteriellen pH-Wertes bzw. Erhöhung des arteriellen CO₂-Partialdrucks und zu einer schnellen Absenkung (nach 30 s) des intrazellulären pH-Wertes im Gehirn (Martoft et al., 2003).

Da CO₂ die Bluthirnschranke leicht überwinden kann, bedingt es auch eine Absenkung des pH-Wertes des Liquors cerebrospinalis. Der Gehirnmotabolismus und die Volumenregulation in den Zellen des Gehirns sind durch eine schwergradige Azidose eingeschränkt, und es resultiert eine fortschreitende Benommenheit bis hin zum Koma (Adroque und Madias, 1998). Es wird angenommen, dass die narkotischen Eigenschaften von CO₂ primär darauf beruhen, den extrazellulären und den intrazellulären pH-Wert der Neurone und Gliazellen zu senken. Möglicherweise wird dadurch die Membranpermeabilität für Na⁺ erniedrigt, wodurch eine Hyperpolarisation der Nervenzelle erfolgt und so die Erregungsbildung und Erregungsweiterleitung von Reizen vermindert wird (Krnjevic et al., 1965). Dulla und Mitarbeiter (2005) erklären Änderungen der neuronalen Funktion mit einer pH-abhängigen Modulation der Adenosin- und ATP-Konzentrationen. CO₂ ist in der Lage, über die Senkung des pH-Wertes der Cerebrospinalflüssigkeit wie ein Antagonist die Funktion des NMDA-Rezeptors zu beeinflussen, was auch zum Teil die narkotischen Eigenschaften erklären könnte (Brosnan und Pham, 2008). In Abhängigkeit von der eingeatmeten CO₂-Konzentration können drei kortikale Erregbarkeitszustände, gemessen an der Höhe der Schwelle zur Auslösung von Elektrokonvulsionen (Woodbury und Karler, 1960), festgestellt werden:

- Bis 12,5% CO₂ (Maus) bzw. 15% CO₂ (Ratte): zunächst verringerte kortikale Erregbarkeit
- Über 15% CO₂: erhöhte Erregbarkeit bis hin zu spontanen Krampfanfällen
- Über 35% CO₂: ausgeprägte kortikale und subkortikale Depression bis hin zur Narkose.

Die Exposition mit 80% CO₂ führte bei Ratten zu einem verlangsamten EEG und induzierte schnell eine Unterbrechung der afferenten sensorischen Weiterleitung von Nervenimpulsen zum Cortex (Forslid et al., 1986). Ratten verlieren das Bewusstsein bei CO₂-Konzentrationen von ca. 30%, die durch Kammereinfüllraten von ungefähr 20 KV%/min erreicht wurden (Smith und Harrap, 1997; Niel und Weary, 2006). In einer anderen Studie werden Ratten schon bei Konzentrationen von ca. 21% CO₂ mit einer Einfüllrate von 10 KV%/min bewusstlos (Burkholder et al., 2010).

- **Inhalation von Isofluran und Sevofluran**

Isofluran und Sevofluran wirken beide dosisabhängig atemdepressiv. Die Atemfrequenz und das Atemzugvolumen sinken (Fourcade et al., 1971; Doi und Ikeda, 1987). Bei Ratten führen Isoflurankonzentrationen von 2,5 – 4% in der Einatemluft zum Atemstillstand und Konzentrationen darüber zum Herzstillstand (Wolfson et al., 1978). Isofluran und Sevofluran bewirken über die Atemdepression mit zunehmender Narkosedauer einen leichten Abfall des pH-Wertes (Angus et al., 2007; Sjoblom und Nylander, 2007; Cesarovic et al., 2010). So wurde z. B. bei Mäusen nach einer 120-minütigen Isoflurannarkose ein pH-Wert von 7,15 festgestellt (Sjoblom und Nylander, 2007), nach 10 min Isofluranexposition wurde ein pH-Wert von ca. 7,25 ermittelt (Cesarovic et al., 2010).

Isofluran und Sevofluran wirken gut hypnotisch und muskelrelaxierend (Eger, 1981; Patel und Goa, 1996). Sie wirken schwach analgetisch (Hagihira et al., 2004). Der genaue Wirkmechanismus beider Inhalationsanästhetika ist noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich sind GABA_A-Rezeptoren (Zeller et al., 2008), nicotinerge und glutamaterge Rezeptoren (Akk et al., 2008) sowie Glycin-Rezeptoren und Natriumkanäle beteiligt (Sonner et al., 2003). Isofluran kann bei Mäusen im Anästhesiestadium II (Exzitationsstadium) einen Opisthotonus, d. h. eine Reflexüberstreckung der Rückenmuskulatur, auslösen. Diese Exzitationen werden nicht bewusst wahrgenommen und äußern sich umso stärker, je langsamer dieses Stadium durchlaufen wird (Ibrahim et al., 2001; Archer und Roth, 2007). Die Häufigkeit des Auftretens von Opisthotonus variiert bei unterschiedlichen Mausstämmen (Komatsu und Ogli, 1987).

1.4.3 Wirkung auf das sympathische Nervensystem

- **Allgemeines**

Der Organismus reagiert bei Bedrohung der Homöostase mit Aktivierung des sympathischen Nervensystem und des Nebennierenmarks. An sog. SAM-Achse (sympathetic adrenal medullary axis, Sympathikus-Nebennierenmark-Achse) sind die Transmitter Acetylcholin, Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin beteiligt. Stress führt zu einem schnellen Anstieg der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin im Blut (Webster Marketon und Glaser, 2008). Im weiteren Verlauf wird die Stressreaktion über die sog. HPA-Achse (hypothalamic pituitary

1 Literatur

adrenocortical axis, Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse) durch die Hormone Corticotropin-releasing hormone (CRH), Adrenocorticotropic hormone (ACTH) und Corticosteron bzw. Cortisol vermittelt. Erhöhte Konzentrationen von ACTH und Cortisol im Blut können nachgewiesen werden (Webster Marketon und Glaser, 2008). Dies ist eine sehr vereinfachte Sichtweise, die Reaktionen des Organismus auf Stress sind nicht einheitlich, sondern hängen vielmehr vom Stressortyp, der aktuellen Situation und den bisherigen Erfahrungen des Tieres ab (McEwen und Wingfield, 2003; Goldstein und Kopin, 2008).

Hypoglykämie, Hitze und Kälte, Hypotension, Hypovolämie, Blutungen und Schock wie auch Hypoxie, Hyperkapnie und Azidose sind potente Stimuli für eine Katecholaminfreisetzung (Kopin, 1989). Erhöhte Wachsamkeit und emotionale Reaktionen auf eine wahrgenommene Bedrohung sorgen ebenfalls für einen Anstieg der Stresshormonkonzentrationen im Blut (Kopin, 1989).

Ein akutes Stresssignal erfordert sofortige Aufmerksamkeit, um reagieren zu können. Im ZNS ist dafür der Nucleus coeruleus, ein bedeutendes Ursprungsgebiet noradrenerger Neurone, eine wichtige Schaltstation (Goddard et al., 2010; Itoi und Sugimoto, 2010). Eine Aktivierung führt zu Steigerung der Noradrenalinfreisetzung in vielen Hirngebieten, zu denen die Neurone des Locus coeruleus projizieren (Itoi und Sugimoto, 2010). In der Folge werden das periphere sympathoadrenale autonome System und die HPA-Achse aktiviert (Goddard et al., 2010). Es resultieren Verhaltensänderungen und autonome endokrine Antworten (Morilak et al., 2005).

Adrenalin ist das dominierende Stresshormon bei adulten Säugetieren. Es wird im Nebennierenmark über mehrere Schritte gebildet. Noradrenalin wird zusätzlich auch in anderen chromaffinen Geweben synthetisiert. Die NoradrenalinKonzentration im Plasma ist relativ hoch, da es nicht nur aus dem Nebennierenmark, sondern auch aus sympathischen Nervenendigungen abgegeben werden kann. Die Katecholamine haben eine kurze Plasma-Halbwertszeit. Sie beträgt für Adrenalin ca. 11 min (Gu et al., 1999) und für Noradrenalin ca. 2 min (Grimm et al., 1980). Unter Belastung gemessene Werte können den Ausgangswert um das 10 bis 50-fache übersteigen (Adams und Hempelmann, 1991). AdrenalinKonzentrationen erreichen ihre Maximalwerte schon 30 s nach Einsetzen des Stimulus, fallen dann leicht ab und pegeln sich auf einen konstant erhöhten Wert ein (Kopin, 1989). NoradrenalinKonzentrationen steigen steil an und erreichen nach 3-4 min einen *steady state* (Kopin, 1989). Nach Stimulusende fallen beide KatecholaminKonzentrationen rasch wieder ab. Katecholamine vermitteln ihre Wirkung über α - und β -Rezeptoren und dienen dazu, den Körper bei hohen Belastungen und in einer Notfallsituation zu unterstützen. Adrenalin und Noradrenalin im Gehirn lösen Reaktionen aus, die charakteristisch für Angst sind. Adrenalin kann auch umgekehrt, wenn es verabreicht wird, Angst erzeugen (Kopin, 1989). Wird Adrenalin intravenös verabreicht, führt es bei adulten Tieren in der Regel zu

einer Erregungszunahme (arousal) (Marley und Stephenson, 1972).

Bei Belastung wird CRH aus dem Hypothalamus ausgeschüttet, was zur Sekretion von ACTH aus dem Hypophysenvorderlappen führt. ACTH bewirkt die Ausscheidung von Glucocorticoiden aus der Nebennierenrinde. Corticosteron überwiegt bei Vögeln, Mäusen und Ratten, Cortisol bei den meisten anderen Tierarten. Corticosteron steigt langsam an, die Maximalkonzentration ist ca. 30 min nach Setzen eines Stressreizes erreicht (Jones und Stockham, 1966). Glucocorticoide und Katecholamine zusammen begünstigen die Gedächtnisbildung von potentiell bedrohlichen Situationen, so dass das Tier sie zukünftig meiden kann (Roozendaal, 2000).

Akuter Stress oder Injektion von Adrenalin verursacht eine Hyperglykämie (Eigler et al., 1979; Bialik et al., 1988). Bei Mäusen stieg 15 min nach der Injektion von Adrenalin der Glukosespiegel im Plasma auf mehr als das Doppelte, nach 30-60 min auf ca. das 3-fache an. Nach 120 min war die Konzentration fast wieder auf Ausgangsniveau gefallen (Kuhn et al., 1987). Bialik und Mitarbeiter (1989) konnten bei Ratten nach Setzen verschiedener Stressorreize (Adrenalininjektion, Predatorengeruch, elektrische Fußschocks) ähnliche Zeitverläufe der Glukosekonzentrationen im Blut messen. 10 min nach einem Stressreiz (Schwimmen im eiskalten Wasser für 10 min) waren die Serumkonzentrationen von Glukose, Adrenalin und Noradrenalin erhöht im Vergleich zu Tieren, die keinem Stress ausgesetzt waren (Gotoh et al., 1998). Nach 60 min waren die Konzentrationen der Katecholamine zwar schon gesunken, doch noch immer signifikant erhöht, während die Glukosekonzentration auf demselben hohen Level blieb (Gotoh et al., 1998). Nach 120 min näherten sich alle Konzentrationen den Werten an, die vor dem Stressreiz gemessen wurden (Gotoh et al., 1998). Die zentrale Regulation der Blutglukosekonzentration erfolgt über noradrenerge neuronale Aktivität des Hypothalamus, die zum einen die Freisetzung von Glukose aus der Leber stimulieren und zum anderen durch die Aktivierung von Katecholaminen aus der Nebenniere die Insulinfreisetzung aus dem Pankreas hemmen (Smythe et al., 1989). Wird die noradrenerge neuronale Aktivität im Hypothalamus pharmakologisch gehemmt, wird eine Hyperglykämie durch Stress verhindert (Smythe und Edwards, 1992). Chronischer Immobilisationsstress hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Blutglukosespiegel von Ratten, während unerwarteter akuter Immobilisationsstress die Konzentrationen der Blutglukose im Vergleich zu einer ungestressten Kontrollgruppe signifikant erhöhte (Ricart-Jané et al., 2002). Somit kann ein erhöhter Blutglukosespiegel ebenfalls Hinweise auf eine akute Stressreaktion geben.

- **CO₂-Inhalation**

Brofman und Mitarbeiter (1990) lösten bei Schweinen durch Inhalation von CO₂ eine sog. hyperkapnische Azidose (erhöhter CO₂-Partialdruck und erniedrigter pH-Wert des Blutes, s.

1 Literatur

o.) aus. Die Autoren charakterisierten die neurohumorale Antwort auf die akute hyperkapnische Azidose und stellten eine Erhöhung der Plasmakonzentration von Adrenalin und Noradrenalin sowie eine gesteigerte Herzauswurfleistung und Herzfrequenz fest. Auch bei nicht-narkotisierten Hunden resultierte eine akute hyperkapnische Azidose allein oder in Kombination mit Hypoxie in einem Anstieg der NoradrenalinKonzentrationen im Plasma und in einem Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes, der Herzauswurfleistung und der Herzfrequenz (Rose et al., 1983). Bei der Saugferkelkastration unter 75-sekündiger CO₂-Begasung war eine ca. 10-fache Erhöhung der Adrenalin- und ca. 20-fache Erhöhung der Noradrenalinwerte im Vergleich zur betäubungslosen Kastration festzustellen, aber im Gegensatz zu zuvor erwähnten Studien sank die Herzfrequenz auf ca. ¼ des Ruhewertes bei der CO₂-Verabreichung (Zimmermann, 2010). Bei Ratten konnten ein Abfall der Herzfrequenz bei 3% und bei 5% CO₂ sowie ein erniedrigter systolischer Blutdruck bei 5% CO₂, telemetrisch festgestellt werden (Krohn et al., 2003). Auch beim 2-minütigen Einstrom von CO₂ mit 10% des Kammervolumens pro Minute (KV%/min) sank bei Ratten die Herzfrequenz, alle Ratten waren in dieser Zeit noch bei Bewusstsein (Burkholder et al., 2010). Eine Azidose setzt die Kreislauf- und Herzfunktion herab (Adroque und Madias, 1998). In vorher genannten Fällen scheint die gedämpfte Kreislauf- und Herzfunktion von der CO₂-bedingten Azidose zu dominieren und nicht durch die Katecholaminwirkungen überlagert zu werden. Eine Azidose schwächt die Wirkungen der Katecholamine auf das Herz-Kreislaufsystem nach und nach ab, bei pH-Werten unter 7,2 überwiegen diese direkten dämpfenden Wirkungen der Azidose (Adroque und Madias, 1981). Auch kann eine Azidose die vaskuläre Antwort auf eine Adrenalininjektion modulieren: Bei einem niedrigen Blut-pH-Wert beeinflusste Adrenalin den Blutdruck weniger als bei normalen Blut-pH bei decerebrierten Katzen (Burget und Visscher, 1927). Gleichzeitig stellt eine Azidose jedoch einen starken Stimulus für die Katecholaminausschüttung (Adroque und Madias, 1981) und für die Adrenalin- und Noradrenalinsynthese in der Nebenniere dar (Nahas et al., 1967). So können in erst genannten Fällen (Rose et al., 1983; Brofman et al., 1990) die herz- und kreislauffördernden Wirkungen durch Adrenalin- und Noradrenalin die herz- und kreislauffördernden Auswirkungen einer Azidose überwiegen. Weiterhin ist eine Beeinflussung der kardiovaskulären Funktion durch eine Angst- und Stressreaktion, wie sie durch CO₂-Inhalation mit folgender Hyperkapnie und Azidose ausgelöst wird (s. a. 1.4.6.1), denkbar.

Eine schwergradige Hyperkapnie, hervorgerufen durch eine 20-minütige Inhalation von 8% CO₂ allein oder in Kombination mit Hypoxie, führte bei nicht-narkotisierten Ratten zu einem Anstieg der ACTH-Konzentration im Plasma (Raff und Roarty, 1988). Das Blut wurde direkt nach der Inhalation über einen zuvor gelegten arteriellen Katheter gewonnen (Raff und Roarty, 1988). Auch mehrmalige Narkosen an den Zeitpunkten 0, 0.5, 1, 2, 3 und 24h mit

70% CO₂ plus Sauerstoffzugabe führten bei Ratten zu einem Anstieg der Cortisolkonzentrationen im Serum ab 0.5h (Altholtz et al., 2006). Das Blut wurde während den einzelnen Narkosen aus der Jugularvene abgenommen (Altholtz et al., 2006).

ACTH und Corticosteron als Marker für akuten Stress müssen mit Vorsicht und unter Einbeziehung des Zeitpunktes der Probennahme interpretiert werden. Der optimale Zeitpunkt zur Probennahme für die Bestimmung von ACTH und Corticosteron ist nach ca. 20-30 min Stimulation erreicht (Jones und Stockham, 1966; Raff und Roarty, 1988). Wird die Blutprobe zu einem früheren Zeitpunkt gewonnen, ist es möglich, dass der gemessene Konzentrationsanstieg auf Stress *vor* der Anästhesie bzw. Euthanasie hindeutet oder dass zwar Stress während der Anästhesie bzw. Euthanasie vorlag, jedoch noch keine entsprechende Erhöhung der ACTH- und Corticosteronkonzentration stattgefunden hat.

In folgenden Untersuchungen wurden die Proben direkt im Anschluss an die Anästhesie bzw. Euthanasie genommen, also sofort nach Setzen des zu untersuchenden Stimulus. Bei gehändelten Ratten, die durch Einleitung von 70% CO₂ plus Sauerstoffzugabe im Heimatkäfig narkotisiert wurden, konnten Cortisolkonzentrationen im Serum gemessen werden, die im physiologischen Bereich lagen (Fomby et al., 2004). Das Blut wurde unter der CO₂-Narkose aus dem retroorbitalen Sinus gewonnen (Fomby et al., 2004). Corticosteron wurde hier, wie auch in den unten beschriebenen Studien, als Biomarker für Stress verwendet.

Bei Mäusen, die in einer mit CO₂ vorgefüllten Kammer narkotisiert wurden, konnte bei für die Mäuse bekannter Umgebung und Routinehandlungen keine Erhöhung der Cortisolkonzentrationen in Serumproben, die direkt im Anschluss an die Narkose gewonnen wurden, festgestellt werden (Shipp und Woodward, 1998). So fanden auch Valentine und Mitarbeiter (2012) keine Erhöhung von ACTH und Cortisol im Plasma bei Mäusen, die mit 100% CO₂ mit einer Einfüllrate von 20 KV%/min narkotisiert wurden, die Proben wurden gleich nach der Narkoseeinleitung genommen.

Bei Ponys unter Halothannarkose stieg die Konzentration der Plasmaglukose während einer 60-minütigen hyperkapnischen Phase (erhöhter CO₂-Partialdruck) an, nicht jedoch unter normokapnischen Narkosebedingungen (Taylor, 1998). Die Autoren führen die Hyperglykämie auf eine erhöhte sympathische Aktivität zurück. Nach einer ca. 1-minütigen Exposition mit CO₂, die eine tiefe Narkose hervorrief, wurden höhere Glukosekonzentrationen im Plasma bei Ratten gemessen als bei nicht-narkotisierten Ratten (Zardooz et al., 2010). Auch bei Ratten, die mit einem Gemisch aus CO₂ und O₂ narkotisiert wurden, war die Glukosekonzentration im Plasma im Vergleich zu einer Ethernarkose erhöht (Fowler et al., 1980), obwohl Ether sogar als Stressmodell etabliert ist.

- **Inhalation von Isofluran und Sevofluran**

Crozier und Mitarbeiter (1992) untersuchten die endokrine und metabolische Stressantwort während Isofluran- und Halothananästhesien beim Menschen. In der Narkosephase vor dem operativen Eingriff blieben die Konzentrationen von den Stresshormonen Adrenalin, Noradrenalin, ACTH und Cortisol sowie von Glukose und Laktat stabil oder sie sanken sogar. Intra- und postoperativ stiegen die Konzentrationen an (Crozier et al., 1992). Halter (1977) führt diese Antwort auf Schmerzstimuli, die nicht durch die Inhalationsanästhesie unterdrückt werden, zurück. Euthanasieuntersuchungen an Ratten ergaben niedrigere Katecholaminkonzentrationen im Blut bei 7,2%iger Isofluran- im Vergleich zu 25%iger Etherexposition (Stevens, 2001). Etherinhalation wird als Stressmodel verwendet (Gibson et al., 1980; Smythe et al., 1983). Ein Anstieg der Katecholamine konnte bei Isofluran erst zum Zeitpunkt des Atemstillstandes mit gleichzeitiger Hypoxämie und Hyperkapnie festgestellt werden (Stevens, 2001).

Mehrmalige Narkosen mit Isofluran erhöhten die Cortisolkonzentrationen im Serum von Ratten zwischen den Probennahmezeiten 0.5 h – 24 h, jedoch nicht so ausgeprägt wie durch eine CO₂-Narkose (Altholtz et al., 2006). Bei Mäusen, die vor der Euthanasie mit CO₂ zum Induzieren der Bewusstlosigkeit eine Isoflurannarkose erhielten, wurden erhöhte ACTH- und Corticosteronkonzentrationen im Plasma gemessen (Valentine et al., 2012). Allerdings erfolgte auch hier die Probennahme direkt im Anschluss an die Tötung. Somit deutet dieser Anstieg der Stresshormone eher auf Stress vor der Narkose/Tötung hin als auf durch die Narkose/Tötung selbst verursachten Stress (s. o.).

Isofluran und Sevofluran erweitern die peripheren Blutgefäße und der Widerstand sinkt, dadurch fällt der Blutdruck und die Herzfrequenz steigt kompensatorisch an (Eger, 1981; Bovill, 2008). Isofluran hemmt den sympathischen Anteil des Baroreflexes und somit die Reflex-Kontrolle der Herzfrequenz. Das bedeutet, dass die Steigerung der Herzfrequenz begrenzt ist und dass der Blutdruck nicht wieder in den Normbereich angehoben werden kann (Lee et al., 2002).

Narkosedauer, Narkoseart, Stress vor und während der Narkose und ob Futterentzug vorlag, haben Einfluss auf die Glukosekonzentration (Winder et al., 1983; Zardooz et al., 2010). Bei Ponys konnte während einer 2-stündigen Halothannarkose kein Anstieg der Blutglukose festgestellt werden (Taylor, 1998). Bei Katzen führten jedoch 90 min einer Halothan-, Isofluran- oder Sevoflurannarkose zu Hyperglykämie (Hikasa et al., 1996). Zardooz und Mitarbeiter (2010) fanden keine Unterschiede in der Plasmaglukosekonzentration bei Ratten nach einer 2-minütigen Isofluranexposition im Vergleich zu nicht-narkotisierten Ratten. Während lang dauernden (10 h) Isofluran- und Sevoflurannarkosen beim Menschen sank die

Glukagonkonzentration im Plasma (Nishiyama et al., 2005). Die Autoren sehen hier eine Ursache für die gleichzeitig erhöhten Glukosekonzentrationen im Plasma.

1.4.4 Wirkung auf das Erleben der Atmung, Dyspnoe

Eupnoe ist die physiologische, nicht behinderte Atmung mit normgerechter Atemfrequenz und Atemtiefe. Dyspnoe wird als Atemnot oder erschwerte Atmung definiert. Sie führt zu einer gesteigerten Lungenventilation. Eine Dyspnoe kann mechanisch oder durch eine Reizung des Atmungszentrums (durch Erhöhung von $p\text{CO}_2$, Erniedrigung von $p\text{O}_2$ des Blutes, Fieber, Anämie, Angst, Erregung, periphere oder kardial bedingte Kreislaufinsuffizienz) bedingt sein.

Das Erleben von Dyspnoe lässt sich in die Empfindungsqualitäten Lufthunger, Enge und Arbeit/Anstrengung aufgliedern (Banzett und Moosavi, 2001). Die Empfindung von Lufthunger, der durch erhöhten CO_2 -Gehalt in der Einatemluft hervorgerufen wird, wird von Probanden als entschieden unangenehmer als die Empfindung von Atemarbeit/Atemanstrengung, die durch vermehrte Atemtätigkeit bei eukapnischer Einatemluft entsteht, eingestuft (Banzett et al., 2008). Der Schweregrad von Lufthunger steht in positiver Korrelation mit den endexpiratorischen CO_2 -Konzentrationen. Lufthunger wird durch ein erhöhtes Atemzugvolumen und erhöhte Atemfrequenz zwar gemildert, doch halten die Autoren es für möglich, dass starke Atmung den Lufthunger bei hohen endexpiratorischen CO_2 -Konzentrationen nicht völlig ausschaltet (Lansing et al., 2000).

Serotonerge Raphé-Neurone fungieren als zentrale CO_2 -Chemosensoren und stimulieren die Atmung bei einem Absinken des pH-Wertes im Blut aufgrund eines Anstiegs des $p\text{CO}_2$ im Blut (Dohle und Richerson, 2010). Es gibt Hinweise, dass direkte Projektionen von diesen serotonergen Neuronen ins Vorderhirn und von dort ins limbische System das Erleben der Dyspnoe vermitteln (Dohle und Richerson, 2010). Lufthunger bewirkt im Gehirn eine starke Aktivierung des mittleren bis vorderen Inselgebietes, das Teil des limbischen Kortex ist (Banzett et al., 2000). Beim Menschen ist dieses Gebiet auch bei Übelkeit, bei unangenehmen Geschmack und Geruch und bei anderen aversiven Stimuli aktiviert (Banzett et al., 2000). Auch werden weitere Gehirnregionen wie der vordere Gyrus cinguli, das Operculum, das Kleinhirn, die Amygdala, der Thalamus und die Basalganglien aktiviert (Evans et al., 2002). Dyspnoe, ebenso wie Schmerz, Hunger und Durst, stellt eine starke Motivation zu adaptivem Verhalten dar (Banzett und Moosavi, 2001).

Analog zum Menschen sollten wir auch bei Tieren von einer zumindest unangenehmen Empfindung bei Dyspnoe, wie sie durch CO_2 -Inhalation verursacht wird, ausgehen.

Unter Isoflurannarkose stieg der CO_2 -Partialdruck im Verlauf der Narkose und konzentrationsabhängig an, dabei sank das Atemminutenvolumen und die Anpassungsreaktion der Atmung aufgrund von erhöhten CO_2 -Partialdrücken im Blut war vermindert (Fourcade et al., 1971). Auch niedrige Dosen von Isofluran, Sevofluran und

Enfluran, die noch nicht narkotisch wirken, verminderten eine durch Hyperkapnie verursachte Steigerung der Atmung beim Menschen (van den Elsen et al., 1998) und bei Mäusen (Groeben et al., 2004). 1% und 2% Isofluran wirkten bei gesunden Probanden als Bronchodilatator (Rehder et al., 1974). Inwieweit bei der Narkoseeinleitung mit Isofluran und Sevofluran Zustände, die einer Dyspnoe gleichen, auftreten können, lässt sich daraus schwer ableiten.

1.4.5 Wirkung auf die Gewebe des Atemtraktes

• Allgemeines

Die oberen Atemwege sind mit hochprismatischem Plattenepithel ausgekleidet, das in respiratorisches Epithel übergeht. Dieses besitzt Flimmerhärchen und viele eingelagerte Becherzellen, die Schleim produzieren. Die Mauslunge setzt sich aus einem Lungenlappen auf der linken und aus vier Lappen auf der rechten Seite zusammen. Die Alveolargänge, Alveolarsäcke und Alveolen haben sehr dünne Wände und sind mit einem engmaschigen Netzwerk aus großen, dünnwandigen Kapillaren umgeben. Die Lunge lässt sich in drei Kompartimente (Alveolar- und Bronchialgewebe, Blutgefäße und Interstitium) aufteilen, an denen pathologische Veränderungen auftreten und die eine Beeinträchtigung der Lungenfunktion zur Folge haben können.

Schmerzafferenzen, die Nasen-, Maul- und Rachenraum versorgen, ziehen entlang der Glossopharyngeal- und Trigeminierven (Ruch, 1979). Der Kehlkopf und die Luftröhre werden sensibel durch die oberen Laryngealerven und durch die oberen thorakalen Vagusäste innerviert (Ruch, 1979). Sympathische Anteile des Brachialplexus und der Intercostalerven ziehen zu der die Thoraxinnenwand auskleidenden parietalen Pleura (Ruch, 1979). Die viszerale Pleura wird nicht sensibel versorgt.

Es ist möglich, dass die Inhalation von Pharmaka Irritationen der Schleimhäute (Nase, Larynx, Pharynx, Trachea und Bronchien) und des Lungengewebes (alveoläres, bronchiales, vaskuläres und interstitielles Gewebe) hervorruft, die sich z. B. in Husten und Schmerzen äußern, aber mit bloßem Auge oder in der Lichtmikroskopie nicht zu erkennen sind. Morphologisch erkennbare Veränderungen der Gewebe werden in dieser Arbeit als Schäden beschrieben.

• CO₂-Inhalation

CO₂ reagiert mit Wasser auf den Schleimhäuten zu Kohlensäure. Die Inhalation oder Aspiration von Säure (H⁺-Ionen) stimuliert vagale bronchopulmonäre Nerven über ASIC- (acid-sensing ion channel, säureempfindlicher Ionenkanal) und TRPV1- (transient receptor potential, transientes Rezeptorpotential) Kanäle und ist verantwortlich für Reaktionen wie Husten und Reflexbronchokonstriktion (Gu und Lee, 2010). Die Inhalation von CO₂ kann zudem Schäden am gesamten Lungengewebe verursachen. Bei mit CO₂ getöteten Ratten

findet man in der histologischen Untersuchung der Lunge perivaskuläre Ödeme und im Vergleich zur Tötung mit dem Injektionsnarkotikum Pentobarbital ein häufigeres Vorkommen von Blutaustritt in diese Ödeme und in den alveolären Raum (Fawell et al., 1972; Port et al., 1978). Feldman und Gupta (1976) stellen Blutungen in die Alveolarräume fest. Das Auftreten und der Schweregrad von Ödem und Blutaustritt sind bei niedrigen CO₂-Konzentrationen (Danneman et al., 1997) und beim Zusatz von Sauerstoff erhöht (Ambrose et al., 2000), wahrscheinlich bedingt durch eine Verlängerung der CO₂-Exposition. Messow und Mitarbeiter (1987) finden nicht nur bei durch Dekapitation getöteten Ratten, sondern auch bei durch CO₂ getöteten Tieren vereinzelte und herdförmige Blutaspirationen in der Trachea und den Bronchien und erklären diese als Folge von intrapulmonalen Blutungen. Des Weiteren können die Autoren folgende Veränderungen des Lungengewebes nach dem Tod durch CO₂-Inhalation feststellen: Hyperämie der septalen Kapillaren, Blutungen im interalveolären Septengewebe und disseminierte Blutungen im Lungengewebe, interstitielle Ödeme und Resorptionsatelektasen. Nach einer 1- und 6-stündigen Exposition mit 15% CO₂ wiesen alle Lungen von Meerschweinchen Atelektasen, Stauungshyperämien, Ödeme und höhere Lungengewichte auf; Lungenblutungen fielen bei der Hälfte der Tiere nach 1-stündiger und bei allen Tieren nach 6-stündiger Exposition auf (Schaefer et al., 1964). Bei Ratten, die mit CO₂ getötet wurden (Einfüllrate 10 KV%/min, Todeseintritt im Mittel nach ca. 14 min), findet man in der histologischen Untersuchung der Lungen bei allen Tieren leichte multifokale Blutungen in den Alveolen und bei 1 von 8 Tieren ein leichtes Lungenödem. Diese Läsionen unterschieden sich nicht von Folgen, die bei mit Argon (Einfüllrate 50 KV%/min) getöteten Ratten auftraten (Burkholder et al., 2010).

Es ist aus den Untersuchungen nicht ersichtlich, ob diese Schäden vor Eintritt der Bewusstlosigkeit auftraten und zur Belastung des Tieres während der Phase der Narkoseentwicklung beitragen konnten oder ob sie erst in Narkose/Agonie auftraten. Es finden sich keine Untersuchungen zu durch CO₂ verursachte Gewebeschäden an der Luftröhre, die als schmerzhaft empfunden werden könnten.

- **Inhalation von Isofluran und Sevofluran**

Isofluran und Sevofluran können von Menschen als Schleimhaut irritierend und unangenehm wahrgenommen werden (s. a. 1.4.1). Halothannarkosen, nicht jedoch Isoflurannarkosen, führten zu mikrovaskulären Endothelschäden in der Lunge bei Menschen und auch experimentell bei Kaninchen (Gunaydin et al., 1997). In einer weiteren Studie an Menschen führten Narkosen mit Halothan und Isofluran zu leichten, transienten Endothelschäden der Lungengefäße, die klinisch nicht relevant waren (Hung et al., 2003). Isofluran kann auch leichte, vorübergehende Erhöhungen der Permeabilität des Alveolarepithels verursachen (Sun et al., 2000). All diese Veränderungen wurden mit einer Radionuklid-Clearance-

Methode erhoben und wären in einer mikroskopischen Untersuchung nicht zu erkennen gewesen.

1.4.6 Wirkung auf das Verhalten

Das Erkennen von Distress erfordert bei Labortieren eine gute Kenntnis sowohl des spezies- und stammesspezifischen Normalverhaltens als auch der Normbereiche morphologischer und physiologischen Parameter. Um eine Tötungsmethode umfassend zu beurteilen, genügt es deshalb nicht, sich nur auf physiologische und biochemische Messungen zu stützen. Die Beurteilung des Verhaltens eines Tieres während Narkosegas-Exposition kann Aufschluss über die Aversivität der Gase sowie über das momentane Befinden des Tieres geben.

1.4.6.1 Wirkung auf das Angstverhalten

- **Allgemeines**

Angst stellt einen unangenehmen emotionalen Zustand (Sambraus, 1997) und einen evolutionär konservierten Prozess dar, der die Unversehrtheit und im Äußersten das Überleben eines Individuums sichert, indem er die Vermeidung von oder die Flucht vor Beutefängern oder bedrohlichen Situationen auslöst (Öhman und Mineka, 2001). Die Angstreaktion wird von einer vegetativen (sympathischen) Symptomatik begleitet. In einer unbekanntem Umgebung oder Situation zeigt ein Individuum erhöhte Aufmerksamkeit (arousal) und Erkundungsverhalten. Die Notfallreaktion Angriff oder Flucht (fight or flight) auf eine akute gefährliche, lebensbedrohende oder beängstigende Situation kann sich auch in alternativem Verhalten, wie Sich-Tod-Stellen (freeze) oder Befreunden, Beschwichtigen (flirt) äußern. In der neurobiologischen und neuropsychologischen Forschung werden unterschiedliche Verhaltenstests (Angstparadigmen) wie z. B. das Elevated Plus Maze oder Konflikttests, eingesetzt, um die Angstreaktion von Mäusen und Ratten zu quantifizieren.

- **CO₂-Inhalation**

In klinischen Studien wird CO₂ beim Menschen als angst- und panikauslösendes Mittel eingesetzt (Finlay und Forsyth, 2009; Schruers et al., 2011; Colasanti et al., 2012). Das Einatmen von CO₂ induziert einen negativen affektiven Zustand, der nah verwandt mit dem klinischen Phänomen der Panik ist (Schruers et al., 2011). Bei gesunden Freiwilligen löst das 20-minütige Einatmen von 7,5% CO₂ reproduzierbar Furcht, Angst, Anspannung und Sorge sowie ein vermindertes Gefühl von Glückseligkeit und Entspannung aus (Bailey und Nutt, 2008). Laut den Autoren ist die CO₂-induzierte Angst über Spezies hinweg zu finden und deshalb wahrscheinlich ein grundlegender evolutionärer Adaptations- und Überlebensmechanismus (Bailey und Nutt, 2008). Auch sehen Griez und Mitarbeiter (2007) den durch CO₂-Inhalation (und der damit verbundenen Hyperkapnie und akutem

metabolischem Distress) hervorgerufenen affektiven Distress als evolutionären Schutzmechanismus an.

Als Transmissionssysteme im Gehirn sind bei der Angstreaktion auf CO₂ das noradrenerge System (Bailey et al., 2003; Colasanti et al., 2012), das GABAerge System (Bailey und Nutt, 2008) sowie auch das serotonerge System (Dohle und Richerson, 2010; Schruers et al., 2011; Colasanti et al., 2012) beteiligt. An der zentralen CO₂-Chemorezeption beteiligte Gehirnregionen sind der Bulbus olfactorius (Hu et al., 2007), medulläre Raphé-Kerne (Corcoran et al., 2009; Dohle und Richerson, 2010) und weitere Kerne des Hirnstamms, wie der Locus coeruleus, der Nucleus des Tractus solitarius und der Nucleus retrotrapezoideus (Chernov et al., 2010) sowie die Amygdala (Ziemann et al., 2009). Die Chemorezeption findet direkt in den Neuronen durch Reaktion mit Enzymen, wie der Carbonanhydrase im Bulbus olfactorius (Hu et al., 2007), oder durch Modulation von diversen K⁺-Ionenkanälen in Neuronen des Hirnstamms (Chernov et al., 2010) statt. ASIC 1a Ionenkanäle (acid-sensing ion channel 1a, säureempfindlicher Ionenkanal 1a), die im Gebiet der Amygdala exprimiert werden, können pH-Wert-Unterschiede als Folge der Hyperkapnie detektieren (Ziemann et al., 2009). Auch bei serotonergen Neuronen im Raphé-Gebiet ist der primäre Stimulus eine Änderung des Blut-pH-Wertes (Dohle und Richerson, 2010).

Mäuse können mit Hilfe olfaktorischer Neurone im Riechepithel, die das Enzym Carboanhydrase Typ II exprimieren und zum Bulbus olfactorius projizieren, CO₂ detektieren (Hu 2007). Bei Mäusen wird die potentiell lebensrettende Arousal-Antwort auf erhöhte CO₂-Gehalte in der Einatemluft (hier: 10%) über Serotonin-Neurone vermittelt (Buchanan und Richerson, 2010). Unterschiede in der dosisabhängigen Angstreaktion auf CO₂ (9%, 17,5% und 35%) beim Menschen konnten auf eine unterschiedliche Serotonin-Aktivität zurückgeführt werden, die auf einem Polymorphismus in der Promotor-Region des Serotonin-Transportergens beruht (Schruers et al., 2011). Es wird angenommen, dass serotonerge Neurone eine Arousal-Antwort bei niedrigen CO₂-Konzentrationen induzieren, und dass dieselben Neurone bei höheren CO₂-Konzentrationen Angst und Dyspnoe (s. a. 1.4.4) hervorrufen (Dohle und Richerson, 2010).

Ziemann und Kollegen (2009) beobachteten mit Hilfe von vier unterschiedlichen Angstparadigmen folgende Reaktionen bei Mäusen:

- 10% CO₂ provozierte Freezing-Verhalten.
- 10% CO₂ verstärkte das Angstgedächtnis, wenn es mit Fußschock kombiniert wurde.
- 10% CO₂ reduzierte die Aktivität im aversiven Zentrum des Open Field Tests, was auf erhöhte Ängstlichkeit schließen ließ.
- Bei einem Präferenztest (Kammer mit je 15% CO₂ und <2% CO₂) verbrachte die Maus > 90% der Zeit in der Kammer mit dem geringen CO₂-Gehalt.

Die Amygdala vermittelt über das noradrenerge System eine Fight-or-flight-Reaktion und hat Verbindungen zu anderen Gehirnregionen, die bei einer Reaktion auf eine Bedrohung beteiligt sind (Ziemann et al., 2009). Auch bei Ratten verstärkt eine 5-minütige Exposition von 20% CO₂ (gradueller Konzentrationsanstieg) angstbezogenes Verhalten, hier gemessen an erhöhter Anzahl von Kotkötter und an verringerter Aufenthaltszeit im aversiven Zentrum des Open Field Tests (Johnson et al., 2011). Die Autoren berichten, dass diese CO₂-Exposition Regionen des Vorderhirns und des Hirnstamms, die bei der Auslösung von angst- und furchtbezogenem Verhalten, bei der Mobilisation der HPA-Achse und bei der Aktivierung der stressbezogenen Sympathikusantwort beteiligt sind, aktiviert. Dies führt zur Anpassung der Atmung, zu Arousal-Verhalten und zu aversiven Panikantworten, um die Säuren-Basen-Homöostase wieder herzustellen.

Weiterhin wurde untersucht, welches Verhalten Ratten zeigten, die keine Möglichkeit hatten, eine CO₂-Atmosphäre zu verlassen. Dabei kannten die Tiere den Ausgang aus der Kammer, dieser war jedoch verschlossen. Neil und Mitarbeiter (2008a) beobachteten ein vermehrtes Erkundungs- und Fluchtverhalten, wobei sich das Erkunden sowohl auf die unbekannte Umgebung als auch auf die Aversivität von CO₂ zurückführen ließ. Fluchtversuche hingegen wurden allein durch CO₂ ausgelöst (Neil et al., 2008a).

- **Inhalation von Isofluran und Sevofluran**

Es ist wenig über die direkten Folgen der Exposition mit Inhalationsanästhetika auf das Angstverhalten bekannt. Die chronische Exposition (4 Stunden täglich über 30 Tage) mit niedrigen, nicht-narkotisch wirkenden Konzentrationen von Halothan, Sevofluran und Enfluran führte bei Ratten zu Änderungen im Verhalten im Vergleich zu nicht exponierten Ratten (Ozer et al., 2006):

- Verringerte Anzahl von Head Dippings und kürzere Explorationszeiten im Hole Board Test. Dies lässt auf vermindertes Explorationsverhalten und damit auf erhöhtes Angstverhalten schließen.
- Kürzere Aufenthaltszeit in den offenen Armen des Elevated Plus Mazes, was auf erhöhte Ängstlichkeit hindeutet.
- Längere Zeiten, um das Zielobjekt im Multiple T Maze zu finden, sowie eine größere Anzahl von falsch eingeschlagenen Abbiegungen. Dies wird mit einer verminderten Lern- und Gedächtnisfunktion in Verbindung gebracht.

Wiklund und Mitarbeiter (2008) untersuchten Mäuse, denen die β_2 -Untereinheit des nicotineren Acetylcholinrezeptors fehlte. 24 Stunden nach einer 2-stündigen Narkose mit 2,6% Sevofluran konnte bei diesen Mäusen vermindertes Explorationsverhalten im Open Field Test und erhöhtes Angstverhalten im Elevated Plus Maze Test im Vergleich zur Untersuchung vor der Narkose gemessen werden. Wildtyp-Mäuse zeigten keine

Verhaltensänderungen durch die Narkose, was auf eine Beteiligung cholinergischer Mechanismen beim Angstverhalten hindeutet.

1.4.6.2 Wirkung auf das Meideverhalten und olfaktorische Aversion

Nager verfügen über einen ausgeprägten Geruchssinn, der den Tieren als Warnsystem dient. Im Gegensatz zum Menschen können sie schon geringste CO₂-Konzentrationen wahrnehmen, wie sie z. B. bei zu vielen Tieren auf engem Raum oder bei Verlegung des Ausganges der unterirdischen Höhlen bei wildlebenden Tieren entstehen können. Ratten können CO₂ ab einer Konzentration von 0,5% detektieren (Ferris 2007), Mäuse schon ab einer Konzentration von ca. 0,066% mit Hilfe olfaktorischer Neurone im Riechepithel, die das Enzym Carboanhydrase Typ II exprimieren und zum Bulbus olfactorius projizieren (Hu 2007). Zum Vergleich: die Konzentration von CO₂ in der Atmosphäre beträgt 0,038%. Auch können Mäuse gasförmiges CO₂ mittels Geschmackssinneszellen der Zunge, die eine Carboanhydrase vom Typ IV exprimieren und zur Chorda tympani des Nervus facialis projizieren, konzentrationsabhängig wahrnehmen (Chandrashekar 2009). Sogar die Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) zeigt ein angeborenes Meideverhalten auf CO₂-Konzentrationen, die nur 0,1% über der Umgebungskonzentration liegen (Suh et al., 2004).

Bei einer Inhalationsnarkose nehmen die Tiere den Geruch der Narkosegase als erstes wahr und dieser kann, noch bevor eine anästhetische Wirkung einsetzt, aversiv auf die Tiere wirken und eine Belastung darstellen. In Präferenztest und im Approach-Avoidance-Paradigma stellen CO₂, Isofluran, Sevofluran und andere Narkosegase in unterschiedlichen Graden aversive Stimuli für Labornager dar (s. u.). Es ist bekannt, dass Etherinhalation als starker Stressor eingesetzt wird. Sie bewirkt eine gesteigerte Erregbarkeit auf Verhaltensebene und beeinflusst die Bildung und Freisetzung von stressbezogenen Transmittern im Gehirn (Patchev et al., 2007). Manche Mausstämme (z. B. C57BL/6J) haben eine verminderte Geruchswahrnehmung für bestimmte Stoffe (z. B. Isovaleriansäure) (Wysocki et al., 1977). Es ist nicht auszuschließen, dass unterschiedliche Mausstämme Inhalationsnarkotika unterschiedlich wahrnehmen.

Die Geruchsbelastung und Aversivität von CO₂ und Inhalationsnarkotika wurde bisher in zwei verschiedenen Modellen untersucht: Präferenztest und Approach-Avoidance-Paradigma.

- **Präferenztest**

Bei der Wahl zwischen einem luftgefüllten Käfig und einem Käfig mit 1% CO₂ zeigten Ratten keine Präferenz für den einen oder anderen Käfig. Schon eine Konzentration von 3% CO₂ in einem der Käfige ließ die Ratten diesen Käfig meiden (Krohn et al., 2003).

Ein anderer Test beruht darauf, dass das Tier einer Narkosegasatmosphäre ausgesetzt wird und diese jederzeit verlassen kann. Es werden die Gesamtaufenthaltsdauer in der Kammer und die Zeit bis zum Verlassen registriert. Je kürzer die Zeiten, desto aversiver wird das

Narkotikum eingestuft (Leach et al., 2002).

Leach und Mitarbeiter (2002) verglichen in diesem Test an Ratten und Mäusen die Aversivität der Inhalationsnarkotika Halothan, Isofluran, Enfluran und CO₂ in drei unterschiedlichen Kammerkonzentrationen, die jeweils gleich effektiv waren. Bei Mäusen zeigten sich die größten Unterschiede bei den niedrigen Konzentrationen: Die Aversivität war am höchsten bei CO₂ (28%) > Isofluran (1,5%) > Enfluran (5,2%) = Halothan (3,5%). Bei den mittleren und hohen Konzentrationen in der Kammer waren alle vier Gase etwa gleich aversiv (Leach et al., 2002). In einer weiteren Studie untersuchten Leach und Mitarbeiter (2004) zusätzlich Sevofluran, welches auch bei höherer Konzentration in der Kammer (7,2%) weniger unangenehm als CO₂ und Isofluran für Mäuse war.

- **Approach-Avoidance-Paradigma**

In diesem Test wird in einer Kammer eine unangenehme Atmosphäre (Narkosegase) mit einem angenehmen Reiz (Futterbelohnung) gepaart. Anhand der aufgenommenen Futtermenge und Aufenthaltsdauer in der Kammer während der Narkosegasexposition wird der Grad der Aversivität des jeweiligen Narkosegases bestimmt. Je mehr unter Einwirkung des Narkosegases gefressen wird bzw. je länger das Tier in der Kammer bleibt, desto „neutraler“ ist das Narkosegas für das Tier.

Ratten meiden Atmosphären mit statischen und ansteigenden CO₂-Konzentrationen sowie das Edelgas Argon und die damit einhergehende sauerstoffarme Atmosphäre. Die Tiere blieben nie lange genug in der Kammer, um das Bewusstsein zu verlieren (Niel und Weary, 2007; Makowska, 2008; Niel et al., 2008b). Der Zusatz von Sauerstoff beim schrittweisen Einleiten von CO₂ reduzierte leicht die Aversivität (Kirkden et al., 2008). Die Inhalationsanästhetika Isofluran und Halothan wirkten ebenfalls aversiv auf Ratten. Die Tiere tolerierten Isofluran (Maximalkonzentration 3,75%) länger als Halothan (Maximalkonzentration 5%), beide Narkotika in diesen Konzentrationen führten zu einem Zustand der Sedation und Ataxie (Makowska, 2009).

Bei Mäusen kommt man zu ähnlichen Ergebnissen mit dieser Testmethode. Mäuse verließen die Testkammer immer vor Bewusstseinsverlust, wenn sie CO₂, Argon und Kohlenmonoxid (CO) ausgesetzt waren (Makowska et al., 2009). Sie tolerierten Isofluran (Maximalkonzentration 3%) länger als Halothan (Maximalkonzentration 4,5%), wobei unter Isofluran-Exposition einige Mäuse sogar bewusstlos wurden (Makowska et al., 2009).

Eigene Untersuchungen am Institut (Menken, 2012) mit C57Bl/6-Mäusen weisen in die gleiche Richtung: Unter CO₂-Exposition verließen alle Mäuse die Testkammer, bevor sie ataktisch oder sogar bewusstlos wurden. Bei Exposition mit 1,25% - 3,75% Isofluran bzw. mit 6% Sevofluran wurden 44% der Mäuse bewusstlos, wobei eine Maus bei 3,75% Isofluran das chirurgische Toleranzstadium erreichte.

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Phase der Erzeugung von Bewusstlosigkeit und chirurgischer Toleranz zur Einleitung der Tötung mittels CO₂ sowie Isofluran und Sevofluran in unterschiedlichen Konzentrationen hinsichtlich ihrer Stressbelastung bei zwei Labormausstämmen untereinander vergleichend bzw. gegen einen reinen Luftstrom umfassend zu untersuchen.

Die Nullhypothese H₀, die es zu verwerfen gilt, lautet: Die Exposition mit CO₂ in unterschiedlichen Konzentrationen verursacht eine gleich hohe oder niedrigere Stressbelastung als die Exposition mit Luft bzw. mit Isofluran und Sevofluran in unterschiedlichen Konzentrationen.

Die Alternativhypothese H_A ist entsprechend: Die Exposition mit CO₂ in unterschiedlichen Konzentrationen verursacht eine höhere Stressbelastung als die Exposition mit Luft bzw. mit Isofluran und Sevofluran in unterschiedlichen Konzentrationen.

Die Stressbelastung wird von mehreren Parametern bestimmt. Wir gehen dabei zum einen von folgenden Annahmen aus:

- Bei starkem akutem Stress sind die Konzentrationen der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin im Plasma höher als bei niedrigerem oder keinem akutem Stress.
- Als Reaktion auf höhere Katecholaminspiegel im Plasma ist die Konzentration der Blutglukose bei akutem Stress höher als bei niedrigerem oder keinem akutem Stress.
- Exposition mit einem reinen Luftstrom verursacht keine Veränderung des Verhaltens. Eine stressvolle Narkosegasbehandlung verursacht eine deutliche Veränderung des Verhaltens im Vergleich zur Luftexposition. Eine wenig bzw. nicht stressvolle Narkosegasbehandlung verursacht keine Veränderung des Verhaltens im Vergleich zur Luftexposition. Dabei bleibt zu diskutieren, inwieweit eine bestimmte Verhaltensänderung als pharmakologischer Effekt per se oder als Ausdruck von Stress zu werten ist.
- Bei Exposition mit einem Luftstrom sind normale Atembewegungen festzustellen. Vertiefte und/oder beschleunigte Atemzüge können Zeichen für eine Dyspnoe oder auch Hinweise auf eine Änderung des inneren Milieus (Azidose) sein. Beide werden, wenn nicht entgegen gewirkt werden kann, mit Stress assoziiert.
- Exposition mit einem reinen Luftstrom verursacht keine Schädigung der Gewebe des Atemtraktes. Führt die Exposition mit Narkosegasen zu Schäden an den Geweben des Atemtraktes, so wird dies mit Schmerzen oder Stress in Verbindung gebracht.

Zum anderen sind die Wirksamkeit und Verlässlichkeit einer Narkosegasbehandlung, der zeitliche Verlauf der einzelnen Phasen der Narkoseeinleitung und die dann herrschenden

1 Literatur

Narkosegaskonzentrationen in der Kammer ausschlaggebend für die Beurteilung der Stressbelastung und der Tierschutzgerechtigkeit.

Auswirkungen der Narkosegase auf das Verhalten der Mäuse, blutchemische und gewebeopathologische Parameter werden erfasst. Im Unterschied zu bisherigen Studien umfasst der geplante Untersuchungszeitraum die Zeit von Beginn der Narkoseeinleitung bis zum Erreichen einer tiefen Narkose (chirurgisches Toleranzstadium). Dieser Zeitraum wurde deshalb gewählt, da nur in dieser Periode das Tier bewusst Stress und Schmerzen durch das Narkosegas oder Manipulationen empfinden kann. Weitere Veränderungen, die durch eine bis zum Eintritt des Todes geführte Narkose verursacht würden, werden so vermieden.

Zunächst werden das Verhalten und die Atembewegungen während des Narkosegaseinstromes auf Video aufgezeichnet. Dies wird durch die gleichzeitige Aufnahme der Lautäußerungen im hörbaren und im Ultraschallbereich ergänzt. Die Ton- und Filmmaterialien werden hinsichtlich des Verhaltens und der Latenzzeiten bis zum Eintreten der Bewusstlosigkeit und chirurgischer Toleranz analysiert. Das Eintreten der Bewusstlosigkeit und der chirurgischen Toleranz wird mittels Reflexprüfung bestimmt. Bei Erreichen der chirurgischen Toleranz wird sofort Blut durch Dekapitation für die Messung der Blutglukose und die Bestimmung der frühen Stressparameter Adrenalin und Noradrenalin im Plasma gewonnen. Die Atmungsorgane werden sofort danach makroskopisch und histologisch auf Schädigungen durch die Narkosegase untersucht.

Die Effekte der drei Gase CO₂, Isofluran und Sevofluran in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen werden untereinander bzw. wenn möglich, gegen eine Luftkontrolle verglichen. Durch die Abwägung aller Parameter soll das am besten geeignete Narkosegas herausgefunden werden, das zuverlässig eine Narkose zur Tötungseinleitung erzeugt und dabei möglichst wenig Stress verursacht.

2 Tiere, Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Mausstämme

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Mausstämme verwendet, die häufig in der biomedizinischen Forschung eingesetzt werden. Als Auszuchtstamm wurde der NMRI-, als Inzuchtstamm der C57Bl/6J-Stamm gewählt. Letzterer stellt den häufigsten Hintergrundstamm für genetisch veränderte Mausstämme dar.

2.1.2 Tierzahl

Die Versuchsgruppen bestanden zu gleichen Teilen aus männlichen und weiblichen Tieren. Die Tiere waren zwischen 8 und 23 Wochen alt. Die Böcke des NMRI-Stammes wogen durchschnittlich $37,4 \pm 3,8$ g, die Weibchen $30,8 \pm 3,6$ g. Die männlichen Mäuse des C57Bl/6-Stammes wogen $27,6 \pm 2,3$ g und die weiblichen $20,8 \pm 2,0$ g. Es wurden 2 Mausstämme mit je 8 Versuchsgruppen bei einer Gruppengröße von je 16 Tieren verwendet. Die Tiere wurden nicht eigens für diese Versuche gezüchtet, sondern stammten als Überzahl aus der institutseigenen Zucht oder sie fungierten zuvor bei einem anderen Versuch als Kontrolltiere. Die letztgenannten Tiere waren keinen oder geringgradigen Belastungen, wie NaCl-Injektion, ausgesetzt. Die durchgeführten Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde genehmigt (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, Genehmigungsnummern G 0460/09, G0123/10).

2.1.3 Haltungsbedingungen

Zur Zucht und Haltung der Mäuse dienten die institutseigenen Räumlichkeiten, die dafür eine Zulassung vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin haben. Es herrschten folgende Standardbedingungen: Raumtemperatur 23 ± 1 C°, relative Luftfeuchtigkeit $60 \pm 5\%$, zwölfständiger Hell-Dunkel-Rhythmus mit einer Lichtphase von 5:00-17:00 Uhr.

Die Tiere wurden in gleichgeschlechtlichen Gruppen (2 - 6 Tiere) in Makrolon®-Käfigen Typ III auf Standardeinstreu (sniff® Lignocel 3-4 S, Soest, Deutschland) mit Zellstoff und Papprollen als Nistmaterial gehalten. Den Mäusen stand Trinkwasser und pelletiertes Standardfutter (sniff® R/M-H, Soest, Deutschland) *ad libitum* zur Verfügung. Ab der Habituations- und Versuchsphase dieses Vorhabens galten die gleichen Bedingungen, jedoch wurden die Mäuse einzeln gesetzt, um die Entwicklung einer Anticipatory Anxiety beim Herausnehmen aus der Gruppe zu vermeiden (Borsini et al., 1989).

2.1.4 Verwendete Substanzen, Applikationsformen und Expositionszeit

Es wurde CO₂ aus Druckgasflaschen (Air Liquide Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet. Der Gasfluss konnte über einen für CO₂ geeigneten Druckminderer mit Flowmeter (Vulkan–Effekt mit Flowmeter, gastechnik24 KG, Solingen, Deutschland) reguliert werden. Als Inhalationsanästhetika wurden Isofluran (Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) und Sevofluran (Sevorane®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) eingesetzt. Sie wurden mittels eines eigens umgebauten Narkosegerätes (Dräger Sulla®, Dräger Medical GmbH, Lübeck, Deutschland) und entsprechenden Präzisionsverdampfern (Dräger Vapor® 19.1 Isoflurane, 5% und Dräger Vapor® 19.3 Sevoflurane, 8%, Dräger Medical GmbH, Lübeck, Deutschland) verabreicht. Der Umbau erlaubte eine Gasflussregulation über ein Flowmeter, die Anreicherung des Gases mit den anästhetisch wirkenden Substanzen und eine direkte Einleitung des Narkosegases in die Narkosebox. Als Träger- und Kontrollgas diente Luft aus Druckgasflaschen (Air Liquide Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland).

Zum Einsatz kam CO₂ in einer Konzentration von 100% mit einer niedrigen, mittleren und hohen Einfüllrate. Je höher die Einfüllrate gewählt wurde, desto schneller stieg die CO₂-Konzentration in der Narkosekammer. Isofluran und Sevofluran wurden mit Präzisionsverdampfern in den damit zu erreichenden Maximalkonzentrationen und in der niedrigeren, zur Narkoseerhaltung empfohlenen Konzentration von 1,5 MAC (Minimale alveoläre Konzentration) verabreicht (Eger, 1981).

Die maximale Expositionszeit betrug 300 s. Während dieser Zeitspanne sollten alle Mäuse das chirurgische Toleranzstadium erreichen, das dem Ausfall des Zwischenzehenreflexes und einer tiefen Narkose entspricht. Der Zeitraum orientiert sich an Untersuchungen, die mit den hier verwendeten niedrigen Isofluran- und Sevoflurankonzentrationen und niedrigen CO₂-Einfüllrate vergleichbar sind. In Studien an Mäusen, die in eine mit 1,3 MAC Isofluran vorgefüllte Kammer verbracht wurden, trat der Verlust des Zwischenzehenreflexes nach ca. 290 s auf, bei 1,3 MAC Sevofluranexposition nach ca. 124 s (Wiklund et al., 2008). In einer weiteren Untersuchung an Mäusen war nach 192 s eine reflektorische Atmung bei Exposition mit CO₂ mit einer Einfüllrate von 20 KV%/min festzustellen (Corbach, 2006). Eine reflektorische Atmung tritt erst in sehr tiefer Narkose auf. Bei höheren Gaskonzentrationen und höheren Einfüllraten tritt eine schnellere Narkoseinduktion ein.

Als Vergleich zu den Narkosegasen diente Luft mit einer Einfüllrate von 10 Litern pro min. Erläuterungen zu den jeweiligen Narkosegasen und der Kontrolle finden sich in Tab. 2.1.

Tab. 2.1 Narkosegase und Kontrolle

Abkürzung	Erläuterung
CO₂ 20	Langsame Füllung der Narkosekammer mit 100% CO₂ mit einer Einfüllrate von 20% des Kammervolumens pro Minute (KV%/min) (entspricht hier 2,8 Litern pro Minute) nach Hawkins und Mitarbeiter (2006).
CO₂ 60	Schnellere Füllung der Narkosekammer mit 100% CO₂ mit einer Einfüllrate von 60 KV%/min (entspricht hier 8,4 Litern pro Minute) in Anlehnung an Corbach (2006) und AVMA (2007).
CO₂ 100	Rasche Füllung der Narkosekammer mit 100% CO₂ mit einer Einfüllrate von 100 KV%/min (entspricht hier 14 Litern pro Minute), dies kommt einer <i>vorgefüllten</i> Kammer mit hoher CO ₂ -Konzentration nahe (Bundesamt für Veterinärwesen der Schweiz, 1993).
Iso 2%	Isofluran 2% entspricht 1,5 MAC (minimale alveoläre Konzentration) bei der Maus (Mazze et al., 1985). Bei 1 MAC reagiert die Hälfte der Tiere nicht mehr auf einen Hautschnitt. Bei 1,5 MAC kann man bei allen Tieren von einer ausreichenden chirurgischen Narkosetiefe ausgehen. Da normale Narkosekammern klein sind und das Tier sich rasch in einer unverdünnten Narkosegasatmosphäre befindet, wird, um diesem zu entsprechen, die mit dem Verdampfer maximal mögliche Einfüllrate von 71 KV%/min (entspricht hier 10 Litern pro Minute) gewählt.
Iso 5%	Isofluran 5% ist die Maximalkonzentration mittels Präzisionsverdampfer. Einfüllrate s. o.
Sevo 4,8%	Sevofluran 4,8% entspricht 1,5 MAC (minimale alveoläre Konzentration) bei der Maus (Ichinose et al., 1998). Einfüllrate s. o.
Sevo 8%	Sevofluran 8% ist die Maximalkonzentration mittels Präzisionsverdampfer und wird in dieser Konzentration auch zur Narkoseeinleitung bei Kindern eingesetzt (Baum et al., 1997). Einfüllrate s. o.
Luft	Als Kontrolle zu den Narkosegasen dient Luft mit einer Einfüllrate von 71 KV%/min (entspricht hier 10 Litern pro Minute) für 300 s.

2.2 Versuchsaufbau und -ablauf

Die Untersuchungen fanden in einem Nebenraum, der direkt an den Haltungsraum anschloss, statt. Die Habituation der Mäuse an das Handling und die Narkosekammer erfolgte zwischen 9:00 und 11:00 Uhr und zwischen 14:00 und 16:00 Uhr. Die Versuche wurden zwischen 8:30 und 11:30 Uhr durchgeführt.

Die Wirkungen unterschiedlicher Inhalationsnarkotika auf den Organismus und das Wohlbefinden des Tieres von Beginn der Narkoseeinleitung bis zum Eintritt der chirurgischen Toleranz wurden untersucht. Die chirurgische Toleranz wurde mit Hilfe des Zwischenzehenreflexes überprüft. Der Untersuchungszeitraum begann mit der Gaseinleitung und endete nach maximal 300 s, falls nicht schon davor die chirurgische Toleranz eingetreten war. Sonst markierte die chirurgische Toleranz den Endpunkt der Video- und Tonaufzeichnungen bzw. den Zeitpunkt der Dekapitation und Probennahmen. Tiere, die nach 300 s nicht die chirurgische Toleranz erreichten, wurden ebenfalls dekapitiert.

2.2.1 Versuchsaufbau

Als Narkosekammer diente ein Makrolon®-Käfig Typ III, dessen Volumen 14 l betrug. Im dafür konstruierten Deckel waren ein Zufluss für das Narkosegas und seitlich Öffnungen für die Abluftschläuche angebracht. Unterhalb des Zuflusses befand sich eine 7 cm x 10 cm große Acrylglasplatte mit Löchern, um das zuströmende Gas zu verwirbeln und so für eine gleichmäßige Durchmischung zu sorgen. Diese Konstruktion wurde an Corbach (2006) angelehnt (für eine Bauzeichnung s. Anhang 9.1). Den Untergrund bildete ein Einlegeboden aus Acrylglas mit rauer Oberfläche, der von außen zur Überprüfung des Stellreflexes angehoben werden konnte (s. Abb. 2.2, A – C). Ein für hörbaren Schall und Ultraschall geeignetes Mikrofon (Ultraschallsensor von Knowles, Dover Corporation, Downers Grove, Illinois, USA; Steckverbindung von Neutrik® NC MX, Dachau, Deutschland) wurde in die Kammer gehängt und mit einem entsprechenden Aufnahmegerät (Avisoft Ultrasoundgate 116) verbunden, welches an ein Laptop (HP Pavilion dv2899, Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, Deutschland) mit dazugehöriger Software (Avisoft-RECORDER 2.7, Berlin, Deutschland) angeschlossen war. Zwei Videokameras (Panasonic® HDC-TM 700, Kadoma Osaka, Japan und Canon PowerShot SX 200 IS, Tokyo, Japan) wurden zur Aufnahme des Verhaltens und der Atembewegungen in der Nähe der Narkosekammer platziert. Eine Stoppuhr stand bereit.

2.2.2 Versuchsablauf

Eine Übersicht über den Versuchsablauf gibt Abb. 2.1.

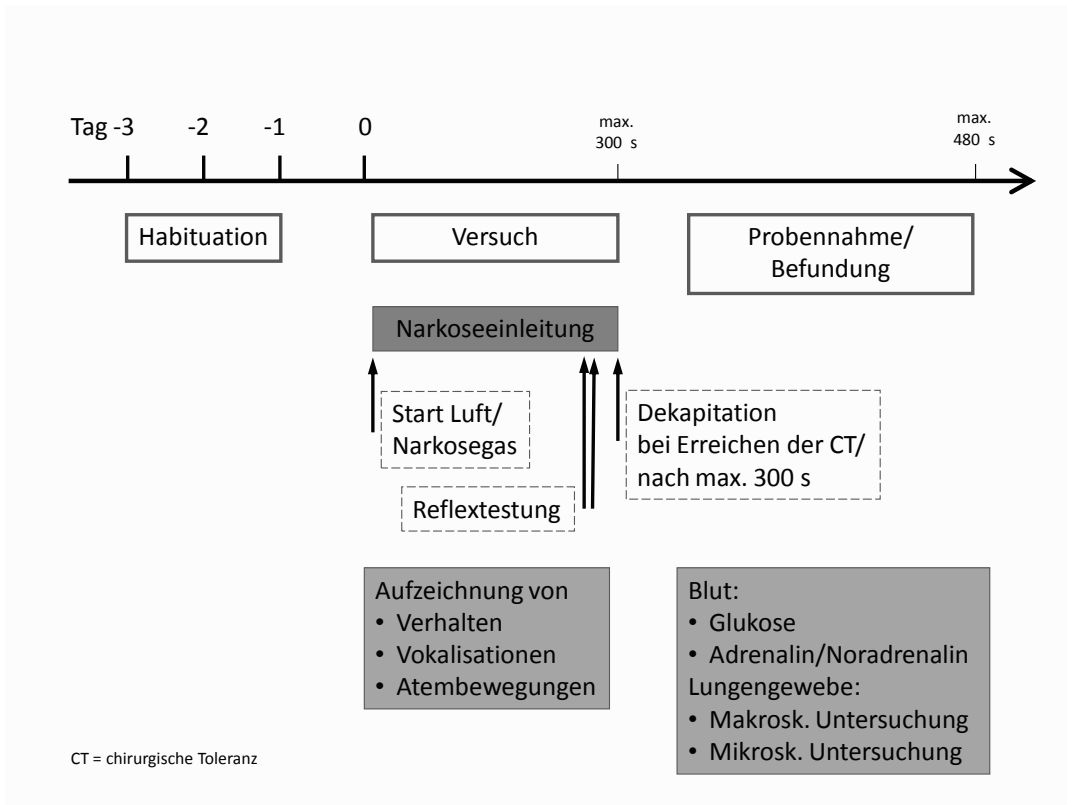


Abb. 2.1 Versuchsablauf

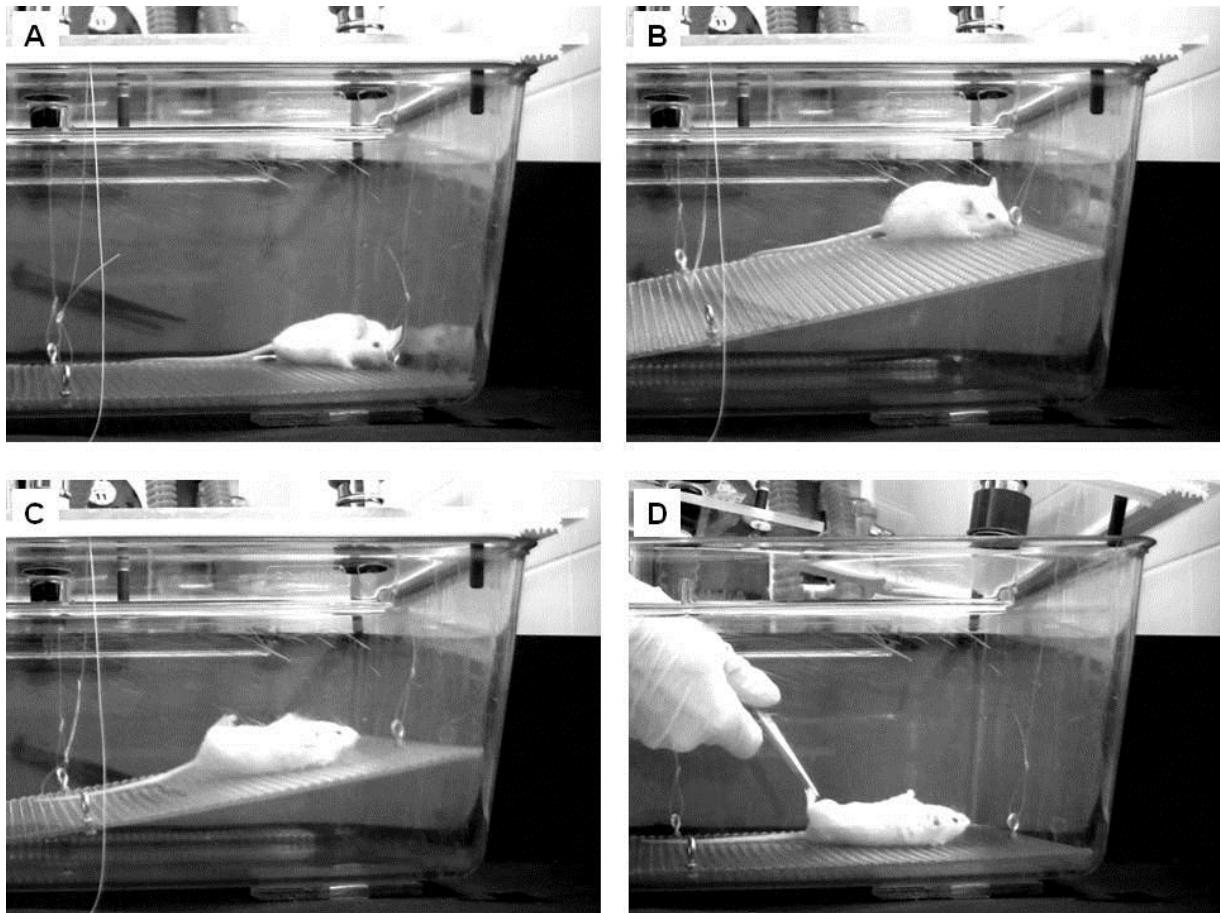


Abb. 2.2 Reflextestung

- A–C Zur Überprüfung des Stellreflexes wurde der Einlegebodenboden schräg gestellt, um die Maus um ihre Achse zu rollen.
- D Zur Testung des Zwischenzehenreflexes wurde mit einer Pinzette in die Hautfalte zwischen den Zehen eines Hinterlaufes gekniffen.

- **Habituation**

Vor dem eigentlichen Versuch wurde jede Maus über 3 Tage für jeweils 3 Minuten zur Stressminimierung an die Kammer gewöhnt. Drei Tage sind für die Habituation an die neue Umgebung ausreichend (Podhorna und Brown, 2002). Jedes Tier bekam für das Training einen eigenen Versuchskäfig zugeordnet, der den tiereigenen Geruch über den gesamten Versuchszeitraum beibehielt. Nur der Einlegeboden und die Deckelkonstruktion wurden nach jedem Tier geruchsneutral mit warmem Wasser und Spülmittel (Frosch Sensitiv Vitamin Spülmittel, parfümfrei, Erdal GmbH, Hallein, Österreich) gereinigt und abgetrocknet.

- **Versuch**

Für den Versuch wurde die Maus in die Narkosekammer gesetzt. Eine Minute lang konnte die Maus die Kammer explorieren, dann wurde die Gaseinleitung gestartet. Die Narkosegaskonzentration stieg in der Kammer kontinuierlich an. Die Gasexposition dauerte von Beginn der Gaseinleitung bis Erreichen der CT bzw. maximal 300 s. Das Verhalten und die Atembewegungen wurden auf Video aufgenommen und die Lautäußerungen aufgezeichnet.

- **Reflextestung**

Der Eintritt der Bewusstlosigkeit wurde anhand des Stellreflexes überprüft. Das Erreichen der chirurgischen Toleranz wurde mit Testung des Zwischenzehen- und Lidreflexes verifiziert.

- **Probennahme und Befundung**

Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz wurde das Tier sofort durch Dekapitation getötet. Dies war nötig, da beim Abbruch der Narkosegaszufuhr das Tier rasch das Bewusstsein wieder erlangen würde.

Im Anschluss fand die Blutentnahme für die Bestimmung von Glukose und den Stresshormonen statt. Die Schleimhäute der Augen und des Atemtraktes wurden makroskopisch untersucht. Die Lunge und Trachea wurden präpariert und entnommen, gewogen, fotografiert und in Fixierlösung verbracht. Die makroskopische Befundung, Gewebeentnahme, Wiegen und Fotoaufnahme fanden in maximal 180 s statt.

2.3 Untersuchungsmethoden und -parameter

2.3.1 Körpergewichtsmessung

Die Mäuse wurden am letzten Eingewöhnungstag mit einer Präzisionswaage (Satorius AG, Göttingen, Deutschland) gewogen. Das Körpergewicht wurde für die Berechnung des relativen Lungengewichtes benötigt.

2.3.2 Reflexausfälle

Zur Überprüfung des Stellreflexes wurde, nachdem das Tier während der Narkoseeinleitung zum ersten Mal für 10 Sekunden regungslos liegen blieb, der Einlegebodenboden schräg gestellt, um die Maus um ihre Körperachse zu rollen. Richtete sich das Tier nicht mehr aus der Seiten- oder Rückenlage auf, so galt der Reflex als ausgefallen. Zeigte die Maus Aufrichtebewegungen, so wurde der Stellreflex gegebenenfalls mehrmals in 10-sekündigen Abständen nach wieder eingetretener Relaxation überprüft.

An den Ausfall des Stellreflexes schloss sich die Testung des Zwischenzehenreflexes an. Hierzu wurde mit einer Pinzette in die Hautfalte zwischen den Zehen eines Hinterlaufes gekniffen. Zeigte die Maus keine Abwehrbewegungen, so galten die Reflexe als erloschen. Reagierte die Maus mit Wegziehen der Gliedmaße, so wurde der Reflex gegebenenfalls mehrmals in folgenden Zeitabständen getestet: 10, 10, 15, 15, 30, 30, 60, 60 s.

Nach Erlöschen des Zwischenzehenreflexes wurde der Lidreflex durch saches Berühren des medialen Augenwinkels mit der abgerundeten Spitze einer anatomischen Pinzette getestet. Blinzelte das Tier nicht, so galt dieser Reflex als ausgefallen.

Die Latenzzeiten bis zum Ausfall der einzelnen Reflexe wurden als Sekundenangaben notiert.

2.3.3 Wirksamkeit und Zuverlässigkeit der Narkosebehandlung

Das Erlöschen des Zwischenzehenreflexes entspricht dem Erreichen der chirurgischen Toleranz (CT) (Westhues und Fritsch, 1961; Arras et al., 2001; Flecknell, 2009b), bei der von einer Schmerz- und Empfindungslosigkeit ausgegangen werden kann. Das Erreichen der CT sollte maximal 300 s dauern (s. 2.1.4). Die Wirkung einer Substanz ist von ihrer Konzentration abhängig und wird mit Hilfe von Dosis-Wirkungskurven beschrieben. Bei Narkosegasen entspricht die ED_{50} dem MAC-Wert (de Jong und Eger, 1975). Aus praktischer Sicht ist diese Dosisangabe für den Anästhesisten wenig sinnvoll. De Jong und Eger (1975) schlagen deshalb eine ED_{95} bzw. AD_{95} , eine anästhetische Dosis, bei der 95% der Patienten narkotisiert sind und nicht mehr mit Bewegung auf einen Schmerzreiz reagieren, vor.

So betrachteten wir in vorliegender Arbeit die Narkosegasbehandlung bei einem einzelnen Tier als wirksam, wenn es die CT innerhalb von 300 s erreichte. Erreichten mindestens 15

von 16 Tieren (93,8%) die CT innerhalb von 300 s, so galt die Narkosegasbehandlung als wirksam und zuverlässig.

In vorliegender Untersuchung wurden auch die Behandlungsgruppen, bei denen mindestens 14 von 16 Tieren (87,5%) die CT innerhalb von 300 s erreichten, mit betrachtet und in die statistische Auswertung mit einbezogen.

Erreichte ein Tier innerhalb von maximal 300 s nicht die CT, wurden sein Zustand und die Narkosephase notiert. Von der weiteren Auswertung wurde es jedoch ausgeschlossen. Wurden mindestens 3 von 16 Tieren von einer Behandlungsgruppe ausgeschlossen, so wurde die Narkosebehandlung zur Euthanasieeinleitung in vorliegender Arbeit als ungenügend wirksam und zuverlässig eingestuft und die gesamte Gruppe von der weiteren statistischen Auswertung ausgeschlossen.

2.3.4 Phasen der Narkoseeinleitung

Alle eingesetzten Gase, außer der Luftkontrolle, erzeugen eine Narkose. Die Narkoseeinleitung verläuft in mehreren aufeinander folgenden Phasen, die sich voneinander abgrenzen lassen. Die Einteilung erfolgte aufgrund bestimmter Verhaltensweisen und Reflexausfälle, die sich aus den Auswertungen der Videoaufzeichnungen ergaben. Die Latenzzeiten bis zum Eintritt der einzelnen Phasen wurden anhand der Videoaufzeichnungen ermittelt und in Sekunden angegeben.

2.3.5 Errechneter Narkosegas-Konzentrationsverlauf

Unter der Annahme, dass zu jedem Zeitpunkt das einströmende Gas sich vollständig mit dem in der Kammer befindlichen Gas vermischt, lässt sich die Konzentration (c) zu jedem Zeitpunkt (t) mit folgender Formel (Corbach, 2006) berechnen:

$$\frac{c_{in}-c}{c_{in}-c_0} = e^{-\left(\frac{Q}{V}\right)t}$$

c_{in}	Konzentration des einströmenden Gases
c_0	Konzentration des Gases in der Kammer zum Zeitpunkt $t = 0$ (Beginn des Gaseinstroms)
Q	Volumenstrom des einströmenden Gases
V	Volumen der Kammer

2.3.6 Blutanalyse

Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz bzw. nach maximal 300 s Gaseinstrom wurde die Maus sofort im Anschluss mit einer Nagerguillotine dekapitiert und das Blut direkt in ein Probenröhrchen getropft oder mit einer 1-ml-Spritze vom Guillotineboden aufgezogen. Es wurde darauf geachtet, dass kein Urin oder schaumiges Sekret aus der Trachea in die

2 Tiere, Material und Methoden

Blutprobe gelangte. Alle Blutentnahmen fanden in weniger als 120 s statt. Die Guillotine wurde nach jedem Tier mit Wasser gereinigt und abgetrocknet.

2.3.6.1 Glukosebestimmung aus dem Vollblut

Die Bestimmung der Glukose erfolgte sofort nach Abnahme mit einem Blutzuckermessgerät (Ascensia® Dex2®, Bayer HealthCare AG, Leverkusen) und Teststreifen (Autodisc®, Bayer HealthCare AG, Leverkusen) mit einem Messbereich 10-600 mg/dl entsprechend 0,6-33,3 mmol/l. Die Glukosekonzentration wurde in mmol/l angegeben.

2.3.6.2 Katecholaminbestimmung aus dem Plasma

Das Blut wurde in auf Eis gekühlten Probengefäßen (420 A weiß Katecholamine 1ml, Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) aufgefangen, zentrifugiert (5°C, 10 min, 4000 rpm) und der Plasmaüberstand gewonnen. Zur weiteren Probenaufbereitung wurde das Testkit von CHROMSYSTEMS GmbH (München, Deutschland) für die HPLC-Bestimmung von Katecholaminen verwendet. Es beinhaltet die mobile Phase, den internen Standard, den Extraktionspuffer, den Waschpuffer, den Elutionspuffer, die Probenaufbereitungskartuschen und den wässrigen Kalibrationsstandard. Da nur sehr geringe Mengen an Plasma zur Verfügung standen, wurden die Arbeitsvorschriften des Herstellers modifiziert. Die Proben setzten sich deshalb wie folgt zusammen (s. Tab. 2.2):

Tab. 2.2 Probenzusammensetzung zur HPLC-Katecholaminbestimmung

Behandlungs- gruppe	Plasma [µl]	Verdünnungslösung 0,9% NaCl [µl]	Interner Standard [µl]
CO ₂ 20	100	800	100
CO ₂ 60	100	800	100
CO ₂ 100	100	800	100
Iso 2%	200	725	75
Iso 5%	200	725	75
Sevo 4,8%	200	725	75
Sevo 8%	200	725	75
Luft	200	725	75

Durch die weitere Aufbereitung wurde ein Eluat gewonnen, von dem jeweils 20-60 µl der HPLC (High-Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatografie) mit elektrochemischer Detektion zugeführt wurden. Das System bestand aus Geräten der Firma Waters (Milford, Massachusetts, USA). Es wurden die Pumpe Modell 510, der Autosampler 717 und der elektrochemische Detektor 460 verwendet. Die Messung erfolgte mit einem Fluss von 0,8 ml/min und einem Arbeitspotential von 400 mV. Die Daten wurden

mit der Chromatographiesoftware Peak Net™ (Automatisierungssoftware, Version 5.1, Dionex, Sunnyvale, California, USA) erfasst. Die Konzentrationen der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin wurden in ng/ml angegeben.

2.3.7 Verhaltensanalyse

Die Analyse des Verhaltens stützt sich größtenteils auf die Comprehensive Observational Assessment-Methode (umfassende Bewertung durch Beobachtung) von Irwin (1968), die entwickelt wurde, um Wirkungen von Pharmaka bei der Maus zu charakterisieren. Sie ist sehr umfangreich und sehr detailliert in den einzelnen Beschreibungen der Verhaltensweisen und deren Abstufungen und dafür ausgelegt, akut auftretende sowie chronisch anhaltende Zustände zu erfassen. Wo es nötig schien, wurde diese Methode durch weitere Verhaltensanalysen ergänzt, wie der des Putzverhaltens und der Ultraschallvokalisation. Die gängigen Verhaltenskataloge zur Beurteilung von Leiden und Schmerzen bei Labornagern, (z. B. FELASA, 1994; National Research Council, 2008), scheinen ungeeignet, da ihr Schwerpunkt auf der Feststellung von chronischem, d. h. über Stunden und Tage andauerndem, Stress liegt.

Bei der Verhaltensanalyse der Videoaufnahmen werden die für diese Untersuchung relevanten und tatsächlich aufgetretenen Verhaltensweisen nachfolgend aufgeführt.

2.3.7.1 Körperhaltung

Die Körperhaltung gibt Auskunft über den Wachheitsgrad der Maus. Mit zunehmender Narkose geht die zuvor aufrecht stehende oder sitzende Haltung in eine liegende bis hin zu einer vollständig flachen, relaxierten Körperhaltung über.

Die Körperhaltung wurde verbal in ihrem Verlauf beschrieben.

2.3.7.2 Motorische Aktivität

Auch die motorische Aktivität spiegelt den Wachheits- sowie den Erregungsgrad (engl. arousal) wider. Sie reicht von keiner Aktivität und Ruhen bis zu extrem heftigen Bewegungen.

- **Lokomotorischen Aktivität**

In vorliegender Arbeit wurde die Lokomotion anhand eines Punktesystems nach Niel und Weary (2006), welches wir an Mäuse anpassten, beschrieben. Es wurde ein Punkt vergeben, sobald die Maus mit ihrer Körpermitte die Mittellinie (ML) senkrecht zur Längsseite der Narkosebox überquerte. Ein Zurückwenden innerhalb von 3 s wurde nicht als neuer Punkt gezählt. Je höher die Punktezahl, desto schneller und erregter war die Maus.

- **Rearings**

Das Aufrichten auf beide Hinterbeine (engl. rearing) dient der Erkundung einer neuen Umgebung und Situation und wird von Mäusen, die sich in einer veränderten, jedoch zuvor vertrauten Umgebung, befinden, häufiger gezeigt (Lever et al., 2006). Die Rearings finden mit Kontakt der Vorderpfoten zu den Wänden oder frei im Raum statt.

- **Putzverhalten**

An der Quantität und Qualität der Putzbewegungen lässt sich die Stresshaftigkeit einer Situation abschätzen. In einer stressfreien oder -armen Situation kann man Putzen als Komfortverhalten bei Mäusen beobachten (Kalueff und Tuohimaa, 2004). Hierbei findet laut den Autoren keine Unterbrechung statt, d. h. die Pausen zwischen den einzelnen Bewegungen liegen unter 5 s. Die Putzbewegungen werden in cephalocaudaler Richtung in nachstehender Reihenfolge durchgeführt: Vorderpfotenlecken, „Waschen“ von Nase und Gesicht, Putzen des Kopfes, Belecken und Kratzen des Körperfells, Belecken der Hinterbeine und schließlich Schwanz- und Genitalienpflege. Bei gestressten Mäusen kann man eine erhöhte Anzahl von Putzhandlungen, länger als für 5 s unterbrochene Bewegungen und inkorrektes Aneinanderreihen der Putzstadien feststellen (Kalueff und Tuohimaa, 2004).

Die motorische Aktivität wurde verbal beschrieben. Die Gesamtpunktzahl der Überquerungen der Mittellinie (lokomotorische Aktivität) für das Einzeltier, die Gesamtzahl der Rearings für das Einzeltier und die Gesamtzahl der Putzperioden für das Einzeltier wurden auf eine Minute standardisiert. Dabei wurde bei den Behandlungsgruppen die Gesamtzahl für das Einzeltier durch die Zeit in Sekunden bis Eintritt der völligen Muskelrelaxation geteilt, mit 60 multipliziert und als Anzahl/min angegeben. Bei den Kontrolltieren wurde ebenso verfahren, hier wurde jedoch die Gesamtzahl für das Einzeltier durch 300 s (Luftstromexposition) geteilt, mit 60 multipliziert und als Anzahl/min angegeben. Das Putzverhalten wurde zusätzlich anhand oben beschriebener Kriterien als Komfortverhalten (normales Putzverhalten) oder als gestresstes Verhalten klassifiziert.

2.3.7.3 Konvulsionen

Während der Narkoseeinleitung und -ausleitung im zweiten Anästhesiestadium, dem Exzitationsstadium, können Konvulsionen auftreten, besonders wenn dieses langsam durchschritten wird. Es besteht eine erhöhte Ansprechbarkeit auf noxische Reize (Ibrahim et al., 2001; Archer und Roth, 2007). Es gibt klonische Krampfanfälle mit abwechselnder Kontraktion und Relaxation der willkürlichen Muskulatur, denen Running Excitement vorausgehen kann. Zu den klonischen Konvulsionen werden auch die Popcorn-Konvulsionen

gezählt. Opisthotonus ist ein tonischer Krampfanfall, bei denen Teile der willkürlichen Muskulatur sich anhaltend in Kontraktion befinden.

- **Running Excitement und klonischer Krampf**

Der klonische Krampfanfall wird beschrieben als koordinierte, unsymmetrische Konvulsionen mit natürlichen, zielgerichteten Bewegungen aller vier Gliedmaßen, die wie versuchtes Laufen oder Rennen in Bauch- oder Seitenlage aussehen (Irwin, 1968). Ihnen kann ein sog. Running Excitement (aufgeregtes Laufen) mit leichtem Klonus vorausgehen.

- **Popcornkonvulsionen**

Eine weitere Form des klonischen Krampfyps wird sehr bildlich als Popcorn-Konvulsion aufgeführt, wobei das Tier wiederholt in die Luft bzw. gegen den Deckel der Narkosebox springt oder „poppt“ (Irwin, 1968).

- **Opisthotonus (tonischer Krampf)**

Als Opisthotonus wird eine tonische Überstreckung der Nacken-, Rücken- und Schwanzmuskulatur bezeichnet, wobei der gesamte Körper nach dorsal gebogen ist.

Es wurden die Anzahl der Tiere und der entsprechende Anteil der Tiere einer Behandlungs- oder Kontrollgruppe in % dargestellt, bei denen Konvulsionen, getrennt nach Running Excitement, klonischer Krampfanfall und Opisthotonus auftraten. Die Gesamtzahl der Popcorn-Konvulsionen für ein Einzeltier oder ihnen ähnliche Verhaltensweisen, wie Springen, wurden auf eine Minute standardisiert. Dabei wurde bei den Behandlungsgruppen die Gesamtzahl für das Einzeltier durch die Zeit in Sekunden bis Eintritt der völligen Muskelrelaxation geteilt, mit 60 multipliziert und als Anzahl/min angegeben. Bei den Kontrolltieren wurde ebenso verfahren, hier wurde jedoch die Gesamtzahl für das Einzeltier durch 300 s (Luftstromexposition) geteilt, mit 60 multipliziert und als Anzahl/min angegeben.

2.3.7.4 Hypotoner Gang und Ataxie

Als weitere Verhaltensweisen, die in der Narkoseeinleitung auffallen, sind der hypotone und der ataktische Gang zu nennen. Sie betreffen vornehmlich das erste Anästhesie-, das sog. Analgesiestadium, können aber auch noch in das zweite Stadium hineinreichen. Der hypotone Gang tritt aufgrund von Muskelschwäche der Gliedmaßen oder aufgrund einer Lähmung auf (Irwin, 1968). Das Tier ist nicht in der Lage, sein Gewicht zu tragen, jedoch kann es ohne zu torkeln sich auf einer geraden Linie vorwärts bewegen. Irwin (1968) nennt folgende Abstufungen: normaler Gang, leicht hypotoner Gang, wobei das Becken leicht nach unten geneigt und Hintergliedmaßen leicht nach hinten gerichtet sind, mäßig hypotoner Gang mit geneigtem Becken und seitlich ausgestellten Hintergliedmaßen, mäßig bis stark

2 Tiere, Material und Methoden

hypotoner Gang mit flachem Becken und nach seitlich/hinten ausgestellten Hintergliedmaßen sowie ein stark hypotoner Gang, wobei der Bauch des Tieres flach aufliegt und die Hintergliedmaßen extrem nach seitlich/hinten gestreckt sind oder vollständig hinterher gezogen werden.

Der ataktische Gang rührt von der Unfähigkeit her, die Muskeln des Körperstammes, des Beckens und der Gliedmaßen stimmig zu bewegen. Das Tier kann sich nicht auf einer geraden Linie vorwärtsbewegen, es schwankt und torkelt. Bei einer ausgeprägten Ataxie fällt es auf die Seite.

Hypotoner Gang und Ataxie wurden verbal und im Verlauf beschrieben. Es wurden die Anzahl der Tiere und der entsprechende Anteil der Tiere einer Behandlungs- oder Kontrollgruppe in % angegeben, bei denen hypotoner und/oder ataktischer Gang festgestellt wurden.

2.3.7.5 Vokalisationen

Die Tonaufnahmen wurden mit einer Analysesoftware (Avisoft-SASLab Pro 4.15, Berlin, Deutschland) nach Vokalisationen im hörbaren sowie im Ultraschallbereich bis 100 kHz gescannt und deren Frequenz und Dauer bestimmt. Irwin (1968) wertet hörbare Vokalisationen bei Mäusen als Zeichen von Irritiertheit und/oder Ängstlichkeit.

Die Vokalisationen wurden hinsichtlich ihrer Dauer und Frequenz beschrieben.

2.3.8 Untersuchung des Atmungssystems

Es wurden die Veränderungen der Atembewegungen unter Gasexposition beurteilt und Schleimhäute, Tracheal- und Lungengewebe makroskopisch untersucht. Hierbei wurde auch das relative Lungengewicht ermittelt sowie die Lungengröße und oberflächlich sichtbare Petechien und Blutungen morphometrisch bestimmt. Für den mikroskopischen Teil der Untersuchung wurden komplette Lungen- und Trachealschnitte angefertigt, die pathohistologisch ausgewertet wurden. Der Luftgehalt wurde an Schnittbildern morphometrisch bestimmt.

Die histologischen und morphometrischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. J. Plendl und Frau Dr. H. Hünigen aus dem Institut für Veterinär Anatomie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin durchgeführt.

2.3.8.2 Atembewegungen

Die Veränderungen der Atembewegungen wurden anhand der Videoaufzeichnungen bewertet. Die Atemfrequenz, die in Ruhe bei Mäusen ca. 250 Atemzüge pro Minute beträgt (Donovan et al., 2011), kann visuell nur grob abgeschätzt werden. Sie wurde deshalb im Vergleich zu der Anfangslage bei Beginn der Narkoseeinleitung als zunehmend oder abnehmend in ihrem weiteren Verlauf beschrieben. Die Atemtiefe und damit das

Atemzugvolumen, kann visuell ebenfalls nur grob abgeschätzt werden. Die Atemtiefe wurde in Relation zu der Anfangslage bei Beginn der Narkoseeinleitung als zu- oder abnehmend in ihrem weiteren Verlauf beschrieben. Besonders auffällige Atembewegungen, wie Niesen bei Schleimhautreizungen oder terminale Schnappatmung wurden notiert.

Die Veränderungen der Atembewegungen, gekennzeichnet durch die Atemfrequenz und die Atemtiefe, wurden verbal und im Verlauf beschrieben.

2.3.8.3 Makroskopische Untersuchung des Atemtraktes

- **Schleimhautschädigung**

Direkt nach Ausfall des Zwischenzehenreflexes bzw. nach maximal 300 s Gasexposition wurde die Maus aus der Narkosebox genommen und die Nasen- und Maulschleimhäute sowie die Konjunktiven wurden hinsichtlich Entzündungszeichen, wie Rötung, Schwellung und vermehrte Sekretion, untersucht. Der jeweilige Ausprägungsgrad wurde als nicht vorhanden, leicht, mittel oder stark beschrieben.

Es wurden jeweils die Anzahl der Tiere und der entsprechende Anteil der Tiere einer Behandlungs- oder Kontrollgruppe in % dargestellt, bei denen Rötung, Schwellung und vermehrte Sekretion der Schleimhäute in den jeweiligen Ausprägungen auftraten.

- **Trachealausfluss**

Nach der Dekapitation wurde die Schnittfläche des Halses untersucht. Bei vermehrter Sekretbildung in den Lungen bis hin zu einem Lungenödem quillt schaumig-seröses Sekret aus dem Anschnitt der Luftröhre. Der jeweilige Ausprägungsgrad wurde als nicht vorhanden, leicht, mittel oder stark beschrieben.

Es wurden die Anzahl der Tiere und der entsprechende Anteil der Tiere einer Behandlungs- oder Kontrollgruppe in % dargestellt, bei denen Trachealausfluss in den jeweiligen Ausprägungen auftraten.

- **Blutaspiration und Atelektase**

Im Anschluss an die Blutabnahme wurde die Lunge samt Luftröhre entnommen. Für die Präparation wurde der Thorax beidseits paramedian mit einer Schere eröffnet, das Sternum mit einem großen Rippenanteil entfernt, das Herz samt Herzbeutel abgetrennt, äußerst vorsichtig einen Teil der serösen Häute und das Fettgewebes des Mediastinums mit einer anatomischen Pinzette entfernt, um die Trachea freizulegen. Die Trachea wurde dann behutsam mit einer feinen Augenpinzette (anatomisch) gefasst und der craniale Teil durch Zug aus dem umliegenden Gewebe gelöst. Dann wurde durch leichtem Zug nach caudo-ventral die Lunge herausgehoben. Gleichzeitig löste man mit einer weiteren Pinzette vorsichtig die serösen Häute von der Lunge und entfernte die Speiseröhre und eventuell anhaftendes Fett- und Thymusgewebe.

2 Tiere, Material und Methoden

Es wurde notiert, ob Blut aspiriert wurde und ob Blut in der Trachea sichtbar war. Des Weiteren wurde der Befund Atelektase erfasst und notiert, ob die Lunge übermäßig retrahiert und die Lappenränder wie gequetscht erschienen.

Es wurden die Anzahl der Tiere und der entsprechende Anteil der Tiere einer Behandlungs- oder Kontrollgruppe in % dargestellt, bei denen Blutaspiration und Atelektase auftraten.

- **Relatives Lungengewicht**

Das Gewicht der Lunge samt Trachea wurde mit einer Feinwaage (Satorius AG, Göttingen, Deutschland) bestimmt und in mg angegeben. Mit Hilfe des zuvor bestimmten Körpergewichtes wurde das relative Lungengewicht nach folgender Formel

$$\text{relatives Lungengewicht [mg/g]} = \text{Lungengewicht [mg]} / \text{Körpergewicht [g]}$$

berechnet (Marino, 2012). Ein erhöhtes relatives Gewicht kann Hinweise auf den Füllungsgrad der Lunge mit Flüssigkeit, wie ein alveoläres Ödem, geben (Schaefer et al., 1964).

Das relative Lungengewicht wurde in mg/g angegeben.

- **Morphometrische Untersuchung: Lungengröße und oberflächlich sichtbare Petechien und Blutungen**

Die Lunge wurde auf eine schwarze, wasserabweisende Unterlage mit mm-Skala gelegt und mit der dorsalen Seite nach oben fotografiert (Canon EOS 350 D digital mit Canon 28-105 mm Objektiv, Tokyo, Japan). Der Abstand zwischen Objektiv und Lunge betrug ca. 65 cm.

Als Maß für die Lungengröße diente die dorsale Oberfläche der Lunge, die als zweidimensionale Flächenprojektion auf den Bildaufnahmen morphometrisch bestimmt wurde und in mm² angegeben wurde. Mit Hilfe der Morphometrie-Software NIS-Elements AR 3.2 (Nikon Instruments Europe B.V., Amstelveen, Niederlande) wurde die Fläche der Lungenlappen, nicht jedoch die der Trachea, markiert und deren Größe bestimmt. Die Lungengröße gibt Hinweise auf den Retraktionsgrad und den Füllungsgrad mit Luft oder Flüssigkeit.

Die Oberfläche einer normalen Lunge ist mit Serosa (Lungenfell) überzogen. Sie ist feucht, glatt, glänzend und durchsichtig. Das Lungengewebe erscheint aufgrund des feinen Lungenkapillarnetzes kräftig rosa gefärbt. Oberflächlich sichtbare Blutungen fallen als dunkelrote Bereiche auf, die punktförmig (Petechien) bis großflächig sein können. Die Blutung kann sich nur auf das Gewebe unter der Serosa beschränken oder bis in die Tiefe des Lungengewebes reichen. Der Ausprägungsgrad der oberflächlich sichtbaren Einblutungen liess sich mittels des Morphometrie-Softwareprogramms an den

Lungenaufnahmen bestimmen. Die dunkelroten Bereiche wurden markiert und automatisch ausgemessen. Die Gesamtfläche der dunkelroten Bereiche wurde als Flächenanteil der Gesamtlungenfläche in % angegeben.

In Tab. 2.3 sind alle oben erwähnten Parameter der makroskopischen Untersuchung zusammengefasst.

Tab. 2.3 Bewertungsschema für die makroskopischen Untersuchungsbefunde der Lunge

Befund	Ausprägungsgrad		Beschreibung
Schleimhäute (SH) des Atemtraktes und Konjunktiven: <ul style="list-style-type: none"> • Rötung • Schwellung • Sekretion 	0	nicht vorhanden	SH rosa, glatt u. glänzend, feucht
	1	geringgradig	SH rosarot, leicht verquollen, wenig seromuköses Sekret
	2	mittelgradig	SH rot, mäßig verquollen, mäßig Sekret
	3	schwergradig	SH dunkelrot, stark aufgequollen u. verdickt, viel Sekret
Schnittfläche des Thorax nach Dekapitation: <ul style="list-style-type: none"> • Sekretausfluss aus der Trachea 	0	nicht vorhanden	aus Trachea quillt kein Sekret
	1	geringgradig	aus Trachea quillt wenig schaumig-blutiges Sekret (geschätzt < 0,2 ml)
	2	mittelgradig	aus Trachea quillt mäßig viel schaumig-blutiges Sekret (geschätzt 0,2-0,4 ml)
	3	schwergradig	aus Trachea quillt viel schaumig-blutiges Sekret (geschätzt > 0,4 ml)
Trachea: <ul style="list-style-type: none"> • Blutaspiration 	0	nicht vorhanden	kein Blut in der Trachea erkennbar
	1	vorhanden	Blut in der Trachea erkennbar
Lunge: <ul style="list-style-type: none"> • Atelektase 	0	nicht vorhanden	Lunge physiologisch retrahiert, Lappenränder scharf begrenzt
	1	vorhanden	Lunge übermäßig retrahiert, Lappenränder teils wie zusammengequetscht
Lungengewicht: <ul style="list-style-type: none"> • Gewicht • relatives Gewicht 	mg mg/g		
Lungengröße	mm ²		dorsale Gesamtoberfläche, die durch die Lungenlappen begrenzt wird
Dorsale Oberfläche der Lunge: <ul style="list-style-type: none"> • Petechien und Einblutungen 	%		rot gefärbter Anteil an der dorsalen Gesamtoberfläche

2.3.8.4 Mikroskopische Untersuchung des Atemtraktes

Für die mikroskopische Untersuchung wurden Paraffinschnitte angefertigt. Die Lungenproben wurden für mindestens 14 Tage in 4%igem Paraformaldehyd fixiert und über eine aufsteigende Alkoholreihe in Paraplast® (Roth, Karlsruhe, Deutschland) überführt (s. Anhang 9.2.1.1). Die Proben wurden komplett am Stück (5 Lungenlappen und Trachea) in Paraplast® (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet, so dass die dorsale Lungenfläche parallel zur Schnittfläche zu liegen kam. Es wurden 6 µm dünne Schnitte mit einem Schlittenmikrotom (Jung-Histoslide 2000, Cambridge Instruments, Nußloch, Deutschland) angefertigt und mehrere Objektträger pro Probe bestückt. Es wurde darauf geachtet, dass möglichst alle Lungenlappen und die Trachea beinhaltet waren. Die getrockneten Schnitte wurden mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (s. Anhang 9.2.1.2) und mit den in Tab. 2.4 gelisteten Färbungen gefärbt. Die genaue Zusammensetzung der Färbung, die einzelnen Arbeitsschritte der Färbung sowie das Färbeergebnis können dem Anhang 9.2 entnommen werden. Der Schnitt wurde unter Kunstharz und einem Deckglas dauerhaft geschützt (s. a. Anhang 9.2.1.4.)

Tab. 2.4 Färbungen für die histologische Untersuchung

Färbung	Abkürzung	Beurteilung
Doppelfärbung mit Hämalaun-Eosin	HE	Gesamteindruck Blutaspiration, Blutstau, Einblutung, Atelektase, Gewebezerstörung (Bindegewebe mit Gefäßen, Alveolen)
Bindegewebsfärbung nach Ladewig	nach Ladewig	Gute Abgrenzung von Bindegewebe und Erythrozyten → Lokalisation der Einblutungen
Elastika-Färbung mit Resorcinfuchsin-Thiazinrot-Pikrinsäure	Elastika	Gerissene elastische Fasern darstellbar → Zerstörung der Alveolen

Für die mikroskopische Untersuchung standen ein Mikroskop (Axioskop HBO 50, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland; Mikroskopkamera: Nikon DS Ri 1, Nikon Instruments Europe B.V., Amstelveen, Niederlande) und das Software-Programm NIS-Elements AR 3.2 (Nikon Instruments Europe B.V., Amstelveen, Niederlande) für die Morphometrie zur Verfügung. Morphometrische Messungen sowie die histologische Untersuchung wurden an 4 Proben je Behandlungsgruppe (n = 16) durchgeführt, um zu beurteilen, ob sich Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen abzeichnen. Die Proben wurden von den Tieren, die das Behandlungsziel erreichten, zufällig per Los ausgewählt.

- **Histologische Untersuchung**

Die Schnitte wurden hinsichtlich der in nachfolgender Tab. 2.5 aufgelisteten Punkte von demselben Untersucher beurteilt. Ein erstes Befunden aller Schnitte diente als Einarbeitung und zur Findung eines eigenen Referenzrahmens. Die zweite Durchsicht wurde als eigentliche Befundung gewertet. Es wurde mit der 200-fachen Vergrößerung zur Übersicht und mit der 400-fachen Vergrößerung zur Detailbestimmung gearbeitet und der komplette Lungenschnitt meanderförmig durchsucht. Je Tier wurden 2 HE-Schnitte, 1 nach Ladewig gefärbter und 1 Elastika-Schnitt untersucht.

Es wurde die Anzahl der Tiere dargestellt, bei denen die entsprechenden Befunde in den jeweiligen Ausprägungsgraden auftraten.

- **Morphometrische Untersuchung: Luftgehalt**

Auf dem Lungenschnittbild können Alveolar- und Bindegewebsanteile der Lunge sowie Blutzellen differenziert werden. Die Alveolen sind physiologisch mit Luft gefüllt, was man als leeren Raum auch im Schnittbild erkennen kann. Der lufthaltige Anteil des Lungengewebes wurde morphometrisch an HE-Schnitten bei 400-facher Vergrößerung und bei denselben Softwareprogramm-Einstellungen bestimmt. Derselbe Untersucher wählte nach einem meanderförmigen Muster je 16 Bereiche der linken und der rechten Lungenhälfte aus. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Bereiche keine oder möglichst wenig Anteile von leerem Objektträger oder von der Trachea und großen Bronchien sowie von Gefäßen beinhalteten. Mit Hilfe des Programms ließen sich die Bereiche, die keine Zellen und keine Bindegewebsmatrix enthielten, markieren und deren Fläche bestimmen. Der mittlere lufthaltige Anteil (also zell- und matrixfreier Anteil) der jeweils 32 Bereiche wurde als % des Gesamtbereichs angegeben. Der Luftgehalt ist erniedrigt bei Einblutungen, Atelektasen und Gewebeerstörung.

Alle Parameter der mikroskopischen Untersuchung sind in Tab. 2.5 zusammengefasst.

2 Tiere, Material und Methoden

Tab. 2.5 Bewertungsschema für die mikroskopischen Untersuchungsbefunde der Lunge

Befund	Ausprägungsgrad		Beschreibung
Trachea: • Blutaspiration	0	nicht vorhanden	kein Blut in der Trachea erkennbar
	1	vorhanden	Blut in der Trachea erkennbar
Bronchien: • Blutaspiration	0	nicht vorhanden	kein Blut erkennbar
	1	geringgradig	an mindestens zwei unterschiedlichen Stellen Blut in den Bronchien
	2	mittelgradig	an mehreren unterschiedlichen Stellen Blut, zum Teil Bronchien komplett gefüllt
	3	schwergradig	in mehr als der Hälfte aller Bronchien Blut
Venen und Kapillaren: • Blutfülle/ -stau	0	nicht vorhanden	im vorliegenden Schnitt nicht erkennbar
	1	vorhanden	treten auf (mindestens die Hälfte der Gefäße ist komplett mit Blut gefüllt)
Lungengewebe: • Einblutungen in Alveolarsepten • Einblutungen in Alveolarraum • Atelektase • Ödem • Gewebeerstörung	0	nicht vorhanden	tritt im beobachteten Schnitt nicht auf
	1	geringgradig	tritt in mindestens einem Bereich auf
	2	mittelgradig	ist an mindestens zwei Stellen im Gewebe erkennbar
	3	schwergradig	mindestens 1/3 des Gewebes ist betroffen
	4	höchstgradig	starke Intensität und mindestens die Hälfte des Gewebes ist betroffen
Luftgehalt	%		Anteil am Gesamtlungengewebe

2.4 Auswertung und Statistik

Die statistische Analyse der Daten wurde nach Beratung mit Herrn F. Lotz vom Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung (Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin) durchgeführt.

Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mit dem Softwareprogramm SigmaPlot® (Version 11, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Qualitative Daten wurden in Tabellenform als Anzahl der Tiere und als der entsprechende Anteil der Tiere einer Behandlungs- oder Kontrollgruppe in % angegeben. Die Prozentangaben wurden auf eine Stelle bis nach dem Komma gerundet, daher kann die Summe in einigen Fällen größer 100% ergeben. Quantitative Daten wurden als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) graphisch dargestellt. Bei einer Gruppengröße $n = 4$ (bei den morphometrischen Untersuchungen) wurden sie als Einzelwerte dargestellt. Normal verteilte Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Nur Tiere, die das Behandlungsziel, also die chirurgische Toleranz, innerhalb von 300 s, erreichten und Behandlungsgruppen, bei denen mindestens 14 Tiere die chirurgische Toleranz erreichten, wurden in der weiteren graphischen Darstellung und statistischen Auswertung berücksichtigt. Wurden in einer Behandlungsgruppe mindestens 3 Tiere ausgeschlossen, wurde diese Behandlungsgruppe nicht statistisch ausgewertet, da diese Behandlung als nicht ausreichend wirksam galt und somit die vergleichende Bewertung an einem frühen Schritt beendet war.

Eine tabellarische Übersicht aller erhobenen Messwerte (einschließlich der Werte von als nicht ausreichend wirksam bewerteten Gruppen) findet sich im Anhang 9.3.

Die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse wurde gewählt, wenn es sich um einen Vergleich von mehreren Gruppen und um nicht normalverteilte Werte und unterschiedliche Gruppengrößen handelte. Sie wurde angewendet, um Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen innerhalb eines Stammes zu erkennen, deren Lokalisationen im Anschluss mit dem Post hoc Test Dunn's Method als paarweiser Vergleich bestimmt wurden (z. B. Blutparameter, einzelne Verhaltensparameter). Der Unterschied wurde als signifikant angesehen, wenn der p-Wert $< 0,05$ betrug.

Eine Two Way ANOVA wurde gewählt, wenn es sich um einen Vergleich von mehreren Gruppen und um normalverteilte Werte handelte. Sie diente dazu, festzustellen, ob sich Behandlungsgruppen unterscheiden, deren Parameter als Ausprägungsgrad von 0-3 bzw. 0-4 ermittelt wurden (z. B. bei der makroskopischen Untersuchung). Der Unterschied wurde als signifikant angesehen, wenn der p-Wert $< 0,05$ betrug.

2 Tiere, Material und Methoden

Um Stammesunterschiede mit gleicher Behandlung aufzudecken, wurde der Mann-Whitney-Ranksummentest bei den Latenzzeiten, den Blutwerten und einzelnen Verhaltensparametern angewendet. Dieser Test wurde gewählt, wenn es sich um einen Vergleich von zwei Gruppen unterschiedlicher Gruppengröße und um nicht normalverteilte Werte handelte. Wurden die Anteile von Tieren einer Behandlungsgruppe zwischen beiden Stämmen verglichen (z. B. bei einigen exzitatorischen Erscheinungen), so wurde der z-Test gewählt. Hier handelte es sich um einen Vergleich von zwei Gruppen unterschiedlicher Gruppengröße und um nicht normalverteilte Werte.

Morphometrische Messungen sowie die histologische Untersuchung wurden an Proben von 4 Tieren je Behandlungs- oder Kontrollgruppe durchgeführt, um zu beurteilen, ob sich Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen abzeichnen. Die Proben wurden von den Tieren, die das Behandlungsziel erreichten, zufällig per Los ausgewählt. Es erfolgte eine Einzelwertdarstellung und keine statistische Auswertung.

3 Ergebnisse

3.1 Reflexausfälle

Bei den NMRI-Mäusen führten die Behandlungen mit der niedrigsten CO₂-Einfüllrate und den niedrigen Isofluran- und Sevoflurankonzentrationen bei höchstens 10 von 16 Tieren zum Verlust des Zwischenzehenreflexes und zum Eintritt der CT innerhalb von 300 s. Die Narkosegasbehandlungen mit der mittleren und der hohen CO₂-Einfüllrate sowie mit den hohen Isofluran- und Sevoflurankonzentrationen waren bei mindestens 14 von 16 Tieren wirksam (s. a. Tab. 3.1).

4 von 16 (25%) NMRI-Mäuse erreichten bei der Behandlung mit CO₂ 20 die CT innerhalb von 300 s. Iso 2%- und Sevo 4,8%-Behandlungen führten bei 10 von 16 (62,5%) Tieren zur CT innerhalb von 300 s. Die Behandlungen mit CO₂ 60 und mit Iso 5% führten bei allen Tieren der Gruppe zur CT. 15 von 16 (93,8%) Mäuse erlangten innerhalb von 300 s die CT unter CO₂ 100-Exposition sowie 14 von 16 (87,5%) Mäuse unter Sevo 8%-Exposition.

Bei den C57Bl/6-Mäusen führten die Behandlungen mit der niedrigsten CO₂-Einfüllrate und der niedrigen Sevoflurankonzentration bei höchstens 13 von 16 Tieren zum Verlust des Zwischenzehenreflexes und zum Eintritt der CT innerhalb von 300 s. Die Narkosegasexpositionen mit der mittleren und der hohen CO₂-Einfüllrate, der niedrigen und hohen Isofluran- und sowie mit der hohen Sevoflurankonzentration waren bei mindestens 14 von 16 Tieren wirksam (s. a. Tab. 3.1).

CO₂ 20 erzeugte bei 5 von 16 (31,5%) Tieren die CT innerhalb von 300 s, Sevo 4,8% bei 13 von 16 (81,3%) Tieren der Behandlungsgruppe. Die Behandlungen mit CO₂ 100, mit Iso 5% und mit Sevo 8% führten bei allen Tieren der Gruppe zur CT. 15 von 16 (93,8%) Mäuse erlangten innerhalb von 300 s die CT unter CO₂ 60-Exposition sowie 14 von 16 (87,5%) Mäuse unter Iso 2%-Exposition.

Tab. 3.1 Verlust des Zwischenzehenreflexes und Erreichen der CT bei NMRI- und C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl [N] von je 16 Tieren einer Behandlungsgruppe sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, die die chirurgische Toleranz (CT), markiert durch den Verlust des Zwischenzehenreflexes, innerhalb von 300 s erreichten.

	CT erreicht	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
NMRI	[N]	4	16	15	10	16	10	14
	[%]	25	100	93,8	62,5	100	62,5	87,5
C57Bl/6	[N]	5	15	16	14	16	13	16
	[%]	31,3	93,8	100	87,5	100	81,3	100

3 Ergebnisse

Mittels des z-Testes konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Tiere, die die CT erreichten, zwischen dem NMRI- und dem C57Bl/6-Stamm ermittelt werden.

Im Folgenden werden die Tiere betrachtet, bei denen nicht der Verlust des Zwischenzehenreflexes und die CT innerhalb von 300 s eintraten.

Bei Tieren des NMRI-Stammes konnte nach 300 s Exposition mit CO₂ 20 bei 3 Tieren, mit CO₂ 100 bei 1 Tier, mit Iso 2% bei 3 Tieren, bei Sevo 4,8% bei 6 Tieren und bei Sevo 8% bei 1 Tier der Verlust des Stellreflexes, jedoch nicht der Verlust des Zwischenzehenreflexes, festgestellt werden. 4 Mäuse der CO₂ 20-Gruppe, 2 Mäuse der Iso 2%-Gruppe und 1 Maus der Sevo 8%-Gruppe zeigten nach 300 s Exposition Zuckungen und Bewegungen beim Herausnehmen aus der Kammer. Darüber hinaus wurden nach 300 s Behandlung mit CO₂ 20 bei 5 Tieren spontane Vorwärtsbewegungen beobachtet. Ein Tier der Iso 2%-Gruppe zeigte Ataxie und Exzitationen bei der spontanen Vorwärtsbewegung nach 300 s Exposition.

Bei Tieren des C57Bl/6-Stammes, die die CT nicht erreichten, konnte nach 300 s mit CO₂ 20 bei 7 Mäusen, mit CO₂ 60 bei 1 Maus, mit Iso 2% bei 2 Mäusen und mit Sevo 4,8% bei 3 Mäusen der Verlust des Stellreflexes, jedoch nicht der Verlust des Zwischenzehenreflexes, ermittelt werden. Bei 1 Maus der CO₂ 20-Gruppe war der Stellreflex nicht vollständig erloschen, 1 Maus dieser Gruppe zeigte spontane Bewegungen und Zuckungen nach 300 s Behandlung. Bei 2 Mäusen der CO₂ 20-Gruppe wurden nach 300 s Exposition spontane Vorwärtsbewegungen, bei 1 davon Ataxie und hypotoner Gang, beobachtet.

Der Ausfall des Stellreflexes markierte den Beginn der Bewusstlosigkeit und wird unter 3.2 behandelt. Die Testung des Lidreflexes diente zur Verifizierung des Zwischenzehenreflexes. Bei allen Tieren beider Stämme, bei denen der Zwischenzehenreflex als erloschen galt, d. h. die CT erreicht wurde, war auch der Lidreflex nicht mehr auslösbar.

Im Weiteren werden die Kontrollgruppe und nachstehende Behandlungsgruppen NMRI: CO₂ 60, CO₂ 100, Iso 5% und Sevo 8%; C57Bl/6: CO₂ 60, CO₂ 100, Iso 2%, Iso 5% und Sevo 8%) berücksichtigt. Es wurden die Tiere aufgenommen, die die chirurgische Toleranz erreichten.

3.2 Phasen der Narkoseeinleitung und ihre Latenzzeiten

Alle Tiere des NMRI- sowie des C57Bl/6-Stammes, die dem alleinigen Luftstrom (Luftkontrollgruppe) ausgesetzt waren, zeigten keine Anzeichen, die mit einer Narkosegaswirkung zu vergleichen wären (Ataxie, Muskelrelaxation, Bewusstlosigkeit, chirurgische Toleranz) während der 300 s Expositionszeit.

Alle NMRI- sowie C57Bl/6-Mäuse, die die chirurgische Toleranz (CT) erreichten, durchliefen folgende Phasen der Narkoseeinleitung in angegebener Reihenfolge:

- **Normale Phase**

Diese Phase begann mit der Einleitung des Narkosegases und endete mit der ersten unkoordinierten Bewegung der Maus. Es waren äußerlich keine Anzeichen einer Narkosegaswirkung feststellbar.

- **Ataktische Phase**

Die Phase der Ataxie begann mit der ersten unkoordinierten Bewegung des Tieres und endete mit vollständig eingetretener Muskelrelaxation. Das Tier schwankte um die Körperachse, bewegte Vorder- und Hintergliedmaßen unkoordiniert, der Lenden- und Hüftbereich fiel nach caudo-ventral ab. Am Ende dieser Phase kam das Tier zum Niederliegen.

- **Phase der Muskelrelaxation**

Beginn dieser Phase war die vollständige Muskelrelaxation, die gut am Absenken der Schwanzwurzel beurteilt werden konnte. Das Ende war durch den Übergang in die Bewusstlosigkeit gekennzeichnet, der hier anhand des Ausfalls des Stellreflexes überprüft wurde.

- **Phase der Bewusstlosigkeit**

Sie begann mit Eintritt der Bewusstlosigkeit und dauerte in vorliegender Arbeit bis zum Eintritt der CT, die mit Hilfe des Zwischenzehen- und Lidreflexes verifiziert wurde. Das Erreichen der CT markierte das Ende des Untersuchungszeitraumes.

3 Ergebnisse

Nachfolgend werden die Latenzzeiten als Median (0,25/0,75-Quantile) angegeben.

Bei NMRI-Mäusen führten die Behandlungen mit CO₂ 60 und CO₂ 100 in signifikant kürzerer Zeit zum Eintritt der Ataxie als die Behandlungen mit Iso 5% und Sevo 8% (s. Abb. 3.1).

Mithilfe der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ($H = 39,063$ mit 3 Freiheitsgraden, $p < 0,001$) ließen sich Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich der Latenzzeit bis zum Erreichen der Ataxie aufdecken. Der paarweise Vergleich mit dem nachfolgenden Test Dunn's Method zeigte die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen der Exposition mit CO₂ 60 bzw. CO₂ 100 und der Exposition mit Iso 5% bzw. Sevo 8% auf. Die Zeit bis zum Eintritt der Ataxie dauerte bei der CO₂ 60-Behandlung 25,0 (20,0/26,0) s, bei der CO₂ 100-Behandlung 19,0 (16,0/20,0) s. Diese beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant. Das Erreichen der Ataxie erfolgte bei Iso 5% nach 30,0 (27,0/34,0) s und bei Sevo 8% nach 30,0 (28,0/33,0) s. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen.

Bei Mäusen des NMRI-Stammes trat eine vollständige Muskelrelaxation am schnellsten bei den Behandlungen mit CO₂ 60 und CO₂ 100 auf. Diese Latenzzeiten unterschieden sich signifikant von denen der Iso 5%- und Sevo 8%-Behandlungen (s. Abb. 3.2).

Die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ergab signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ($H = 50,685$ mit 3 Freiheitsgraden, $p < 0,001$) in Bezug auf die Latenzzeit bis zum Erreichen der Muskelrelaxation. Ihre Lokalisation wurde mit dem Post-hoc-Test Dunn's Method als paarweiser Vergleich bestimmt. Es traten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen der Behandlung mit CO₂ 60 bzw. CO₂ 100 und der Behandlung mit Iso 5% bzw. Sevo 8% auf. Die Zeit bis zum Beginn der Muskelrelaxation betrug bei der CO₂ 60-Exposition 45,0 (41,25/47,75) s, bei der CO₂ 100-Exposition 35,0 (33,0/40,0) s. Diese beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant. Das Erreichen der Muskelrelaxation erfolgte bei Iso 5% nach 68,0 (63,5/71,0) s und bei Sevo 8% nach 79,0 (72,5/95,0) s. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen.

Bei Mäusen des NMRI-Stammes erfolgte der Eintritt der Bewusstlosigkeit am schnellsten bei der Exposition mit CO₂ 60 und CO₂ 100. Die Iso 5%- und Sevo 8%-Behandlungsgruppen erreichten die Bewusstlosigkeit in signifikant längerer Zeit (s. Abb. 3.3).

Die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ($H = 49,312$ mit 3 Freiheitsgraden, $p < 0,001$) hinsichtlich der Latenzzeit bis zum Erreichen der Bewusstlosigkeit. Mittels des Post-hoc-Tests Dunn's Method als paarweiser Vergleich wurden diese Unterschiede näher bestimmt. Es fanden sich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen der CO₂ 60- bzw. CO₂ 100-Gruppe und der Iso

5%- bzw. Sevo 8%-Gruppe. Die Zeit bis zum Eintritt der Bewusstlosigkeit dauerte bei der CO₂ 60-Behandlung 58,5 (55,0/67,75) s, bei der CO₂ 100-Behandlung 51,0 (46,0/55,0) s. Diese beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant. Das Erreichen der Bewusstlosigkeit erfolgte bei Iso 5% nach 80,5 (72,5/87,0) s und bei Sevo 8% nach 100,5 (85,75/113,0) s. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen.

Bei NMRI-Mäusen führte die Behandlung mit CO₂ 100 in signifikant kürzerer Zeit zum Eintritt der chirurgischen Toleranz (CT) als die Behandlungen mit CO₂ 60, Iso 5% und Sevo 8%. Das Erreichen der CT dauerte signifikant länger bei der Behandlung mit Sevo 8% als bei der Behandlung mit CO₂ 60. Zur Veranschaulichung s. a. Abb. 3.4.

Mithilfe der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ($H = 40,018$ mit 3 Freiheitsgraden, $p < 0,001$) ließen sich Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen bezüglich der Latenzzeit bis zum Eintritt der CT aufdecken. Der paarweise Vergleich mit dem nachfolgenden Test Dunn's Method zeigte die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen der Exposition mit CO₂ 100 und der Exposition mit CO₂ 60, Iso 5% bzw. Sevo 8% auf. Des Weiteren unterschied sich die Behandlung mit CO₂ 60 signifikant ($p < 0,05$) von der Behandlung mit Sevo 8%. Die Zeit bis zum Eintritt der CT dauerte bei der CO₂ 60-Behandlung 94,5 (74,25/130,5) s, bei der CO₂ 100-Behandlung 65,0 (60,0/72,0) s. Das Erreichen der CT erfolgte bei Iso 5% nach 101,5 (94,5/124,0) s und bei Sevo 8% nach 141,0 (126,5/173,75) s. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen.

Bei C57Bl/6-Mäusen erzeugte die Behandlung mit CO₂ 60 in signifikant kürzerer Zeit Ataxie als die Behandlungen mit Iso 2% und Sevo 8%. Die Exposition mit CO₂ 100 führte signifikant schneller zur Ataxie als Iso 2%, Iso 5% und Sevo 8% (s. Abb. 3.5).

Die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ergab signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ($H = 50,949$ mit 4 Freiheitsgraden, $p < 0,001$) in Bezug auf die Latenzzeit bis zum Beginn der Ataxie. Ihre Lokalisation wurde mit dem Post-hoc-Test Dunn's Method als paarweiser Vergleich bestimmt. Es traten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen der Behandlung mit CO₂ 60 und der Behandlung mit Iso 2% bzw. Sevo 8% auf. Weiterhin unterschied sich die CO₂ 100-Gruppe von der Iso 2%-, der Iso 5%- und der Sevo 8%-Gruppe signifikant ($p < 0,05$). Die Zeit bis zum Einsetzen der Ataxie betrug bei der CO₂ 60-Exposition 22,0 (20,0/24,0) s, bei der CO₂ 100-Exposition 17,0 (16,0/18,0) s. Diese beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant. Der Beginn der Ataxie erfolgte bei Iso 2% nach 29,0 (26,75/36,25) s, bei Iso 5% nach 24,5 (22,25/30,5) s und bei Sevo 8% nach 29,5 (27,25/30,75) s. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen drei Inhalationsanästhetika-Gruppen.

3 Ergebnisse

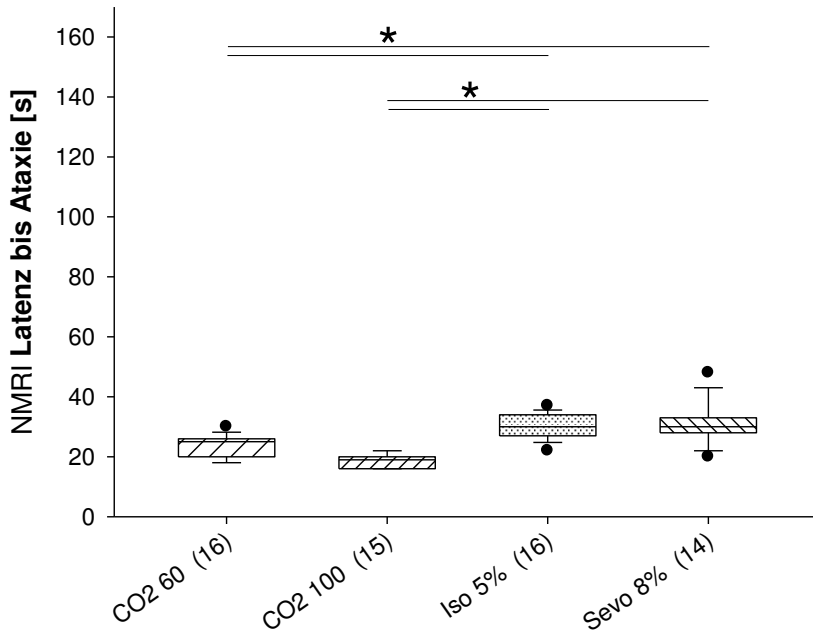


Abb. 3.1 Latenzzeiten bis zum Erreichen der Ataxie bei NMRI-Mäusen

Es sind die Latenzzeiten in [s] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) des Beginns der Phase der Ataxie dargestellt. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

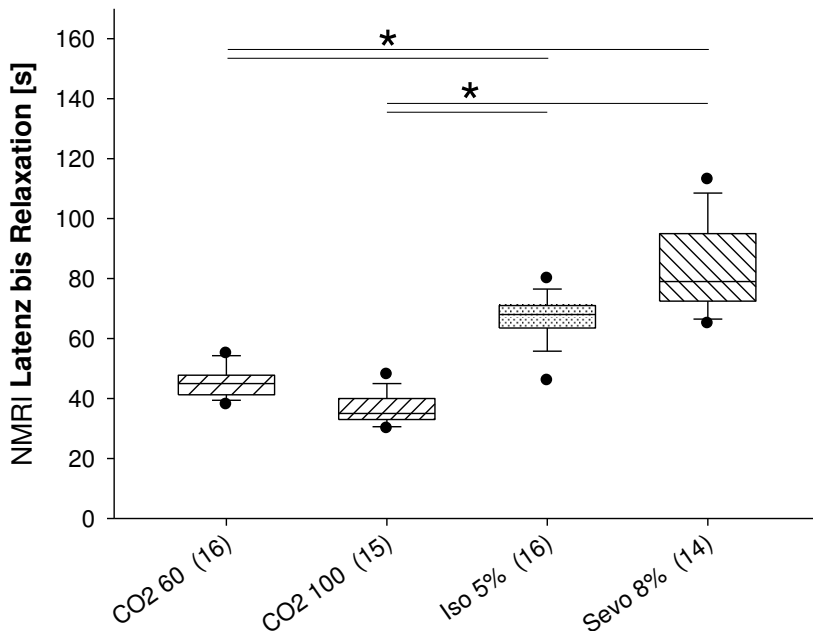


Abb. 3.2 Latenzzeiten bis zum Erreichen der Muskelrelaxation bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Latenzzeiten in [s] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) des Beginns der Phase der Muskelrelaxation. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

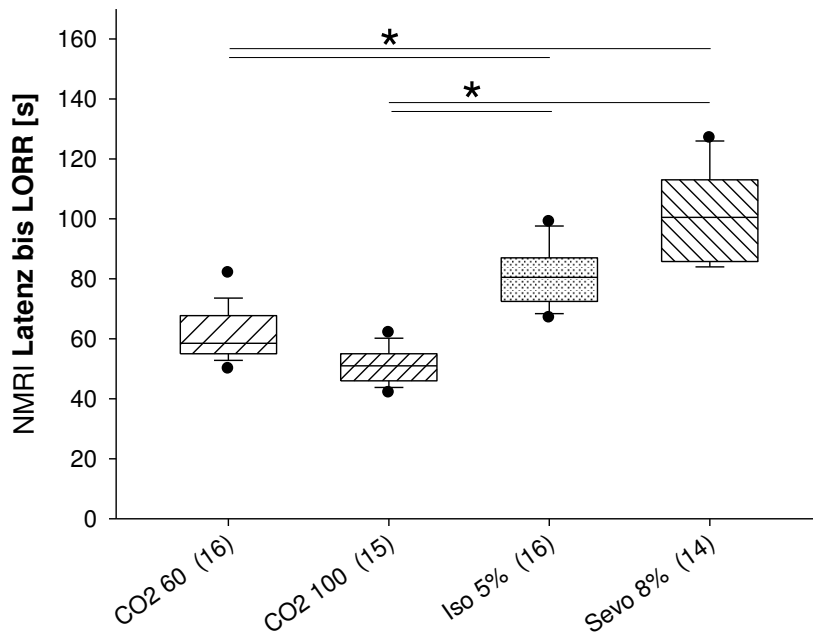


Abb. 3.3 Latenzzeiten bis zum Erreichen der Bewusstlosigkeit bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Latenzzeiten in [s] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) des Beginns der Phase der Bewusstlosigkeit (= LORR). Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

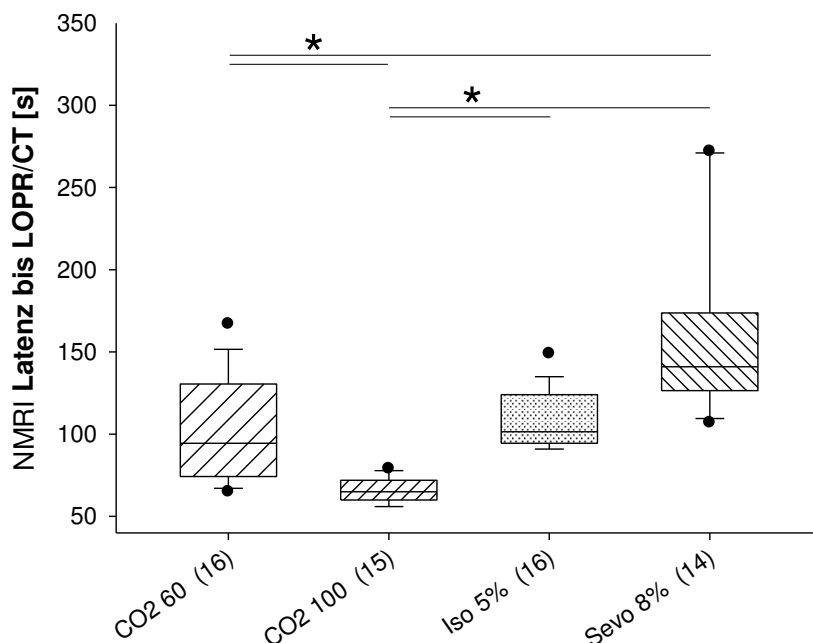


Abb. 3.4 Latenzzeiten bis zum Erreichen der chirurgischen Toleranz bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Latenzzeiten in [s] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) bis zum Erreichen des Verlustes des Zwischenzehenreflexes (= LOPR) bzw. der chirurgischen Toleranz (= CT). Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

3 Ergebnisse

Bei C57Bl/6-Mäusen trat die völlige Muskelrelaxation bei Behandlung mit CO₂ 60 in signifikant kürzerer Zeit auf als bei Behandlungen mit Iso 2% und Sevo 8%. Die Exposition mit CO₂ 100 führte signifikant schneller zur Relaxation als die Exposition mit Iso 2%, Iso 5% und Sevo 8%. Darüber hinaus erzeugte die Iso 5%-Behandlung schneller eine Muskelrelaxation als die Iso 2%-Behandlung (s. Abb. 3.6).

Mittels der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ($H = 70,254$ mit 4 Freiheitsgraden, $p < 0,001$) ließen sich Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich der Latenzzeit bis zum Erreichen der Muskelrelaxation aufdecken. Der paarweise Vergleich mit dem darauffolgenden Test Dunn's Method zeigte die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen der Exposition mit CO₂ 60 und der Exposition mit Iso 2% bzw. Sevo 8% sowie zwischen der Exposition mit CO₂ 100 und der Exposition mit Iso 2%, Iso 5% bzw. Sevo 8% auf. Des Weiteren fanden sich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen der Iso 2% und der Iso 5%-Gruppe. Die Zeit bis zum Eintritt der Muskelrelaxation dauerte bei der CO₂ 60-Behandlung 48,0 (47,0/51,0) s, bei der CO₂ 100-Behandlung 37,5 (36,0/41,75) s. Diese beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant. Das Erreichen der Muskelrelaxation erfolgte bei Iso 2% nach 103,5 (94,0/117,75) s, bei Iso 5% nach 56,5 (53,25/58,0) s und bei Sevo 8% nach 70,5 (64,25/76,5) s. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Iso 5%- und der Sevo 8%-Gruppe.

Bei Mäusen des C57Bl/6- Stammes wurde Bewusstlosigkeit in signifikant kürzerer Zeit durch die Behandlung mit CO₂ 60 erreicht als durch die Behandlungen mit Iso 2% und Sevo 8%. Die Exposition mit CO₂ 100 induzierte signifikant schneller Bewusstlosigkeit als Iso 2%, Iso 5% und Sevo 8%. Außerdem erzeugte die Exposition mit Iso 5% eine signifikant schneller eintretende Bewusstlosigkeit als die Exposition mit Iso 2%. Zur Veranschaulichung s. a. Abb. 3.7.

Mithilfe der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ($H = 66,711$ mit 4 Freiheitsgraden, $p < 0,001$) ließen sich Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen bezüglich der Latenzzeit bis zum Eintritt der Bewusstlosigkeit aufdecken. Der paarweise Vergleich mit dem nachfolgenden Test Dunn's Method zeigte die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen der Exposition mit CO₂ 60 und der Exposition mit Iso 2% bzw. Sevo 8% auf. Die Behandlung mit CO₂ 100 unterschied sich signifikant ($p < 0,05$) von den Behandlungen mit Iso 2%, Iso 5% und Sevo 8%. Des Weiteren fand sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Iso 2%- und der Iso 5%-Gruppe. Die Zeit bis zum Eintritt der Bewusstlosigkeit dauerte bei der CO₂ 60-Behandlung 60,0 (57,0/64,0) s, bei der CO₂ 100-Behandlung 50,0 (49,0/52,75) s. Diese beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant. Das Erreichen der Bewusstlosigkeit erfolgte bei Iso 2% nach 122,0 (107,75/137,0) s, Iso 5% nach 67

(65,25/68,75) s und bei Sevo 8% nach 82,0 (75,25/86,0) s. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Iso 5%- und der Sevo 8%-Gruppe.

Bei Mäusen des C57Bl/6-Stammes trat die CT bei Behandlung mit CO₂ 60 in signifikant kürzerer Zeit auf als bei Behandlungen mit Iso 2% und Sevo 8%. Die Exposition mit CO₂ 100 führte signifikant schneller zur CT als die Expositionen mit Iso 2%, Iso 5% und Sevo 8%. Die Iso 5%-Gruppe erreichte signifikant schneller die CT als die Iso 2%-Gruppe (s. Abb. 3.8).

Die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (H = 66,393 mit 4 Freiheitsgraden, p < 0,001) hinsichtlich der Latenzzeit bis zum Erreichen der CT. Mittels des Post-hoc-Tests Dunn's Method als paarweiser Vergleich wurden diese Unterschiede näher bestimmt. Es fanden sich signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen der CO₂ 60-Gruppe und der Iso 2%- bzw. der Sevo 8%-Gruppe. Die Exposition mit CO₂ 100 unterschied sich signifikant (p < 0,05) von den Expositionen mit Iso 2%, Iso 5% und Sevo 8%. Die Behandlung mit Iso 5% führte signifikant schneller (p < 0,05) zum Erreichen der CT als die Behandlung mit Iso 2%. Die Zeit bis zum Eintritt der CT dauerte bei der CO₂ 60-Behandlung 80,0 (75,0/86,0) s, bei der CO₂ 100-Behandlung 63,5 (60,25/67,5) s. Diese beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant. Das Erreichen der CT erfolgte bei Iso 2% nach 250,5 (222,25/282,5)s, bei Iso 5% nach 95,0 (83,25/102,5) s und bei Sevo 8% nach 115,5 (108,5/123,0) s. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Iso 5%- und der Sevo 8%-Gruppe.

Um Stammesunterschiede aufzudecken, wurden Mann-Whitney-Ranksummentests durchgeführt. Die Latenzzeiten bis zum Erreichen der Muskelrelaxation unter CO₂ 60-Exposition waren bei Tieren des NMRI-Stammes signifikant (p = 0,022) kürzer als bei Tieren des C57Bl/6-Stammes. Beim Vergleich der beiden Iso 5%-Gruppen waren alle Latenzzeiten der NMRI-Tiere signifikant länger als bei C57Bl/6-Tieren (Latenzzeiten bis zum Erreichen der Ataxie mit p = 0,006; der Muskelrelaxation mit p < 0,001; der Bewusstlosigkeit mit p < 0,001 und der CT mit p = 0,029). Vergleich man die Sevo 8%-Gruppen, so waren die Latenzzeiten bis zum Erreichen der Muskelrelaxation (p = 0,007), der Bewusstlosigkeit (p < 0,001) und der CT (p < 0,001) bei NMRI-Mäusen signifikant kürzer als bei Mäusen des C57Bl/6-Stammes.

3 Ergebnisse

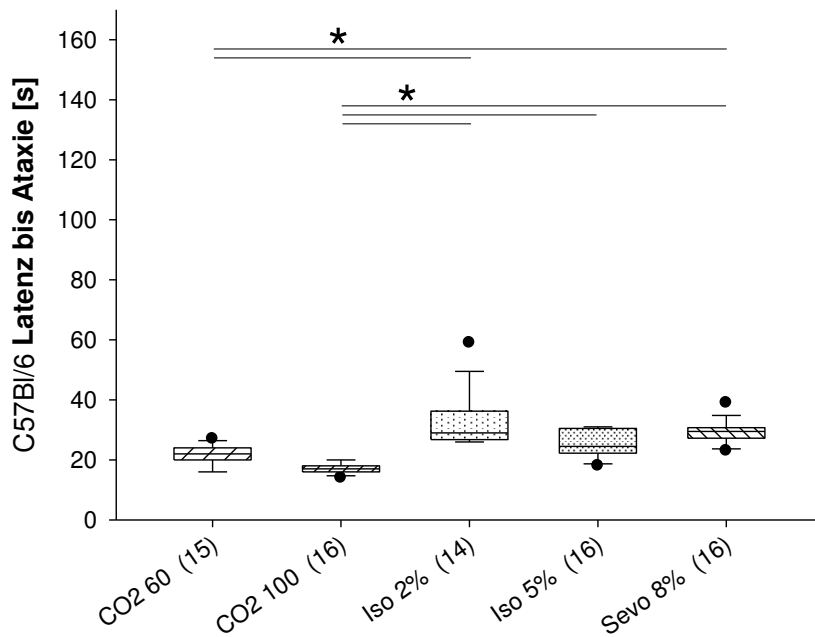


Abb. 3.5 Latenzzeiten bis zum Erreichen der Ataxie bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Latenzzeiten in [s] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) des Beginns der Phase der Ataxie. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

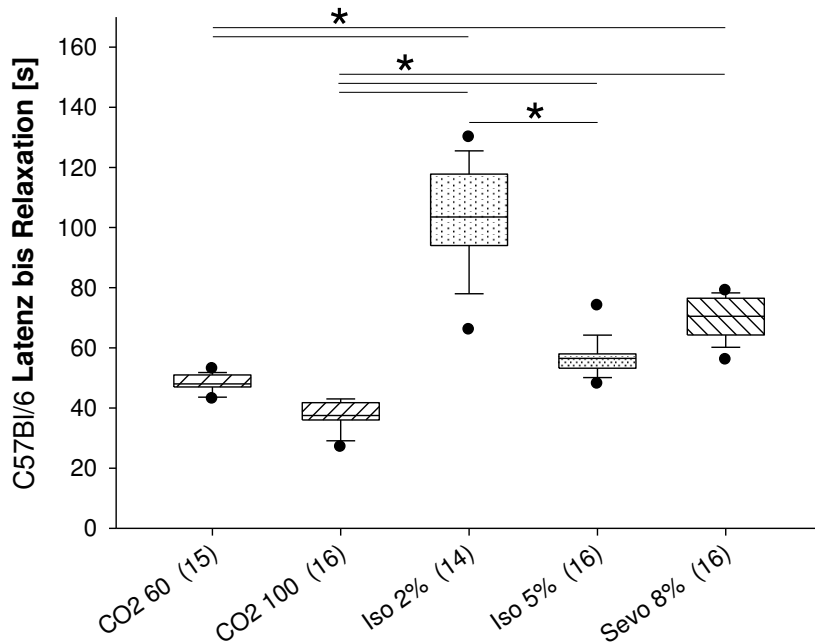


Abb. 3.6 Latenzzeiten bis zum Erreichen der Muskelrelaxation bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Latenzzeiten in [s] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) des Beginns der Phase der Muskelrelaxation. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

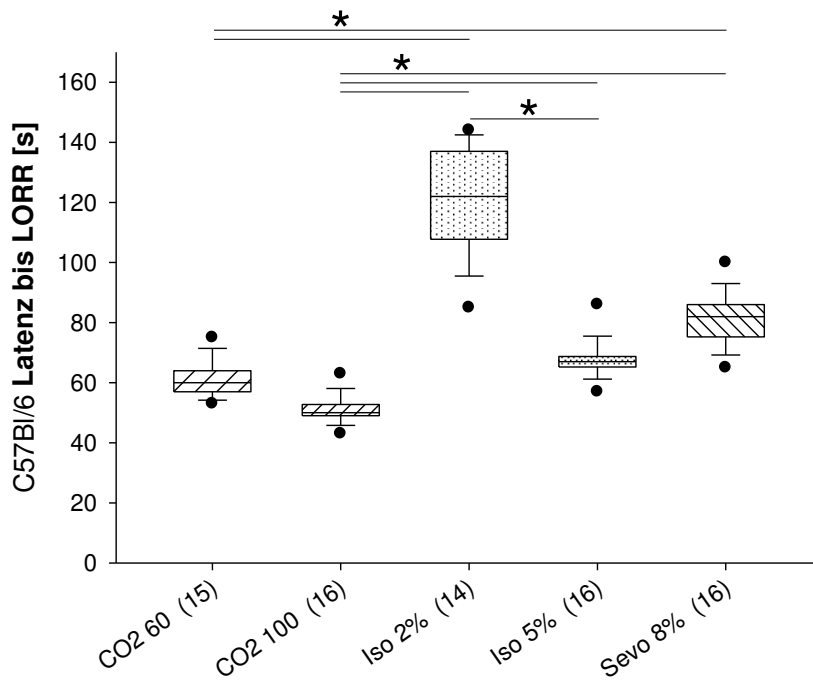


Abb. 3.7 Latenzzeiten bis zum Erreichen der Bewusstlosigkeit bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Latenzzeiten in [s] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) des Beginns der Phase der Bewusstlosigkeit (= LORR). Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

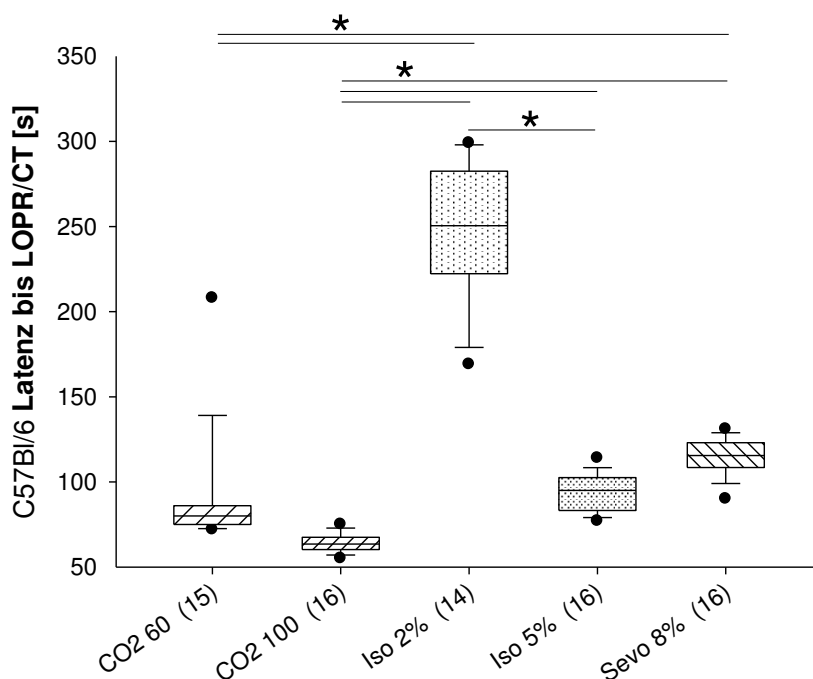


Abb. 3.8 Latenzzeiten bis zum Erreichen der chirurgischen Toleranz bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Latenzzeiten in [s] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) bis zum Erreichen des Verlustes des Zwischenzehenreflexes (= LOPR) bzw. der chirurgischen Toleranz (= CT). Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

3 Ergebnisse

3.3 Errechneter Narkosegas-Konzentrationsverlauf

Der errechnete Konzentrationsverlauf nach Corbach (2006) in der Narkosekammer, der durch die Einfüllrate und die Konzentration des eingeleiteten Narkosegases bestimmt wurde, war nicht linear. Er nahm zunächst rasch zu, verflachte sich dann und lief asymptotisch auf den Wert, der der einströmenden Konzentration entsprach, zu (s. Abb. 3.9 und Abb. 3.10). Nach 200 s waren ca. 90% der einströmenden Konzentration erreicht.

Bei Mäusen des NMRI- und des C57Bl/6-Stammes traten die einzelnen Narkosephasen unter CO₂ 60-Exposition bei niedrigeren errechneten Kammerkonzentrationen auf als unter der Exposition mit CO₂ 100. Bei C57Bl/6-Mäusen lag der Beginn der einzelnen Narkosephasen unter Iso 2%-Behandlung bei niedrigeren Kammerkonzentrationen als unter der Iso 5%-Behandlung. Die errechneten Narkosegaskonzentrationen, die zu Beginn der einzelnen Narkosephasen in der Kammer herrschten, stehen in der Tab. 3.2 und Tab. 3.3.

Tab. 3.2 Errechnete Narkosegaskonzentrationen in der Kammer bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die errechneten Narkosegaskonzentrationen in [%] zu Zeitpunkten des experimentell ermittelten Beginns der Phase der Ataxie (= Atax), der Phase der Muskelrelaxation (= Relax) und der Phase der Bewusstlosigkeit (= LORR) sowie zum Zeitpunkt des Verlustes des Zwischenzehenreflexes (= LOPR) bzw. der chirurgischen Toleranz (= CT).

NMRI	CO₂ 60	CO₂ 100	Iso 5%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]	16	15	16	14
Atax	22,1	27,2	1,5	2,4
Relax	36,3	44,2	2,8	4,9
LORR	44,3	57,3	3,1	5,6
LOPR/CT	61,0	66,2	3,5	6,5

Tab. 3.3 Errechnete Narkosegaskonzentrationen in der Kammer bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die errechneten Narkosegaskonzentrationen in [%] zu Zeitpunkten des experimentell ermittelten Beginns der Phase der Ataxie (= Atax), der Phase der Muskelrelaxation (= Relax) und der Phase der Bewusstlosigkeit (= LORR) sowie zum Zeitpunkt des Verlustes des Zwischenzehenreflexes (= LOPR) bzw. der chirurgischen Toleranz (= CT).

C57Bl/6	CO₂ 60	CO₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]	15	16	14	16	16
Atax	19,8	24,7	0,6	1,3	2,4
Relax	38,1	46,0	1,4	2,4	4,5
LORR	45,1	56,6	1,5	2,7	5,0
LOPR/CT	55,1	65,3	1,9	3,4	6,0

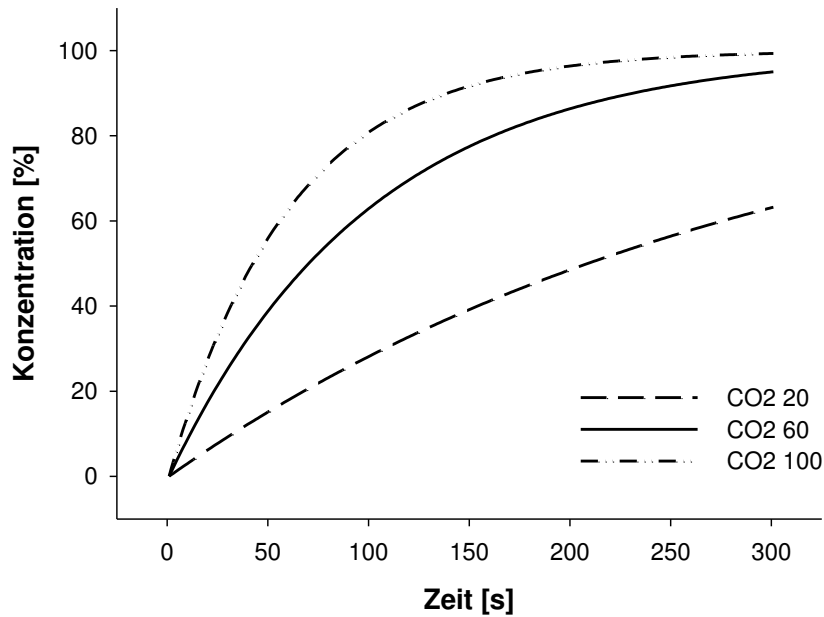


Abb. 3.9 Errechnete CO₂-Konzentrationsverläufe in der Narkosekammer

Dargestellt sind die errechneten CO₂-Konzentrationen in der Narkosekammer in [%] in Abhängigkeit von der Zeit in [s]. 100% CO₂ wurde mit Einfüllraten von 20, 60 und 100 KV%/min (CO₂ 20, CO₂ 60 und CO₂ 100) in eine Kammer mit einem Volumen von 14 l eingeleitet.

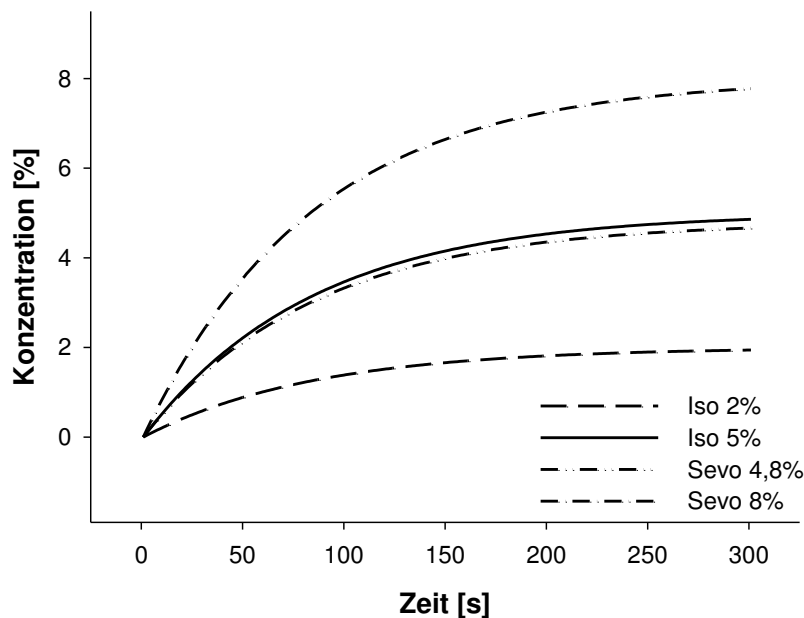


Abb. 3.10 Errechnete Isofluran- und Sevofluran-Konzentrationsverläufe in der Narkosekammer

Dargestellt sind die errechneten Isofluran- und Sevofluran-Konzentrationen in der Narkosekammer in [%] in Abhängigkeit von der Zeit in [s]. 2% und 5% Isofluran (Iso 2%, Iso 5%) sowie 4,8% und 8% Sevofluran (Sevo 4,8%, Sevo 8%) wurden mit einer Einfüllrate von 71 KV%/min in eine Kammer mit einem Volumen von 14 l eingeleitet.

3 Ergebnisse

3.4 Blutanalyse

3.4.1 Glukosebestimmung aus dem Vollblut

Im Folgenden werden die Konzentrationen der Blutglukose als Median (0,25/0,75-Quantile) angegeben.

Bei NMRI-Mäusen der Kontrollgruppe, die nach Luftstromexposition dekapitiert wurden, lag die Blutglukosekonzentration bei 9,40 (8,050/9,850) mmol/l.

Die Konzentrationen der Blutglukose unterschieden sich nicht zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (s. a. Abb. 3.11).

Mithilfe der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ($H = 6,025$ mit 3 Freiheitsgraden, $p = 0,109$) ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen bezüglich den Blutglukosekonzentrationen aufdecken. Die Glukosekonzentration der CO₂ 60-Gruppe betrug 9,30 (7,60/11,30) mmol/l, die der CO₂ 100-Gruppe 9,40 (7,10/11,60) mmol/l. Der Blutglukosewert der Iso 5%-Gruppe lag bei 11,55 (9,725/12,950) mmol/l, der der Sevo 8%-Gruppe bei 10,70 (9,20/11,575) mmol/l.

Bei C57Bl/6-Mäusen der Kontrollgruppe, die nach Luftstromexposition dekapitiert wurden, lag der Blutglukosewert bei 8,05 (7,350/8,550) mmol/l.

Die Konzentrationen der Blutglukose waren nach der Behandlung mit CO₂ 60 und CO₂ 100 signifikant niedriger als nach der Behandlung mit Iso 2% und Sevo 8%. Die Exposition mit Iso 5% führte zu signifikant niedrigeren Glukosewerten als die Exposition mit Iso 2% (s. a. Abb. 3.12).

Die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ergab signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ($H = 34,215$ mit 4 Freiheitsgraden, $p < 0,001$) in Bezug auf die Blutglukosekonzentrationen. Ihre Lokalisation wurde mit dem Post-hoc-Test Dunn's Method als paarweiser Vergleich bestimmt. Es traten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen der CO₂ 60- bzw. der CO₂ 100-Gruppe und der Iso 2%- bzw. Sevo 8%-Gruppe auf. Weiterhin unterschieden sich die Werte für die Blutglukose nach Behandlung mit Iso 2% und Iso 5% signifikant ($p < 0,05$). Die Behandlungsgruppen CO₂ 60, CO₂ 100 und Iso 5% unterschieden sich nicht. Die Glukosekonzentration der CO₂ 60-Gruppe betrug 7,40 (6,90/8,70) mmol/l, die der CO₂ 100-Gruppe 7,60 (6,95/7,90) mmol/l. Der Wert für die Iso 5%-Gruppe lag bei 9,30 (7,30/10,15) mmol/l. Die Behandlung mit Sevo 8% unterschied sich nicht signifikant von der Behandlung mit Iso 2% und Iso 5%. Die Blutglukosekonzentration betrug für die Iso 2%-Gruppe 11,90 (10,90/13,65) mmol/l, für die Sevo 8%-Gruppe 10,35 (8,325/11,975) mmol/l. Die Behandlung mit Sevo 8% unterschied sich nicht signifikant von der Behandlung mit Iso 2% und Iso 5%.

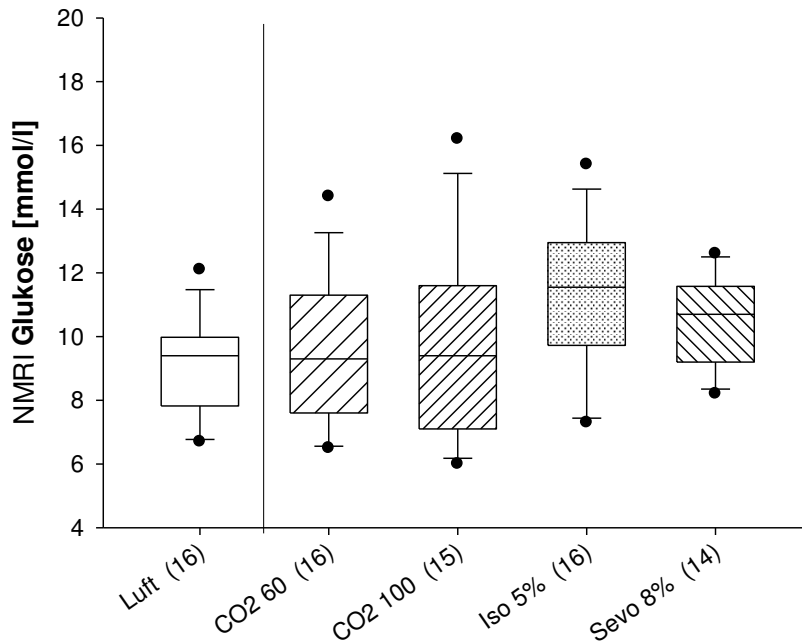


Abb. 3.11 Blutglukosekonzentrationen bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Blutglukosekonzentrationen in [mmol/l] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) zum Zeitpunkt der CT. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

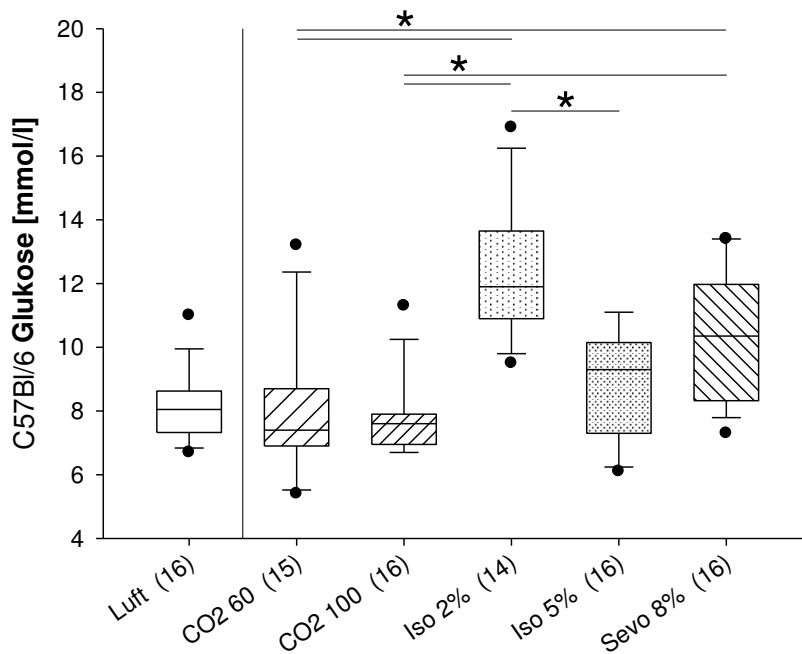


Abb. 3.12 Blutglukosekonzentrationen bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Blutglukosekonzentrationen in [mmol/l] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) zum Zeitpunkt der CT. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

3 Ergebnisse

Mit Mann-Whitney-Ranksummentests wurden signifikante Stammesunterschiede festgestellt. Die Blutglukosewerte der NMRI-Mäuse waren signifikant höher ($p = 0,002$) als die Werte der C57Bl/6-Tiere nach Iso 5%-Behandlung.

3.4.2 Katecholaminbestimmung aus dem Plasma

Nachfolgend werden die Konzentrationen der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin als Median (0,25/0,75-Quantile) angegeben.

Bei NMRI-Mäusen der Kontrollgruppe, die nach Luftstromexposition dekapitiert wurden, betrug die Plasmaadrenalinkonzentration 12,370 (11,525/14,770) ng/ml.

Die Adrenalinkonzentrationen im Plasma waren nach der Behandlung mit CO₂ 60 ca. 8 – 12-fach höher als nach der Behandlung mit Iso 5% bzw. mit Sevo 8%. Die Werte für die Adrenalinkonzentrationen waren nach der Exposition mit CO₂ 100 ca. 11 – 18-fach höher als nach der Behandlung mit Iso 5% bzw. mit Sevo 8% (s. a. Abb. 3.13).

Die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ($H = 43,655$ mit 3 Freiheitsgraden, $p < 0,001$) bezüglich den Adrenalinkonzentrationen im Plasma. Ihre Lokalisation wurde mit dem Post-hoc-Test Dunn's Method als paarweiser Vergleich bestimmt. Es ergaben sich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen der CO₂ 60- bzw. der CO₂ 100-Gruppe und der Iso 5%- bzw. Sevo 8%-Gruppe. Die Plasmaadrenalinkonzentration der CO₂ 60-Gruppe betrug 30,600 (21,815/35,457) ng/ml, die der CO₂ 100-Gruppe 44,290 (24,340/52,000) ng/ml. Diese beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant. Die Adrenalinwerte im Plasma der Iso 5%-Gruppe lagen bei 4,065 (2,507/6,657) ng/ml, die der Sevo 8%-Gruppe bei 2,510 (1,275/6,363) ng/ml. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Bei C57Bl/6-Mäusen der Kontrollgruppe, die nach Luftstromexposition dekapitiert wurden, betrug die Adrenalinkonzentration im Plasma 8,205 (6,200/10,290) ng/ml.

Die Adrenalinkonzentrationen im Plasma waren in der CO₂ 60- bzw. in der CO₂ 100-Gruppe ca. 3 – 5-fach höher als in der Iso 2%- bzw. in der Iso 5%-Gruppe. Nach Behandlung mit CO₂ 60 bzw. mit CO₂ 100 lagen die Werte für die Adrenalinkonzentration ca. 10-fach höher als nach der Behandlung mit Sevo 8% (s. a. Abb. 3.14).

Hinsichtlich den Adrenalinkonzentrationen im Plasma ergab die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ($H = 60,735$ mit 4 Freiheitsgraden, $p < 0,001$), deren Lokalisation mit dem Post-hoc-Test Dunn's Method als paarweiser Vergleich bestimmt wurde. Die Exposition mit CO₂ 60 bzw. mit CO₂ 100 unterschied sich signifikant ($p < 0,05$) von der Exposition mit Iso 2%, mit Iso 5% bzw. mit

Sevo 8%. Die AdrenalinKonzentration im Plasma betrug für die CO₂ 60-Gruppe 16,960 (11,550/21,220) ng/ml, für die CO₂ 100-Gruppe 18,180 (12,650/19,945) ng/ml. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen. Der Wert für die PlasmaadrenalinKonzentration war für die Iso 2%-Gruppe 5,240 (3,893/6,133) ng/ml, für die Iso 5%-Gruppe 4,070 (3,177/4,610) ng/ml und für die Sevo 8%-Gruppe 1,570 (0,570/2,277) ng/ml. Zwischen diesen drei Gruppen fanden sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Mittels Mann-Whitney-Ranksummentests wurden Unterschiede zwischen den Stämmen nach CO₂-Exposition hinsichtlich den AdrenalinKonzentrationen im Plasma aufgedeckt. Die AdrenalinKonzentrationen waren nach CO₂ 60- ($p = 0,002$) und nach CO₂ 100-Behandlung ($p < 0,001$) signifikant höher bei Tieren des NMRI-Stammes als bei C57Bl/6-Tieren.

Bei NMRI-Mäusen der Kontrollgruppe, die nach Luftstromexposition dekapitiert wurden, betrug die NoradrenalinKonzentration im Plasma 15,000 (13,100/20,770) ng/ml.

Die NoradrenalinKonzentrationen im Plasma wiesen bei der CO₂ 60- und der CO₂ 100-Gruppe ca. 8 – 10-fach höhere Werte auf als bei der Iso 5%- und Sevo 8%-Gruppe (s. a. Abb. 3.15).

Mithilfe der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ($H = 45,452$ mit 3 Freiheitsgraden, $p < 0,001$) ließen sich Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen bezüglich den NoradrenalinKonzentrationen im Plasma aufdecken. Der paarweise Vergleich mit dem nachfolgenden Test Dunn's Method zeigte die signifikanten Unterschiede (Iso $p < 0,05$) zwischen der Exposition mit CO₂ 60 bzw. CO₂ 100 und der Exposition mit 5 % bzw. Sevo 8% auf. Die NoradrenalinKonzentration betrug nach der CO₂ 60-Behandlung 61,910 (50,465/80,215) ng/ml, nach der CO₂ 100-Behandlung 65,880 (47,250/73,950) ng/ml. Diese Behandlungen unterschieden sich nicht signifikant. Der Wert für die NoradrenalinKonzentration nach der Exposition mit Iso 5% lag bei 8,055 (5,497/8,995) ng/ml, nach der Exposition mit Sevo 8% bei 6,540 (4,940/7,973) ng/ml. Auch diese beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant.

Bei C57/Bl6-Mäusen der Kontrollgruppe, die nach Luftstromexposition dekapitiert wurden, betrug die Konzentration des Plasmanoradrenalins 10,955 (8,030/12,360) ng/ml.

Die NoradrenalinKonzentrationen im Plasma waren bei der CO₂ 60- und der CO₂ 100-Behandlungsgruppe um ca. 10-fach höher als bei den Inhalationsanästhetika-Gruppen Iso 5% und Sevo 8% (s. a. Abb. 3.16).

3 Ergebnisse

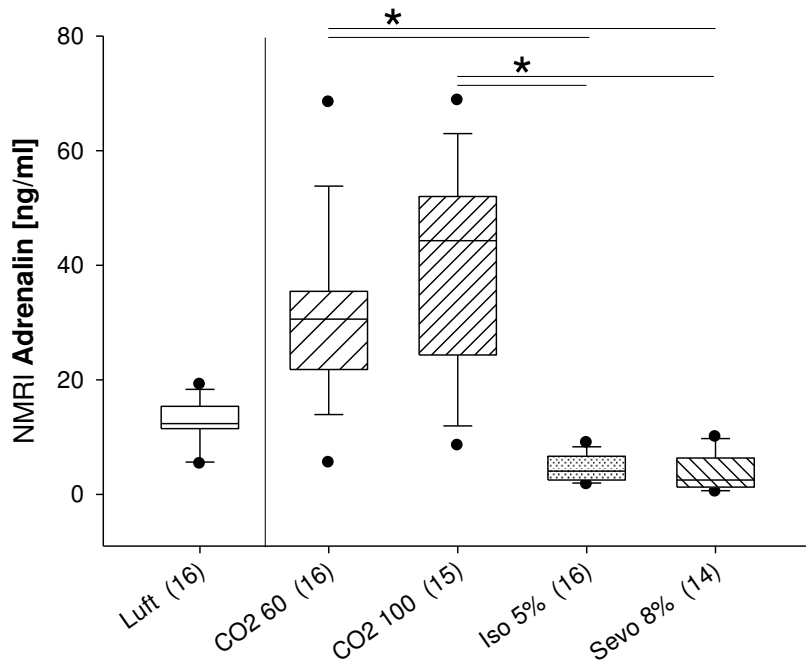


Abb. 3.13 Adrenalinkonzentrationen bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Adrenalinkonzentrationen im Plasma in [ng/ml] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) zum Zeitpunkt der CT. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

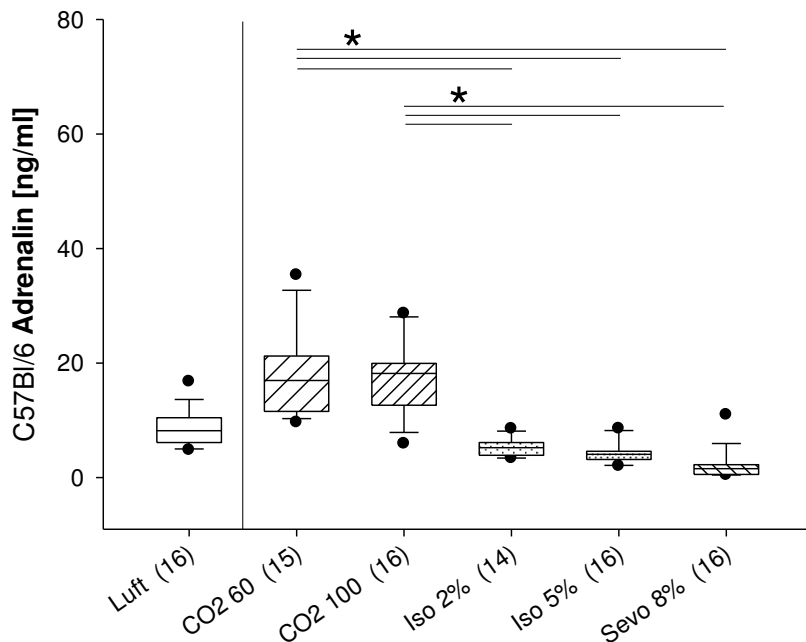


Abb. 3.14 Adrenalinkonzentrationen bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Adrenalinkonzentrationen im Plasma in [ng/ml] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) zum Zeitpunkt der CT. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

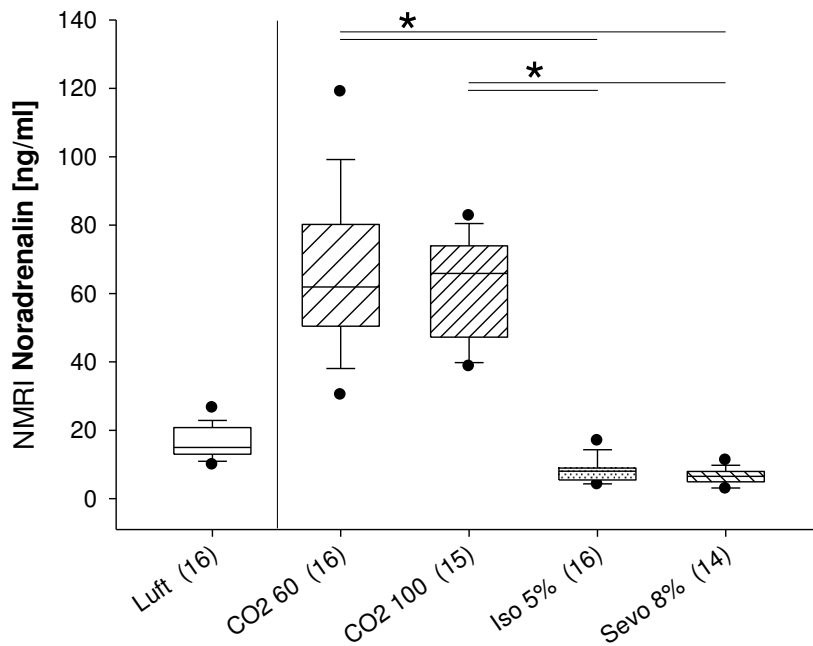


Abb. 3.15 Noradrenalininkonzentrationen bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Noradrenalininkonzentrationen im Plasma in [ng/ml] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) zum Zeitpunkt der CT. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

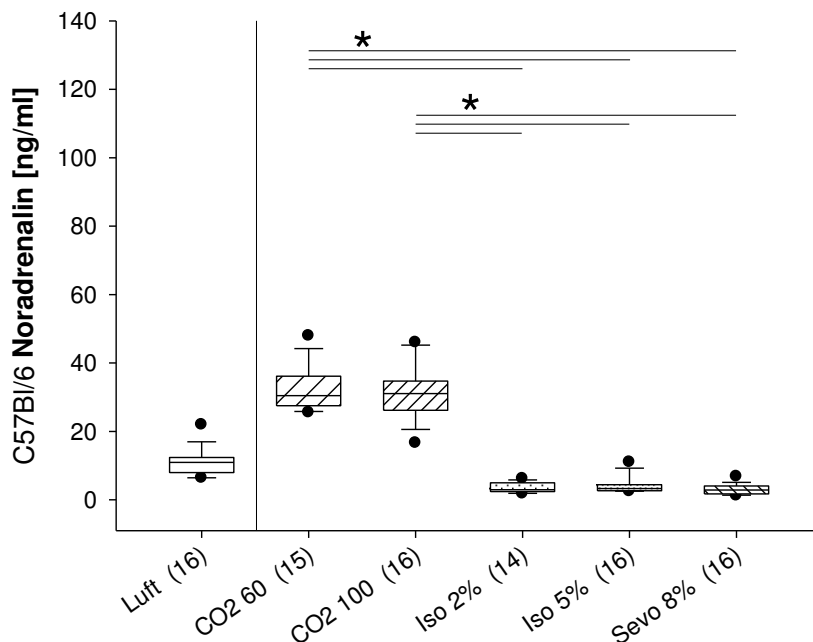


Abb. 3.16 Noradrenalininkonzentrationen bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Noradrenalininkonzentrationen in [ng/ml] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) zum Zeitpunkt der CT. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

3 Ergebnisse

Hinsichtlich den NoradrenalinKonzentrationen im Plasma ließen sich mittels der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ($H = 55,684$ mit 4 Freiheitsgraden, $p < 0,001$) feststellen. Ihre Lokalisation wurde mit dem Post-hoc-Test Dunn's Method als paarweiser Vergleich bestimmt. Die Behandlungen mit CO_2 60 bzw. mit CO_2 100 unterschieden sich signifikant ($p < 0,05$) von den Behandlungen mit Iso 2%, Iso 5% bzw. Sevo 8%.

Der Wert für die NoradrenalinKonzentration nach Exposition mit CO_2 60 betrug $30,460$ ($27,540/36,140$) ng/ml, nach Exposition mit CO_2 100 betrug er $31,075$ ($26,195/34,712$) ng/ml. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen. Die NoradrenalinKonzentration für die Iso 2%-Gruppe lag bei $2,960$ ($2,402/4,975$) ng/ml, für die Iso 5%-Gruppe bei $3,290$ ($2,677/4,428$) ng/ml und für die Sevo 8%-Gruppe bei $2,865$ ($1,757/4,077$) ng/ml. Zwischen diesen drei Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Mann-Whitney-Ranksummentests deckten Stammesunterschiede hinsichtlich den NoradrenalinKonzentrationen im Plasma auf. Die Konzentrationen aller Behandlungsgruppen der NMRI-Tiere waren signifikant höher (alle Gruppen mit $p < 0,001$) als die der C57Bl/6-Tiere.

3.5 Verhaltensanalyse

3.5.1 Körperhaltung

- **Stehen, Sitzen, Liegen**

Während der gesamten 300 s des Luftstroms befanden sich die Kontrolltiere des NMRI- und des C57Bl/6-Stammes wechselnd aufrecht auf vier Gliedmaßen oder in einer sitzenden Körperhaltung. Die Tiere waren entweder immobil oder bewegten sich vorwärts bzw. putzten sich. Die Tiere hatten während des ruhigen Stehens oder Sitzens keinen erhöhten Muskeltonus und waren nicht völlig versteift, auch konnten Bewegungen der Vibrissen festgestellt werden.

Alle Tiere beider Mausstämme, die eine Narkosegasbehandlung erhielten, befanden sich zu Beginn der Narkosegaseinleitung in einer stehenden oder sitzenden Position, wobei die Mäuse immobil waren oder sich vorwärts bewegten bzw. sich putzten. Diese Haltungen gingen im weiteren Narkoseverlauf in eine liegende bis hin zu einer vollständig flachen, relaxierten Haltung über, welches den Beginn der Phase der Muskelrelaxation markierte. Mit Ausnahme des Auftretens von Opisthotonus wurde diese relaxierte Körperhaltung bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes beibehalten.

3.5.2 Motorische Aktivität

- **Lokomotorische Aktivität**

Die lokomotorische Aktivität wurde anhand eines Punktesystems nach Niel und Weary (2006) beschrieben: Es wurde ein Punkt vergeben, sobald die Maus mit ihrer Körpermitte die Mittellinie (ML) senkrecht zur Längsseite der Narkosebox überquert hatte.

Bei NMRI-Mäusen, die Iso 5% und Sevo 8% erhielten, war die lokomotorische Aktivität als Überquerungen der ML im Vergleich zur Luftkontrolle und zur CO₂ 60-Gruppe vermehrt.

Darüber hinaus war die Lokomotion bei Tieren unter Iso 5%-Exposition vermehrt verglichen mit Tieren der CO₂ 100-Gruppe (s. a. Abb. 3.17).

Die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ($H = 44,673$ mit 4 Freiheitsgraden, $p < 0,001$) ergab signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich der Anzahl der Überquerungen der ML. Ihre Lokalisationen wurden mit dem Post-hoc-Test Dunn's Method als paarweiser Vergleich bestimmt. Tiere, die mit Iso 5% behandelt wurden, überquerten signifikant häufiger ($p < 0,05$) die ML als Tiere, die einströmende Luft bzw. eine CO₂ 60- und CO₂ 100-Behandlung erhielten. Mäuse unter Sevo 8%-Exposition überquerten signifikant häufiger ($p < 0,05$) die ML als Mäuse unter einströmender Luft bzw. unter CO₂ 60-Exposition. Die Gruppen, die CO₂ 60 und CO₂ 100 ausgesetzt waren, unterschieden sich nicht signifikant untereinander und nicht von der Luftkontrollgruppe. Die Iso 5%-Gruppe unterschied sich nicht signifikant von der Sevo 8%-Gruppe.

3 Ergebnisse

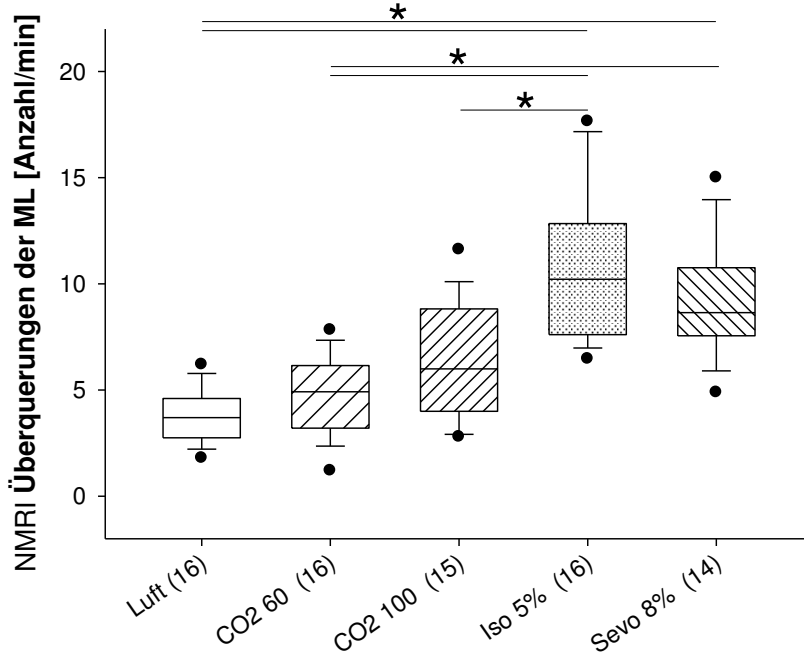


Abb. 3.17 Lokomotorische Aktivität bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl der Überquerungen der Mittellinie (ML) in [Anzahl/min] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) vom Start der Narkoseeinleitung bis zum Beginn der Muskelrelaxation. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

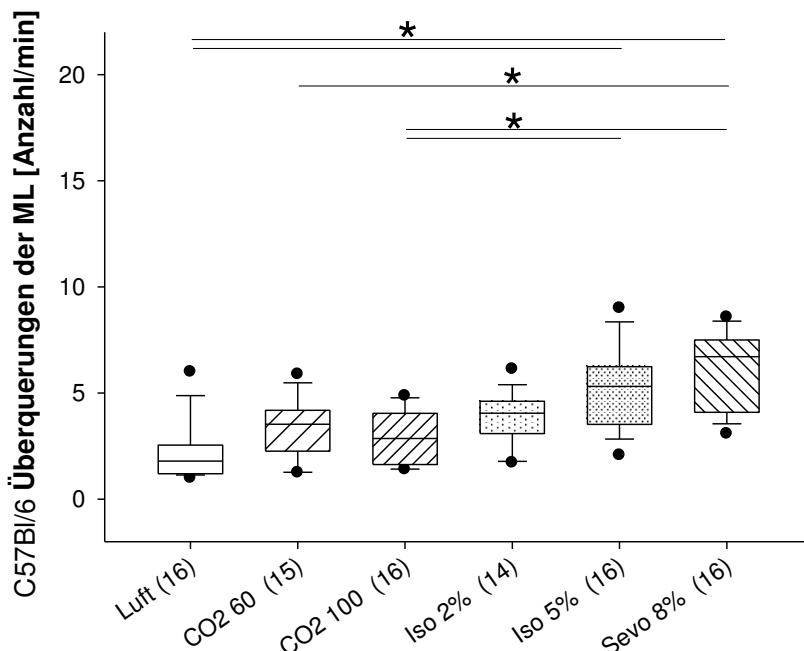


Abb. 3.18 Lokomotorische Aktivität bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl der Überquerungen der Mittellinie (ML) in [Anzahl/min] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) vom Start der Narkoseeinleitung bis zum Beginn der Muskelrelaxation. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

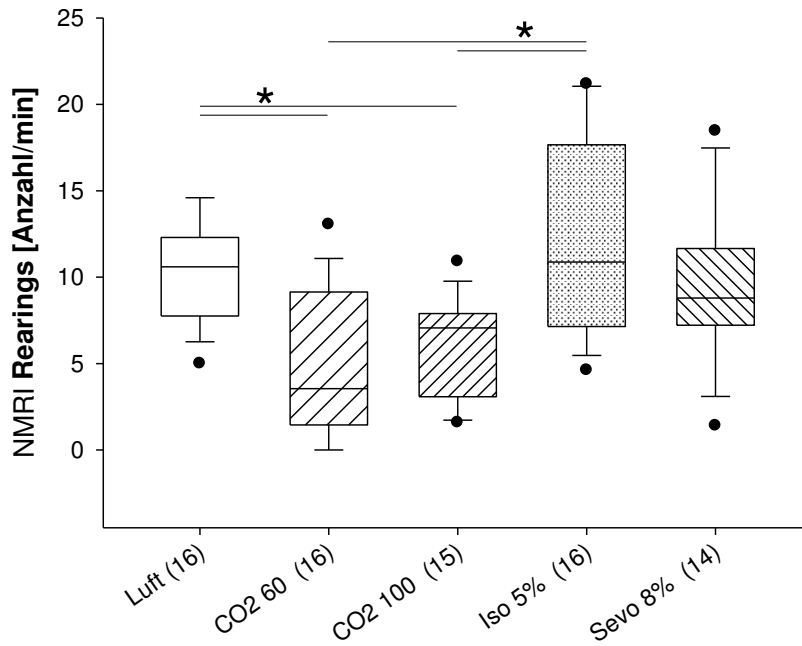


Abb. 3.19 Rearing-Verhalten bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl der Rearings in [Anzahl/min] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) vom Start der Narkoseeinleitung bis zum Beginn der Muskelrelaxation. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

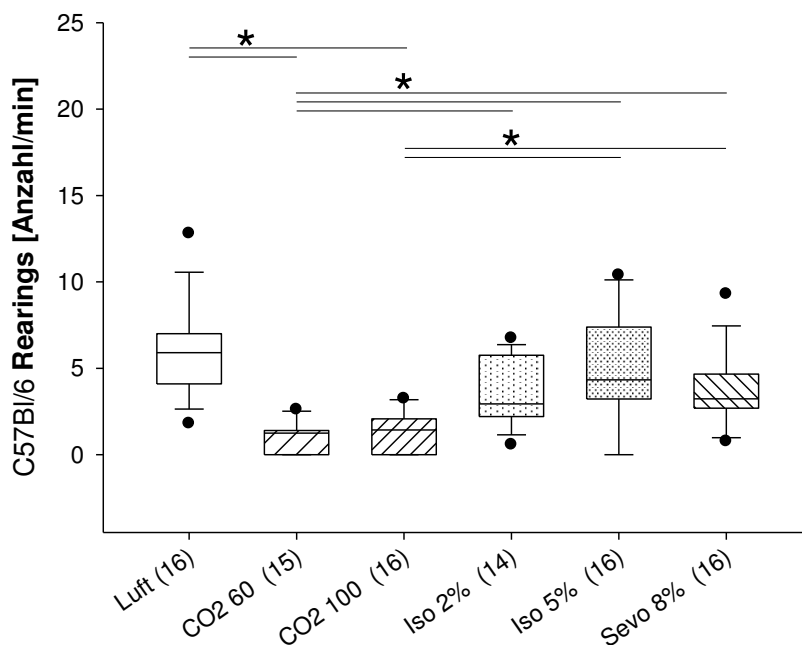


Abb. 3.20 Rearing-Verhalten bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl der Rearings in [Anzahl/min] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) vom Start der Narkoseeinleitung bis zum Beginn der Muskelrelaxation. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

3 Ergebnisse

Bei Mäusen des C57Bl/6-Stammes, die Iso 5% und Sevo 8% erhielten, war die lokomotorische Aktivität als Überquerungen der ML im Vergleich zur Luftkontrolle und zur CO₂ 100-Gruppe vermehrt. Darüber hinaus war die Lokomotion bei Tieren unter Sevo 8%-Exposition vermehrt verglichen mit Tieren der CO₂ 60-Gruppe (s. a. Abb. 3.18).

Mithilfe der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ($H = 41,680$ mit 5 Freiheitsgraden, $p < 0,001$) ergaben sich Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen in Bezug auf die Anzahl der Überquerungen der ML. Ihre Lokalisationen wurden mit dem Post-hoc-Test Dunn's Method als paarweiser Vergleich bestimmt. Tiere, die Iso 5% ausgesetzt wurden, überquerten signifikant häufiger ($p < 0,05$) die ML als Tiere, die einströmende Luft bzw. eine CO₂ 100-Behandlung erhielten. Mäuse unter Sevo 8%-Behandlung überquerten signifikant häufiger ($p < 0,05$) die ML als Mäuse unter einströmender Luft bzw. unter CO₂ 60- und CO₂ 100-Exposition. Die Gruppen, die CO₂ 60 und CO₂ 100 ausgesetzt wurden, unterschieden sich nicht untereinander und nicht von der Luftkontrollgruppe. Die Iso 5%-Gruppe unterschied sich nicht von der Sevo 8%-Gruppe.

Stammesunterschiede wurden hinsichtlich der lokomotorischen Aktivität in allen Behandlungsgruppen und in der Kontrollgruppe mit Mann-Whitney-Ranksummentests ermittelt. Die Anzahl der Überquerungen der ML war in der CO₂ 60-Gruppe bei Tieren des NMRI-Stammes signifikant größer ($p = 0,015$) als bei Tieren des C57Bl/6-Stammes. Auch in den CO₂ 100-, Iso 5%- Sevo 8%- und Luftkontrollgruppen waren die Werte für NMRI-Tiere signifikant höher (jeweils $p < 0,001$) als für C57Bl/6-Tiere.

- **Rearings**

Beim Rearing stand die Maus aufrecht auf ihren Hinterbeinen. Dabei hielt sie Wandkontakt mit den Vorderpfoten oder sie stand frei im Raum (Abb. 3.21).

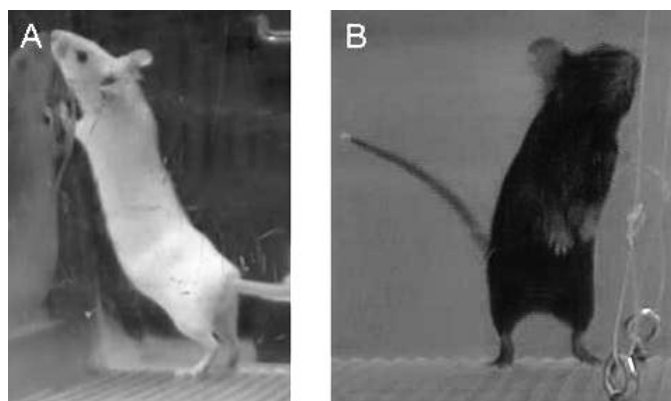


Abb. 3.21 Rearing-Verhalten

A Die NMRI-Maus stand aufrecht auf ihren Hinterbeinen, sie hielt mit beiden Vorderpfoten Kontakt zur Wand der Narkosekammer.

B Die C57Bl/6-Maus stand frei im Raum.

Bei NMRI-Mäusen, die CO₂ mit der mittleren und hohen Einfüllrate erhielten, war das Rearing-Verhalten im Vergleich zur Luftkontrolle und zur Iso 5%-Gruppe reduziert (s. a. Abb. 3.19).

Hinsichtlich des Rearing-Verhaltens ergab die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ($H = 20,413$ mit 4 Freiheitsgraden, $p < 0,001$), deren Lokalisationen mit dem Post-hoc-Test Dunn's Method als paarweiser Vergleich bestimmt wurden. Tiere, die der CO₂ 60- und CO₂ 100-Behandlung ausgesetzt waren, zeigten signifikant weniger ($p < 0,05$) Rearing-Verhalten als Mäuse der Luftkontrollgruppe. Tiere, die eine Behandlung mit Iso 5% und Sevo 8% erhielten, unterschieden sich nicht signifikant von der Luftkontrolle. Mäuse unter CO₂ 60- und CO₂ 100-Exposition zeigten signifikant weniger ($p < 0,05$) Rearing-Verhalten als Mäuse unter Iso 5%-Behandlung. Die beiden CO₂-Gruppen unterschieden sich nicht. Zwischen den Inhalationsanästhetika-Gruppen Iso 5% und Sevo 8% fand man ebenfalls keine signifikanten Unterscheide.

Bei C57Bl/6-Mäusen, die CO₂ 60 und CO₂ 100 erhielten, war das Rearing-Verhalten im Vergleich zur Luftkontrolle und zur Iso 5%- und Sevo 8%-Gruppe reduziert. Darüber hinaus war das Rearing-Verhalten bei Tieren unter CO₂ 60-Exposition verringert verglichen mit Tieren unter Iso 2%-Exposition (s. a. Abb. 3.20).

Die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ($H = 45,347$ mit 5 Freiheitsgraden, $p < 0,001$) in Bezug auf das Rearing-Verhalten. Ihre Lokalisationen wurden mit dem Post-hoc-Test Dunn's Method als paarweiser Vergleich bestimmt.

Bei Mäusen des C57Bl/6-Stammes fand sich bei Tieren unter CO₂ 60- und unter CO₂ 100-Exposition signifikant weniger ($p < 0,05$) Rearing-Verhalten als bei Tieren, die dem Luftstrom ausgesetzt waren. Tiere der Inhalationsanästhetika-Gruppen Iso 2%, Iso 5% und Sevo 8% unterschieden sich nicht signifikant von der Luftkontrolle. Tiere, die eine Behandlung mit CO₂ 60 erhielten, zeigten signifikant weniger ($p < 0,05$) Rearing-Verhalten als solche, die Iso 5%, Iso 2% und Sevo 8% erhielten. Die Exposition mit CO₂ 100 führte zu signifikant geringerem ($p < 0,05$) Rearing-Verhalten als die Behandlung mit Iso 5% und Sevo 8%. Zwischen der CO₂ 60- und CO₂ 100-Gruppe gab es keine signifikanten Unterschiede, ebenso unterschieden sich die Inhalationsanästhetika-Gruppen nicht signifikant voneinander.

Mit Mann-Whitney-Ranksummentests konnten Unterschiede zwischen den Stämmen aufgedeckt werden. NMRI-Mäuse aller Behandlungs- und der Kontrollgruppe zeigten signifikant mehr (jeweils $p < 0,001$) Rearing-Verhalten als C57Bl/6-Tiere.

3 Ergebnisse

- **Putzverhalten**

Keine Maus des NMRI- und des C57Bl/6-Stammes zeigte normales Komfort-Putzverhalten während der Untersuchung. Alle gezeigten Putzhandlungen konnten nach den Kriterien von Kalueff und Tuohimaa (2004) als stressinduziertes Verhalten klassifiziert werden: bei den Mäusen wurden länger als für eine Dauer von 5 s unterbrochene Bewegungen und inkorrektes Aneinanderreihen der Putzstadien festgestellt.

NMRI-Mäuse, die einem Luftstrom ausgesetzt wurden, zeigten am meisten Putzverhalten. Mäuse, die CO₂ 60 und CO₂ 100 ausgesetzt wurden, zeigten überhaupt kein Putzverhalten. Tiere zeigten während der Behandlung mit Sevo 8% weniger gestresstes Putzverhalten als Tiere der Luftkontrolle (s. a. Abb. 3.22).

Mittels der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ($H = 35,247$ mit 4 Freiheitsgraden, $p < 0,001$) bezüglich des stressinduzierten Putzverhaltens feststellen. Sie wurden mit dem Post-hoc-Test Dunn's Method als paarweiser Vergleich lokalisiert. Die Behandlung mit CO₂ 60, CO₂ 100 bzw. Sevo 8% führte zu signifikant geringerem ($p < 0,05$) Putzverhalten als die Exposition mit einströmender Luft. Die übrigen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant untereinander.

Bei Tieren des C57Bl/6 Stammes mit Luftstromexposition trat am meisten Putzverhalten auf. Bei keinem Tier unter CO₂ 60- und CO₂ 100-Exposition trat Putzverhalten auf. Die Behandlungen mit Isofluran und Sevofluran führten zu geringerem stressinduziertem Putzverhalten als die Behandlung mit einströmender Luft (s. a. Abb. 3.23).

Die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ($H = 51,260$ mit 5 Freiheitsgraden, $p < 0,001$) zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich des stressinduzierten Putzverhaltens. Ihre Lokalisationen wurden mit dem Post-hoc-Test Dunn's Method als paarweiser Vergleich bestimmt. Die Expositionen mit CO₂ 60, CO₂ 100, Iso 2%, Iso 5% und Sevo 8% führten zu signifikant geringerem ($p < 0,05$) Putzverhalten als die Exposition mit einströmender Luft. Die übrigen Gruppenpaarungen unterschieden sich nicht signifikant untereinander.

Hinsichtlich des Putzverhaltens gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen.

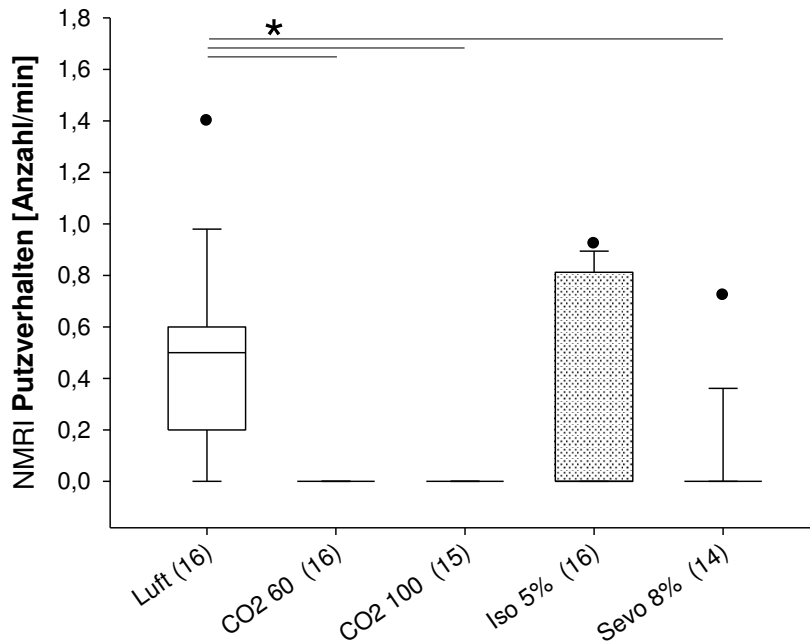


Abb. 3.22 Stressinduziertes Putzverhalten bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl der Putzperioden in [Anzahl/min] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) vom Start der Narkoseeinleitung bis zum Beginn der Muskelrelaxation. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

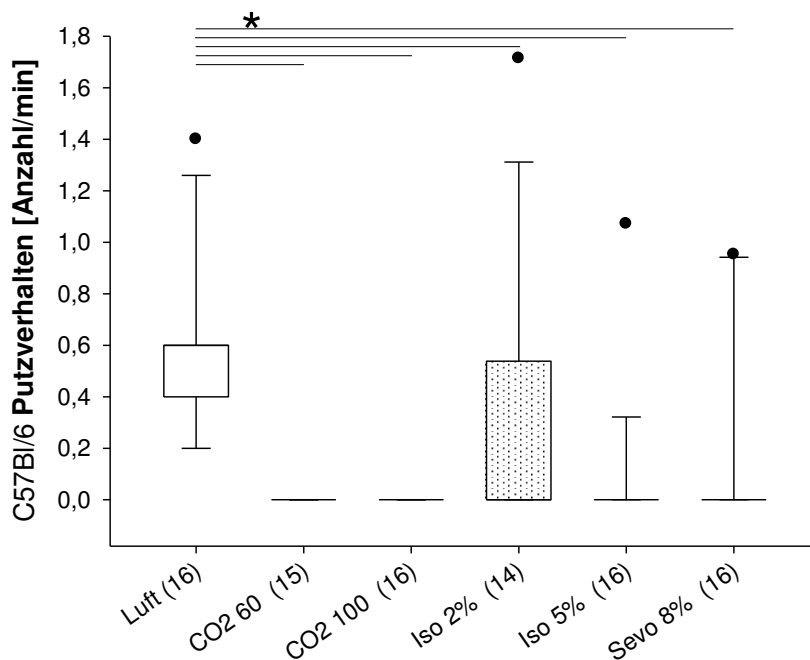


Abb. 3.23 Stressinduziertes Putzverhalten bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl der Putzperioden in [Anzahl/min] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) vom Start der Narkoseeinleitung bis zum Beginn der Muskelrelaxation. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

* = $p < 0,05$

3 Ergebnisse

3.5.3 Konvulsionen

Während der Narkosegaseinleitung konnten unterschiedliche Konvulsionen, wie Running Excitement, klonische und tonische Krämpfe sowie Popcorn-Konvulsionen beobachtet werden.

- **Running Excitement und klonischer Krampf**

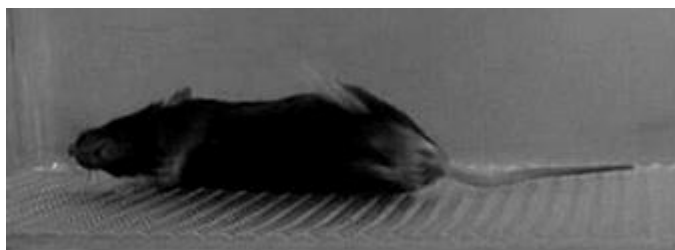


Abb. 3.24 Klonischer Krampf

Unter Sevo 8%-Exposition zeigte die C57Bl/6-Maus einen klonischen Krampf.

Bei NMRI-Mäusen traten Running Excitement und klonische Krämpfe weder während des LuftEinstroms noch während der Exposition mit CO₂ 60 und CO₂ 100 auf. Bei der Behandlung mit Iso 5% und Sevo 8% hingegen zeigten alle Tiere klonische Krämpfe, denen Running Excitement vorausging (s. a. Tab. 3.4 und Abb. 3.24).

Bei Mäusen des C57Bl/6-Stammes kam es weder während des LuftEinstroms noch während der Behandlung mit CO₂ 60 und CO₂ 100 zu Running Excitement und klonischen Krämpfen. Während der Exposition mit Iso 2% war bei 57%, mit Iso 5% bei 75% und mit Sevo 8% bei 100% der Tiere Running Excitement zu beobachten. Ein klonischer Krampf war dahingegen nur während der Behandlung mit Sevo 8% bei 25% der Tiere festzustellen (s. a. Tab. 3.5 und Abb. 3.24).

Beide Stämme unterschieden sich nicht signifikant bezüglich des Running Excitement. Signifikante Unterschiede hinsichtlich des Klonus wurden mittels z-Tests in den Iso 5%- und Sevo 8%-Gruppen ermittelt. Eine signifikant größere (jeweils $p < 0,001$) Anzahl von NMRI-Mäusen zeigte einen Klonus im Vergleich zu C57Bl/6-Mäusen.

Tab. 3.4 Konvulsionen und exzitatorische Phänomene bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl [N] der Tiere sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, die Running Excitement (Running Exc.), einen klonischen Krampfanfall und Opisthotonus während der Behandlung zeigten.

NMRI	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 5%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]	16	16	15	16	14
Running Exc. [N]	--	--	--	16	14
<i>Running Exc. [%]</i>	0	0	0	100	100
Klonischer Krampf [N]	--	--	--	16	14
<i>Klonischer Krampf [%]</i>	0	0	0	100	100
Opisthotonus [N]	--	--	--	4	9
<i>Opisthotonus [%]</i>	0	0	0	25	64

Tab. 3.5 Konvulsionen und exzitatorische Phänomene bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl [N] der Tiere sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, die Running Excitement (Running Exc.), einen klonischen Krampfanfall und Opisthotonus während der Behandlung zeigten.

C57Bl/6	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]	16	15	16	14	16	16
Running Exc. [N]	--	--	--	8	12	16
<i>Running Exc. [%]</i>	0	0	0	57	75	100
Klonischer Krampf [N]	--	--	--	--	--	4
<i>Klonischer Krampf [%]</i>	0	0	0	0	0	25
Opisthotonus [N]	--	--	--	--	--	--
<i>Opisthotonus [%]</i>	0	0	0	0	0	0

3 Ergebnisse

- **Opisthotonus (tonischer Krampf)**

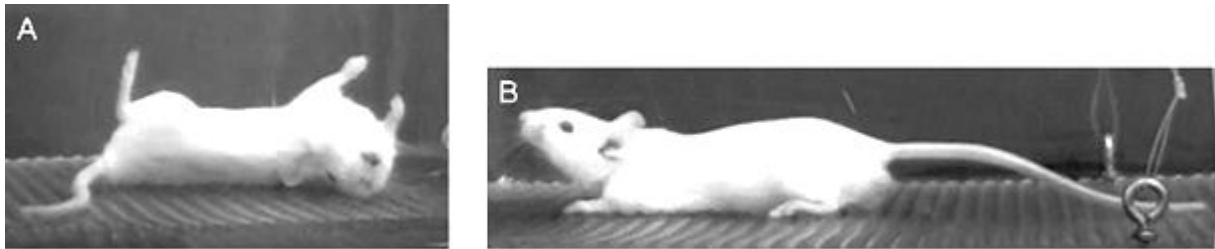


Abb. 3.25 Opisthotonus

Die NMRI-Mäuse zeigten unter Iso 5% und Sevo 8%-Exposition eine kurzzeitig anhaltende Überstreckung der Nacken-, Rücken- und teilweise der Schwanzmuskulatur

A in Seitenlage,
B in Bauchlage.

Bei Mäusen des NMRI-Stammes zeigten keine Tiere während des Luftstroms und während der Exposition mit CO₂ 60 und CO₂ 100 einen Opisthotonus. In der Iso 5%-Gruppe trat bei 25% der Tiere, in der Sevo 8%-Gruppe bei 64% der Tiere Opisthotonus auf (s. a. Tab. 3.4 und Abb. 3.25).

Bei C57Bl/6-Mäusen trat weder bei der Luftkontrolle noch bei den Behandlungen mit CO₂ 60 und CO₂ 100 bzw. bei den Behandlungen mit Iso 2%, Iso 5% und Sevo 8% ein Opisthotonus auf (s. a. Tab. 3.5).

Signifikante Unterschiede konnten zwischen beiden Stämmen in der Sevo 8%-Gruppe hinsichtlich des Opisthotonus mit z-Tests aufgedeckt werden. Eine signifikant größere ($p < 0,001$) Anzahl von NMRI-Mäuse zeigte einen Opisthotonus im Vergleich zu C57Bl/6-Tieren.

- **Popcorn-Konvulsionen**

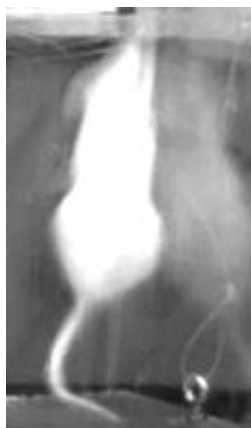


Abb. 3.26 Popcorn-Konvulsionen

Die NMRI-Maus zeigte unter CO₂ 100-Exposition sog. Popcorn-Konvulsionen, bei denen sie gegen den Deckel der Narkosebox springt.

Bei Mäusen des NMRI-Stammes traten in allen Behandlungsgruppen (CO₂ 60, CO₂ 100, Iso 5% und Sevo 8%) sogenannte Popcorn-Konvulsionen auf. Auch in der Luftkontrollgruppe konnte man ähnliche Verhaltensweisen, wie in die Höhe Springen, beobachten (s. a. Abb. 3.27 und Abb. 3.26).

Die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ergab zwar signifikante Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der Popcorn-Konvulsionen zwischen den Behandlungsgruppen ($H = 9,698$ mit 4 Freiheitsgraden, $p = 0,046$), deren Lokalisationen mit dem Post-hoc-Test Dunn's Method als paarweiser Vergleich bestimmt wurden. Hierbei wurden die signifikanten Unterschiede jedoch nicht aufgedeckt.

C57Bl/6-Mäuse zeigten unter CO₂ 60- und CO₂ 100-Behandlung Popcorn-Konvulsionen. Unter Iso 2%-, Iso 5%- und Sevo 8%-Exposition konnte man keine Popcorn-Konvulsionen feststellen. Bei Tieren, die einem Luftstrom ausgesetzt waren, traten ähnliche Verhaltensweisen, wie in die Höhe Springen, auf (s. a. Abb. 3.28).

Auch hier führte die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse zu signifikanten Unterschieden in Bezug auf die Anzahl der Popcorn-Konvulsionen zwischen den Behandlungsgruppen ($H = 11,510$ mit 5 Freiheitsgraden, $p = 0,042$). Ihre Lokalisationen wurden mit dem Post-hoc-Test Dunn's Method als paarweiser Vergleich bestimmt, wobei die signifikanten Unterschiede jedoch nicht aufgedeckt wurden.

Mittels Mann-Whitney-Ranksummentests wurden signifikante Unterschied zwischen NMRI- und C57Bl/6-Tieren hinsichtlich der Popcorn-Konvulsionen festgestellt. Eine signifikant größere Anzahl von NMRI-Mäusen der CO₂ 100- ($p = 0,025$), der Iso 5%- ($p = 0,039$) und der Sevo 8%-Gruppe ($p = 0,027$) zeigte Popcorn-Konvulsionen im Vergleich zu C57Bl/6-Tieren.

3 Ergebnisse

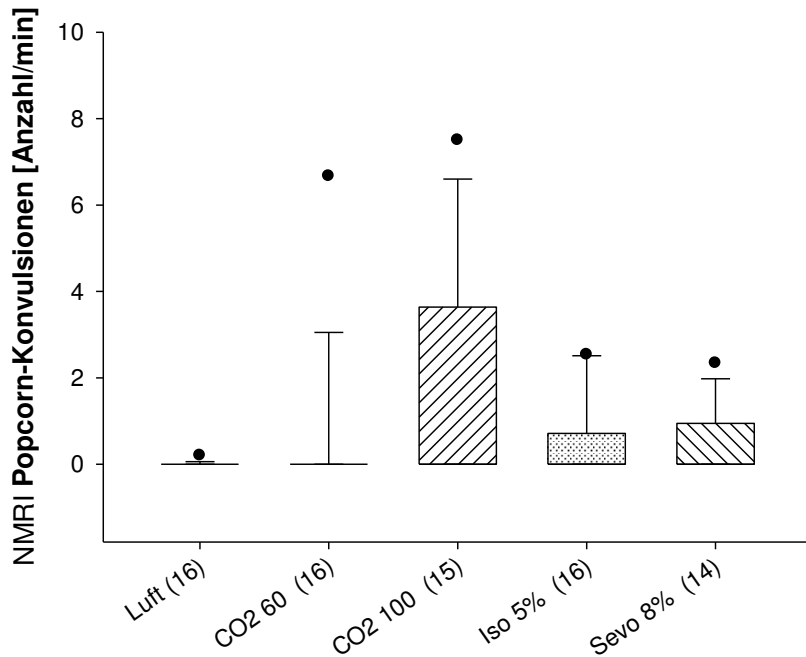


Abb. 3.27 Popcorn-Konvulsionen bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl der Popcorn-Konvulsionen oder ihnen ähnliche Verhaltensweisen in [Anzahl/min] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) vom Start der Narkoseeinleitung bis zum Beginn der Muskelrelaxation. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

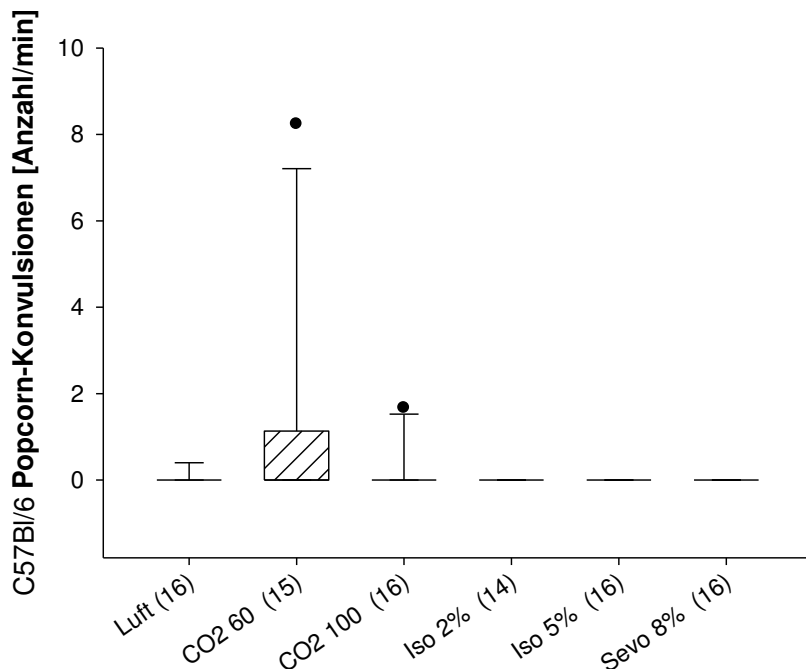
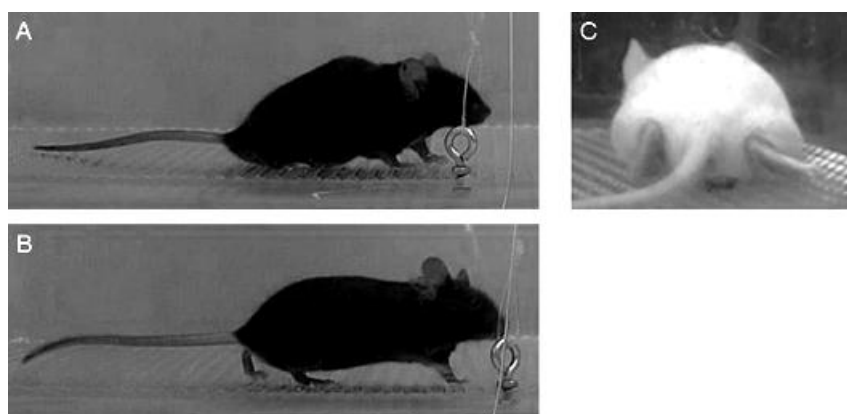


Abb. 3.28 Popcorn-Konvulsionen bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl der Popcorn-Konvulsionen oder ihnen ähnliche Verhaltensweisen in [Anzahl/min] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer) vom Start der Narkoseeinleitung bis zum Beginn der Muskelrelaxation. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

3.5.1 Hypotoner Gang und Ataxie

**Abb. 3.29 Hypotoner Gang**

- A Die C57Bl/6-Maus zeigte unter CO₂ 60-Exposition einen hypotonen Gang, bei dem Becken und Bauch des Tieres nach unten sanken und das Eigengewicht nicht auf den Hinterbeinen getragen werden konnte.
- B Zum Vergleich: normales Gangbild während Luftestrom.
- C Bei der NMRI-Maus waren unter CO₂ 60-Exposition die Hinterbeine nach seitlich/hinten ausgestreckt und wurden hinterhergezogen.

NMRI- und C57Bl/6-Mäuse, die nur dem Luftstrom ausgesetzt waren, zeigten kein verändertes Gangbild. Der hypotone Gang trat sowohl bei allen Tieren des NMRI-Stammes als auch bei allen Tieren des C57Bl/6-Stammes auf, die mit CO₂ 60 und mit CO₂ 100 behandelt wurden, nicht jedoch bei Tieren die mit den Inhalationsanästhetika Isofluran und Sevofluran behandelt wurden. Tiere, die nur dem Luftstrom ausgesetzt waren, zeigten kein verändertes Gangbild (s. a. Tab. 3.6 und Tab. 3.7).

Der hypotone Gang war nur in der ataktischen Phase festzustellen und nahm im Verlauf dieser Phase an Schwere zu. Zu Beginn der ataktischen Phase war bei diesen Tieren ein immer weiter nach unten geneigtes Becken festzustellen bis gegen Ende der ataktischen Phase der Bauch der Tiere flach auf dem Boden lag. Das Eigengewicht des Tieres konnte nicht auf den Hinterbeinen getragen werden. Gleichzeitig wurden die Hinterbeine zunehmend von seitlich nach hinten ausgestreckt und schließlich vollständig hinterhergezogen (Abb. 3.29).

Mäuse der Luftkontrollgruppen zeigten keine Ataxie. Der ataktische Gang trat bei allen NMRI-Mäusen und bei allen C57Bl/6-Mäusen auf, die mit CO₂ 60 und mit CO₂ 100 wie auch mit Iso 2%, Iso 5% und Sevo 8% behandelt wurden (s. Tab. 3.6 und Tab. 3.7).

Die Mäuse schwankten um die eigene Körperachse und bewegten Vorder- und Hintergliedmaßen unkoordiniert. Diese Gangbildveränderung war während der Phase der Ataxie zu beobachten und endete mit vollständig eingetretener Muskelrelaxation.

3 Ergebnisse

Tab. 3.6 Hypotoner Gang und Ataxie bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl [N] der Tiere sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, die einen hypotonen Gang und Ataxie während der Behandlung zeigten.

NMRI	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 5%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]	16	16	15	16	14
Hypotoner Gang [N]	--	16	15	--	--
<i>Hypotoner Gang [%]</i>	<i>0</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
Ataxie [N]	--	16	15	16	14
<i>Ataxie [%]</i>	<i>0</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>

Tab. 3.7 Hypotoner Gang und Ataxie bei C57BI/6-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl [N] der Tiere sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, die einen hypotonen Gang und Ataxie während der Behandlung zeigten.

C57BI/6	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]	16	15	16	14	16	16
Hypotoner Gang [N]	--	15	16	--	--	--
<i>Hypotoner Gang [%]</i>	<i>0</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
Ataxie [N]	--	15	16	14	16	16
<i>Ataxie [%]</i>	<i>0</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>

3.5.1 Vokalisationen

Bei beiden Mausstämmen konnten weder im hörbaren noch im Ultraschallbereich Lautäußerungen während der Narkosegas- bzw. Lufteinleitung festgestellt werden.

3.6 Untersuchung des Atmungssystems

3.6.1 Atembewegungen

Bei Mäusen des NMRI- und des C57Bl/6-Stammes waren während der Exposition mit einströmender Luft keine Veränderungen der Atembewegungen festzustellen. Heben und Senken des Brustkorbes und der Flanken waren auf der Videoaufnahme fast nicht zu erkennen.

Bei Mäusen beider Stämme waren während der Behandlung mit CO₂ 60 und CO₂ 100 bis zum Eintritt der Ataxiephase keine Veränderungen der Atembewegungen festzustellen. Im Verlauf der Ataxiephase zeichnete sich ein immer stärker sichtbares Heben und Senken des Brustkorbes und der Flanken ab, die Atemtiefe nahm zu. Eine Beurteilung der Atemfrequenz war auf den Videoaufnahmen zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Nachdem die Mäuse zum Liegen kamen, wurde nach und nach sichtbar, wie die Atemfrequenz abnahm. Heben und Senken des Brustkorbes und der Flanken waren weiterhin deutlich zu erkennen. Einige Tiere hatten das Maul geöffnet und „nickten“ mit dem Kopf. Beim Erreichen der chirurgischen Toleranz war die Frequenz weiter bis auf wenige Atemzüge pro Minute abgesunken und die Atmung konnte als Schnappatmung bezeichnet werden.

Bei NMRI- und C57Bl/6-Mäusen zeigten sich während der Exposition mit Iso 2% (nur bei C57Bl/6), mit Iso 5% und mit Sevo 8% zu Beginn der Narkoseeinleitung keine auf den Videoaufnahmen sichtbaren Veränderungen der Atembewegungen. Während der Phase der Ataxie und während klonischen Krämpfen („Laufbewegungen“ mit allen Gliedmaßen) konnten die Atembewegungen nicht beurteilt werden. Sobald die Mäuse lagen, konnte man zunehmend eine verstärkte abdominale Atmung feststellen, die Atemtiefe nahm zu. Im weiteren Verlauf konnte man eine Abnahme der Atemfrequenz beobachten. Beim Erreichen der chirurgischen Toleranz war keine Schnappatmung zu erkennen.

Bei keiner Maus des NMRI- oder des C57Bl/6-Stammes wurde Niesen festgestellt.

3.6.2 Makroskopische Untersuchung des Atemtraktes

- **Schleimhautschäden**

Bei allen Mäusen des NMRI- und des C57Bl/6-Stammes waren makroskopisch keine Schäden der Schleimhäute des Atemtraktes oder der Konjunktiven nach Exposition mit einströmender Luft, CO₂ 60 und CO₂ 100 sowie nach Exposition mit Iso 2%, Iso 5% und Sevo 8% festzustellen. Es traten keine Entzündungszeichen wie Rötungen, Schwellungen oder Sekretion der Schleimhäute nach Luft- und nach Narkosegasexposition auf.

- **Trachealausfluss**

Bei NMRI-Mäusen war nach Exposition mit einströmender Luft kein Trachealausfluss festzustellen. Nach CO₂ 60- bzw. CO₂ 100-Exposition sowie nach Iso 5%- bzw. Sevo 8%-Exposition kam es bei einigen Tieren zu Trachealausfluss in unterschiedlichen Schweregraden.

Die Two-Way ANOVA ergab hierbei keine signifikanten Unterschiede ($p = 1,000$) zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich des Trachealausflusses. Die Anzahl der Tiere einer Gruppe bzw. ihr prozentualer Anteil sind in Tab. 3.8 zu finden.

Beim C57Bl/6-Stamm war bei einem Tier der Luftkontrolle Sekretausfluss aus der Trachea zu erkennen. Bei allen Tieren, die CO₂ 100 erhielten, war kein Sekretausfluss zu finden. Nach CO₂ 60-Behandlung sowie nach Iso 2%-, Iso 5%- bzw. Sevo 8%-Exposition kam es bei einigen Tieren zu Trachealausfluss in den Schweregraden 1 - 3.

Die Two-Way ANOVA zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p = 1,000$) zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich des Trachealausflusses. Die Anzahl der Tiere einer Gruppe bzw. ihr prozentualer Anteil können der Tab. 3.9 entnommen werden.

- **Blutaspiration in die Trachea**

Beim NMRI-Stamm ließ sich Blutaspiration makroskopisch sowohl bei den Luftkontrolltieren als auch bei den Tieren der Behandlungsgruppen feststellen.

Mittels Two-Way ANOVA ließen sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 1,000$) zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich der makroskopisch erkennbaren Blutaspiration feststellen. Die Anzahl der Tiere einer Gruppe bzw. ihr prozentualer Anteil sind in Tab. 3.10 zu finden.

Beim C57Bl/6-Stamm trat der makroskopische Befund Blutaspiration sowohl bei Tieren, die dem Luftstrom ausgesetzt waren, als auch bei Tieren, die CO₂ 60, CO₂ 100, Iso 2%, Iso 5% und Sevo 8% ausgesetzt waren, auf.

Die Two-Way ANOVA ergab hierbei keine signifikanten Unterschiede ($p = 1,000$) zwischen den Behandlungsgruppen bezüglich der makroskopisch erhobenen Blutaspiration. Die Anzahl der Tiere einer Gruppe bzw. ihr prozentualer Anteil sind in Tab. 3.11 zu finden.

3 Ergebnisse

Tab. 3.8 Trachealausfluss bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl [N] der Tiere sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, bei denen nach der Behandlung Trachealausfluss auftrat. Der Befund ist in die Ausprägungsgrade 0 – 3 = nicht vorhanden, gering-, mittel- und schwergradig unterteilt.

NMRI	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 5%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]		16	16	15	16	14
Tracheal- ausfluss [N]	0	16	11	13	6	10
	1	--	--	1	7	1
	2	--	--	1	2	1
	3	--	5	--	1	2
Tracheal- ausfluss [%]	0	100	68,8	86,7	37,5	71,4
	1	0	0	6,7	43,8	7,1
	2	0	0	6,7	12,5	7,1
	3	0	31,3	0	6,3	14,3

Tab. 3.9 Trachealausfluss bei C57BI/6-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl [N] der Tiere sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, bei denen nach der Behandlung Trachealausfluss auftrat. Der Befund ist in die Ausprägungsgrade 0 – 3 = nicht vorhanden, gering-, mittel- und schwergradig unterteilt.

C57BI/6	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]		16	15	16	14	16	16
Tracheal- ausfluss [N]	0	15	14	16	8	9	9
	1	--	1	--	5	5	4
	2	1	--	--	1	1	2
	3	--	--	--	--	1	1
Tracheal- ausfluss [%]	0	93,8	93,3	100	57,1	56,3	56,3
	1	0	6,7	0	35,7	31,3	25
	2	6,3	0	0	7,1	6,3	12,5
	3	0	0	0	0	6,3	6,3

Tab. 3.10 Makroskopischer Befund: Blutaspiration bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl [N] der Tiere sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, bei denen nach der Behandlung Blutaspiration auftrat. Der Befund ist in die Ausprägungsgrade 0 – 1 = nicht vorhanden und vorhanden unterteilt.

NMRI	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 5%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]		16	16	15	16	14
Blutaspiration [N]	0	7	13	12	13	10
	1	9	3	3	3	4
<i>Blutaspiration [%]</i>	0	<i>43,8</i>	<i>81,3</i>	<i>80</i>	<i>81,3</i>	<i>71,4</i>
	1	<i>56,3</i>	<i>18,8</i>	<i>20</i>	<i>18,8</i>	<i>28,6</i>

Tab. 3.11 Makroskopischer Befund: Blutaspiration bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl [N] der Tiere sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, bei denen nach der Behandlung Blutaspiration auftrat. Der Befund ist in die Ausprägungsgrade 0 – 1 = nicht vorhanden und vorhanden unterteilt.

C57Bl/6	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]		16	15	16	14	16	16
Blutaspiration [N]	0	4	8	5	9	7	8
	1	12	7	11	5	9	8
<i>Blutaspiration [%]</i>	0	<i>25</i>	<i>53,3</i>	<i>31,3</i>	<i>64,3</i>	<i>43,8</i>	<i>50</i>
	1	<i>75</i>	<i>46,7</i>	<i>68,8</i>	<i>35,7</i>	<i>56,3</i>	<i>50</i>

3 Ergebnisse

- **Atelektase**

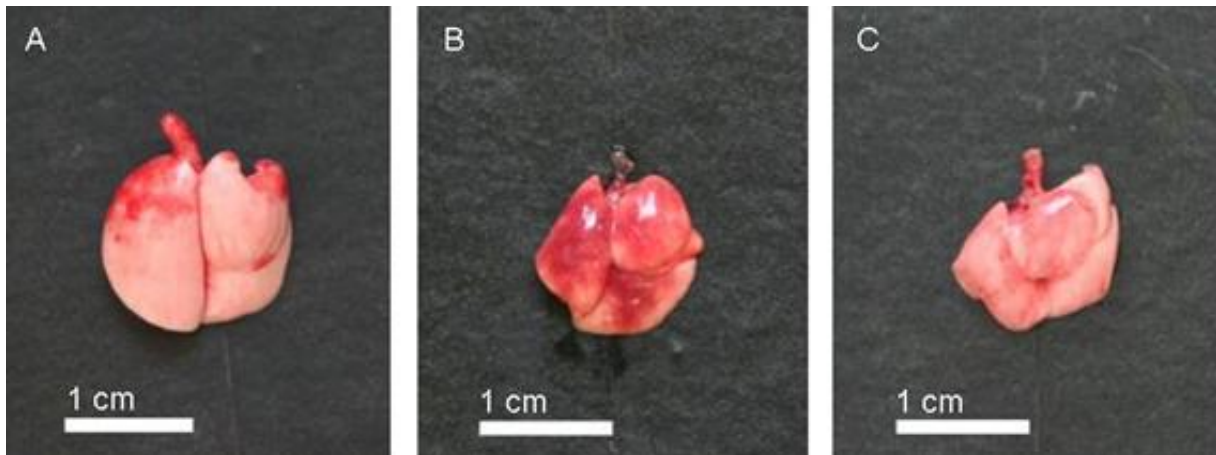


Abb. 3.30 Atelektase

- A Diese Lunge stammt von einer C57Bl/6-Maus, die einem Luftstrom ausgesetzt war. Die Lunge ist physiologisch retrahiert, die Lappenränder sind scharf begrenzt. Es liegt keine makroskopisch erkennbare Atelektase vor.
- B Diese Lunge stammt von einer C57Bl/6-Maus, die mit CO₂ 60 behandelt wurde. Die Lunge ist übermäßig retrahiert, die Lappenränder erscheinen teils wie zusammengequetscht. Es liegt eine makroskopisch erkennbare Atelektase vor.
- C Diese Lunge stammt von einer C57Bl/6-Maus, die mit CO₂ 100 behandelt wurde. Die Lunge ist übermäßig retrahiert, die Lappenränder erscheinen teils wie zusammengequetscht. Es liegt eine makroskopisch erkennbare Atelektase vor.

Eine physiologisch retrahierte Lunge sowie der makroskopische Befund einer Atelektase sind in der Abb. 3.30 dargestellt.

Bei den NMRI-Kontrolltieren und der Iso 5%-Gruppe des NMRI-Stammes fanden sich makroskopisch keine Atelektasen. Unter den Tieren der CO₂ 60-, der CO₂ 100- und der Sevo 8%-Gruppe fanden sich die Befunde makroskopisch erkennbare Atelektasen.

Die Two-Way ANOVA ergab hierbei keine signifikanten Unterschiede ($p = 1,000$) zwischen den Behandlungsgruppen bezüglich den makroskopisch erhobenen Atelektasen. Die Anzahl der Tiere einer Gruppe bzw. ihr prozentualer Anteil sind in Tab. 3.12 aufgelistet.

Bei den C57Bl/6-Mäusen wiesen sowohl einige Tiere der Luftkontrolle wie auch einige Tiere der CO₂ 60-, CO₂ 100-, Iso 2%-, Iso 5%- und Sevo 8%-Gruppen makroskopisch sichtbare Atelektasen auf.

Die Two-Way ANOVA zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p = 1,000$) zwischen den Behandlungsgruppen bezüglich dieses Befundes. Die Anzahl der Tiere einer Gruppe bzw. ihr prozentualer Anteil sind der Tab. 3.13 zu entnehmen.

Tab. 3.12 Makroskopischer Befund: Atelektase bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl [N] der Tiere sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, bei denen nach der Behandlung Atelektase auftrat. Der Befund ist in die Ausprägungsgrade 0 – 1 = nicht vorhanden und vorhanden unterteilt.

NMRI	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 5%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]		16	16	15	16	14
Atelektase [N]	0	16	13	9	16	11
	1	--	3	6	--	3
Atelektase [%]	0	100	81,3	60	100	78,6
	1	0	18,8	40	0	21,4

Tab. 3.13 Makroskopischer Befund: Atelektase bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl [N] der Tiere sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, bei denen nach der Behandlung Atelektase auftrat. Der Befund ist in die Ausprägungsgrade 0 – 1 = nicht vorhanden und vorhanden unterteilt.

C57Bl/6	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]		16	15	16	14	16	16
Atelektase [N]	0	13	4	6	6	8	10
	1	3	11	10	8	8	6
Atelektase [%]	0	81,3	26,7	37,5	42,9	50	62,5
	1	18,8	73,3	62,5	57,1	50	37,5

3 Ergebnisse

- **Relatives Lungengewicht**

Bei den Mäusen des NMRI-Stammes unterschied sich das relative Lungengewicht nicht zwischen der Kontrollgruppe und zwischen den einzelnen CO₂- und Inhalationsanästhetika-Gruppen (s. a. Abb. 3.31).

Die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ergab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des relativen Lungengewichts zwischen den Behandlungsgruppen ($H = 6,967$ mit 4 Freiheitsgraden, $p = 0,138$). Im Anhang sind in der Tab. 9.31 die Werte für das relative Lungengewicht der einzelnen Gruppen aufgelistet.

Bei den C57Bl/6-Mäusen fanden sich keine Unterschiede bezüglich des Lungengewichts zwischen der Luftkontrollgruppe und zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen mit CO₂, Isofluran und Sevofluran (s. a. Abb. 3.32).

Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen bei der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ($H = 3,421$ mit 5 Freiheitsgraden, $p = 0,635$). Die Werte des relativen Lungengewichts können im Anhang der Tab. 9.37 entnommen werden.

Werte für das absolute Lungengewicht der Kontroll- und der Behandlungsgruppen können in Tab. 9.31 und Tab. 9.37 des Anhangs eingesehen werden.

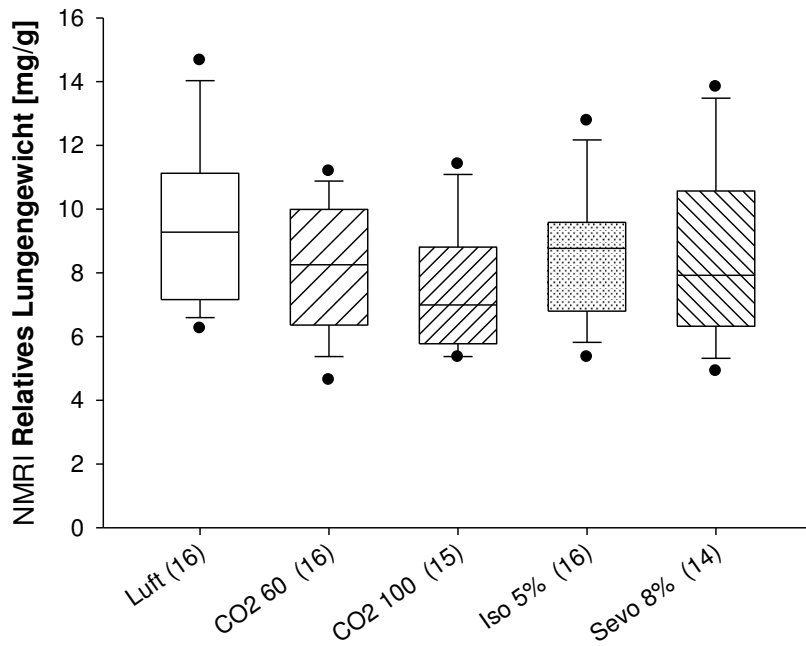


Abb. 3.31 Relatives Lungengewicht bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die relativen Lungengewichte in [mg/g] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer). Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

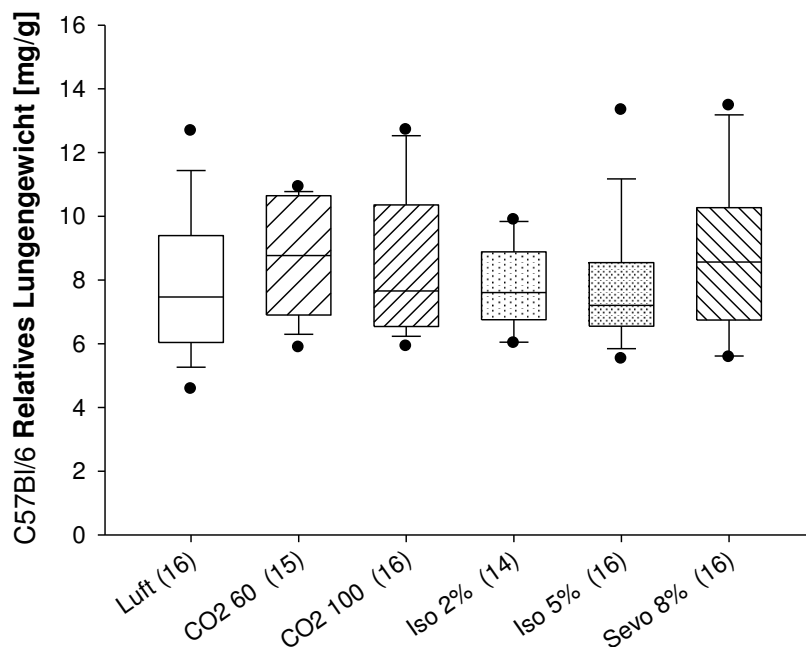


Abb. 3.32 Relatives Lungengewicht bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die relativen Lungengewichte in [mg/g] als Boxplots (Median = 0,5-Quantil, Beginn und Ende der Box = 0,25- und 0,75-Quantile, Whiskers = 0,05- und 0,95-Quantile, Punkte = Ausreißer). Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

3 Ergebnisse

- **Morphometrische Untersuchung: Lungengröße**

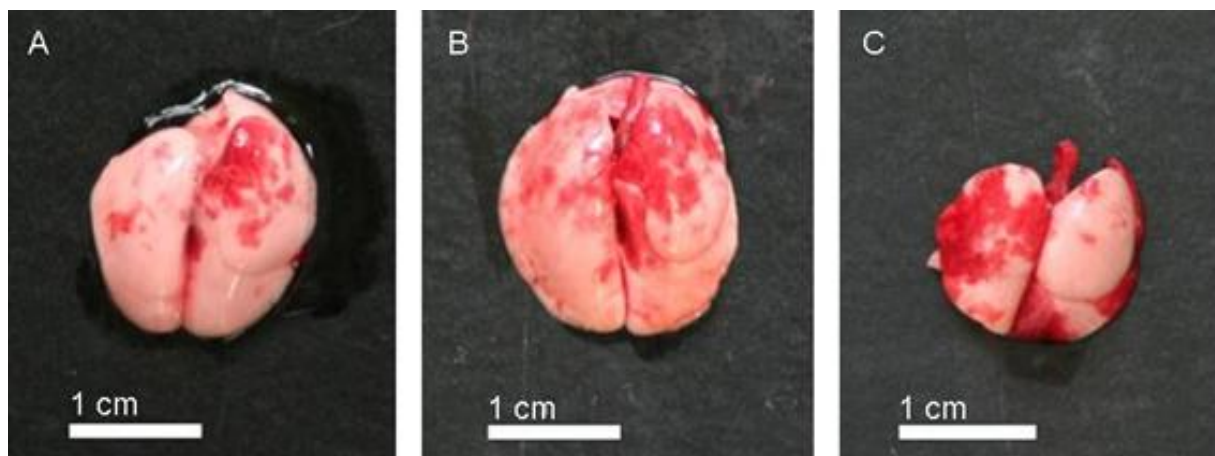


Abb. 3.33 Lungengröße und Petechien und Einblutungen

- A Diese Lunge stammt von einer NMRI-Maus, die einem Luftstrom ausgesetzt war. Die Fläche der dorsalen Lungenoberseite beträgt 284,07 mm², der Flächenanteil der Petechien und Blutungen 24,2%.
- B Diese Lunge stammt von einer NMRI-Maus, die mit Sevo 8% behandelt wurde. Die Fläche der dorsalen Lungenoberseite beträgt 222,14 mm², der Flächenanteil der Petechien und Blutungen 18,0%.
- C Diese Lunge stammt von einer C57Bl/6-Maus, die mit CO₂ 60 behandelt wurde. Die Fläche der dorsalen Lungenoberseite beträgt 157,44 mm², der Flächenanteil der Petechien und Blutungen 39,3%.

Die Lungengröße wurde als dorsale Oberfläche der Lunge, die als zweidimensionale Flächenprojektion auf den Bildaufnahmen morphometrisch bestimmt wurde, dargestellt (s. Abb. 3.33).

Bei NMRI-Mäusen waren die Werte für die dorsale Oberfläche der Lunge von jeweils 4 zufällig ausgewählten Tieren bei der Luftkontrolle zwischen 189,67 und 284,07 mm², bei den Tieren mit CO₂ 60-Behandlung zwischen 129,59 und 193,22 mm² und bei den Tieren mit CO₂ 100-Behandlung zwischen 122,34 und 192,93 mm². Die Werte für die Iso 5%-Gruppe lagen zwischen 191,71 und 223,86 mm², für die Sevo 8%-Gruppe zwischen 141,88 und 222,14 mm² (s. a. Abb. 3.34).

Von jeweils 4 zufällig ausgewählten Tieren des C57Bl/6-Stammes lagen bei den Tieren der Luftkontrolle die Werte für die dorsale Oberfläche der Lunge zwischen 128,95 und 190,06 mm², bei Tieren nach CO₂ 60-Exposition zwischen 94,76 und 163,59 mm² und bei Tieren nach CO₂ 100-Exposition zwischen 99,90 und 157,44 mm². Für Mäuse der Iso 2%-Gruppe reichten die Werte von 110,24 bis 202,24 mm², bei der Iso 5%-Gruppe von 123,87 bis 160,64 mm² und bei der Sevo 8%-Gruppe von 117,65 bis 177,57 mm² (s. a. Abb. 3.35).

Tiere beider Stämme, die mit CO₂ 60 und CO₂ 100 behandelt wurden, wiesen zwar die geringste dorsale Lungenoberfläche auf, doch gab die Verteilung der Einzelwerte keinen Anlass, biologisch relevante Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen zu vermuten. Aus diesem Grund wurde auf die Auswertung weiterer Proben verzichtet.

- **Morphometrische Untersuchung: Petechien und Blutungen**

Petechien und Blutungen hoben sich als rote Bereiche auf der normal rosafarbenen Lungenoberfläche ab (s. Abb. 3.33).

Bei den jeweils 4 zufällig ausgewählten NMRI-Mäusen fanden sich bei allen Tieren, d. h. sowohl in der Luftkontrollgruppe als auch in allen Behandlungsgruppen, Petechien und Blutungen, die schon mit bloßem Auge auf der dorsalen Lungenoberfläche erkannt werden konnten. Der Flächenanteil dieser Veränderung reichte bei den Kontrolltieren von 9,2 bis 59,2%, bei den mit CO₂ 60 behandelten Tieren von 3,4 bis 28,4% und bei den mit CO₂ 100 behandelten Tieren von 2,7 bis 10,4%. Der Flächenanteil der Petechien und Blutungen nach Iso 5%-Exposition reichte von 6,3 bis 45,9%, nach Sevo 8%-Exposition von 7,5 bis 29,2% (s. a. Abb. 3.36).

Bei Mäusen des C57Bl/6-Stammes traten bei allen der jeweils 4 zufällig ausgewählten Tiere sowohl nach Exposition mit einströmender Luft als auch nach Exposition mit CO₂, Isofluran und Sevofluran makroskopisch erkennbare Petechien und Blutungen auf der dorsalen Lungenoberfläche auf. Der Flächenanteil dieser Blutansammlungen betrug bei der Luftgruppe 3,5 bis 60,5%, bei der CO₂ 60-Gruppe 7,2 bis 42,0% und bei der CO₂ 100-Gruppe 2,4 bis 39,3%. Bei Tieren nach Iso 2%-Exposition reichte dieser Flächenanteil von 3,9 bis 26,5%, nach Iso 5%-Exposition von 4,5% bis 66,4% und nach Sevo 8%-Exposition von 7,5 bis 54,6% (s. a. Abb. 3.37).

Die Verteilung der Einzelwerte hinsichtlich der auf der Lungenoberfläche erkennbaren Petechien und Blutungen bei NMRI- und C57Bl/6-Mäusen gaben keinen Anlass, Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen zu vermuten. Aus diesem Grund wurde auf die Auswertung weiterer Proben verzichtet.

3 Ergebnisse

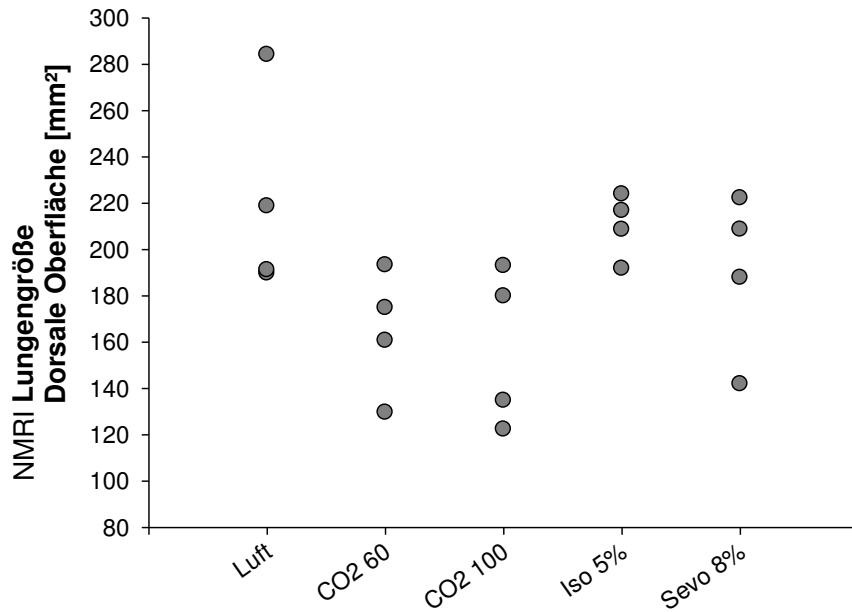


Abb. 3.34 Lungengröße (dorsale Oberfläche) bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Werte für die Lungengröße (dorsale Oberfläche) in [mm²] als Einzelwerte. Es wurden je Gruppe 4 zufällig ausgewählte Tiere untersucht.

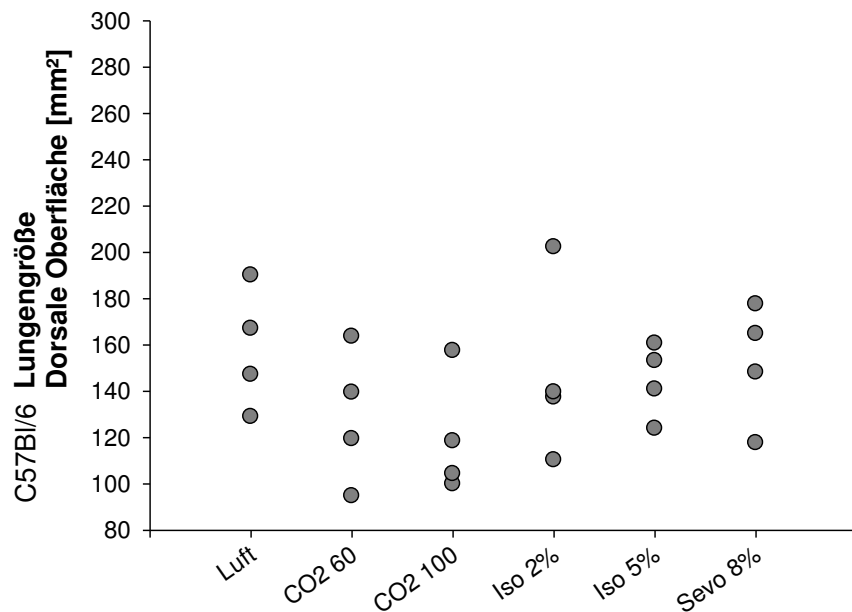


Abb. 3.35 Lungengröße (dorsale Oberfläche) bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Werte für die Lungengröße (dorsale Oberfläche) in [mm²] als Einzelwerte. Es wurden je Gruppe 4 zufällig ausgewählte Tiere untersucht.

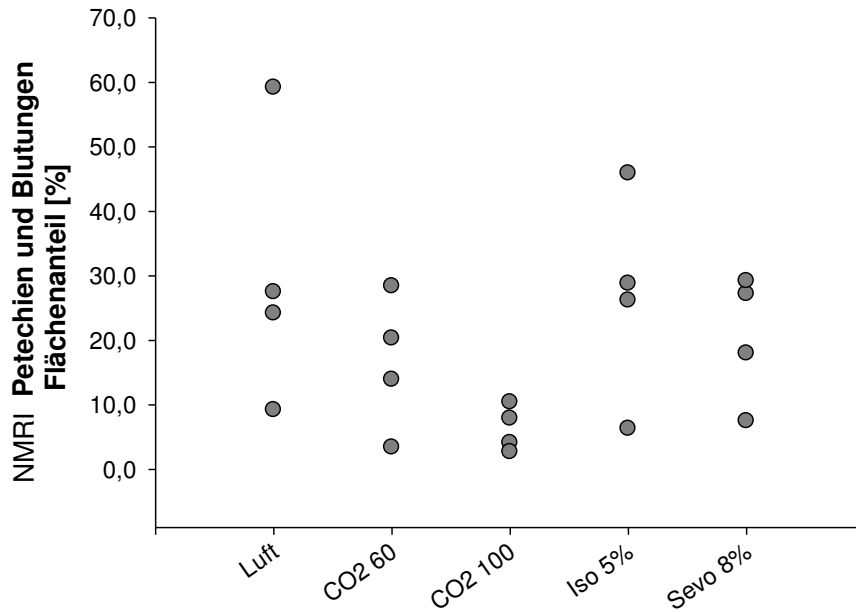


Abb. 3.36 Makroskopischer Befund: Petechien und Einblutungen bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind Petechien und Einblutungen als Flächenanteil der dorsalen Lungenoberfläche in [%] als Einzelwerte. Es wurden je Gruppe 4 zufällig ausgewählte Tiere untersucht.

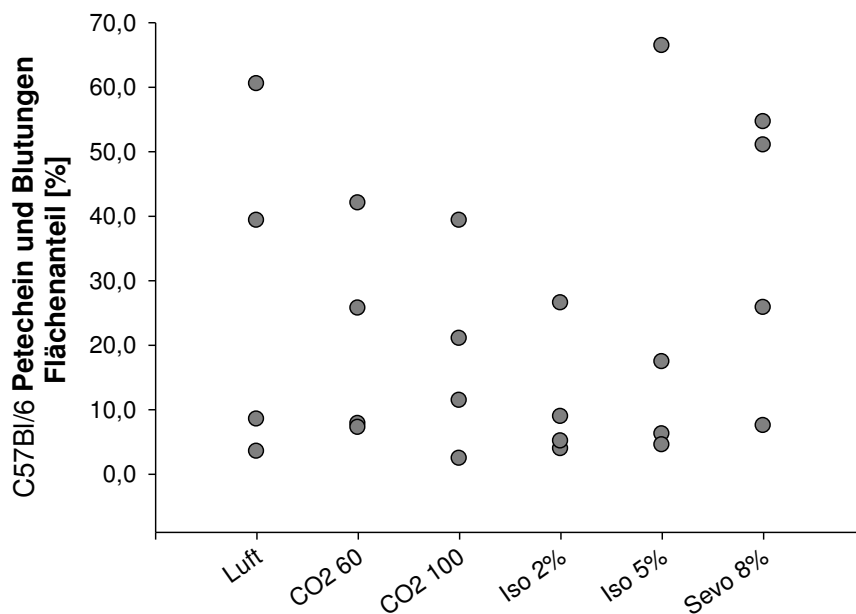


Abb. 3.37 Makroskopischer Befund: Petechien und Einblutungen bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind Petechien und Einblutungen als Flächenanteil der dorsalen Lungenoberfläche in [%] als Einzelwerte. Es wurden je Gruppe 4 zufällig ausgewählte Tiere untersucht.

3.6.3 Mikroskopische Untersuchung des Atemtraktes

3.6.3.1 Histologische Untersuchung

- **Blutaspiration in die Trachea und in die Bronchien**

Im histologischen Schnittbild waren massive Ansammlungen von Erythrozyten und weiteren Blutzellen im Lumen der Trachea und im Lumen der anschließenden Bronchien zu erkennen (s. Abb. 3.39). Zum Vergleich finden sich auf Abb. 3.38 unveränderte, normale Lungenabschnitte.

Sowohl bei NMRI- als auch bei C57Bl/6-Mäusen war der Befund Blutaspiration in die Trachea und in die Bronchien in allen Kontroll- sowie in allen Behandlungsgruppen zu erheben.

Bei NMRI-Mäusen fanden sich Blutansammlungen in der Trachea bei mindestens 2 der jeweils 4 untersuchten Tiere, die sowohl der Kontrollgruppe als auch den Behandlungsgruppen angehörten.

Bei allen 4 untersuchten Proben der Luft-, der Iso 5%- und der Sevo 8%-Gruppe trat der Befund Blutaspiration in die Bronchien auf, bei ersterer mit dem Schweregrad 1, bei letzteren mit den Schweregraden 1 und 2. Bei 3 von 4 untersuchten Tieren der CO₂ 60-Gruppe sowie bei 1 von 4 Tieren der CO₂ 100-Gruppe war Blutaspiration in den Bronchien mit dem Schweregrad 2 zu erkennen.

Bei allen Proben mit dem Befund Blutaspiration in die Trachea, mit Ausnahme 1 Probe der CO₂ 100-Gruppe, lag auch der Befund Blutaspiration in die Bronchien vor. Nur bei 1 Probe der Luftkontrolle fand man Blutansammlungen in den Bronchien, jedoch nicht in der Trachea (der gezeigten Tabelle nicht zu entnehmen).

Bei C57Bl/6-Mäusen ergab sich bei 1 von 3 untersuchten Tieren der Kontrollgruppe der Befund Blutaspiration in der Trachea. Bei mindestens 1 der jeweils 4 untersuchten Proben der CO₂ 60-, CO₂ 100-, Iso 5%- und Sevo 8%-Gruppe fand man Blutansammlungen in der Trachea. In der Iso 2%-Gruppe kam dieser Befund nicht vor.

Bei 3 von 4 Proben der Luftkontrollgruppe, der Iso 2%-, Iso 5%- und der Sevo 8%-Gruppe erkannte man Blutaspiration in die Bronchien. Bei allen 4 Proben der CO₂ 60- und bei der Hälfte der Proben der CO₂ 100-Gruppe zeigte sich ebenfalls der Befund Blutaspiration in die Bronchien. Die jeweiligen Schweregrade sind der Tab. 3.15 zu entnehmen.

Bei allen Tieren mit dem Befund Blutaspiration in die Trachea lag auch der Befund Blutaspiration in die Bronchien vor. Bei einigen Tieren (Luft: 1 von 3, Iso 2%: 3 von 4, Iso 5%: 2 von 4) fand man zwar Blut in den Bronchien, jedoch nicht in der Trachea (der gezeigten Tabelle nicht zu entnehmen).

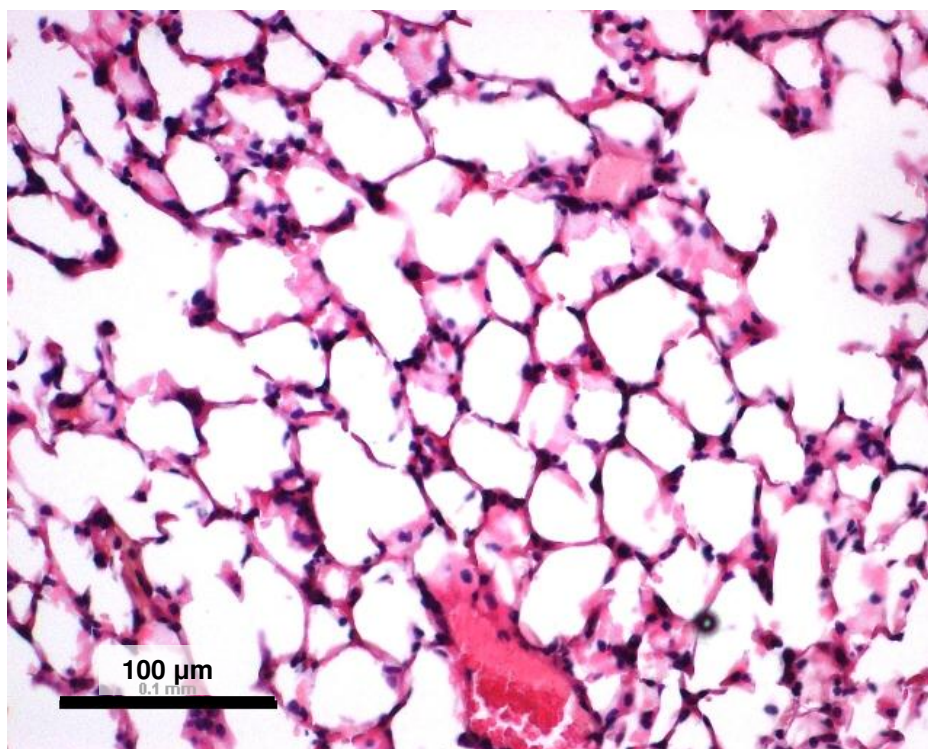


Abb. 3.38 Normales Lungengewebe

Die freien, lufthaltigen Alveolarräume werden von feinen Alveolarsepten (Alveolozyten Typ I und II) gebildet. Die Kapillaren, die wie ein Netz die Alveolen überziehen sind fast nicht zu erkennen. Blutzellen finden sich nur in größeren Blutgefäßen, wie in einer Vene (unten mittig)
HE- Färbung

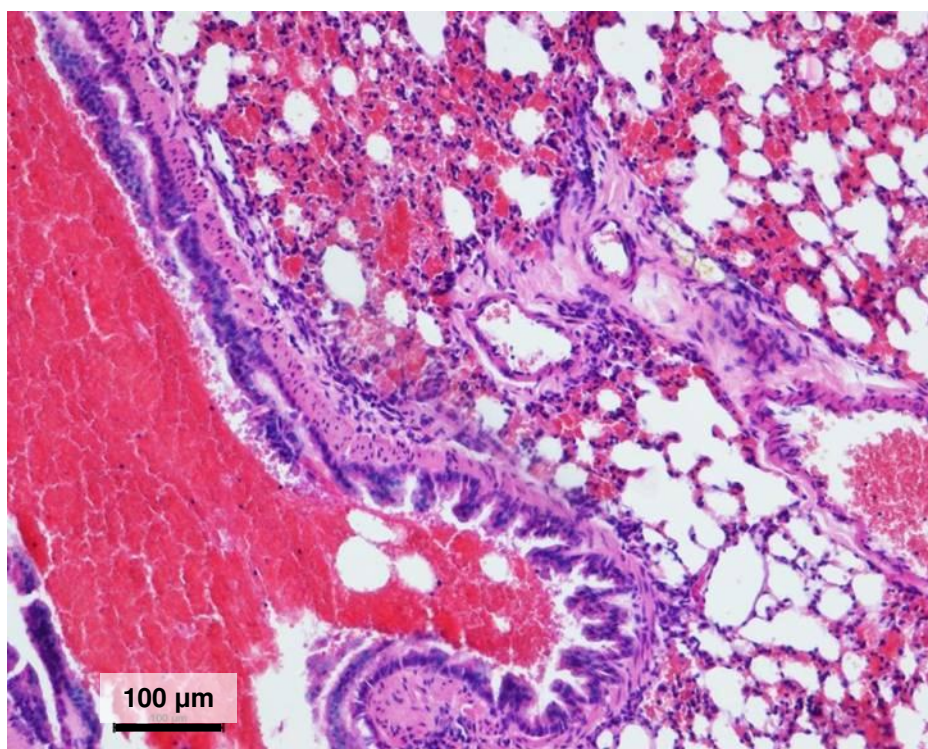


Abb. 3.39 Blutaspiration in die Trachea und in die Bronchien

Das Lumen der Trachea ist fast völlig mit Blutzellen gefüllt, der angrenzende Bronchus (rechts im Bild) ebenso. Die Alveolarräume sind vor allem im oberen Teil des Bildes mit Blutzellen gefüllt.
HE-Färbung

3 Ergebnisse

Tab. 3.14 Mikroskopischer Befund: Blutaspiration bei NMRI-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von 4 zufällig ausgewählten Tieren einer Gruppe, bei denen nach der Behandlung Blutaspiration in die Trachea und in die Bronchien auftraten. Der Befund Blutaspiration in die Trachea ist in die Ausprägungsgrade 0 – 1 = nicht vorhanden und vorhanden unterteilt. Der Befund Blutaspiration in die Bronchien ist in die Ausprägungsgrade 0 – 3 = nicht vorhanden, gering-, mittel- und schwergradig unterteilt.

NMRI	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 5%	Sevo 8%
Trachea: Blutaspiration [N]	0	1	1*	2	--	--
	1	3	2*	2	4	4
Bronchien: Blutaspiration [N]	0	--	1	3	--	--
	1	4	--	--	1	2
	2	--	3	1	3	2
	3	--	--	--	--	--

* nur 3 Schnitte wurden ausgewertet, auf dem 4. war die Trachea nicht vorhanden

Tab. 3.15 Mikroskopischer Befund: Blutaspiration bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von 4 zufällig ausgewählten Tieren einer Gruppe, bei denen nach der Behandlung Blutaspiration in die Trachea und in die Bronchien auftraten. Der Befund Blutaspiration in die Trachea ist in die Ausprägungsgrade 0 – 1 = nicht vorhanden und vorhanden unterteilt. Der Befund Blutaspiration in die Bronchien ist in die Ausprägungsgrade 0 – 3 = nicht vorhanden, gering-, mittel- und schwergradig unterteilt.

C57Bl/6	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 8%
Trachea: Blutaspiration [N]	0	2*	2	2	4	3	1
	1	1*	2	2	--	1	3
Bronchien: Blutaspiration [N]	0	1	--	2	1	1	1
	1	2	3	--	3	2	1
	2	1	1	2	--	--	1
	3	--	--	--	--	1	1

* nur 3 Schnitte wurden ausgewertet, auf dem 4. war die Trachea nicht vorhanden

- **Gestaute und gefüllte Venen und Kapillaren**

Die Venen waren prall mit Erythrozyten und weiteren Blutzellen gefüllt (s. Abb. 3.40). In einer höheren Vergrößerung waren die gefüllten Kapillaren deutlich zu erkennen, bei im Längsschnitt getroffenen Kapillaren erschienen die Erythrozyten im Lumen wie Geldrollen (s. Abb. 3.41). Die Kapillaren umspannten die Alveolen wie ein Netz und befanden sich im Alveolarseptum. Der Befund sehr stark gefüllter Kapillaren ging fließend in den Befund Einblutungen in die Alveolarsepten über.

Bei NMRI- sowie bei C57Bl/6-Mäusen ergab sich der Befund gestauter und gefüllter Venen und Kapillaren bei allen Kontroll- und Behandlungsgruppen.

Bei Mäusen des NMRI-Stammes sah man in der Luftkontrollgruppe und in der Iso 5%- bzw. Sevo 8%-Gruppe bei 2 von 4 der untersuchten Proben Stauungserscheinungen in den venösen Blutgefäßen. Bei den Gruppen mit CO₂ 60- und CO₂ 100-Exposition traten bei jeweils 1 von 4 Proben gestaute Venen auf.

Bei allen Tieren der Luftkontrolle, der CO₂ 60- und der Iso 5%-Gruppe fanden sich gefüllte und gestaute Kapillaren. Dieser Befund zeigte sich ebenfalls bei 3 von 4 Proben von Tieren, die eine Behandlung mit CO₂ 100 und mit Sevo 8% erhielten (s. a. Tab. 3.16).

Wenn die Venen gestaut und gefüllt waren, so waren auch immer die Kapillaren gestaut und gefüllt. Umgekehrt galt das jedoch nicht immer. Den alleinigen Befund gestauter Kapillaren fand man bei einigen Schnitten (Luft, CO₂ 100 und Iso 5%: 2 von 4; CO₂ 60: 3 von 4 und Sevo 8%: 1 von 4) (der gezeigten Tabelle nicht zu entnehmen).

Bei C57Bl/6-Mäusen erkannte man in der Luftkontrollgruppe und in der CO₂ 60-Gruppe bei 2 von 4 der untersuchten Proben Stauungserscheinungen in den venösen Gefäßen. In der CO₂ 100-, in der Iso 5%- und in der Sevo 8%-Gruppe ergab sich der Befund venöser Blutfülle und Blutstau bei 1 von 4 untersuchten Tieren. Nach der Behandlung mit Iso 2% sah man bei keiner Probe gefüllte und gestaute Venen.

Bei allen untersuchten Tieren der Luftkontrolle, der CO₂ 60- und der CO₂ 100-Gruppe traten gefüllte und gestaute Kapillaren auf. Bei 3 von 4 Proben der Iso 2%- und Iso 5%-Gruppe sowie bei 2 von 4 untersuchten Proben der Sevo 8%-Gruppe zeigte sich ebenfalls dieser Befund (s. a. Tab. 3.17).

Wenn der Befund gestauter und gefüllter Venen vorlag, so fand man auch gestaute und gefüllte Kapillaren (mit Ausnahme 1 Probe der Iso 5%-Gruppe). Nur gefüllte und gestaute Kapillaren, aber nicht gestaute Venen, kamen in einigen Proben vor (Luft und CO₂ 60: 2 von 4; CO₂ 100, Iso 2% und Iso 5%: 3 von 4; Sevo 8%: 1 von 4) (der gezeigten Tabelle nicht zu entnehmen).

3 Ergebnisse

Tab. 3.16 Mikroskopischer Befund: Blutfülle und Blutstau bei NMRI-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von 4 zufällig ausgewählten Tieren einer Gruppe, bei denen nach der Behandlung gestaute und gefüllte Venen und Kapillaren (Blutfülle/-stau) auftraten. Die Befunde sind in die Ausprägungsgrade 0 – 1 = nicht vorhanden und vorhanden unterteilt.

NMRI	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 5%	Sevo 8%
Venen: Blutfülle/-stau [N]	0	2	3	3	2	2
	1	2	1	1	2	2
Kapillaren: Blutfülle/-stau [N]	0	--	--	1	--	1
	1	4	4	3	4	3

Tab. 3.17 Mikroskopischer Befund: Blutfülle und Blutstau bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von 4 zufällig ausgewählten Tieren einer Gruppe, bei denen nach der Behandlung gestaute und gefüllte Venen und Kapillaren (Blutfülle/-stau) auftraten. Die Befunde sind in die Ausprägungsgrade 0 – 1 = nicht vorhanden und vorhanden unterteilt.

C57Bl/6	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 8%
Venen: Blutfülle/-stau [N]	0	2	2	3	4	3	3
	1	2	2	1	--	1	1
Kapillaren: Blutfülle/-stau [N]	0	--	--	--	1	1	2
	1	4	4	4	3	3	2

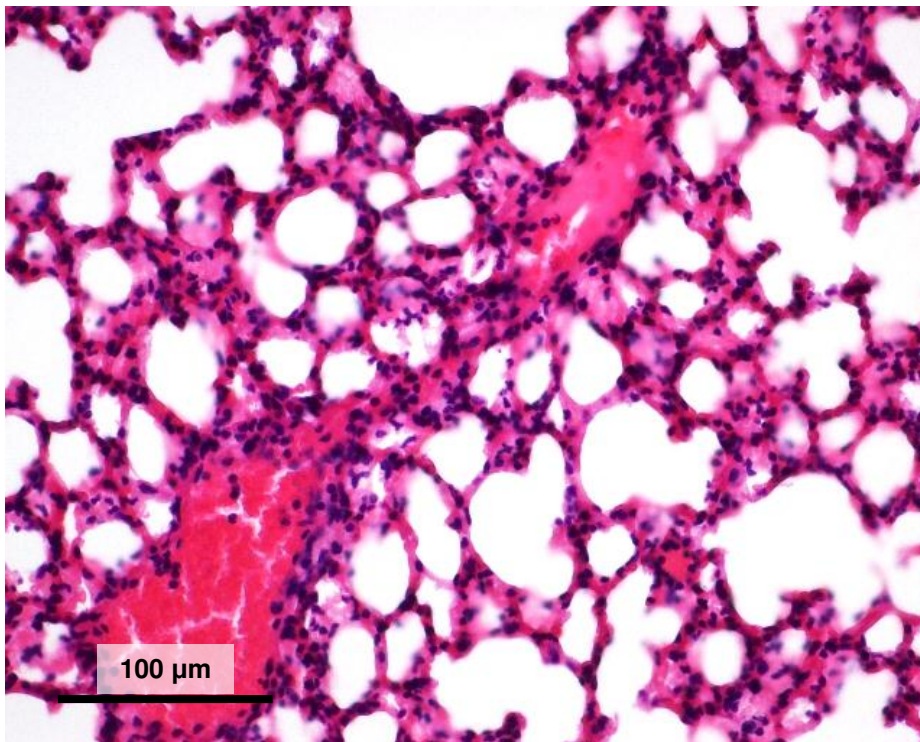


Abb. 3.40 Gestaute Venen

Die Venen sind prall mit Blutzellen gefüllt, das Lumen erscheint mehr rund als flach.
HE-Färbung

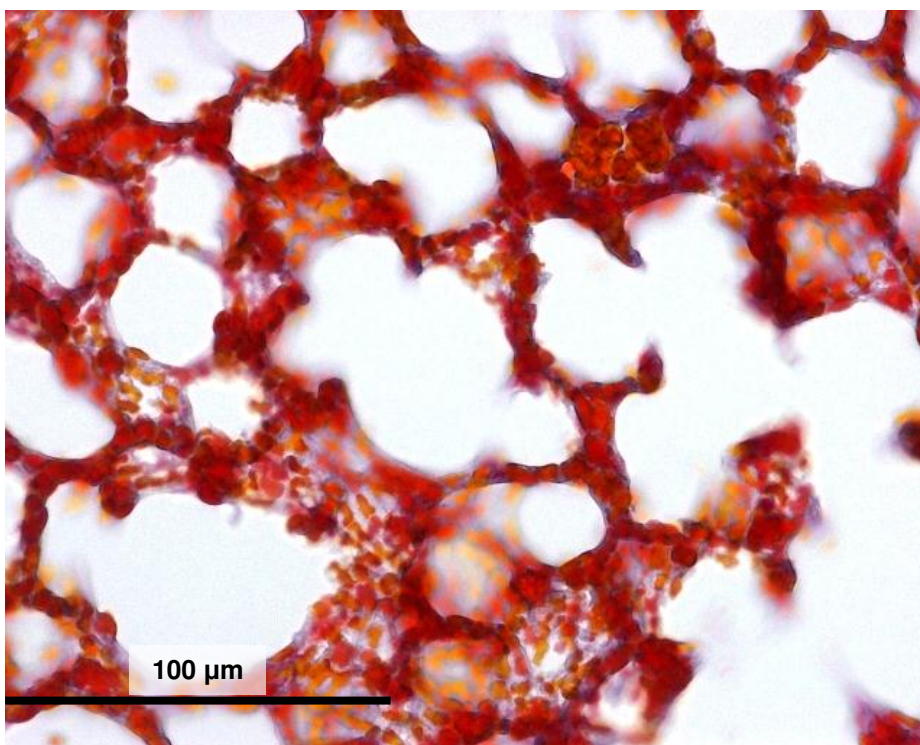


Abb. 3.41 Gestaute Kapillaren

Die Kapillaren sind prall mit Erythrozyten (orange) gefüllt. Bei längs geschnittenen Kapillaren erscheinen die Erythrozyten aneinandergereiht wie Geldrollen. Zum Teil befinden sich die Erythrozyten auch im septalen Gewebe.
Ladewig-Färbung

- **Einblutungen in die Alveolarsepten und in den Alveolarraum**

Der Übergang von extrem gestauten Kapillaren zu Blutübertritt in die Alveolarsepten war fließend. Die Alveolarzellen waren auseinander gedrängt, der Raum dazwischen war mit Blutzellen angefüllt, die einzelnen Kapillaren waren nicht davon zu unterscheiden. Das Lumen der Alveolen war rund und fast leer, nur vereinzelt waren Erythrozyten zu erkennen. Dieser Befund ging nach und nach in den Befund Einblutungen in den Alveolarraum über. Die Lumen der Alveolen waren dann mit Blutzellen ausgefüllt.

In den Kontroll- und in allen Behandlungsgruppen beider Stämme waren Einblutungen sowohl in die Alveolarsepten als auch in die Alveolarräume festzustellen.

Bei Mäusen des NMRI-Stammes waren bei allen untersuchten Proben der Luftkontrollgruppe, der Iso 5%- und der Sevo 8%-Gruppe Einblutungen in die Alveolarsepten und in den Alveolarraum zu erkennen. Die Einblutungen in die Alveolarsepten konnten dem Schweregrad 1 und 2 zugeordnet werden, die Einblutungen in den Alveolarraum den Schweregraden 1 und 2 nach Luft- und Sevo 8%-Exposition sowie den Schweregraden 2 und 3 nach Iso 5%-Exposition. Bei 3 von 4 Proben fand man nach CO₂ 60- und CO₂ 100-Behandlung Einblutungen in die Alveolarsepten mit den Schweregraden 1 – 3. Bei der CO₂ 60-Gruppe war Blutübertritt in den Alveolarraum bei allen untersuchten Proben in den Schweregraden 1 – 3 zu erheben, bei der CO₂ 100-Gruppe bei 3 von 4 Proben in den Schweregraden 1 und 2 (s. a. Tab. 3.18).

Der Befund Einblutung in die Alveolarsepten trat in allen Fällen zusammen mit dem Befund Einblutung in den Alveolarraum auf. Mit einer Ausnahme (CO₂ 60-Gruppe) trat auch der Befund Einblutung in den Alveolarraum immer zusammen mit dem Befund Einblutung in die Alveolarsepten auf. Bei 1 Tier der CO₂ 100-Gruppe waren die Einblutungen nur in den Bereichen lokalisiert, in denen auch die Bronchien mit Blut gefüllt waren (der gezeigten Tabelle nicht zu entnehmen).

Bei C57Bl/6-Mäusen zeigten sich Einblutungen in die Alveolarsepten bei allen untersuchten Proben nach Exposition mit einströmender Luft sowie nach CO₂ 60- und Iso 2%-Exposition. Bei 2 von 4 Tieren der CO₂ 100-Gruppe und bei jeweils 3 von 4 Tieren der Iso 5%- und Sevo 8%-Gruppe traten Einblutungen in die Alveolarsepten auf. Bei allen untersuchten Proben der Luftkontrollgruppe und der CO₂ 60-Gruppe erkannte man Einblutungen in die Alveolarräume. Bei 2 von 4 Proben der CO₂ 100-Gruppe und der Iso 5%-Gruppe sowie bei 3 von 4 Proben der Iso 2%- und der Sevo 8%-Gruppe waren Einblutungen in die Alveolarräume zu finden. Die jeweiligen Ausprägungsgrade sind der Tab. 3.19 zu entnehmen.

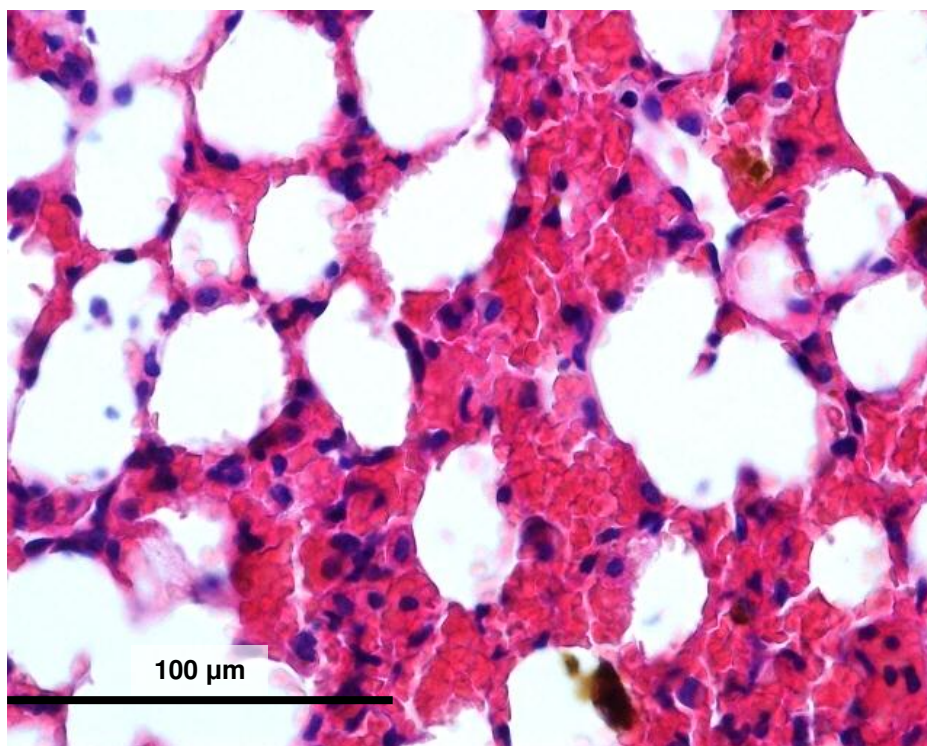


Abb. 3.42 Einblutungen in die Alveolarsepten

Blutzellen, vor allem Erythrozyten, befinden sich im septalen Gewebe und drängen die Alveolarsepten auseinander. Teilweise sind schon einzelne Erythrozyten im Alveolarraum zu erkennen.
HE-Färbung

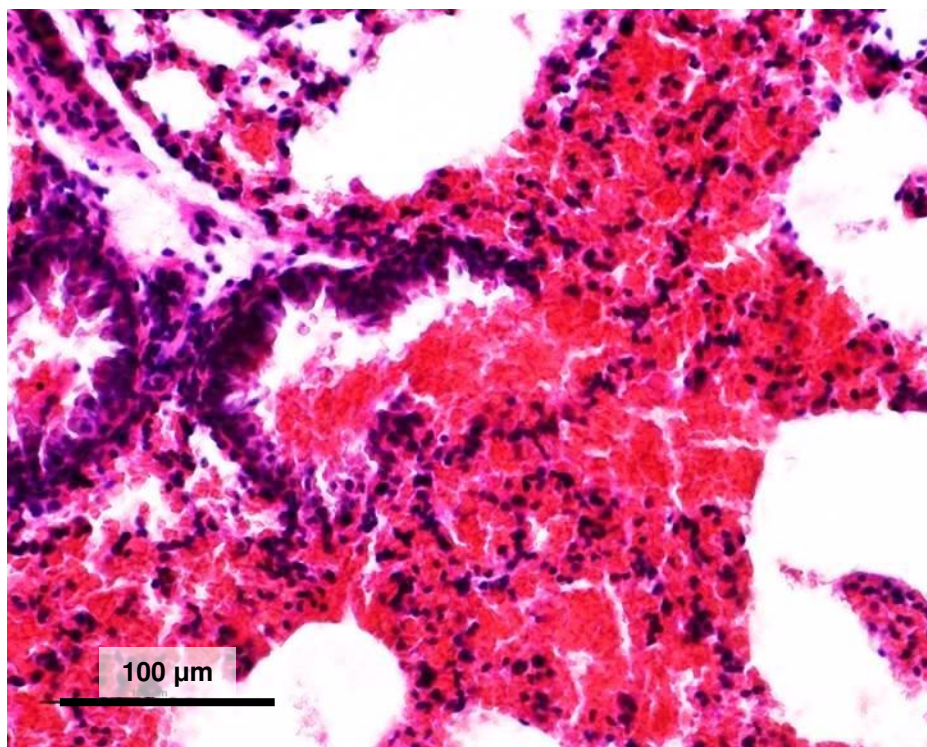


Abb. 3.43 Einblutungen in den Alveolarraum

Vom Bronchiallumen ausgehend ergießen sich Blutzellen in das angrenzende Lungengewebe. Die Alveolarräume sind fast komplett mit Erythrozyten ausgefüllt.
HE-Färbung

3 Ergebnisse

Tab. 3.18 Mikroskopischer Befund: Einblutungen in das Lungengewebe bei NMRI-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von 4 zufällig ausgewählten Tieren einer Behandlungsgruppe bzw. der Kontrollgruppe, bei denen nach der Behandlung Einblutungen in die Alveolarsepten und den Alveolarraum auftraten. Die Befunde sind in die Ausprägungsgrade 0 – 4 = nicht vorhanden, gering-, mittel-, schwer- und höchstgradig unterteilt.

NMRI	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 5%	Sevo 8%
Einblutungen in Alveolarsepten [N]	0	--	1	1	--	--
	1	1	--	2	--	1
	2	3	2	--	4	3
	3	--	1	1	--	--
	4	--	--	--	--	--
Einblutungen in Alveolarraum [N]	0	--	--	1	--	--
	1	2	1	2	--	1
	2	2	2	1	3	3
	3	--	1	--	1	--
	4	--	--	--	--	--

Tab. 3.19 Mikroskopischer Befund: Einblutungen in das Lungengewebe bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von 4 zufällig ausgewählten Tieren einer Behandlungsgruppe bzw. der Kontrollgruppe, bei denen nach der Behandlung Einblutungen in die Alveolarsepten und den Alveolarraum sowie Atelektasen auftraten. Die Befunde sind in die Ausprägungsgrade 0 – 4 = nicht vorhanden, gering-, mittel-, schwer- und höchstgradig unterteilt.

C57Bl/6	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 8%
Einblutungen in Alveolarsepten [N]	0	--	--	2	--	1	1
	1	2	2	1	2	2	--
	2	1	1	1	2	1	1
	3	1	--	--	--	--	2
	4	--	1	--	--	--	--
Einblutungen in Alveolarraum [N]	0	--	--	2	1	2	1
	1	2	1	--	3	1	--
	2	2	3	2	--	--	1
	3	--	--	--	--	--	2
	4	--	--	--	--	1	--

Der Befund Einblutung in die Alveolarsepten trat mit Ausnahme von 2 Fällen (je 1 in der Iso 2%- und in der Iso 5%-Gruppe) zusammen mit dem Befund Einblutung in den Alveolarraum auf. Fand man Einblutungen in den Alveolarraum, so fand man auch in allen Fällen Einblutungen in die Alveolarsepten. Auch hier waren bei 1 Probe der CO₂ 100-Gruppe die Einblutungen nur in den Bereichen lokalisiert, in denen auch die Bronchien mit Blut gefüllt waren (der gezeigten Tabelle nicht zu entnehmen).

- **Atelektase**

Atelektase bedeutet Nichtausdehnung. Das Lungengewebe wirkte im histologischen Schnitt wie verdichtet, die Alveolarwände erschienen verdickt, der lufthaltige Alveolarraum war vermindert (s. Abb. 3.44).

Bei Mäusen des NMRI-Stammes und des C57Bl/6-Stammes kamen mikroskopisch festgestellte Atelektasen nach Behandlung mit CO₂ 60 und CO₂ 100 vor.

Bei NMRI-Mäusen zeigten sich weder bei den untersuchten Proben der Luftkontrollgruppe noch bei der Iso 5%- und Sevo 8%-Gruppe mikroskopisch erkennbare Atelektasen. Diesen Befund fand man bei 2 von 4 Proben in der CO₂ 60-Gruppe mit dem Ausprägungsgrad 2 und bei 3 von 4 Proben in der CO₂ 100-Gruppe mit den Ausprägungsgraden 1, 3 und 4 (s. a. Tab. 3.20).

Bei Mäusen des C57Bl/6-Stammes erkannte man sowohl nach Exposition mit einem Luftstrom wie auch nach Exposition mit Iso 2%, Iso 5% und Sevo 8% mikroskopisch keine Atelektasen. Nach CO₂ 60-Behandlung ergab sich der Befund Atelektase bei 1 von 4 untersuchten Proben mit dem Schweregrad 4 und nach CO₂ 100-Behandlung bei 3 von 4 Proben mit den Schweregraden 2 und 3 (s. a. Tab. 3.21).

3 Ergebnisse

Tab. 3.20 Mikroskopischer Befund: Atelektase bei NMRI-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von 4 zufällig ausgewählten Tieren einer Behandlungsgruppe bzw. der Kontrollgruppe, bei denen nach der Behandlung Atelektasen auftraten. Die Befunde sind in die Ausprägungsgrade 0 – 4 = nicht vorhanden, gering-, mittel-, schwer- und höchstgradig unterteilt.

NMRI	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 5%	Sevo 8%
Atelektase [N]	0	4	2	1	4	4
	1	--	2	1	--	--
	2	--	--	--	--	--
	3	--	--	1	--	--
	4	--	--	1	--	--

Tab. 3.21 Mikroskopischer Befund: Atelektase bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von 4 zufällig ausgewählten Tieren einer Behandlungsgruppe bzw. der Kontrollgruppe, bei denen nach der Behandlung Atelektasen auftraten. Die Befunde sind in die Ausprägungsgrade 0 – 4 = nicht vorhanden, gering-, mittel-, schwer- und höchstgradig unterteilt.

C57Bl/6	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 8%
Atelektase [N]	0	4	3	1	4	4	4
	1	--	--	--	--	--	--
	2	--	--	2	--	--	--
	3	--	--	1	--	--	--
	4	--	1	--	--	--	--

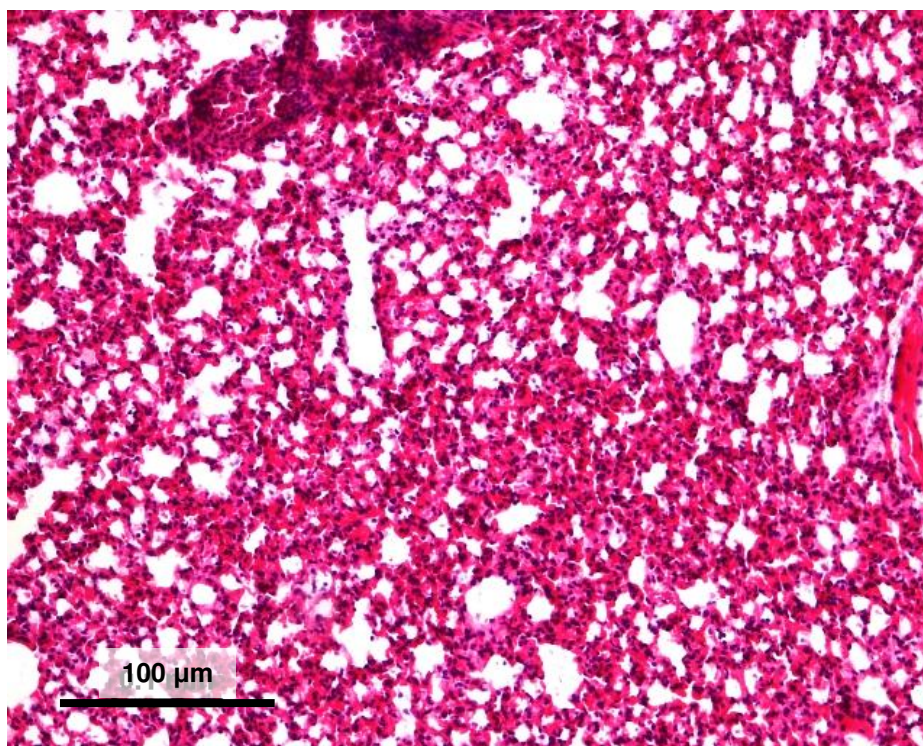


Abb. 3.44 Atelektase

Das Lungengewebe wirkt wie verdichtet, die Alveolarwände erscheinen verdickt, der lufthaltige Alveolarraum ist vermindert.
HE-Färbung

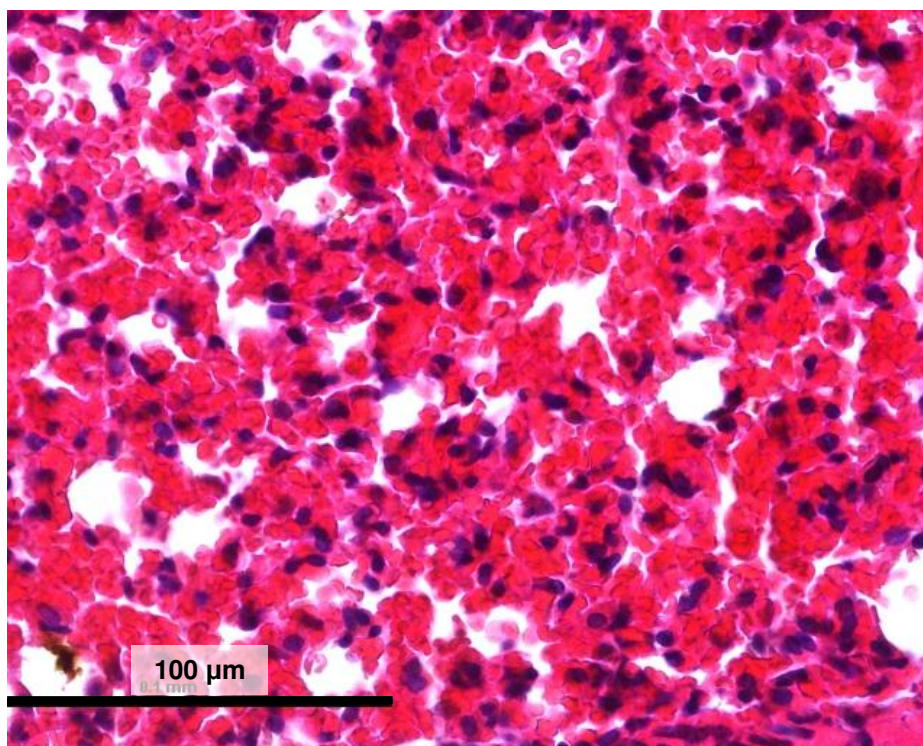


Abb. 3.45 Gewebezerstörung

Alveolarsepten, Alveolarräume und ihre typische Anordnung sind nicht mehr zu erkennen, es finden sich Anhäufungen von unterschiedlichen Zellen (Blutzellen, Alveolarzellen, Bindegewebszellen) ohne ordnende Struktur.
HE-Färbung

3 Ergebnisse

- **Gewebezerstörung und Ödem**

Gewebezerstörung äußerte sich darin, dass keine Alveolarsepten, Alveolarräume und ihre typische Anordnung mehr zu erkennen waren, sondern nur noch Anhäufungen von unterschiedlichen Zellen (Blutzellen, Alveolarzellen, Bindegewebszellen) ohne ordnende Struktur (s. Abb. 3.45).

Zerstörtes Gewebe wurde in der geringgradigen Ausprägung bei NMRI-Mäusen gefunden. Der Befund trat bei 1 von 4 untersuchten Proben nach der CO₂ 60-Behandlung sowie bei 2 von 4 Proben nach Sevo 8%-Behandlung auf.

Bei Mäusen des C57Bl/6-Stammes kam der Befund Gewebezerstörung nicht vor.

Bei 5 der insgesamt 64 untersuchten Proben wurde das Gewebe teilweise durch den Schneidvorgang beschädigt. Dieses Artefakt ließ sich jedoch gut von der oben genannten Gewebezerstörung unterscheiden.

Weder bei NMRI noch bei C57Bl/6-Mäusen trat der Befund Lungenödem in den untersuchten Proben auf. Auch wurden keine proteinhaltigen Sekrete oder Fibrinansammlungen weder in der Trachea noch im Lungenparenchym gefunden.

3.6.3.2 Morphometrische Untersuchung: Luftgehalt

Der zell- und matrixfreie Flächenanteil eines Sichtfeldes spiegelt den Luftgehalt der Lunge wider.

Er reichte bei jeweils 4 zufällig ausgewählten NMRI-Mäusen der Luftkontrollgruppe von 53,61 bis 67,87%, der CO₂ 60-Gruppe von 41,97 bis 55,75% und der CO₂ 100-Gruppe von 38,70 bis 59,49%. Der zell- und matrixfreie Flächenanteil betrug nach Iso 5%-Behandlung 43,34 bis 53,33%, nach Sevo 8%-Behandlung 43,73 bis 58,92% (s. a. Abb. 3.46).

Bei Proben von jeweils 4 Mäusen des C57Bl/6-Stammes, die zufällig ausgewählt wurden, betrug der zell- und matrixfreie Flächenanteil in der Luftkontrollgruppe 51,27 bis 75,01%. Bei der CO₂ 60-Gruppe reichte dieser Flächenanteil von 47,73% bis 68,25% und bei der CO₂ 100-Gruppe von 44,04 bis 62,05%. Die Werte der Iso 2%-Gruppe lagen bei 57,06 bis 62,57%, bei der Iso 5%-Gruppe bei 44,30 bis 63,13% und bei der Sevo 8%-Gruppe bei 47,27 bis 74,27% (s. a. Abb. 3.47).

Die Verteilung der Einzelwerte hinsichtlich des Luftgehaltes als zell- und matrixfreier Flächenanteil des Sichtfeldes bei NMRI und C57Bl/6-Mäusen gaben keinen Anlass, Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und zwischen den einzelnen

Behandlungsgruppen zu vermuten. Aus diesem Grund wurde auf die Auswertung weiterer Proben verzichtet.

3.6.4 Vergleich der makroskopischen und mikroskopischen Untersuchung

Der makroskopische Befund Trachealausfluss als Zeichen einer vermehrten Flüssigkeitsansammlung in der Lunge spiegelte sich in keinem der histologischen Präparate wider, mikroskopische Zeichen von Sekret- oder Fibrinansammlungen oder ein Lungenödem waren in keiner Probe zu sehen.

Der makroskopisch festgestellte Befund Blutaspilation in die Trachea (bei 18 von 44 der ebenfalls auch mikroskopisch untersuchten Proben) ließ sich in allen Fällen mikroskopisch bestätigen. In 17 von 44 Fällen konnte Blutaspilation nur mikroskopisch erhoben werden.

Der makroskopische Befund Atelektase (in 13 von 44 Fällen) fand sich ca. zur Hälfte (in 6 der 13 Fälle) in den entsprechenden Schnittbildern wider. In 3 von 44 Fällen konnte der Befund Atelektase nur mikroskopisch erhoben werden.

3 Ergebnisse

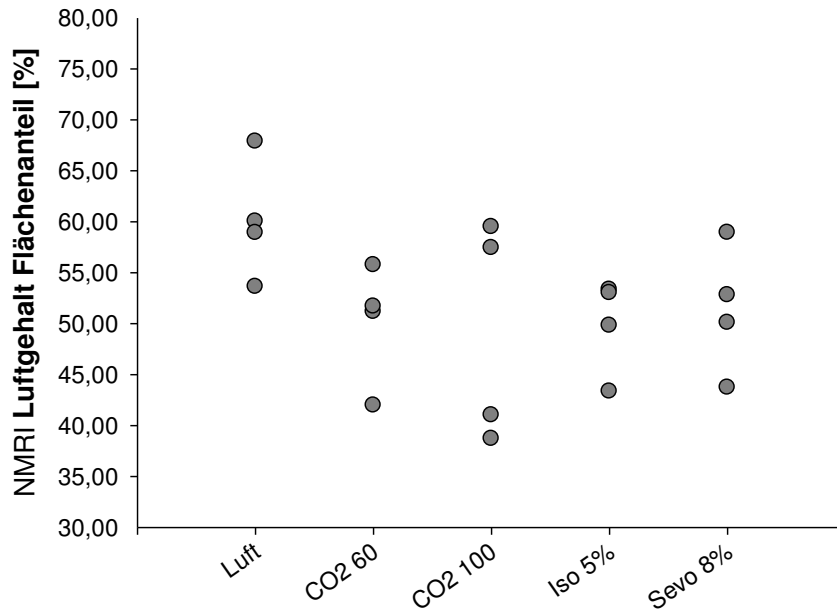


Abb. 3.46 Mikroskopischer Befund: Luftgehalt der Lunge bei NMRI-Mäusen

Dargestellt ist der Luftgehalt als zell- und matrixfreier Flächenanteil des Sichtfeldes in [%] als Einzelwerte (= Mittelwerte aus je 30 Sichtfeldern). Es wurden je Gruppe 4 zufällig ausgewählte Tiere untersucht.

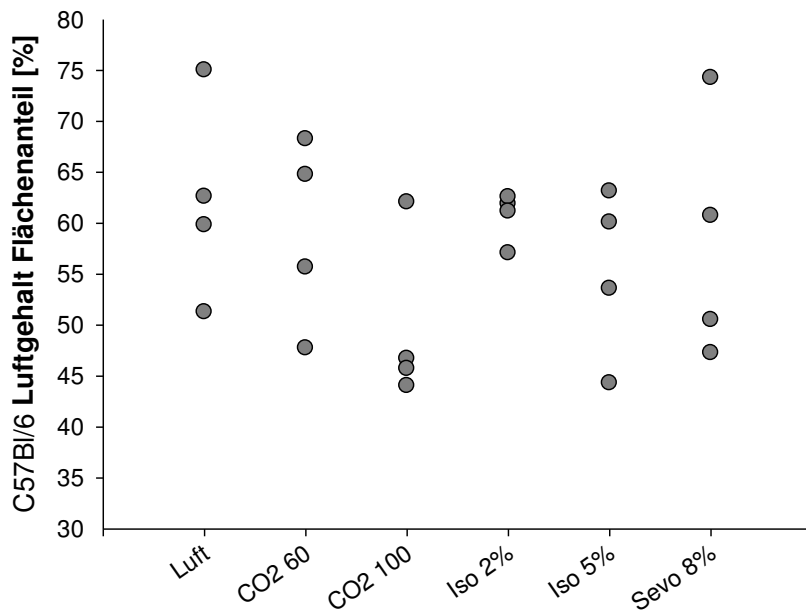


Abb. 3.47 Mikroskopischer Befund: Luftgehalt der Lunge bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt ist der Luftgehalt als zell- und matrixfreier Flächenanteil des Sichtfeldes in [%] als Einzelwerte (= Mittelwerte aus je 30 Sichtfeldern). Es wurden je Gruppe 4 zufällig ausgewählte Tiere untersucht.

4 Diskussion

4.1 Methodenkritik

4.1.1 Zeitpunkt bzw. Zeitraum der Messungen

Ein ideales Narkotikum soll im Rahmen einer Allgemeinanästhesie Amnesie, Anxiolyse, Muskelrelaxation, Immobilität, kardiovaskuläre und respiratorische Stabilität, Unterdrückung von Reaktionen auf noxische Reize, Analgesie und Bewusstlosigkeit erzeugen (Urban und Bleckwenn, 2002). Weiterhin sollen beim Einsatz eines idealen Narkotikums Erbrechen, Zittern, Exzitationen und Krampfanfälle nicht auftreten (Urban und Bleckwenn, 2002). Bei einem idealen Narkotikum zur Euthanasieeinleitung spielen Amnesie, kardiovaskuläre und respiratorische Stabilität keine Rolle. Entscheidend ist die Erzeugung von Bewusstlosigkeit, die in eine tiefe Narkose (chirurgisches Toleranzstadium) übergeht, in der das Tier nicht mehr auf noxische Reize reagiert (Reflexunterdrückung und Analgesie). Hinsichtlich der Tierschutzgerechtigkeit soll das Erreichen der Bewusstlosigkeit und der tiefen Narkose so wenig wie möglich Distress und Schmerzen erzeugen (Charbonneau et al., 2010). Um Distress und Schmerzen erfahren zu können, muss ein Organismus bei Bewusstsein sein (Goldstein, 2010). Das Erreichen der chirurgischen Toleranz (CT) stellt einen geeigneten Endpunkt dar, da zu diesem Zeitpunkt das Bewusstsein schon als erloschen gilt und von da an weder Distress noch Schmerzen, wie sie z. B. durch eine Operation verursacht würden, wahrgenommen werden können. Weiterhin soll das Verfahren für eine tierschutzgerechte Tötung zuverlässig, reproduzierbar, irreversibel, einfach, sicher und schnell sein (Charbonneau et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Messungen der Stressbelastung im Zeitraum von Beginn des Narkosegaseinstroms bis zum Erreichen der CT bzw. zum Zeitpunkt der CT durchgeführt. Die maximale Expositionszeit wurde auf 300 s gesetzt, da zu erwarten war, dass die hier eingesetzten Inhalationsanästhetika Isofluran und Sevofluran eine CT in diesem Zeitraum erzeugten. Mäuse mit einer ähnlichen Narkoseinduktion (Isofluran bzw. Sevofluran) erlangten die CT in 290 bzw. 124 s (Wiklund et al., 2008). Auch bei der Exposition mit 100% CO₂ mit Einfüllraten von 20, 60 und 100 KV%/min war anhand von Literaturdaten davon auszugehen, dass die Mäuse die CT in weniger als 300 s erreichten. So wurde z. B. bei Mäusen nach 192 s eine reflektorische Atmung bei Exposition mit CO₂ mit einer Einfüllrate von 20 KV%/min festgestellt (Corbach, 2006). Eine reflektorische Atmung tritt erst in sehr tiefer Narkose auf. Bei höheren Einfüllraten tritt eine schnellere Narkoseinduktion ein.

4.1.2 Narkosebox und Reflexprüfung

Die Prüfung des Stellreflexes diente zur Feststellung der Bewusstlosigkeit, die Testung des Zwischenzehenreflexes zur Ermittlung des Eintrittes der CT. Der Bewusstseinsverlust korreliert sehr gut mit dem Verlust des Stellreflexes (loss of righting reflex = LORR) bei Tieren (Franks, 2008) und wurde bei Studien zur Inhalationsanästhesie an Ratten und Mäusen verwendet (Imas et al., 2004; Imas et al., 2005). Das Erlöschen des Zwischenzehenreflexes entspricht dem Erreichen der chirurgischen Toleranz (CT) (Westhues und Fritsch, 1961; Arras et al., 2001; Flecknell, 2009b).

Mit der gewählten Narkosebox- und Deckelkonstruktion war die Reflexprüfung einfach und schnell durchzuführen. Die Überprüfung des Stellreflexes mittels Schrägstellens des Einlegebodens gelang sehr gut, da der Boden an jeder Seite angehoben werden konnte. Von Vorteil war, dass die Narkosebox nicht geöffnet werden musste. Dahingegen erforderte die Testung des Zwischenzehenreflexes ein kurzes Öffnen der Box. Die dabei ausströmende Narkosegasmenge blieb gering, da die Testung immer in weniger als 5 s erfolgte.

4.1.3 Video- und Tonaufnahmen

Die Tiere wurden von der Längs- und der Querseite der Narkosebox mit zwei Kameras aufgenommen, so dass das Verhalten immer gut beurteilt werden konnte. Allein die Atembewegungen waren trotz guter Auflösung (1920x1080/50p, Panasonic® HDC-TM 700, Kadoma Osaka, Japan) schwer auf den Videoaufnahmen zu analysieren. Die Ruheatemfrequenz von Mäusen liegt bei ca. 250 Atemzüge/min (Donovan et al., 2011) und ist visuell nur grob abzuschätzen. Erschwerend sind hierbei die Bewegungen der Maus (wie Vorwärtsbewegen, Putzen, Rearings, ataktisches Rennen). Deshalb wurden die Atembewegungen nur als zu- oder abnehmend im Vergleich zur Ruheatmung beschrieben. Bei einem sedierten oder schon bewusstlosen Tier hätte man genauere Daten mit Hilfe eines speziellen Pulsoximeters gewinnen können, wie dem MouseOx®, das neben der Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung auch die Atemfrequenz messen kann. Die Messsonde wird einfach um den Hals der Maus befestigt und sendet jedoch nur bei sich nicht bewegenden Tieren auswertbare Daten. Mit telemetrischen Verfahren ist es möglich, Atmungs- und Herzkreislaufparameter ungestört an einem sich frei bewegenden Tier aufzuzeichnen. Diese Verfahren sind jedoch mit einer Zusatzbelastung für das Tier (OP, relativ großer Transmitter in der Bauchhöhle des Tieres und Implantation einer Messsonde) verbunden.

Das verwendete Mikrofon zur Aufnahme von Vokalisationen im hörbaren und Ultraschallbereich war sehr empfindlich (Sensitivität bei 1 kHz: -42dB, Ultraschallsensor von Knowles, Dover Corporation, Downers Grove, Illinois, USA). Artefakte, die ein ähnliches Frequenzspektrum wie Ultraschallvokalisationen von Nagern aufweisen, werden z. B. schon

durch passives Bewegen der metallenen Narkoseschlauchhalterung beim Öffnen der Narkosebox oder auch durch einen Schlüsselbund in der Kitteltasche erzeugt. Durch den Abgleich von Video- und Tonaufnahmen sowie durch den Vergleich mit bekannten Aufnahmen von in Frage kommenden Geräuschen konnten jedoch Artefakte sicher identifiziert werden.

4.1.4 Probennahme

Die Dekapitation war gut geeignet, um rasch ausreichend viel Blut (mind. 0,7 ml) für die Glukose- und Katecholaminbestimmung auch bei kleinen Mäusen mit ca. 20 g Körpergewicht zu erhalten.

Für die mikroskopischen Untersuchungen des Lungengewebes ist diese Methode jedoch nicht geeignet, da sie wahrscheinlich zu Blutaspiration in die Trachea führte und sich in diesen Fällen der Befund Einblutung in die Alveolarräume nicht mehr eindeutig auf die Wirkung des Narkosegases zurückführen ließ.

Als Lösung bietet sich an, die Blutabnahme und mikroskopische Untersuchungen an getrennten Gruppen von Mäusen durchzuführen. Dies würde zwar die Tierzahl erhöhen, aber man hätte verlässliche Daten hinsichtlich des Befundes Einblutung in den Alveolarraum.

4.2 Wirksamkeit der Narkosegase

- **Wirksame und zuverlässige Behandlungen**

Die Beurteilung der Wirksamkeit und Zuverlässigkeit wurde von der AD_{95} , der anästhetischen Dosis, bei der 95% der Tiere nicht mehr auf einen schmerzhaften Reiz reagieren, abgeleitet (s. a. 2.3.3). Die Narkosegasbehandlung bei einem einzelnen Tier wurde als wirksam betrachtet, wenn es die CT innerhalb von 300 s erreichte. Weiterhin beurteilten wir die Zuverlässigkeit einer Behandlung. Bei einer Gruppengröße von 16 müssten mindestens 15 Tiere (93,8%) nicht mehr auf einen Schmerzreiz reagieren bzw. die CT innerhalb von 300 s erreicht haben, um von einer wirksamen und zuverlässigen Behandlung zu sprechen.

Die Narkoseinduktion zum Einleiten der Euthanasie erwies sich bei beiden Mausstämmen bei der mittleren und der hohen Einfüllrate von CO_2 (60 bzw. 100 KV%/min) sowie bei den hohen Konzentrationen von Isofluran (5%) mit einem Fluss von 10 l/min (entspricht hier 71 KV%/min) als wirksam und zuverlässig nach oben genannten Kriterien. Sevofluran (8%) mit einem Fluss von 10 l/min (entspricht hier 71 KV%/min) war nur bei C57Bl/6-Mäusen wirksam und zuverlässig.

- **Nicht ausreichend wirksame Behandlungen**

Wenn zwei und mehr Tiere nicht innerhalb von 300 s die CT erreichten, betrachten wir die Behandlung als nicht ausreichend wirksam für diese Zielstellung. Damit können Behandlungen mit der niedrigen Einfüllrate von CO_2 (20 KV%/min) sowie die Behandlungen mit den niedrigen Konzentrationen von Isofluran (2%) bzw. Sevofluran (4,8%) mit einer Einfüllrate von 10l/min (entspricht hier 71 KV%/min) bei beiden Mausstämmen zur Euthanasieeinleitung nicht empfohlen werden. Bei NMRI-Mäusen können wir zudem die Behandlung mit 8% Sevofluran und einer Einfüllrate von 10l/min (entspricht hier 71 KV%/min) zur Euthanasieeinleitung nicht empfehlen.

Momentan wird die Anwendung von CO_2 mit 20 KV%/min von einigen Organisationen (Arthwohl et al., 2006; AVMA, 2007) zur Euthanasie von Labornagern empfohlen, mit dem Hintergrund, dass durch ein langsames Ansteigen der CO_2 -Konzentration das Tier bewusstseinsgetrübt oder schon bewusstlos wird, bevor schmerzhafte Konzentrationen erreicht werden. Dies wird unter 4.3.1 genauer diskutiert.

Sjöblom und Nylander (2007) induzierten mit 2,2% Isofluran erfolgreich die CT bei C57/Bl6-Mäusen, allerdings haben sie die Maskenbeatmung angewandt. Der von uns eingesetzte 1,5-MAC-Wert von 2% Isofluran wurden aus einer Arbeit mit 8-10 Wochen alten Swiss Webster-Mäusen entnommen (Ichinose et al., 1998), war aber bei unseren NMRI-Mäusen nicht genügend wirksam und damit nicht verlässlich.

Die hier verwendete 1,5-MAC-Sevofluran-Konzentration von 4,8% beruht auf MAC-Messungen bei CD-1-Mäusen, deren Alter nicht angegeben wurde (Mazze et al., 1985). Wir verwendeten zwei andere Stämme im Alter zwischen 8 und 23 Wochen, die sich möglicherweise im Alter von diesen CD-1-Mäusen unterschieden. So können eine stammspezifisch unterschiedliche Empfindlichkeit und eine altersabhängige Empfindlichkeit auf das Narkosegas Gründe für die ungenügende Wirksamkeit und Zuverlässigkeit bei unseren Mäusen sein.

4,8% Sevofluran und 2% Isofluran stellen den 1,5-fachen MAC-Wert dar. Die Konzentration, die dem 1,5-fachen MAC-Wert entspricht, wird beim Menschen zur Narkoseinduktion angewendet (Eger, 1981), jedoch handelt es sich dabei meist um Masken- oder Tubusbeatmung. Bei dieser Form der Inhalation gelangt das Narkosegas mit der am Gerät eingestellten Konzentration direkt in die Lungen. Zur Narkoseeinleitung in einer Kammer können durchaus höhere Konzentrationen als ein entsprechender 1,5-MAC-Wert nötig sein, da das zugeleitete Gas mit der Kammerluft verdünnt wird und sich erst allmählich anreichert. 300 s als maximale Expositionszeit sind eine ausreichend lange Zeit, um theoretisch mit einer Einfüllrate von 10l/min in der hier verwendeten Kammer eine Konzentration zu erreichen, die annähernd 100% der eingeleiteten Konzentration entspricht (s. Abb. 3.10). Nach 200 s sind hierbei ca. 90% der Maximalkonzentration erreicht. Die ungenügende Wirksamkeit der Narkoseeinleitung bei NMRI-Mäusen lag folglich an einer für unsere Mäuse zu niedrigen Konzentration des in die Kammer eingeleiteten Gases und nicht an der Zeit.

4.3 Narkoseverlauf, Schnelligkeit und Gaskonzentrationen

C57Bl/6-Mäuse wiesen hinsichtlich der Latenzzeiten bis zum Erreichen der Phase der Ataxie, der Muskelrelaxation, der Bewusstlosigkeit und bis zum Erreichen der CT generell eine geringere Streuung auf als NMRI-Mäuse. Dies lässt sich mit dem genetischen Hintergrund der Tiere erklären. C57Bl/6-Mäuse sind Inzucht-Tiere, das bedeutet, dass sie genetisch einander sehr ähnlich sind und phänotypisch ähnlich reagieren.

C57Bl/6-Mäuse erreichten unter 5% Isofluran den Beginn der Phase der Ataxie schneller als NMRI-Mäuse. Unter 5% Isofluran und 8% Sevofluran erreichten C57Bl/6-Mäuse ebenfalls schneller den Beginn der Phase der Muskelrelaxation und der Bewusstlosigkeit sowie den Eintritt der CT als NMRI-Mäuse. Diese Stammesunterschiede beruhen auf einer unterschiedlichen Empfindlichkeit der Tiere, die sich in unterschiedlichen MAC-Werten äußern. MAC-Werte sind nicht nur spezifisch für eine Substanz und Tierart, sondern können auch spezifisch für einen Stamm sein (s. a. 4.2). Generell scheinen in unseren Untersuchungen C57Bl/6-Mäuse empfindlicher auf Isofluran und Sevofluran zu reagieren als NMRI-Mäuse. Auch Tanaka und Mitarbeiter (1993) fanden bei C57Bl/6-Mäusen im Vergleich zu einem anderen Stamm, den ddN-Mäusen, eine erhöhte Empfindlichkeit bzw. eine niedrigere ED₅₀ bis zum Verlust des Stellreflexes bei der Verwendung von Isofluran und Sevofluran.

4.3.1 Exposition mit CO₂

Die Geschwindigkeit der Narkoseinduktion mit 100% CO₂ war abhängig vom Konzentrationsanstieg über die Zeit in der Narkosekammer, der durch die Einfüllrate bestimmt wurde. Da es sich um eine exponentielle Zunahme der CO₂-Konzentration in der Kammer handelte, lief der Anstieg asymptotisch auf 100% zu (s. Berechnungsformel in 2.3.5 und graphische Darstellung in Abb. 3.9).

- **CO₂ mit 60 und 100 KV%/min sowie aversive Wirkungen**

Der Eintritt der Bewusstlosigkeit war durch den Ausfall des Stellreflexes gekennzeichnet, bei dem ein Tier sich nicht mehr selbsttätig aus der Rücken- oder Seitlage aufrichtet. Der Eintritt der CT wurde durch den Ausfall des Zwischenzehenreflexes markiert.

Mäuse beider Stämme erfuhren mit der Einleitung von 100% CO₂ mit einer Einfüllrate von 100 KV%/min die schnellste Narkoseinduktion bis zum Erreichen der CT. Die CT wurde im Median nach ca. 65 s (NMRI) und 64 s (C57Bl/6) erreicht. Der Eintritt der Bewusstlosigkeit war schon nach 50 s bzw. 51 s erreicht. Ähnlich kurze Zeiten fanden sich bei der Einleitung von CO₂ mit 60 KV%/min: die CT trat im Median nach ca. 95 s (NMRI) und 80 s (C57Bl/6) ein. Bewusstlosigkeit war bei NMRI-Mäusen nach ca. 59 s und bei C57Bl/6 nach 60 s erreicht.

Die CO₂-Konzentrationen im Rechenmodell erreichten für die beiden Einfüllraten und die verwendete Narkosebox Werte von ca. 44% bei einer Einfüllrate von 60 KV%/min und ca. 56% bei einer Einfüllrate von 100 KV%/min beim Eintritt der Bewusstlosigkeit. Anton und Mitarbeiter (1992) werten CO₂-Konzentrationen ab ca. 46% bei Menschen als schmerzhaft. In einer weiteren Studie werden CO₂-Konzentrationen ab 50% in den meisten Fällen von Probanden als „sehr unangenehm“ bis „schmerzhaft“ wahrgenommen (Danneman et al., 1997). Mäuse verlassen eine Kammer mit CO₂ schon bei Konzentrationen von durchschnittlich 7-12% (Menken, 2012) bzw. 13,5-18,2% unabhängig von der Einfüllrate (Makowska et al., 2009). Ratten verlassen bei ähnlichen CO₂-Konzentrationen (13,0-18,4) eine Kammer (Niel und Weary, 2007; Niel et al., 2008b). Dabei waren bei keinem der Tiere aus den zuvor erwähnten Untersuchungen Zeichen einer beginnenden narkotischen Wirkung des CO₂, wie z. B. Ataxie, festzustellen.

Es ist schwierig zu beurteilen, was das Tier während der Narkoseeinleitung zuerst bei vollen oder später bei eingetrübtem Bewusstsein empfindet. Dennoch ist davon auszugehen, dass Mäuse analog zum Menschen Schmerzen, die durch CO₂ verursacht werden (Anton et al., 1992; Danneman et al., 1997), wahrnehmen und noch vor völligem Bewusstseinsverlust CO₂-Konzentrationen erreicht werden können, die potentiell als aversiv und negativ wahrgenommen werden. So werden bei Ratten durch 25-100% CO₂, das als zwei-sekündiger Gasstoss auf die Schleimhaut verabreicht wurde, Chemonozeptoren gereizt und dieser Reiz über A δ - und C-Fasern zum Dorsalhorn des Rückenmarks geleitet (Peppel und Anton, 1993).

- **Beziehung zwischen Einfüllrate, Kammervolumen und Eintritt der Bewusstlosigkeit**

Der Eintritt der Bewusstlosigkeit findet nicht, wie man erwarten könnte, beim Erreichen einer immer gleichen CO₂-Konzentration in der Kammer statt, sondern die Konzentrationen zum Zeitpunkt der Bewusstlosigkeit unterscheiden sich bei unterschiedlichen Einfüllraten. Die Kammerkonzentration hängt von der eingeleiteten Konzentration, die in nachfolgenden Fällen 100% war, sowie von der Einfüllrate und von der Zeit ab. So werden Ratten bewusstlos bei CO₂-Konzentrationen von ca. 30%, die durch Einfüllraten von ungefähr 20 KV%/min erreicht wurden (Smith und Harrap, 1997; Niel und Weary, 2006) und bei einer Kammerkonzentration von ca. 21% CO₂ mit einer Einfüllrate von 10 KV%/min (Burkholder et al., 2010).

Auch in vorliegender Arbeit trat bei der niedrigen CO₂-Einfüllrate von 20 KV%/min, die einen langsamen Konzentrationsanstieg zur Folge hatte, Bewusstlosigkeit und CT zu einem späteren Zeitpunkt, aber bei niedrigeren Kammerkonzentrationen ein als bei den hohen Einfüllraten von 60 bzw. 100 KV%/min, die mit einem schnelleren Konzentrationsanstieg und

4 Diskussion

höheren Kammerkonzentrationen zum Zeitpunkt der Bewusstlosigkeit und CT einhergingen. Bei C57Bl/6-Mäusen trat die CT z. B. mit einer Einfüllrate von 20 KV%/min im Median nach 196 s bei einer errechneten Kammerkonzentration von 48% CO₂ und mit einer Einfüllrate von 60 KV%/min im Median nach 80 s bei einer errechneten Kammerkonzentration von 55,1% CO₂ ein. Der Eintritt der Bewusstlosigkeit erfolgte nicht bei immer der gleichen CO₂-Konzentration in der Kammer, sondern war abhängig von der Einfüllrate: je niedriger die Einfüllrate, desto höher war die errechnete CO₂-Konzentration in der Kammer zu dem Zeitpunkt, bei dem die Bewusstlosigkeit und CT eintraten (s. Tab. 3.2 und Tab. 3.3. bzw. Tab. 9.18 und Tab. 9.19). Diese Beobachtung wird auch von anderen Autoren bestätigt (Ambrose et al., 2000; Corbach, 2006).

Eine Erklärung ist, dass der Eintritt der Phasen wohl abhängig von der pH-Wert-Änderung des Blutes und der Cerebrospinalflüssigkeit ist und dieser pH-Wert-Abfall eher von der Wirkungsdauer (gegebenenfalls ab einer bestimmten Schwellenkonzentration von CO₂ (Leach et al., 2005)) als von der eingeatmeten CO₂-Konzentration (= Kammerkonzentration) abhängt. Außerdem entspricht die Konzentration in der Lunge nicht der eingeatmeten Konzentration: der CO₂-Konzentrationsanstieg über die Zeit in der Lunge, die nach dem Ausatmen nicht luftleer ist, sondern ein sog. Residualvolumen beinhaltet, verläuft exponentiell und ist dem Konzentrationsanstieg in der Kammer zeitlich nachgeschaltet. Das bedeutet, dass es noch längere Zeit dauern kann, bis sich in der Lunge eine bestimmte Konzentration eingestellt hat, nachdem in der Kammer schon diese Konzentration erreicht wurde.

- **CO₂ mit 20 KV%/min**

Mit diesen Überlegungen wäre theoretisch die schonendste Narkoseeinleitung zur Euthanasie mit CO₂ durch eine niedrige Einfüllrate zu erreichen, um die CO₂-Konzentration in der Kammer zum Zeitpunkt des Bewusstseinsverlustes so gering wie möglich zu halten. Allerdings erreichten in vorliegender Arbeit 75% (12 von 16) der NMRI-Mäuse und 69% (11 von 16) der C57Bl/6-Mäuse nicht die CT nach 300 s unter CO₂-Exposition mit einer Einfüllrate von 20 KV%/min. Nach 300 s herrschten rechnerisch CO₂-Konzentrationen in der Kammer von 63%.

Bei den NMRI- und C57Bl/6-Mäusen, die die CT erreichten, trat der Verlust des Bewusstseins nach ca. 110 s ein (s. Anhang 9.3.1 und 9.3.2). Die rechnerische Konzentration in der Kammer zu diesen Zeitpunkten lag bei ca. 30% CO₂. Auch in Studien bei Ratten konnten CO₂-Konzentrationen in der Kammer von ca. 30% zum Zeitpunkt des Eintritts der Bewusstlosigkeit festgestellt werden, die durch Einfüllraten von ungefähr 20 KV%/min erreicht wurden (Smith und Harrap, 1997; Niel und Weary, 2006).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass bei niedrigen CO₂-Einfüllraten ein nicht zu vernachlässigender Teil der Mäuse bei noch erhaltenem, evtl. eingetrübtem, Bewusstsein ansteigenden CO₂-Konzentrationen ausgesetzt war, die in der Lage waren, aversiv und schmerzhaft zu wirken.

4.3.2 Exposition mit Isofluran und Sevofluran

Auch bei den Behandlungen mit den Inhalationsanästhetika Isofluran und Sevofluran nahm die Konzentration in der Kammer über die Zeit exponentiell zu (s. Berechnungsformel in Unterkapitel 2.3.5 und graphische Darstellung in Abb. 3.10). Bei einer Einfüllrate von 10 l/min waren ca. 90% der Maximalkonzentrationen nach 200 s erreicht. Nach 300 s waren annähernd die eingeleiteten Konzentrationen (2% und 5% Isofluran, 4,8% und 8% Sevofluran) in der Kammer erreicht.

- **5% Isofluran (NMRI und C57Bl/6) und 8% Sevofluran (C57Bl/6)**

Die Exposition mit 5% Isofluran erzeugte die CT bei allen Tieren der Behandlungsgruppe innerhalb von 300 s und ist somit als wirksam und zuverlässig zu werten. Die Induktion der Narkose mit 5% Isofluran ist langsamer als durch Exposition mit CO₂ mit 100 KV%/min, sie unterschied sich jedoch nicht von der CO₂-Exposition mit 60 KV%/min. Die Differenz der Mediane der Latenz bis zum Erreichen der CT betrug zwischen den Behandlungen mit 5% Isofluran und CO₂ mit 100 KV%/min 37 s (NMRI) bzw. 32 s (C57Bl/6).

Bei C57Bl/6-Mäusen erfolgte die Narkoseinduktion mit 8% Sevofluran bei allen Tieren einer Gruppe bis zum Eintritt der CT innerhalb von 300 s. Die Narkoseinduktion war bei der Exposition mit 8% Sevofluran deutlich langsamer als mit den hohen CO₂-Einfüllraten von 60 und 100 KV%/min. Die Differenz der Mediane war hierbei am größten zwischen der Behandlung mit CO₂ mit 100 KV%/min und mit 8% Sevofluran und betrug 52 s.

Auf der einen Seite soll Bewusstseinsverlust durch die Tötungsmethode schnell erfolgen (Bundesamt für Veterinärwesen 1993; AVMA, 2007). Auf der anderen Seite lässt es sich nicht ohne eine gründliche ethische Diskussion entscheiden, ob eine länger andauernde Belastung, die mit geringerer Maximalbelastung einhergeht (wie 5% Isofluran), besser ist als eine kürzer andauernde Methode, bei der jedoch eine größere Maximalbelastung (wie CO₂ mit 100KV%/min) auftritt. Auf die aversiven Wirkungen und Stressbelastungen durch die einzelnen Methoden wird weiter unten sowie bei der Diskussion der Blutwerte noch näher eingegangen.

Es ist zu betonen, dass das Narkosegerät bei den hier verwendeten hohen Isofluran- und Sevoflurandosierungen mit höchster Leistung (maximale Konzentrationseinstellung des Verdampfers und maximale Durchströmungsrate) arbeitet.

- **Aversive Wirkungen**

Das Einatmen von Inhalationsanästhetika kann mit unangenehmen Empfindungen verbunden sein. Beim Menschen löst ein-minütiges Einatmen von 2,3% Isofluran über eine Maske bei gut 40% der Probanden Husten, Brennen, Irritationen oder anderes Unwohlgefühl in den Atemwegen aus, wohingegen 4% Sevofluran nur bei 3,7% der Probanden zu Husten und sonst zu keiner weiteren Beeinträchtigung führt (TerRiet et al., 2000). Die eingesetzten Konzentrationen von Isofluran und Sevofluran sind equieffektiv und entsprechen 2 MAC. Die Empfindungen, die das Einatmen von Inhalationsanästhetika auslöst, werden von Probanden in dieser Arbeit nicht als Schmerzen beschrieben.

Analog zum Menschen sollte man auch bei Mäusen unter Inhalationsanästhetikaexposition von ähnlich negativen Empfindungen (Brennen, Irritationen) ausgehen. Kaninchen atmen nur widerstrebend Isofluran und Sevofluran ein und halten zwischen 30 und 180 s den Atem an (Flecknell et al., 1999).

Bei Mäusen, wie auch bei Ratten, wirken niedrigere Konzentrationen von Inhalationsanästhetika, wie Isofluran und Sevofluran, weniger aversiv als hohe Konzentrationen in einer vorgefüllten Kammer (Leach 2002, 2004). Die Aversivität wurde anhand der Latenzzeit, die Narkosegasatmosphäre zu verlassen, gemessen.

Wenn Mäuse, und auch Ratten, die Wahl zwischen einer Kammer mit Narkosegas plus Futterbelohnung und einer Kammer mit Luft haben, so bleiben sie länger „freiwillig“ in einer Kammer mit niedrigeren Isoflurankonzentrationen als mit höheren Konzentrationen. Jedoch erreichen die Tiere bei höheren Konzentrationen ein Narkosestadium, das näher an die erwartete Bewusstlosigkeit heranreicht oder sie werden sogar bewusstlos (Makowska et al., 2009; Makowska und Weary, 2009). Das gleiche gilt auch für Sevofluran, wobei sich die Latenzzeiten, die Kammer zu verlassen, unter Sevofluran- und Isofluranexposition nicht signifikant unterscheiden, wie weiterführende Untersuchungen an unserem Institut belegen (Menken, 2012).

- **Beziehung zwischen Einfüllrate, Kammervolumen und Eintritt der Bewusstlosigkeit**

Beim Einsatz von 2% Isofluran mit einer Einfüllrate von 10 l/min (entspricht hier 71 KV%/min) kam es zu einem langsameren Anstieg der Isoflurankonzentration in der Narkosebox und zu einem verzögerten Einsetzen der Narkosegaswirkung im Vergleich zu 5% Isofluran. Bei der Exposition mit Inhalationsanästhetika wurde in vorliegender Untersuchung, wie bei CO₂-Exposition, beobachtet, dass bei niedrigen Narkosegaskonzentrationen, die in die Kammer eingeleitet werden und die einen langsamen Konzentrationsanstieg in der Kammer zur Folge haben, Bewusstlosigkeit und CT zu einem späteren Zeitpunkt, aber bei niedrigeren Kammerkonzentrationen eintreten als bei der Einleitung von hohen Narkosegaskonzentrationen mit

einem schnelleren Konzentrationsanstieg. Auch dies ist damit zu erklären, dass die wirksame Konzentration in der Lunge nicht synchron mit der Kammerkonzentration ansteigt, sondern zeitlich versetzt. Nach dem Ausatmen verbleibt in der Lunge das sog. Residualvolumen, das bei jedem Einatmen mit dem Narkosegas der Kammer nach und nach angereichert wird. Der Konzentrationsunterschied zwischen eingeatmetem Gas und wirksamer Lungenkonzentration nimmt über die Zeit exponentiell ab. Das bedeutet, dass es eine bestimmte Zeit dauert, bis sich eine wirksame Lungenkonzentration aufgebaut hat.

4.3.1 Erste Bewertung

CO₂ mit einer niedrigen Einfüllrate von 20 KV%/min, die Behandlung mit 2% Isofluran und die Behandlung mit 4,8% Sevofluran bei beiden Mausstämmen sowie die Behandlung mit 8% Sevofluran bei NMRI-Mäusen können nicht empfohlen werden. CO₂ mit den höheren Einfüllraten von 60 und 100 KV%/min ist bei NMRI- wie auch bei C57Bl/6-Mäusen als wirksam und zuverlässig einzustufen, wobei die Exposition mit 100 KV%/min am schnellsten die CT erzeugt. Die Induktion der Narkose mit 5% Isofluran ist ebenfalls wirksam und zuverlässig, erfolgte jedoch langsamer als durch Exposition mit CO₂ mit 100 KV%/min. Die Latenzzeiten nach Exposition mit Iso 5% und CO₂ 60 unterschieden sich nicht. Bei C57Bl/6-Mäusen war die Narkoseinduktion mit 8% Sevofluran bei allen Tieren einer Gruppe wirksam und zuverlässig, jedoch langsamer als die Induktion mit beiden hohen CO₂-Einfüllraten.

Inhalationsanästhetika wirken weniger aversiv auf Mäuse als CO₂. Beim Einsatz von CO₂ zur Narkoseinduktion hingegen ist damit zu rechnen, dass bei den hier verwendeten hohen wie auch niedrigen Einfüllraten (20, 60 und 100 KV%/min) Konzentrationen in der Narkosekammer entstehen können, die potentiell mit Schmerzen und Aversion für das Tier verbunden sind, bevor es das Bewusstsein verliert oder die CT erreicht ist.

Es können mit den bisher diskutierten Daten und den Daten aus der Literatur dieser Arbeit keine Aussagen darüber getroffen werden, ob eine schnelle Narkoseinduktion, bei der eine stärkere Maximalbelastung auftritt und die mit Schmerzen einhergehen kann, besser für das Tier ist als eine langsamere Induktion, bei der keine Schmerzen erzeugt werden und die weniger aversiv wirkt. Auf die Stressbelastung wird im Folgenden eingegangen.

4.4 Blutwerte

4.4.1 Katecholamine im Plasma

- **Kontrollgruppe**

Akuter Stress führt, wie in der Literaturübersicht im Unterkapitel 1.4.3 dargestellt, zu einer raschen Erhöhung der Katecholaminkonzentration im Plasma. Es ist schwierig, Basalwerte dieser Hormone zu messen, da jede Blutabnahme invasiv ist und eine Stressreaktion auslösen und somit zu einer Beeinflussung der Werte führen kann. Bei der Blutgewinnung durch Dekapitation ist die Stresszeit extrem kurz und somit ist auch der erlebte Stress kurz. In einer Studie von Grouzmann und Mitarbeitern (2003) führte die Dekapitation bei Bewusstsein (ohne vorherige Luftstromexposition) zu Adrenalinwerten von ca. 5 ng/ml und zu Noradrenalinwerten von ca. 4,16 ng/ml bei C57Bl/6-Mäusen. In vorliegender Arbeit waren die Kontrolltiere für 300 s einem Luftstrom ausgesetzt und wurden anschließend bei Bewusstsein dekapitiert. Die Plasmakonzentrationen von Adrenalin lagen bei 12,4 ng/ml für NMRI- und bei 8,2 ng/ml für C57Bl/6-Mäuse und die Konzentrationen für Noradrenalin bei 15,0 ng/ml (NMRI) und 11 ng/ml (C57Bl/6). Die Katecholaminkonzentrationen der Kontrolltiere sind höher als die Werte von Grouzmann, was an der vorherigen Luftstromexposition liegen könnte. Die Werte der Kontrollgruppe entsprechen somit nicht Basalwerten, dennoch können sie als Vergleichswerte dienen, da sie eine geringe Belastung durch Dekapitation und Luftstromexposition widerspiegeln.

- **Exposition mit Isofluran und Sevofluran**

Die in unserer Untersuchung nach Isofluran- und Sevofluranexposition und anschließender Dekapitation zum Zeitpunkt der CT gemessenen Katecholaminspiegel bei beiden Mausstämmen lagen leicht unter dem Bereich der Werte der Luftkontrolle. In der Untersuchung von Grouzmann und Mitarbeiter (2003) konnten niedrigere Werte von 0,2 ng/ml Adrenalin und 0,69 ng/ml Noradrenalin bei C57Bl/6-Mäusen festgestellt werden, wenn die Blutabnahme unter Halothan-Narkose stattfand. Inhalationsanästhetika sollen eine Stressreaktion auf noxische chirurgische Reize, wie Hautschnitt oder Gewebemanipulation, während einer Operation verhindern oder vermindern. Auch Croizer und Mitarbeiter (1992) konnten zeigen, dass in der präoperativen Narkosephase Adrenalin- und Noradrenalinwerte, wie auch die weiteren Stressparameter Cortisol und ACTH, stabil blieben oder sogar sanken. Somit kann man davon ausgehen, dass die in unserer Arbeit ermittelten Adrenalin- und NoradrenalinKonzentrationen nach Isofluran- und Sevofluran-Exposition nicht für eine zusätzliche Belastungsreaktion sprechen und vergleichbar sind mit Stress durch Dekapitation bei Bewusstsein.

- **Exposition mit CO₂**

In unserer Untersuchung konnten wir nach CO₂-Exposition und anschließender Dekapitation zum Zeitpunkt der CT Katecholaminkonzentrationen messen, die bei beiden Mausstämmen deutlich über den Werten von unserer Kontrollgruppe lagen. Bei NMRI-Mäusen waren die AdrenalinKonzentrationen im Plasma nach der Exposition mit CO₂ und einer Einfüllrate von 60 und 100 KV%/min ca. 8 – 18-fach höher als nach der Behandlung mit 5% Isofluran und mit 8% Sevofluran. Bei C57Bl/6-Mäusen war dieser Anstieg des Adrenalin spiegels nicht ganz so ausgeprägt (3 – 10-fach höher). Bei Mäusen beider Stämme wiesen die NoradrenalinKonzentrationen im Plasma der CO₂ 60- und der CO₂ 100-Gruppe ca. 10-fach höhere Werte auf als die der Iso 5%- und Sevo 8%-Gruppe.

Unterschiedliche Stressoren rufen eine spezifische Reaktion hervor (Sabbana und Kvetňanský, 2001). Goldstein und Kopin (2008) fassen diese Reaktionen auf unterschiedliche Stressoren in ihrer Meta-Analyse, in der sie hauptsächlich auf Untersuchungen an Menschen und Ratten eingehen, zusammen: Erhöhungen der Katecholaminkonzentrationen sind sowohl in ihrem Ausmaß als auch in der unterschiedlich starken Erhöhung von Adrenalin und Noradrenalin vom Stressor abhängig. Anstiege von Adrenalin auf das 10- und mehrfache werden in dieser Analyse als massiv beschrieben und finden sich als eine äußerst ausgeprägte Reaktion auf Stressoren wie Hypoglykämie (bei Menschen, Ratten und Hunden), Immobilisation (bei Ratten) und hämorrhagische Hypotension (bei Katzen, Ratten und Schweinen). Der Anstieg der Noradrenalin Spiegel ist in diesen Fällen weniger stark. Weiter beschreiben die Autoren, dass ein bis zu 3-facher Anstieg der NoradrenalinKonzentrationen bei aktivem Flucht- und Meideverhalten (bei Ratten) zu beobachten ist (Goldstein und Kopin, 2008). Angst führt in einigen der analysierten Studien bei Ratten zu einem 3 – 10-fachen Anstieg beider Katecholamine (Goldstein und Kopin, 2008). Mäuse unter CO₂-Exposition mit einer Einfüllrate von 60 und 100 KV%/min reagierten in unseren Untersuchungen ebenfalls mit Anstiegen der Katecholaminkonzentrationen in diesen Größenordnungen. Somit spiegeln die erhöhten Konzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin eine starke Stressreaktion des Organismus wider, die durch CO₂-Exposition verursacht wurde.

In der Großtiermedizin wurde bereits mehrfach bestätigt, dass CO₂-Inhalation zur Ferkelkastration und zur Betäubung vor dem Schlachten eine massive Stressreaktion, die unter anderem an der Erhöhung der Katecholamine gemessen wurde, hervorruft (Hartung et al., 2002; Mühlbauer et al., 2009; Zimmermann, 2010). Die betäubungslose Kastration erhöhte die Katecholamine um das 2 – 4-fache des dort ermittelten Ausgangswertes, die Kastration unter CO₂-Exposition erhöht die Werte um das 25 – 93-fache (Zimmermann, 2010). Die Blutabnahme für den Ausgangswert erfolgte durch Punktion der Vena cava cranialis in Rückenlage ohne Betäubung 15 min vor dem chirurgischen Eingriff.

4 Diskussion

Als Ursache des Anstiegs der Katecholaminkonzentrationen ist primär das chronische wie auch akute Bestehen einer respiratorischen Azidose zu nennen. Schaefer und Mitarbeiter (1968) konnten zeigen, dass die Zunahme des Adrenalinalgehaltes des Nebennierenmarks unter intermittierender 8-stündiger CO₂-Exposition mit 15% CO₂ über 7 Tage abhängig vom pH-Wert und auf die Phase einer nicht-kompensierten respiratorischen Azidose beschränkt war. In diesem Fall schien eine Neusynthese der Katecholamine vorzuliegen. Die Neusynthese in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks kann innerhalb von Minuten erfolgen (Pohorecky und Wurtman, 1971). Eine Änderung der Neusynthese aufgrund von geänderten Glukokortikoidkonzentrationen nimmt Stunden in Anspruch (Pohorecky und Wurtman, 1971). Auch Brofman und Mitarbeiter (1990) wiesen nach, dass ein Anstieg der Adrenalin- und NoradrenalinKonzentrationen direkt durch eine Abnahme des pH-Wertes im Blut vermittelt wird, die durch einen steigenden CO₂-Partialdruck (CO₂-Inhalation für mindestens 10 min) verursacht wurde. Hier ist es eher möglich, dass Katecholaminspeicher der chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks entleert worden sind (Pohorecky und Wurtman, 1971), was auch bei unseren Mäusen aufgrund der kurzen Expositionszeit am wahrscheinlichsten ist.

- **Stammesunterschiede**

Die Konzentrationen für Adrenalin im Plasma waren in der CO₂ 60- und CO₂ 100-Gruppe bei C57/Bl6-Mäusen niedriger als bei NMRI-Mäusen. Die NoradrenalinKonzentrationen im Plasma waren ebenfalls in der CO₂ 60-, CO₂ 100-, Iso 5%- und Sevo 8%-Gruppe bei Tieren des C57Bl/6-Stammes niedriger als bei Tieren des NMRI-Stammes. Dies kann am genetischen Hintergrund der Stämme liegen. Es ist bekannt, dass Mäuse unterschiedlicher Stämme ein sehr unterschiedliches Verhalten hinsichtlich z. B. Angst, Aktivität und Stressreaktivität zeigen und dass sie Unterschiede in der Neurorezeptor- und Neurotransmitterausstattung aufweisen (Liu et al., 2003; Jacobson und Cryan, 2005). Bei akutem wie auch chronischem Stress wurden zwischen C57Bl/6- und einem anderen Mausstamm, BALB/cByJ, unterschiedliche Konzentrationen von Noradrenalin im Gehirn gemessen werden, welche sich auch auf der Verhaltensebene widerspiegelten (Shanks et al., 1994).

- **Welche Ursachen kommen für die Stressantwort in Frage?**

Geringste CO₂-Konzentrationen werden von Mäusen als Warnsignal wahrgenommen und führen zu einer Verhaltensänderung. Für wildlebende Mäuse, die in Bauten unter der Erde leben, ist es überlebenswichtig, eine verlegte Frischluftzufuhr, z. B. durch eingefallene Gänge, frühestmöglich zu erkennen und Gegenmaßnahmen zu ergreifen. So können Mäuse schon CO₂-Konzentrationen von 0,066% wahrnehmen (Hu et al., 2007).

Wie zuvor unter 4.3.1 erläutert, ist anzunehmen, dass die CO₂-Konzentrationen, die während der Narkoseinduktion in der Kammer herrschten, schmerzhaft und aversive Reize für Mäuse darstellen.

CO₂-Inhalation verursacht eine Erniedrigung des pH-Wertes < 7 im Blut (Angus et al., 2007; Deckardt et al., 2007; Traslavina et al., 2010; Thomas et al., 2012) und nachgeschaltet in der Cerebrospinalflüssigkeit sowie in den Nervenzellen selbst (Ziemann et al., 2009). Diese massiven, lebensbedrohlichen Änderungen des inneren Milieus können nicht in der kurzen Zeit der Narkoseinduktion durch körpereigene Puffersysteme abgefangen werden. Regulationsmechanismen, wie die Erhöhung der Atemfrequenz und Atemtiefe zur Abatmung des überschüssigen CO₂ greifen nicht, da dadurch nur noch mehr CO₂ in den Körper gelangt (s. a. 1.4.2). Die sympathoadrenerge Reaktion ist auf diese nicht kompensierte Phase der respiratorischen Azidose zurückzuführen (Schaefer et al., 1968; Brofman et al., 1990).

Papp und Mitarbeiter (1993) sowie Colasanti und Mitarbeiter (2012) zeigen in ihren Übersichtsarbeiten deutlich die angst- und panikerzeugende Wirkung von erhöhten CO₂-Konzentrationen im Organismus. Zentrale noradrenerge, serotonerge und GABAerge Systeme in für Angstprozesse relevanten Hirnstrukturen sind an der Ausprägung der Panikzustände beteiligt (Bailey et al., 2003; Bailey und Nutt, 2008; Buchanan und Richerson, 2010; Dohle und Richerson, 2010; Schruers et al., 2011; Colasanti et al., 2012). An der zentralen CO₂-Chemorezeption sind der Bulbus olfactorius (Hu et al., 2007), medulläre Raphé-Kerne (Corcoran et al., 2009; Dohle und Richerson, 2010) und weitere Kerne des Hirnstamms, wie der Locus coeruleus, der Nucleus des Tractus solitarius und der Nucleus retrotrapezoideus (Chernov et al., 2010) sowie die Amygdala (Ziemann et al., 2009) beteiligt. Man vermutet, dass serotonerge Neurone eine Arousal-Antwort bei niedrigen CO₂-Konzentrationen induzieren, und dass dieselben Neurone bei höheren CO₂-Konzentrationen Angst und Dyspnoe hervorrufen (Dohle und Richerson, 2010). CO₂-Chemosensoren, die im Bereich der Amygdala lokalisiert sind, vermitteln bei Hyperkapnie und Azidose Angst- und Panikverhalten bei Mäusen (Ziemann et al., 2009). Auch bei Ratten verstärkt die 5-minütige Exposition mit 20% CO₂ (gradueller Konzentrationsanstieg) angstbezogenes Verhalten und aktiviert Hirnregionen, die über Aktivierung der HPA-Achse und der Sympathikusantwort zu Anpassung der Atmung, zu Arousal-Verhalten und zu aversiven Panik-/Verteidigungs-Reaktionen führen (Johnson et al., 2011) (s. a. 1.4.6.1). Man sollte davon ausgehen, dass Angst von Tieren als größere Belastung erlebt wird als von Menschen, die intellektuell fähig sind, die Angst zu rationalisieren und Ursachen zu klären (Binder, 2009).

Weiterhin erzeugt das Einatmen von CO₂ Dyspnoe (Atemnot mit der Empfindungsqualität Lufthunger), was ebenfalls zu einer Stressantwort des Organismus führt (s. 4.6.1).

Diesem werden noch einmal die Inhalationsanästhetika gegenübergestellt.

Es ist nicht bekannt, dass Isofluran und Sevofluran in sehr geringen, nicht narkotisch wirkenden Konzentrationen von Mäusen als Warnsignal wahrgenommen werden. Isofluran und Sevofluran können irritierend auf die Schleimhäute des Atemtrakts von Mäusen wirken, jedoch werden diese Empfindungen von Menschen nicht mit Schmerzen verglichen (Doi und Ikeda, 1993; TerRiet et al., 2000). Ratten zeigten erst nach einer Langzeitbehandlung mit niedrigen, nicht-narkotisch wirkenden Konzentrationen von Halothan, Sevofluran und Enfluran ein erhöhtes Angstverhalten (Ozer et al., 2006). Einen Tag nach einer 2-stündigen Narkose mit 2,6% Sevofluran konnte bei Wildtyp-Mäusen jedoch kein erhöhtes Angstverhalten gemessen werden (Wiklund et al., 2008). Während der kurzen Narkoseeinleitung mit Isofluran und Sevofluran von weniger als 300 s ist aufgrund der Literaturbefunde und der vergleichsweise geringen Konzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin im Plasma nicht davon auszugehen, dass Mäuse eine Angst- und Panikreaktion erfahren.

Isofluran und Sevofluran haben eine atemdepressive Wirkung und verursachen dadurch eine geringe Abnahme des pH-Wertes, wie $\text{pH} > 7,23$ nach Narkoseeinleitung bzw. nach 10 min Narkose (Angus et al., 2007; Cesarovic et al., 2010). Geringe Dosen von Isofluran, Sevofluran und Enfluran, die noch nicht narkotisch wirken, verminderten eine durch Hyperkapnie verursachte Steigerung der Atmung bei Mäusen (Groeben et al., 2004). Inwieweit bei der Narkoseeinleitung Zustände, die einer Dyspnoe gleichen, auftreten können, lässt sich daraus schwer ableiten. Mäuse tolerieren Isofluran und Sevofluran während der Narkoseeinleitung bis zur Phase der Ataxie, in einigen Fällen bis zur Bewusstlosigkeit und somit bis zu einem tieferen Narkosestadium als CO_2 , ehe sie die Umgebung verlassen (Makowska et al., 2009; Menken, 2012).

4.4.2 Zweite Bewertung

Warnmeldung durch bereits niedrige CO_2 -Konzentrationen, auftretende Nozizeption bei höheren Konzentrationen, lebensbedrohliche Änderungen des inneren Milieus (Azidose und Hyperkapnie), die mit einer Angst- und Panikreaktion sowie Dyspnoe einhergehen, stellen Stressoren mit einer starken Motivation dar, die CO_2 -Atmosphäre zu verlassen. Wenn möglich, verlassen Mäuse, wie zuvor erwähnt, eine CO_2 -Atmosphäre immer bevor narkotische Wirkungen, wie Ataxie und Bewusstlosigkeit, eintreten. In der Narkosekammer jedoch haben die Mäuse keine Möglichkeit, dem rechtzeitig zu entkommen. Aktives Coping ist nicht möglich.

Demzufolge sind bei NMRI- und C57Bl/6-Mäusen die Narkoseinduktionen zur Euthanasieeinleitung mit 100% CO_2 mit einer Einfüllrate von 60 und 100 KV%/min mit großem Distress verbunden. In Übereinstimmung damit steht, dass bei unseren Untersuchungen nach sofortiger Tötung der Tiere bei Erreichen der CT erhöhte Adrenalin-

und Noradrenalin-Konzentrationen im Plasma nach CO₂-Exposition im Vergleich zu Isofluran- und Sevofluran-Exposition gemessen wurden.

Die aversive Zeitspanne, also die Zeit ab dem Moment, an dem die Mäuse die Narkosekammer verlassen würden, bis zum Erreichen der CT, scheint unter Isofluran- oder Sevofluranexposition weniger belastend als unter CO₂-Exposition zu sein, obwohl die Narkoseeinleitung mit den hohen CO₂-Einfüllraten in unseren Untersuchungen schneller eine CT erzeugt als die hohen Konzentrationen von Isofluran und Sevofluran. Übereinstimmend damit konnten wir niedrige Konzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin im Plasma bei NMRI- und C57Bl/6-Mäusen, die zur Narkoseinduktion zur Euthanasieeinleitung 5% Isofluran und 8% Sevofluran erhielten, sowie bei C57Bl/6-Mäusen, die 2% Isofluran (Einfüllraten jeweils 71 KV%/min) erhielten, messen.

4.4.3 Blutglukose

- **Kontrollgruppe**

Bei unseren NMRI-Mäusen lag die Glukosekonzentration der Kontrollgruppe, die einem Luftstrom ausgesetzt und bei Bewusstsein dekapitiert wurde, bei 9,40 mmol/l und damit leicht unter den physiologischen Blutglukosekonzentrationen, die für 12 Wochen alte NMRI-Mäuse mit $11,0 \pm 1,2$ mmol/l für männliche Tiere und mit $11,4 \pm 1,1$ mmol/l für weibliche Tiere angegeben werden (Harlan Laboratories, 2008b). Es ist denkbar, dass die Luftstrombehandlung eine Erniedrigung des Blutglukosespiegels zur Folge hatte. Auf der anderen Seite könnte auch das Alter unserer Tiere, das zwischen 8 und 23 Wochen lag, einen Einfluss auf den physiologischen Bereich der Blutglukosekonzentration gehabt haben.

Bei unseren C57Bl/6-Mäusen war die Blutglukosekonzentration der Kontrollgruppe, die einem Luftstrom ausgesetzt und bei Bewusstsein dekapitiert wurde, 8,05 mmol/l. Für 7-9 Wochen alte Mäuse der C57Bl/6J01aHsd-Zuchtlinie werden $9,18 \pm 1,88$ mmol/l für männliche Tiere und $8,90 \pm 1,90$ mmol/l für weibliche Tiere als physiologisch angegeben (Harlan Laboratories, 2008a). Hiermit verglichen liegen die Blutglukosewerte unserer Kontrollgruppe in diesen Bereichen. Für Mäuse der C57Bl/6JRccHsd-Zuchtlinie werden $11,87 \pm 2,72$ mmol/l für männliche Tiere und $9,50 \pm 1,54$ mmol/l für weibliche Tiere als physiologisch angegeben (Harlan Laboratories, 2008a). Vergleicht man die in dieser Arbeit gemessenen Blutglukosekonzentrationen mit obigen Werten, liegen die Konzentrationen der C57Bl/6-Luftkontrollgruppe innerhalb dieses physiologischen Bereiches.

- **Exposition mit Isofluran und Sevofluran**

Verglichen mit den physiologischen Referenzbereichen des Züchters scheinen die Expositionen mit den hohen Isofluran- und Sevoflurankonzentrationen die

4 Diskussion

Blutglukosekonzentration im physiologischen Bereich zu halten. Nur die Exposition mit 2% Isofluran führte zu leicht erhöhten Glukosekonzentrationen im Vergleich mit C57Bl/6JOLA-Hsd-Mäusen.

Betrachtet man die Werte der Behandlungsgruppen untereinander, so führte die Exposition mit 2% Isofluran und 8% Sevofluran bei C57Bl/6-Mäusen zu erhöhten Konzentrationen der Blutglukose verglichen mit CO₂-Exposition mit 60 und 100 KV%/min. Auch war bei C57Bl/6-Mäusen die Konzentration der Blutglukose höher bei Behandlung mit 2% Isofluran im Vergleich zu 5% Isofluran.

Die Dauer der Exposition mit den Isofluran- und Sevoflurankonzentrationen war in vorliegender Arbeit immer < 300s, in den meisten Fällen sogar < 150 s. Es scheint möglich, dass diese Zeit zu kurz gewesen war, um eine sog. Stresshyperglykämie auszulösen. Die Regulation der Blutglukosekonzentration erfolgt über noradrenerge Neurone des Hypothalamus, die direkt die Freisetzung von Glukose aus der Leber stimulieren und indirekt durch die Aktivierung von Katecholaminen aus der Nebenniere die Insulinfreisetzung aus dem Pankreas hemmen (Smythe et al., 1989). Erhöhte Glukosekonzentrationen bei einer Stresshyperglykämie werden in der Regel erst nach 10-15 min gemessen (s. a. 1.4.3). So fanden Zardooz und Mitarbeiter (2010) ebenfalls keine Unterschiede in der Plasmaglukosekonzentration bei Ratten nach einer 2-minütigen Isofluranexposition im Vergleich zu nicht-narkotisierten Ratten.

Dem entgegen fanden Pomplun und Mitarbeiter (2004) einen Blutglukoseanstieg bei C57Bl/6-Mäusen, die eine Narkose mit Isofluran im Äthertopf-Verfahren oder mit Ketamin/Xylazin als i.p.-Injektion im Vergleich zu einer unbehandelten Gruppe erhielten. Sobald die Bewusstlosigkeit erreicht wurde, wurde Blut gewonnen. Nach einer innerhalb von Sekunden einsetzenden Isofluran-Narkose waren hier die Blutkonzentrationen zwar im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, jedoch relativ niedriger als nach einer innerhalb von Minuten einsetzenden Ketamin/Xylazin-Narkose. Die Insulinspiegel blieben von beiden Anästhesieformen unbeeinflusst. Die Autoren erklären den Glukoseanstieg der Ketamin/Xylazin-Gruppe mit der Dauer bis zum Eintritt der vollständigen Narkose und mit einer erhöhten Stressantwort. Je länger die Narkoseinduktion dauere, desto größer sei eine Stressreaktion und desto höher seien die Blutglukosewerte. Dies wird mit erhöhten Corticosteron-Werten der Ketamin/Xylazin-Gruppe belegt. Auch stellten Arnold und Langhans (2010) bei Ratten nach Narkoseeinleitung mit Isofluran und mit Ketamin/Xylazin und Blutentnahme bei Erreichen der CT ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Plasmaglukose und eine Erhöhung der Corticosteron-Konzentrationen, die allerdings noch kein signifikantes Ausmaß erreichten, fest. In Übereinstimmung zeigten Untersuchungen am Menschen, dass während der Narkoseeinleitung mit Isofluran und Sevofluran die

Plasmaglukosespiegel stiegen, die Katecholaminkonzentrationen blieben jedoch unverändert (Geisser et al., 2003).

Es scheinen noch andere Mechanismen neben Stress Einfluss auf den Blutglukosespiegel zu haben. Es wurden erhöhte Plasmaglukosespiegel nach ca. 30 und 60 min Isofluran- und Sevofluran-Narkosen bei Ratten gemessen (Zuurbier et al., 2008). Es gibt Hinweise, die dafür sprechen, dass die Isofluran-induzierte Hyperglykämie zumindest teilweise von der Aktivierung K_{ATP} -Kanäle im Pankreas direkt durch die Narkosegase herrührt (Zuurbier et al., 2008).

- **Exposition mit CO_2**

Im Vergleich mit den physiologischen Referenzbereichen des Züchters hatte in vorliegender Arbeit die CO_2 -Exposition, die zwischen 60 und 150 s dauerte, keinen oder einen leicht senkenden Einfluss auf die Konzentration der Blutglukose. Dem entgegen wurden bei Ratten leicht erhöhte Glukosekonzentrationen im Plasma nach einer 2-minütigen Exposition mit einer Mischung aus 50% CO_2 und O_2 und sofortiger Blutabnahme gemessen, die aber noch innerhalb des von den Autoren ermittelten Normbereiches lagen (Fowler et al., 1980). Auch wurden nach einer ca. 1-minütigen Exposition mit CO_2 , die eine tiefe Narkose hervorrief, höhere Glukosekonzentrationen im Plasma bei Ratten gemessen als bei nicht-narkotisierten Ratten (Zardooz et al., 2010). Dass in unseren Untersuchungen kein Anstieg der Blutglukose verzeichnet werden konnte, könnte daran liegen, dass die Zeit zwischen Stressorreiz mit folgender Erhöhung der zentralen und peripheren Katecholaminkonzentrationen und der dann dadurch ausgelösten Glukosefreisetzung aus der Leber und Inhibition der Insulinsekretion zu kurz war (Smythe et al., 1989). Erhöhte Glukosekonzentrationen bei einer Stresshyperglykämie werden in der Regel erst nach 10-15 min gemessen (s. a. 1.4.3).

Mit unseren Ergebnissen lassen sich mittels der Messung der Glukosekonzentrationen keine sicheren Aussagen zur Stresshaftigkeit der verschiedenen Narkoseverfahren treffen.

4.5 Verhaltensanalyse

In vorliegender Untersuchung gab es große interindividuelle Variationen in der Häufigkeit des Auftretens von einzelnen Verhaltensweisen, z. B. beim Putzverhalten oder bei den Popcorn-Konvulsionen bzw. beim Springen gegen den Deckel. So wurde auch von Niel und Weary (2006) bei Ratten unter CO₂-Exposition beobachtet, dass einige Tiere viele Fluchtversuche unternahmen, wohingegen einige Tiere keine Fluchtversuche zeigten. Die Autoren betonen, dass ein Fehlen einer Verhaltensweise nicht notwendigerweise darauf schließen lässt, dass die Prozedur vom Tier als harmlos und neutral wahrgenommen wird.

4.5.1 Körperhaltung

Mäuse beider Stämme, die einem Luftstrom mit 10 l/min (71 KV%/min) ausgesetzt waren, zeigten normales Verhalten, das auch ohne Lufteinstrom gezeigt wird.

Alle Tiere, die eine Narkosegasbehandlung erhielten, zeigten zu Beginn die gleichen Körperhaltungen und Verhaltensweisen. Im weiteren Narkoseverlauf gingen diese Haltungen in eine liegende bis hin zu einer vollständig flachen, relaxierten Haltung über. Dies ist mit der narkotischen Wirkung der Gase zu erklären. Isofluran, Sevofluran und CO₂ erzeugen Muskelrelaxation und Immobilität (Woodbury und Karler, 1960; Eger, 1981; Patel und Goa, 1996).

Freezing wird als das Fehlen jeglicher Bewegung, einschließlich den Bewegungen der Tasthaare und ausschließlich den Atembewegungen, beschrieben (Supple et al., 1988; Zeitlina et al., 2012). Die Tiere sind dabei völlig steif (Yang et al., 2011). Das hier beobachtete Ruhen konnte nicht als sog. Freezing-Verhalten, das als Antwort auf eine stressvolle Situation gezeigt werden kann (Patchev et al., 2007), gedeutet werden. Die Tiere hatten während des ruhigen Stehens oder Sitzens keinen erhöhten Muskeltonus und waren nicht völlig versteift, auch konnten Bewegungen der Vibrissen festgestellt werden.

4.5.2 Motorische Aktivität

- **Vorwärtsbewegung**

Die lokomotorische Aktivität war nur bei Exposition mit 5% Isofluran und 8% Sevofluran im Vergleich zu allen anderen Gruppen erhöht. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es während der Exzitationsphase der Narkoseeinleitung mit Inhalationsanästhetika zu spontanen und reflexartigen Bewegungen kommen kann (Rang et al., 2003).

- **Rearings**

Bei Mäusen, die CO₂ mit 60 und 100 KV%/min erhielten, war das Rearing-Verhalten im Vergleich zur Luft-Kontrolle reduziert. Die Häufigkeit der gezeigten Rearings unter Isofluran- und Sevofluran-Exposition unterschied sich nicht von der unter Lufteinstrom gezeigten Häufigkeit.

Rearings dienen dem Erkundungsverhalten. Eine Abnahme des Erkundungsverhaltens kann als Verhaltensreaktion auf eine Stressexposition, z. B. eine unbekannte Umgebung oder aversiven Reiz, gewertet werden (Patchev, 2006). Die Narkosekammer als neue Umgebung ist eine eher unwahrscheinliche Stressursache, da alle Tiere während der Habitationsphase die Kammer mehrmals explorieren konnten. Des Weiteren behielt jedes Tier seine eigene Narkosekammer, die den tiereigenen Geruch annehmen konnte, über die Habitationsphase und während des Versuches bei. Möglich wäre aber eine Stressreaktion auf den Gaseinstrom an sich. So benutzten Ziemann und Mitarbeiter (2009) einen Lufteinstrom von 15 l/min, was bei der dort verwendeten Kammer einer Einfüllrate von ca. 260 KV%/min entspricht, als aversiven Reiz. In Approach-Avoidance-Versuchen an unserem Institut jedoch meiden Mäuse einen Lufteinstrom von 10 l/min (entspricht dem hier verwendeten Lufteinstrom) plus Futterbelohnung nicht (Menken, 2012). Diese geringere Einströmrate scheint keinen aversiven Reiz darzustellen. Die Abnahme der Rearings unter CO₂-Exposition ist eher mit der narkotischen Wirkung und der frühzeitig einsetzenden Muskelschwäche, die auch am hypotonen Gang (s. a. weiter unten) zu sehen ist, zu erklären.

- **Putzverhalten**

Alle gezeigten Putzhandlungen konnten nach den von Kalueff und Tuohimaa (2004) beschriebenen Kriterien als stressinduziertes Verhalten klassifiziert werden: bei den Mäusen wurden Bewegungen, die länger als für 5 s unterbrochen wurden, und inkorrektes Aneinanderreihen der Putzstadien festgestellt.

Die Exposition mit Inhalationsanästhetika reduzierte das Putzverhalten im Vergleich zur Exposition mit einströmender Luft. NMRI- und C57Bl/6-Mäuse, die CO₂ mit einer Einfüllrate von 60 und 100 KV%/min ausgesetzt waren, zeigten kein Putzverhalten.

Es verwundert nicht, dass kein normales Putzverhalten gezeigt wurde. Mäuse zeigen Komfort-Verhalten, zu dem Körper- und Fellpflege gehört, in der Regel nur, wenn sie sich sicher und unbeobachtet fühlen, wie es z. B. im Heimatkäfig zu beobachten ist. Es ist möglich, dass stressinduziertes Putzverhalten, das als Übersprunghandlung in einer ambivalenten Situation gezeigt wird (Jolles et al., 1979; Spruijt et al., 1992), durch den Aufenthalt in der Narkosebox und den Lufteinstrom verursacht wird. Die verminderte Häufigkeit der Putzhandlungen unter Isofluran- und Sevofluranexposition im Vergleich zur Luftstromexposition lässt sich durch die einsetzende narkotische Wirkung erklären. Auch die frühzeitig einsetzende Muskelschwäche und narkotische Wirkung unter CO₂-Exposition kann Putzverhalten unmöglich machen.

4.5.3 Konvulsionen

Während der Narkoseeinleitung können Konvulsionen auftreten. Irwin (1968) unterscheidet bei den Konvulsionen zwischen klonischen Krämpfen, denen sog. Running Excitement vorausgehen kann, und tonischen Krämpfen, wie z. B. Opisthotonus. Auch können sog. Popcorn-Konvulsionen beobachtet werden.

Bei Mäusen beider Stämme kam es weder während des Luftstroms noch während der CO₂-Exposition zu Running Excitement, klonischen Krämpfen oder Opisthotonus.

Bei der Behandlung mit 5% Isofluran und 8% Sevofluran hingegen zeigten alle NMRI-Mäuse eine Art klonische Krämpfe, denen Running Excitement vorausging. Bei einem Teil dieser Tiere fand man auch Opisthotonus.

Nur bei einem Teil der C57Bl/6-Mäuse war unter Isofluran-Exposition Running Excitement zu beobachten, wohingegen alle Tiere dieses Stammes, die 8% Sevofluran erhielten, Running Excitement zeigten, das dann bei einem Viertel der Tiere in einen klonischen Krampf mündete. Bei keiner C57Bl/6-Maus kam es zu Opisthotonus.

Unter CO₂-Exposition treten bei kleinen Labortieren nur sehr selten Exzitationen auf (Erhardt et al., 1989). Im Gegensatz dazu zeigen Mäuse bei einer Inhalationsmononarkose mit Isofluran und Sevofluran in der Einleitung oft Exzitationen (Henke, 2010). Diese Exzitationen werden jedoch nicht bewusst miterlebt (Henke, 2010). Da in vorliegender Arbeit bei Mäusen, bei denen Exzitationen auftraten, der Stellreflex noch nicht erloschen war, könnte das Bewusstsein nur eingetrübt gewesen sein.

Bei *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass 2 MAC Sevofluran das Gleichgewicht zwischen synaptischer Exzitation und Inhibition in Zellen des Striatums in Richtung Exzitation verschiebt und dass dadurch unwillkürliche Bewegungen während der Narkoseinduktion mit Sevofluran verursacht werden (Oose et al., 2012).

Opisthotonus bei Mäusen tritt in den meisten Fällen innerhalb der ersten 5 min der Narkoseeinleitung mit Inhalationsanästhetika auf (Komatsu und Ogli, 1987). Dabei variiert die Häufigkeit des Auftretens zwischen unterschiedlichen Anästhetika und unterschiedlichen Mausstämmen (Komatsu und Ogli, 1987). Den Autoren zufolge ist ein möglicher Mechanismus des Opisthotonus, dass höhere Gehirnzentren schneller gehemmt werden als die Zellen der Formatio reticularis, über die Streckreflexe ausgelöst werden. Mit zunehmender Narkosetiefe werden dann auch diese Zellen gehemmt.

In den Luftkontrollgruppen beider Stämme konnte man vereinzelt Verhaltensweisen, wie in die Höhe oder gegen den Deckel Springen, beobachten. Dieses kann der Versuch sein, der Narkosebox zu entkommen. Möglich wäre aber auch, dass die Mäuse den durchsichtigen

Plexiglasdeckel nur ungenügend wahrnehmen und, wie häufig im Heimatkäfig gezeigt, gegen den vermeintlichen Gitterdeckel springen, um daran zu klettern. Im Rahmen von exzitatorischen Phänomenen bei der Narkoseeinleitung wird das in die Höhe Springen als Popcorn-Konvulsionen bezeichnet (Irwin, 1968).

Obwohl es keine signifikanten Unterschiede gibt, werden diese Sprünge vermehrt in den mit CO₂ behandelten Gruppen beobachtet. Da es jedoch bei CO₂-Exposition kaum Hinweise auf eine Auslösung von Exzitationen gibt (s. o.), sollte das in die Höhe Springen eher als Fluchtversuche gedeutet werden, wie es auch von Thomas und Mitarbeitern (2012) angesehen wird.

4.5.4 Hypotoner Gang und Ataxie

Der hypotone Gang fand sich bei allen Mäusen beider Stämme, die mit CO₂ behandelt wurden. Bei Tieren, die 2% und 5% Isofluran und 8% Sevofluran sowie dem Luftstrom ausgesetzt waren, konnte kein hypotones Gangbild festgestellt werden. Der hypotone Gang war durch eine Absenkung von Becken und Bauch gekennzeichnet, so dass das Eigengewicht nicht auf den Hinterbeinen getragen werden konnte und die Hinterbeine nach seitlich/hinten hinterhergezogen wurden. Das hypotone Gangbild tritt aufgrund von Muskelschwäche der Gliedmaßen oder aufgrund einer Lähmung auf (Irwin, 1968). Diese muskuläre Einschränkung bei CO₂-Exposition wurde schon zu Beginn der Ataxiephase, also noch bevor eine vollständige Muskelrelaxation eingetreten war, beobachtet. Der hypotone Gang ist in Zusammenhang mit der Entwicklung der Narkosestadien und als eine pharmakologische Wirkung des CO₂ zu sehen.

CO₂-Exposition bedingt eine respiratorische Azidose mit pH-Werten unterhalb von 7 (s. a. 1.4.2). Eine respiratorische Azidose führt zu Hyperkaliämie, da vermehrt Kalium aus der Zelle ausströmt (Adroque und Madias, 1981). Erhöhte Kaliumkonzentrationen im Blut können die Ursache für eine Verzögerung der Depolarisation mit Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeit und folgend Ursache für Muskelschwäche bis Paralyse sein (Forster, 2008). Beim Vorliegen einer respiratorischen Azidose wird auch das Phosphat-Puffer-System in Anspruch genommen und es kommt zu einer Hyperphosphatämie, die ebenfalls zu einer Muskelschwäche beitragen kann (Forster, 2008).

Isofluran- und Sevofluran-Exposition kann eine leichte Absenkung des pH-Wertes im Blut zur Folge haben (s. a. 1.4.2) und sich auch auf die Elektrolytkonzentrationen im Blut auswirken. Hier sind jedoch diese Änderungen nicht so stark wie unter CO₂-Exposition. Es wurden keine Anzeichen eines hypotonen Ganges unter Isofluran- und Sevofluran-Behandlung festgestellt, dafür aber Exzitationen.

Ataxie tritt mit dem Beginn des zweiten Narkosestadiums nach Guedel auf und ist als Zeichen der Narkosegaswirkung zu werten. Folgerichtig war bei allen Mäusen beider

Stämme, die mit CO₂, Isofluran und Sevofluran behandelt wurden, Ataxie festzustellen. Mäuse der Luftkontrollgruppe zeigten keinen ataktischen Gang.

4.5.5 Vokalisationen

Bei beiden Mausstämmen konnten weder im hörbaren noch im Ultraschallbereich Lautäußerungen während der Narkosegas- bzw. Lufteinleitung festgestellt werden. Im Gegensatz dazu finden Valentine und Mitarbeiter (2012) bei Mäusen während der Exposition mit CO₂ und Isofluran Vokalisationen im Ultraschallbereich. Allerdings beschreiben die Autoren keine einzeln aufgezeichneten Ultraschallrufe (charakterisiert durch Frequenz und Dauer), sondern sprechen von 26,5 kHz-Peaks im Spektrogramm. Diese Peaks traten nur bei Aufnahmen während der CO₂- und Isofluran-Exposition auf. Anhand dieser Art von Spektrogramm lässt sich nicht eindeutig erkennen, ob die gemessenen Frequenz-Peaks tatsächlich Maus-Vokalisationen entsprechen oder ob sie Artefakte, wie z. B. durch den Gaseinstrom verursacht, darstellen.

Bei Ratten wurde beobachtet, dass die Exposition mit 100% CO₂ mit einer Einfüllrate von knapp 20 KV%/min vermehrte Ultraschallvokalisationen auslösen kann (Niel und Weary, 2006). In einer andere Studie fand man dahingegen während der Exposition mit 100% CO₂ mit 10 KV%/min keine Ultraschallvokalisationen bei Ratten (Burkholder et al., 2010). Ratten äußern furchtinduzierte Ultraschallvokalisationen im Bereich von 22 kHz mit einer Dauer von ca. 1000 ms, wenn sie z. B. mit einem Fressfeind konfrontiert werden, im innerartlichen Kampf unterworfen werden oder Schmerzreize erfahren (Wöhr und Schwarting, 2010). Hierbei scheint der Ultraschallruf eher einen negativen affektiven Zustand wie Angst und Furcht widerzuspiegeln, da während einer Furchtkonditionierung Ratten auch ohne Schmerzreiz auf den konditionierten Stimulus mit Vokalisationen reagieren (Wöhr und Schwarting, 2010). So traten bei Ratten diese 22 kHz-Vokalisationen nicht in Zusammenhang mit Schmerzverhalten auf, das in entzündlichen, viszeralen und neuropathischen Schmerzmodellen gezeigt wurde (Wallace et al., 2005). Wöhr und Schwarting (2010) stellen fest, dass bei Mäusen keine der Ratten ähnliche Ultraschallvokalisation im 22 kHz-Bereich bisher bekannt ist. Mäuse äußern dagegen isolationsinduzierte Ultraschallvokalisationen im 60 kHz-Bereich während der ersten Lebensstage, wenn sie von Mutter und Nest getrennt werden (Wöhr und Schwarting, 2010). Auch während der sozialen Interaktion mit einem Artgenossen werden 70 kHz-Vokalisationen emittiert (Wöhr und Schwarting, 2010). Wird ein Männchen mit Weibchenurin exponiert, so äußert es Vokalisationen im 70 kHz-Bereich (Wöhr und Schwarting, 2010). In vorliegender Arbeit lassen sich mittels der Aufzeichnung von Vokalisationen keine Aussagen zur Stresshaftigkeit der Narkosebelastung treffen.

4.5.6 Dritte Bewertung

Im Vergleich zu den Inhalationsanästhetika erzeugt CO₂ mit einer Einfüllrate von 60 und 100 KV%/min eine Narkoseinduktion, die ohne jede Verhaltens- oder Bewegungsauffälligkeit einhergeht. Auf den ersten Blick mag dadurch die Narkoseeinleitung mit CO₂ „ruhig und sanft“ für den Betrachter aussehen, jedoch sollte dies nicht über die tatsächliche Belastung aufgrund von Änderungen des Säuren-Basen-Gleichgewichts mit all seinen Folgen, wie Azidose, erhöhter CO₂-Partialdruck, Reizung von zentralen Chemosensoren, Anstieg von Adrenalin und Noradrenalin im Plasma und den wahrscheinlich damit einhergehenden Erfahrungen von Dyspnoe, Angst und Panik, wie sie weiter oben beschrieben wurden, hinwegtäuschen.

Bei der Narkoseeinleitung mit Isofluran und Sevofluran, besonders mit den niedrigen Konzentrationen, tritt das Exzitationsstadium bei den hier verwendeten Mäusen ausgeprägt in Erscheinung. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass diese Exzitationen durch die fortgeschrittene Narkose nicht mehr bei vollem Bewusstsein vom Tier erlebt werden (Henke, 2010).

4.6 Untersuchung des Atmungssystems

4.6.1 Atembewegungen und Dyspnoe

Eine Zunahme der Atemtiefe wurde während der CO₂-Exposition festgestellt. Steigt die CO₂-Konzentration in der Einatemluft, so führt dies über die Stimulation des Atemzentrums in der Medulla oblongata zu einer Steigerung des Atemzugvolumens (Nattie, 1999). Dieser Zustand wird als zentrogene Dyspnoe bezeichnet. Nach Hackbarth und Lückert (2002) kann man hier schon von Schäden sprechen, die dem Tier durch CO₂-Inhalation wiederfahren. Im weiteren Verlauf und mit zunehmender CO₂-Konzentration in der Einatemluft nimmt die Ventilation bis hin zur Schnappatmung, die auch in unserer Untersuchung beobachtet werden konnte, aufgrund der narkotischen Wirkung des CO₂ ab (Hill und Flack, 1908; Ikeda et al., 1989).

Eine Empfindungsqualität von Dyspnoe stellt der Lufthunger dar (Banzett und Moosavi, 2001). Der Schweregrad von Lufthunger steht in positiver Korrelation mit dem CO₂-Gehalt der Einatemluft (Banzett et al., 2008). Lufthunger bewirkt im Gehirn eine Aktivierung besonders der vorderen Inselrinde, welche beim Menschen mit dem Erfahren von Schmerz und unangenehmen Gefühlen in Zusammenhang gebracht wird (Banzett et al., 2000; Nishino, 2011). Auch werden weitere Gehirnregionen wie der vordere Gyrus cinguli, das Operculum, das Kleinhirn, die Amygdala, der Thalamus und die Basalganglien aktiviert (Evans et al., 2002). Dyspnoe, ebenso wie Schmerz, Hunger und Durst, informiert den Organismus über einen gestörten physiologischen Zustand und stellt eine starke Motivation zu adaptivem Verhalten dar (Banzett und Moosavi, 2001). Dazu ist die Maus in der Narkosekammer nicht in der Lage. Zum einen kann die Maus der CO₂-Atmosphäre nicht entkommen und zum anderen bewirkt die Atmungssteigerung keine Besserung, sondern eine Verschlechterung der Situation. Der Organismus ist bestrebt CO₂ abzuatmen, nimmt jedoch durch die Steigerung der Atmung nur noch mehr CO₂ auf. Als positiver Nebeneffekt durch diesen *circulus vitiosus* werden zwar die Bewusstlosigkeit und chirurgische Toleranz schneller herbeigeführt, jedoch erhöhen sich auch in gleichem Maße die negativen Effekte wie Lufthunger und Unfähigkeit zu adaptiven Verhalten.

Auch Isofluran und Sevofluran haben Einfluss auf die Atmung, sie wirken mit zunehmender Konzentration und zunehmender Narkosetiefe atemdepressiv (Fourcade et al., 1971; Doi und Ikeda, 1987). Im ersten Anästhesiestadium ist die Atmung noch annähernd normal, im Exzitationsstadium nimmt die Atemfrequenz zu und die Atembewegungen werden unregelmäßig. Mit zunehmender Narkosetiefe wird die Atmung im Toleranzstadium wieder regelmäßig und ab der chirurgischen Toleranz auch zunehmend flacher. Wird die Narkose noch tiefer, so erfolgt die Atmung nur noch stoßweise bis sie im Asphyxiestadium völlig fehlt (Rang et al., 2003). Während der Exzitationsphase konnten in dieser Arbeit aufgrund der Eigenbewegung der Mäuse die Atembewegungen nicht erfasst werden. Im weiteren Verlauf

nahm die Atemtiefe der Mäuse unter Isofluran- und Sevofluran-Exposition erst zu und dann wieder ab, die Atemfrequenz sank. Beim Erreichen der chirurgischen Toleranz war keine Schnappatmung zu erkennen. Diese Beobachtungen entsprechen jenen einer normalen Narkoseeinleitung unter Inhalationsanästhetika und die Mäuse nahmen wahrscheinlich unter der Isofluran- bzw. Sevofluranexposition keinen Lufthunger wahr, während sie noch bei Bewusstsein waren.

4.6.2 Makroskopische und mikroskopische Untersuchung

• Schleimhäute

Bei keiner Maus wurden Schäden der Schleimhäute des Atemtraktes makroskopisch festgestellt. Es traten keine Entzündungszeichen wie Rötungen, Schwellungen oder Sekretion der Schleimhäute nach Narkosegasexposition auf. Auch bei Schweinen, die 100% CO₂ mit gradueller Einfüllung ausgesetzt waren, fand man keine makroskopischen Zeichen einer Schleimhautschädigung an den Konjunktiven (Erhardt et al., 1989). Es ist möglich, dass die Gase in den hier verwendeten Konzentrationen zwar irritierend wirkten, die Zeit bis zum Erreichen der CT jedoch nicht ausreichte, um mit bloßem Auge erkennbare morphologische Veränderungen hervorzurufen. Bei Ratten, die für ca. 8 min, und bei Meerschweinchen, die für ca. 6 min 80% CO₂ plus 20% O₂ ausgesetzt waren fand man hingegen serosanguinösen Nasenausfluss (Iwarsson und Rehbinder, 1993). Ratten, die 60-80% CO₂ mit gradueller Füllung oder in einer vorgefüllten Kammer bis zum Eintritt des Todes (zwischen ca. 12 und ca. 27 min) ausgesetzt waren, zeigten ebenfalls einen serosanguinösen Nasenausfluss (Danneman et al., 1997). Dieser Ausfluss kann von einer starken Schleimhautreizung der Atemwege oder auch von einem Lungenödem und Lungenblutungen herrühren. Auch Isofluran und Sevofluran können die Schleimhäute reizen. Innerhalb einer einminütigen Beobachtungszeit entwickelten einige Patienten unter Isofluranexposition Hustenreiz, Sevofluran hingegen war sehr viel besser verträglich (TerRiet et al., 2000).

• Trachealausfluss

Zwischen der Luftkontrollgruppe und den Gruppen, die mit Narkosegasen behandelt wurden, fanden sich keine Unterschiede hinsichtlich Trachealausfluss. Denkbar ist, dass zum einen die Expositionszeit zu kurz war und zum anderen, dass durch das heraussprudelnde Blut nach der Dekapitation ein Trachealausfluss nicht mehr zu diagnostizieren war.

• Blutaspiration in die Trachea und in die Bronchien

In vorliegender Untersuchung fanden sich keine Unterschiede zwischen den Narkosegas- und Luftkontrollgruppen bezüglich des makroskopischen Befundes Blutaspiration. Da alle Tiere nach Erreichen der CT dekapitiert wurden, liegt es nahe, dass dieser Befund auf die

4 Diskussion

Dekapitation und reflexartige Einatmung des herausquellenden Blutes zurückzuführen ist. Bei den meisten durch Dekapitation (ohne vorherige Betäubung) getöteten Ratten tritt dieser Befund auf (Fiolna, 1986; Iwarsson und Reh binder, 1993). Aber auch bei Ratten die alleinig mit CO₂ getötet wurden, wurde der Befund Blutasp iration erhoben (Fiolna, 1986).

Unsere makroskopische Erhebung von Blutasp iration deckte sich gut mit den mikroskopischen Befunden Blutasp iration in Trachea und Bronchien, wobei die mikroskopische Untersuchung mehr Fälle von Blutasp iration erfasst. Es ist möglich, dass der makroskopische Befund Blutasp iration in die Trachea aufgrund von oberflächlich anhaftendem Blut fehlinterpretiert wurde. Auch ist es denkbar, dass durch die Präparation der Trachea und der Lunge evtl. vorhandene Blutkoagel aus der Trachea heraus gedrückt wurden und im umliegenden Gewebe hängen blieben.

In der Regel lag bei allen Schnitten mit dem Befund Blutasp iration in die Trachea auch der Befund Blutasp iration in die Bronchien vor. Dies legt die Vermutung nahe, dass in vorliegender Arbeit ein Teil des Blutes, das in den Bronchien und in den Alveolen zu finden ist, letztlich von der Dekapitation herrührt (s. a. weiter unten beim Unterpunkt Petechien und Blutungen, Einblutungen in die Alveolarsepten und in den Alveolarraum sowie Gewebeerstörung).

- **Atelektase, Lungengröße und Luftgehalt**

Auch hier gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen, die mit Narkosegasen behandelt wurden, und der Luftkontrollgruppe. Es ist möglich, dass die Narkosegase keinen Einfluss auf das Retraktionsverhalten der Lunge hatten und die aufgetretenen, mit bloßem Auge erkennbaren Atelektasefälle eine andere Ursache hatten. Da die Befunde makroskopisch und mikroskopisch sichtbarer Atelektasen nur zum Teil übereinstimmen, ist es eher wahrscheinlich, dass das, was makroskopisch beobachtet wurde (Lunge ist übermäßig retrahiert, die Lappenränder erscheinen teils wie zusammengequetscht) nur in einigen Fällen einer tatsächlichen Atelektase entsprach. Die morphometrisch bestimmte Lungengröße und der morphometrisch ermittelte Luftgehalt geben ebenfalls nicht genügend Anlass, von einer Narkosegaswirkung auf das Retraktionsverhalten der Lunge zu schließen. Anders zu werten ist der Befund der mikroskopisch festgestellten Atelektase. Dieser trat nur bei mit CO₂ behandelten Mäusen beider Stämme auf. Dieser Befund ist zwar auch bei anderen Tötungsmethoden festzustellen, jedoch tritt er zu fast 100% bei der Euthanasie mit CO₂ auf (Fiolna, 1986; Iwarsson und Reh binder, 1993). Die in vorliegender Arbeit festgestellten Befunde von Atelektase sind der Absorptionsatelektase zuzuordnen, da sie global auftritt und keine Verlegung der Bronchien festgestellt wurde (mit Ausnahme von Blut, welches sich auch in vielen Schnitten ohne Atelektase findet). Beim Einsatz von 100% Sauerstoff, ist es möglich, dass durch Absorption die Lunge innerhalb von 6 min kollabiert

(Mushambi und Smith, 2001). CO₂ ist sehr gut im Blut löslich und hat einen 23-fach höheren Diffusionskoeffizienten als Sauerstoff (Thews, 1997). Bei 100% CO₂ ist es möglich, dass es in kürzerer Zeit resorbiert wird. Da die hier untersuchten Lungen nicht sofort nach Entnahme fixiert wurden, sondern erst gewogen und fotografiert wurden, reichte wohl diese Zeit aus, um den Befund Atelektase bei einigen Schnitten hervorzurufen. Es lässt sich nicht ausschließen, dass der Befund, evtl. nur teilweise, schon *in vivo* vorlag. Viel wahrscheinlicher scheint jedoch das Auftreten nach der Lungenentnahme, da der hohe CO₂-Diffusionskoeffizient nur für 100% CO₂ gilt und während das Tier noch bei Bewusstsein war viel niedrigere Kammerkonzentrationen und noch niedrigere Lungenkonzentrationen von CO₂ herrschten.

- **Lungengewicht und Lungenödem**

Bezüglich des Lungengewichts unterschieden sich die Narkosegasgruppen und die Luftgruppe beider Stämme nicht untereinander. Eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch die häufig aufgetretene Blutaspilation scheint wenig wahrscheinlich, da die hier ermittelten Werte mit Normwerten aus der Literatur vergleichbar sind (Marino, 2012). Ein erhöhtes Lungengewicht kann Hinweise auf ein alveoläres Lungenödem geben. Dieses lag hier nicht vor, in der histologischen Untersuchung wurden ebenfalls keine Anzeichen eines Lungenödems gefunden. Im Gegensatz dazu fand man in einer Studie an Meerschweinchen bei allen untersuchten Tieren ein alveoläres Lungenödem nach 1- und 6-stündiger sowie nach 1-tägiger Exposition mit 15% CO₂ (Schaefer et al., 1964). Auch bei Mäusen und Ratten wurden in anderen Studien Befunde wie Ödemflüssigkeit in den Bronchien, perivaskuläres Ödem, alveoläres und interstitielles Ödem nach CO₂-Euthanasie erhoben (Fawell et al., 1972; Fiolna, 1986; Iwarsson und Reh binder, 1993; Danneman et al., 1997). Diese Befunde treten auch bei anderen Tötungsmethoden, wie mit Pentobarbital, auf, sie sind in der Regel jedoch nicht so stark ausgeprägt und nicht so häufig (Fawell et al., 1972; Fiolna, 1986; Iwarsson und Reh binder, 1993; Danneman et al., 1997). Zum einen ist eine gewisse Mindestwirkzeit von CO₂ nötig, um Ödeme jeglicher Art zu verursachen und es ist wahrscheinlich, dass diese Zeitspanne zum Zeitpunkt der CT bei den hier untersuchten Tieren noch nicht erreicht war. Zum anderen können Ödeme eine Folge einer über die CT hinaus geführten Narkose und Folge des Atemstillstandes und Herz-Kreislauf-Versagens in der Agonie sein.

- **Gestaute und gefüllte Venen und Kapillaren**

Bei Mäusen beider Stämme ergab sich der Befund gestauter und gefüllter Venen und Kapillaren bei allen Kontroll- und Behandlungsgruppen. Der Befund sehr stark gefüllter Kapillaren geht fließend in den Befund Einblutungen in die Alveolarsepten über.

4 Diskussion

Hyperämie in den Septenkapillaren und septale Blutungen sind vor allem bei der Tötung mit CO₂ festzustellen, treten aber auch bei anderen Tötungsmethoden, wie Dekapitation, Pentobarbitalinjektion, Chloroform- und Etherexposition, auf (Fiolna, 1986; Messow et al., 1987). Auch Methoxyfluran, ein Inhalationsanästhetikum, führt zu gestauten Lungengefäßen (Feldman und Gupta, 1976). Gestaute Gefäße können Folge des agonalen Herz-Kreislauf-Versagens sein. CO₂ erweitert Arteriolen und Venolen der peripheren Strombahn (Erhardt et al., 1989), was den gehäuften Befund bei CO₂-Exposition erklären könnte.

- **Petechien und Blutungen, Einblutungen in die Alveolarsepten und in den Alveolarraum sowie Gewebeerstörung**

Bei beiden Mausstämmen fanden sich bei allen Tieren sowohl in der Luftkontrollgruppe wie auch in allen Behandlungsgruppen Petechien und Blutungen, die schon mit bloßem Auge auf der dorsalen Lungenoberfläche erkannt werden konnten. Diesem Befund entsprechend waren auch in den Kontroll- und in allen Behandlungsgruppen Einblutungen sowohl in die Alveolarsepten wie auch in die Alveolarräume mikroskopisch festzustellen. Die Petechien und Blutungen waren nicht nur oberflächlich unter der Serosa lokalisiert, sondern reichten in die Tiefe bzw. breiteten sich von dort bis an die Oberfläche aus. Diese Blutungen können zum einen von der Dekapitation und der damit einhergehenden Blutaspilation kommen, sie können aber auch ihren Ursprung in vermehrt gestauten und durchlässigen Kapillaren haben. Der Übergang von extrem gestauten Kapillaren zu Blutübertritt in die Alveolarsepten ist fließend.

Ambrose und Mitarbeiter (2000) sehen einen erhöhten kapillaren Druck in schlecht belüfteten Lungengebieten, hervorgerufen durch ein Ventilations-Perfusions-Ungleichgewicht aufgrund erhöhten CO₂-Gehalten in der Einatemluft, als Ursache für Ödeme mit hoher Kapillardurchlässigkeit oder sogar für Blutungen in das Lungengewebe. Die Beobachtung, dass bei Einblutungen in den Alveolarraum auch in allen Fällen Einblutungen in die Alveolarsepten vorliegen, lässt in unseren Untersuchungen vermuten, dass zumindest ein Teil des Blutes letztlich aus dem Kapillarbett stammt. Da auch die Luftkontrolle betroffen ist, ist es möglich, dass diese Einblutungen auf agonalem Herz-Kreislaufversagen beruhen. Fawell und Mitarbeiter (1972) sprechen von Extravasation von Blut in die Alveolarräume, die bei 10 von 16 Schnitten nach CO₂-Euthanasie und bei 4 von 16 nach Pentobarbitalinjektion festgestellt wurden. Die Autoren führen dies auf das Asphyxietrauma zurück. Blutungen in das alveoläre Septengewebe und disseminierte Blutungen sind vor allem nach CO₂-Euthanasie zu erheben und stehen den Autoren zufolge mit der Hyperämie der Septenkapillaren in Zusammenhang (Fiolna, 1986; Messow et al., 1987). Danneman und Mitarbeiter (1997) fanden perivaskuläre und intraalveoläre Hämorrhagien, die nur nach CO₂-Exposition nicht jedoch nach Pentobarbital-Behandlung auftraten. Des Weiteren stellten sie fest, dass der Schweregrad der Läsionen umgekehrt mit der CO₂-Konzentration korreliert.

Feldman und Gupta (1976) fanden Petechien auf der Lungenoberfläche von Mäusen, Ratten und Meerschweinchen nach CO₂-Euthanasie nicht jedoch nach Überdosierung von Methoxyfluran. Nach Isoflurannarkosen konnten Endothelschäden der Lungengefäße, die klinisch nicht relevant waren und leichte, vorübergehende Erhöhungen der Permeabilität des Alveolarepithels mittels einer Radionuklid-Clearance-Methode ermittelt werden (Sun et al., 2000; Hung et al., 2003). Diese Veränderungen wären in einer mikroskopischen Untersuchung jedoch nicht zu erkennen gewesen.

In unseren Untersuchungen sind Blutaspiration nach Dekapitation und agonales Herz-Kreislaufversagen Ursachen für Petechien und Blutungen und für Blutungen in die Alveolarsepten und Alveolarräume.

4.6.3 Vierte Bewertung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in vorliegender Arbeit die Ergebnisse der makroskopischen und mikroskopischen Untersuchung nicht geeignet sind, mit Sicherheit auf eine Belastung und deren Ausmaß während der Narkosegasexposition bis zum Erreichen der CT zu schließen. Es finden sich bei den makroskopischen Befunden keine Unterschiede zwischen Narkosegas- und Kontrollgruppen. Bei den mikroskopischen sowie bei den morphometrisch erhobenen Befunden lässt sich auch kein Muster erkennen, das auf Unterschiede zwischen den Behandlungen hinweisen könnte. Die Zeit bis zum Erreichen der CT war wahrscheinlich zu kurz um Läsionen und Veränderungen des Atemsystems auszulösen. Es ist anzunehmen, dass die erhobenen Befunde alleinig der Dekapitation und des agonalen Herz-Kreislauf-Versagens geschuldet sind. Der einzige auffällige Befund ist die mikroskopisch festgestellte Atelektase nach Exposition mit CO₂. Dieser lässt sich jedoch als Absorptionatelektase erklären und trat wahrscheinlich nicht *in vivo* auf.

4.7 Arbeitssicherheit

Der hier verwendete Versuchsaufbau ist nicht für den Routineeinsatz geeignet. Die bei Isofluran und Sevofluran eingesetzten hohen Einfüllraten von 10l/min und hohen Narkosegaskonzentrationen waren zwar gut, um eine schnelle Narkoseinduktion zu gewährleisten, aber sie beeinträchtigten die Arbeitssicherheit. Die Narkosebox war nicht hermetisch dicht, für die Testung des Zwischenzehenreflexes und die Entnahme des Tieres musste sie geöffnet werden. Das Tragen einer dicht schließenden Atemschutzmaske mit Aktiv-Kohle-Filter und das Sicherstellen einer guten Raumlüftung (interne Lüftung und offenes Fenster zwischen den Durchgängen) sowie eine zeitliche Begrenzung der Narkosegasexposition pro Woche waren unabdingbar. Lösungen dieser Probleme sind z. B. eine aktive Absaugung der Narkosegase in der Narkosekammer, eine Tischabsaugung (gelöcherte Tischplatte mit Absaugung darunter) oder ein komplettes Arbeiten unter einem Abzug. Zusätzliche Maßnahmen wären die Verwendung einer Narkosekammer mit geringerem Volumen und ein dichter Deckelverschluss z. B. mit Klemmverschluss.

5 Schlussfolgerung

Die am weitesten verbreitete Methode zur Labornagereuthanasie ist der Einsatz von CO₂ mit niedrigen bis hohen Einfüllraten, vereinzelt werden auch vorgefüllte Narkosekammern verwendet. Wie in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte, ist die Verwendung von CO₂ mit Belastungen für das Tier verbunden.

Das Einatmen von CO₂ erzeugt eine Narkose, die fortgesetzt zum Tod führt. Die CO₂-Inhalation ist mit einer starken Absenkung des pH-Wertes des Blutes und folgend mit einer Absenkung des pH-Wertes der Cerebrospinalflüssigkeit und des Hirngewebes verbunden. Diese drastische Änderung des inneren Milieus hat verschiedene Reaktionen des Organismus zur Folge. Ist das Tier zu Coping fähig, so kann der Organismus durch unterschiedliche Verhaltens- und Kompensationsmechanismen, z. B. Meiden der CO₂-Atmosphäre, Abatmen des überschüssigen CO₂ und weitere Puffersysteme des Blutes und der Zellen, das Säuren-Basen-Gleichgewicht wieder herstellen. Gemäß der Stressdefinition kann man dann noch nicht von Stress sprechen. Scheitern diese Anpassungsprozesse jedoch, wie dies bei der Narkoseeinleitung zur Euthanasie mit CO₂ der Fall ist, da kein Verlassen möglich ist und kontinuierliches Einatmen von CO₂ mit steigender Konzentration sowie eine Erschöpfung der Puffersysteme mit Folge einer hyperkapnischen Azidose vorliegen, so muss man von einer erheblichen Belastung und Distress für das Tier ausgehen. Diese Anpassungsprozesse werden über das Gehirn vermittelt: spezialisierte Neurone nehmen CO₂-Konzentrationen, die nur etwas oberhalb der atmosphärischen Konzentration liegen, wahr und dienen als Frühwarnsystem, zentrale CO₂-Chemosensoren lösen schon bei subanästhetischen CO₂-Konzentrationen eine Panik-/Angstreaktion aus, eine Aktivierung von CO₂-Chemosensoren im Atemzentrum erhöht das Atemminutenvolumen. Ein erhöhter CO₂-Partialdruck ist für die unangenehme Empfindung Dyspnoe verantwortlich, die von Gehirnregionen verarbeitet wird, die auch auf weitere negative Empfindungen wie Schmerz und Übelkeit reagieren. Höhere CO₂-Konzentrationen können das nozizeptive System reizen. Gleichzeitig wird das sympathoadrenerge System aktiviert. Folgerichtig konnten wir auch in unseren Untersuchungen erhöhte Adrenalin- und NoradrenalinKonzentrationen im Plasma messen.

Dem entgegengesetzt ist der Einsatz von Inhalationsanästhetika, wie Isofluran und Sevofluran, zur Narkose- und Tötungseinleitung mit weniger Belastungen für Labormäuse verbunden. Der Säuren-Basen-Haushalt wird geringfügiger gestört und es wird eine geringere Stressreaktion, die hier ebenfalls an den Katecholaminkonzentrationen im Plasma gemessen wurde, ausgelöst. Inhalationsanästhetika verursachen keine Schmerzen oder Dyspnoe. Jedoch können sie auch konzentrationsabhängig schleimhautreizierend und

5 Schlussfolgerung

aversiv wirken. Allerdings tolerieren Mäuse Isofluran- und Sevofluranatmosphären länger und bis zu einem tieferen Narkosestadium als eine CO₂-Umgebung.

Die in vorliegender Arbeit bei Mäusen nach CO₂-Exposition gemessenen Adrenalin- und Noradrenalinwerte demonstrieren die Stressreaktion. Eindeutige stress- oder schmerzanzeigende Verhaltensweisen während der Narkoseeinleitung konnten in unserer Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Die Änderung des Verhaltens unter Narkosegasexposition im Vergleich zu Luftstromexposition ließ sich größtenteils mit der narkotischen Wirkung der Gase erklären. Die unter Inhalationsanästhetika vermehrt auftretenden Verhaltensweisen Ataxie, Rearings, Running Excitement und Konvulsionen, besonders bei einer langsamen Anflutung des Anästhetikums, werden häufig und fälschlicherweise als Agitationen und Distress gedeutet. Sie sind jedoch der Exzitationsphase der Narkoseeinleitung zuzuordnen und werden von den Tieren nur eingeschränkt wahrgenommen. Dahingegen ist die Narkoseeinleitung durch CO₂ scheinbar in vielen Fällen sanfter und ruhiger aufgrund kürzerer Ataxiezeiten, weniger Rearings und weniger exzitatorische Phänomene sowie aufgrund eines hypotonen Gangbildes. Dieser äußere Schein darf nicht über die Folgen einer massiven Änderung des inneren Milieus, wie Azidose, erhöhter CO₂-Partialdruck, Reizung von zentralen Chemosensoren, Anstieg von Adrenalin und Noradrenalin im Plasma und damit einhergehender Dyspnoe, Aversion, Angst und Panik, wie sie in der Literatur beschrieben und durch eigenen Befunde ergänzt wurden, hinwegtäuschen. Eindeutig der Narkosegaswirkung geschuldete pathologische Veränderungen des Atemsystems, die schon *in vivo* vorlagen, konnten nicht festgestellt werden.

Mit den bisher empfohlenen niedrigen CO₂-Einfüllraten von 20 KV%/min waren von unseren Mäusen einzelne Tiere nach 300 s noch bei Bewusstsein und einzelne Tiere zeigten spontane Vorwärtsbewegungen. Die dabei herrschenden CO₂-Konzentrationen sind bereits in der Lage, Chemo- und Nozizeptoren zu reizen.

Die niedrigen Konzentrationen von den Inhalationsanästhetika, wie 2% Isofluran und 4,8% Sevofluran bei NMRI- und C57Bl/6-Mäusen, sehen wir ebenfalls nicht als geeignet. Gleiches gilt für die hohe Konzentration von 8% Sevofluran bei NMRI-Mäusen. Wider Erwarten war Sevofluran weniger wirksam als Isofluran.

Bei beiden Mausstämmen induzierte die hohe CO₂-Einfüllrate von 100 KV%/min zwar am schnellsten eine tiefe Narkose, jedoch ist sie auch von höchsten Konzentrationen der Stresshormone begleitet. 5% Isofluran und CO₂ mit 60 KV%/min erzeugten gleich schnell die chirurgische Toleranz. Aus unserer Sicht ist 5% Isofluran besser zur Narkose- und

Tötungseinleitung bei NMRI- und C57Bl/6-Mäusen geeignet als CO₂ mit einer Einfüllrate von 60 KV%/min, da sie beide zwar gleich schnell eine tiefe Narkose erzeugten, bei Isofluran-Exposition jedoch geringere Stresshormonkonzentrationen gemessen wurden.

Der zeitliche Unterschied bis zum Erreichen der chirurgischen Toleranz zwischen der schnellsten CO₂-Exposition mit 100 KV%/min und der Exposition mit 5% Isofluran beträgt 36,5 s bei NMRI-Mäusen bzw. 31,5 s bei C57BL/6-Mäusen. Dabei konnten wir unter CO₂-Exposition mit 100 KV%/min einen ca. 10-fach höheren Anstieg der Stresshormone im Vergleich zur Exposition mit 5% Isofluran feststellen. Ob 5% Isofluran akzeptabler ist als CO₂ mit einer Einfüllrate von 100 KV%/min kann mit dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. Auf der einen Seite soll der Bewusstseinsverlust durch die Tötungsmethode schnell erfolgen (Bundesamt für Veterinärwesen, 1993; AVMA, 2007). Auf der anderen Seite lässt es sich nicht ohne eine gründliche ethische Diskussion entscheiden, ob eine langsamere, jedoch mit geringerer Maximalbelastung verbundene Methode (wie 5% Isofluran) besser als eine schnellere mit größerer Maximalbelastung verbundene Methode (wie CO₂ mit 100KV%/min) ist. Eine endgültige Bewertung der Methoden sollte gemeinsam nach Diskussion mit Ethikern und Wissenschaftlern, die Tierversuche durchführen, erfolgen.

Unsere Ergebnisse, die wir durch Untersuchungen an zwei Mausstämmen erhoben haben, weisen deutlich darauf hin, dass Stammesunterschiede eine große Rolle spielen und bei der Wahl des Narkosegases und bei der einzusetzenden Konzentration beachtet werden müssen. Auch sind sie bei der Bewertung der Belastung der Tiere und damit der Tierschutzgerechtigkeit zu berücksichtigen.

Eine ideale Tötungsmethode, die sowohl dem Tier als auch dem Anwender vollends gerecht wird, gibt es bisher nicht. Die Tierversuchsrichtlinie erlaubt zwar den Einsatz von CO₂ zur Tötung von Labormäusen, jedoch wurde mit dieser Arbeit gezeigt, dass die CO₂-Exposition bis zum Erreichen der chirurgischen Toleranz mit erhöhten Plasmakonzentrationen der Stresshormone Adrenalin- und Noradrenalin im Plasma einhergeht.

Im Hinblick auf unsere Ergebnisse, die im Kontext mit der Literatur zu betrachten sind, wie auch aus Sicht des Tierschutzes ist 5% Isofluran besser zur Narkose- und Tötungseinleitung geeignet als CO₂ mit Einfüllraten von 20 und 60 KV%/min.

Dies bedeutet jedoch keinen vollständigen Verzicht auf CO₂. Die Narkoseeinleitung mit Isofluran und anschließende Tötung mit CO₂ der sicher bewusstlosen Mäusen, wie sie schon seit 2010 in Kanada befürwortet wird (EFSA, 2004; Charbonneau et al., 2010) und auch von der EFSA im „Gutachten des Wissenschaftlichen Gremiums für Tiergesundheit und Tierschutz auf Ersuchen der Kommission zur Biologie und zum Wohlergehen von Tieren, die für Versuchszwecke und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden“

5 Schlussfolgerung

vorgeschlagen wird, stellt zum jetzigen Zeitpunkt eine gute Alternative zur alleinigen Anwendung von CO₂ dar. Genaue Dosierungen und Applikationsformen der Inhalationsanästhetika, die dem Tierschutz und dem Arbeitsschutz gerecht werden, werden Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

6 Zusammenfassung

Vergleich der Belastungen durch Kohlendioxid (CO₂), Isofluran und Sevofluran in der Phase der Narkoseeinleitung bei Mäusen – ein Beitrag zum Refinement von Tierversuchen

Kohlendioxid (CO₂) wird weitverbreitet für die Tötung von Labormäusen verwendet, jedoch ist der Einsatz aus Sicht des Tierschutzes umstritten. Inhalationsanästhetika werden als Alternativen vorgeschlagen, doch sind sie bisher nicht ausreichend untersucht worden.

Ziel dieser Arbeit war es, umfassend die Einleitung der Tötung mittels CO₂ (100% CO₂ mit 20, 60 und 100% des Kammervolumens pro Minute (KV%/min)) sowie Isofluran (2% und 5% Isofluran mit 71 KV%/min) und Sevofluran (4,8% und 8% Sevofluran mit 71 KV%/min) hinsichtlich ihrer Stressbelastung bei NMRI- und C57Bl/6-Mäusen untereinander vergleichend bzw. gegen einen reinen Luftstrom (71 KV%/min) zu untersuchen. Dabei sollten die Wirksamkeit und Zuverlässigkeit der Narkosegasbehandlung, der zeitliche Verlauf der einzelnen Phasen der Narkoseeinleitung, das Verhalten einschließlich Vokalisationen, die Adrenalin- und Noradrenalin-Konzentrationen im Plasma, die Glukosekonzentration im Blut sowie die Auswirkungen der Gase auf die Atembewegungen und auf die Gewebe des Atemtraktes beurteilt werden. Der Untersuchungszeitraum war von Beginn der Gasexposition bis zum Erreichen der chirurgischen Toleranz bzw. bis maximal 300 s. Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet und Blut- und Gewebeproben gewonnen.

Bei beiden Mausstämmen führten nur die CO₂-Behandlungen mit 60 und 100 KV%/min und die Behandlung mit 5% Isofluran sowie die Behandlung mit 8% Sevofluran bei NMRI-Mäusen zum Erreichen der chirurgischen Toleranz innerhalb von 300 s bei mindestens 93,8% der Tiere einer Gruppe und galten somit als wirksam und zuverlässig. Die Narkoseeinleitung konnte bei allen Gasen in eine normale Phase, eine Phase der Ataxie, der Muskelrelaxation und der Bewusstlosigkeit bis zum Einsetzen der chirurgischen Toleranz unterteilt werden. Die CO₂-Behandlung mit 100 KV%/min erzeugte am schnellsten die chirurgische Toleranz. Die CO₂-Behandlung mit 60 KV%/min und die Behandlung mit 5% Isofluran unterschieden sich nicht hinsichtlich der Zeit bis zum Erreichen der chirurgischen Toleranz. Adrenalin- und Noradrenalin-Konzentrationen waren bei den wirksamen und zuverlässigen CO₂-Behandlungen ca. 10-fach erhöht im Vergleich zu den Isofluran- und Sevofluran-Gruppen. Die Glukosekonzentrationen der C57Bl/6-Mäuse lagen bei den Isofluran- und Sevofluran-Gruppen teilweise höher als bei den mit CO₂ behandelten Gruppen, bei den NMRI-Mäusen wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Es konnte kein eindeutiges stress- oder schmerzanzeigendes Verhalten gefunden werden, alle Änderungen in Bezug auf das normale Verhalten unter Luftstromexposition (Ataxie, hypotoner Gang,

6 Zusammenfassung

Vorwärtsbewegung, Rearings, Putzverhalten, Exzitationen) konnten größtenteils auf die narkotische Wirkung der Gase zurückgeführt werden. Vokalisationen konnten weder im hörbaren noch im Ultraschallbereich festgestellt werden. Die Atembewegungen wurden durch alle Narkosegasbehandlungen beeinflusst. Alle makroskopischen und mikroskopischen Befunde, außer der Atelektase, waren sowohl in allen Behandlungsgruppen wie auch in der Luftkontrollgruppe zu erheben. Sie konnten nicht eindeutig auf die Wirkung der Narkosegase zurückgeführt werden, sondern sind der Dekapitation bzw. agonalem Herz-Kreislaufversagen geschuldet.

In Verbindung mit der Literatur ließ sich die Stressreaktion unter CO₂-Exposition, die sich in erhöhten Adrenalin- und NoradrenalinKonzentrationen widerspiegelte, mit den massiven physiologischen Änderungen, wie hyperkapnische Azidose, Dyspnoe, Aversions- und Angstverhalten, die durch die Inhalation von CO₂ hervorgerufen wurden, erklären. Augenscheinlich wirkte die Narkoseeinleitung mit CO₂ meistens sanft und friedlich auf den Beobachter, jedoch sollten hypotoner Gang, verminderte Vorwärtsbewegung und verminderte Rearings nicht über die tatsächliche (innere) Stressreaktion hinwegtäuschen.

Stammesunterschiede müssen bei der Wahl des Narkosegases und der Konzentration beachtet werden.

Im Hinblick auf unsere Ergebnisse ist 5% Isofluran mit einer Einfüllrate von 71KV%/min besser bei NMRI- und C57Bl/6-Mäusen zur Narkose- und Tötungseinleitung geeignet als CO₂ mit Einfüllraten von 20 und 60 KV%/min. Ausreichende Maßnahmen, die den Arbeitsschutz sicherstellen, müssen dabei gewährleistet sein. Genaue Dosierungen und Darreichungsformen der Inhalationsanästhetika, die tier- und arbeitsschutzkonform sind, werden Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

7 Summary

Comparison of stress reactions induced by carbon dioxide (CO₂), isoflurane and sevoflurane during the phase of induction of narcosis in mice - a contribution to the refinement of animal research

Carbon dioxide (CO₂) is commonly used to euthanize laboratory mice but it is controversially discussed from an animal welfare's point of view. Inhalent anaesthetics are proposed as an alternative but they have not been fully characterized yet.

The aim of this study was the comprehensive investigation of the induction of euthanasia with CO₂ (100% CO₂ with filling rates of 20, 60 and 100% of chamber volume per minute (KV%/min)) as well as with isoflurane (2% and 5% isoflurane with 71 KV%/min) and sevoflurane (4.8% and 8% sevoflurane with 71 KV%/min) in NMRI and C57Bl/6 mice. We compared stress reactions between the groups or in comparison to an air stream (71 KV%/min). We evaluated the effectiveness and reliability of the narcotic gas treatment, the time course of the phases of induction of narcosis, behaviour inclusive vocalisations, plasma adrenaline and noradrenaline concentrations, blood glucose concentrations as well as the effects of the gases on respiratory movements and on tissues of the respiratory tract. The period of investigation was from start of the gas exposure until surgical tolerance was reached or after maximum 300 s. Mice were decapitated and blood and tissue samples were collected.

In both strains only the CO₂ treatments with 60 and 100 KV%/min and the treatments with 5% isoflurane as well as the treatment with 8% sevoflurane in NMRI mice induced surgical tolerance within 300 s in at least 93,8% of animals of a group and were considered as effective and reliable. The induction of narcosis can be divided into a normal phase, a phase of ataxia, of muscle relaxation and of loss of consciousness until the onset of surgical tolerance. CO₂ with 100 KV%/min was the fastest treatment to induce surgical tolerance. The CO₂ treatment with 60 KV%/min did not differ from the treatment with 5% isoflurane in regard to time to reach surgical tolerance. Plasma adrenaline and noradrenaline concentrations of the effective CO₂ treated groups were ca. 10-fold higher than the concentrations of isoflurane and sevoflurane treated groups. In C57Bl/6 mice, blood glucose concentrations were partly higher in isoflurane and sevoflurane treated groups than in CO₂ treated groups. In NMRI mice, we could not detect any differences between the groups. We could not find distinct stress or pain indicating behaviour, all changes in behaviour in relation to normal behaviour under air stream exposure (e.g. ataxia, hypotonic gait, forward movement, rearings, grooming, excitatory phenomena) could mainly be explained by the narcotic properties of the gases. We could not detect any vocalizations in the audible nor in the ultrasound range.

7 Summary

Respiratory movements were influenced by all narcotic gases. Except atelectasis, all macroscopic and microscopic pathological findings were detected in all treatment groups as well as in the air control group. They could not clearly be ascribed to as effects of the narcotic gas treatment but are rather due to decapitation or cardiac and circulatory failure in agony.

Regarded in context with the reviewed literature the stress reaction under CO₂ exposure, which is reflected by elevated adrenaline and noradrenaline concentrations in plasma, could be explained by the massive physiological changes (as hypercapnic acidosis, dyspnea, aversion and fear behaviour) that are produced by the inhalation of CO₂. Viewed from the outside, the induction of narcosis with CO₂ mostly seemed to look nice and peaceful yet hypotonic gait, reduced forward movements and reduced rearings should not deceive the real (inner) stress reaction.

Strain differences need to be considered when choosing a narcotic gas and gas concentration.

In regard to our results, 5% isoflurane with 71 KV%/min is better than CO₂ with 20 and 60 KV%/min for the induction of narcosis or euthanasia in NMRI- and C57Bl/6-mice. Occupational safety needs to be ensured. Exact doses and modes of application of inhalant anaesthetics which are compliant with animal welfare and occupational safety need to be investigated in the future.

8 Zitierte Literatur

8.1 Wissenschaftliche Literatur

Adams HA, Hempelmann G. 1991.

[The endocrine stress reaction in anesthesia and surgery - origin and significance].
AINS - Anästhesiologie · Intensivmedizin · Notfallmedizin · Schmerztherapie. 26(6):
294-305.

Adroque HJ, Madias NE. 1981.

Changes in plasma potassium concentration during acute acid-base disturbances.
American Journal of Medicine. 71(3): 456-67.

Adroque HJ, Madias NE. 1998.

Medical progress: management of life-threatening acid-base disorders: first of two
parts.
The New England Journal of Medicine. 338(1): 26-34.

Akk G, Mennerick S, Steinbach JH. 2008.

Actions of anesthetics on excitatory transmitter-gated channels.
in: Modern Anesthetics. Handbook of Experimental Pharmacology 182. Hrsg.
Schüttler J, Schwilden H. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.

Altholtz LY, Fowler KA, Badura LL, Kovacs MS. 2006.

Comparison of the stress response in rats to repeated isoflurane or CO₂:O₂
anesthesia used for restraint during serial blood collection via the jugular vein.
Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 45(3): 17-22.

Ambrose N, Wadham J, Morton D. 2000.

Refinement of euthanasia.
in: Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation.
Hrsg. Balls M, van Zeller A-M, Halder ME. Elsevier Science B. V.

Angus DW, Baker JA, Mason R, Martin IJ. 2007.

The potential influence of CO₂, as an agent for euthanasia, on the pharmacokinetics
of basic compounds in rodents.
Drug Metabolism and Disposition. 36(2): 375-9.

Antognini JF, Carstens E. 2002.

In vivo characterization of clinical anaesthesia and its components.
British Journal of Anaesthesia. 89(1): 156-66.

Anton F, Euchner I, Handwerker HO. 1992.

Psychophysical examination of pain induced by defined CO₂ pulses applied to the
nasal mucosa.
Pain. 49(1): 53-60.

Archer DP, Roth SH. 2007.

Low concentrations of pentobarbital enhance excitability of rat hippocampal neurons.
Anesthesia & Analgesia. 105(4): 993-7.

Arnold M, Langhans W. 2010.

Effects of anesthesia and blood sampling techniques on plasma metabolites and
corticosterone in the rat.
Physiology & Behaviour. 99(5): 592-8.

Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rulicke T. 2001.

Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth.
Comparative Medicine. 51(5): 443-56.

Arthwohl J, Brown P, Corning B, Stein S. 2006.

Report of the ACLAM task force on rodent euthanasia.
Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 45(1) 98-105.

AVMA. 2007.

AVMA guidelines on euthanasia.
American Veterinary Medical Association. Letzter Zugriff im Februar 2013.
<https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>

Ayers P, Dixon C. 2012.

Simple acid-base tutorial.
Journal of Parenteral and Enteral Nutrition. 36(1): 18-23.

Bailey JE, Argyropoulos SV, Lightman SL, Nutt DJ. 2003.

Does the brain noradrenaline network mediate the effects of the CO₂ challenge?
Journal of Psychopharmacology. 17(3): 252-9.

Bailey JE, Nutt DJ. 2008.

GABA_A receptors and the response to CO₂ inhalation - A translational trans-species model of anxiety?
Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 90(1): 51-7.

Banzett RB, Moosavi SH. 2001.

Dyspea and pain: similarities and contrasts between two very unpleasant sensations.
APS Bulletin. 11(1).

Banzett RB, Mulnier HE, Murphy K, Rosen SD, Wise RJ, Adams L. 2000.

Breathlessness in humans activates insular cortex.
Neuroreport. 11(10): 2117-20.

Banzett RB, Pedersen SH, Schwartzstein RM, Lansing RW. 2008.

The affective dimension of laboratory dyspnea: air hunger is more unpleasant than work/effort.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 177(12): 1384-90.

Baum VC, Yemen TA, Baum LD. 1997.

Immediate 8% sevoflurane induction in children: a comparison with incremental sevoflurane and incremental halothane.
Anesthesia & Analgesia. 85(2): 313-6.

Baumans V. 2004.

Use of animals in experimental research: an ethical dilemma?
Gene Therapy. 11(supplement 1): 64-6.

Baxter PJ, Kapila M, Mfonfu D. 1989.

Lake Nyos disaster, Cameroon, 1986: the medical effects of large scale emission of carbon dioxide?
British Medical Journal (Clinical research edition). 298(6685): 1437-41.

Bialik RJ, Smythe JW, Roberts DC. 1988.

Alpha 2-adrenergic receptors mediate the increase in blood glucose levels induced by epinephrine and brief footshock stress.
Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry. 12(2-3): 307-14.

Bialik RJ, Smythe JW, Sardelis M, Roberts DC. 1989.

Adrenal demedullation blocks and brain norepinephrine depletion potentiates the hyperglycemic response to a variety of stressors.
Brain Research. 502(1): 88-98.

Binder R. 2009.

Die "Schadenseite": Zur Erfassung der Belastungen von Versuchstieren.
in: Der ethisch vertretbare Tierversuch, Kriterien und Grenzen. Hrsg. Borchers D, Luy J. Mentis Verlag. Paderborn.

Blackshaw JK, Fenwick DC, Beattie AW, Allan DJ. 1988.

The behaviour of chickens, mice and rats during euthanasia with chloroform, carbon dioxide and ether.
Laboratory Animals. 22(1): 67-75.

BMELV. 2012.

Versuchstierzahlen 2011.
Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. Letzter Zugriff im Februar 2013.
<http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Tier/Tierschutz/2011-TierversuchszahlenGesamt.pdf>

Borsini F, Lecci A, Volterra G, Meli A. 1989.

A model to measure anticipatory anxiety in mice?
Psychopharmacology. 98(2): 207-11.

Bovill J. 2008.

Inhalation anaesthesia: from diethyl ether to xenon.
in: Modern Anesthetics. Handbook of Experimental Pharmacology 182. Hrsg. Schüttler J, Schwilden H. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.

Brofman JD, Leff AR, Munoz NM, Kirchhoff C, White SR. 1990.

Sympathetic secretory response to hypercapnic acidosis in swine.
Journal of Applied Physiology. 69(2): 710-7.

Broom DM. 1991.

Animal welfare: concepts and measurement.
Journal of Animal Science. 69(10): 4167-75.

Broom DM. 2011.

A History of animal welfare science.
Acta Biotheoretica. 59(2): 121-37.

Brosnan RJ, Pham TL. 2008.

Carbon dioxide negatively modulates N-methyl-D-aspartate receptors.
British Journal of Anaesthesia. 101(5): 673-9.

Buchanan GF, Richerson GB. 2010.

Central serotonin neurons are required for arousal to CO₂.
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 107(37): 16354-9.

Burget GE, Visscher MB. 1927.

Variations of pH of blood and the response of the vascular system to adrenalin.
American Journal of Physiology. 81(1): 113-23.

Burkholder TH, Niel L, Weed JL, Brinster LR, Bacher JD, Foltz CJ. 2010.

Comparison of carbon dioxide and argon euthanasia: effects on behavior, heart rate, and respiratory lesions in rats.
Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 49(4): 448-53.

Buxton DW. 1911.

The surgical requirements of narcosis and the available methods.
The British Medical Journal. 2(2653): 1145-50.

Cartner SC, Barlow SC, Ness TJ. 2007.

Loss of cortical function in mice after decapitation, cervical dislocation, potassium chloride injection, and CO₂ inhalation.
Comparative Medicine. 57(6): 570-3.

CCAC. 1993.

Euthanasia.
in: Guide to the care and use of experimental animals. Hrsg. Olfert E, Cross B, McWilliam A. Canadian Council on Animal Care. Ottawa. Letzter Zugriff im Februar 2013.
http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Experimental_Animals_Vol1.pdf

Cesarovic N, Nicholls F, Rettich A, Kronen P, Hassig M, Jirkof P, Arras M. 2010.

Isoflurane and sevoflurane provide equally effective anaesthesia in laboratory mice.
Laboratory Animals. 44(4): 329-36.

Charbonneau R, Niel L, Olfert E, von Kayserlingk M, Griffin G. 2010.

CCAC guidelines on: euthanasia of animals used in science.
Canadian Council on Animal Care. Ottawa. Letzter Zugriff im Januar 2013.
<http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Euthanasia.pdf>

Chernov MM, Erlichman JS, Leiter JC. 2010.

Ionic mechanisms of central CO₂ chemosensitivity.
Respiratory Physiology & Neurobiology. 173(3): 298-304.

Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C. 1996.

Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission.
Laboratory Animals. 30(4): 293-316.

Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C. 1997.

Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission.
Laboratory Animals. 31(1): 1-32.

Coenen AM, Drinkenburg WH, Hoenderken R, van Luijckelaar EL. 1995.

Carbon dioxide euthanasia in rats: oxygen supplementation minimizes signs of agitation and asphyxia.
Laboratory Animals. 29(3): 262-8.

- Colasanti A, Esquivel G, Schruers KJ, Griez EJ. 2012.**
On the psychotropic effects of carbon dioxide.
Current Pharmaceutical Design. 18(35):5627-37.
- Conlee KM, Stephens ML, Rowan AN, King LA. 2005.**
Carbon dioxide for euthanasia: concerns regarding pain and distress, with special reference to mice and rats.
Laboratory Animals. 39(2): 137-61.
- Corbach S. 2006.**
Untersuchung der CO₂-Euthanasie bei Labormäusen auf Tierschutzgerechtigkeit.
Dissertationsschrift. Tierärztliche Hochschule Hannover. Hannover.
- Corcoran AE, Hodges MR, Wu Y, Wang W, Wylie CJ, Deneris ES, Richerson GB. 2009.**
Medullary serotonin neurons and central CO₂ chemoreception.
Respiratory Physiology & Neurobiology. 168(1-2): 49-58.
- Cregg N, Wall C, Green D, Mannion D, Casey W. 1996.**
Humidification reduces coughing and breath-holding during inhalation induction with isoflurane in children.
Canadian Journal of Anaesthesia. 43(11): 1090-4.
- Crozier TA, Morawietz A, Drobnik L, Rieke H, Sydow M, Radke J, Kettler D. 1992.**
The influence of isoflurane on peri-operative endocrine and metabolic stress responses.
European Journal of Anaesthesiology. 9(1): 55-62.
- Dandie G. 2006.**
Report of the International Consensus Meeting on Carbon Dioxide Euthanasia of Laboratory Animals.
ANZCCART News. 19(2): 1-7.
- Danneman PJ, Stein S, Walshaw SO. 1997.**
Humane and practical implications of using carbon dioxide mixed with oxygen for anesthesia or euthanasia of rats.
Laboratory Animal Science. 47(4): 376-85.
- de Jong RH, Eger EII. 1975.**
MAC expanded: AD₅₀ and AD₉₅ values of common inhalation anesthetics in man.
Anesthesiology. 42(4): 384-9.
- Deckardt K, Weber I, Kaspers U, Hellwig J, Tennekes H, van Ravenzwaay B. 2007.**
The effects of inhalation anaesthetics on common clinical pathology parameters in laboratory rats.
Food and Chemical Toxicology. 45(9): 1709-18.
- Dohle CI, Richerson GB. 2010.**
5-HT neurons and central CO₂ chemoreception.
in: Handbook of Behavioral Neurobiology of Serotonin. Hrsg. Müller C, Jacobs B. Elsevier B. V.
- Doi M, Ikeda K. 1987.**
Respiratory effects of sevoflurane.
Anesthesia & Analgesia. 66(3): 241-44.

8 Zitierte Literatur

Doi M, Ikeda K. 1993.

Airway irritation produced by volatile anaesthetics during brief inhalation: comparison of halothane, enflurane, isoflurane and sevoflurane.
Canadian Journal of Anaesthesiology. 40(2): 122-6.

Donovan LM, Moore MW, Gillombardo CB, Chai S, Strohl KP. 2011.

Effects of hydrogen sulfide synthesis inhibitors on posthypoxic ventilatory behavior in the C57BL/6J mouse.
Respiration. 82(6): 522-9.

Duffin J. 2010.

The role of the central chemoreceptors: a modeling perspective.
Respiratory Physiology & Neurobiology. 173(3): 230-43.

Dunford JV, Lucas J, Vent N, Clark RF, Cantrell FL. 2009.

Asphyxiation due to dry ice in a walk-in freezer.
Journal of Emergency Medicine. 36(4): 353-6.

Eger EI, 2nd. 1981.

Isoflurane: a review.
Anesthesiology. 55(5): 559-76.

Eigler N, Saccà L, Sherwin RS. 1979.

Synergistic interactions of physiologic increments of glucagon, epinephrine, and cortisol in the dog: a model for stress-induced hyperglycemia.
The Journal of Clinical Investigation. 63(1): 114-23.

Erhardt W, Ring C, Kraft H, Schmid H, Weinmann HM, Ebert R, Schläger B, Schindele M, Heinze R, Lomholt N, Kallweit E, Henning M, Unshelm J, Berner H, Blümel G. 1989.

Die CO₂-Betäubung von Schlachtschweinen aus anästhesiologischer Sicht.
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift. 96(3): 92-6.

Evans KC, Banzett RB, Adams L, McKay L, Frackowiak RS, Corfield DR. 2002.

BOLD fMRI identifies limbic, paralimbic, and cerebellar activation during air hunger.
Journal of Neurophysiology. 88(3): 1500-11.

Fawell JK, Thomson C, Cooke L. 1972.

Respiratory artefact produced by carbon dioxide and pentobarbitone sodium euthanasia in rats.
Laboratory Animals. 6(3): 321-6.

FELASA. 1994.

Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Pain and Distress accepted by the FELASA Board of Management November 1992.
Laboratory Animals. 28(2): 97-112.

Feldman DB, Gupta BN. 1976.

Histopathologic changes in laboratory animals resulting from various methods of euthanasia.
Laboratory Animal Science. 26(2): 218-21.

Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. 2003.

Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity.
Annual Review of Neuroscience. 26: 239-66.

Fenwick DC, Blackshaw JK. 1989.

Carbon dioxide as a short-term restraint anaesthetic in rats with subclinical respiratory disease.
Laboratory Animals. 23(3): 220-8.

Finlay CG, Forsyth JP. 2009.

Context and renewal of conditioned fear: an experimental evaluation using 20% carbon dioxide-enriched air as an unconditioned stimulus.
Journal of Anxiety Disorders. 23(6): 737-45.

Fiolna A. 1986.

Morphologische Veränderungen der Lungen von Ratten bei der Tötung.
Dissertationsschrift. Tierärztliche Hochschule Hannover. Hannover.

Fitzner Toft M, Petersen MH, Dragsted N, Hansen AK. 2006.

The impact of different blood sampling methods on laboratory rats under different types of anaesthesia.
Laboratory Animals. 40(3): 261-74.

Flecknell P. 2009a.

Anaesthesia.
in: Laboratory Animal Anaesthesia. 3. Aufl. Hrsg. Flecknell P. Academic Press, Elsevier. London.

Flecknell P. 2009b.

Anaesthetic Management.
in: Laboratory Animal Anaesthesia. 3. Aufl. Hrsg. Flecknell P. Academic Press, Elsevier. London.

Flecknell PA, Roughan JV, Hedenqvist P. 1999.

Induction of anaesthesia with sevoflurane and isoflurane in the rabbit.
Laboratory Animals. 33(1): 41-6.

Fomby LM, Wheat TM, Hatter DE, Tuttle RL, Black CA. 2004.

Use of CO₂/O₂ anesthesia in the collection of samples for serum corticosterone analysis from Fischer 344 rats.
Contemporary Topics in Laboratory Animal Science. 43(2): 8-12.

Forslid A, Ingvar M, Rosen I, Ingvar DH. 1986.

Carbon dioxide narcosis: influence of short-term high concentration carbon dioxide inhalation on EEG and cortical evoked responses in the rat.
Acta Physiologica Scandinavica. 127(3): 281-7.

Forster N. 2008.

Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt.
in: NeuroIntensiv. Hrsg. Schwab S, Schellinger P, Werner C, Unterberg A, Hacke W. Springer Medizin Verlag. Heidelberg.

Fourcade HE, Stevens WC, Larson CP Jr., Cromwell TH, Bahlman SH, Hickey RF, Halsey MJ, Eger EI. 1971.

The ventilatory effects of Forane, a new inhaled anesthetic.
Anesthesiology. 35(1): 26-31.

8 Zitierte Literatur

Fowler JS, Brown JS, Flower EW. 1980.

Comparison between ether and carbon dioxide anaesthesia for removal of small blood samples from rats.
Laboratory Animals. 14(3): 275-8.

Franks NP. 2008.

General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal.
Nature Reviews Neuroscience. 9(5): 370-86.

Gardiner D, Shemie S, Manara A, Opdam H. 2012.

International perspective on the diagnosis of death.
British Journal of Anaesthesia. 108(supplement 1): i14-i28.

Geisser W, Schreiber M, Hofbauer H, Lattermann R, Füssel S, Wachter U, Georgieff M, Schrickler T. 2003.

Sevoflurane versus isoflurane - anaesthesia for lower abdominal surgery. Effects on perioperative glucose metabolism.
Acta Anaesthesiologica Scandinavica. 47(2): 174-79.

Gibson A, Hart SL, Shabib A. 1980.

Leucine-enkephalin and methionine-enkephalin produce opposing effects on plasma corticosterone levels in ether-stressed mice.
British Journal of Pharmacology. 70(4): 509-11.

Goddard AW, Ball SG, Martinez J, Robinson MJ, Yang CR, Russell JM, Shekhar A. 2010.

Current perspectives of the roles of the central norepinephrine system in anxiety and depression.
Depression and Anxiety. 27(4): 339-50.

Goldstein DS. 2010.

Adrenal responses to stress.
Cellular and Molecular Neurobiology. 30(8): 1433-40.

Goldstein DS, Kopin IJ. 2008.

Adrenomedullary, adrenocortical, and sympathoneural responses to stressors: a meta-analysis.
Endocrine Regulations. 42(4): 111-9.

Gos T, Hauser R, Krzyzanowski M. 2002.

Regional distribution of glutamate in the central nervous system of rat terminated by carbon dioxide euthanasia.
Laboratory Animals. 36(2): 127-33.

Gotoh M, Tajima T, Suzuki Y, Ikari H, Iguchi A, Kakumu S, Hirooka Y. 1998.

Swimming stress that causes hyperglycemia increases in vivo release of noradrenaline, but not acetylcholine, from the hypothalamus of conscious rats.
Brain Research. 780(1): 74-9.

Griez EJ, Colasanti A, van Diest R, Salamon E, Schruers K. 2007.

Carbon dioxide inhalation induces dose-dependent and age-related negative affectivity.
PLoS ONE. 2(10): e987.

Grimm M, Weidmann P, Keusch G, Meier A, Glück Z. 1980.

Norepinephrine clearance and pressor effect in normal and hypertensive man.
Klinische Wochenschrift. 58(21): 1175-81.

Groeben H, Meier S, Tankersley CG, Mitzner W, Brown RH. 2004.

Influence of volatile anaesthetics on hypercapnoeic ventilatory responses in mice with blunted respiratory drive.
British Journal of Anaesthesia. 92(5): 697-703.

Gross JB, Bailey PL, Connis RT, Coté CJ, Davis FG, Epstein BS, Gilbertson L, Nickinovich DG, Zerwas JM, Zuccaro G. 2002.

Practice guidelines for sedation and analgesia by non-anesthesiologists.
Anesthesiology. 96 (4): 1004-17.

Grouzmann E, Cavadas C, Grand D, Moratel M, Aubert JF, Brunner HR, Mazzolai L. 2003.

Blood sampling methodology is crucial for precise measurement of plasma catecholamines concentrations in mice.
European Journal of Physiology. 447(2): 254-8.

Gu Q, Lee LY. 2010.

Airway irritation and cough evoked by acid: from human to ion channel.
Current Opinion in Pharmacology. 11(3): 238-47.

Gu X, Simons FE, Simons KJ. 1999.

Epinephrine absorption after different routes of administration in an animal model.
Biopharmaceutics & Drug Disposition. 20(8): 401-5.

Guedel AE. 1927.

Stages of Anesthesia and a Re-Classification of the Signs of Anesthesia.
Anesthesia & Analgesia. 6(4):157-62).

Guedel AE. 1951.

Inhalation anesthesia: a fundamental guide.
2. Aufl. Macmillan. New York.

Gunaydin B, Karadenizli Y, Babacan A, Kaya K, Unlu M, Inanir S, Mahli A, Akcabay M, Yardim S. 1997.

Pulmonary microvascular injury following general anaesthesia with volatile anaesthetics - halothane and isoflurane: a comparative clinical and experimental study.
Respiratory Medicine. 91(6): 351-60.

Hackbarth H, Kuppers N, Bohnet W. 2000.

Euthanasia of rats with carbon dioxide - animal welfare aspects.
Laboratory Animals. 34(1): 91-6.

Hackbarth H, Lückert A. 2002.

Tierschutzrecht: Leitfaden für die Praxis.
2. Aufl. Verlagsgruppe Hüthig-Jehle-Rehm.

Hagihira S, Takashina M, Mori T, Ueyama H, Mashimo T. 2004.

Electroencephalographic bicoherence is sensitive to noxious stimuli during isoflurane or sevoflurane anesthesia.
Anesthesiology. 100(4): 818-25.

8 Zitierte Literatur

Halter JB, Pflug AE, Porte D. 1977.

Mechanism of plasma catecholamine increases during surgical stress in man.
Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 45(5): 936-44.

Hari R, Portin K, Kettenmann B, Jousmaki V, Kobal G. 1997.

Right-hemisphere preponderance of responses to painful CO₂ stimulation of the human nasal mucosa.
Pain. 72(1-2): 145-51.

Harlan Laboratories Inc. 2008a.

C57Bl/6 data sheet.
Letzter Zugriff im Februar 2013.
<http://www.harlan.com/download.axd/ebadcb4acc524b5f9fa0d21836da05c9.pdf>

Harlan Laboratories Inc. 2008b.

NMRI data sheet.
Letzter Zugriff im Februar 2013.
<http://www.harlan.com/download.axd/33e1141c6c104373bb4f38388df35421.pdf>

Harrison N, Nau C. 2008.

Sensitization of nociceptive ion channels by inhaled anesthetics - a pain in the gas?
Molecular Pharmacology. 74(5): 1180-2.

Hartung J, Nowak B, Waldmann KH, Ellerbrock S. 2002.

[CO₂-stunning of slaughter pigs: effects on EEG, catecholamines and clinical reflexes].
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift. 109(3): 135-9.

Hawkins P, Playle L, Golledge H, Leach M, Banzett R, Coenen A, Cooper J, Danneman P, Flecknell P, Kirkden R, Niel L, Raj M. 2006.

Newcastle consensus meeting on carbon dioxide euthanasia of laboratory animals. Meeting report. University of New Castle upon Tyne.
Letzter Zugriff im Februar 2013.
<http://www.nc3rs.org.uk/displaypagedoc.asp?id=9934>

Henke J. 2010.

Analgesie und Anästhesie beim Kleinsäuger.
Der praktische Tierarzt. 91(4): 294-304

Hewett TA, Kovacs MS, Artwohl JE, Bennett BT. 1993.

A comparison of euthanasia methods in rats, using carbon dioxide in prefilled and fixed flow rate filled chambers.
Laboratory Animal Science. 43(6): 579-82.

Hikasa Y, Kawanabe H, Takase K, Ogasawara S. 1996.

Comparisons of sevoflurane, isoflurane, and halothane anesthesia in spontaneously breathing cats.
Veterinary Surgery. 25(3): 234-43.

Hill L, Flack M. 1908.

The effect of excess of carbon dioxide and of want of oxygen upon the respiration and the circulation.
Journal of Physiology. 37(2): 77-111.

Hirt A, Maisack C, Moritz J. 2007.

Tierschutzgesetz Kommentar.
2. Aufl. Verlag Franz Vahlen. München.

Hornett TD, Haynes AP. 1984.

Comparison of carbon dioxide/ air mixtures and nitrogen/ air mixtures for the euthanasia of rodents, design of a system for inhalation euthanasia.
Animal Technology. (35): 93-9.

Hsieh CC, Shih CL, Fang CC, Chen WJ, Lee CC. 2005.

Carbon dioxide asphyxiation caused by special-effect dry ice in an election campaign.
American Journal of Emergency Medicine. 23(4): 567-8.

Hu J, Zhong C, Ding C, Chi Q, Walz A, Mombaerts P, Matsunami H, Luo M. 2007.

Detection of near-atmospheric concentrations of CO₂ by an olfactory subsystem in the mouse.
Science. 317(5840): 953-7.

Hug CC, Jr. 1990.

Does opioid "anesthesia" exist?
Anesthesiology. 73(1): 1-4.

Hummel T, Mohammadian P, Marchl R, Kobal G, Lotsch J. 2003.

Pain in the trigeminal system: irritation of the nasal mucosa using short- and long-lasting stimuli.
International Journal of Psychophysiology. 47(2): 147-58.

Hung CJ, Liu FY, Shaiu YC, Kao A, Lin CC, Lee CC. 2003.

Assessing transient pulmonary injury induced by volatile anesthetics by increased lung uptake of technetium-99m hexamethylpropylene amine oxime.
Lung. 181(1): 1-7.

IASP Task Force on Taxonomy. 1994.

Part III: Pain terms, a current list with definitions and notes on usage.
in: Classification of chronic pain, descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 2. Aufl. Hrsg. Merskey H, Bogduk N. IASP Press. Seattle.

Ibrahim AE, Mohamed M, Kharasch ED, Epstein RH, Groudine SB, Ebert TJ, Binstock WB, Philip BK. 2001.

Speed of recovery and side-effect profile of sevoflurane sedation compared with midazolam.
Anesthesiology. 94(1): 87-94.

Ichinose F, Mi W, Miyazaki M, Onouchi T, Goto T, Morita S. 1998.

Lack of correlation between the reduction of sevoflurane MAC and the cerebellar cyclic GMP concentrations in mice treated with 7-nitroindazole.
Anesthesiology. 89(1): 143-8.

Ikeda N, Takahashi H, Umetsu K, Suzuki T. 1989.

The course of respiration and circulation in death by carbon dioxide poisoning.
Forensic Science International. 41(1-2): 93-9.

Imas OA, Ropella KM, Ward BD, Wood JD, Hudetz AG. 2005.

Volatile anesthetics disrupt frontal-posterior recurrent information transfer at gamma frequencies in rat.
Neuroscience Letters. 387(3): 145-50.

Imas OA, Ropella KM, Wood JD, Hudetz AG. 2004.

Halothane augments event-related gamma oscillations in rat visual cortex.
Neuroscience. 123(1): 269-78.

Irwin S. 1968.

Comprehensive observational assessment: A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse.
Psychopharmacologia. 13(3): 222-57.

Itoi K, Sugimoto N. 2010.

The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression.
Journal of Neuroendocrinology. 22(5): 355-61.

Iwarsson K, Rehbinder C. 1993.

A study of different euthanasia techniques in guinea pigs, rats, and mice. Animal response and postmortem findings.
Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science. 4(20): 191-205.

Jacobson LH, Cryan JF. 2005.

Differential sensitivity to the motor and hypothermic effects of the GABA_B receptor agonist baclofen in various mouse strain.
Psychopharmacology. 179(3): 688-99.

Johnson PL, Fitz SD, Hollis JH, Moratalla R, Lightman SL, Shekhar A, Lowry CA. 2011.

Induction of c-Fos in 'panic/defence'-related brain circuits following brief hypercarbic gas exposure.
Journal of Psychopharmacology. 25(1): 26-36.

Jolles J, Rompa-Barendregt J, Gispen WH. 1979.

Novelty and grooming behavior in the rat.
Behavioural and Neural Biology. 25: 563-72.

Jones MT, Stockham MA. 1966.

The effect of previous stimulation of the adrenal cortex by adrenocorticotrophin on the function of the pituitary - adrenocortical axis in response to stress.
Journal of Physiology. 184(3): 741-50.

Kalueff AV, Tuohimaa P. 2004.

Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research.
Brain Research Protocols. 13(3): 151-8.

Kirkden RD, Niel L, Stewart SA, Weary DM. 2008.

Gas killing of rats: the effect of supplemental oxygen on aversion to carbon dioxide.
Animal Welfare. 17(1): 79-87.

Kling GW, Clark MA, Wagner GN, Compton HR, Humphrey AM, Devine JD, Evans WC, Lockwood JP, Tuttle ML, Koenigsberg EJ. 1987.

The 1986 Lake Nyos gas disaster in Cameroon, West Africa.
Science. 236(4798): 169-75.

Kohler I, Meier R, Busato A, Neiger-Aeschbacher G, Schatzmann U. 1999.

Is carbon dioxide (CO₂) a useful short acting anaesthetic for small laboratory animals?
Laboratory Animals. 33(2): 155-61.

Komatsu H, Ogli K. 1987.

Opisthotonus during exposure to isoflurane, enflurane, and halothane in mice.
Anesthesiology. 67(5): 771-4.

Kopin IJ. 1989.

Plasma levels of catecholamines and dopamine- β -hydroxylase.
in: Catecholamines II. Hrsg. Trendelenburg U, Weiner N. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.

Krnjevic K, Randic M, Siesjoe BK. 1965.

Cortical CO₂ tension and neuronal excitability.
Journal of Physiology. 176: 105-22.

Krohn TC, Hansen AK, Dragsted N. 2003.

The impact of low levels of carbon dioxide on rats.
Laboratory Animals. 37(2): 94-9.

Kuhn CM, Cochrane C, Feinglos MN, Surwit RS. 1987.

Exaggerated peripheral responses to catecholamines contributes to stress-induced hyperglycemia in the ob/ob mouse.
Pharmacology Biochemistry and Behavior. 26(3): 491-5.

Lansing RW, Im BS, Thwing JI, Legedza AT, Banzett RB. 2000.

The perception of respiratory work and effort can be independent of the perception of air hunger.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 162(5): 1690-6.

Leach M, Raj M, Morton D. 2005.

Aversiveness of carbon dioxide.
Laboratory Animals. 39(4): 452-3.

Leach MC, Howell VA, Allan TF, Morton DB. 2002.

Degrees of aversion shown by rats and mice to different concentrations of inhalational anaesthetics.
Veterinary Record. 150(26): 808-15.

Leach MC, Howell VA, Allan TF, Morton DB. 2004.

Measurement of aversion to determine humane methods of anaesthesia and euthanasia.
Animal Welfare. 13(supplement 1): 77-86.

Lee JS, Morrow D, Andresen MC, Chang KS. 2002.

Isoflurane depresses baroreflex control of heart rate in decerebrate rats.
Anesthesiology. 96(5): 1214-22.

Lerman J, Sikich N, Kleinman S, Yentis S. 1994.

The pharmacology of sevoflurane in infants and children.
Anesthesiology. 80(4): 814-24.

Lever C, Burton S, O'Keefe J. 2006.

Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation.
Reviews in the Neurosciences. 17(1-2): 111-33.

Liu X, Peprah D, Gershenfeld HK. 2003.

Tail-suspension induced hyperthermia: a new measure of stress reactivity.
Journal of Psychiatric Research. 37(3):

8 Zitierte Literatur

Lorz A, Metzger E. 1999.

Tierschutzgesetz Kommentar.
5. Aufl. C. H. Beck. München.

Makowska IJ, Vickers L, Mancell J, Weary DM. 2009.

Evaluating methods of gas euthanasia for laboratory mice.
Applied Animal Behaviour Science. 121(3-4): 230-5.

Makowska IJ, Weary DM. 2009.

Rat aversion to induction with inhalant anaesthetics.
Applied Animal Behaviour Science. 119(3-4): 229-35.

Makowska IJ, Niel L, Kirkden, RD, Weary, DM. 2008.

Rats show aversion to argon-induced hypoxia.
Applied Animal Behaviour Science. 114(3-4): 572-81.

Marino DJ. 2012.

Age-specific absolute and relative organ weight distributions for B6C3F1 mice.
Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. 75(2): 76-99.

Marley E, Stephenson JD. 1972.

Central actions of catecholamines.
in: Catecholamines. Hrsg. Blaschko H, Muscholl E. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

Martoft L, Stodkilde-Jorgensen H, Forslid A, Pedersen HD, Jorgensen PF. 2003.

CO₂ induced acute respiratory acidosis and brain tissue intracellular pH: a ³¹P NMR study in swine.
Laboratory Animals. 37(3): 241-48.

Mazze RI, Rice SA, Baden JM. 1985.

Halothane, isoflurane, and enflurane MAC in pregnant and nonpregnant female and male mice and rats.
Anesthesiology. 62(3): 339-41.

McEwen BS, Wingfield JC. 2003.

The concept of allostasis in biology and biomedicine.
Hormones and Behavior. 43: 2-15.

McIntyre AR, Drummond RA, Riedel ER, Lipman NS. 2007.

Automated mouse euthanasia in an individually ventilated caging system: system development and assessment.
Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 46(2): 65-73.

Menken L. 2012.

Evaluation of aversion towards inhalent anaesthetics in laboratory mice.
Master's Thesis. Freie Universität Berlin. Berlin.

Messow C, Fiolna A, Kaup F-J, Hackbarth H. 1987.

Morphologische Auswirkungen an der Lunge bei Ratten nach der Tötung.
Zeitschrift für Versuchstierkunde. 29: 219-27.

Moberg GP. 2000.

Biological response to stress: implications for animal welfare.
in: The biology of animal stress. Hrsg. Moberg GP, Mench JA. CAB International.

- Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S, Petre CO. 2005.**
Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress.
Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. 29(8): 1214-24.
- Mühlbauer IC, Otten W, Lüpping W, Palzer A, Zöls S, Elicker S, Ritzmann M, Heinritzi K. 2009.**
Untersuchung zur CO₂-Narkose als eine Alternative zur betäubungslosen Kastration von Saugferkeln.
Praktischer Tierarzt. 90(5): 460-64.
- Mushambi MC, Smith G. 2001.**
Inhalation anaesthetic agents.
in: Textbook of Anaesthesia. Hrsg. Aitkenhead AR, Rowbotham DJ, Smith G.
Churchill Livingstone. Edingburgh, London.
- Nahas GG, Zagury D, Milhaud A, Manger WM, Pappas GD. 1967.**
Acedemia and catecholamine output of the isolated canine adrenal gland.
American Journal of Physiology. 213: 1186-92.
- National Research Council. 2008.**
Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals.
Hrsg. (US) Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals. National Academies Press. Washington (DC).
- Nattie E. 1999.**
CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing.
Progress in Neurobiology. 59(4): 299-331.
- Niel L, Kirkden RD, Weary DM. 2008a.**
Effects of novelty on rat's responses to CO₂ exposure.
Applied Animal Behaviour Science. 111(1-2): 183-94.
- Niel L, Stewart SA, Weary DM. 2008b.**
Effect of flow rate on aversion to gradual-fill carbon dioxide exposure in rats.
Applied Animal Behaviour Science. 109(1): 77-84.
- Niel L, Weary DM. 2006.**
Behavioural responses of rats to gradual-fill carbon dioxide euthanasia and reduced oxygen concentrations.
Applied Animal Behaviour Science. 100(3-4): 295-308.
- Niel L, Weary DM. 2007.**
Rats avoid exposure to carbon dioxide and argon.
Applied Animal Behaviour Science. 107(1-2): 100-9.
- Nishino T. 2011.**
Dyspnoea: underlying mechanisms and treatment.
British Journal of Anaesthesia. 106(4): 463-74.
- Nishiyama T, Yamashita K, Yokoyama T. 2005.**
Stress hormone changes in general anesthesia of long duration: isoflurane-nitrous oxide vs sevoflurane-nitrous oxide anesthesia.
Journal of Clinical Anesthesia. 17(8): 586-91.

Öhman A, Mineka S. 2001.

Fears, phobias, and preparedness: Toward an evolved module of fear and fear learning.
Psychological Review. 108(3): 483-522.

Oose Y, Miura M, Inoue R, Andou N, Aosaki T, Nishimura K. 2012.

Imbalanced suppression of excitatory and inhibitory synaptic transmission onto mouse striatal projection neurons during induction of anesthesia with sevoflurane in vitro.
The European Journal of Neuroscience. 35(9): 1396-405.

Ozer M, Baris S, Karakaya D, Kocamanoglu S, Tur A. 2006.

Behavioural effects of chronic exposure to sub-anesthetic concentrations of halothane, sevoflurane and desflurane in rats.
Canadian Journal of Anaesthesia. 53(7): 653-8.

Papp LA, Klein DF, Gorman JM. 1993.

Carbon dioxide hypersensitivity, hyperventilation, and panic disorder.
American Journal of Psychiatry. 150(8): 1149-57.

Patchev AV, Fischer D, Wolf SS, Herkenham M, Gotz F, Gehin M, Chambon P, Patchev VK, Almeida OF. 2007.

Insidious adrenocortical insufficiency underlies neuroendocrine dysregulation in TIF-2 deficient mice.
FASEB Journal. 21(1): 231-8.

Patel SS, Goa KL. 1996.

Sevoflurane: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and its clinical use in general anaesthesia.
Drugs. 51(4): 658-700.

Pecaut MJ, Smith AL, Jones TA, Gridley DS. 2000.

Modification of immunologic and hematologic variables by method of CO₂ euthanasia.
Comparative Medicine. 50(6): 595-602.

Peppel P, Anton F. 1993.

Responses of rat medullary dorsal horn neurons following intranasal noxious chemical stimulation: effects of stimulus intensity, duration, and interstimulus interval.
Journal of Neurophysiology. 70(6): 2260-75.

Podhorna J, Brown RE. 2002.

Strain differences in activity and emotionality do not account for differences in learning and memory performance between C57BL/6 and DBA/2 mice.
Genes, Brain and Behavior. 1(2): 96-110.

Pohorecky LA, Wurtman RJ. 1971.

Adrenocortical control of epinephrine synthesis.
Pharmacological Reviews. 23(1): 1-35.

Pollmann U, Tschanz B. 2006.

Leiden - ein Begriff aus dem Tierschutzrecht.
Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle. 13(4).

Pomplun D, Möhlig M, Sprangler J, Pfeiffer AFH, Ristow M. 2004.

Elevation of blood glucose following anaesthetic treatment in C57Bl/6 mice.
Hormone and Metabolic Research. 36: 67-9.

- Port CD, Garvin PJ, Ganote CE, Sawyer DC. 1978.**
Pathologic changes induced by euthanasia agent.
Laboratory Animal Science. 28(4): 448-50.
- Pritchett-Corning KR. 2009.**
Euthanasia of neonatal rats with carbon dioxide.
Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 48(1): 23-7.
- Pritchett K, Corrow D, Stockwell J, Smith A. 2005.**
Euthanasia of neonatal mice with carbon dioxide.
Comparative Medicine. 55(3): 275-81.
- Raff H, Roarty TP. 1988.**
Renin, ACTH, and aldosterone during acute hypercapnia and hypoxia in conscious rats.
American Journal of Physiology - Regulatory Physiology. 254(3): R431-R5.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. 2003.**
The nervous system - general anaesthetic agents.
in: Pharmacology. Churchill Livingstone. Edingburgh, London, New York.
- Reed B, Varon J, Chait BT, Kreek MJ. 2009.**
Carbon dioxide-induced anesthesia results in a rapid increase in plasma levels of vasopressin.
Endocrinology. 150(6): 2934-9.
- Rehder K, Mallow JE, Fibuch EE, Krabill DR, Sessler AD. 1974.**
Effects of isoflurane anesthesia and muscle paralysis on respiratory mechanics in normal man.
Anesthesiology. 41(5): 477-85.
- Ricart-Jané D, Rodríguez-Sureda V, Benavides A, Peinado-Onsurbe J, López-Tejero MD, Llobera M. 2002.**
Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat.
Metabolism. 51(7): 925-31.
- Rintisch U. 2010.**
Analgesiemonitoring bei der Ketamin-Azaperon-Allgemeinanästhesie der Schweine unter besonderer Berücksichtigung des nozizeptiven Flexorreflexes (bzw. RIII-Reflex).
Dissertationsschrift. Freie Universität Berlin. Berlin.
- Romeis. 2010.**
Romeis - Mikroskopische Technik.
18. Aufl. Hrsg. Mulisch M, Welsch U. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg.
- Roosendaal B. 2000.**
Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation.
Psychoneuroendocrinology. 25(3): 213-38.
- Rose CEJ, Althaus JA, Kaiser DL, Miller ED, Carey RM. 1983.**
Acute hypoxemia and hypercapnia: increase in plasma catecholamines in conscious dogs.
American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. 245(6): H924-9.

8 Zitierte Literatur

Ruch TC. 1979.

Pathophysiology of pain.

in: Physiology and biophysics: the brain and neural function. Hrsg. Ruch TC, Patton HD. W.B.Saunders. Philadelphia.

Russell WMS, Burch RL. 1959.

The principles of humane experimental technique.

Methuen & Co Ltd. London.

Sabbana EL, Kvetňanský R. 2001.

Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events.

Trends in Neurosciences. 24(2): 91-8.

Samraus HH. 1997.

Grundbegriffe im Tierschutz.

in: Das Buch vom Tierschutz. Hrsg. Samraus HH, Steiger A. Enke. Stuttgart.

Schaefer KE, Avery ME, Bensch K. 1964.

Time course of changes in surface tension and morphology of alveolar epithelial cells in CO₂-induced hyaline membrane disease.

Journal of Clinical Investigation. 43: 2080-93.

Schaefer KE, McCabe N, Withers J. 1968.

Stress response in chronic hypercapnia.

American Journal of Physiology. 214(3): 543-48.

Schruers K, Esquivel G, van Duinen M, Wichers M, Kenis G, Colasanti A, Knuts I, Goossens L, Jacobs N, van Rozendaal J, Smeets H, van Os J, Griez E. 2011.

Genetic moderation of CO₂-induced fear by 5-HTTLPR genotype.

Journal of Psychopharmacology. 25(1): 37-42.

Schultz A, Siedenberg M, Grouven U, Kneif T, Schultz B. 2008.

Comparison of Narcotrend Index, Bispectral Index, spectral and entropy parameters during induction of propofol-remifentanyl anaesthesia.

Journal of Clinical Monitoring and Computing. 22(2): 103-11.

Shanks N, Griffiths J, Anisman H. 1994.

Norepinephrine and serotonin alterations following chronic stressor exposure: mouse strain differences.

Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 49(1): 57-65.

Sharp J, Azar T, Lawson D. 2006.

Comparison of carbon dioxide, argon, and nitrogen for inducing unconsciousness or euthanasia of rats.

Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 45(2): 21-5.

Shipp K, Woodward BD. 1998.

A simple exsanguination method that minimizes acute pre-anesthesia stress in the mouse: evidence based on serum corticosterone concentrations.

Contemporary Topics in Laboratory Animal Science. 37(5): 73-7.

Sjoblom M, Nylander O. 2007.

Isoflurane-induced acidosis depresses basal and PGE₂-stimulated duodenal bicarbonate secretion in mice.

American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology. 292(3): 899-904.

Smith W, Harrap SB. 1997.

Behavioural and cardiovascular responses of rats to euthanasia using carbon dioxide gas.

Laboratory Animals. 31(4): 337-46.

Smythe GA, Bradshaw JE, Vining RF. 1983.

Hypothalamic monoamine control of stress-induced adrenocorticotropin release in the rat.

Endocrinology. 133(3): 1062-71.

Smythe GA, Edwards SR. 1992.

Suppression of central noradrenergic neuronal activity inhibits hyperglycemia.

American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism. 263(5): E823-E7.

Smythe GA, Pascoe WS, Storlien LH. 1989.

Hypothalamic noradrenergic and sympathoadrenal control of glycemia after stress.

American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism. 256(2): E231-E5.

Sonner JM, Antognini JF, Dutton RC, Flood P, Gray AT, Harris RA, Homanics GE, Kendig J, Orser B, Raines DE, Trudell J, Vissel B, Eger EI, II, Rampil IJ. 2003.

Inhaled anesthetics and immobility: mechanisms, mysteries, and minimum alveolar anesthetic concentration.

Anesthesia & Analgesia. 97(3): 718-40.

Spruijt BM, Van Hoof JARAM, Gispen WH. 1992.

Ethology and neurobiology of grooming behavior.

Physiological Reviews. 72: 825-52.

Stevens K. 2001.

Plasma-Catecholaminspiegel bei der Ratte unter Ether oder Isofluran bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen.

Dissertationsschrift. Universität München. München.

Stutler SA, Johnson EW, Still KR, Schaeffer DJ, Hess RA, Arfsten DP. 2007.

Effect of method of euthanasia on sperm motility of mature Sprague-Dawley rats.

Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 46(2): 13-20.

Suh GSB, Wong AM, Hergarden AC, Wang JW, Simon AF, Benzer S, Axel R, Anderson DJ. 2004.

A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in *Drosophila*.

Nature. 431(7010): 854-9.

Sun SS, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ, Kao CH. 2000.

Transient increase in alveolar epithelial permeability induced by volatile anesthesia with isoflurane.

Lung. 178(3): 129-35.

Supple WF, Cranney J, Leaton RN. 1988.

Effects of lesions of the cerebellar vermis on VMH lesion-induced hyperdefensiveness, spontaneous mouse killing, and freezing in rats
Physiology & Behavior. 42(2): 145–53.

Tanaka T, Oglı K, Komatsu H, Nogaya J, Yokono S. 1993.

Strain-differences of sensitivity to volatile anesthetics and their genetic character in mice.
Journal of Anesthesia. 7(1): 75-81.

Taylor PM. 1998.

Effects of hypercapnia on endocrine and metabolic responses to anaesthesia in ponies.
Research in Veterinary Science. 65(1): 41-6.

TerRiet MF, DeSouza GJ, Jacobs JS, Young D, Lewis MC, Herrington C, Gold MI. 2000.

Which is most pungent: isoflurane, sevoflurane or desflurane?
British Journal of Anaesthesia. 85(2): 305-7.

Thews G. 1997.

Lungenatmung.
in: *Physiologie des Menschen*. 27. Aufl. Hrsg. Schmidt RF, Thews G. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

Thomas AA, Flecknell PA, Golledge HD. 2012.

Combining nitrous oxide with carbon dioxide decreases the time to loss of consciousness during euthanasia in mice - refinement of animal welfare?
PLoS One. 7(3): e32290.

Traslavina RP, King EJ, Loar AS, Riedel ER, Garvey MS, Ricart-Arbona R, Wolf FR, Couto SS. 2010.

Euthanasia by CO₂ inhalation affects potassium levels in mice.
Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 49(3): 316-22.

Urban BW, Bleckwenn M. 2002.

Concepts and correlations relevant to general anaesthesia.
British Journal of Anaesthesia. 89(1): 3-16.

Valentine H, Williams WO, Maurer KJ. 2012.

Sedation or inhalant anesthesia before euthanasia with CO₂ does not reduce behavioral or physiologic signs of pain and stress in mice.
Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 51(1): 50-7.

van den Elsen M, Sarton E, Teppema L, Berkenbosch A, Dahan A. 1998.

Influence of 0.1 minimum alveolar concentration of sevoflurane, desflurane and isoflurane on dynamic ventilatory response to hypercapnia in humans.
British Journal of Anaesthesia. 80(2): 174-82.

Veissier, Boissy A. 2007.

Stress and welfare: two complementary concepts that are intrinsically related to the animal's point of view.
Physiology & Behaviour. 92(3): 429–33.

von Mickwitz G. 1976.

Definition des Begriffes "Tierschutzgerechtes Töten".
in: *Tierschutzgerechtes Töten von Wirbeltieren*. Hrsg. Hauser KW. Schlütersche.

Wallace VC, Norbury TA, Rice AS. 2005.

Ultrasound vocalisation by rodents does not correlate with behavioural measures of persistent pain.
European Journal of Pain. 9(4): 445-52.

Webster Marketon JI, Glaser R. 2008.

Stress hormones and immune function.
Cellular Immunology. 252(1-2): 16-26.

Westhues M, Fritsch R. 1961.

Grundlagen der Narkose.
in: Die Narkose der Tiere. Verlag Paul Parey. Berlin, Hamburg.

Wiklund A, Granon S, Cloëz-Tayarani I, Faure P, le Sourd A-M, Sundman E, Changeux J-P, Eriksson LI. 2008.

Sevoflurane anesthesia alters exploratory and anxiety-like behavior in mice lacking the $\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor subunit.
Anesthesiology. 109(5): 790-8.

Williams HI. 1958.

Carbon dioxide poisoning: report of eight cases, with two deaths.
British Medical Journal. 2(5102): 1012-4.

Winder WW, Fuller EO, Conlee RK. 1983.

Adrenal hormones and liver cAMP in exercising rats - different modes of anesthesia.
Journal of Applied Physiology. 55(5): 1634-6.

Wöhr M, Schwarting RK. 2010.

Ultraschallkommunikation bei Nagern und ihre Bedeutung für Modelle neuropsychiatrischer Erkrankungen.
Neuroforum. 4(10): 248-58.

Wolfson B, Hetrick WD, Lake CL, Siker ES. 1978.

Anesthetic indices - further data.
Anesthesiology. 48(3): 187-90.

Woodbury DM, Karler R. 1960.

The role of carbon dioxide in the nervous system.
Anesthesiology. 21: 686-703.

Wysocki CJ, Whitney G, Tucker D. 1977.

Specific anosmia in the laboratory mouse.
Behavior Genetics. 7(2): 171-88.

Yang L, Wellman LL, Ambrozewicz MA, Sanford LD. 2011.

Effects of stressor predictability and controllability on sleep, temperature, and fear behavior in mice.
Sleep. 34(6): 759-71.

Zardooz H, Rostamkhani F, Zaringhalam J, Shahrivar FF. 2010.

Plasma corticosterone, insulin and glucose changes induced by brief exposure to isoflurane, diethyl ether and CO₂ in male rats.
Physiological Research. 59(6): 973-8.

8 Zitierte Literatur

Zeitlina R, Patela S, Solomona R, Trana J, Weeberc EJ, Echeverria V. 2012.

Cotinine enhances the extinction of contextual fear memory and reduces anxiety after fear conditioning.
Behavioural Brain Research. 228(2): 284–93.

Zeller A, Jurd R, Lambert S, Arras M, Drexler B, Grashoff C, Antkowiak B, Rudolph U. 2008.

Inhibitory ligand-gated ion channels as substrates for general anesthetic actions.
in: Modern Anesthetics. Handbook of Experimental Pharmacology 182. Hrsg. Schüttler J, Schwilden H. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.

Ziemann AE, Allen JE, Dahdaleh NS, Drebot II, Coryell MW, Wunsch AM, Lynch CM, Faraci FM, Howard MA, 3rd, Welsh MJ, Wemmie JA. 2009.

The amygdala is a chemosensor that detects carbon dioxide and acidosis to elicit fear behavior.
Cell. 139(5): 1012-21.

Zimmermann S. 2010.

Untersuchungen zur Wirkung der Betäubung mittels Kohlendioxid bei der Kastration männlicher Saugferkel.
Dissertationsschrift. Ludwigs-Maximilians-Universität München. München.

Zurbier CJ, Keijzers PJM, Koeman A, Van Wezel HB, Hollmann MW. 2008.

Anesthesia's effects on plasma glucose and insulin and cardiac hexokinase at similar hemodynamics and without major surgical stress in fed rats.
Anesthesia & Analgesia. 106(1): 135-42.

8.2 Verordnungen, Gesetze und Sonstiges

VERORDNUNG (EG) Nr. 1907/2006 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 18. Dezember 2006

zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Chemikalienagentur, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission
Amtsblatt der Europäischen Union L 396 vom 30. Dezember 2006

Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006

(BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 20 des Gesetzes vom 9. Dezember 2010 (BGBl. I S. 1934) geändert worden ist

RICHTLINIE 2010/63/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2010

zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere
Amtsblatt der Europäischen Union L 276/33 vom 20. Oktober 2010

EFSA. 2005.

Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to "Aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes"

Gutachten des Wissenschaftlichen Gremiums für Tiergesundheit und Tierschutz auf Ersuchen der Kommission „Zur Biologie und zum Wohlergehen von Tieren, die für Versuchszwecke und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden“

EFSA-Q-2004-105

Adopted by the AHAW Panel on 14 November 2005

The EFSA Journal. 292:1-46.

UK Home Office. 2006.

Report of the Animal Procedures Committee for 2006.

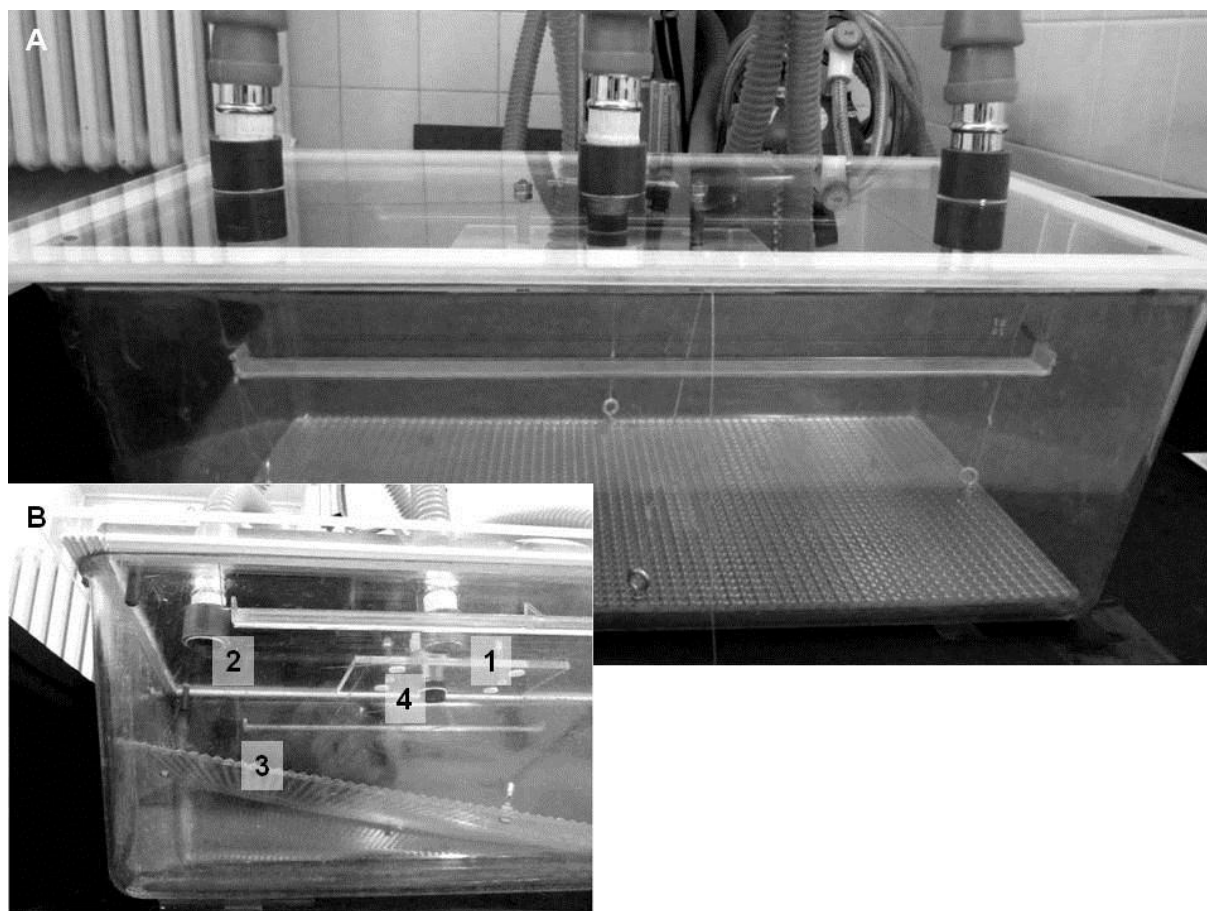
Report on schedule 1 - Appropriate methods of humane killing.

Home Office, United Kingdom.

<http://www.official-documents.gov.uk/document/hc0708/hc00/0041/0041.pdf>, letzter Zugriff im Februar 2013

9 Anhang

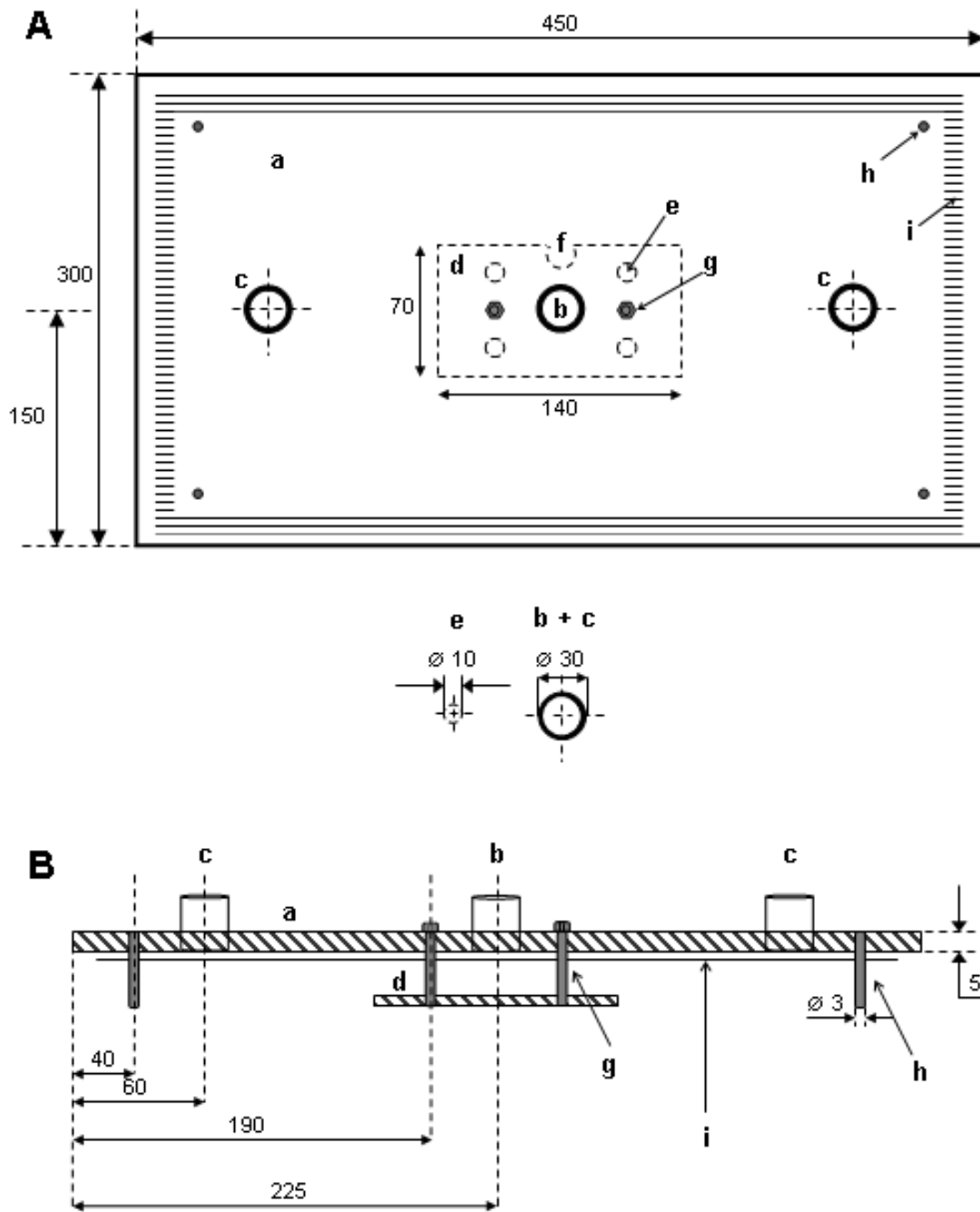
9.1 Narkosebox und Deckel

**Abb. 9.1 Narkosebox**

A Narkosebox auf Basis eines Makrolon®-Käfigs Typ III mit Deckelkonstruktion

B Detailaufnahme der Narkosebox

- 1 Öffnung und Ansteckstutzen für den Gaseinlass, darunter befindet sich die Verwirbelungsplatte
- 2 Öffnung und Ansteckstutzen für den Gasauslass, auf der gegenüberliegenden Seite befindet sich eine zweite Öffnung
- 3 Einlegeboden, der von außerhalb der Kammer angehoben werden kann
- 4 Mikrofon



Grafiken von Alexandra Wistel

Abb. 9.2 Deckelkonstruktion

Die Deckelkonstruktion besteht aus Acrylglas, PVC-Rohren und -Stäben und Metallmutter sowie einem selbstklebendem Isolierband. Die Maße sind in mm angegeben.

- A Ansicht von oben
- B Ansicht von der Seite

- a Deckplatte
- b Öffnung für den Narkosegasschlauch
- c Öffnungen für die Abgasschläuche
- d Verwirbelungsplatte in Anlehnung an Corbach (2006)
- e Löcher, die das Gas auch durch die Verwirbelungsplatte strömen lassen
- f Aussparung für das Mikrofon in der Deck- und der Verwirbelungsplatte
- g Halterungsstäbe (mit Gewinde) für die Verwirbelungsplatte, die mit Muttern befestigt werden
- h Halterungsstäbe, die ein Verrutschen der Deckplatte auf der Narkosebox verhindern
- i Isolierband

9.2 Histologie

9.2.1 Grundlegende Arbeitsschritte

Die Ethanole stammen von der Firma Berkel AHK Alkoholhandel GmbH Co KG, Berlin, Deutschland. Das Xylol, das Paraffingemisch Paraplast® und das Kunstharz Roti®-Histokitt werden von der Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland bezogen.

9.2.1.1 Einbettung der Proben in Paraplast®

Substanz	Dauer	Arbeitsschritt
Leitungswasser	30 min	Die Proben aus der Fixierlösung nehmen und wässern, beim Umsetzen abtropfen lassen.
Ethanol 70% I	1 h	Die Proben in das Gefäß stellen, beim Umsetzen abtropfen lassen
Ethanol 70% II	1 h	s. o.
Ethanol 70% III	1 h	s. o.
Ethanol 80%	über Nacht	s. o.
Ethanol 96% I	1 h	s. o.
Ethanol 96% II	1 h	s. o.
Ethanol absolut I	1 h	s. o.
Ethanol absolut II	1 h	s. o.
Ethanol absolut III	1 h	s. o.
Xylol I	30 min	s. o.
Xylol II	30 min	s. o.
Paraplast® I	über Nacht	s. o.
Paraplast® II	2 h	s. o.
Paraplast® III	2 h	s. o. Die Proben können nun in Paraplast®-Blöcke eingebettet werden.

9.2.1.2 Entparaffinieren: Xylol und absteigende Alkoholreihe

Tab. 9.1 Entparaffinieren von Objektträgern

Substanz	Dauer	Arbeitsschritt
Xylol I	10 - 15 min	Objektträger in Küvette einstellen, kurz leicht auf und ab bewegen, beim Umsetzen abtropfen lassen
Xylol II	10 - 15 min	s. o.
Xylol III	kurz	s. o.
Ethanol absolut I	1 min	s. o.
Ethanol absolut II	1 min	s. o.
Ethanol 96%	1 min	s. o.
Ethanol 90%	1 min	s. o.
Ethanol 80%	1 min	s. o.
Ethanol 70% I	1 min	s. o.
Ethanol 70% II	1 min	s. o.

9.2.1.3 Entwässern: aufsteigende Alkoholreihe und Xylol

Tab. 9.2 Entwässern von Objektträgern

Substanz	Dauer	Arbeitsschritt
Ethanol 70% I	1 min	Objektträger in Küvette einstellen, kurz leicht auf und ab bewegen, beim Umsetzen abtropfen lassen
Ethanol 70% II	1 min	s. o.
Ethanol 80%	1 min	s. o.
Ethanol 90%	1 min	s. o.
Ethanol 96%	1 min	s. o.
Ethanol absolut I	1 min	s. o.
Ethanol absolut II	1 min	s. o.
Xylol I	2 min	s. o.
Xylol II	2 min	s. o.

9.2.1.4 Harzeinschluss

Im Anschluss an die Färbung, Entwässerung und Überführung in Xylol wird der Schnitt auf dem Objektträger eingedeckt. Dazu wird ein Deckgläschen mit einem Tropfen des Kunstharzes Roti®-Histokitt auf dem Objektträger über dem Schnitt fixiert und in waagrechter Position über Nacht trocknen gelassen.

9.2.2 Färbungen

Die Anweisungen für alle Färbungen entstammen dem Romeis, dem Standardwerk der Mikroskopischen Technik (2010).

9.2.2.1 Doppelfärbung mit Hämalan-Eosin (HE-Färbung)

- **Substanzen:** Hämalan nach Mayer und Eosin 0,5%

Tab. 9.3 Hämalan nach Mayer

Substanz	Menge	Vorgehen
Hämatoxylin	1,0 g	lösen in
Aqua bidest.	1000,0 ml	
Natriumjodat	200,0 g	und
Kalialaun	50,0 g	zugeben und lösen (blauviolette Lösung)
Chloralhydrat	50,0 g	und
Zitronensäure	1,0 g	zugeben und lösen (Farbumschlag nach rotviolett)

Tab. 9.4 Eosin 0,5%

Substanz	Menge	Vorgehen
Eosin Y	0,5 g	auf Magnetrührer lösen in
Aqua bidest.	100,0 g	
		vor Gebrauch filtrieren. bei schlechtem Färbeerfolg mit
Eisessig	1 Tropfen	ansäuern

- **Arbeitsablauf**

Tab. 9.5 Arbeitsablauf der HE-Färbung

Substanz	Dauer	Arbeitsschritt
s. Entparaffinieren		Entparaffinieren
Aqua dest. I	1 min	Objektträger in Küvette einstellen, kurz leicht auf und ab bewegen, beim Umsetzen abtropfen lassen
Hämalaun nach Mayer	8 – 10 min	s. o.
Aqua dest. II	kurz	Spülen s. o.
Leitungswasser	5 min	Bläuen der Kerne s. o.
Eosin 0,5%	1 – 2 min	s. o. Schnitte sollen leicht überfärbt sein
Aqua dest. III	20 – 30 s	Spülen s. o.
Ethanol 70%	20 s	Differenzierung (Abschwächung der Eosinfärbung) s. o.
Ethanol 80%	30 s	Differenzierung (Abschwächung der Eosinfärbung) s.o.
Ethanol 90%	1 min	Entwässern s. o.
Ethanol 96% I	2 min	s. o.
Ethanol 96% II	2 min	s. o.
Ethanol absolut I	2 min	s. o.
Ethanol absolut II	2 min	s. o.
Ethanol absolut III	2 min	s. o.
Xylol I	2 min	s. o.
Xylol II	2 min	s. o.

- **Färbeergebnis**

Tab. 9.6 Färbeergebnis der HE-Färbung

Gewebestruktur	Farbe
Zellkerne	blau
Zytoplasma Muskulatur Bindegewebe	unterschiedlich intensive Rottöne
Saurer Schleim (z.B. Becherzellen)	blau

9 Anhang

9.2.2.2 Bindegewebsfärbung nach Ladewig

- **Substanzen:** Eisenhämatoxylin nach Weigert, Phosphorwolframsäure 5% und Trichromlösung nach Ladewig

Tab. 9.7 Eisenhämatoxylin nach Weigert

Substanz	Menge	Vorgehen
Hämatoxylin	1,0 g	in
Ethanol 96%	100 ml	lösen, evtl. erwärmen, 1 Woche reifen lassen → <i>Stammlösung A</i>
Eisen(III)chlorid, wasserfrei	1,5 g	in
Aqua dest.	100 ml	lösen und
Konz. Salzsäure	1 ml	zusetzen → <i>Stammlösung B</i>
Stammlösung A		mischen
Stammlösung B		

Tab. 9.8 Phosphorwolframsäure 5%

Substanz	Menge	Vorgehen
Phosphorwolfram- säure	5,0 g	in
Aqua dest.	100,0 ml	lösen

Tab. 9.9 Trichromlösung nach Ladewig

Substanz	Menge	Vorgehen
Methylblau	0,5 g	
Orange G	2,0 g	
Säurefuchsin	1,0 g	
Oxalsäure	0,6 g	alles lösen in
Aqua dest.	100,0 ml	

- **Arbeitsablauf**

Tab. 9.10 Arbeitsablauf der Bindegewebsfärbung nach Ladewig

Substanz	Dauer	Arbeitsschritt
s. Entparaffinieren		Entparaffinieren
Aqua dest. I	1 min	Objekträger in Küvette einstellen, kurz leicht auf und ab bewegen, beim Umsetzen abtropfen lassen
Eisenhämatoxylin nach Weigert	3 - 5 min	Kernfärbung s. o.
Aqua dest. II	kurz	Spülen s. o.
Leitungswasser	5 min	Bläuen der Kerne s. o.
Phosphorwolframsäure 5%	10 min	Beizen s. o.
Aqua dest. III	kurz	
Aqua dest. IV	kurz	s. o.
Trichrom-Lösung nach Ladewig	4 min	s. o.
Aqua dest. V	kurz	s. o.
s. Entwässern und Harzeinschluss		Entwässern und Harzeinschluss

- **Färbeergebnis**

Tab. 9.11 Färbeergebnis der Bindegewebsfärbung nach Ladewig

Gewebestruktur	Farbe
Zellkerne	schwarz
Erythrozyten	orange
Zytoplasma	rot
Kollagen	blau

9.2.2.3 Elastika-Färbung mit Resorcinfuchsin-Thiazinrot-Pikrinsäure

Resorcinfuchsin färbt die elastischen Fasern. Die Kombination Thiazinrot-Pikrinsäure und Eisenhämatoxylin entspricht der Variation nach Domagk der Van Gieson-Bindegewebsfärbung.

- **Substanzen:** Resorcinfuchsin-Lösung, Pikrinsäure-Thiazinrot und Eisenhämatoxylin nach Weigert

Tab. 9.12 Resorcinfuchsin-Lösung

Substanz	Menge	Vorgehen
Basisches Fuchsin	0,5 g	und
Resorcin	1 g	in
Aqua dest.	50 g	unter Erwärmen lösen → <i>Lösung 1</i>
Eisen(III)chlorid	2 g	in
Aqua dest.	100 ml	lösen → <i>Lösung 2</i>
Lösung 1		bis zum Kochen erhitzen und
Lösung 2		zugeben, auf kleiner Flamme 5 min kochen, zwischendurch umschwenken
		erkalten lassen, abfiltrieren
Filter und Niederschlag		in einen Kolben bringen, mit
Ethanol 96%	70 – 100 ml	übergießen, bis zum Kochen erhitzen, der Niederschlag löst sich dabei auf
		erkalten lassen und
Konz. Salzsäure	0,7 ml	zusetzen

Tab. 9.13 Pikrinsäure-Thiazinrot

Substanz	Menge	Vorgehen
Wässr. Thiazinrot-lösung 1%	7,5 ml	mit
Gesättigte, wässr. Pikrinsäurelösung	92,5 ml	auf 100 ml auffüllen und mischen

Eisenhämatoxylin nach Weigert

s. weiter oben Tab. 9.7 Eisenhämatoxylin nach Weigert

- **Arbeitsablauf**

Tab. 9.14 Arbeitsablauf der Elastika-Färbung

Substanz	Dauer	Arbeitsschritt
s. Entparaffinieren		Entparaffinieren, aber nur bis Ethanol 80%
Resorcinfuchsin	15 min	Objektträger in Küvette einstellen, kurz leicht auf und ab bewegen, beim Umsetzen abtropfen lassen
Leitungswasser	kurz	Spülen s. o.
Aqua dest. I	kurz	Spülen s. o.
Eisenhämatoxylin nach Weigert	2 -3 min	Kernfärbung s. o.
Aqua dest. II	kurz	Spülen s. o.
Leitungswasser	10 min	Bläuen der Kerne s. o.
Pikrinsäure-Thiazinrot	5 min	s. o.
Aqua dest. III	kurz	s. o.
Ethanol 96% I	1 min	Differenzierung der Elastinfärbung und Auswaschen der Pikrinsäure s. o.
Ethanol 96% II	1 min	Differenzierung der Elastinfärbung und Auswaschen der Pikrinsäure s. o.
s. Entwässern und Harzeinschluss		Entwässern und Harzeinschluss

- **Färbeergebnis**

Tab. 9.15 Färbeergebnis der Elastika-Färbung

Gewebestruktur	Farbe
Elastische Fasern	schwarz
Zellkerne	schwarzbraun
Kollagen	rot
Muskulatur	gelb

9.3 Tabellarische Übersicht aller Ergebnisse

9.3.1 Phasen der Narkoseeinleitung und ihre Latenzzeiten bei NMRI-Mäusen

Tab. 9.16 Latenzzeiten der Phasen der Narkoseeinleitung bei NMRI-Mäusen

Es sind die Latenzzeiten in [s] als Median (0,25/0,75-Quantile) des Beginns der Phase der Ataxie (= Atax), der Phase der Muskelrelaxation (= Relax) und der Phase der Bewusstlosigkeit (= LORR) sowie die Latenzzeit bis zum Erreichen des Verlustes des Zwischenzehenreflexes (= LOPR) bzw. der chirurgischen Toleranz (= CT) dargestellt. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

Median (0,25/0,75)	Atax [s]	Relax [s]	LORR [s]	LOPR/CT [s]
CO₂ 20 (4)	52,5 (48,0/59,0)	--*	111,5 (108,0/114,0)	261,0 (197,5/298,5)
CO₂ 60 (16)	25,0 (20,5/26,0)	45,0 (41,5/47,5)	58,5 (55,0/66,5)	94,5 (74,5/129,0)
CO₂ 100 (16)	19,0 (16,25/19,75)	35,0 (33,0/39,75)	51,0 (46,75/54,75)	65,0 (60,5/71,25)
Iso 2% (10)	43,0 (41,0/44,0)	174,0 (163,0/194,0)	191,5 (181,0/204,0)	284,0 (256,0/297,0)
Iso 5% (16)	30,0 (27,0/34,0)	68,0 (64,0/71,0)	80,5 (73,0/86,0)	101,5 (95,0/124,0)
Sevo 4,8% (10)	32,0 (30,0/33,0)	146,0 (126,0/163,0)	169,0 (141,0/181,0)	270,5 (246,0/295,0)
Sevo 8% (14)	30,0 (28,0/33,0)	79,0 (73,0/92,0)	100,5 (86,0/113,0)	141,0 (127,0/172,0)

* Die Werte für die Latenz bis zur Muskelrelaxation der CO₂ 20-Gruppe waren nicht eindeutig zu bestimmen, die Tiere fingen nach kompletter Relaxation erneut und teilweise mehrmals an, vorwärts zu kriechen. Erst nach Eintritt der Bewusstlosigkeit blieben die Mäuse entspannt und unbeweglich liegen.

9.3.2 Phasen der Narkoseeinleitung und ihre Latenzzeiten bei C57Bl/6-Mäusen

Tab. 9.17 Latenzzeiten der Phasen der Narkoseeinleitung bei C57Bl/6-Mäusen

Es sind die Latenzzeiten in [s] als Median (0,25/0,75-Quantile) des Beginns der Phase der Ataxie (= Atax), der Phase der Muskelrelaxation (= Relax) und der Phase der Bewusstlosigkeit (= LORR) sowie die Latenzzeit bis zum Erreichen des Verlustes des Zwischenzehenreflexes (= LOPR) bzw. der chirurgischen Toleranz (= CT) dargestellt. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

Median (0,25/0,75)	Atax [s]	Relax [s]	LORR [s]	LOPR/CT [s]
CO₂ 20 (5)	35,0 (31,25/39,5)	96,0 (71,75/103,25)	108,0 (84,5/117,5)	196,0 (166,0/267,25)
CO₂ 60 (15)	22,0 (20,25/24,0)	48,0 (47,0/50,75)	60,0 (57,0/63,75)	80,0 (75,25/85,75)
CO₂ 100 (16)	17,0 (16,0/18,0)	37,5 (36,0/41,5)	50,0 (49,0/52,5)	63,5 (60,5/67,0)
Iso 2% (14)	29,0 (27,0/36,0)	103,5 (95,0/117,0)	122,0 (108,0/136,0)	250,5 (231,0/282,0)
Iso 5% (16)	24,5 (22,5/30,0)	56,5 (53,5/58,0)	67,0 (65,5/68,0)	95 (83,5/102,0)
Sevo 4,8% (13)	37,0 (33,75/39,0)	103,0 (96,25/124,0)	122,0 (113,25/129,5)	230,0 (213,5/259,5)
Sevo 8% (16)	29,5 (27,5/30,5)	70,5 (64,5/76,0)	82,0 (75,5/86,0)	115,5 (109,0/123,0)

9.3.3 Errechnete Narkosegaskonzentrationen bei NMRI-Mäusen

Tab. 9.18 Errechnete Narkosegaskonzentrationen in der Kammer bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die errechneten Narkosegaskonzentrationen in [%] zu Beginn der Phase der Ataxie (= Atax), der Phase der Muskelrelaxation (= Relax) und der Phase der Bewusstlosigkeit (= LORR) sowie zum Zeitpunkt des Verlustes des Zwischenzehenreflexes (= LOPR) bzw. der chirurgischen Toleranz (= CT).

NMRI	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]	4	16	15	10	16	10	14
Atax	16,1	22,1	27,2	0,8	1,5	1,5	2,4
Relax	--*	36,3	44,2	1,7	2,8	4,0	4,9
LORR	31,1	44,3	57,3	1,8	3,1	4,2	5,6
LOPR/CT	58,1	61,0	66,2	1,9	3,5	4,6	6,5

* Narkosegaskonzentration zu Beginn der Phase der Muskelrelaxation konnte nicht berechnet werden, da die Werte für die Latenz bis zur Muskelrelaxation der CO₂ 20-Gruppe nicht eindeutig zu bestimmen waren.

9.3.4 Errechnete Narkosegaskonzentrationen bei C57BI/6-Mäusen

Tab. 9.19 Errechnete Narkosegaskonzentrationen in der Kammer bei C57BI/6-Mäusen

Dargestellt sind die errechneten Narkosegaskonzentrationen in [%] zu Beginn der Phase der Ataxie (= Atax), der Phase der Muskelrelaxation (= Relax) und der Phase der Bewusstlosigkeit (= LORR) sowie zum Zeitpunkt des Verlustes des Zwischenzehenreflexes (= LOPR) bzw. der chirurgischen Toleranz (= CT).

C57BI/6	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]	5	15	16	14	16	13	16
Atax	11,0	19,8	24,7	0,6	1,3	1,7	2,4
Relax	27,4	38,1	46,0	1,4	2,4	3,4	4,5
LORR	30,3	45,1	56,6	1,5	2,7	3,7	5,0
LOPR/CT	48,0	55,1	65,3	1,9	3,4	4,5	6,0

9.3.5 Blutwerte bei NMRI-Mäusen

Tab. 9.20 Glukose-, Adrenalin- und Noradrenalinwerte bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Konzentrationen der Blutglukose in [mmol/l], Adrenalin und Noradrenalin im Plasma in [ng/ml] als Median (0,25/0,75-Quantile) zum Zeitpunkt der CT. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

Median (0,25/0,75)	Glukose [mmol/l]	Adrenalin [ng/ml]	Noradrenalin [ng/ml]
Luft (16)	9,400 (8,050/9,850)	12,370 (11,525/14,770)	15,000 (13,100/20,770)
CO₂ 20 (4)	14,950 (12,950/18,850)	24,980 (22,775/26,530)	44,015 (35,465/56,610)
CO₂ 60 (16)	9,300 (7,600/11,225)	30,600 (21,990/35,435)	61,910 (51,200/78,880)
CO₂ 100 (16)	9,400 (7,250/11,500)	44,290 (25,118/51,665)	65,880 (49,290/72,875)
Iso 2% (10)	13,850 (12,600/15,500)	7,745 (6,260/10,590)	5,830 (5,300/8,370)
Iso 5% (16)	11,550 (10,050/12,900)	4,065 (2,535/6,215)	8,055 (5,575/8,990)
Sevo 4,8% (10)	12,600 (12,100/13,800)	2,030 (1,520/2,950)	4,445 (3,080/5,590)
Sevo 8% (14)	10,700 (9,400/11,400)	2,510 (1,320/5,420)	6,540 (4,960/7,880)

* Die CO₂ 60-Gruppe enthält für Glukose aufgrund einer Fehlbestimmung nur 15 Werte anstelle der sonst 16 Werte.

9.3.6 Blutwerte bei C57Bl/6-Mäusen

Tab. 9.21 Glukose-, Adrenalin- und Noradrenalinwerte bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Konzentrationen der Blutglukose in [mmol/l], Adrenalin und Noradrenalin im Plasma in [ng/ml] als Median (0,25/0,75-Quantile) zum Zeitpunkt der CT. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

Median (0,25/0,75)	Glukose [mmol/l]	Adrenalin [ng/ml]	Noradrenalin [ng/ml]
Luft (16)	8,050 (7,350/8,550)	8,205 (6,200/10,290)	10,955 (8,030/12,360)
CO₂ 20 (5)	7,800 (7,425/18,00)	20,00 (8,447/41,565)	42,030 (23,422/47,405)
CO₂ 60 (15)	7,400 (6,900/8,450)	16,960 (11,555/20,782)	30,460 (27,703/34,922)
CO₂ 100 (16)	7,600 (7,000/7,900)	18,180 (13,030/19,860)	31,075 (26,210/34,565)
Iso 2% (14)	11,900 (10,900/13,500)	5,240 (4,000/6,130)	2,960 (2,480/4,880)
Iso 5% (16)	9,300 (7,400/10,100)	4,070 (3,255/4,600)	3,290 (2,695/4,345)
Sevo 4,8% (13)	12,400 (10,550/12,800)	2,720 (1,715/3,660)	2,190 (1,428/3,010)
Sevo 8% (16)	10,350 (8,550/11,950)	1,570 (0,590/2,255)	2,865 (1,875/3,945)

9.3.7 Verhaltensparameter bei NMRI-Mäusen

Tab. 9.22 Rearings, gestresstes Putzverhalten, Überquerung der Mittellinie und Popcorn-Konvulsionen bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl der Rearings, der Anzahl der gestressten Putzperioden, der Überquerungen der Mittellinie und der Popcorn-Konvulsionen oder ihnen ähnliche Verhaltensweisen in [Anzahl/min] als Median (0,25/0,75-Quantile) vom Start der Narkoseeinleitung bis zum Beginn der Muskelrelaxation. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

Median (0,25/0,75)	Rearings* [Anzahl/min]	Gestresstes Putzverhalten [Anzahl/min]	Überquerung der Mittellinie [Anzahl/min]	Popcorn- Konvulsionen [Anzahl/min]
Luft (16)	10,600 (7,900/12,200)	0,500 (0,200/0,600)	3,700 (2,900/4,600)	0,000 (0,000/0,000)
CO₂ 20 (4)	5,714** (4,241/7,104)	0,000 (0,000/0,000)	2,795** (2,116/3,589)	0,000 (0,000/0,000)
CO₂ 60 (16)	3,551 (1,464/8,952)	0,000 (0,000/0,000)	4,922 (3,415/6,025)	0,000 (0,000/0,000)
CO₂ 100 (16)	7,059 (3,354/7,796)	0,000 (0,000/0,000)	6,000 (4,250/8,824)	0,000 (0,000/3,182)
Iso 2% (10)	8,228 (6,628/10,206)	0,000 (0,000/0,368)	7,095 (6,136/8,120)	0,800 (0,541/1,840)
Iso 5% (16)	10,877 (7,222/17,229)	0,000 (0,000/0,792)	10,216 (7,721/12,752)	0,000 (0,000/0,476)
Sevo 4,8% (10)	8,440 (7,200/10,141)	0,000 (0,000/0,000)	6,864 (6,258/8,160)	0,183 (0,000/0,952)
Sevo 8% (14)	8,796 (7,434/11,538)	0,000 (0,000/0,000)	8,648 (7,606/10,385)	0,000 (0,000/0,769)

* Die CO₂ 20-Gruppe enthält hier nur 3 Tiere. Ein Tier wurde ausgeschlossen, da es kein Rearing-Verhalten zeigen konnte, es kletterte auf der Gas-Verwirbelungsplatte.

** Dies ist nur ein angenäherter Wert, für dessen Bestimmung die Zeit bis zum Eintritt der Bewusstlosigkeit herangezogen wurde, da die Werte für die Latenz bis zur Muskelrelaxation der CO₂ 20-Gruppe nicht eindeutig zu bestimmen waren (s.a. Tab. 9.16). Der wahre Wert ist größer.

Tab. 9.23 Konvulsionen und exzitatorische Phänomene bei NMRI-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] der Tiere sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, die Running excitement (Running exc.), einen klonischen Krampfanfall und Opisthotonus während der Behandlung zeigten.

NMRI	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]	16	4	16	15	10	16	10	14
Running exc. [N]	--	--	--	--	10	16	10	14
Running exc. [%]	0	0	0	0	100	100	100	100
Klonischer Krampf [N]	--	--	--	--	10	16	10	14
Klonischer Krampf [%]	0	0	0	0	100	100	100	100
Opisthotonus [N]	--	--	--	--	9	4	9	9
Opisthotonus [%]	0	0	0	0	90	25	90	64

9 Anhang

Tab. 9.24 Hypotoner Gang und Ataxie bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl [N] der Tiere der Luftkontrollgruppe und der Behandlungsgruppen sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, die einen hypotonen Gang und Ataxie während der Behandlung zeigten.

NMRI	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]	16	4	16	15	10	16	10	14
Hypotoner Gang [N]	--	4	16	15	--	--	--	--
<i>Hypotoner Gang [%]</i>	<i>0</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
Ataxie [N]	--	4	16	15	10	16	10	14
<i>Ataxie [%]</i>	<i>0</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>100</i>

9.3.8 Verhaltensparameter bei C57Bl/6-Mäusen

Tab. 9.25 Rearings, gestresstes Putzverhalten, Überquerung der Mittellinie und Popcorn-Konvulsionen bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl der Rearings, der Anzahl der gestressten Putzperioden, der Überquerungen der Mittellinie und der Popcorn-Konvulsionen oder ihnen ähnliche Verhaltensweisen in [Anzahl/min] als Median (0,25/0,75-Quantile) vom Start der Narkoseeinleitung bis zum Beginn der Muskelrelaxation. Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

Median (0,25/0,75)	Rearings [Anzahl/min]	Gestresstes Putzverhalten [Anzahl/min]	Überquerung der Mittellinie [Anzahl/min]	Popcorn-Konvulsionen [Anzahl/min]
Luft (16)	5,900 (4,200/7,000)	0,600 (0,400/0,600)	1,800 (1,200/2,500)	0,000 (0,000/0,000)
CO₂ 20 (5)	1,875 (0,433/2,931)	0,000 (0,000/0,000)	2,500 (1,018/2,735)	0,000 (0,000/1,250)
CO₂ 60 (15)	1,250 (0,000/1,387)	0,000 (0,000/0,000)	3,529 (2,286/4,077)	0,000 (0,000/0,849)
CO₂ 100 (16)	1,429 (0,000/1,922)	0,000 (0,000/0,000)	2,859 (1,644/3,810)	0,000 (0,000/0,000)
Iso 2% (14)	2,943 (2,330/5,684)	0,000 (0,000/0,496)	4,051 (3,158/4,615)	0,000 (0,000/0,000)
Iso 5% (16)	4,333 (3,229/7,279)	0,000 (0,000/0,000)	5,310 (3,803/6,228)	0,000 (0,000/0,000)
Sevo 4,8% (13)	2,474 (1,173/4,114)	0,441 (0,000/0,588)	4,468 (3,340/5,388)	0,000 (0,000/0,000)
Sevo 8% (16)	3,233 (2,730/4,645)	0,000 (0,000/0,000)	6,714 (4,286/7,500)	0,000 (0,000/0,000)

Tab. 9.26 Konvulsionen und exzitatorische Phänomene bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] der Tiere sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, die Running excitement (Running exc.), einen klonischen Krampfanfall und Opisthotonus während der Behandlung zeigten.

C57Bl/6	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]	16	5	15	16	14	16	13	16
Running exc. [N]	--	--	--	--	8	12	13	16
<i>Running exc. [%]</i>	0	0	0	0	57	75	100	100
Klonischer Krampf [N]	--	--	---	--	--	--	10	4
<i>Klonischer Krampf [%]</i>	0	0	0	0	0	0	77	25
Opithotonus [N]	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Opisthotonus [%]</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 9.27 Hypotoner Gang und Ataxie bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind die Anzahl [N] der Tiere der Luftkontrollgruppe und der Behandlungsgruppen sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, die einen hypotonen Gang und Ataxie während der Behandlung zeigten.

C57Bl/6	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]	16	5	15	16	14	16	13	16
Hytotoner Gang [N]	--	5	15	16	--	--	--	--
<i>Hytotoner Gang [%]</i>	0	100	100	100	0	0	0	0
Ataxie [N]	--	5	15	16	14	16	13	16
<i>Ataxie [%]</i>	0	100	100	100	100	100	100	100

9.3.9 Makroskopische Untersuchung des Atemtraktes bei NMRI-Mäusen

Tab. 9.28 Trachealausfluss bei NMRI-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] der Tiere sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, bei denen nach der Behandlung Trachealausfluss auftrat. Der Befund 0 – 3 = nicht vorhanden, gering-, mittel- und schwergradig unterteilt.

NMRI	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]		16	4	16	15	10	16	10	14
Tracheal- ausfluss [N]	0	16	1	11	13	8	6	5	10
	1	--	1	--	1	2	7	4	1
	2	--	1	--	1	--	2	1	1
	3	--	1	5	--	--	1	--	2
Tracheal- ausfluss [%]	0	100	25	68,8	86,7	80	37,5	50	71,4
	1	0	25	0	6,7	20	43,8	40	7,1
	2	0	25	0	6,7	0	12,5	10	7,1
	3	0	25	31,3	0	0	6,3	0	14,3

Tab. 9.29 Makroskopischer Befund: Blutaspilation bei NMRI-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von Tieren sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, bei denen nach der Behandlung Blutaspilation auftrat. Der Befund ist in die Ausprägungsgrade 0 – 1 = nicht vorhanden und vorhanden unterteilt.

NMRI	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]		16	4	16	15	10	16	10	14
Blutaspilation [N]	0	7	4	13	12	8	13	8	10
	1	9	--	3	3	2	3	2	4
Blutaspilation [%]	0	43,8	100	81,3	80	80	81,3	80	71,4
	1	56,3	0	18,8	20	20	18,8	20	28,6

Tab. 9.30 Makroskopischer Befund: Atelektase bei NMRI-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von Tieren sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, bei denen nach der Behandlung Atelektase auftrat. Der Befund Atelektase ist in die Ausprägungsgrade 0 – 1 = nicht vorhanden und vorhanden unterteilt.

NMRI	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]		16	4	16	15	10	16	10	14
Atelektase [N]	0	16	2	13	9	4	16	5	11
	1	--	2	3	6	6	--	5	3
Atelektase [%]	0	100	50	81,3	60	40	100	50	78,6
	1	0	50	18,8	40	60	0	50	21,4

Tab. 9.31 Lungenparameter: absolutes und relatives Lungengewicht bei NMRI-Mäusen

Dargestellt ist das absolute Lungengewicht in [mg] und das relative Lungengewicht in [mg/g] als Median (0,25/0,75-Quantile). Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

Median (0,25/0,75)	Absolutes Lungengewicht [mg]	Relatives Lungengewicht [mg/g]
Luft (16)	281,5 (232,8/341,25)	9,278 (7,371/10,817)
CO ₂ 20 (4)	300,4 (273,8/309,3)	10,038 (8,563/10,245)
CO ₂ 60 (16)	295,7 (215,0/332,0)	8,252 (6,455/9,980)
CO ₂ 100 (16)	253,0 (208,9/267,3)	6,991 (5,860/8,488)
Iso 2% (10)	228,7 (207,9/263,4)	7,417 (6,323/8,399)
Iso 5% (16)	282,2 (253,1/338,25)	8,766 (6,907/9,539)
Sevo 4,8% (10)	237,5 (186,3/290,8)	7,568 (6,599/8,986)
Sevo 8% (14)	296,7 (219,6/338,3)	7,923 (6,462/10,211)

9 Anhang

Tab. 9.32 Lungengröße (Oberfläche) bei NMRI-Mäusen

Dargestellt ist die Lungengröße (dorsale Oberfläche) in [mm²] als Einzelwert. Es wurden je Gruppe vier zufällig ausgewählte Tiere untersucht.

NMRI	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Einzelwerte Lungengröße Dorsale Oberfläche [mm ²]	189,67	149,06	129,59	122,34	114,13	191,71	152,04	141,88
	191,13	166,09	160,61	134,71	133,31	208,59	161,87	187,80
	218,67	241,10	174,77	179,81	138,09	216,70	164,05	208,62
	284,07	260,29	193,22	192,93	192,32	223,86	286,85	222,14

Tab. 9.33 Makroskopischer Befund: Petechien und Einblutungen bei NMRI-Mäusen

Dargestellt sind Petechien und Einblutungen als Flächenanteil der dorsalen Lungenoberfläche in [%] als Einzelwert. Es wurden je Gruppe vier zufällig ausgewählte Tiere untersucht.

NMRI	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Einzelwerte Petechien und Blutungen Flächenanteil [%]	9,2	24,7	3,4	2,7	3,5	6,3	4,1	7,5
	24,2	32,9	13,9	4,1	9,1	26,2	4,6	18,0
	27,5	46,7	20,3	7,9	12,3	28,8	32,3	27,2
	59,2	46,8	28,4	10,4	37,1	45,9	40,5	29,2

9.3.10 Makroskopische Untersuchung des Atemtraktes bei C57Bl/6-Mäusen

Tab. 9.34 Trachealausfluss bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] der Tiere sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, bei denen nach der Behandlung Trachealausfluss auftrat. Der Befund 0 – 3 = nicht vorhanden, gering-, mittel- und schwergradig unterteilt.

C57Bl/6	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]		16	5	15	16	14	16	13	16
Tracheal- ausfluss [N]	0	15	1	14	16	8	9	6	9
	1	--	3	1	--	5	5	5	4
	2	1	1	--	--	1	1	1	2
	3	--	--	--	--	--	1	1	1
Tracheal- ausfluss [%]	0	93,8	20	93,3	100	57,1	56,3	46,1	56,3
	1	0	60	6,7	0	35,7	31,3	38,5	25
	2	6,3	20	0	0	7,1	6,3	7,7	12,5
	3	0	0	0	0	0	6,3	7,7	6,3

Tab. 9.35 Makroskopischer Befund: Blutaspiration bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von Tieren sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, bei denen nach der Behandlung Blutaspiration auftrat. Der Befund ist in die Ausprägungsgrade 0 – 1 = nicht vorhanden und vorhanden unterteilt.

C57Bl/6	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]		16	5	15	16	14	16	13	16
Blutaspiration [N]	0	4	--	8	5	9	7	7	8
	1	12	5	7	11	5	9	6	8
<i>Blutaspiration</i> [%]	0	25	0	53,3	31,3	64,3	43,8	53,8	50
	1	75	100	46,7	68,8	35,7	56,3	46,1	50

Tab. 9.36 Makroskopischer Befund: Atelektase bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von Tieren sowie der entsprechende prozentuale Anteil der Tiere, bei denen nach der Behandlung Atelektase auftrat. Der Befund Atelektase ist in die Ausprägungsgrade 0 – 1 = nicht vorhanden und vorhanden unterteilt.

C57Bl/6	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Gruppengröße [N]		16	5	15	16	14	16	13	16
Atelektase [N]	0	13	--	4	6	11	4	12	10
	1	3	5	11	10	3	12	1	6
<i>Atelektase</i> [%]	0	81,3	0	26,7	37,5	78,6	25	92,3	62,5
	1	18,8	100	73,3	62,5	21,4	75	7,7	37,5

Tab. 9.37 Lungenparameter: absolutes und relatives Lungengewicht bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt ist das absolute Lungengewicht in [mg] und das relative Lungengewicht in [mg/g] als Median (0,25/0,75-Quantile). Gruppengröße in Klammer hinter der Behandlungsgruppen-Bezeichnung.

Median (0,25/0,75)	Absolutes Lungengewicht [mg]	Relatives Lungengewicht [mg/g]
Luft (16)	178,3 (156,1/214,1)	7,466 (6,075/9,353)
CO₂ 20 (5)	311,6 (267,275/328,0)	10,771 (10,093/12,278)
CO₂ 60 (15)	206,1 (180,95/218,9)	8,768 (6,922/10,334)
CO₂ 100 (16)	196,25 (161,35/254,95)	7,656 (6,545/10,319)
Iso 2% (14)	179,8 (161,6/210,3)	7,606 (6,815/8,795)
Iso 5% (16)	167,55 (145,55/192,85)	7,205 (6,585/8,395)
Sevo 4,8% (13)	190,4 (170,025/235,95)	8,704 (7,796/9,835)
Sevo 8% (16)	180,7 (158,0/247,55)	8,566 (6,762/10,015)

Tab. 9.38 Lungengröße (dorsale Oberfläche) bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt ist die Lungengröße (dorsale Oberfläche) in [mm²] als Einzelwert. Es wurden je Gruppe vier zufällig ausgewählte Tiere untersucht.

C57Bl/6	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Einzelwerte Lungengröße Dorsale Oberfläche [mm ²]	128,95	124,5	94,76	99,90	110,24	123,87	136,25	117,65
	147,15	132,08	119,41	104,3	137,33	140,83	147,86	148,17
	167,02	134,73	139,43	118,49	139,60	153,12	152,31	164,78
	190,06	169,23	163,59	157,44	202,24	160,64	166,38	177,57

Tab. 9.39 Makroskopischer Befund: Petechien und Einblutungen bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt sind Petechien und Einblutungen als Flächenanteil der dorsalen Lungenoberfläche in [%] als Einzelwert. Es wurden je Gruppe vier zufällig ausgewählte Tiere untersucht.

C57Bl/6	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Einzelwerte Petechien und Blutungen Flächenanteil [%]	3,5	21,6	7,2	2,4	3,9	4,5	5,7	7,5
	8,5	30,1	7,8	11,4	5,1	6,2	21,0	25,8
	39,3	32,4	25,7	21,0	8,9	17,4	28,7	51,0
	60,5	47,0	42,0	39,3	26,5	66,4	35,4	54,6

9.3.11 Mikroskopische Untersuchung des Atemtraktes bei NMRI-Mäusen

Tab. 9.40 Mikroskopischer Befund: Blutaspiration bei NMRI-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von 4 zufällig ausgewählten Tieren einer Behandlungsgruppe bzw. der Kontrollgruppe, bei denen nach der Behandlung Blutaspiration in die Trachea und in die Bronchien auftraten. Der Befund Blutaspiration in die Trachea ist in die Ausprägungsgrade 0 – 1 = nicht vorhanden und vorhanden unterteilt. Der Befund Blutaspiration in die Bronchien ist in die Ausprägungsgrade 0 – 3 = nicht vorhanden, gering-, mittel- und schwergradig unterteilt.

NMRI	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Trachea: Blutaspiration [N]	0	1	1	1*	2	2	--	1	--
	1	3	3	2*	2	2	4	3	4
Bronchien: Blutaspiration [N]	0	--	1	1	3	2	--	--	--
	1	4	3	--	--	--	1	3	2
	2	--	--	3	1	2	3	--	2
	3	--	--	--	--	--	--	1	--

* nur 3 Schnitte ausgewertet, auf dem vierten war die Trachea nicht vorhanden

Tab. 9.41 Mikroskopischer Befund: Blutfülle und Blutstau bei NMRI-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von 4 zufällig ausgewählten Tieren einer Behandlungsgruppe bzw. der Kontrollgruppe, bei denen nach der Behandlung gestaute und gefüllte Venen und Kapillaren (Blutfülle/-stau) auftraten. Die Befunde sind in die Ausprägungsgrade 0 – 1 = nicht vorhanden und vorhanden unterteilt.

NMRI	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Venen: Blutfülle/-stau [N]	0	2	3	3	3	1	2	1	2
	1	2	1	1	1	3	2	3	2
Kapillaren: Blutfülle/-stau [N]	0	--	--	--	1	1	--	--	1
	1	4	4	4	3	3	4	4	3

Tab. 9.42 Mikroskopischer Befund: Einblutungen in das Lungengewebe bei NMRI-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von 4 zufällig ausgewählten Tieren einer Behandlungsgruppe bzw. der Kontrollgruppe, bei denen nach der Behandlung Einblutungen in die Alveolarsepten und den Alveolarraum auftraten. Die Befunde sind in die Ausprägungsgrade 0 – 4 = nicht vorhanden, gering-, mittel-, schwer- und höchstgradig unterteilt.

NMRI	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Einblutungen in Alveolarsepten [N]	0	--	--	1	1	1	--	--	--
	1	1	1	--	2	2	--	2	1
	2	3	1	2	--	1	4	2	3
	3	--	2	1	1	--	--	--	--
	4	--	--	--	--	--	--	--	--
Einblutungen in Alveolarraum [N]	0	--	--	--	1	2	--	--	--
	1	2	--	1	2	--	--	2	1
	2	2	4	2	1	2	3	1	3
	3	--	--	1	--	--	1	1	--
	4	--	--	--	--	--	--	--	--

Tab. 9.43 Mikroskopischer Befund: Atelektase bei NMRI-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von 4 zufällig ausgewählten Tieren einer Behandlungsgruppe bzw. der Kontrollgruppe, bei denen nach der Behandlung Atelektasen auftraten. Die Befunde sind in die Ausprägungsgrade 0 – 4 = nicht vorhanden, gering-, mittel-, schwer- und höchstgradig unterteilt.

NMRI	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Atelektase [N]	0	4	3	2	1	3	4	4	4
	1	--	--	2	1	1	--	--	--
	2	--	--	--	0	--	--	--	--
	3	--	--	--	1	--	--	--	--
	4	--	1	--	1	--	--	--	--

Tab. 9.44 Mikroskopischer Befund: Luftgehalt der Lunge bei NMRI-Mäusen

Dargestellt ist der Luftgehalt als zell- und matrixfreier Flächenanteil des Sichtfeldes in [%] als Einzelwert (Mittelwert aus 30 Sichtfeldern). Es wurden je Gruppe vier zufällig ausgewählte Tiere untersucht.

NMRI	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Einzelwerte Luftgehalt der Lunge Flächenanteil [%]	53,61	38,72	41,97	38,70	40,11	43,34	37,66	43,73
	58,91	41,84	51,16	41,02	57,35	49,80	53,03	50,09
	60,03	45,76	51,68	57,43	58,84	53,01	58,73	52,80
	67,87	52,93	55,75	59,49	60,69	53,33	63,73	58,92

9.3.12 Mikroskopische Untersuchung des Atemtraktes bei C57Bl/6-Mäusen

Tab. 9.45 Mikroskopischer Befund: Blutaspiration bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von 4 zufällig ausgewählten Tieren einer Behandlungsgruppe bzw. der Kontrollgruppe, bei denen nach der Behandlung Blutaspiration in die Trachea und in die Bronchien auftraten. Der Befund Blutaspiration in die Trachea ist in die Ausprägungsgrade 0 – 1 = nicht vorhanden und vorhanden unterteilt. Der Befund Blutaspiration in die Bronchien ist in die Ausprägungsgrade 0 – 3 = nicht vorhanden, gering-, mittel- und schwergradig unterteilt.

C57Bl/6	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Trachea: Blutaspiration [N]	0	2*	3	2	2	4	3		1
	1	1*	1	2	2	--	1	2	3
Bronchien: Blutaspiration [N]	0	1	2	--	2	1	1	12	1
	1	2	2	3	--	3	2	1	1
	2	1	--	1	2	--	--	2	1
	3	--	--	--	--	--	1	--	1

* nur 3 Schnitte ausgewertet, auf dem vierten war die Trachea nicht vorhanden

Tab. 9.46 Mikroskopischer Befund: Blutfülle und Blutstau bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von 4 zufällig ausgewählten Tieren einer Behandlungsgruppe bzw. der Kontrollgruppe, bei denen nach der Behandlung gestaute und gefüllte Venen und Kapillaren (Blutfülle/-stau) auftraten. Die Befunde sind in die Ausprägungsgrade 0 – 1 = nicht vorhanden und vorhanden unterteilt.

C57Bl/6	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Venen: Blutfülle/-stau [N]	0	2	--	2	3	4	3	4	3
	1	2	4	2	1	--	1	--	1
Kapillaren: Blutfülle/-stau [N]	0	--	--	--	--	1	1	2	2
	1	4	4	4	4	3	3	2	2

9 Anhang

Tab. 9.47 Mikroskopischer Befund: Einblutungen in das Lungengewebe bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von 4 zufällig ausgewählten Tieren einer Behandlungsgruppe bzw. der Kontrollgruppe, bei denen nach der Behandlung Einblutungen in die Alveolarsepten und den Alveolarraum auftraten. Die Befunde sind in die Ausprägungsgrade 0 – 4 = nicht vorhanden, gering-, mittel-, schwer- und höchstgradig unterteilt.

C57Bl/6	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Einblutungen in Alveolarsepten [N]	0	--	--	--	2	--	1	--	1
	1	2	4	2	1	2	2	1	--
	2	1	--	1	1	2	1	3	1
	3	1	--	--	--	--	--	--	2
	4	--	--	1	--	--	--	--	--
Einblutungen in Alveolarraum [N]	0	--	--	--	2	1	2	--	1
	1	2	1	1	--	3	1	1	--
	2	2	3	3	2	--	--	2	1
	3	--	--	--	--	--	--	1	2
	4	--	--	--	--	--	1	--	--

Tab. 9.48 Mikroskopischer Befund: Atelektase bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl [N] von 4 zufällig ausgewählten Tieren einer Behandlungsgruppe bzw. der Kontrollgruppe, bei denen nach der Behandlung Atelektasen auftraten. Die Befunde sind in die Ausprägungsgrade 0 – 4 = nicht vorhanden, gering-, mittel-, schwer- und höchstgradig unterteilt.

C57Bl/6	Ausprägungsgrad	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Atelektase [N]	0	4	--	3	1	4	4	4	4
	1	--	--	--	--	--	--	--	--
	2	--	1	--	2	--	--	--	--
	3	--	3	--	1	--	--	--	--
	4	--	--	1	--	--	--	--	--

Tab. 9.49 Mikroskopischer Befund: Luftgehalt der Lunge bei C57Bl/6-Mäusen

Dargestellt ist der Luftgehalt als zell- und matrixfreier Flächenanteil des Sichtfeldes in [%] als Einzelwert (Mittelwert aus 30 Sichtfeldern). Es wurden je Gruppe vier zufällig ausgewählte Tiere untersucht.

C57Bl/6	Luft	CO ₂ 20	CO ₂ 60	CO ₂ 100	Iso 2%	Iso 5%	Sevo 4,8%	Sevo 8%
Einzelwerte Luftgehalt der Lunge Flächenanteil [%]	51,27	33,06	47,73	44,04	57,06	44,30	49,08	47,27
	59,81	42,74	55,67	45,72	61,15	53,57	59,55	50,51
	62,60	43,96	64,75	46,70	61,89	60,08	61,89	60,73
	75,01	62,87	68,25	62,05	62,57	63,13	77,99	74,27

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt ...

... Prof. Dr. Heidrun Fink, die es mir ermöglicht hat, das „CO₂-Projekt“ unter einer ausgezeichneten Betreuung, sowohl selbstständig etablieren als auch bearbeiten zu können. Großer Dank auch für die vielen konstruktiven Gespräche und aufbauenden Worte.

... Prof. Dr. Jörg Luy für die Vermittlung eines grundlegenden ethischen Verständnisses bei Versuchstierangelegenheiten.

... Dr. Bettina Bert für sehr interessante und lehrreiche Diskussionen bei der Entwicklung und Durchführung des Projektes.

... Prof. Dr. Johanna Plendl und Dr. Hana Hünigen für die sehr gute Betreuung des histologischen Teils der Arbeit.

... allen Institutsmitarbeitern für eine tolle Zusammenarbeit. Großer Dank vor allem an Norbert Mnichatz für die Herstellung des Narkosebox-Deckels, und an Carmen Bohnwagner, unsere HPLC-Expertin, die mit ihrem Feingefühl und ihrer Exaktheit aus der noch so kleinsten Probenmenge eine verlässliche Messung zustande bringt.

Großer Dank an Dr. Jan Brosda und Dr. Silke Dietze, für gute und motivierende Gespräche und an Dr. Melanie Hamann und Dr. Svenja Sander für die immer und sofort gewährte Hilfe. Großer Dank auch an Sabine Jacobs und Robert Haberzettl.

... Karin Briest, die mich in das histologische Handwerk einführte und immer ein liebes Wort und offenes Ohr für mich hat.

... Alexandra Wistel, die mit ihrer Genauigkeit und Ausdauer nicht nur bei der Histologie unentbehrlich war, von der ich viel lernen und mit der ich viel lachen kann.

... Lena Kolbowski, die mit ihrem Fingerspitzengefühl und Entscheidungsfähigkeit in der histologischen Arbeit unersetzlich war und auf die ich mich immer verlassen konnte.

... Lena Menken, die selbst den Mäusezirkus hinter sich hat, die mit viel Einfühlung, Geduld und Ausdauer einen großen Beitrag zur Klärung der CO₂-Frage beitrug.

Mit euch allen zusammenzuarbeiten hat viel Spaß gemacht!

... und Pawel, der alle Höhen und Tiefen an meiner Seite mit durchsteht, der mir viel Kraft und Zuversicht gibt. Und das Schönste: Endless Summer!

11 Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den

Nicole Marquardt