

Aus der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E. Kochs)

und aus dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung

der Technischen Universität München

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)

angefertigt in der interdisziplinären Arbeitsgruppe Neuroprotektion unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. med. C. Werner

Vorgelegt über den

Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie

am Institut für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)

Der Einfluss des Anästhetikums Sevofluran auf die Expression Apoptose-assoziierter Proteine nach inkompletter cerebraler Hemisphärenischämie bei der Ratte im protrahierten zeitlichen Verlauf

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Cornelia Haczek

aus

München

München, 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum.....	2
2.1	Anatomische und histologische Grundlagen.....	2
2.1.1	Anatomie des Rattenhirns	2
2.1.2	Allgemeine Histologie des Nervensystems.....	3
2.1.3	Anatomie und Feinbau des Hippocampus.....	3
2.2	Tiermodelle cerebraler Ischämie.....	4
2.2.1	Tiermodelle für die globale cerebrale Ischämie.....	5
2.2.2	Tiermodelle für die fokale cerebrale Ischämie.....	6
2.3	Pathophysiologie der cerebralen Ischämie.....	6
2.3.1	Mechanismen der cerebralen Ischämie	6
2.3.2	Folgen der cerebralen Ischämie	8
2.3.2.1	Nekrose	8
2.3.2.2	Apoptose	9
2.3.3	Expression Apoptose-assoziiierter Proteine.....	11
2.3.3.1	Pro-apoptotische Proteine	11
2.3.3.2	Anti-apoptotische Proteine.....	13
2.3.4	Cerebrale Ischämie im zeitlichen Verlauf.....	14
2.4	Neuroprotektion	15
2.4.1	Möglichkeiten der Neuroprotektion.....	15
2.4.1.1	Reduktion des cerebralen Metabolismus durch Hypothermie	15
2.4.1.2	Senkung des intrakraniellen Drucks durch Hyperventilation	16
2.4.1.3	Antagonisierung der Exzitotoxine.....	16
2.4.1.4	Reduktion der freien Radikal-Bildung und deren Wirkung.....	16
2.4.1.5	Verbesserung der Reperfusion	17
2.4.2	Therapieansätze durch Anästhetika.....	17
2.4.2.1	Intravenöse Anästhetika	17
2.4.2.2	Inhalationsanästhetika	18
2.5	Sevofluran	19
2.5.1	Physikalische und chemische Charakteristika	19
2.5.2	Pharmakokinetik	20
2.5.2.1	Löslichkeitskoeffizient und Verteilung.....	20
2.5.2.2	Metabolismus	21
2.5.3	Pharmakodynamik.....	21
2.5.3.1	Minimale alveoläre Konzentration.....	21
2.5.3.2	Wirkung auf den Respirationstrakt	22
2.5.3.3	Wirkung auf die Blutgase und den Säure-Basen-Haushalt.....	22
2.5.3.4	Wirkung auf das cardiovaskuläre System	22
2.5.3.5	Neuromuskuläre Wirkung.....	23
2.5.3.6	Einfluss von Sevofluran auf das Zentrale Nervensystem	24
2.5.3.6.1	Einfluss von Sevofluran auf die Körpertemperatur	25
2.5.3.6.2	Einfluss von Sevofluran auf Leber und Nieren.....	25
2.5.3.6.3	Einfluss von Sevofluran auf Blutglucose und Hormone.....	26
2.5.4	Toxikologie von Sevofluran.....	26
3.	Eigene Untersuchungen	28
3.1	Zielvorstellung	28
3.2	Material und Methodik.....	29
3.2.1	Versuchstiere und deren Haltung	29
3.2.2	Einteilung der Versuchstiergruppen	29
3.2.3	Versuchsvorbereitung	30

3.2.4	Versuchsdurchführung	30
3.2.4.1	Operativer Teil	31
3.2.4.1.1	Vorbereitung	31
3.2.4.1.2	Anästhesie, Narkose-Monitoring und Messparameter	31
3.2.4.1.3	Präischämische OP-Phase	36
3.2.4.1.4	Ischämie	38
3.2.4.1.5	Postischämische OP-Phase.....	38
3.2.4.2	Analytischer Teil.....	39
3.2.4.2.1	Probenentnahme und Präparation des Gehirns	39
3.2.4.2.2	Untersuchungsmethoden.....	40
3.2.4.3	Statistische Befundbewertung.....	55
3.2.4.4	Geräte und Material.....	56
3.2.4.4.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	56
3.2.4.4.2	Immunfluoreszenz.....	57
3.2.4.4.3	Western-Blot	58
3.3	Ergebnisse	62
3.3.1	Operativer Teil	62
3.3.1.1	Physiologische Messparameter	62
3.3.1.2	Gehirndurchblutung	65
3.3.1.3	Periphere und pericranielle Körpertemperatur.....	67
3.3.2	Analytischer Teil.....	67
3.3.2.1	Analyse des pro-apoptotischen Bax-Proteins.....	69
3.3.2.2	Analyse des pro-apoptotischen p53-Proteins	73
3.3.2.3	Analyse des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins	77
3.3.2.4	Analyse des anti-apoptotischen Mdm-2-Proteins	81
4.	Diskussion.....	86
4.1	Diskussion der Versuchsdurchführung	87
4.1.1	Ischämiemodell	87
4.1.2	Untersuchungszeitpunkte	88
4.1.3	Semiquantitative Proteinbestimmung durch Immunfluoreszenz	89
4.1.4	Proteinkonzentrationsbestimmung mit der Western-Blot-Analyse	90
4.2	Diskussion der Ergebnisse	92
4.2.1	Operativer Teil	92
4.2.1.1	Physiologische Messparameter	92
4.2.1.2	Gehirndurchblutung	94
4.2.2	Analytischer Teil.....	95
4.2.2.1	Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse	95
4.2.2.2	Bax-Protein	97
4.2.2.3	p53-Protein.....	98
4.2.2.4	Bcl-2-Protein	100
4.2.2.5	Mdm-2-Protein.....	102
4.2.3	Der Einsatz von Sevofluran als mögliches Neuroprotektivum.....	103
4.3	Schlussfolgerung und Ausblicke	105
5.	Zusammenfassung.....	107
6.	Summary	108
7.	Literaturverzeichnis.....	109
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	131
9.	Danksagung.....	134
10.	Lebenslauf.....	135

1 EINLEITUNG

Der Tod von neuronalen Zellen stellt sowohl eine wichtige physiologische Komponente während der Entwicklung des Nervensystems, als auch die Basis aller neurodegenerativen Erkrankungen dar (WATERS 1996). Dabei ist in den Industrienationen die cerebrale Zirkulationsstörung, insbesondere die der cerebralen Ischämie, klinisch von besonderer Bedeutung.

Cerebrale Ischämien sind nach dem Myocardinfarkt und den malignen Tumoren die dritthäufigste Todesursache in Deutschland. Neben dem Schlaganfall tritt die cerebrale Minderdurchblutung vor allem bei Schädel-Hirn-Trauma, während neuro-, cardio- oder gefäßchirurgischer Eingriffe und nach cardio-pulmonaler Reanimation auf. Als Ursachen von Spätinvalidität und Pflegebedürftigkeit stehen die Folgen eines Schlaganfalls an erster Stelle. Allein in den USA beliefen sich die direkten und indirekten Kosten der Schlaganfallbehandlung im Jahr 1998 auf 43,3 Milliarden Dollar (WHITE et al. 2000).

Der Erfolg von akuten therapeutischen Interventionen bei einer cerebralen Ischämie hängt im Wesentlichen davon ab, wie schnell der Patient zur Behandlung kommt. Je zeitiger die Behandlungsmaßnahmen einsetzen, umso mehr besteht die Möglichkeit, minderdurchblutetes Hirngewebe vor einer ischämischen Nekrose zu bewahren. Neuroprotektive Maßnahmen z.B. durch den Einsatz des Anästhetikums Sevofluran (WARNER et al. 1993) oder durch kontrollierte Hypothermie (WERNER 1997) sind tierexperimentell belegt. Studien zur längerfristigen neuroprotektiven Wirkung des Sevofluran sind bis heute unvollständig.

Die neuronale Schädigung nach Herz-Kreislaufstillstand (globale cerebrale Ischämie) und Schlaganfall (fokale cerebrale Ischämie) ist eine der Hauptursachen für die hohe Morbidität und Mortalität dieser Krankheitsbilder. Eines der Merkmale ist hierbei das verzögerte Auftreten von Nervenzelluntergängen, der Apoptose (ENDRES et al. 1998). Aus der Erkenntnis, dass nach cerebraler Ischämie Apoptose-assoziierte Schädigungsmechanismen eine Rolle spielen, ergeben sich neue therapeutische Ansätze.

In der vorliegenden Arbeit werden im tierexperimentellen Ischämiemodell die Expression der Apoptose-assoziierten Proteine Bax, Bcl-2, p53 und Mdm-2 unter Einfluss des volatilen Anästhetikums Sevofluran qualitativ und quantitativ in zeitlichen Verlauf von 28 Tagen untersucht. Aus dem verwendeten Tiermodell abzuleitende Therapiekonzepte könnten möglicherweise weitere Ansätze für eine zukünftige klinische Anwendung liefern.

2 **SCHRIFTTUM**

2.1 **Anatomische und histologische Grundlagen**

2.1.1 **Anatomie des Rattenhirns**

Das Gehirn, der craniorostrale Teil des zentralen Nervensystems, liegt von den Hirnhäuten (Meninges) umschlossen in der soliden Knochenkapsel der Schädelhöhle (Cavum cranii).

Bei dem Gehirn (Encephalon, Cerebrum) der Ratte lassen sich makroskopisch 5 Abschnitte unterscheiden:

- das Großhirn (Telencephalon) mit den beiden Großhirnhälften (Hemisphären) und ihrer Rinde (Cortex), dem Marklager, den Stammganglien und dem Riechhirn (Rhinencephalon)
- das Zwischenhirn (Diencephalon) mit Thalamus, Hypothalamus, der Epiphyse und dem Mammillarkörper
- das Mittelhirn (Mesencephalon) mit der Vierhügelplatte, der Haube und den zwei Hirnschenkeln
- das Hinterhirn (Metencephalon) mit der Brücke und dem Kleinhirn (Cerebellum)
- und zuletzt das verlängerte Mark (Medulla oblongata)

(HEBEL und STROMBERG 1976, NICKEL et al. 1991, WALKER und HOMBERGER 1997). Die Anatomie der Gefäßversorgung des Rattengehirnes entspricht im Wesentlichen der des Menschen (YAMORI et al. 1976)

Die Blutversorgung des Gehirns erfolgt über das beidseits angelegte Hauptgefäß A. carotis interna, das durch Zuflüsse aus den Stromgebieten der Aa. vertebrales, occipitales und spinales ergänzt wird. Die Aa. carotides internae entspringen aus der A. carotis communis, die lateral der Trachea entlangläuft. Es existiert ein anteriores und posteriores Stromgebiet, das durch eine Anastomose (Circulus arteriosus cerebri (Willisii)) miteinander in Verbindung steht. Die A. carotis interna teilt sich auf in die A. cerebri rostralis, die die craniale und mediale Hemisphäre versorgt und in die A. cerebri media, die die Lateralfläche der Hemisphäre vaskularisiert (HEBEL und STROMBERG 1976, NICKEL et al. 1991, WALKER und HOMBERGER 1997). Aus der A. vertebralis entspringt die A. basilaris und bildet mit den daraus abgehenden Aa. cerebri posteriores den posterioren Hirnkreislauf. Von dem Circulus arteriosus cerebri gehen die Aa. cerebri caudales ab, die das Mittelhirn und mit Abzweigungen das Kleinhirn versorgen (NICKEL et al. 1991).

Der Stoffwechsel im Gehirn kann grundsätzlich in einen Struktur- und einen Funktionsstoffwechsel eingeteilt werden (NEMOTO et al. 1996, WERNER 1997).

Der Strukturstoffwechsel, mit 40 % Anteil am Gesamtstoffwechsel, bildet die nötigen Proteine und Transmitter und hält das Membranpotential konstant. Der Funktionsstoffwechsel, mit 60 % Anteil am Gesamtstoffwechsel, hält die efferenten und afferenten Prozesse aufrecht (WERNER 1997).

Durchschnittlich kann beim Menschen ein cerebraler Blutdurchfluss von ca. 50 ml/100g/min bei einem mittleren cerebralen Perfusionsdruck von 60 bis 140 mmHg gemessen werden (KEMPSKI 1994).

Unterschreitet der cerebrale Blutfluss einen Wert von 18 ml/100g/min, wird der Funktionsstoffwechsel eingestellt. Sinkt der Wert auf 12 bis 18 ml/100g/min bleibt der Strukturstoffwechsel bestehen und eine Penumbra entsteht. Unter einer Penumbra versteht man die paraischämische Zone, die trotz Fehlen einer elektrischen Erregbarkeit ein noch erhaltenes Membranpotential der enthaltenen Neuronen aufweist (HAKIM 1987).

Wenn der Wert des cerebralen Blutflusses auf unter 12 ml/100g/min sinkt, kommt es zu morphologischen Veränderungen und Zelluntergang (KEMPSKI 1994).

2.1.2 Allgemeine Histologie des Nervensystems

Histogenetisch baut sich das Nervensystem aus dem Nervengewebe ektodermalen Ursprungs und dem umhüllenden Bindegewebe mit den sekundär einwachsenden Blutgefäßen mesodermalen Ursprungs auf.

Das Nervengewebe kann funktionell in zwei Zelltypen eingeteilt werden (NICKEL et al. 1991, HEES und SINOWATZ 1992):

In die Neurogliazellen, die Abgrenzungs- und Stoffwechselfunktionen übernehmen, und in die Ganglienzellen, die die Erregung bilden und weiterleiten. Die Neurogliazellen selbst können in drei Zellformen eingeteilt werden: In die Ependymzellen, die als einschichtiges Epithel die Binnenräume des Gehirns auskleiden, in die Astrocyten und die Oligodendrocyten.

2.1.3 Anatomie und Feinbau des Hippocampus

Zur bogenförmigen Hippocampusformation gehören der Hippocampus, auch Ammonshorn (Cornu ammonis) genannt, der Gyrus parahippocampalis, der Gyrus dentatus, die Fimbria hippocampi und der Fornix. Der Hippocampus wird erst nach Eröffnung des Seitenventrikels sichtbar. Er stellt eine S-förmige Einrollung der ventromedialen Hemisphärenwand dar. Grobstrukturell kann die Hippocampusformation in die CA1-, CA2-, CA3- und die CA4-Region unterteilt werden, welche sich zwischen den oberen und unteren Ästen des Gyrus dentatus einschiebt (NICKEL et al. 1991).

Im Feinbau des Hippocampus sind drei Schichten zu unterscheiden. Zuerst das Stratum moleculare, in dem Endverzweigungen afferenter Nervenfasern und Spitzendendriten der großen Pyramidenzellen zu finden sind. Im Stratum moleculare wird in tieferen Lagen das Stratum lacunosum, bestehend aus markhaltigen Tangentialfasern, gebildet. Dann folgt das Stratum pyramidale bestehend aus kleinen und großen Pyramidenzellen, die durch Dendritenbüschel mit der Molekularschicht und den polymorphen Zellen in Verbindung stehen. An die Schicht der Pyramidenzellen schließt das Stratum multiforme, das von Assoziationszellen gebildet wird, an (NICKEL et al. 1991).

Der Gyrus dentatus, der kappenartig dem freien Ende des Hippocampus aufsitzt, dient vermutlich der Ausbreitung zuströmender Erregungen aus dem Hippocampus. Er besteht aus der Molekularschicht, der Körnerschicht und einer polymorphzelligen Schicht. Die Körnerschicht setzt sich aus kleinen modifizierten Pyramidenzellen zusammen, deren Axone an den großen Pyramidenzellen des Hippocampus enden. Embryologisch gesehen entsteht der Hippocampus mit seinen Anteilen im Telencephalon, ventromedial der Hemisphärenbläschen, die sich später zu den Großhirnhemisphären ausbilden (NICKEL et al. 1991, HEES und SINOWATZ 1992).

Der Hippocampus erweist sich bei Studien und zur Bewertung von Ischämieschäden als besonders geeignet, da dieser auf Störungen im cerebralen Stoffwechsel selektiv vulnerabel reagiert (BONNEKOH et al. 1990).

In der Literatur wird von Zellschäden als Reaktion auf eine Ischämie vor allem in der CA1-Region des Hippocampus gesprochen, während in den restlichen Bezirken des Gehirns eher Ischämie-induzierte Folgereaktionen entstehen (ITO et al. 1975, KRAJEWSKI et al. 1995).

2.2 Tiermodelle cerebraler Ischämie

Die beim Menschen entstehenden cerebralen Ischämien sind in ihrem Manifestationsgrad, ihrer Ursache und Anatomie meist so verschieden, dass sie für klinische Studien und deren Analyse keine konstanten Rahmenbedingungen bieten können. Um reproduzierbare Verhältnisse für die Untersuchung von cerebralen Ischämien zu schaffen, wurde die Entwicklung experimenteller Tiermodelle nötig.

Ratten erweisen sich aus verschiedenen Gründen für dieses Modell als besonders geeignet. Zum einen entstehen relativ geringe Anschaffungs- und Haltungskosten, zum anderen kann durch die Verwendung einer bestimmten Abstammungslinie von gleichen Versuchsbedingungen ausgegangen werden. Das Rattenhirn ist dem Gehirn von

höherentwickelten Spezies ähnlich und aufgrund der geringen Größe für analytische Meßmethoden gut geeignet (GINSBERG und BUSTO 1989).

Man unterscheidet zwischen Modellen, die eine globale cerebrale Ischämie und denjenigen, die eine fokale cerebrale Ischämie verursachen.

2.2.1 Tiermodelle für die globale cerebrale Ischämie

Es gibt verschiedene experimentelle Methoden, die eine globale Ischämie hervorrufen können. Die globale Ischämie ist meist vorübergehend und betrifft große Areale des Gehirns. Die größten Veränderungen am Hirngewebe entstehen an selektiv vulnerablen Regionen wie z.B. dem Hippocampus (GINSBERG und BUSTO 1989).

Es sind mehrere Methoden einer experimentellen globalen Ischämie in der Literatur beschrieben. Eine Methode zur Erzeugung einer globalen cerebralen Ischämie ist die so genannte „two-vessel occlusion“. In diesem Modell wird der bilaterale Verschluss beider Aa. carotides mit einer systemischen Hypotension kombiniert (EKLÖF und SIESJÖ 1972). Dabei handelt es sich aber um eine inkomplette globale Ischämie, da das Gehirn noch über Kollateralgefäße versorgt wird.

In der Literatur wird 1979 die „four-vessel occlusion“ von PULSINELLI und BRIERLEY beschrieben. Diese Methode setzt sich aus zwei Schritten zusammen. Zuerst werden unter Anästhesie die Vertebralarterien mit einem Elektrokauter koaguliert und bilateral um die CCA (common carotid artery) atraumatische Clips angebracht. Im zweiten Schritt, der 24 Stunden später stattfindet, werden die Clips verschlossen.

Eine weitere Möglichkeit, eine globale cerebrale Ischämie auszulösen, ist die Erhöhung des cerebrospinalen Flüssigkeitsdrucks. LJUNGGREN et al. (1974) führen diese Methode bei Ratten durch, indem sie künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) in die Cisterna magna infundieren und damit den CSF-Druck auf 20 bis 70 mmHg über den arteriellen Blutdruck erhöhen. Andere Versuche mit einer kombinierten CCA Okklusion folgen (BUSTO und GINSBERG 1985).

Eine weitere Variante, die „neck tourniquet“-Methode hat sich nicht durchgesetzt. Hierbei wird dem Tier eine aufblasbare Halsmanschette angelegt und soweit gefüllt (600 bis 700 mmHg), bis eine Komprimierung der Gefäße erfolgt. Die cerebrale Perfusion kann dabei bis auf < 1 % der ursprünglichen Durchblutung gesenkt werden (SIEMKOWICZ und HANSEN 1978).

Auch der durch eine K⁺ - Infusion induzierte Herzstillstand stellt eine weitere Möglichkeit zur Entstehung einer globalen cerebralen Ischämie dar (NAKASHIMA et al. 1995).

2.2.2 Tiermodelle für die fokale cerebrale Ischämie

Bei einer fokalen Ischämie kommt es zu einer lokal begrenzten Ischämiezone. Die bei der Ratte induzierte fokale Ischämie ist ein weit verbreitetes Modell zur Untersuchung des Hirninfarkts beim Menschen (GARCIA et al. 1993). Das heutzutage am häufigsten verwendete Modell ist die sogenannte Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) mit seinen Modifikationen (MOLINARI 1976, GARCIA 1984, CHOPP et al. 1992) und die kombinierten Formen mit einem gleichzeitigen CCA-Verschluss (CHARRIAUT-MARLANGUE et al. 1998).

Das Tiermodell der MCAO nähert sich den Verhältnissen eines menschlichen Hemisphäreninfarkts an und ist daher besonders für die Untersuchung diverser Therapeutika geeignet. Eine ausführliche Beschreibung der Operationstechnik der MCAO ist von TAMURA et al. 1981 veröffentlicht worden.

In einer anderen Studie verschließen HOFFMAN und THOMAS (1996) nur die rechte A. carotis communis und kombinieren diese mit einer Hypotension. (Das Modell entspricht, abgesehen von einigen Modifikationen, im Grundprinzip dem in der vorliegenden Studie verwendeten Modell.)

Einige Rattenlinien, insbesondere die sog. spontaneously hypertensive rat (SHR), ein Rattenstamm der besonders empfänglich für cerebrovasculäre Verschlüsse ist, reagieren empfindlicher auf Gefäßverschlüsse (FUJISHIMA et al. 1981) und entwickeln besonders große Infarkte (OGATA et al. 1976). Sie eignen sich deswegen für Studien, die den zeitlichen Verlauf, die Lokalisation und die Pathophysiologie beleuchten.

Weitere nicht so verbreitete Tiermodelle zur Untersuchung der fokalen cerebralen Ischämie beschreiben Methoden, die eine cerebrale Thrombose oder Embolie auslösen. Eine Übersicht liefern GINSBERG und BUSTO 1989. Unterschieden werden muss dabei zwischen photochemisch ausgelösten Thrombosen und Methoden, die eine cerebrale Thromboembolie z.B. durch Blutaggregation, Microspheninjektion, photochemisch induzierte Thromboembolien oder Arachidonatinjektion auslösen.

2.3 Pathophysiologie der cerebralen Ischämie

2.3.1 Mechanismen der cerebralen Ischämie

Die cerebrale Ischämie wird durch einen reduzierten Blutfluss im Gehirn verursacht. Sie kann regional begrenzt oder global auftreten, wobei die fokalen Manifestationen häufiger auftreten (KOISTINAHO und HÖKFELT 1997).

SCHRIFTTUM

Bei der cerebralen Ischämie ist das Gleichgewicht zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot gestört. Wird die Zufuhr des Blutes für das gesamte Gehirn unterbrochen, spricht man von einer globalen Ischämie; ist nur der Versorgungsbereich einer Arterie betroffen, handelt es sich um eine fokale Ischämie. Das Gehirn wird im Mittel von 50 ml/100g/min Blut versorgt. Wenn der Flusswert 20 bis 18 ml/100g/min unterschreitet, kommt es zum Funktionsverlust, erkennbar am isoelektrischen EEG. Morphologische Veränderungen oder Zelluntergang treten erst nach weiter sinkenden Blutflusswerten von 10 bis 12 ml/100g/min auf (SIESJÖ 1992).

Der sehr geringe Energiespeicher des Gehirns, in Form von ATP, verursacht eine erhebliche Empfindlichkeit bereits bei geringen Zirkulationsstörungen. Der cerebrale Perfusionsdruck spielt hierbei eine wichtige Rolle, da durch diesen eine Autoregulation des Gehirns erhalten bleibt. Bei Unterschreiten der unteren Grenze dieser Autoregulation kommt es zu einem Absinken der Hirndurchblutung und zu einer Minderperfusion des Gehirns. Durch die Abwesenheit von Sauerstoff entsteht eine Depolarisation an der präsynaptischen Zellmembran und zeitgleich eine Blockade der oxidativen Phosphorylierung. Die durch anaerobe Glykolyse gesteuerte ATP-Produktion kann den Energiebedarf des Gehirns langfristig nicht mehr decken. Durch Akkumulation von Lactat entsteht, in Abhängigkeit vom Glucosespiegel, eine interstitielle wie auch intrazelluläre Acidose mit einem pH-Wert von 5,6 bis 6,4 (KEMPSKI 1994).

Diese beeinflusst die Zellmembranpermeabilität und bewirkt eine Denaturierung der Membranproteine und Enzyme. Das in Folge dessen entstehende Ödem des Gefäßendothels, der Astrozyten und anderer neuronaler Strukturen reduziert die Durchblutung zusätzlich. Die rasche Entleerung der ATP-Speicher und die insuffiziente anaerobe ATP-Produktion bewirken den Funktionsverlust der ATP-getriebenen Pumpsysteme. Durch den unkontrollierten Na^+ - und Cl^- Einstrom, sowie K^+ -Ausstrom kann der extra-/intrazelluläre Ionengradient nicht aufrechterhalten werden, und es entsteht eine Membrandepolarisation. Diese Depolarisation stimuliert die Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat in den präsynaptischen Vesikeln. Die exzitatorische Aminosäure Glutamat ist zwar der wichtigste erregende Transmitter im Zentralen Nervensystem (ZNS), sie kann aber bei erhöhter Konzentration im Extrazellulärraum als Exzitotoxin wirken und zum Nervenzelluntergang sowie zur Schwellung der Nerven- und Gliazellen führen (BAETHMANN et al. 1993).

Spezifische Rezeptorsysteme für Glutamat sind bekannt, wobei die an Ionenkanälen gekoppelten NMDA-, AMPA- bzw. Kainatrezeptoren am besten untersucht sind (KEMPSKI 1994).

Bei Bindung eines Liganden an den Rezeptor wird der Kanal für einen massiven Ca^{2+} - und Na^{+} -Einstrom in die Zelle permeabel. Die Öffnung der Ionenkanäle für Ca^{2+} ist ein entscheidender Schritt für die Einleitung zytotoxischer Wirkungen. Die massive Anhäufung von Ca^{2+} im Intrazellulärraum der Zelle aktiviert die neuronale Stickstoffsynthetase, Phospholipasen, Proteasen und Lipidoxidasen (MURDOCH und HALL 1990, WERNER 2000).

Es folgt eine Hydrolyse der Zellmembran und der intrazellulären Organellen, die einerseits zu Veränderungen der Permeabilität, aber auch zur Bildung von freien Fettsäuren führt. Die freien Fettsäuren, vor allem die Arachidonsäure, die unter anderem eine Ausgangssubstanz freier Radikale ist, werden weiter zu Eikosanoiden oxidiert. Dies führt zu physiologischen und pathophysiologischen Reaktionen der Neuronen und zu Störungen der Mikrozirkulation (CHEN et al. 1986).

2.3.2 Folgen der cerebralen Ischämie

Der neuronale Zelltod, durch cerebrale Ischämie verursacht, kann sowohl nekrotische wie auch apoptotische Mechanismen hervorrufen (SCHULZ et al. 1999).

Obwohl der ischämische neuronale Zelltod klassischerweise als nekrotisch betrachtet wird, ist in neuerer Zeit auch der apoptotische Zelltod nachgewiesen worden. Dieser tritt vor allem dann auf, wenn der ischämische Insult relativ mild ist und ein zellulärer Metabolismus noch erhalten ist (CAO et al. 2001).

2.3.2.1 Nekrose

Unter der Nekrose versteht man irreversible sichtbare morphologische Veränderungen in einem lebenden Organismus, die den Zelltod zur Folge haben. Ein genauer Zeitpunkt des Zelltodes ist nicht feststellbar, da die verschiedenen Vitalfunktionen einer Zelle nicht gleichzeitig erlöschen. Die Zeitspanne bis zum Eintritt der irreversiblen Zellschädigung kann durch die Körpertemperatur, die Dauer der präfinalen Hypoxie und Vorerkrankungen wie z. B. einer Acidose beeinflusst werden (HOLZNER 1989).

Nach direkter Schädigung der Zellmembran als Folge einer entgleisten Homöostase innerhalb der Zelle kommt es soweit zu einer Anschwellung der intrazellulären Organellen, vor allem den Mitochondrien, bis die Zelle lysiert. Nach dem Verlust der Zellmembran können Inhaltsstoffe des Zytoplasmas, wie z. B. Lysozyme in den Extrazellulärraum fließen. In vivo

kann der nekrotische Zelltod einen extensiven Gewebeschaden verursachen, dem eine intensive inflammatorische Antwort folgt (VAN FURTH und VAN ZWET 1988).

Histologisch manifestiert sich die irreversible Zellschädigung frühestens nach 6 bis 8 Stunden. Sie beginnt mit einer Mikrovakuolisierung und geht später in eine Koagulationsnekrose mit Schwellung der Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (Tigrolyse), Kernveränderungen (Pyknose, Karyorhexis, Karyolyse) und einer Astrogliaanschwellung um die geschädigte Nervenzelle über. Der Übergang in die totale Zellnekrose kann entweder in einer Zytolyse d. h. Kolliquationsnekrose mit Abbau durch Makrophagen, oder mit einer Mumifikation (Atrophie mit Inkrustation) enden (HOLZNER 1989).

Die Nekrose ist durch irreversible Veränderungen im Nukleus und Zytoplasma gekennzeichnet (MAJNO und JORIS 1995) und bedeutet den unwiderruflichen Untergang der Zelle.

2.3.2.2 Apoptose

Der Begriff Apoptose erfolgt in Anlehnung an das griechische Wort für „fallen“ und beschreibt sinnbildlich das Herabfallen der Blätter eines Baumes im Herbst.

Der Begriff der Apoptose wird erstmals von KERR et al. 1972 erwähnt, die diese als aktive Form des Zelltodes neben der Nekrose beschreiben. Heutzutage wird dieser Begriff als Synonym für den programmierten Zelltod verwendet (THOMPSON 1995). Der Prozess der Apoptose ist prinzipiell in 3 Phasen aufzuteilen: die Induktionsphase, welche von dem Apoptose-induzierenden Stimulus abhängig ist, die Effektorphase und die Degradationsphase (KROEMER et al. 1995). Im Gegensatz zur Nekrose, die durch externe Noxen passiv ausgelöst wird, ist der programmierte Zelltod ein Selbstmordmechanismus unter aktiver zellulärer Kontrolle. Die einzelne Zelle führt durch ein Suizidprogramm den eigenen Tod herbei (STELLER 1995, ENDRES et al. 1998). Nach Schädigung der Zelle verschiebt sich das Gleichgewicht der intrazellulären regulierenden Proteine zugunsten der pro-apoptischen Mediatorproteine (KROEMER et al. 1995).

Die Apoptose spielt nicht nur als physiologischer Zelluntergang, also bei Erhaltung des Gleichgewichtes zwischen Zellproliferation und Zelltod eine wichtige Rolle (STELLER 1995), sondern hat auch Anteil an vielen pathologischen Prozessen.

Zu den histopathologischen Merkmalen kann die Chromosomenkondensation, die Fragmentation des Nukleus mit erhaltener Membranintegrität, die Zellschrumpfung und die Bildung so genannter Apoptosekörper gezählt werden (KANE 1995, MAJNO und JORIS 1995).

Viele verschiedene Zelltypen können durch den programmierten Zelltod sterben. Dieser Prozess geht ohne Entzündung einher und ist durch primäre Zytoplasma- sowie Zellkernkondensationen gekennzeichnet. Erst sekundär erfolgt die Membranschädigung. Ein zunächst apoptotischer Zelluntergang kann auch in eine Nekrose übergehen (ENDRES et al. 1998). Hierbei scheinen die Stärke des Reizes (z. B. die Temperatur) und das Ausmaß der Zellschädigung eine Rolle zu spielen (LENNON et al. 1991).

PADOSCH et al. (2001) beschreiben in folgendem Schema die Möglichkeiten einer Reizantwort bzw. den Degenerationsmechanismus einer Zelle in Abhängigkeit von der Reizdauer und Reizintensität und dem intrazellulären ATP-Gehalt.

Reiz ↓ + ATP ↑ → Apoptose

Reiz ↑ + ATP ↓ → Apoptose → Nekrose

Reiz ↑ ↑ + ATP ↓ → Nekrose

Grundlagenforschung der Apoptose von ELLIS und HORVITZ (1986) am Nematoden *C. elegans* ergeben eine Regulation der Apoptose über Gene. Prinzipiell muss dabei zwischen verschiedenen Genklassen unterschieden werden, den „death inhibiting genes“ und den „death effector genes“ (YUAN und HORVITZ 1990).

Weitere Untersuchungen zur Evidenz einer Apoptose speziell bei cerebralen Ischämien kann laut ENDRES et al. (1998) mittlerweile von verschiedenen Arbeitsgruppen anhand von Tiermodellen der globalen und fokalen cerebralen Ischämie erbracht werden.

Nach globalen oder milden fokalen cerebralen Ischämien tritt der verzögerte Zelltod („delayed neuronal death“) in besonders vulnerablen Regionen, wie z. B. der CA1-Region des Hippocampus oft selektiv auf. (Diese Region wird auch im Rahmen der vorliegenden Studie untersucht).

Quantitativ sind apoptotische Zellen vor allem in der ischämischen Randzone, der sog. Penumbra, zu finden. Dort findet durch eine Restperfusion noch ein geringer Metabolismus der Zellen statt (ENDRES et al. 1998).

Tab1: Vergleich und Unterschiede von Nekrose und Apoptose (nach Roche Molecular Biochemicals, Apoptosis and Cell Proliferation, 2nd revised edition, Mannheim, Germany)

NEKROSE	APOPTOSE
<i>Morphologische Eigenschaften:</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Verlust der Membranintegrität • Totale Zelllysis • Pyknose des Nukleus • Erhöhtes Zellvolumen • Desintegration der Zellorganellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Membranintegrität erhalten • Zellfragmentation (Bildung der „apoptotic bodies“) • Chromatinaggregation • Erniedrigtes Zellvolumen
<i>Biochemische Eigenschaften:</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Passiver Prozess • Energieunabhängig • Degradation der DNA 	<ul style="list-style-type: none"> • Aktiver, enzymatischer Prozess • Energieabhängig • Oligonukleosomale Bruchstücke
<i>Physiologische Kennzeichen:</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Phagozytose durch Makrophagen • Signifikante inflammatorische Antwort 	<ul style="list-style-type: none"> • Phagozytose durch Makrophagen und benachbarte Zellen • Keine inflammatorische Antwort

2.3.3 Expression Apoptose-assoziiierter Proteine

Die genetische Kontrolle des programmierten Zelltods wird bereits von HENGARTNER und HORVITZ (1994) nachgewiesen. Während des apoptotischen Zelluntergangs kommt es zu einer Expression spezifischer Proteine (z.B. Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2), die den programmierten Zelltod steuern (CHARRIAUT-MARLANGUE et al. 1998).

2.3.3.1 Pro-apoptische Proteine

Bax-Protein:

Das pro-apoptische Protein Bax ist im Rahmen seiner Interaktionen mit Bcl-2 entdeckt worden. Bax ist als ein Bcl-2-assoziiertes Protein identifiziert, das eine 21 % ige Ähnlichkeit mit Bcl-2 aufweist (OLTVAI et al. 1993).

Laut DAVIES (1995) bildet Bax mit Bcl-2 Heterodimere, formiert sich aber selbst auch als Homodimer. Während Bcl-2-Bax-Heterodimere die Apoptose inhibieren, fördern Bax-Homodimere die Apoptose.

Die Bax-RNA codiert drei verschiedene Proteine, die sich in ihrem Molekulargewicht wie folgt unterscheiden: Das Bax α -Protein mit 21 kD, das Bax β -Protein mit 24 kD und das 5 kD schwere Bax γ -Protein (KRAJEWSKI et al. 1994).

Das der Bcl-2-Familie zugehörige Protein Bax ist ein potentes pro-apoptotisches Molekül (CAO et al. 2001), das in der Mitochondrienmembran lokalisiert, die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-2 hemmt (NIWA et al. 1997). Eine Überexpression von Bax antagonisiert somit den protektiven Effekt des Bcl-2 (OLTVAI et al. 1993). Bax wurde als unmittelbares Antwortgen des p53 identifiziert und erklärt die hohe Apoptoserate, die durch p53 induziert wird (HOFFMAN und LIEBERMANN 1994).

Die Lokalisation des Bax-Proteins findet sich vor allem in Geweben mit einer hohen Apoptoserate, wie z.B. in der Dünndarmschleimhaut. Aber auch in vielen anderen epithelialen Geweben wie im Dickdarm, der Brustdrüse, der Prostata, der Haut und in den Luftwegen kann dieses Protein nachgewiesen werden. Innerhalb des Nervensystems kann das Bax-Protein in den Neuronen der Purkinje-Zellen des Cerebellum, den großen Neuronen im Cortex, im Hirnstamm und in den sympathischen Ganglien angetroffen werden (KRAJEWSKI et al. 1994).

p53-Protein:

Bei dem Protein p53 handelt sich um ein im Zellkern lokalisiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 53 kD, das aufgrund seiner Instabilität eine Halbwertszeit von 25 bis 35 Minuten aufweist (COX und LANE 1995). Das Protein p53 ist ein Produkt des p53-Tumor-Suppressor-Gens und bildet einen Komplex mit Hitzeschockproteinen (CHOPP et al. 1992). Hitzeschockproteine können im Gehirn nach cerebralen Ischämien vorgefunden werden (HINDS et al. 1987). Bereits YONISH et al. (1991) identifizieren p53 als potenziellen Initiator der Apoptose. In diesen Untersuchungen an Zelllinien, die eine mangelnde p53 Expression aufweisen, können nach Aktivierung des p53-Gens charakteristische Merkmale einer Apoptose beobachtet werden. Das p53-Protein agiert als Transkriptionsfaktor und ist in die Reparaturvorgänge geschädigter DNA involviert. Der Mechanismus auf molekularer Ebene ist jedoch noch nicht geklärt (TOMASEVIC et al. 1999).

Ein DNA-Schaden ist ein starker Auslöser für die Bildung von p53. Hierbei muss jedoch zwischen den Schweregraden unterschieden werden. Ist der DNA-Schaden mild, verzögert p53 die Progression des Zellzyklus. Handelt es sich um einen irreversiblen Schaden, induziert p53 die zelluläre Apoptose (HUGHES et al. 1996).

In gewissen Situationen induzieren p53-abhängige Stimuli die Expression von Bax (MIYASHITA 1994), obwohl Bax nicht für alle p53-abhängigen Zelltode erforderlich ist (KNUDSEN et al. 1995).

Eine durch p53 hervorgerufene Apoptose kann mit einer intrazellulär erhöhten Bcl-2 Konzentration gehemmt werden. In Zellkulturen kann eine Reduktion des anti-apoptotischen Bcl-2 durch p53 nachgewiesen werden (WANG et al. 1993).

2.3.3.2 Anti-apoptotische Proteine

Bcl-2-Protein:

Eines der zuerst identifizierten Gene der Apoptose ist das Bcl-2 Gen (HENGARTNER und HORVITZ 1994). Das Bcl-2-Gen codiert das 26-kD schwere Membran-assoziierte Bcl-2-Protein und ist vor allem in folgenden Zellanteilen wie etwa den Mitochondrien, der Zellmembran und dem endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (LITHGOW et al. 1994).

Es existieren drei Isoformen des Bcl: Bcl-xl, Bcl-xs und Bcl-x β . Mutationsanalysen von Bcl-2 ergeben, dass beide BH-Domänen für die Repression des Zelltods verantwortlich sind. Diese BH Domänen, genannt BH1 und BH2, entsprechen dem Bereich mit der höchsten Proteinähnlichkeit innerhalb der Bcl-2 Familie (DAVIES 1995).

Gene der Bcl-2 Familie spielen eine bedeutende Rolle bei der Regulation der mitochondrialen Permeabilität. Als Folge einer Down-Regulierung von Bcl-2 oder anderer anti-apoptotischer Familienmitglieder wird die mitochondriale Permeabilität erhöht (GRAHAM und CHEN 2001).

Funktionell gesehen ist Bcl-2 ein potenter Suppressor des Zelltods und kann durch eine Überexpression den Zelltod gegenüber einer Reihe von Stimuli wie z.B. Chemotherapeutika oder Glukokortikoiden verhindern (REED 1994). Aufgrund dieses Effektes wird Bcl-2 vielfach auch als Onkogen bezeichnet. Im Rahmen von In-vitro-Versuchen kann eine Überexpression des Bcl-2 den Tod von sympathischen (GARCIA et al. 1992) und sensorischen (ALLSOPP et al. 1993) Neuronen verhindern.

Mdm-2-Protein:

Das murine double minute-Gen (Mdm-2) wurde ursprünglich in einer spontan entstehenden onkogenen Zelllinie identifiziert (CAHILLY-SNYDER et al. 1987). Es kodiert ein 90 kD schweres Polypeptid, welches im Zellkern liegt und das spezifisch an das p53-Protein bindet (CHEN et al. 1996). Das Mdm-2-Protein reguliert das p53-Gen in seiner Aktivität, während das p53-Protein die Transkription des Mdm-2-Gen steuert.

Diese Autoregulation wird auch als p53-Mdm-2-Feedback-Loop bezeichnet (WU et al.1993, MOMMAND und ZAMBETTI 1997, TU et al. 1998). Eine Überexpression des Mdm-2 hemmt sowohl die Transkriptionsaktivität, als auch die repressiven Aktivitäten des p53 (MOMAND et al.1992). Die Expression von Mdm-2 ist von DNA-schädigenden Einflüssen (UV, Gammastrahlung etc.) abhängig. Nach einer cerebralen Ischämie kann ein früher DNA-Schaden die Mdm-2 Expression stimulieren (TU et al. 1998).

JONES et al. (1995) vermuten aufgrund der engen funktionalen Beziehung von Mdm-2 und p53 während apoptotischer Vorgänge eine anti-apoptotische Wirkung des Mdm-2.

CHEN et al. können dem Mdm-2 bereits 1994 bei In-vitro-Versuchen eine Hemmung der Apoptose nachweisen. Der protektive Effekt kann nur unter Bedingungen beobachtet werden, die die Formation eines p53-Mdm-2-Komplexes erlauben (HAUPT et al. 1996).

2.3.4 Cerebrale Ischämie im zeitlichen Verlauf

Es lassen sich gewisse Zeitfenster definieren, die den Funktionsverlust des Gehirns nach einer Ischämie beschreiben.

So wird ein Zeitraum von 4 bis 8 Sekunden ohne weitere Schädigung vom Organismus toleriert. Erste messbare Veränderungen am EEG, meist gekoppelt mit Bewusstseinsverlust treten nach 15 bis 30 Sekunden auf. Nach 7 bis 10 Minuten verläuft eine Reanimation erfolglos (KEMPSKI 2000).

Allerdings haben Untersuchungen an Katzen mit 60-minütiger kompletter Ischämie gezeigt, dass eine fast vollständige Restitution der neurologischen Funktionen noch möglich ist (HOSSMANN et al. 1987, HOSSMANN 1988).

In der Literatur finden sich viele Studien die nur einen Untersuchungszeitpunkt wählen oder unmittelbar post Ischämie untersuchen. Die Notwendigkeit der Untersuchung bestimmter Stoffwechselforgänge vor allem im zeitlichen Verlauf von bis zu mehreren Wochen nach einer cerebralen Ischämie, wird durch nachfolgende Studienergebnisse bestätigt (und in der vorliegenden Studie durchgeführt):

Das Zeitprofil eines neuronalen Schadens wird von PULSINELLI et. al 1982 untersucht. Die Studie beschreibt den neuropathologischen Schaden nach einer transienten Frontalhirn-Ischämie bei der Ratte in einem Zeitfenster von bis zu 3 Tagen. Der Zeitraum bis zum Auftreten eines sichtbaren neuronalen Schadens variiert innerhalb der verschiedenen Regionen des Gehirns und einige der Veränderungen können erst Stunden oder auch Tage nach dem Initialschaden festgestellt werden. Es kann vor allem ein verzögerter Beginn und Fortschreiten des neuronalen Schadens speziell im Hippocampus und Neocortex beobachtet

werden, bei dem ein weiterer Anstieg der geschädigten Zellen erst nach 24 bis 72 Stunden beendet ist.

Auch DIRNAGL et al. (1999) beschreiben den zeitlichen Verlauf der wichtigsten pathologischen Mechanismen nach einem ischämischen Insult. Dabei beginnt die Reaktion des Gehirns auf eine fokale cerebrale Ischämie bereits nach einigen Minuten mit einer Excitotoxizität und kann in Form des programmierten Zelltodes über Tage anhalten. Die strukturelle Läsion vermag sogar, trotz Rückgang des funktionellen neurologischen Defizits, über Tage und Wochen wachsen. Bei einer weiteren Studie, die einen postischämischen Zeitraum untersucht, können bei 10-minütiger fokaler Ischämie nach 48 Stunden Neurone mit fragmentierter DNA nachgewiesen werden (LI et al. 1995). Unterschieden werden muss dabei zwischen einer fokalen Ischämie in ihrer Vollaussprägung und deren abgemilderter Form.

Während es nach einer fokalen Ischämie relativ rasch in der Infarktzone zum Zelluntergang kommt, verläuft der neuronale Zelltod bei einer milden fokalen Ischämie verzögert ab. Erst nach Tagen demarkiert sich nach verzögertem Zelluntergang der Infarkt (ENDRES et al. 1998).

2.4 Neuroprotektion

2.4.1 Möglichkeiten der Neuroprotektion

Die Neuroprotektion versteht sich als empirisches Maß zur Erhöhung der Ischämietoleranz des Gehirns. Neuroprotektive Maßnahmen können einen präventiven (die Behandlung beginnt schon präischämisch zur Prophylaxe) oder therapeutischen (die Behandlung beginnt während oder nach einer Ischämie) Charakter haben (WERNER 2000).

Aus im Kapitel 2.3. skizzierten und experimentell abgesicherten Kenntnissen der Pathophysiologie der cerebralen Ischämie werden im Folgenden die Hauptansatzpunkte für eine Behandlungsstrategie aufgezeigt.

2.4.1.1 Reduktion des cerebralen Metabolismus durch Hypothermie

Bei einer globalen Ischämie hat sich die induzierte milde Hypothermie als die effektivste Protektion für das Gehirn bewährt (BORIS-MÖLLER et al. 1989, HARA et al. 1993).

Bereits 1962 wiesen DRAKE und JORY sowohl im Tierexperiment als auch an Schädel-Hirn-Trauma-Patienten die neuroprotektive Wirkung der Hypothermie nach. Die Reduktion des cerebralen Funktions- und Strukturstoffwechsels kann als einer der neuroprotektiven Mechanismen angenommen werden (WERNER 2000).

2.4.1.2 Senkung des intrakraniellen Drucks durch Hyperventilation

Nach Abnahme des paCO_2 durch Hyperventilation reagiert das Gehirn mit einer Reduktion der Durchblutung und des cerebralen Blutvolumens. Der pH-Wert nimmt zu und der intracranielle Druck wird reduziert (WERNER 2000).

In der Literatur finden sich Einzelbeobachtungen, bei denen nach Hyperventilation eine Erholung des EEG oder Wiederherstellung der Perfusion nach Ischämie beobachtet werden können (GRUBB et al. 1974, ARTRU und MERRIMAN 1989). Zur Behandlung der durch den anaeroben Stoffwechsel entstehenden Acidose wird die kompensatorische Hyperventilation beschrieben (ANDREWS und MUTO 1992). Untersuchungen an Katzen haben ergeben, dass eine Hyperventilation zu einer Zunahme der cerebralen Lactatkonzentration führt, was auf eine hyperventilationsbedingte Perfusionsstörung hinweist (SUTTON et al. 1990). Versuche, Puffersubstanzen zu infundieren, sind noch in der Erprobung.

2.4.1.3 Antagonisierung der Exzitotoxine

Hauptsächlicher Gegenstand der momentanen Forschung in diesem Bereich sind die Glutamatantagonisten. Wegen ihrer unterschiedlichen Wirkungsweise muss zwischen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)- und α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazolpropionat (AMPA) -Inhibitoren unterschieden werden (KEMPSKI 1994).

Da NMDA-Antagonisten die Blut-Hirnschranke (BHS) jedoch schlecht passieren können (SIMON et al. 1984), liegt zunächst das Augenmerk auf den AMPA-Antagonisten (BUCHAN et al. 1991, DIEMER et al. 1993).

Bei den heutigen nicht-kompetitiven NMDA-Antagonisten ist die BHS-Gängigkeit verbessert. Tierexperimentelle Studien beweisen, dass bei einer fokalen Ischämie der Zellschaden und das neurologische Defizit zu begrenzen sind (CHURCH et al. 1988, HOFFMANN et al. 1992a)

2.4.1.4 Reduktion der freien Radikal-Bildung und deren Wirkung

In zahlreichen tierexperimentellen Studien wird bereits die antioxidative Wirkung von Steroidabkömmlingen untersucht. Dabei haben sich insbesondere die 21-Aminosteroide bewährt, deren Gluco- und Mineralcorticoidwirkung kaum mehr nachweisbar sind (BECK und BIELENBERG 1991, LESIUK et al. 1991).

Als natürliche Antioxidantien dienen hohe Dosen von z.B. Vitamin E. In einer Studie am Rattenmodell kann eine protektive Wirksamkeit bei der fokalen cerebralen Ischämie nachgewiesen werden (EICHINGER 1998).

2.4.1.5 Verbesserung der Reperfusion

Therapeutisches Ziel ist hier die Aufrechterhaltung oder Erhöhung des cerebralen Perfusionsdrucks. Zum Einsatz gelangt die hypervoläme Hämodilution zur Verbesserung der Mikrozirkulation (GROTTA 1990, GOSLINGA et al. 1992).

Zunehmend werden auch hypertone-hyperonkotische Lösungen zur schnelleren Einleitung der Reperfusion eingesetzt (KEMPSKI 1994).

2.4.2 Therapieansätze durch Anästhetika

Der Einsatz von Anästhetika zur Neuroprotektion gilt als mögliches pharmakologisches Therapiekonzept zur Begrenzung des hypoxisch-ischämischen Zellschadens.

Folgende neuroprotektive Mechanismen werden diskutiert (WERNER 2000):

- verbesserte Balance zwischen Substratangebot und -bedarf
- Suppression des Sympathikus und der Krampfpotentiale
- Reduktion des intrakraniellen Drucks (bei nicht volatilen Anästhetika)
- Umverteilung der cerebralen Durchblutung zugunsten der Ischämieareale
- Abfangen freier Radikale

2.4.2.1 Intravenöse Anästhetika

Als potenziell neuroprotektive Agenzien gelten heutzutage auch die Injektionsanästhetika. Vor allem den Barbituraten wird eine Beeinflussung des cerebralen Metabolismus nachgesagt. Barbiturate senken den cerebralen Stoffwechsel, den Energiebedarf und reduzieren die cerebrale Durchblutung und Lipidoxidation durch Radikale (WERNER 2000). Untersuchungen ergeben, dass die Infarktgröße bei einer fokalen Ischämie bei frühzeitiger Barbituratgabe reduzierbar ist (HOFF 1986).

In tierexperimentellen Studien kann eine Reduktion der Infarktgröße und der neurologischen Defizite nach einer permanenten Ischämie durch ein Barbituratkoma nachgewiesen werden (MILDE et al. 1988, WARNER et al. 1996).

Eine erfolgreiche Behandlung der kompletten, globalen Ischämie mit Barbituraten kann nicht erreicht werden (KRIER et al. 1987).

Durch Gabe von Etomidat und Propofol kann laut KOCHS et al. (1992) und WATSON et al. (1992) ein fokaler ischämischer Schaden vermindert werden.

Den Benzodiazepinen, vor allem dem Midazolam, wird eine neuroprotektive Potenz nach inkompletter globaler Ischämie nachgesagt (BAUGHMAN et al. 1989). Als hirnpotektive Substanz nehmen sie aber in der klinischen Anwendung eine untergeordnete Rolle ein.

2.4.2.2 Inhalationsanästhetika

Alle volatilen Anästhetika (außer N₂O) entwickeln eine dosisabhängige Reduktion des cerebralen Metabolismus (VAN AKEN und VAN HEMELRIJCK 1991). Die volatilen Anästhetika Isofluran, Sevofluran und Desfluran erzeugen bei einem MAC-Wert von 2 eine metabolische Suppression von 40 bis 50 % (WERNER 2000). Auch bei minimalen MAC-Werten ist der cerebrale Metabolismus reduziert (MIELCK et al. 1999). Die Eigenschaften des Sevofluran bezüglich des Gehirnstoffwechsels während und nach einer cerebralen Ischämie können denen von Isofluran gleichgesetzt werden (NAKAJIMA et al. 1997).

Für den Einfluss von Isofluran auf das neurologische Defizit und den ischämischen Schaden bei einer, am Tiermodell induzierten, fokalen Ischämie existieren verschiedene Beurteilungen. MILDE et al. (1988) stellen eine Reduzierung des neurologischen Defizits und des histologischen Schadens fest, während SANO et al. (1992) und WARNER et al. (1991) keine Reduzierung des histologischen Schadens beobachten können. WARNER et al. (1993) können jedoch ein geringeres Infarktvolume bei mit Sevofluran oder Halothan anästhesierten Ratten nach einer fokalen Ischämie feststellen. Bei einer inkompletten globalen Ischämie unter Sevofluran- oder Isoflurannarkose (WERNER et al. 1995) kann eine verminderte Lactatakkumulation und eine Reduzierung des neurologischen Defizits erkannt werden.

Eine Neuroprotektion durch volatile Anästhetika bei einer kompletten globalen Ischämie kann im Tierexperiment nicht nachgewiesen werden, da durch den globalen Insult eine Isoelektrizität des EEG bewirkt wird und somit eine weitere Reduzierung des Metabolismus nicht möglich ist (WERNER 2000).

Unter Isoflurannarkose ist die Toleranz für niedrigere Hirndurchblutungswerte im Vergleich zu Halothan und Enfluran gegeben (MESSICK et al. 1987). Laut WERNER (2000) kann Isofluran präventiv zum neuroprotektiven Einsatz verwendet werden, wenn der intracranielle Druck nicht zunimmt.

(Die mögliche neuroprotektive Potenz von Sevofluran, vor allem im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf, soll in der eigenen Studie am Tiermodell untersucht werden.)

2.5 Sevofluran

2.5.1 Physikalische und chemische Charakteristika

Sevofluran wurde erstmals in den 70er Jahren von B. Regan synthetisiert (WALLIN et al. 1975). Im Jahre 1981 erfolgten Phase I-Studien an Probanden (HOLADAY 1981), aber durch die hohen Herstellungskosten und die mögliche toxische Wirkung (HITT et al. 1974) erfolgte die Zulassung auf dem deutschen Markt erst 1995 (CONZEN und HOBBAHN 1996).

Die chemische Grundbezeichnung lautet Fluoromethyl-2,2,2-trifluoro-methyl-ethyl-ether (DUDZIAK und VETTERMANN 1996). Das spezifische Gewicht liegt bei 1,53 g/ml, der Siedepunkt bei 58,6 °C und der Dampfdruck bei 157 mmHg bei 20 °C. Sevofluran ist weder explosiv noch brennbar und reagiert mit keinem der Metalle, die typischerweise in Narkosegeräten Verwendung finden (CONZEN und HOBBAHN 1996). Im Vergleich zu anderen Inhalationsnarkotika, wie Isofluran oder Enfluran, fällt der angenehme, fruchtige Geruch auf (WALLIN 1975).

Für die Stabilität von Sevofluran sind weder Additive noch Konservierungsstoffe erforderlich (LARSEN 1999). Durch Reaktion mit dem Atemkalk im Absorber von Narkosegeräten entsteht Olefin (Vinylether), das so genannte Compound A. Dieses Abbauprodukt kann bei Ratten ab einer Konzentration von 50 ppm eine renale Tubulusnekrose bewirken (GONSOWSKI 1994). Die fehlenden Hinweise auf ein toxisches Potential beim Menschen lassen die Ratte als Modell für Toxizitätsuntersuchungen nicht zu.

Bei Verwendung von Narkose-Kreissystemen ist die Bildungsrate von Compound A linear abhängig von der verwendeten Sevoflurandosis (JONES und CONZEN 1996). Die Konzentration von Compound A im Narkosesystem ist umgekehrt proportional zur verwendeten Frischgas-Flussrate. Je niedriger der Frischgasfluss, umso mehr Compound A wird eingeatmet (BITO und IKEDA 1992, JONES und CONZEN 1996). Die Bildung von Compound A ist abhängig von der Art des Absorberkalks (FRINK et al. 1992b, JONES und CONZEN 1996), dem Wassergehalt (WONG und LERMAN 1992) und der Temperatur (WONG und LERMAN 1992, JONES und CONZEN 1996).

SCHRIFTTUM

In folgender Tabelle sind die wichtigsten physiko-chemischen Eigenschaften von Sevofluran zusammengefasst:

Tab.2: Physiko-chemische Eigenschaften des Anästhetikums Sevofluran
(nach DUDZIAK und VETTERMANN 1996, CONZEN und HOBBAHN 1996)

Struktur	$\text{FCH}_2\text{-O-CH}(\text{CF}_3)_2$
Molekulargewicht (kD)	200,06
Farbe	klar, farblos
Geruch	mild, fruchtig
Siedepunkt (°C) bei 760 mmHg	58,6
Brennbarkeit	
• in Luft	nicht brennbar
• in Sauerstoff	11 Vol %
• in Lachgas	10 Vol %
Spezifisches Gewicht bei 20 °C	1,53
Dampfdruck (mmHg)	
• bei 20 °C	160
• bei 25 °C	200
Verteilungskoeffizient	
• Wasser/Gas	0,36
• Blut/Gas	0,69
• Gehirn/Blut	1,17
• Leber/Blut	1,85
• Niere/Blut	1,15

2.5.2 Pharmakokinetik

2.5.2.1 Löslichkeitskoeffizient und Verteilung

Der Blut/Gas-Verteilungskoeffizient von Sevofluran liegt bei 0,69 und ist somit niedriger als der von Halothan und Isofluran. Daraus resultiert, neben einer schnellen Narkoseeinleitung, ein rascher Konzentrationsanstieg im Blut und im Gehirn (KAZAMA und IKEDA 1988a, MUTOH et al. 1995, DUDZIAK und VETTERMANN 1996). Dies ist ein entscheidendes Kriterium für die Kinetik eines volatilen Anästhetikums.

Ein niedriger Koeffizient bewirkt ein schnelles An- und Abfluten der Substanz im Körper. Die daraus folgende leicht beeinflussbare An- und Abflutung lässt die Narkosetiefe intraoperativ leicht steuern (YASUDA et al. 1991, SCHOLZ 1994). Im Gegensatz zu Isofluran und Halothan ist der Verteilungskoeffizient von Sevofluran weitgehend altersunabhängig (MALVIYA und LERMAN 1990).

2.5.2.2 Metabolismus

Das Sevofluranmolekül wird vom Organismus wenige Sekunden nach Beginn der Inhalation zu 3 bis 5 % in der Leber metabolisiert (SHIRAISHI und IKEDA 1990). Die entstehenden Spaltprodukte sind ein nicht-organisches Fluoratom sowie Hexafluoroisopropanol (HFIP). HFIP wird zunächst in der Leber gebildet, rasch glucuronidiert und renal als Hexafluoroisopropanolglucuronid ausgeschieden. Durch die Bindung an die Glucuronsäure wird das aus der Etherspaltung resultierende Hexafluoroisopropanol entgiftet und zerfällt beim oxidativen Abbau in Fluorid, Kohlendioxid und Wasser (FRINK et al. 1992a). Das anorganische Fluorid besitzt nephrotoxische Wirkung (WALLIN et al. 1975, MARTIS et al. 1981, HOLADAY und SMITH 1981, FRINK et al. 1992a, KHARASCH 1995).

Das Enzym Cytochrom P-450 katalysiert die Reaktion vor allem auf hepatischem (KHARASCH und THUMMEL 1993), aber auch zum Teil auf renalem Weg (KENNA und JONES 1995).

Metaboliten, insbesondere die Fluorausscheidung im Urin, wurden von WALLIN et al. bereits 1975 am Rattenmodell untersucht. Sevofluran ist das einzige Inhalationsanästhetikum, das eine Phase II-Biotransformation (Glucuronidierung) durchläuft. Da Sevofluran stärker biotransformiert wird als andere Inhalationsanästhetika, liegt der Serumfluoridspiegel kurzfristig fast doppelt so hoch als normalerweise (WIESNER et al. 1996). Beim Menschen wird die nierentoxische Schwelle von 50 μM teilweise überschritten (MALAN 1995). Die Halbwertszeit des Fluorids im Urin beträgt 14 bis 16 Stunden. Sevofluranmetaboliten im Serum sind nach 24 Stunden nur noch in Spuren nachweisbar (HOLADAY und SMITH 1981). Prinzipiell metabolisieren Ratten aber das Inhalationsanästhetikum Sevofluran weniger als der Mensch (MARTIS et al. 1981).

2.5.3 Pharmakodynamik

2.5.3.1 Minimale alveoläre Konzentration

Im Vergleich zu anderen volatilen Anästhetika weist Sevofluran eine geringe Lipophilie auf. Folglich ist eine höhere minimale alveoläre Konzentration (MAC) zu erwarten. Diese ist bei

Neugeborenen am höchsten und fällt mit zunehmendem Alter ab. Der MAC von Sevofluran liegt beim Menschen mittleren Alters bei 1,7 bzw. 2,1 (KITAGUCHI et al. 1993) und bei der Sprague-Dawley Ratte bei 2,99 (STEFFEY et al. 2003). Die Beimischung von 70 % Lachgas vermindert den MAC-Wert um etwa die Hälfte auf 1,1 Vol % (SCHELLER et al. 1988a).

2.5.3.2 Wirkung auf den Respirationstrakt

Sevofluran irritiert die Atemwege weniger als andere volatile Inhalationsanästhetika (WALLIN et al. 1975, SMITH et al. 1992, DOI und IKEDA 1993). Da in der Induktionsphase keine Atemdepression auftritt, ist diese Narkose auch für Kinder gut geeignet (SMITH et al. 1992, BROWN und FRINK 1992). Eine Atemdepression tritt beim Menschen erst ab einem MAC von 1 auf (DOI und IKEDA 1993, MUTOH et al. 1997). Dabei ist eine Abnahme des Atemzugvolumens (KOCHI et al. 1991) und eine Zunahme der Atemfrequenz zu beobachten. Im Tierexperiment kann gezeigt werden, dass Sevofluran einen protektiven Effekt gegen Histamin-induzierte Bronchospasmen aufweist (MITSUHATA et al. 1994), und dass die Oxygenierung bei versehentlicher Einlungenventilation unter Sevofluran gewährleistet ist (FUJITA et al. 1993).

2.5.3.3 Wirkung auf die Blutgase und den Säure-Basen-Haushalt

Durch die respiratorisch depressive Wirkung von Sevofluran kann der Kohlendioxidpartialdruck im Blut ansteigen und eine respiratorische Acidose verursachen (WALLIN et al. 1975, HOLADAY und SMITH 1981, HIKASA et al. 1996).

Im Tiermodell bei Ratten kann eine stärkere Hyperkapnie und Acidose als unter Halothan beobachtet werden (CRAWFORD et al. 1990). Beim Menschen können AKAZAWA et al. (1988) einen unveränderten Kohlendioxidpartialdruck-, pH- und Basenexzesswert feststellen. In der Literatur wird jedoch vorherrschend von einem negativen Basenexzess unter Sevoflurannarkose berichtet, dessen Werte mit denen einer Isoflurannarkose vergleichbar sind (HIKASA et al. 1996).

2.5.3.4 Wirkung auf das cardiovaskuläre System

Die negativen cardiovaskulären Wirkungen des Sevofluran entsprechen qualitativ denen von Isofluran (MALAN et al. 1994, MALAN et al. 1995, MUTOH et al. 1997). Diese können durch Zugabe von Lachgas, Narkoseverlängerung oder Spontanatmung vermindert werden (MALAN et al. 1995).

In einer Studie mit Hunden stellen MUTOH und Mitarbeiter (1995) fest, dass sich die Herzfrequenz und das Auswurfvolumen in der Induktionsphase erhöhen. Diese Steigerung

soll durch den Blutdruckabfall ausgelösten Baroreflex und durch einen erhöhten Sympathikotonus, als Folge einer Kohlendioxidsteigerung, bedingt sein (MUTOH et al. 1997).

AKAZAWA et al. (1988) beobachten eine negativ chronotrope Wirkung durch steigende Sevoflurankonzentrationen. Laut KERSTEN et al. (1994) kann bei Hunden eine direkte dosisabhängige negativ inotrope Wirkung von Sevofluran auf das Myocard festgestellt werden. Im Vergleich zu Halothan ist die negative Inotropie aber deutlich geringer ausgeprägt.

Sevofluran bewirkt bei Ratten eine cardiale Depression sowohl diastolisch als auch systolisch. Diese ist aber vergleichsweise niedriger als bei anderen volatilen Anästhetika wie Halothan und Isofluran (SKEEHAN et al. 1995). MALAN et al. (1994) finden in echographischen Untersuchungen beim Menschen unveränderte Messgrößen der systolischen linksventrikulären Funktion des Herzens. Der Widerstand der Coronararterien nimmt ab (AKAZAWA et al. 1988, KAZAMA und IKEDA 1988b, BERNARD et al. 1990).

Weitere Untersuchungen des kardiovaskulären Systems ergeben, dass sich das Auswurfvolumen dosisabhängig reduziert (MANOHAR und PARKS 1984, BERNARD et al. 1990, HARKIN et al. 1994).

Außerdem kommt es bei einer Erhöhung der Sevoflurandosis zu einem Blutdruckabfall (BERNARD et al. 1990, MALAN et al. 1994, HARKIN et al. 1994, MUTOH et al. 1997). Dessen Ursache scheint eine Vasodilatation zu sein (BERNARD et al. 1990). Auch MATTA et al. (1999) können unter Sevofluran einen direkten, cerebralen vasodilatatorischen Effekt messen.

Der zentrale Venendruck bleibt laut KAZAMA und IKEDA (1988b) beim Hund unverändert. AKAZAWA et al. (1988) stellt eine Zunahme des zentralen Venendrucks bei Hunden unter hohen Sevoflurankonzentrationen fest.

2.5.3.5 Neuromuskuläre Wirkung

Der Angriffspunkt von Sevofluran an der neuromuskulären Endplatte befindet sich vor allem postsynaptisch. Belegt werden kann dieses durch Untersuchungen des sogenannten posttetanic count (PTC), der nach 1, 10 und 20 min unverändert bleibt. Der PTC kann somit als Maß für die präsynaptische Blockierung angesehen werden (SAITOH et al. 1993, ERIKSSON et al. 1995).

Die Anschlagszeit nicht-depolarisierender Muskelrelaxantien ist unter Sevofluran tendenziell, aber nicht signifikant, kürzer als unter Halothan (KAPLAN et al. 1995) oder intravenöser Anästhesie (ISHII et al. 1994). Die Wirkdauer nicht-depolarisierender Muskelrelaxantien ist

unter Sevoflurannarkose verlängert (SAITOH et al. 1993), die Erholung der neuromuskulären Funktion verzögert (MORITA et al. 1995).

Außerdem ist der Bedarf an nicht-depolarisierenden Muskelrelaxantien unter Sevoflurannarkose um ca. 30 % reduziert (VANLINTHOUT et al. 1994).

2.5.3.6 Einfluss von Sevofluran auf das Zentrale Nervensystem

In tierexperimentellen Studien induziert Sevofluran im EEG Veränderungen, die denen von Isofluran entsprechen. Es bewirkt eine dosisabhängige Zunahme der Latenz, eine Abnahme der Amplitude akustisch evozierter Potentiale mittlerer Latenz (MLAEP) und eine Konstanz der Hirnstammpotentiale (SCHELLER et al. 1988b, SCHELLER et al. 1990). Andererseits können HOLADAY et al. (1981) bei einer Sevoflurankonzentration von 2 bis 3 % keine relevanten Veränderungen im EEG beobachten.

Der cerebrale Blutfluss (CBF) bleibt im Tierexperiment bei Kaninchen und Hunden (SCHELLER et al. 1988b, SCHELLER et al. 1990) bei abnehmendem arteriellem Druck annähernd konstant, was durch eine cerebrale Vasodilatation zustande kommt. Bei Schweinen kann allerdings keine relevante cerebral vasodilatierende Wirkung festgestellt werden (MANOHAR et al. 1984, MANOHAR et al. 1986). CONZEN et al. (1992) beschreiben im Rattenversuch, bei Hirndurchblutungsmessung mit der Mikrosphärenmethode, unter Sevoflurannarkose eine weniger stark ausgeprägte cerebrale Vasodilatation im Vergleich zu Isofluran. Bei einer an Menschen durchgeführten Studie reduziert sich bei einem MAC von 0,9 die Hirndurchblutung um ca. 35 % (KITAGUSHI et al. 1993).

Die dem Isofluran ähnliche (SCHELLER et al. 1988b, SCHELLER et al. 1990, KITAGUCHI et al. 1993) oder geringer (LUNDEEN et al. 1983, CONZEN et al. 1992) ausgeprägte vasodilatierende Wirkung von Sevofluran macht dieses Anästhetikum ideal für neurochirurgische Eingriffe.

Bei einem MAC von 1 ist eine Reduktion des zerebralen Sauerstoffgehaltes um ca. 50 % zu beobachten (MANOHAR 1986, SCHELLER et al. 1990, KITAGUCHI et al. 1993).

Bei Patienten wurde unter Sevoflurannarkose die Beziehung zwischen cerebralem Blutfluss und arteriellem paCO_2 untersucht. Die Auswertung ergibt, dass die CO_2 -Antwort der Gehirndurchblutung bei einem MAC von 0,9 und einem paCO_2 -Wert von 33 bis 47 mmHg aufrechterhalten wird (KITAGUCHI et al. 1993). Auch bei einem Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks auf 110 bis 120 mmHg bleibt die cerebrale Autoregulation vollständig erhalten (FUJIBAYASHI et al. 1994). Es kann demzufolge auf eine intakte cerebrale Autoregulation unter der oben beschriebenen Sevoflurankonzentration geschlossen werden (KITAGUSHI et al. 1993).

In Studien von SCHELLER und Mitarbeiter wird publiziert, dass Sevofluran sowohl bei Hunden, Ratten und Kaninchen, als auch beim Menschen den cerebralen Sauerstoffverbrauch und die Metabolisierungsrate senkt (SCHELLER et al. 1988a, SCHELLER et al. 1988b, SCHELLER et al. 1990).

FUJIBAYASHI et al. (1994) untersuchen den cerebralen Energiestoffwechsel bei Katzen. Bei Normokapnie und einem MAC bis zu 4 kann keine Veränderung des cerebralen Energiestoffwechsels festgestellt werden. Lässt man das Tier hyperventilieren, reicht bereits ein MAC von 2 aus, um pathologische Veränderungen im Energiestoffmetabolismus hervorzurufen. Die Autoren begründen dies aber nicht mit der Wirkung von Sevofluran, sondern mit der hyperventilationsbedingten Abnahme der Durchblutung um mehr als 50 %. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass Sevofluran jedoch keinen direkten nachteiligen Effekt auf den cerebralen Energiestoffwechsel ausübt.

2.5.3.6.1 Einfluss von Sevofluran auf die Körpertemperatur

Auch die Thermoregulation des Körpers wird durch Einsatz von Anästhetika beeinflusst. Thermoregulatorische Prozesse werden bei einer Abweichung von $> 0,2$ °C vom Sollwert induziert. Der Schwellenwert wird bei Anästhetika reduziert und begünstigt somit ein Auskühlen des Patienten während der Operation. Sevofluran hemmt die Körpertemperaturregulierung (EGER 1994). Der Schwellenwert des Menschen kann durch 2 Vol % Sevofluran von ca. 37 °C auf $35,1 \pm 0,4$ °C reduziert werden und löst regulatorisch eine Vasokonstriktion aus (OZAKI et al. 1995).

2.5.3.6.2 Einfluss von Sevofluran auf Leber und Nieren

Bei einer Sevoflurannarkose bleibt das Harnkonzentrationsvermögen der Niere erhalten (FRINK et al. 1994, EGER et al. 1997). Eine von EGER et al. (1997) gemessene postnarkotische Glucosurie wird durch mögliche Schädigung des proximalen Tubulus begründet.

Das im Absorberkalk entstehende Olefin und dessen Konzentrationsschwelle für eine Nephrotoxizität untersuchen GONSOWSKI et al. (1994) an Ratten und stellen einen möglichen Bezug zum Menschen her. Laut FRINK et al. (1992a) wird aber eine nephrotoxische Konzentration nicht erreicht.

In tierexperimentellen Studien zeigen FRINK et al. (1992a), dass der leberarterielle Fluss und damit die Sauerstoffversorgung über die A. hepatica ähnlich gut wie unter Isofluran aufrechterhalten werden kann.

CONZEN et al. (1992) berichten von einem gleich bleibenden portalvenösen Lebereinstrom wie der des Isoflurans. Somit wird unter Narkosebedingungen die Sauerstoffversorgung der Leber aufrechterhalten. Sevofluran kennzeichnet in vivo wie auch in vitro eine große Abbauproduktivität. Eine renale oder hepatische Schädigung durch das Gas selbst oder dessen Abbauprodukte kann nicht nachgewiesen werden (FRINK et al. 1992a, MALAN et al. 1993, FRINK 1995, SCHOLZ et al. 1996).

2.5.3.6.3 Einfluss von Sevofluran auf Blutglucose und Hormone

HIKASA et al. 1996 stellt unter Sevoflurannarkose bei Katzen eine Hyperglykämie fest.

Unter Sevoflurannarkose steigt Prolaktin stark und Plasmainsulin sinkt.

Allerdings ist auch bei chirurgischer Manipulation ein mäßiger Anstieg von ACTH, Wachstumshormonen und Glucose zu beobachten (OYAMA et al. 1989).

2.5.4 Toxikologie von Sevofluran

Die Ergebnisse der bislang durchgeführten Untersuchungen zur Frage der Organtoxizität von Sevofluran lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Laut KENNA und JONES (1995) ist Sevofluran nicht nephro- oder hepatotoxisch. Den bei der Biotransformation entstehenden Metaboliten kann keine hepatische oder renale Toxizität nachgewiesen werden (KHARASCH 1995). Selbst im sensitivsten Tiermodell zum Nachweis von Nephrotoxizität von Inhalationsnarkotika, dem Fischer 344 Rattenstamm, zeigen sich weder histopathologisch noch funktionell Anzeichen einer Schädigung (COOK et al. 1975, MARTIS et al. 1981).

Es gibt jedoch Studien, die eine potenzielle Toxizität von Sevofluran in Frage stellen. So kann eine Nephrotoxizität des im Absorberkalk entstehenden Compound A nicht ausgeschlossen (EGER et al. 1997), aber auch nicht bewiesen werden (JONES und CONZEN 1996).

In der Literatur finden sich stark schwankende Angaben zur Inzidenz postoperativer hepatischer Dysfunktionen. Meist handelt es sich um einen Anstieg der Transaminasen und/oder des Bilirubins. Dieser Anstieg findet seine Erklärung in der intraoperativen Beeinträchtigung der hepatischen Sauerstoffversorgung, in chirurgischen Manipulationen und in der Mediatoren- und Hormonfreisetzung und nicht in tatsächlichen Veränderungen der Leberfunktion (CONZEN und HOBBAHN 1996).

Anders als bei Halothan handelt es sich bei Sevofluran um das erste fluoridierte Inhalationsanästhetikum, bei dessen Metabolisierung keine Trifluoressigsäure entsteht. Schwere Leberschäden, wie sie nach Konjugation des Trifluoressigsäure mit intrazellulären Makromolekülen („Halothan-Hepatitis“) möglich sind, können nach einer Sevoflurannarkose weitgehend ausgeschlossen werden (CONZEN und HOBBAHN 1996).

SCHRIFTTUM

Da weder Trifluoressigsäure, noch vergleichbar reaktive Metaboliten (FRINK und BROWN 1994) bei der Sevoflurannarkose entstehen, ist das Risiko eines schweren Leberschadens nach Sevoflurannarkose als vernachlässigbar einzuordnen.

Das entstehende HFIP wird glucuronidiert und rasch ausgeschieden, so dass das Risiko für die Entstehung kovalenter Komplexe mit hepatozellulären Makromolekülen gering ist. Dies wird durch In-vitro-Experimente an Rattenlebern gestützt, bei denen zwar nach Halothan-, nicht aber nach Sevoflurannarkose kovalente Bindungen mit hepatozellulären Proteinen gefunden werden (GREEN et al. 1994).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielvorstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Expression Apoptose-assoziiierter Proteine nach inkompletter cerebraler Ischämie mit Reperfusion und zeitgleicher Behandlung mit dem Inhalationsanästhetikum Sevofluran im protrahierten zeitlichen Verlauf von 28 Tagen zu untersuchen.

Bisherige tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass Sevofluran, aber auch andere volatile Anästhetika, einen cerebralen Schaden nach Ischämie reduzieren können (WARNER et al. 1993). Diese cerebralen Ischämien verursachen je nach Schweregrad einen schnellen nekrotischen oder einen langsamen apoptotischen Zelltod (KEMPSKI 1994). Während eines apoptotischen Zelltodes kommt es zur Expression sogenannter Apoptose-assoziiierter Proteine, die eine pro-apoptische (Bax, und p53) oder eine anti-apoptische (Bcl-2 und Mdm-2) Wirkung besitzen. Bereits 4 Stunden nach einer cerebralen Ischämie folgt die erhöhte Expression des pro-apoptischen Proteins Bax. Durch die Behandlung mit Sevofluran kann diese Proteinexpression nachweislich reduziert werden (ENGELHARD et al. 2001).

Die vorliegende Studie untersucht, ob die Expression der Apoptose-assoziierten Proteine Bax, Bcl-2, Mdm-2 und p53 im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen nach einer cerebralen Ischämie mit Reperfusion (CHARRIAUT-MARLANGUE et al. 1998) durch eine Behandlung mit Sevofluran beeinflusst werden kann.

Die genannten Proteine werden anhand der folgenden Untersuchungen identifiziert und auf quantitative Veränderungen der Apoptose-assoziierten Proteine hin untersucht.

Zu vier definierten Zeitpunkten (1., 3., 7. und 28. Tag) werden die Gehirne der Versuchstiere qualitativ und semi-quantitativ durch Immunfluoreszenzfärbung und Proteinbestimmung durch Western-Blot-Analyse auf die vier Apoptose-assoziierten Proteine Bax, Bcl-2, Mdm-2 und p53 analysiert.

Mit dieser Studie sollen Untersuchungen wie die von ENGELHARD et al. 2001 über die mögliche neuroprotektive Wirkung von Sevofluran ergänzt werden. Eine potenzieller dauerhafter Einfluss des Sevofluran auf die Expression der Apoptose-assoziierten Proteine und damit auf neuronale Schäden im Gehirn wird im Modell an der Ratte untersucht, um neue therapeutische Möglichkeiten für die klinische Anwendung zu entwickeln.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz, § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG i. d. F vom 25.05.1998, BGBl I S.1105; AZ 211-2531-29/99) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2 Material und Methodik

3.2.1 Versuchstiere und deren Haltung

Die Untersuchungen werden an 72 männlichen Sprague-Dawley Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) durchgeführt.

Das Gewicht der Tiere zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung bewegt sich zwischen 375 und 455 g. Die Adaptionszeit nach Lieferung der Tiere vom Erzeuger beträgt mindestens 7 Tage. Maximal fünf Tiere werden in einem Gruppenkäfig (Makrolon Typ 4) gehalten. Der Käfig ist mit entkeimtem und entstaubtem Weichholzgranulat (Fa. Altromin, Lage/Lippe) eingestreut und die Ratten erhalten Futter (Alleinfutterpellets für Ratten und Mäuse „ssniff R/M-Haltung, 10 mm, nitrosaminarm der Fa.ssniff Spezialitäten GmbH, Soest) und Wasser ad libitum.

Die postoperative Haltung erfolgt in Einzelkäfigen. Die Raumtemperatur beträgt zwischen 20 und 23 °C bei einer relativen Luftfeuchte zwischen 50 und 60 %. Durch ein automatisches Beleuchtungssystem wird eine Tagphase mit 50 bis 100 Lux und eine Nachtphase im 12-Stunden-Rhythmus simuliert.

3.2.2 Einteilung der Versuchstiergruppen

Für die vorliegende Untersuchung werden die Ratten in drei Gruppen randomisiert eingeteilt. Die erste Gruppe stellt die Kontrollgruppe dar und durchläuft nach abgeschlossener Präparation (Anästhesie während der Präparation: Isofluran und Sauerstoff/Lachgasgemisch [$FiO_2=0,33$]) alle Operationsphasen, einschließlich der Ischämie unter einer Anästhesie mit Fentanyl (25 µg/kg/h) und N_2O/O_2 .

Die zweite Untersuchungsgruppe, nachfolgend „Sevoflurangruppe“ genannt, entspricht der Behandlungsgruppe. Diese Tiere werden nach der Präparation auf eine Sevoflurannarkose (2 Vol % in O_2 /Raumluft) umgestellt. Zusätzlich gehen in diesen Versuch 8 Nativtiere, die die physiologischen Referenzwerte liefern, ein. Diese Tiere werden nicht operiert, sondern gehen völlig unbehandelt in die Analyse.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab 3: Einteilung der Versuchstiergruppen und deren Anästhesie

Tiergruppe	Kontrollgruppe	Sevoflurangruppe	Nativgruppe
Anzahl (n)	32	32	8
Anästhesie	Fentanyl/ N ₂ O	Sevofluran 2 Vol % in O ₂ / Raumlufte	Keine

Für den analytischen Teil werden die Tiere der Versuchsgruppen nach der Operation einem der vier festgelegten Untersuchungszeitpunkte randomisiert zugeteilt.

Tab 4: Einteilung der Versuchstiergruppen nach dem Untersuchungszeitpunkt

UNTERSUCHUNGS- ZEITPUNKT POST OP:	1. TAG	3. TAG	7. TAG	28. TAG
Kontrollgruppe (n=32)	8	8	8	8
Sevoflurangruppe (n=32)	8	8	8	8

3.2.3 Versuchsvorbereitung

Das Versuchstier wird 12 h Stunden vor dem Eingriff aus der Tiergruppe separiert und für die verbleibende Zeit zur besseren Überwachung der notwendigen präoperativen Ausgangsbedingungen unter Futterentzug in einem Einzelkäfig gehalten.

Die Tiere gehen nüchtern (=normoglycäm) in den Versuch, um der Gefahr einer intraoperativen Acidose vorzubeugen.

Präoperativ steht den Tieren jedoch Wasser ad libitum aus einer Nippeltränke zu Verfügung.

Alle während des folgenden Eingriffs verwendeten Katheter werden zuvor über Nacht in Heparin (Liquemin[®] N 25.000 I.E./ml, Hoffmann-La Roch AG, Grenzach-Whylen) eingelegt und vor dem Eingriff mit einer Mischung aus 500 ml einer Vollelektrolytlösung (Thomaejonin[®]) und 0,2 ml Heparin (Liquemin[®]) gespült.

3.2.4 Versuchsdurchführung

Im nachfolgend beschriebenen Versuch muss zwischen einem operativen und analytischen Teil unterschieden werden.

3.2.4.1 Operativer Teil

Der operative Versuchsteil lässt sich nach folgendem Schema in Operationsphasen einteilen:

Tab 5: Operationsphasen

<i>PHASE:</i>	<i>DAUER:</i>
Präparation	ca. 1,5 h
Äquilibration	52 min
Hypoperfusion	8 min
Ischämie	45 min
Reinfusion + Reperfusion	15 min
Erholungsphase	45 min

3.2.4.1.1 Vorbereitung

Das Versuchstier wird im vertrauten Käfig einer kurzen Allgemeinuntersuchung unterzogen und anschließend gewogen. Es werden ausschließlich gesunde Tiere mit ungestörtem Allgemeinbefinden in diesem Versuch eingesetzt.

3.2.4.1.2 Anästhesie, Narkose-Monitoring und Messparameter

Anästhesie:

Zur Narkoseeinleitung und zur Ausschaltung des Schluckreflexes für die orotracheale Intubation wird die Ratte durch Kammerinhalation anästhesiert. In einem verschließbaren Glaszylinder (Durchmesser ca. 25 cm) wird Zellstoff ausgelegt. Der Zellstoff ist vorab mit ca. 1 ml Halothan (Halothan ASID, Rüscher Hospital Vertriebs GmbH, Böblingen) getränkt. Anschließend wird die Ratte in den verschlossenen Standzylinder gesetzt.

Unmittelbar nach Eintritt der Bewusstlosigkeit muss das Tier aus dem Zylinder entnommen und zügig intubiert werden. Zur Intubation wird das Tier an ein Schrägbrett gehängt und mit Hilfe eines modifizierten Säuglingslaryngoskop (mit verdünntem Spatel) intubiert. Als Tubus wird ein Herzkatheter (Cavafix, Certo 225, Fa. Braun AG, Melsungen) verwendet, der je nach Rattengröße individuell gekürzt wird.

Die Narkose zur Präparation der Gefäße wird unter Isofluran (Forene®, Abbot GmbH, Wiesbaden) (1,5-2,5 Vol %) und Sauerstoff/Lachgasgemisch (Mischungsverhältnis 1:2) fortgeführt.

Die Beatmung erfolgt durch eine volumengesteuerte Beatmungspumpe (Harvard Rodent Ventilator, Model 883, Harvard Apparatus Inc., Massachusetts, 01760 USA). In einem halboffenen System ohne Rückatmung und konstanter Frischgaszufuhr (2 l/min) wird kontrolliert beatmet.

Vor Ischämiebeginn wird die Narkose der Behandlungsgruppe von Isofluran auf 2,0 Vol % Sevofluran (SEVOrane®, Abbott GmbH, Wiesbaden) in O₂/Luft -Gemisch (FiO₂=0,33) umgestellt. Bei der Kontrollgruppe wird nach der Präparation die Isofluranzufuhr beendet und die Narkose mit Fentanyl/ N₂O fortgeführt. Zusätzlich wird das Muskelrelaxans Rocuronium (Esmeron®, 0,8 ml/h) injiziert, um eine kontrollierte Beatmung ohne Gegenatmung zu gewährleisten. Nach Kontrolle der Blutgaskonzentrationen unter Zuhilfenahme eines Blutgasanalysegerätes (Modell 865, Chiron Diagnostics, Fernwald) wird während der ischämischen Phase nach Bedarf Natriumhydrogencarbonat 8,4 % zugegeben, um einer Acidose entgegenzuwirken.

Zusätzlich ist bei Präparationsbeginn ein initialer Bolus Fentanyldihydrogencitrat (Fentanyl-Janssen®) von 0,01 mg/kg KM i. v. zu verabreichen und die Fentanylgabe mit anschließender Dauertropfinfusion (0,025 mg/kg/h i. v.) über einen Perfusor (Modell 11, Syringe Pump, Dual V, Fa. Harvard Apparatus Inc., South Natick, Massachusetts, 01760, USA) fortzusetzen.

Narkose-Monitoring und Messparameter:

Die Qualität der Beatmung wird durch einen Atemgasmonitor (Capnomac, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) durch die Kontrolle der endexpiratorischen Konzentrationen von CO₂, O₂, N₂O und Isofluran/ Sevofluran überwacht.

Die endexpiratorische CO₂-Konzentration (etCO₂) bewegt sich durch die Regulation der Beatmungsfrequenz zwischen 38 und 42 mmHg.

Die periphere und die pericranielle Körpertemperatur werden kontinuierlich erfasst. Die periphere Messung erfolgt über eine rektale Temperatursonde (Exacon[®]-Asmuth D-RB2 Neonaten, Asmuth Medizintechnik GmbH, Minden), die Messung der pericraniellen Temperatur über eine in den rechten M. temporalis implantierte (0,3 mm Dicke, 1,5 cm Länge) Temperatursonde (Hypodermic Needle Probes Hyp f-30-1/2-T-G-60-SMP-M, Ω Omega[®], Stamford, CT/ USA).

Die pericranielle Temperatur wird mit einem Heizkissen, einem Temperaturkontrollgerät (Ω Omega[®], Stamford, CT/ USA) und einer Infrarotwärmelampe reguliert.

Durch die Rückkopplung der pericraniellen Temperatursonde mit dem Kontrollgerät und der Wärmelampe kann die Gehirntemperatur während des Eingriffs konstant zwischen 37,4°C und 37,6°C gehalten werden.

Das Monitoring der Herzkreislauffunktionen erfolgt über ein EKG-Gerät (Cardiicap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland). Für die Ableitung werden zwei Nadelelektroden subcutan jeweils 1 cm parasternal angebracht. Mit Hilfe eines Monitors wird das EKG sichtbar gemacht, was die Auszählung der Herzfrequenz mit einem EKG-Lineal ermöglicht.

Die Blutdruckmessung erfolgt invasiv über die katheterisierte rechte A. femoralis durch einen Druckdom (MX 960, Fa. Medex), der sowohl an ein Messgerät (Cardiicap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) als auch an einen Gegendruckbeutel (mit 0,9 % NaCl) angeschlossen ist.

Die erhobenen Werte sind systolischer Blutdruck (SAP), diastolischer Blutdruck (DAP) und mittlerer arterieller Druck (MAP).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Mit der Blutgasanalyse (BGA) werden arterieller Sauerstoffpartialdruck (paO_2), arterieller Kohlendioxidpartialdruck ($paCO_2$), Blut-pH und Standardbicarbonat über einen Analyzer gemessen (pH/ Blutgasanalyzer 1306, Fa. Instrumentation Laboratory, 20128 Mailand, Italien).

Für die Blutgase und Blutglucose wird zu definierten Messzeiten über den arteriellen Katheter Blut entnommen.

Tab 6: Definierte Messzeiten und Messparameter

Messzeiten:	Ausgangswert (Baseline)	45 min in der Ischämie	15 min nach Beginn der Reperfusion	45 min in der Erholungs-phase (Recovery)
Messparameter:	MAP; HF; AF; EEG LDF li und LDF re (Laser-Doppler-Flussmessung) Rektale und pericranielle Temperatur paO_2 ; $pa CO_2$; inspiratorisches O_2 pH-Wert Gesamthämoglobin; Blutglucose			

Ein weiteres Überwachungsinstrument während des gesamten Eingriffs ist die Elektroencephalographie (Oscilloscope, Hameg 20 MHz, HM205-3, Frankfurt).

Eine Ableitung der Signale der beiden Gehirnhälften geschieht mit zwei Nadelelektroden, die in 0,5 cm Abstand zum lateralen Lidwinkel über der rechten und linken Hemisphäre die Haut perforierend bis zum Knochenkontakt eingeführt werden. Zwei weitere Elektroden werden je medial der beiden Ohransätze wie bereits oben beschrieben angebracht. Zusätzlich erfolgt die Befestigung einer Erdungselektrode an der Schwanzwurzel.

Die Erfassung der lokalen, kortikalen Hirndurchblutung findet mit der Laser-Doppler-Flussmessung (Laser-Doppler Periflux 4001 Master, Fa. Perimed, Järfälla, Schweden) statt.

Folgende Vorgehensweise ist für das Anbringen der Messsonden notwendig: Das Tier wird in Bauchlage in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt. Vor Beginn der Schädelknochenpräparation sollte der Ratte ein Trommelfellschutz aufgesetzt werden. Die Augen sind zum Schutz vor Austrocknung zusätzlich mit Augensalbe versorgt und mit einem Gazestreifen abgedeckt. Alle Schnittflächen und späteren Präparationsstellen werden mit einem Bolus von 0,2 ml eines Lokalanästhetikums (Bupivacain® 0,5 %, Fa. Curasan, Kleinostheim) unterspritzt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Zunächst wird das Periost der Schädeldecke über einen median verlaufenden 1,5 cm langen Hautschnitt dargestellt. Nach Abpräparation des Periosts und Fixation mit mehreren Moskitoklemmen, kann das Schädeldach mit einem kleinen Diamantbohrer (Diamant-Schleifstift Kugelform \varnothing 1mm, Fa. Proxxon, Niersbach) paramedian der Sutura sagitalis flächig (nicht penetrierend) abgefräst werden.

Zwei Messsonden (Reichweite 1 mm) werden lateral der Sutura sagitalis auf dem Schädelknochen angebracht und zusätzlich an dem stereotaktischen Rahmen fixiert.

Zur Kontrolle der exakten Sondenposition wird im Anschluss eine CO₂-Provokation durchgeführt. Nach Reduzierung der Isofluran-Beatmung auf 1 Vol % und gleichzeitiger kontrollierter Hyperventilation fällt die CO₂-Spannung im Blut ab und das Gehirn reagiert mit einer Vasokonstriktion seiner Gefäße. Bei korrektem Sondensitz reduziert sich der Messwert der Gehirndurchblutung um mindestens 10 %. Die Provokationsprobe ist in diesem Fall als positiv zu bezeichnen. Bei einer negativen Provokationsprobe ist der Sitz der Sonden zu korrigieren und nach einer Erholungsphase mit einer erneuten Provokation zu kontrollieren.

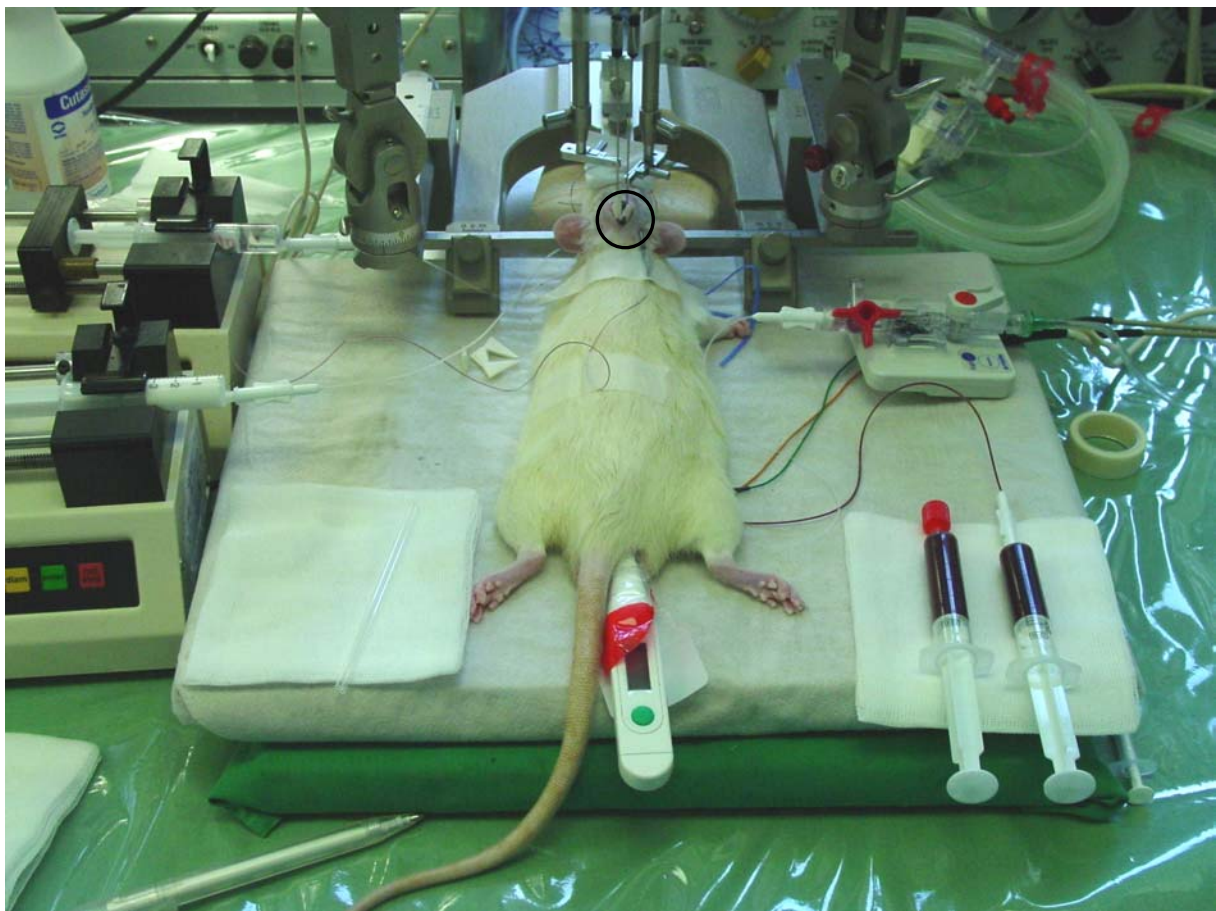


Abb.1: Versuchsaufbau nach chirurgischer Präparation und Installation der Messsonden (Kreisausschnitt): Fixation der Ratte im stereotaktischen Rahmen (während der Ischämie)

3.2.4.1.3 Präischämische OP-Phase

Präparation der Gefäße und Operationsvorbereitung:

Die Präparationsstellen in der rechten Inguinalgegend und an der rechten Halsseite werden rasiert und desinfiziert (Cutasept[®]F, Fa. Bode, Hamburg). Zunächst erfolgt die Darstellung der A., V. und N. femoralis. Dazu wird inguinal parallel zum Gefäßverlauf ein Hautschnitt gesetzt, das subcutane Fettgewebe stumpf abgetrennt und so weit in die Tiefe präpariert, bis A./V. und N. femoralis sichtbar werden. Das Bindegewebe, wie auch der N. femoralis, sind strukturschonend von den Gefäßen zu lösen.

Für die invasive Blutdruckmessung (Cardiicap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) und Blutgas- und Blutglucosebestimmung wird mit einem angespitzten Polyethylen-(PE)-Katheter (Länge 33,5 cm, Außendurchmesser: 0,97 mm, Innendurchmesser: 0,58 mm, hauseigene Herstellung) die A. femoralis katheterisiert. Für die Punktion der V. femoralis wird ein stumpfer PE-Katheter verwendet. Der Venenzugang dient dem Blutentzug während der Ischämiephase und anschließender Reperfusion.

Für einen Zugang zur A. carotis communis dextra und V. jugularis dextra werden die Haut und der Hautmuskel paramedian am caudoventralen Abschnitt der Halsbeuge inzidiert. In die V. jugularis, im Sulcus jugularis zwischen M. brachiocephalicus und M. sternocleidomastoideus gelegen, werden zwei PE-Katheter ca. 2,5 cm tief eingeführt und fixiert. Der erste Katheter dient der kontinuierlichen Fentanylgabe während des Eingriffs, der zweite Katheter wird für die sonstige Medikamentenapplikation (z.B. Rocuronium und Natriumbicarbonat) benötigt.

Durch stumpfe Präparation kann nun die zwischen M. sternohyoideus und M. sternocleidomastoideus gelegene A. carotis communis dextra freigelegt werden. Anschließend sollte der Truncus vagosympathicus schonend von der A. carotis communis dextra abpräpariert werden. Dann wird eine Unterbindungsschlinge aus Kunststoff (1 mm Breite) lose um die A. carotis gelegt und mit dem Gefäß in die Tiefe versenkt ohne den Blutfluss zu behindern.



Abb.2: Anbindung der A. carotis communis dextra mit einer Kunststoffschlinge

Äquilibration:

Vor Beginn der Äquilibration wird das Narkosegas von Isofluran auf Sevofluran umgestellt. Tiere der Kontrollgruppe erhalten eine Anästhesie mit Fentanyl/ N₂O.

Zur Stabilisierung der Kreislauftsituation (steady state) und Einstellung konstanter Ausgangswerte durchläuft das Versuchstier eine 52-minütige Äquilibrationsphase mit konstanten Bedingungen. Die präschämischen Basisparameter werden als Ausgangswert (AW) genutzt, ehe der Versuch fortgeführt wird.

Hypoperfusion:

In der Hypoperfusionsphase wird über einen Zeitraum von 8 min konstant ein Blutvolumen von 10 bis 16 ml aus der katheterisierten V. femoralis entnommen bis der MAP auf 40 mmHg gesunken ist. Zur Acidoseprophylaxe wird während der Hypoperfusions- und Ischämiephase das Muskelrelaxans Rocuronium durch Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) 8,4 % (2,8 ml/h/kg KM) ersetzt und durch die V. jugularis verabreicht.

Das entnommene Blutvolumen wird bis zur Reinfusion in heparinisierten 5 ml Einmalspritzen körperwarm und schwenkend aufbewahrt.

Bei Erreichen des gewünschten MAP-Wertes von 40 mmHg wird nach 8 min die rechte A. carotis communis mit Hilfe der bereits in der Präparation angebrachten Schlinge freigelegt und reversibel mit einem Gefäßclip verschlossen.

3.2.4.1.4 Ischämie

Die Ischämiephase ist auf eine konstante Zeitdauer von 45 min festgesetzt. Der MAP von 40 mmHg wird währenddessen gehalten und durch Zugabe oder Entnahme von Blut über die katheterisierte V. femoralis reguliert. Gegen Ende dieser Zeit werden die Blutgase und andere Messparameter zu einem festgelegten Zeitpunkt bestimmt (siehe Tabelle 6).

3.2.4.1.5 Postischämische OP-Phase

Reinfusion und Reperfusion:

Nach Ablauf der 45 min Ischämie wird der Verschluss der A. carotis communis dextra wieder gelöst und das in der Hypoperfusionsphase entnommene Blut innerhalb von 15 min reinfundiert. Gegen Ende der Reinfusion werden nochmals Blutgase und die Messparameter bestimmt (siehe Tabelle 6).

Erholungsphase:

In der so genannten Erholungsphase (Recovery), mit einer Dauer von 45 min, soll sich der Kreislauf des Versuchstieres stabilisieren und für die Folgeuntersuchungen konstante Ausgangsbedingungen schaffen. Nach Bestimmung der letzten Messparameter gegen Ende der Erholungsphase werden sowohl die Katheter aus den Blutgefäßen, als auch die Messsonden an Kopf und Brust entfernt. Die Läsionen werden mit Lokalanästhetikum Bupivacain (Bucain[®] 0,5 %) unterspritzt und schließlich mit U-Heften (4/0 Prolene[®]) verschlossen. Zuletzt erhält das Tier 10 ml einer Vollelektrolytlösung (Thomaejonin[®]) subcutan als Flüssigkeitsdepot. Am Ende des operativen Eingriffs setzt langsam mit Abklingen des Anästhetikums und des Muskelrelaxans die Spontanatmung wieder ein und die kontrollierte Beatmung wird schrittweise reduziert und schließlich abgeschaltet.

Wenn das Tier vollständig aus der Narkose erwacht ist, wird es bis zum individuell randomisierten Untersuchungszeitpunkt (1., 3., 7. oder 28. Tag) einzeln gehalten.

Gewicht, Futteraufnahme und das Allgemeinbefinden des Tieres werden täglich bis zum randomisierten Untersuchungstag (siehe Tab. 4) kontrolliert.

3.2.4.2 Analytischer Teil

3.2.4.2.1 Probenentnahme und Präparation des Gehirns

Die Euthanasie der Ratte findet, abhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit, nach 1, 3, 7 oder 28 Tagen statt. Dazu setzt man sie, wie auch schon zur Narkoseeinleitung, in einen gläsernen Standzylinder, der mit Halothan getränktem Zellstoff ausgelegt ist.

Sobald sich das Tier in so tiefer Narkose befindet, dass die Atmung aussetzt und eine Reflexantwort ausbleibt, erfolgt die Tötung durch einen Genickbruch. Nach einem Hautschnitt wird die Kopfhaut bis zu den Augen nach rostral vorpräpariert und anschließend die Halswirbelsäule und die Nackenmuskulatur mit einer chirurgischen Schere durchtrennt und das getötete Tier dekapitiert.

Die beiden Mm. temporales werden durchtrennt und vom Schädelknochen abgehoben. Das freiliegende Os occipitale und Os parietale wird mit einer Hohlmeißelzange stückchenweise entfernt und die Dura aufgerissen bis das Gehirn freiliegt. Zur Exenteration des Gehirns müssen Dura mater, Arachnoidea und die oberflächlichen Gefäße entfernt werden. Mit einem kleinen Metallspatel kann daraufhin die Verbindung zwischen N. opticus und Gehirn und basal am Foramen magnum gelöst und das Gehirn vorsichtig ohne Substanzverlust aus der knöchernen Schädelkalotte luxiert und entwickelt werden. Nach Entfernung des Kleinhirns wird rostral wie auch caudal eine ca. 1 mm dicke Scheibe des Großhirns mit einem Skalpell abgetrennt.

Anschließend versenkt man das präparierte Gehirn caudalwärts in einem Aluminiumzylinder (\varnothing 1,5 cm), der bereits mit einem Einfriermedium (Tissue Freezing Medium) bis zur Hälfte aufgefüllt ist. Ein zweites Gefäß ist mit Methylbutan aufgefüllt und auf Trockeneis gestellt. Der Aluminiumzylinder sollte in diesem zweiten Behälter solange aufbewahrt werden, bis sowohl die Probe als auch Medium durchgefroren sind. Der Aluminiumzylinder inklusive Probeninhalt kann bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

3.2.4.2.2 Untersuchungsmethoden

Immunfluoreszenzfärbung:

Prinzip:

Nachweis von Antigenen in Zellen durch einen mit einem fluoreszierenden Stoff markierten Antikörper. Nach Exposition mit Licht (488 nm) fluoresziert der am Antikörper gekoppelte Farbstoff.

In diesem Versuch wird die indirekte Immunfluoreszenzfärbemethode gewählt.

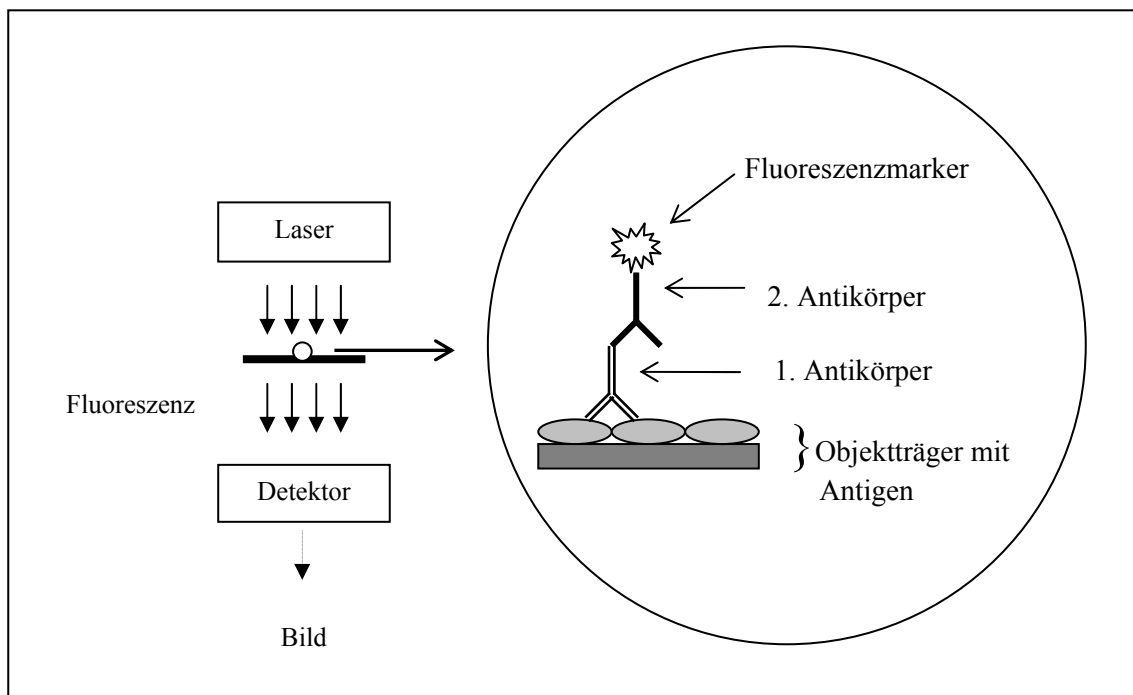


Abb.3: Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung

Durchführung:

Nach Fixation der Hirnschnitte (enthält das Antigen) und Inkubation mit spezifischen Antikörpern erfolgt die Beurteilung mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop.

Ziel ist die semi-quantitative Untersuchung der Apoptose-assoziierten Proteine Bax, Bcl-2, p53 und Mdm-2 wie auch deren räumliche Verteilung im Gehirn.

Probenvorbereitung:

Für die indirekte Färbemethode der Immunfluoreszenz sind Gefrierschnitte die Methode der Wahl.

Zunächst wird die bei -70°C gelagerte Probe aus dem Aluminiumzylinder entnommen und möglichst vollständig vom Einfriermedium befreit. Danach schneidet der Untersucher das Gehirn mit einem Kryotom soweit an, bis die gewünschte Schnittebene (Ebene 33) (PAXINOS und WATSON 1998) erreicht wird. Die vertikale Schnitfführung in der Transversalebene wird in cranio-caudaler Richtung soweit positioniert, dass Cortex, Hippocampus, Thalamus und Hypothalamus erfasst werden. Es werden Gefrierschnitte mit einer Schnittdicke von $7\ \mu\text{m}$ angefertigt und jeweils zwei Schnitte auf einem Objektträger (Superfrost) fixiert.

Material:

Für die Färbung werden pro Versuchstier folgende Gewebeschnitte gefärbt:

- je zwei Objektträger mit den Gehirnschnitten des Probetieres für die Apoptose-assoziierten Proteine Bax, Bcl-2, p53, Mdm-2
- je ein Objektträger mit einem Leberschnitt eines Nativtieres als Positivkontrolle für die zu bestimmenden Proteine Bax, Bcl-2, p53, Mdm-2
- ein Objektträger mit einem Leberschnitt eines Nativtieres als Negativkontrolle
- ein Objektträger mit den Gehirnschnitten eines Nativtieres als Gehirn-Negativkontrolle

Die Qualität der Färbung wird mit Positiv- und Negativkontrollen überprüft. Zum Ausschluss methodischer Färbefehler werden bei jedem Färbedurchgang der Proben zusätzlich Referenzfärbungen als Positiv- und Negativkontrollen angefertigt. Dabei sind Leberschnitte gesunder Ratten besonders geeignet, da im Lebergewebe die nachzuweisenden Proteine Bax, Bcl-2, p53 und Mdm-2 physiologisch in großer Menge vorhanden sind (HARADA et al. 2000, KANZLER und GALLE 2000).

Ein fehlendes oder sehr schwaches Signal der Leberpositivkontrolle lässt auf einen Färbefehler schließen. Umgekehrt kann bei einer ausreichenden Signalintensität des Lebergewebes eine gleichzeitig schwache Signalintensität der Gehirnschnitte als tatsächliches Ergebnis gewertet werden. Bei der Negativkontrolle wird auf den ersten Antikörper, der spezifisch an die nachzuweisenden Apoptoseproteine bindet, verzichtet. Es erfolgt nur eine Inkubation mit dem Fluoreszenz-AK, der unspezifisch bindet und das Maß der Eigenfluoreszenz der Leber sichtbar macht. Nach gleichem Prinzip wie bei der Negativkontrolle der Leber wird mit jedem Färbedurchgang eine Negativkontrolle des Gehirnes mitgefärbt. Die Gehirn-Negativkontrolle ermittelt den Wert der unspezifischen Hintergrundanfärbung und wird bei der Auswertung vom Wert der spezifischen angefärbten Proteine subtrahiert.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Färbung:

Die Immunfluoreszenzfärbung wird nach folgendem Schema durchgeführt:

Arbeitsschritt:	Dauer:
Fixation der Gefrierschnitte in Ethanol (100 %)	10 min
↓	
Waschen der Gefrierschnitte in PBST	2 x 15 min
↓	
Blockiervorgang mit 10 % FKS	60 min
↓	
Inkubation mit dem 1. Antikörper	60 min
↓	
Waschen der Gefrierschnitte in PBST	40 min
↓	
Inkubation mit dem 2. Antikörper (Lichtschutz)	60 min
↓	
Waschen der Gefrierschnitte in PBST	40 min
↓	
Eindecken der Objektträger mit Mounting Medium	-
↓	
lichtgeschützte Lagerung der Objektträger bei 4 °C	max. 24 h

Nach Beschriftung der bei -70 °C gelagerten Objektträger mit der jeweiligen Tiernummer und dem verwendeten Antikörper werden die Proben in einem Objektträgerhalter gestellt und in einer Standkuvette für 10 min mit 100 % Ethanol pro analysi bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixation erfolgt durch den Flüssigkeitsentzug aus dem Probengewebe.

Nach Wechsel des Objektträgerhalters in eine neue Standkuvette, gefüllt mit Phospored buffered Sodium + Tween 20[®] (PBST), werden die Schnitte auf einem Schüttler für 30 min gewaschen. Das PBST wird während dieser Zeit mehrfach gewechselt.

In einer feuchten Kammer erfolgt der erste Inkubationsschritt. Mit frisch angemischtem und gekühltem 10 % fetalem Kälberserum (FKS) in PBST werden unspezifische Bindungen im Gewebe blockiert.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die einzelnen Objektträger werden bis auf den darauf befindlichen Schnitt getrocknet, der Gewebeschnitt wird mit einem Markierungsstift (Fettstift, PAP-Pen) umrandet und mit 500 µl 10 % FKS überdeckt. Der Blockiervorgang findet in der feuchten Kammer für 60 min statt.

Nach Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen sind die Objektträger von dem Blockiermedium zu befreien und mit 500 µl der ersten Antikörpersuspension zu versehen. Der erste Antikörper (AK) bindet jeweils spezifisch an das gesuchte Protein. So existieren für Bax, Bcl-2, p53 und Mdm-2 spezifische AK, die an die jeweiligen Proteine im Gewebe binden.

Der erste Antikörper wird bereits während des Blockiervorgangs vorbereitet. Zunächst werden die bei 4 °C aufbewahrten Antikörper gekühlt zentrifugiert (4 min, 13 000 U/min) um Verunreinigungen in der Antikörpersuspension zu vermeiden. Nachfolgend sind die Antikörper mit gekühltem 10 % FKS nach folgendem Schema zu verdünnen:

- Verdünnung von 1:80 für die Antikörper von Bax (je 50 % Bax-AK I-19 und 50 % Bax-AK P-19)
- Verdünnung von 1:80 für den Antikörper von p53
- Verdünnung von 1:60 für den Antikörper von Bcl-2
- Verdünnung von 1:60 für den Antikörper von Mdm-2

Da das Pipettiervolumen pro Schnitt 500 µl betragen sollte, ist demzufolge die Zusammensetzung der Antikörpersuspension der jeweiligen Verdünnung entsprechend zu berechnen.

Die optimalen Verdünnungen sind bereits in Vorversuchen über Verdünnungsreihen etabliert worden. Eine optimale Verdünnung besteht, wenn eine Färbung mit wenig unspezifisch angefärbtem Hintergrund aber klarer Anfärbung der gewünschten Zellen vorzufinden ist. Die in gekühlten TPP-Röhrchen aufbewahrten und gut durchmischten Antikörpersuspensionen der verschiedenen Antikörper werden, nachdem das Blockiermedium von den Objektträgern gut abgeschüttelt worden ist, in einer Menge von 500 µl je Objektträger aufpipettiert. Ausgenommen sind die Negativkontrollen, die mit dem Blockiermedium (10 % FKS) weiterhin inkubiert bleiben.

Die Inkubation mit dem ersten Antikörper findet ebenfalls in einer feuchten Kammer für die Zeitdauer von 60 min statt. Nach Ende der Inkubation mit dem 1. Antikörper folgt ein Waschvorgang mit PBST. Dazu sind die Objektträger aus der feuchten Kammer zu entnehmen und in eine Standküvette mit Objektträgerhalter zu verbringen. Unter mäßigen Rotationen auf einem Schüttler werden die Schnitte für eine Gesamtdauer von 40 min gewaschen. Das PBST wird bei diesem Vorgang mehrmals gewechselt.

Während des Waschvorganges wird bereits die Verdünnung des zweiten Antikörpers (=Fluoreszenzantikörper) vorbereitet, die bei 1:800 (Fluoreszenzantikörper: 10 % gekühltes FKS) liegt. Das zu pipetierende Volumen pro Objektträger beträgt wie schon beim Pipettiervorgang des 1. Antikörpers 500 µl.

Da der zweite Antikörper lichtempfindlich ist, finden die nachfolgenden Arbeitsschritte unter Abdunkelung der Räumlichkeiten statt.

Nach Abschluss des Waschvorganges werden die Schnitte wieder in die feuchte Kammer gelegt und mit der Antikörpersuspension des 2. Antikörpers inkubiert. Jede Lichtexposition der Schnitte ist während dieses Schrittes zu vermeiden. Die nachfolgende Inkubation beträgt 60 min.

Auf die Inkubation mit dem 2. Antikörper folgt wieder ein Waschvorgang mit PBST, Durchführung wie oben beschrieben.

Zur abschließenden Fixierung der Schnitte wird das Probenmaterial mit zwei Tropfen Mounting Medium überdeckt und mit einem Deckgläschen luftblasenfrei eingeschlossen. Das Mounting Medium ist ein Spezialmedium, das den Verlust an Fluoreszenzkraft des zweiten Antikörpers minimiert.

Um ein Austrocknen des Präparates zu verhindern, wird das Deckglas mit einem farblosen Klarlack umrandet.

Die Präparate können bei 4 °C und dunkel gelagert werden, müssen jedoch innerhalb der folgenden 24 h mit dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop beurteilt werden, da sich die Fluoreszenz abhängig von der Zeit abschwächt.

Mikroskopische Beurteilung mit dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop:

Prinzip:

Das konfokale Laser-Scan-Mikroskop eröffnet die Möglichkeit, quantitative Informationen über die Struktur des mikroskopischen Präparates zu erhalten.

Dazu werden computergesteuerte Schnittserien aufgenommen und auf einer optischen Platte gespeichert. Das konfokale Prinzip bietet vor allem in der Fluoreszenzmikroskopie Vorteile, da Streulicht weitgehend eliminiert wird und somit Fluoreszenzbilder von besonderer Qualität und Detailauflösung gewonnen werden können.

Durchführung:

Die Präparate sind innerhalb von 24 h nach Färbung zu betrachten und Bilder von definierten und reproduzierbaren Strukturen im Gehirn mit der zugehörigen Software (LSM 510) zu speichern.

Es werden fluoreszierende Zellen des Hippocampus der CA1- und CA3-Region und des unteren Astes des Gyrus dentatus der rechten wie auch der linken Gehirnhälfte beurteilt und digital aufgenommen.

Zu Beginn der Untersuchung wird der Laser (Argon 488 nm Wellenlänge, max. Power 25.0 mW) aktiviert und bis zu einer konstanten Laserleistung eingebrannt.

Für die Messungen sind ein Fluoreszenzfilter (FITC) und ein spezielles Objektiv (Plan-Neofluar 20x/0,5 Ph2) erforderlich. Die konstante Laserleistung wird zu definierten Messzeitpunkten mit einem Powermeter überprüft. Zusätzlich werden sogenannte Beads (auf Objektträger fixierte Leuchtperlen) verwendet, die dem Abgleichen der jeweiligen Laserleistung mit der Leuchtkraft der Präparate dienen, so dass eine Überstrahlung der Bilder vermieden wird. Die Einstellungen des Mikroskops werden zu Beginn der Studie festgelegt, die einzige variable Größe ist der Kontrast, der je nach Laserleistung und Präparat verändert wird. Nach einer etwa 30-minütigen Vorlaufzeit wird die Laserleistung kalibriert und mit der Messung begonnen.

Die Beurteilung der Schnitte erfolgt über eine Fluoreszenzlampe. Ist die gewünschte Region auf der richtigen Ebene eingestellt, wird auf den Laser umgeschaltet und mit einem sog. single scan ein digitalisiertes Bild aufgenommen und dieses mit einer Spezialsoftware (Software LSM 510, Fa. Zeiss, Jena) gespeichert.

Es werden jeweils zwei Scans der rechten und linken CA1- und CA3-Region, sowie des rechten und linken unteren Ast des Gyrus dentatus angefertigt.

Auf dem folgenden Foto (Abb.4) sind die relevanten Regionen des Hippocampus zu sehen.

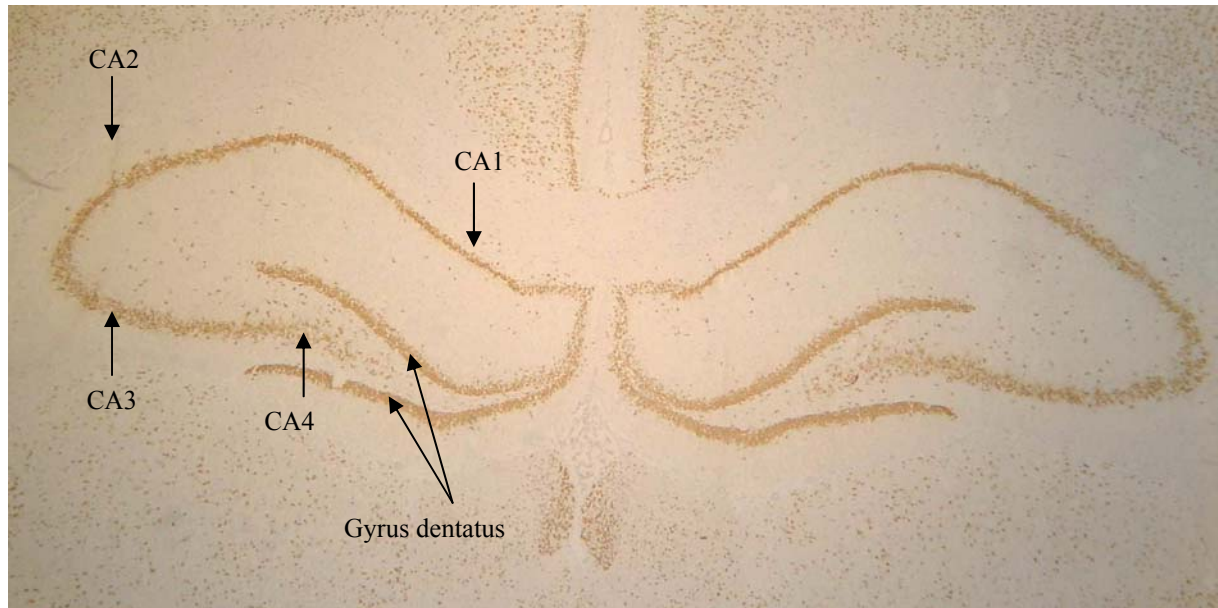


Abb.4: Darstellung des Hippocampus und seiner Regionen CA1, CA2, CA3, CA4 und Gyrus dentatus (NeuN-DAB-Färbung)(Vergr.: 25 fach)

Auswertung der digitalen Bilder:

Die gemessenen Intensitäten der CA1-, CA3-Regionen und die des Gyrus dentatus jedes Tieres werden jeweils für die ischämische und nicht-ischämische Gehirnhälfte summiert. Diese Werte werden den Untersuchungsgruppen (Untersuchungszeitpunkt und Behandlungsmethode) zugeordnet. Gruppenbezogen sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung zu berechnen. Die Werte der Kontrollgruppe und die der mit Sevofluran behandelten Tiere werden mit den Werten einer Nativtiergruppe verglichen. Die Nativtiere (n=8) sind Versuchstiere, die ausschließlich zur Bestimmung der physiologischen Grundexpression der Apoptose-assoziierten Proteine im Gehirn dienen. Diese Tiere gehen unbehandelt und ohne cerebrale Ischämie in die Analytik des Versuches.

Zur Auswertung der Bilder wird die Fluoreszenzintensität der Zellen mit der Spezialsoftware KS RUN (Fa. Zeiss, Jena) erfasst. Dazu werden die Zellen der Hippocampusformation markiert und in eine Maske gelegt.

Die mittlere Intensität der Zellen innerhalb dieser Maske ist relativ zur Fläche zu messen (Intensität pro Fläche). Die Fluoreszenzintensität des Hintergrundes wird von der Intensität der Zellen subtrahiert. Für die CA1-, CA3-Region und für den Gyrus dentatus werden auf zwei unterschiedlichen Schnitten je zwei verschiedene Scans angefertigt. Aus den gemessenen vier Einzelwerten der Fluoreszenzintensität pro Fläche findet anschließend die Berechnung des Mittelwertes statt, der nachfolgend in die statistische Auswertung eingeht.

Western-Blot-Analyse:

Prinzip:

Ein Protein-Gemisch (=Antigen) wird mit Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) in Banden verschiedener Molekulargewichte aufgetrennt. Ein Abklatsch (Blot) auf eine Membran macht die Antigen-Banden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern sichtbar.

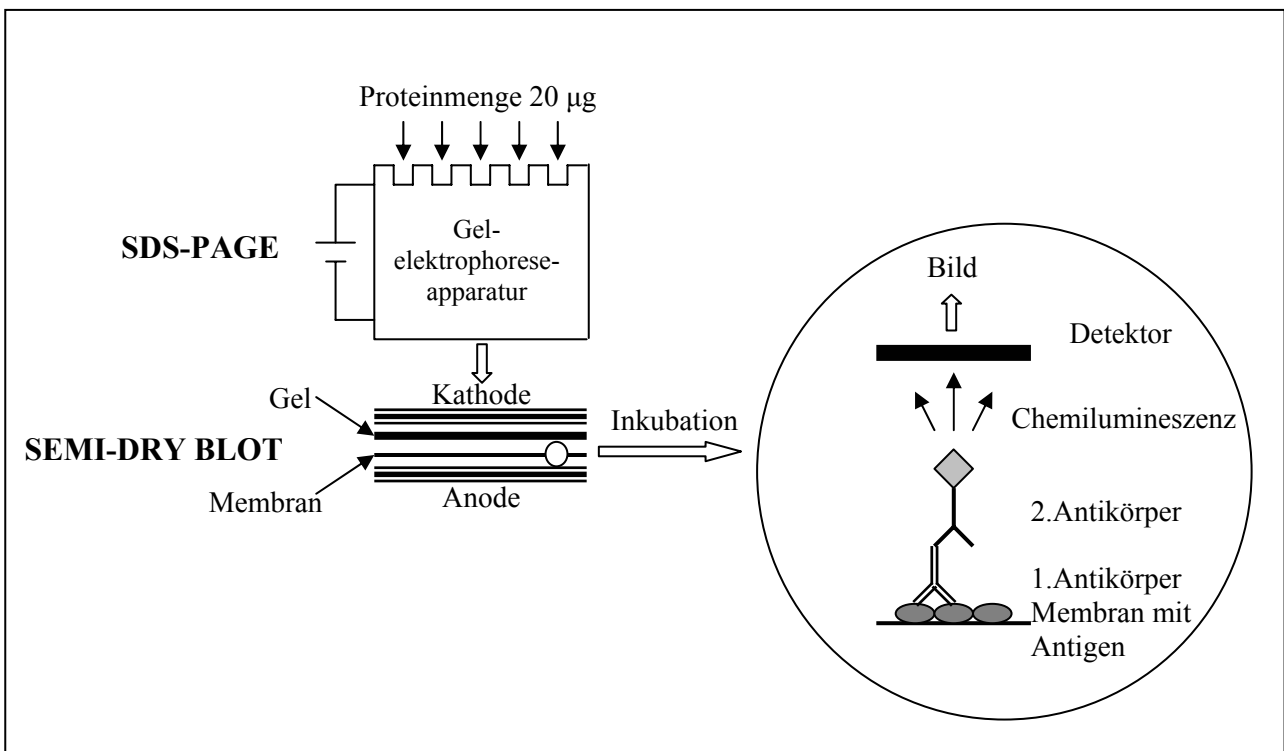


Abb.5: Prinzip der Western-Blot-Analyse

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Durchführung:

Tab. 7: Arbeitsschritte und Dauer der Western-Blot-Analyse

Arbeitsschritt:	Dauer:
Aufbereitung der Proteine ↓	
Separation der Proteine mit SDS-PAGE ↓	3,5 h
Transfer der Proteine auf PVDF-Membran ↓	2 h
Inkubation der Membran mit Blockiermedium ↓	90 min
Inkubation der Membran mit dem 1. Antikörper ↓ waschen	2 h
Inkubation der Membran mit dem 2. Antikörper ↓ waschen	1,5 h
Detektion der spezifischen Proteinbande	

Probenaufbereitung:

Zur Analytik der Apoptosefaktoren mit der Western-Blot-Analyse ist eine vorherige Aufbereitung des Probenmaterials obligat.

Für eine Proteinbestimmung per Western-Blot werden 1 mm dicke Hippocampuschnitte aus der rechten und linken Hemisphäre des Rattenhirns (Lagerung bei -70°C) benötigt. Nach Lysierung des Gewebes und Durchführung eines Proteinangleichs mit einem Photometer schließt sich die Konservierung der Probe an. Die in einem Eppendorfgefäß (1,5 ml) gekühlten Schnitte werden für die Lysierung der Proben mit 300 µl Lysispuffer und 12 Kugeln (Zirkonia beads) vermischt. Die vollständige Lyse des Gewebes erfolgt in einer Kugelmühle bei 4°C für min 12 min und 13 000 Schüttelbewegungen. Anschließend findet die Zentrifugation der Proben bei 4 °C und 13 000 U/min für 10 min statt. Vom Probenüberstand sind 220 µl in 440 µl gekühltes PBS-Dulbecco zu pipettieren.

Standardaufbereitung:

Zur Herstellung des Standards werden 3 Gehirne von Nativtieren in einem Potter mit je 7,5 ml Lysispuffer soweit zerkleinert bis keine Grobstrukturen mehr zu erkennen sind. Anschließend wird die Gehirnsuspension in Eppendorfgefäße (2 ml) abgefüllt und bei 4°C und 13 000 U/min für 12 min zentrifugiert.

Nach Verdünnung des Überstandes mit PBS (1:2) erfolgt die Quantifizierung der gesuchten Proteine Bax, Bcl-2, Mdm-2 und p53 nach BRADFORD (1976). Laut BRADFORD (1976) verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue R-250 von 465 nm zu 595 nm Wellenlänge, wenn dieses an Proteine gebunden ist. Das Ziel ist hier eine Proteinkonzentration von 20 µg auf ein Endvolumen von 30 bis 50 µl. Das rechnerisch ermittelte Pipettiervolumen des Standards für eine Proteinkonzentration von 20 µg bleibt dagegen für den Gesamtversuch konstant. Der fertiggestellte Standard, zur Konservierung mit R-SDS-Probenpuffer vermischt und aufgeköcht, kann bei -70 °C über einen langen Zeitraum gelagert werden.

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben wird zunächst eine Standard-Protein-Verdünnungsreihe mit BSA (bovines Serum-Albumin) als Standardprotein hergestellt. Aus der BSA-Stammlösung (0,1 g BSA + 10 ml PBS) wird nachfolgend eine BSA-Verdünnungsreihe hergestellt. Die BSA-Konzentration beträgt jeweils auf 5 ml Gesamtvolumen 2,0; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05 und 0,02 mg BSA/ml.

Zur photometrischen Bestimmung wird ein handelsübliches Protein Assay der Fa. Bio-rad verwendet, das mit Aqua dest. 1:4 verdünnt wird. Nachdem die hergestellte Verdünnung zu je 1000 µl in Küvetten pipettiert wurde, findet eine Zumischung von 5 µl des Gewebelysats oder 5 µl der BSA-Verdünnungsreihe in die Einzelküvetten statt.

Anschließend erfolgt die Bestimmung des Absorptionsmaximums der BSA-Verdünnungsreihe durch ein Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm, aus dessen Werten eine Standardkurve erstellt werden kann. In Anlehnung an diese schließt sich die photometrische Messung der Proben in Doppelbestimmung an. Bei einer Abweichung der Werte von > 20 % ist die Messwiederholung obligat.

Die Instabilität der Protein/Assay-Verbindung bedingt eine Bestimmung der Standardkurve und Messung der Proben innerhalb einer Stunde nach Vermischung.

Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben lässt sich aus den ermittelten Werten errechnen und auf ein gewünschtes Probenendvolumen von 600 µl angleichen.

Zur Konservierung der Proben wird reduzierender SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:3 hinzugemischt und bei 95°C für 5 min aufgekocht.

Die Proben sind dadurch auch bei 4 °C über mehrere Monate haltbar gemacht.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE):

Die Gel-Elektrophorese dient zur Analyse komplexer Proteinmischungen und ermöglicht den schnellen Nachweis von Proteinen und deren Molekulargewicht.

Diese Methode wird standardmäßig zur Trennung von Proteingemischen und deren Identifizierung eingesetzt.

SDS ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladung der zu bestimmenden Proteine überdeckt und mit diesen Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit bildet. Die Elektrophorese erfolgt in einem von Laemmli (LAEMMLI 1970) eingeführten diskontinuierlichen Puffersystem, bestehend aus der Elektrophoresekammer und dem für die Proteinbestimmung jeweils benötigten Gel.

Als Trägermatrix für das Gel wird Polyacrylamid verwendet. Polyacrylamidgele sind chemisch inert und besonders stabil. Das Gel wird in sogenannte Gekassetten gegossen und besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel, um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen. Im Sammelgel wandern die Proteine schnell und ohne Auftrennung als Bande in einem Gebiet hoher Feldstärke. Mit Erreichen der Grenzfläche zum Trenngel wird ihre Geschwindigkeit mit zunehmender Molekulargröße reduziert.

Die Herstellung des Trenngels und dessen Konzentration sind abhängig von dem nachzuweisenden Protein und dessen Molekulargewicht. Für die Proteine Bax (21 kD) und Bcl-2 (26 kD) werden jeweils Trenngele mit 15 % Polyacrylamid-Anteil (Rotiphorese® Gel 40) hergestellt. Für das Protein p53 (53 kD) ein Gel mit 10 % und für das Protein Mdm-2 (90 kD) ein Gel mit 7 % Polyacrylamid-Anteil im Trenngel. Die Gele werden als 1,5 mm dicke Gelplatten in die Gekassetten gegossen und 24 h bei Kühlschranktemperatur zur Auspolymerisation feucht gelagert.

Das aufbereitete Probenmaterial wird in die sogenannten slots (Geltaschen) eines Sammelgels pipettiert. Es ist eine Proteinmenge von 20 µg vorgesehen, die einer lysierten, zu pipettierenden Probenmenge von 30 bis 50 µl entspricht. In jedem Gel läuft neben den zu bestimmenden Proben auch der zuvor hergestellte Standard, der eine immer gleich bleibende, bekannte Proteinkonzentration enthält, in Dreifachbestimmung und ein Rainbowmarker (RPN 756) mit. Der Rainbowmarker ist ein Gemisch an Proteinen bekannter Molekulargröße, die jeweils an einen Farbstoff gekoppelt sind. Anhand der relativen Laufweite der Proben zu den

Markerbanden lässt sich das gesuchte Protein anhand der Größe identifizieren. Auf die Befüllung der Geltaschen nach definiertem Pipettierschema folgt der Anschluss der Gele für 3,5 Stunden in sog. Vertikal-Gelelektrophoreseapparaturen an eine Gleichstromquelle mit konstanter Spannung von 200 V pro Gel.

Es werden je zwei Gele mit einem SDS-Modul zusammengebaut und der dadurch entstehende Kathodenraum mit SDS-Laufpuffer ausreichend aufgefüllt. Diese, in die Elektrophoresekammer eingehängte, Blot-Apparatur bildet einen geschlossenen Stromkreis von Kathode über die Gele zur Anode.

Die Apparatur ist während des Elektrophoresevorgangs an ein Wasserkühlsystem angeschlossen, um eine Überhitzung der Gele zu vermeiden.

Western-Blot (Semi-dry Blot):

Prinzip:

Um die über SDS-PAGE getrennten Proteine mit Antikörpern nachweisen zu können, müssen die Proteine zunächst aus dem Gel in eine geeignete Matrix überführt werden. Als Träger wird in diesem Versuch eine PVDF-Membran verwendet.

Die Immobilisierung der Proteine auf einer Folie ermöglicht die Anwendung von immunologischen Nachweismethoden, um in dem Probengemisch die spezifischen Proteine (Bax, Bcl-2, Mdm-2 und p53) nachweisen zu können. Für den Transfer der Proteine auf elektrophoretischem Weg in die proteinbindende Membran wird ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt.

Die Proteine lösen sich aus der Gelmatrix und werden auf der Membran gebunden. Beim Semi-Dry Blot werden Gel und Membran sandwichartig von Whatman®-3MM-Filterpapieren eingerahmt, die bei der Elektrophorese als Ionenreservoir dienen und zwischen die Elektroden gelegt werden. Die Filterpapiere sind zuvor in verschiedenen Pufferlösungen getränkt worden. Anodenseitig werden 4 Filterpapiere, getränkt in Anodenpuffer I, und zwei Filterpapiere, getränkt in Anodenpuffer II, angebracht.

Die Kathode ist mit 6 Filterpapieren, die in Kathodenpuffer getränkt sind, bedeckt. Die Membran wird zuvor mit Ethanol benetzt, um die Bindung der Proteine an die Membran zu erhöhen. Die in Pufferlösung getränkten Filterpapiere und die Membran sind vorab in die erforderliche Gelgröße zurechtzuschneiden, um einen konstanten Stromfluss zu gewährleisten.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Der Elektrotransfer der Proteine findet im zuvor beschriebenen diskontinuierlichen Puffersystem mit einem Stromfluss von 1 mA/cm² Geloberfläche mit einer Spannung von 16 bis 18 V und für eine Dauer von 2 Stunden statt. Anschließend wird die Membran auf einem Schüttler für 30 min in PBST gewaschen.

Um den vollständigen Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran zu überprüfen, wird das Gel mit Coomassie gefärbt und anschließend mit Destain entfärbt. Da der Farbstoff Coomassie Proteine unspezifisch anfärbt, lassen sich demnach Aussagen über die Totalität des vorausgegangenen Proteintransfers machen. Bleibt das Gel nach Anfärbung leer, kann von einer vollständigen Proteinbindung an die Membran ausgegangen werden.

Immundetektion der transferierten Proteine auf der PVDF-Membran:

Blockierung:

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Proteine wird die Membran in einem Blockiermedium, je nach Antikörper in Fetalem Kälberserum (FKS) oder Milchlösung, für 90 min bei Zimmertemperatur auf einem Schüttler in Inkubationsschalen (aus Glas oder Kunststoff, Innenmaße nur geringfügig größer als die Maße der Blotting Membran) inkubiert. Für die Membranabsättigung sind prinzipiell alle amphipatischen Substanzen geeignet, die nicht mit der Nachweisreaktion interferieren.

Als Blockiermedium wird für die Proteine Bax und p53 10 % ige FKS (8 ml FKS + 72 ml PBST) und für Bcl-2 und Mdm-2 eine 10 % ige Milchlösung (8 g Magermilchpulver in 80 ml PBST) verwendet.

Inkubation mit dem 1. Antikörper:

Es folgt die Nachweisreaktion, der sogenannte Antikörper-Overlay, mit dem 1. Antikörper. Dazu werden die einzelnen Antikörpergefäße vorab bei 4 °C für 4 min zentrifugiert (13 000 U/min), damit sich Verunreinigungen absetzen können. Anschließend sind die einzelnen Antikörpersuspensionen im Mischungsverhältnis 1:200 herzustellen:

- 50 µl Bax-Antikörper (P-19, polyklonal, rabbit) in 10 ml 10 % FKS
- 50 µl p53-Antikörper (DO-1, monoklonal, mouse) in 10 ml 10 % FKS
- 50 µl Bcl-2-Antikörper (C-2, monoklonal, mouse) in 10 ml 10 % Milchlösung
- 50 µl Mdm-2-Antikörper (C-2, polyklonal, rabbit) in 10 ml 10 % Milchlösung

Jede Membran inkubiert für 2 h bei Raumtemperatur auf einem rotierenden Schüttler. Die Membranen werden dazu einzeln mit dem zugehörigen Volumen an Antikörpersuspension in eine Folientasche verschweißt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit folgt ein Waschvorgang von 45 min mit mehrfach zu wechselndem PBST in einer Schale auf dem Schüttler.

Inkubation mit dem 2. Antikörper:

Zur Visualisierung des Signals ist die Bindung eines Zweitantikörpers an den Erstantikörper erforderlich. Der Zweitantikörper stammt aus einer anderen Tierart als der Erstantikörper und ist gegen konstante Bereiche des Erstantikörpers gerichtet. Das Ursprungssignal wird verstärkt, da mehrere Zweitantikörpermoleküle an ein Erstantikörpermolekül binden können (Amplifikationseffekt).

Der 2. Antikörper ist an das Enzym Peroxidase gebunden, welches die Umsetzung des Substratgemisches unter Lichtemission katalysiert.

Die Antikörpersuspensionen des 2. Antikörpers werden wie folgt angemischt:

- Bax: 5 µl Kaninchen-Antikörper (Anti-rabbit Ig) in 10 ml 10 % FKS
- Mdm-2: 5 µl Kaninchen-Antikörper (Anti-rabbit Ig) in 10 ml 10 % Milchlösung
- p53: 5 µl Maus-Antikörper (Anti-mouse Ig) in 10 ml 10 % FKS
- Bcl-2: 5 µl Maus-Antikörper (Anti-mouse Ig) in 10 ml 10 % Milchlösung

Die Inkubation erfolgt wiederum eingeschweißt in einer Plastikfolie für 90 min bei Raumtemperatur auf einem rotierenden Schüttler.

Abschließend findet ein Waschvorgang für 45 min in PBST (mehrfach gewechselt) statt.

Visualisierung der Proben:

Über ein Visualisierungsreagenz (Western LightningTM Chemiluminescence Plus, Perkin Elmer Life Sciences Inc., Boston, USA) können die Proben sichtbar gemacht werden.

Die inkubierten Membranen werden einzeln mit 10 ml der Entwicklersubstanz benetzt und ohne Verzögerung nach einminütiger Inkubation von einer Kamera digital fotografiert. Durch die Chemilumineszenz ist digital eine Schwärzung der Banden auf der Membran zu messen, die über den Schwärzungsgrad semi-quantitativ Rückschlüsse auf die Konzentration der Apoptose-assoziierten Proteine zulässt.

Dazu verwendet man die Kodak Digital Science™ Image Station 440 CF (IS 440_{CF}). Diese ist ein Mehrzweck-Aufnahmesystem zur quantitativen Abbildung chemilumineszierender Gele und Blots. Das System verfügt über die gleiche Empfindlichkeit wie Autoradiographie-Systeme und erkennt Signale im Pico- bis Femtomolbereich.

Die Apparatur besteht aus einer thermoelektrisch gekühlten CCD-Kamera (Charge-Coupled Device = ladungsgekoppelt), die mit einer COPI™-Kammer (Belichtung mit geschlossenem Strahlengang) verbunden ist. Die entwickelte Membran wird mit der Proteinseite nach unten luftblasenfrei auf ein gereinigtes Vorlagenglas gelegt. Mit dem Softwaremodul der Kamera kann über eine Preview-Funktion der passende Bildausschnitt auf einem Monitor gewählt und die gewünschte Belichtungszeit eingestellt werden. Um möglichst intensive Signale zu erhalten wird der Blendenwert 1.2 (Größte Blendenöffnung) gewählt. Die Banden des Rainbowmarkers werden mit kleinen fluoreszierenden Klebestreifen (Tracker Tape) markiert, um dem digitalen Bild die Banden je nach ihrem Molekulargewicht richtig zuzuordnen zu können. Die Aufnahmen können anschließend in die Software 1D Image Analysis übertragen werden.

Auswertung:

Die Auswertung der digital aufgenommenen Bilder erfolgt über die Software 1D Image Analysis.

Die durch den Rainbowmarker ermittelten relevanten Banden der Proben und der Standards werden einzeln mit einer Linie umrandet. Zur Fehlerminimierung wird die Einzelauswertung in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die mittlere Schwärzungsintensität ist mit dem Flächenwert der Bande zu multiplizieren. Durch den gemessenen Wert der Schwärzung kann der absolute Wert der Chemilumineszenz der Einzelbanden errechnet werden.

Die Werte der Proben und des Standards sind von der Chemilumineszenz-Intensität des Membranhintergrundes zu subtrahieren. Das Volumen und die Proteinmenge des Standards sind festgelegt und bei jeder Western-Blot-Analyse konstant. Durch die Ermittlung der prozentualen Abweichung der Proben zum Standard sind die Einzelanalysen des Western Blots miteinander vergleichbar. Die errechneten Mittelwerte dieser Messungen gehen in die Statistik ein.

3.2.4.3 Statistische Befundbewertung

Die statistische Bewertung basiert auf generalisierten Modellen, die gemäß den Hypothesen hierarchisch angewendet werden. Dadurch kann das Problem der multiplen Vergleiche der Messwerte berücksichtigt werden. Das Signifikanzniveau (p) wird auf 0,05 festgelegt.

Die Hypothesen für die statistische Testung sind innerhalb einer Behandlungsgruppe folgende:

- Unterschiede zwischen den Untersuchungstagen (1, 3, 7 und 28 Tage)
- Unterschiede zwischen der rechten und linken Hemisphäre zum Zeitpunkt der Ischämie zwischen den Untersuchungstagen (1, 3, 7 und 28 Tage)
- Vergleich der physiologischen Parameter zum Messzeitpunkt des Ausgangswertes (Baseline), der Ischämie, der Reperfusion und der Erholungsphase (Recovery)

Zusätzlich werden die Werte auf statistische Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen getestet.

Die intra-operativen Messparameter, die Ergebnisse aus der Immunfluoreszenz-Färbung und der Western-Blot-Analyse werden dazu ausgewertet. Aus den Einzelergebnissen der Tiergruppen wird das arithmetische Mittel (MW) mit der dazugehörigen Standardabweichung (\pm SD) errechnet.

Die statistische Analyse erfolgt mittels Zweiwege-ANOVA, als post-hoc-Test werden T-Tests verwendet.

Die statistische Berechnung erfolgt mit dem Statistikprogramm StatView® vom SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

3.2.4.4 Geräte und Material

3.2.4.4.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Aprotinin/PMSF - Kombitablette, Complete[®] Mini, EDTA-free, Boehringer, Mannheim
Beads In Speck[®] Green I-7219 Microscope Image Intensity Calibration Kit, Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, München
Bromphenolblau, Fa. Serva, Heidelberg
BSA, bovines Serumalbumin, Fractio V, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Capronsäure (ϵ -Amino-n-Caproic Acid), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Coomassie[®] Brilliant Blue R 250, Fluka, Neu-Ulm
DDT (Dithiothreitol), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Einmalküvetten PS, Plastibrand[®], Fa. Brand, Wertheim
Eisessig 100 %, Merck, Darmstadt
Eppendorf-Reaktionsgefäße, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Ethanol 100 % pro analysi, Merck, Darmstadt
Fettstift, PAP-Pen, Daido Sangyo Co., Fa. Peske, Aindling
FKS, fetales Kälberserum, Fa. Biochrom AG, Berlin
Immobilon-P (PVDF-) Transfer Membran, Millipore, Bedford, MA, USA
Milchpuver (0,1 % Fett), Naturaflo[®], Fa. Töpfer, Dietmannsried
Mounting-Medium, Vectashield[®] H-1000, Vectorlabs, Burlingame, USA
Natriumhydrogencarbonat-Lösung 8,4 %, Delta-Pharma, Pfullingen
Objektträger SuperFrost[®] Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig
PBS-Dulbecco w/o Ca²⁺, Mg²⁺, Fa. Biochrom AG, Berlin
Plastikschalen
Plastiktüten, Plastibrand Entsorgungsbeutel, Fa. Brand, Wertheim
Rainbow[®] RPN 756 protein molecular weight marker, Amersham Life Science Inc, Piscataway, USA
Rotiphorese[®] Gel 40 Acrylamid / Bisacrylamid, Fa. Roth, Karlsruhe
SDS (Na-Dodecylsulfat), Bio-Rad Laboratories, München
TEMED (N,N,N',N') Tetramethyldiamid, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tissue Freezing Medium[®], Fa. Jung, Leica Instruments, Nussloch
TPP-Röhrchen, 15 ml: 91015, 50 ml:91050, Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz
Tween[®] 20 (Polyoxyethylensorbitolmonolaurat), Fa. Fluka Chemica, Buchs, Schweiz

Western Lightning™ Chemiluminescence Plus, Perkin Elmer Life Sciences Inc., Boston, USA

Whatman® Chromatographiepapier, Meldstone, England

3.2.4.4.2 Immunfluoreszenz

Geräte:

Elektrische Labortischwaage Kern 440-33, Kern&Sohn, Albstadt

Feuchte Kammer, Eigenbau

Konfokales Laser-Scan-Mikroskop (CLSM) Axiovert 100M mit Software LSM 510, Version 2.5 Expert Mode, Zeiss in cooperation with Microsoft, Fa. Carl Zeiss, Jena

Kryotom HM 500 O, Fa. Micron, Walldorf

Kühlzentrifuge, Biofuge fresco, Heraeus, Hanau

Powermeter, Liconix Model 35 PM Power Meter, Mountain View, CA, USA

Schüttler, Rocky 3D, Fröbel, Lindau

Spektrometer, DU® 640, Fa. Beckman-Coulter, Oberschleißheim

Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf, Hamburg

Vortexer, MS2, Minishaker, IKA® Works, Wilmington, USA

Wasservollentsalzer, Seradest SD, USF Wallace&Tiernan, Ransbach

Antikörper:

1. Antikörper: von Fa. Santa Cruz Biotechnology, USA

Bax (I-19) cat # sc-930, rabbit polyclonal IgG, 200 µl/ml

Bax (P-19) cat# sc-526, rabbit polyclonal IgG, 200 µl/ml

Bcl-2 (ΔC21) cat # sc-783, rabbit polyclonal IgG, 200 µl/ml

p53 (FL-393) cat # sc-6243, rabbit polyclonal IgG, 200 µl/ml

Mdm-2 (C-18) cat # sc-812, rabbit polyclonal IgG, 200 µl/ml

2. Antikörper:

Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugate, highly cross absorbed, 2 mg/ml, Molecular Probes, Leiden, Niederlande

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Lösungen:

PBS (20x) 320 g NaCl
 57,6 g NaHPO₄
 9,6 g KH₂PO₄
 8 g KCL
 auf pH 7,4 eingestellt

PBST (1x) 500 ml PBS (20x)
 1000 µl Tween[®] 20
 ad 2000 ml ddH₂O

3.2.4.4.3 Western-Blot

Geräte:

Elektrophorese Power-supply, EPS-301, Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, USA

Elektrophoresekammer, Pharmacia Biotech, San Francisco, USA

Folienschweißgerät, HM3000CD, Polythene Heat Sealer, Jencons Scientific Limited, Bedfordshire, GB

Kugelmühle, Art.-Nr. 20.738.0001, Fa. Retsch GmbH & Co KG, Haan, Deutschland

Kühlzentrifuge, Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau

Schüttelinkubator, Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf, Hamburg

Tracker Tape, Fa. Amersham Pharmacia RPN 2050 OL/AA, Freiburg, Deutschland

Transfergeräte, Fa. Roth, Karlsruhe

Vortexer, MS2, Minishaker, IKA®Works, Wilmington, USA

Wippschüttler, Rocky 3D, Fröbel Labortechnik, Lindau

Zirkonia beads, Durchmesser 2,5 mm, Bio Spec Products Inc., Fa. Roth, Heidelberg

Antikörper:

1. Antikörper: von Fa. Santa Cruz Biotechnology, USA

Bax (P-19) cat # sc-526, rabbit polyclonal IgG, 200 µl/ml

Bcl-2 (C-2) cat # sc-7382, mouse monoclonal IgG, 200 µl/ml

P53 (DO-1) cat # sc-126, mouse monoclonal IgG, 200 µl/ml

Mdm-2 (C-18) cat # sc-812, rabbit polyclonal IgG, 200 µl/ml

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2. Antikörper: von Fa. Amersham Life Science, Piscataway, USA

Anti-mouse Ig, horseradish peroxidase, linked whole antibody (from sheep), 1 ml, NA 931
für den Nachweis von p53 und Bcl-2

Anti-rabbit Ig, horseradish peroxidase, linked whole antibody (from donkey) 1 ml, Na 934
für den Nachweis von Bax und Mdm-2

Lösungen:

Anodenpuffer I	300 mM Tris 100 % Ethanol pro analysi vor Gebrauch entgast
Anodenpuffer II	40 mM Tris 100 % Ethanol pro analysi vor Gebrauch entgast
Kathodenpuffer	40 mM Capronsäure 100 % Ethanol pro analysi vor Gebrauch entgast
Coomassie-Färbelösung	0,8 g Coomassie Brilliant Blue R250 200 ml Ethanol 100 % pro analysi 40 ml Eisessig ad 500 ml mit ddH ₂ O
Destain	25 % Methanol 10 % Eisessig 65 % ddH ₂ O
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	30,28 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS 0,1 g NaN ₃ ad 1000 ml ddH ₂ O

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Lysispuffer	0,5 % Triton X-100 20 mM Tris-HCL pH 8,0/ 7,4 137 mM NaCl 2 mM EDTA für 10 ml eine Aprotinin und PMSF-Kombitablette
PBS (20x)	(siehe Lösungen Immunfluoreszenz)
PBST (1x)	(siehe Lösungen Immunfluoreszenz)
Reduzierender SDS-Probenpuffer	0,2 M Tris-HCl pH 6,8 6 % SDS 20 % Glycerol 10 % DTT 0,1 mg/ml Bromphenolblau gekühlt gelagert
Sammelgel 5 % (für 4 Gele)	10 ml Rotiphorese [®] Gel 40 20 ml Sammelgelpuffer 50 ml ddH ₂ O 640 µl Ammoniumpersulfat (10 %) 60 µl TEMED
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4 % SDS 0,1 % NaN ₃
Trenngel 7 % (Für Mdm-2-Nachweis)	7 ml Rotiphorese [®] Gel 40 10 ml Trenngelpuffer 23 ml ddH ₂ O 240 µl Ammoniumpersulfat (10 %) 30 µl TEMED

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Trenngel 10 % (Für p53-Nachweis)	10 ml Rotiphorese® Gel 40 10 ml Trenngelpuffer 20 ml ddH ₂ O 240 µl Ammoniumpersulfat (10 %) 30 µl TEMED
Trenngel 15 % (Für Bax- und Bcl-2-Nachweis)	15 ml Rotiphorese® Gel 40 10 ml Trenngelpuffer 15 ml ddH ₂ O 240 µl Ammoniumpersulfat (10 %) 30 µl TEMED
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCL pH 8,8 0,4 % SDS 0,01 % NaN ₃

3.3 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie werden die Ergebnisse der Sevoflurangruppe mit denen der Kontrollgruppe verglichen. Die Resultate beider Versuchsgruppen sind den Messwerten der Nativtiere gegenübergestellt, deren Werte als physiologische Referenzwerte angenommen werden.

Die statistische Auswertung der intraoperativen Messwerte und der Nachweis der Apoptose-assoziierten Proteine durch die Immunfluoreszenz- und Western-Blot-Analyse sollen Hinweise auf die potenzielle, neuroprotektive Wirkung des Sevofluran liefern.

Die intraoperativen Messparameter des operativen Versuchsanteils werden innerhalb einer Gruppe gemittelt und deren Standardabweichung berechnet.

Aus den für die einzelnen Tiere ermittelten Werten wird im analytischen Teil pro Gruppe und Untersuchungszeitpunkt der jeweilige arithmetische Mittelwert gebildet und dessen Standardabweichung errechnet.

Für die Signifikanz wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen.

3.3.1 Operativer Teil

Die Ergebnisse der operativen Phase werden nachfolgend aufgezeichnet.

Die physiologischen Variablen der Sevoflurangruppe werden mit denen der Kontrollgruppe verglichen. Außerdem findet eine intraoperative Untersuchung auf Signifikanzen innerhalb einer Untersuchungsgruppe statt.

3.3.1.1 Physiologische Messparameter

Für die Blutglucose und den hämodynamischen Parameter MAP sind zu den definierten Messzeitpunkten die Mittelwerte und deren Standardabweichungen berechnet worden.

MAP:

Zwischen den Versuchsgruppen Kontrolle und Sevofluran bestehen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des mittleren arteriellen Blutdrucks. In der Ischämiephase kommt es in allen Versuchsgruppen protokollgemäß zu einem artifiziell erzeugten *signifikanten* Blutdruckabfall auf 40 mmHg.

Blutglucose:

Die Blutglucosewerte der Sevoflurangruppe sind im Vergleich zur Kontrollgruppe *signifikant* höher.

Die Ergebnisse der Blutglucose unterscheiden sich innerhalb der Kontrollgruppe zu den verschiedenen Messzeitpunkten nur geringfügig. Innerhalb der Sevoflurangruppe gibt es während des Operationsverlaufs *signifikante* Schwankungen (siehe Tab 8).

Um konstante Rahmenbedingungen während der Ischämie zu schaffen und eventuelle Schwankungen unmittelbar ausgleichen zu können, ist die regelmäßige Kontrolle der Blutgase notwendig.

Zu definierten Messzeitpunkten wird der arterielle Sauerstoffpartialdruck (paO_2), der Kohlendioxidpartialdruck (paCO_2), das Gesamthämoglobin (Hb) und der pH-Wert dokumentiert.

paO₂:

Der Mittelwert des Sauerstoffpartialdrucks (paO_2) im arteriellen Blut unterscheidet sich in der Sevoflurangruppe gegenüber der Kontrollgruppe zu keinem Messzeitpunkt signifikant.

Auch innerhalb einer Untersuchungsgruppe ist im Operationsverlauf keine signifikante Veränderung zu erkennen.

paCO₂:

Bei den Messwerten des Kohlendioxidpartialdrucks (paCO_2) kann während der Operation kein signifikanter Unterschied innerhalb der Untersuchungsgruppen erkannt werden. Eine signifikante Veränderung in einer Untersuchungsgruppe im zeitlichen Verlauf ist ebenfalls nicht messbar.

Hb:

Während der Ischämie ist in allen Untersuchungsgruppen ein erwartungsgemäßer *signifikanter* Abfall des Gesamthämoglobins zu messen. Zu den übrigen Messzeitpunkten kann weder innerhalb einer Versuchsgruppe, noch im direkten Gruppenvergleich ein signifikanter Unterschied gemessen werden.

pH:

Der Mittelwert des pH wird zu den festgelegten Messzeitpunkten bestimmt und weist sowohl zu diesen Zeitpunkten, als auch im Gruppenvergleich keine signifikanten Veränderungen auf.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab.8: Physiologische Parameter

	Gruppe	Zeit				Signifikanzen	
		Baseline	45 min Ischämie (Isch)	15 min Reperfusion (Rep)	45 min Recovery (Rec)	Zeit ² x Gruppe	Baseline vs. Ischämie
MAP (mmHg)	Kontrolle	126±11	40±1 (k.)	125±10	113±13	p < 0,05	p < 0,05
	Sevofluran	82±12	40±1 (k.)	117±12	89±14	p < 0,05	p < 0,05
paO₂ (mmHg)	Kontrolle	145±22	154±23	142±27	117±34	n.s.	n.a.
	Sevofluran	157±26	162±26	154±27	137±32	n.s.	n.a.
paCO₂ (mmHg)	Kontrolle	37,7±3,7	37,6±5,8	40,3±4,7	41,3±4,7	n.s.	n.a.
	Sevofluran	36,8±4,0	35,8±4,9	38,6±4,1	39,7±4,7	n.s.	n.a.
Hb (mg/dl)	Kontrolle	12,9±1,1	9,0±1,0 (k.)	12,4±1,0	12,1±1,3	p < 0,05	p < 0,05
	Sevofluran	12,0±0,8	8,3±1,0 (k.)	11,2±0,7	11,0±1,0	p < 0,05	p < 0,05
Glucose (mg/dl)	Kontrolle	65±10	55±11	66±12	80±18	p < 0,05	n.s.
	Sevofluran	74±16	91±32	86±16	86±15	p < 0,05	p < 0,05

Messung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (\pm SD) des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP), PaO₂, PaCO₂, Gesamthämoglobins und der Blutglucose zu den Messzeitpunkten Baseline (=Ausgangswert), Ischämie, Reperfusion und Recovery (=Erholungsphase);

Signifikanzen: p < 0,05 im Gruppenvergleich und Baseline vs. Ischämie;
n.s. = nicht signifikant; n.a. = nicht anwendbar; k. = konstruierter Wert

3.3.1.2 Gehirndurchblutung

Mit einem Laser-Doppler findet eine kontinuierliche Messung der Gehirndurchblutung beider Hemisphären statt.

Der cerebrale Blutfluss der Kontroll- und Sevoflurangruppe wird mit einem Ausgangswert verglichen.

Als Ausgangswert wird die Gehirndurchblutung mit 100% angenommen. Die jeweils zu definierten Messzeitpunkten erfassten Werte sind als relative Werte in Prozent in Bezug zum Ausgangswert berechnet. Ziel ist es die prozentuale Zu- oder Abnahme der Gehirndurchblutung zu erfassen.

Tab.9: Ergebnisse der Laser-Doppler-Flussmessung

Tiergruppe	Messzeitpunkt	Hemisphärendurchblutung links		Hemisphärendurchblutung rechts	
		LDF li	in Prozent	LDF re	in Prozent
Kontrollgruppe	Ausgangswert	455±131	100	416±147	100
	45 Isch	331±120*	73±17	221±131*	50±20
	15 Rep	431±148	97±24	388±123	102±63
	45 Rec	485±173	109±36	397±184	100±56
Sevoflurangruppe	Ausgangswert	420±149	100	418±146	100
	45 Isch	331±110*	81±15	291±137*	69±19
	15 Rep	417±138	112±68	425±164	100±25
	45 Rec	442±164	102±27	457±72	113±47

Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (±SD) der Laser-Doppler-Flussmessung in Perfusionseinheiten und in Prozent mit einem Ausgangswert von 100 % zu den festgelegten Messzeitpunkten für beide Gruppen.

Signifikanzen: ohne Sonderzeichen = nicht signifikant, () = $p < 0,05$ Messwerte in einer Gruppe verglichen zum Ausgangswert*

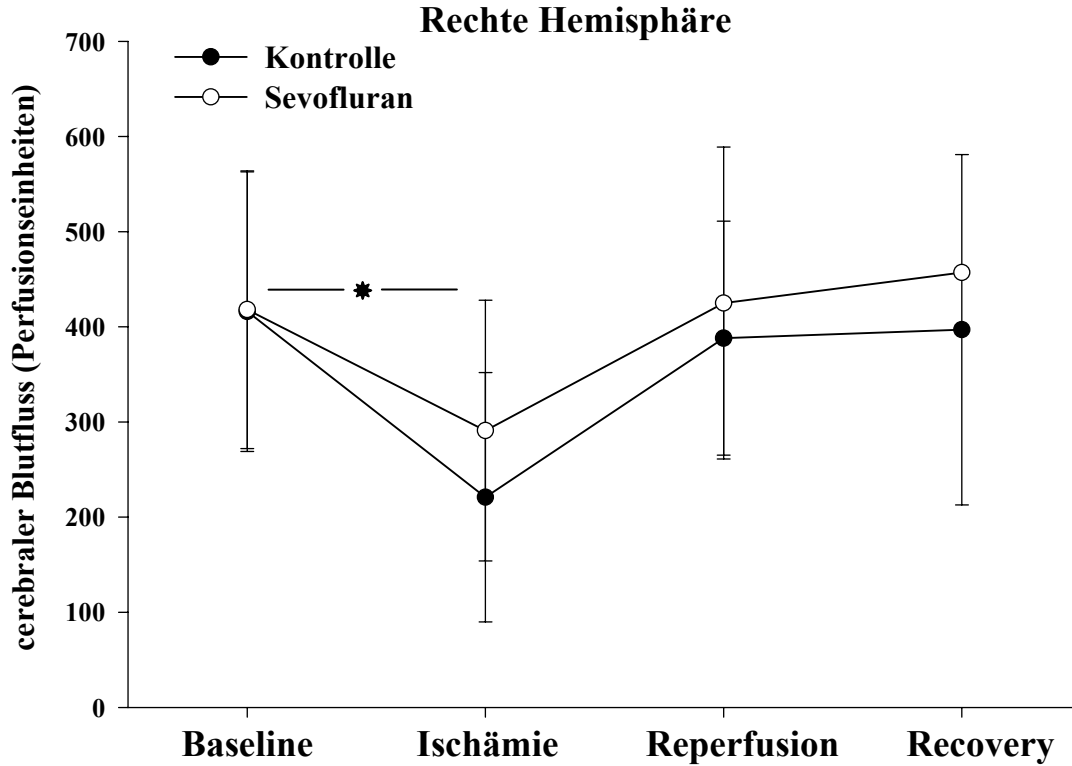


Abb. 6

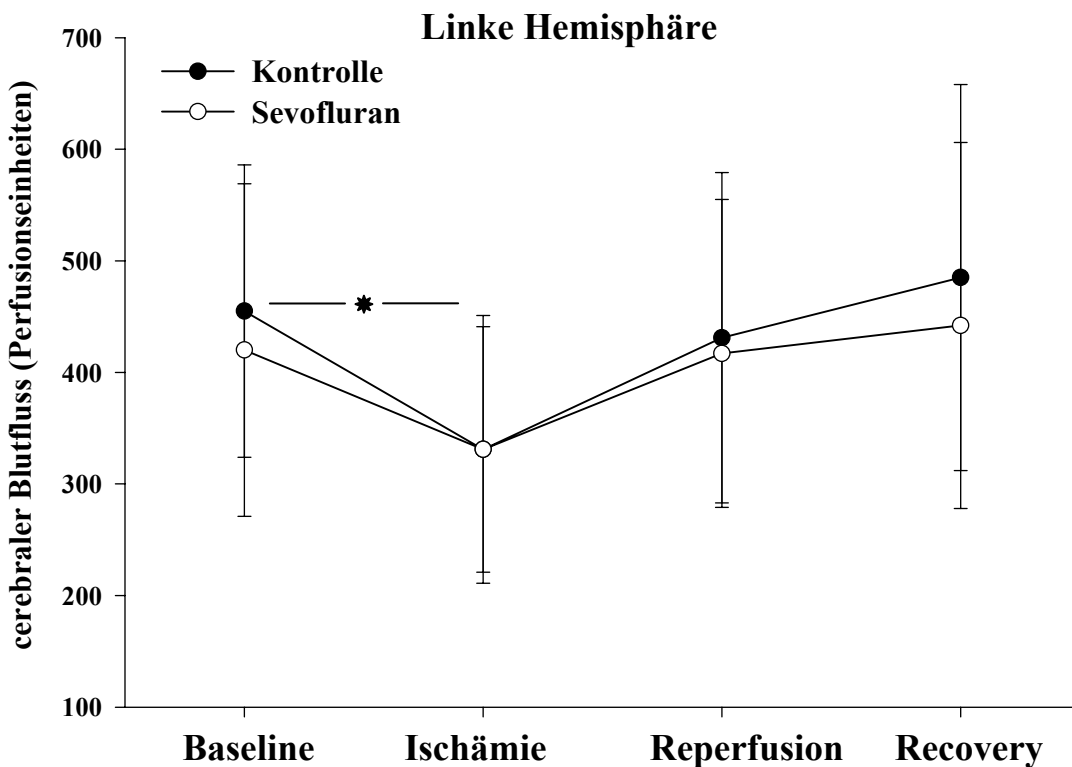


Abb. 7

Abb. 6. u. 7: Graphische Darstellung der Mittelwerte (MW) mit deren Standardabweichungen (\pm SD) der Laser-Doppler-Flussmessung in der rechten (Abb.6) und linken (Abb.7) Gehirnhälfte zu den definierten Messzeitpunkten für beide Gruppen. Signifikanzen: (*) = $p < 0,05$ zwischen dem Ausgangswert (=Baseline) und dem Zeitpunkt der Ischämie

Die cerebrale Perfusion nimmt protokollgemäß in der rechten, ischämischen Hemisphäre zu dem Messzeitpunkt während der ischämischen Phase (siehe Tab.9) in beiden Versuchsgruppen *signifikant* ab und steigt in der Reperfusion und Recovery wieder auf einen physiologischen Bereich an. Es sind zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu erkennen.

Die Mittelwerte der linken Hemisphäre sinken während der Ischämie auf bis zu 70 %, die der rechten auf bis zu 50 % des Ausgangwertes.

Die Gehirndurchblutung der rechten Hemisphäre ist deutlich niedriger als die der linken, da intraischämisch zusätzlich zur Hypotension die rechte A. carotis communis mit einem Clip temporär verschlossen wird.

3.3.1.3 Periphere und pericranielle Körpertemperatur

Um einen möglichen Einfluss des Sevofluran auf die Körpertemperaturregelung dokumentieren zu können, ist eine Kontrolle der peripheren und pericraniellen Körpertemperatur notwendig. Deswegen wird zu definierten Messzeitpunkten sowohl die rektale als auch die pericranielle Körpertemperatur überwacht und mit einer rückgekoppelten Wärmelampe reguliert. Die Temperaturwerte sind zu jedem Messzeitpunkt im physiologischen Bereich und weisen keine signifikanten Veränderungen auf.

3.3.2 Analytischer Teil

Immunfluoreszenzanalyse

Die Apoptose-assoziierten Proteine Bax, Bcl-2, p53 und Mdm-2 der Hippocampusregionen sind mit der Immunfluoreszenzfärbung markiert, durch ein Laser-Scan-Mikroskop erfasst und mit der Spezialsoftware KS 400 ausgewertet.

Die gemessenen Intensitäten der CA1-, CA3-Regionen und die des Gyrus dentatus jeden Tieres sind jeweils für die ischämische und nicht-ischämische Gehirnhälfte summiert und gruppenspezifisch zugeordnet (Untersuchungszeitpunkt und Behandlungsmethode) worden. Die Werte der Kontrollgruppe und die der mit Sevofluran behandelten Tiere werden mit den Werten einer Nativtiergruppe verglichen und in nachfolgenden Tabellen aufgezeigt.

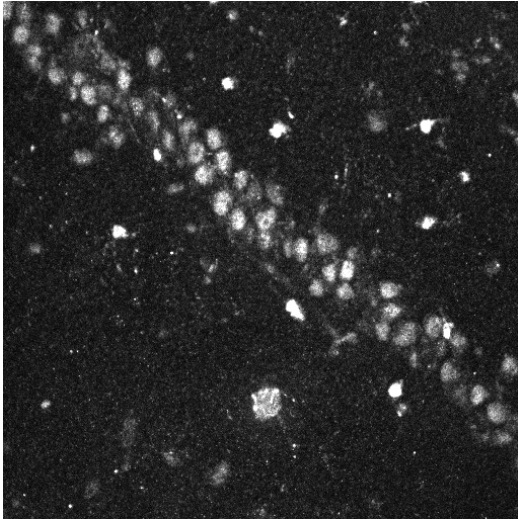


Abb.8: Kontrollgruppe

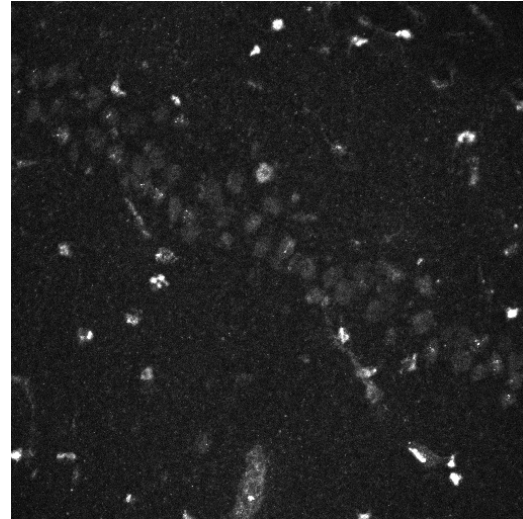


Abb.9: Sevoflurangruppe

Abb.8 und Abb.9: Bax-Expression der Untersuchungsgruppen in den Neuronen der CA1-Region des rechten Hippocampus. Die stärkere Fluoreszenzintensität der Kontrollgruppe (Abb.8) im Vergleich zur Sevoflurangruppe (Abb.9) spricht für eine stärkere Proteinexpression (Signifikanzen siehe 3.3.2.1)

Western-Blot-Analyse

Zur indirekten Visualisierung der Proteine Bax, Bcl-2, Mdm-2 und p53 trägt der Zweit-Antikörper eine Enzymmarkierung, die nach Inkubation mit der Entwicklersubstanz eine Chemilumineszenz entstehen lässt.

Diese Lichtemission wird durch eine CCD-Kamera gemessen. Dabei werden die Werte der Proben mit denen des Standards (entspricht 100 %) prozentual verglichen.

Die Ergebnisse der einzelnen Proteine, als Mittelwerte und deren Standardabweichung, werden in den Tabellen aufgezeigt.

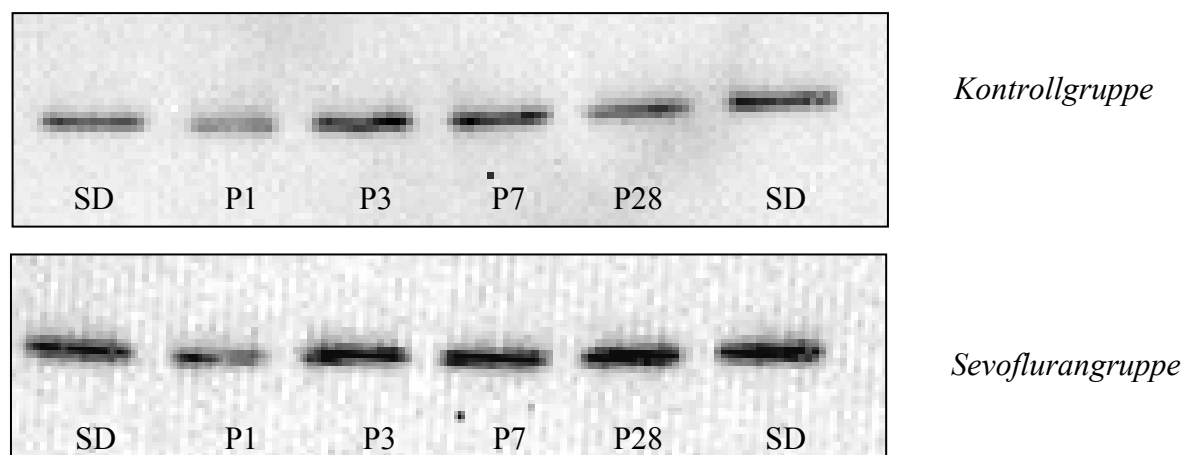


Abb.10: Western-Blot-Analyse; Die Abbildung zeigt beispielhaft zwei Ausschnitte eines entwickelten Western Blots. Die Banden präsentieren die Schwärzungsintensität des durch Chemilumineszenz markierten Bcl-2-Proteins im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen. Die erste und letzte Bande entspricht einem Standard (SD) mit konstanter Proteinkonzentration, die mit P markierten Banden zeigen die Proteinexpression der Proben zu den Untersuchungszeitpunkten (P1= 1. Tag, P3=3. Tag usw.)

3.3.2.1 Analyse des pro-apoptotischen Bax-Proteins

Nachweis des Bax-Proteins durch Immunfluoreszenz

Tab.10: Immunfluoreszenz-Intensität des Bax-Proteins zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Tiergruppe	Ischämische Hemisphäre (rechts)				Nicht-Ischämische Hemisphäre (links)			
	Untersuchungszeitpunkt post op:				Untersuchungszeitpunkt post op:			
	1.Tag	3.Tag	7.Tag	28.Tag	1.Tag	3.Tag	7.Tag	28.Tag
Kontrollgruppe	80±18	76±14	72±41	71±33	89±20	82±21	66±33	74±37
Sevoflurangruppe	28±19*	30±18*	46±21*	44±4*	30±22*	30±18*	44±22*	40±29*
Nativtiere	25±8	Keine Ischämie			24±9	Keine Ischämie		

Summe der Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (±SD) der Immunfluoreszenz-Intensität des Bax-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Regionen des Hippocampus und des unteren Astes des Gyrus dentatus der ischämischen (rechten) und nicht-ischämischen (linken) Gehirnhälfte der Kontrollgruppe und Sevoflurangruppe zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten.

Summe der Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (±SD) der ischämisch (rechten) und nicht-ischämisch (linken) Gehirnhälfte der Nativtiere.

Signifikanzen:

Sonderzeichen (*) = Signifikanz ($p < 0,05$) Kontrollgruppe vs. Sevoflurangruppe

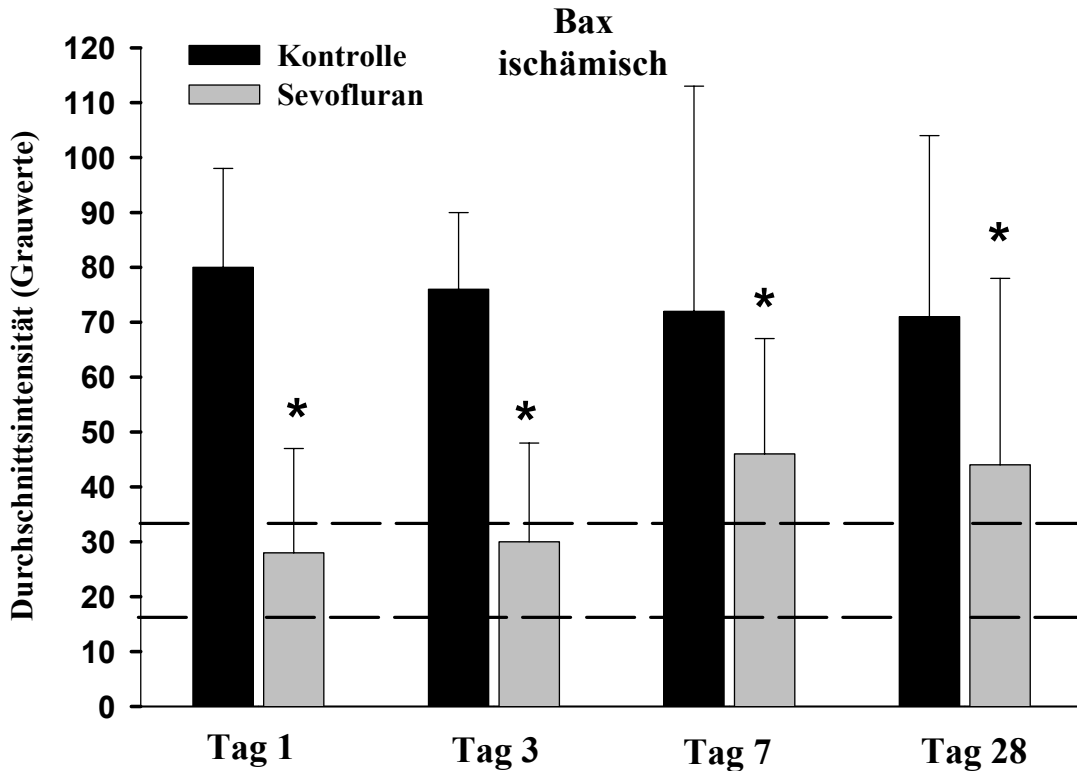


Abb.11

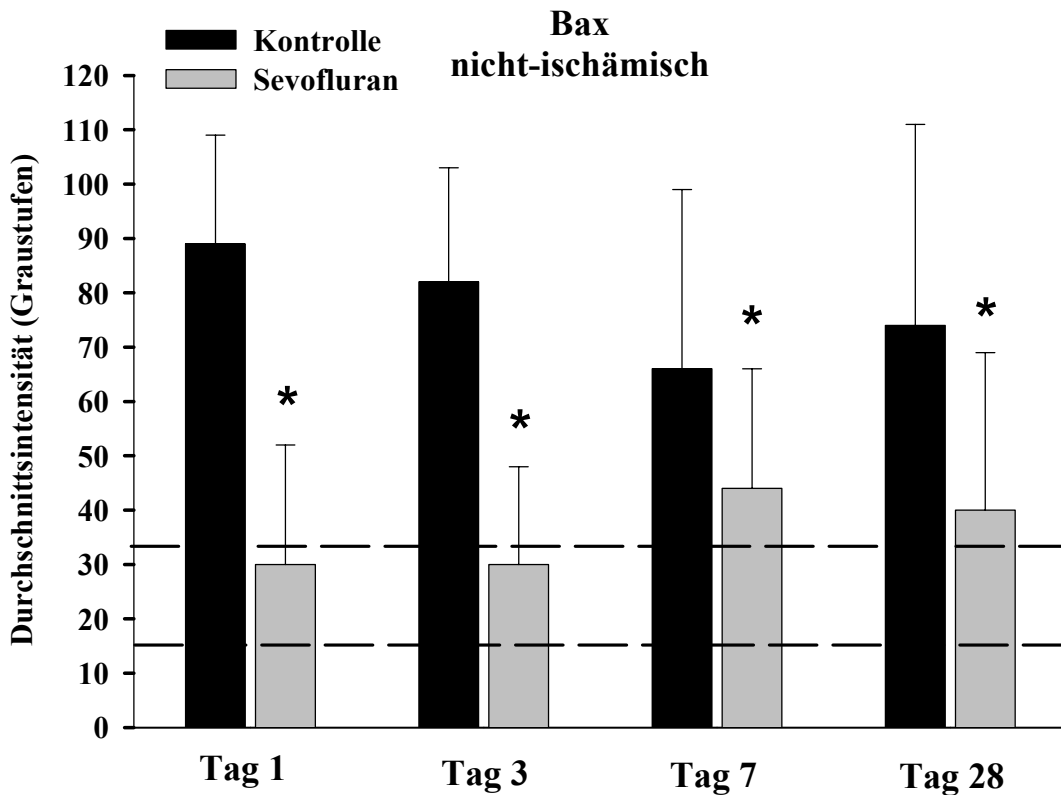


Abb.12

Abb.11 u. 12: Durchschnittliche Immunfluoreszenzintensität (Graustufen) des Bax-Proteins im Hippocampus der rechten (=ischämischen) und linken (=nicht-ischämischen) Hemisphäre im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen. Signifikanzen: (*= $p < 0,05$ vs. Kontrolle; zwischen den gestrichelten Linien liegen die physiologischen Vergleichswerte im Gehirn eines Nativtieres)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Expression des Bax-Proteins der mit Sevofluran behandelten Tiere zeigt sowohl in der ischämischen (rechten), als auch in der nicht-ischämischen (linken) Gehirnhälfte am 1., 3., 7. und 28. Tag einen *signifikant* niedrigeren Wert auf als den der Tiere aus der Kontrollgruppe. Die Expression des Bax-Proteins der Sevoflurangruppe bewegt sich am 1. und 3. Untersuchungstag in beiden Hemisphären im Referenzbereich der Nativtiere. Am 7. und 28. Tag ist die gemessene Intensität des Proteins Bax in der Sevoflurangruppe etwas höher als der durch die Nativtiere vorgegebene Referenzbereich. Die Ergebnisse der rechten und der linken Gehirnhälfte zeigen keine signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassung: Die Proteinexpression des pro-apoptotischen Bax-Proteins ist in der Sevoflurangruppe im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen um 33 - 66 % niedriger als in der Kontrollgruppe.

Nachweis des Bax-Proteins durch Western-Blot-Analyse

Tab.11: Relative Schwärzungsintensität des Bax-Proteins zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in der Western-Blot-Analyse

Tiergruppe	Ischämische Hemisphäre (rechts)				Nicht-Ischämische Hemisphäre (links)			
	Untersuchungszeitpunkt post op:				Untersuchungszeitpunkt post op:			
	1.Tag	3.Tag	7.Tag	28.Tag	1.Tag	3.Tag	7.Tag	28.Tag
Kontrollgruppe	191±78	215±90	222±104	205±53	220±62	212±75	225±72	204±77
Sevoflurangruppe	189±92	178±73	179±78	222±89	203±64	195±76	179±45	173±36
Nativtiere	152±18	Keine Ischämie			124±34	Keine Ischämie		

Vergleich der Mittelwerte (MW) und deren Standardabweichung (SD±) der relativen Schwärzungsintensität in Prozent zum Standard (100 %) von Bax in der Western-Blot-Analyse. Messung der rechten (ischämischen) und linken (nicht-ischämischen) Hemisphäre der Versuchsgruppen zu definierten Untersuchungszeitpunkten.

Signifikanzen:

Sonderzeichen (*) = Signifikanz ($p < 0,05$) Kontrollgruppe vs. Sevoflurangruppe

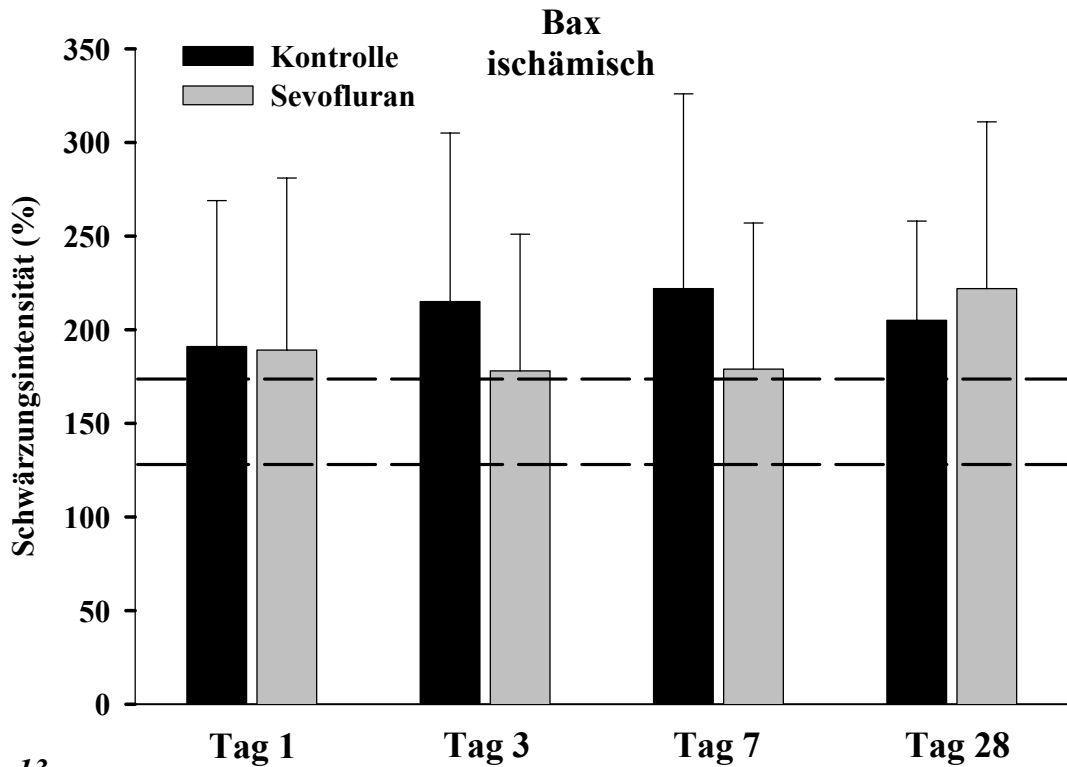


Abb. 13

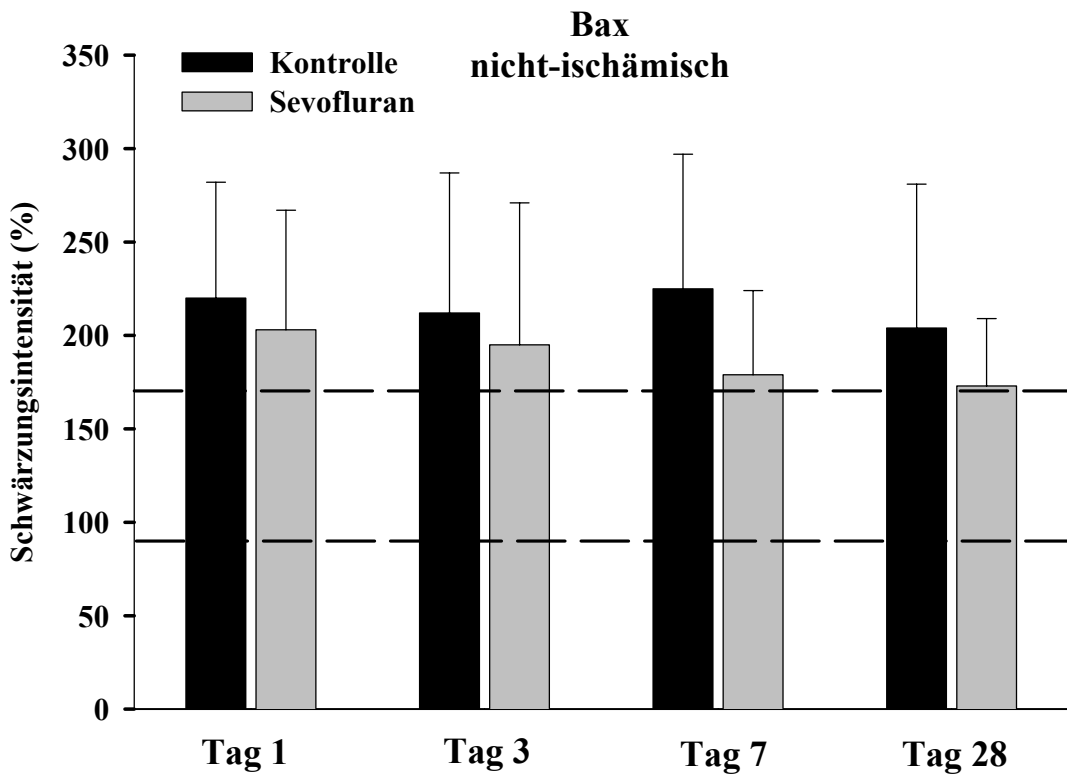


Abb.14

Abb. 13 u. 14: Graphische Darstellung der Western-Blot-Analyse (durchschnittliche Schwärzungsintensität in %) des Bax-Proteins im Hippocampus der rechten (=ischämischen) und linken (=nicht-ischämischen) Hemisphäre im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen (*= $p < 0,05$ vs. Kontrolle; zwischen den gestrichelten Linien liegen die physiologischen Vergleichswerte des Bax-Proteins im Gehirn eines Nativtieres)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

In der Western-Blot-Analyse können keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und den Untersuchungstagen festgestellt werden.

Die Proteinexpression der ischämischen Seite ist am 1., 3. und 7. Tag der Untersuchung innerhalb der Kontrollgruppe tendenziell höher als in der Sevoflurangruppe. Am 28. Untersuchungstag sinkt der Proteinwert der Kontrollgruppe im Vergleich zur Sevoflurangruppe leicht ab. Die nicht-ischämische Hemisphäre der Sevoflurangruppe exprimiert zu allen Zeitpunkten einen tendenziell niedrigeren Wert als die der Kontrollgruppe. Alle gemessenen Werte der zwei Versuchsgruppen zeigen in beiden Hemisphären eine Proteinexpression über den physiologischen Vergleichswerten.

3.3.2.2 Analyse des pro-apoptotischen p53-Proteins

Nachweis des p53-Proteins durch Immunfluoreszenz

Tab.14: Immunfluoreszenz-Intensität des p53-Proteins zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Tiergruppe	Ischämische Hemisphäre (rechts)				Nicht-Ischämische Hemisphäre (links)			
	Untersuchungszeitpunkt post op:				Untersuchungszeitpunkt post op:			
	1.Tag	3.Tag	7.Tag	28.Tag	1.Tag	3.Tag	7.Tag	28.Tag
Kontrollgruppe	28±13	17±4	19±6	45±25	35±18	28±13	23±8	42±17
Sevoflurangruppe	27±21	29±11*	25±9	39±20	27±18	32±16	29±13	37±18
Nativtiere	35±8	Keine Ischämie			35±6	Keine Ischämie		

Summe der Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (±SD) der Immunfluoreszenz-Intensität des p53-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Regionen des Hippocampus und des unteren Astes des Gyrus dentatus der ischämischen (rechten) und nicht-ischämischen (linken) Gehirnhälfte der Kontrollgruppe und Sevoflurangruppe zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten.

Summe der Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (±SD) der ischämisch (rechten) und nicht-ischämisch (linken) Gehirnhälfte der Nativtiere.

Signifikanzen:

Sonderzeichen (*) = Signifikanz ($p < 0,05$) Kontrollgruppe vs. Sevoflurangruppe

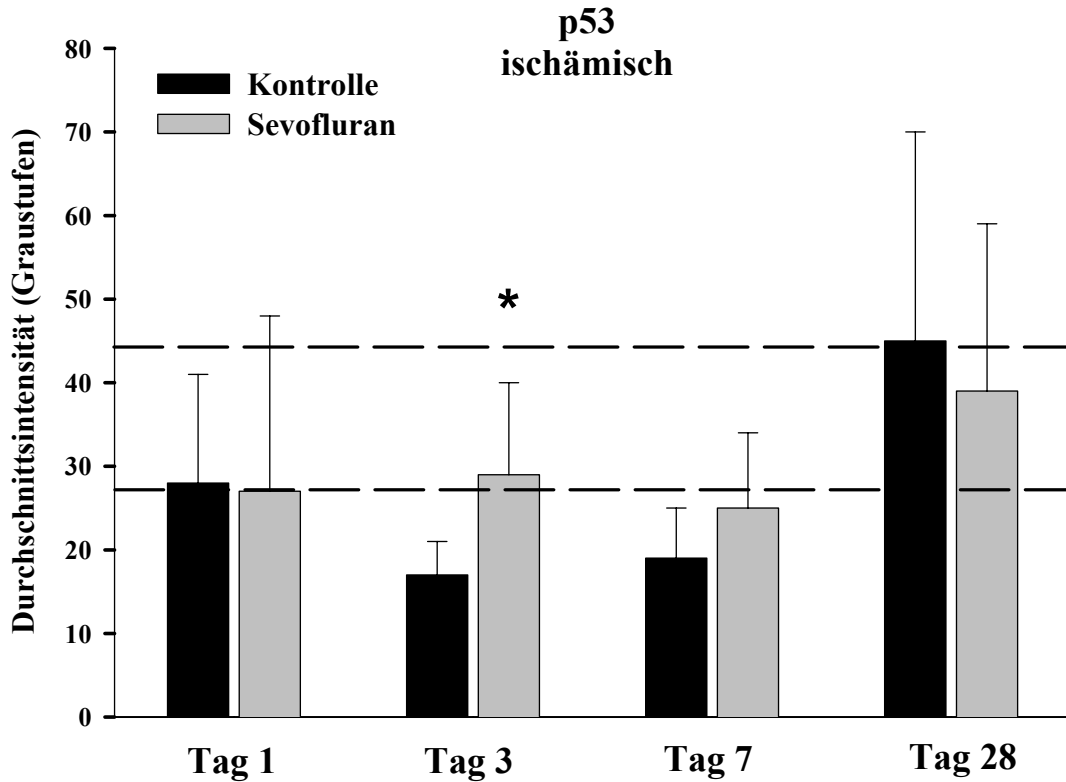


Abb.19

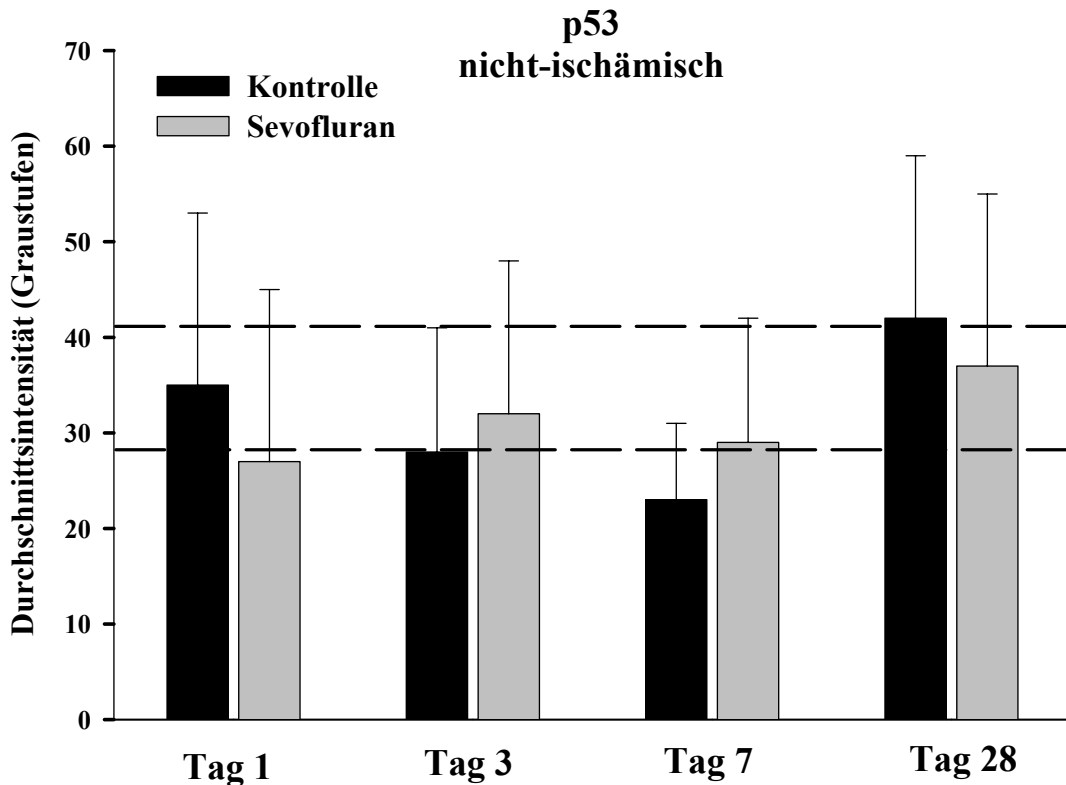


Abb.20

Abb.19 u. 20: Durchschnittliche Immunfluoreszenzintensität (Graustufen) des p53-Proteins im Hippocampus der rechten (=ischämischen) und linken (=nicht-ischämischen) Hemisphäre im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen. Signifikanzen: (*= $p < 0,05$ vs. Kontrolle; zwischen den gestrichelten Linien liegen die physiologischen Vergleichswerte im Gehirn eines Nativtieres)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die einzige *signifikante* Veränderung bei der p53-Proteinanalyse kann am 3. Untersuchungstag in der ischämischen Gehirnhälfte beobachtet werden. Messbar ist eine *signifikante* Erhöhung des p53-Proteins in der Sevoflurangruppe verglichen mit dem Wert der Kontrolltiere des 3. Tages. Für die Konzentration des p53-Proteins sind zu allen anderen Messzeitpunkten mit der Immunfluoreszenzmessung keine weiteren Signifikanzen feststellbar.

Folgende Trends können beobachtet werden: Die Expression des p53-Proteins ist in der ischämischen Gehirnhälfte am 1. Untersuchungstag sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei der mit Sevofluran anästhesierten Untersuchungsgruppe nahezu identisch und unterhalb des Normbereiches anzusiedeln. Am 3. und 7. Untersuchungstag sind die Werte der Kontrolltiere im Vergleich zur Untersuchungsgruppe Sevofluran erniedrigt und unter dem Messbereich der Nativtiere zu finden. Am 28. Tag liegen die Werte beider Versuchsgruppen nahezu im Normbereich der Nativtiere. Der Wert der Kontrollgruppe ist tendenziell höher. In der nicht-ischämischen Gehirnhälfte sind die Werte am 1. und 28. Untersuchungstag in der Kontrollgruppe höher als in der Sevoflurangruppe. Am 3. und 7. Tag ist die Expression des p53 der Sevoflurangruppe höher. Zusammenfassung: Am 3. Untersuchungstag kann in der ischämischen Hemisphäre eine 63 % ige Erhöhung des p53 der Sevoflurangruppe verglichen mit der Kontrollgruppe gemessen werden.

Nachweis des p53-Proteins durch Western-Blot-Analyse

Tab.15: Relative Schwärzungsintensität des p53-Proteins zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in der Western-Blot-Analyse

Tiergruppe	Ischämische Hemisphäre (rechts)				Nicht-Ischämische Hemisphäre (links)			
	Untersuchungszeitpunkt post op:				Untersuchungszeitpunkt post op:			
	1.Tag	3.Tag	7.Tag	28.Tag	1.Tag	3.Tag	7.Tag	28.Tag
Kontrollgruppe	139±50	125±44	126±33	146±41	144±62	124±51	135±32	128±31
Sevoflurangruppe	118±40	123±31	141±32	127±41	131±44	132±35	142±63	132±45
Nativtiere	101±14	Keine Ischämie			102±22	Keine Ischämie		

Vergleich der Mittelwerte (MW) und deren Standardabweichung (SD±) der relativen Schwärzungsintensität in Prozent zum Standard (100 %) von p53 in der Western-Blot-Analyse. Messung der rechten (ischämischen) und linken (nicht-ischämischen) Hemisphäre der Versuchsgruppen zu definierten Untersuchungszeitpunkten.

Signifikanzen:

Sonderzeichen (*) = Signifikanz ($p < 0,05$) Kontrollgruppe vs. Sevoflurangruppe

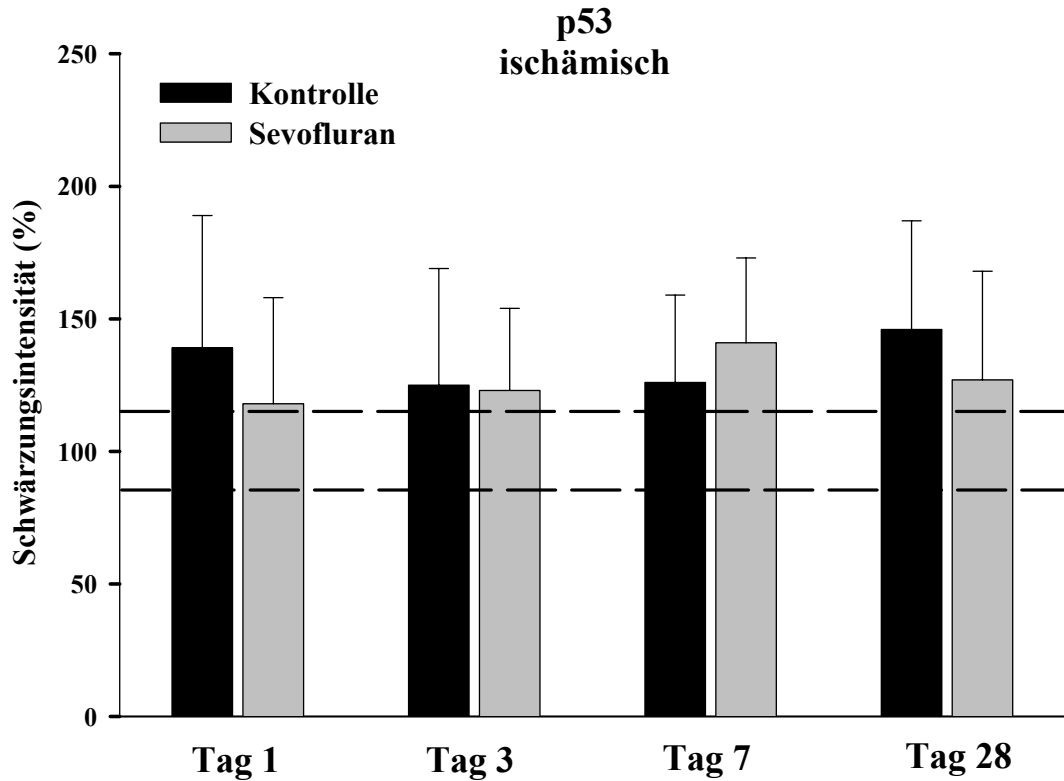


Abb. 21

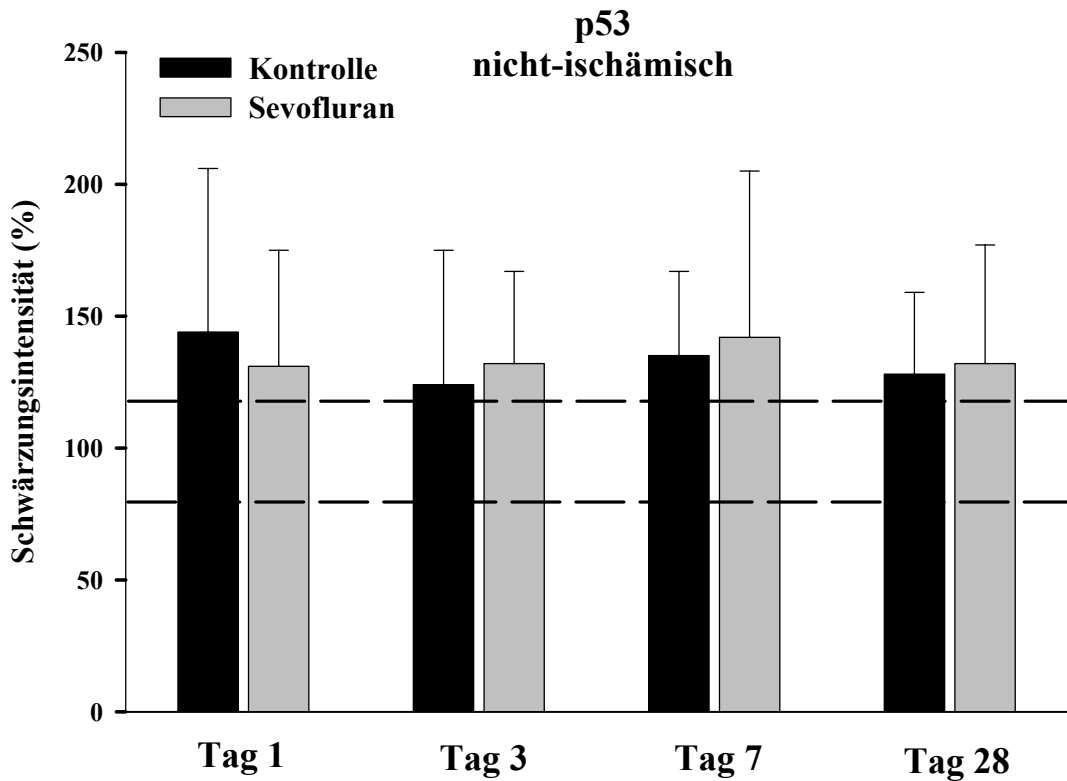


Abb. 22

Abb. 21 u. 22: Graphische Darstellung der Western-Blot-Analyse (durchschnittliche Schwärzungsintensität in %) des p53-Proteins im Hippocampus der rechten (=ischämischen) und linken (=nicht-ischämischen) Hemisphäre im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen (*= $p < 0,05$ vs. Kontrolle; zwischen den gestrichelten Linien liegen die physiologischen Vergleichswerte des p53-Proteins im Gehirn eines Nativtieres)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

In der Western-Blot-Analyse können bei der Messung des p53-Proteins keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Werte der beiden Untersuchungsgruppen sind zu allen Messzeitpunkten und in beiden Hemisphärenhälften nahezu identisch und liegen an der oberen Grenze der physiologischen Referenzwerte.

3.3.2.3 Analyse des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins

Nachweis des Bcl-2-Proteins durch Immunfluoreszenz

Tab.12: Immunfluoreszenz-Intensität des Bcl-2-Proteins zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Tiergruppe	Ischämische Hemisphäre (rechts)				Nicht-Ischämische Hemisphäre (links)			
	Untersuchungszeitpunkt post op:				Untersuchungszeitpunkt post op:			
	1.Tag	3.Tag	7.Tag	28.Tag	1.Tag	3.Tag	7.Tag	28.Tag
Kontrollgruppe	16±6	17±7	24±13	29±9	18±7	13±4	19±11	25±10
Sevoflurangruppe	35±16*	33±6*	30±9	26±11	33±15*	36±6*	30±11	26±12
Nativtiere	27±4	Keine Ischämie			23±4	Keine Ischämie		

Summe der Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (\pm SD) der Immunfluoreszenz-Intensität des Bcl-2-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Regionen des Hippocampus und des unteren Astes des Gyrus dentatus der ischämischen (rechten) und nicht-ischämischen (linken) Gehirnhälfte der Kontrollgruppe und Sevoflurangruppe zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten.

Summe der Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (\pm SD) der ischämisch (rechten) und nicht-ischämisch (linken) Gehirnhälfte der Nativtiere.

Signifikanzen:

Sonderzeichen (*) = Signifikanz ($p < 0,05$) Kontrollgruppe vs. Sevoflurangruppe

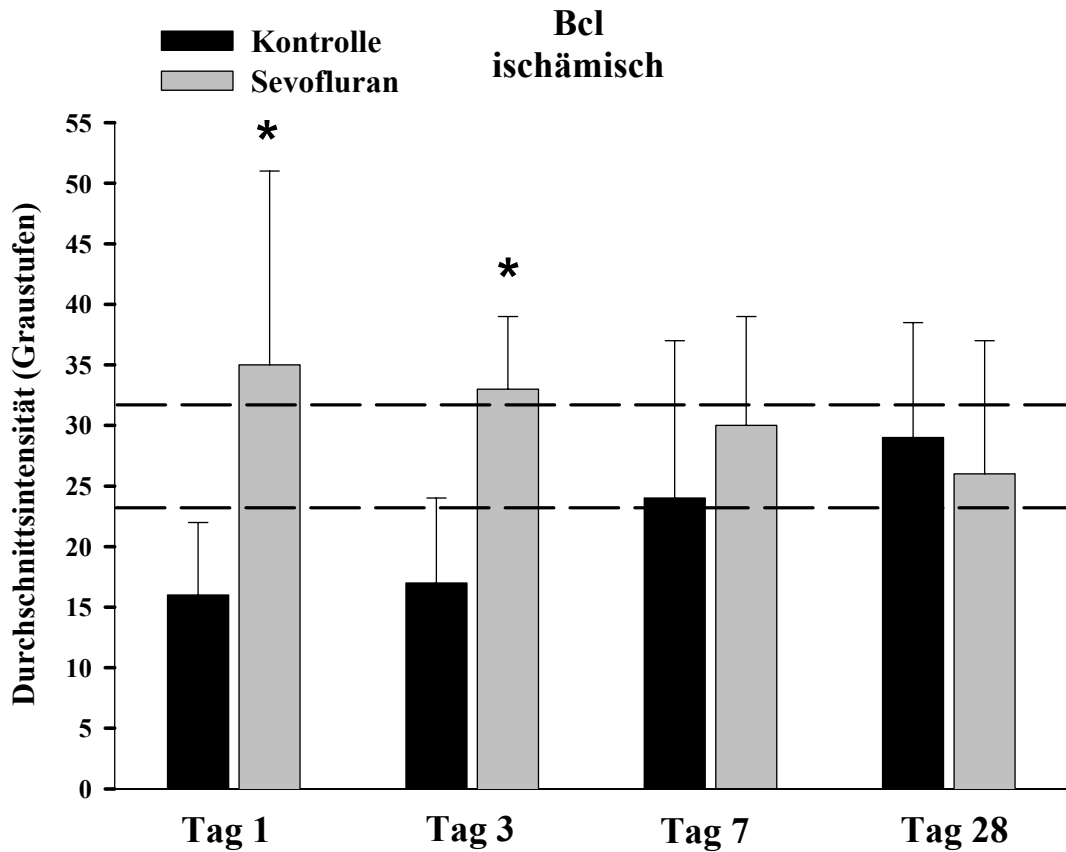


Abb. 15

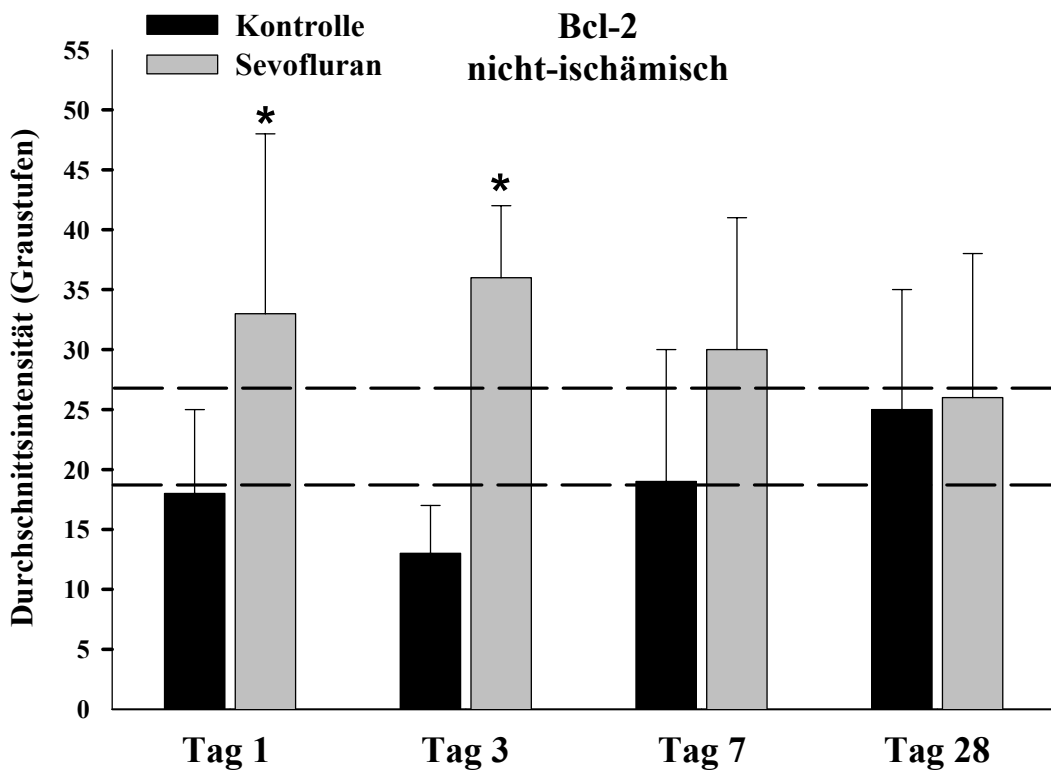


Abb. 16

Abb.15 u. 16: Durchschnittliche Immunfluoreszenzintensität (Graustufen) des Bcl-2-Proteins im Hippocampus der rechten (=ischämischen) und linken (=nicht-ischämischen) Hemisphäre im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen. Signifikanzen: (*= $p < 0,05$ vs. Kontrolle; zwischen den gestrichelten Linien liegen die physiologischen Vergleichswerte im Gehirn eines Nativtieres)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Das Bcl-2-Protein wird in der Sevoflurangruppe in beiden Gehirnhälften am 1. und 3. Tag *signifikant* höher exprimiert als in der Kontrollgruppe. Am 7. Untersuchungstag ist die Expression des Proteins der Kontrollgruppe in beiden Hemisphären tendenziell niedriger als bei mit Sevofluran anästhesierten Tieren, wobei sich die Werte nahezu im Normbereich der Nativtiere bewegen. Am 28. Tag ist das gemessene Bcl-2 beider Untersuchungsgruppen sowohl in der ischämischen als auch in der nicht-ischämischen Seite im Messbereich der Nativtiere aufzufinden.

Zusammenfassung: Die Expression des Bcl-2-Proteins ist in der Sevoflurangruppe verglichen zur Kontrollgruppe im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen um 83 - 177 % erhöht.

Nachweis des Bcl-2-Proteins durch Western-Blot-Analyse

Tab.13: Relative Schwärzungsintensität des Bcl-2-Proteins zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in der Western-Blot-Analyse

Tiergruppe	<i>Ischämische Hemisphäre (rechts)</i>				<i>Nicht-Ischämische Hemisphäre (links)</i>			
	Untersuchungszeitpunkt post op:				Untersuchungszeitpunkt post op:			
	1.Tag	3.Tag	7.Tag	28.Tag	1.Tag	3.Tag	7.Tag	28.Tag
Kontroll- gruppe	83±56	104±72	91±51	114±54	100±46	90±23	100±40	103±37
Sevofluran gruppe	187±65*	141±63	130±44*	165±74*	166±75*	141±45*	128±40	154±82*
Nativtiere	116±34	Keine Ischämie			94±27	Keine Ischämie		

Vergleich der Mittelwerte (MW) und deren Standardabweichung (SD±) der relativen Schwärzungsintensität in Prozent zum Standard (100 %) von Bcl-2 in der Western-Blot-Analyse. Messung der rechten (ischämischen) und linken (nicht-ischämischen) Hemisphäre der Versuchsgruppen zu definierten Untersuchungszeitpunkten.

Signifikanzen:

Sonderzeichen () = Signifikanz ($p < 0,05$) Kontrollgruppe vs. Sevoflurangruppe*

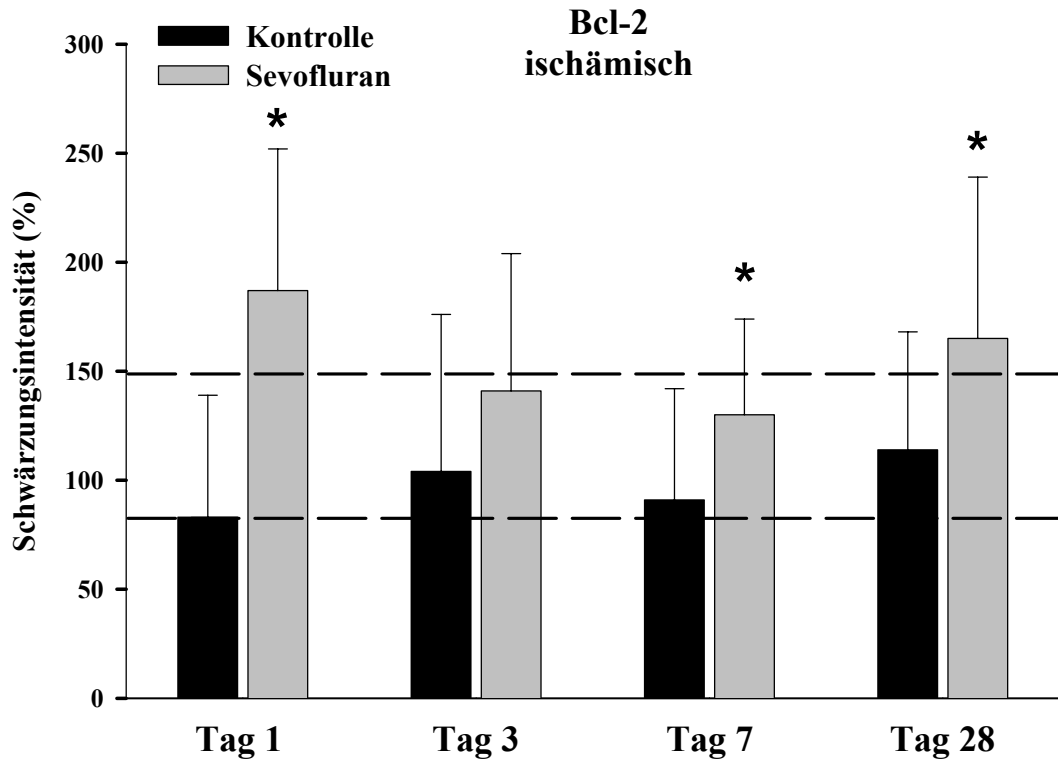


Abb. 17

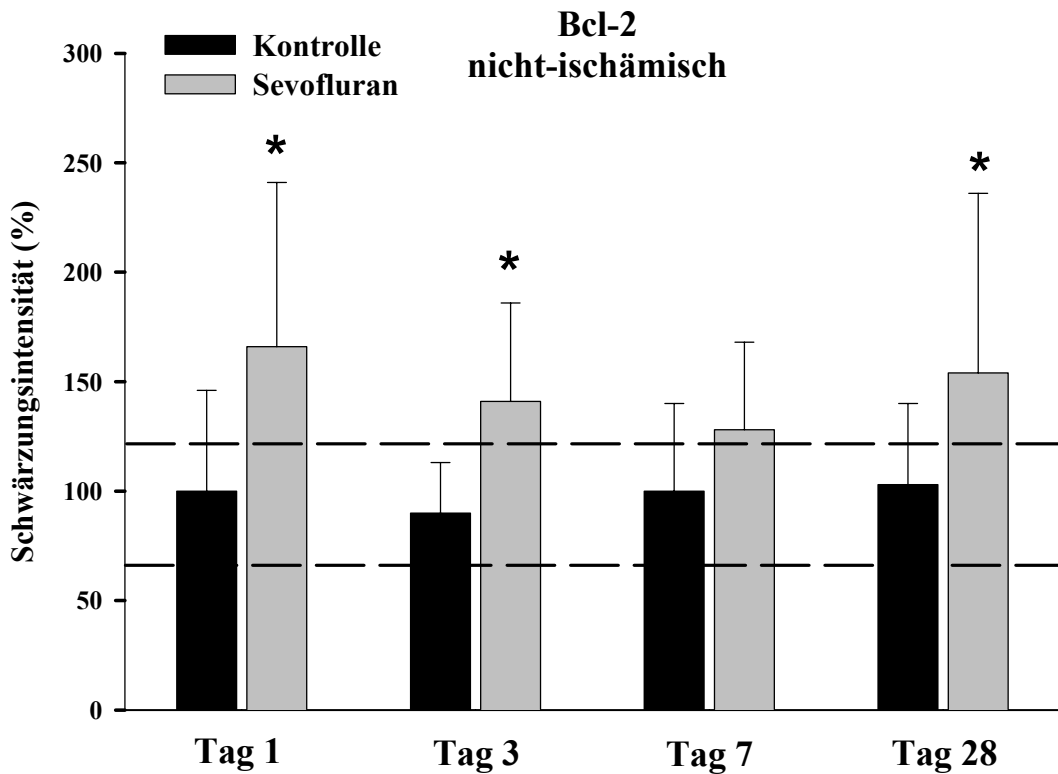


Abb. 18

Abb. 17 u. 18: Graphische Darstellung der Western-Blot-Analyse (durchschnittliche Schwärzungsintensität in %) des Bcl-2-Proteins im Hippocampus der rechten (=ischämischen) und linken (=nicht-ischämischen) Hemisphäre im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen (*= $p < 0,05$ vs. Kontrolle; zwischen den gestrichelten Linien liegen die physiologischen Vergleichswerte des Bcl-2-Proteins im Gehirn eines Nativtieres)

Eine *signifikante* Erhöhung des Bcl-2-Wertes der Sevoflurangruppe verglichen mit dem der Kontrolltiere kann am 1., 7. und 28. Untersuchungstag in der ischämischen Gehirnhälfte und am 1., 3. und 28. Untersuchungstag in der nicht-ischämischen Seite gemessen werden. Eine ebenfalls erhöhte, aber nicht signifikante, Bcl-2-Expression ist am 3. Tag in der ischämischen und am 7. Tag in der nicht-ischämischen Seite zu beobachten. Alle Werte der Kontrollgruppe sind in beiden Hemisphären zu allen Zeitpunkten im Normbereich der Nativtiere vorzufinden. Die Bcl-2 Expression beider Hemisphären der Sevoflurangruppe befindet sich zu allen Untersuchungszeitpunkten im oder leicht über dem physiologischen Referenzbereich.

Zusammenfassung: In der Western-Blot-Analyse ist die Expression des Bcl-2 in der Sevoflurangruppe um 43 - 125 % höher als in der Kontrollgruppe.

3.3.2.4 Analyse des anti-apoptotischen Mdm-2-Proteins

Nachweis des Mdm-2-Proteins durch Immunfluoreszenz

Tab.16: Immunfluoreszenz-Intensität des Mdm-2-Proteins zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Tiergruppe	Ischämische Hemisphäre (rechts)				Nicht-Ischämische Hemisphäre (links)			
	Untersuchungszeitpunkt post op:				Untersuchungszeitpunkt post op:			
	1.Tag	3.Tag	7.Tag	28.Tag	1.Tag	3.Tag	7.Tag	28.Tag
Kontrollgruppe	24±4	14±5	35±25	25±12	21±3	16±9	15±7	26±16
Sevoflurangruppe	38±10*	41±16*	35±13	43±34	41±14*	37±15*	37±16*	39±24
Nativtiere	25±7	Keine Ischämie			26±5	Keine Ischämie		

Summe der Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (±SD) der Immunfluoreszenz-Intensität des Mdm-2-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Regionen des Hippocampus und des unteren Astes des Gyrus dentatus der ischämischen (rechten) und nicht-ischämischen (linken) Gehirnhälfte der Kontrollgruppe und Sevoflurangruppe zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten.

Summe der Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (±SD) der ischämisch (rechten) und nicht-ischämisch (linken) Gehirnhälfte der Nativtiere.

Signifikanzen:

Sonderzeichen (*) = Signifikanz ($p < 0,05$) Kontrollgruppe vs. Sevoflurangruppe

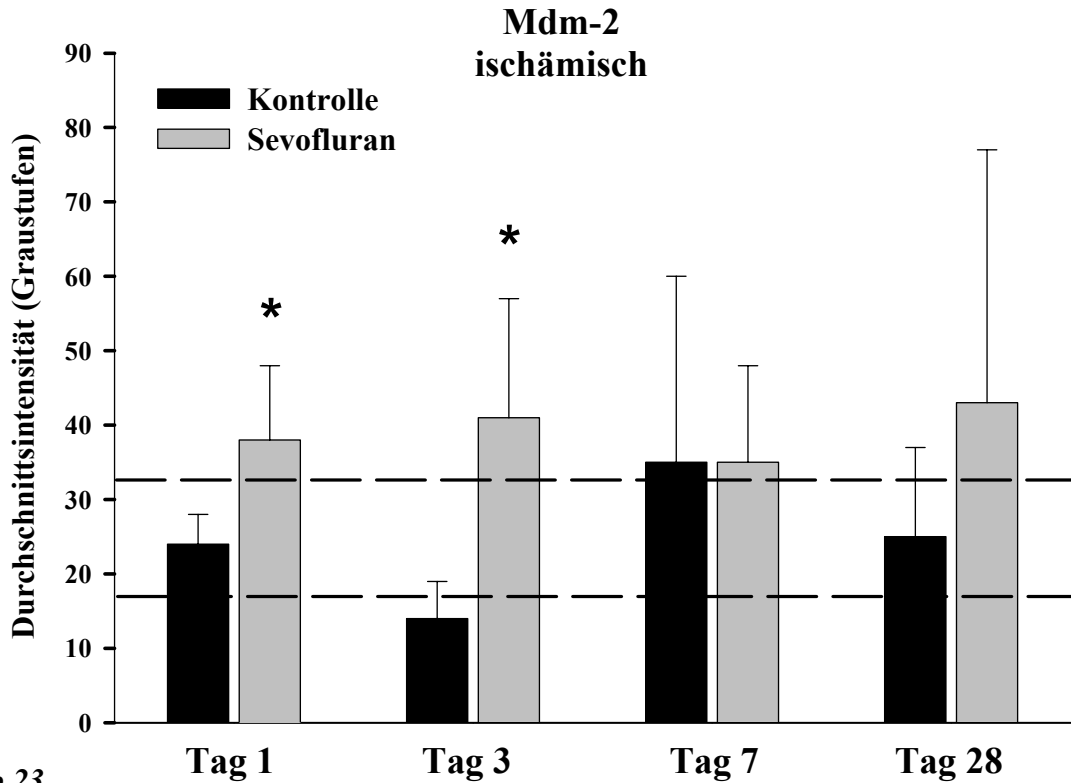


Abb.23

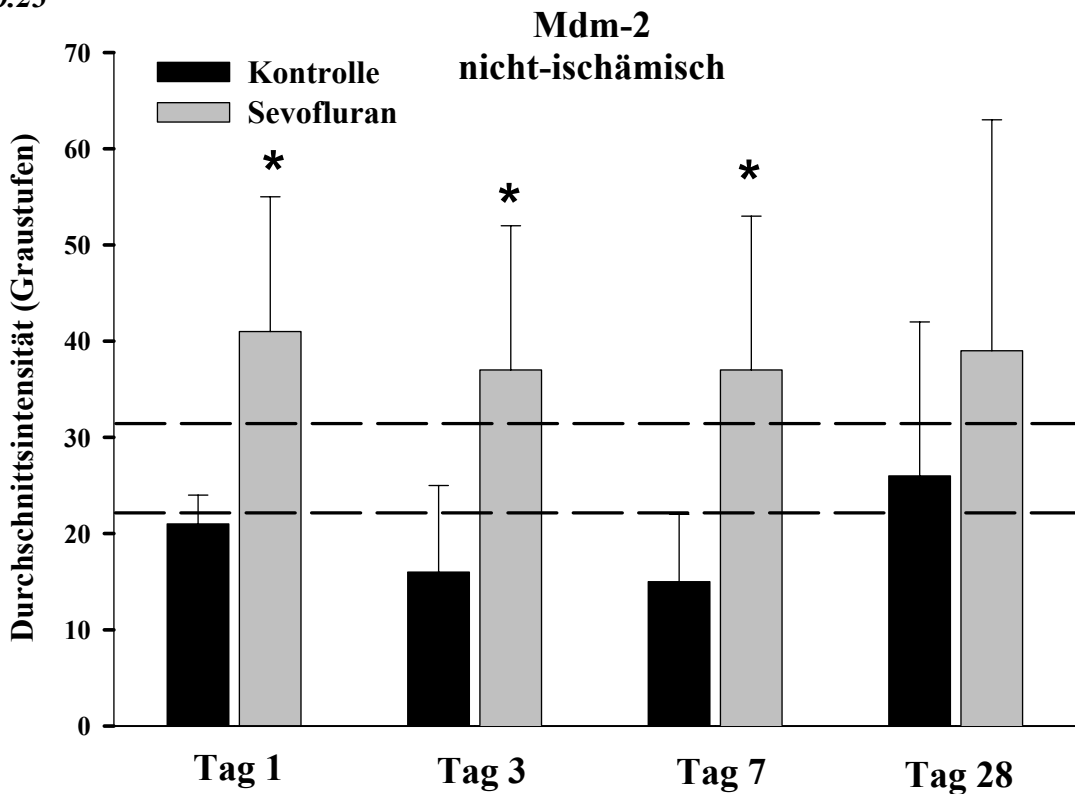


Abb.24

Abb.23 u. 24: Durchschnittliche Immunfluoreszenzintensität (Graustufen) des Mdm-2-Proteins im Hippocampus der rechten (=ischämischen) und linken (=nicht-ischämischen) Hemisphäre im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen. Signifikanzen: (*= $p < 0,05$ vs. Kontrolle; zwischen den gestrichelten Linien liegen die physiologischen Vergleichswerte im Gehirn eines Nativtieres)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Expression des Mdm-2-Protein der Sevoflurangruppe ist in der ischämischen Gehirnhälfte am 1. und 3. Untersuchungstag *signifikant* höher als die der Kontrollgruppe. Am 7. Tag kann kein Unterschied zwischen den Werten beider Untersuchungsgruppen festgestellt werden. Am 28. Untersuchungstag kann nur eine tendenzielle Erhöhung der Sevoflurangruppe verglichen zur Kontrollgruppe gemessen werden.

In der nicht-ischämischen Gehirnhälfte wird am 1., 3. und 7. Untersuchungstag eine *signifikante* Erhöhung des Proteins der Sevoflurangruppe erkennbar. Die Expression des Proteins der Kontrollgruppe ist im oder unterhalb des Wertebereichs der Nativtiere vorzufinden, die der Sevoflurangruppe oberhalb der physiologischen Referenzwerte der Nativtiere.

Zusammenfassung: Bei den signifikanten Werten der Mdm-2-Expression kann in der Sevoflurangruppe eine 58 - 193 %ige Erhöhung verglichen zur Kontrollgruppe gemessen werden.

Nachweis des Mdm-2-Proteins durch Western-Blot-Analyse

Tab.17: Relative Schwärzungsintensität des Mdm-2-Proteins zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in der Western-Blot-Analyse

Tiergruppe	<i>Ischämische Hemisphäre (rechts)</i>				<i>Nicht-Ischämische Hemisphäre (links)</i>			
	Untersuchungszeitpunkt post op:				Untersuchungszeitpunkt post op:			
	1.Tag	3.Tag	7.Tag	28.Tag	1.Tag	3.Tag	7.Tag	28.Tag
Kontrollgruppe	122±44	128±56	117±40	127±42	193±114	198±91	173±89	167±109
Sevoflurangruppe	156±64	157±63	146±74	136±50	207±75	192±75	212±86	248±153
Nativtiere	205±87	Keine Ischämie			206±64	Keine Ischämie		

Vergleich der Mittelwerte (MW) und deren Standardabweichung (SD±) der relativen Schwärzungsintensität in Prozent zum Standard (100 %) von Mdm-2 in der Western-Blot-Analyse. Messung der rechten (ischämischen) und linken (nicht-ischämischen) Hemisphäre der Versuchsgruppen zu definierten Untersuchungszeitpunkten.

Signifikanzen:

Sonderzeichen () = Signifikanz ($p < 0,05$) Kontrollgruppe vs. Sevoflurangruppe*

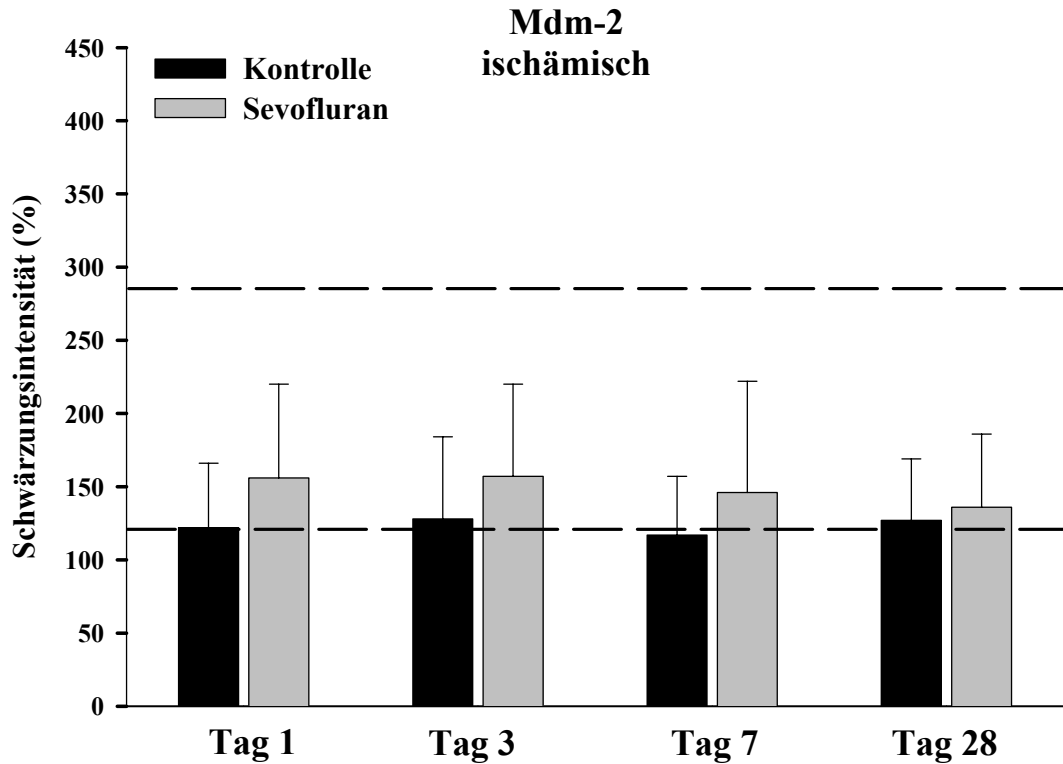


Abb.25

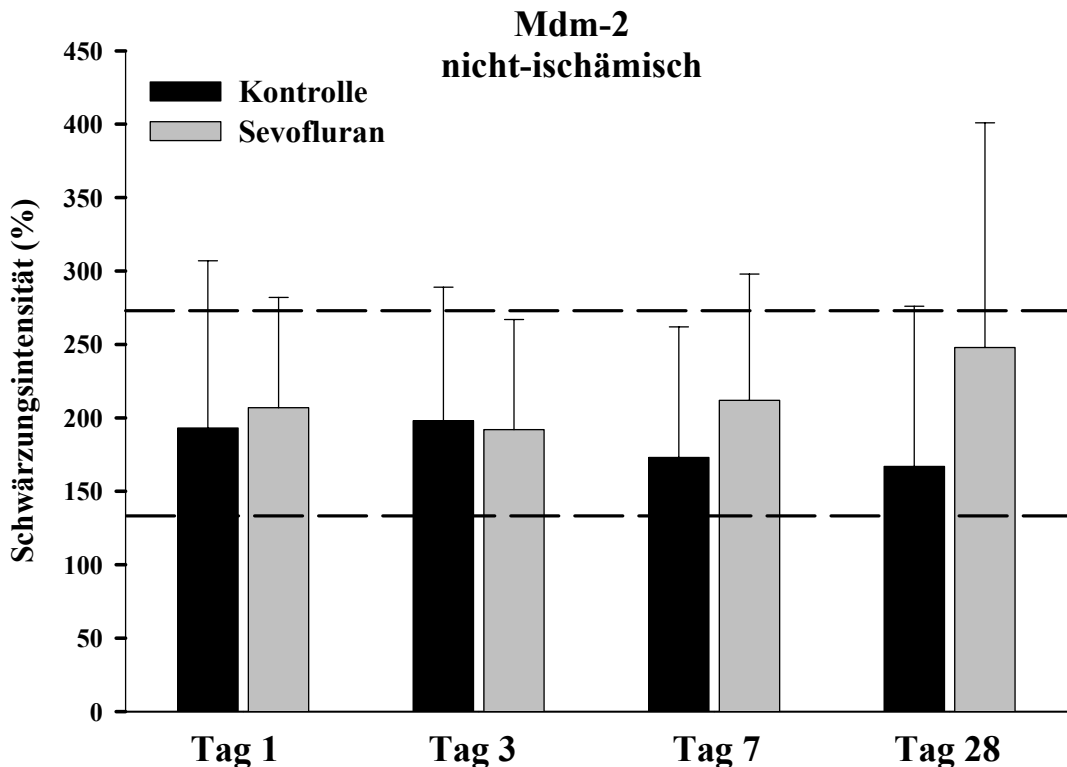


Abb.26

Abb. 25 u. 26: Graphische Darstellung der Western-Blot-Analyse (durchschnittliche Schwärzungsintensität in %) des Mdm-2-Proteins im Hippocampus der rechten (=ischämischen) und linken (=nicht-ischämischen) Hemisphäre im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen (*= $p < 0,05$ vs. Kontrolle; zwischen den gestrichelten Linien liegen die physiologischen Vergleichswerte des Mdm-2-Proteins im Gehirn eines Nativtieres)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Untersuchung der Mdm-2-Konzentration durch die Western-Blot-Analyse ergibt in keiner Untersuchungsgruppe zu keinem Messzeitpunkt ein signifikantes Ergebnis.

Das Apoptose-assoziierte Protein Mdm-2 zeigt in der rechten Gehirnhälfte bei der Kontrollgruppe zu den Untersuchungszeitpunkten nahezu identische Werte, die im oder unterhalb des Normbereichs der Nativtiere liegen. Währenddessen befindet sich der Mittelwert der mit Sevofluran behandelten Tiere im Normbereich und immer über dem der Kontrollgruppe.

In der linken Gehirnhälfte sind Mittelwerte der Kontroll- und Sevoflurangruppe zu allen Untersuchungszeitpunkten im Wertebereich der Nativtiere vorzufinden. Die Mittelwerte der Schwärzungsintensität (%) des Mdm-2-Proteins sind am 1., 3. und 7. Tag der Untersuchung nahezu gleich. Am 28. Untersuchungstag zeichnet sich eine tendenzielle Erhöhung der Mittelwerte der Sevoflurangruppe zur Kontrollgruppe ab.

4 DISKUSSION

Die vorliegende Studie zeigt, dass bei einer inkompletten cerebralen Hemisphärenischämie auch nach einem Zeitraum von 28 Tagen die Expressionsmuster der Apoptose-regulierenden Proteine Bax, Bcl-2, p53 und Mdm-2 beeinflusst werden. Zur Untersuchung eventueller neuroprotektiver Einflüsse von Sevofluran bei einer cerebralen Ischämie sind die Expressionsmuster der Apoptosefaktoren Bax, Bcl-2, p53 und Mdm-2 ausgewählt worden, da deren Einfluss bei cerebralen Ischämien bereits seit längerem bekannt ist (CHOPP und LI 1996, CHOI 1996, CHARRIAUT-MARLANGUE et al. 1998, LI et al. 1998). Ob nach einem ischämischen Insult Apoptose oder Nekrose entsteht, hängt von der Schwere und Zeitdauer ab. Ein sekundärer Hirnschaden tritt nicht unmittelbar nach dem Insult auf, sondern entwickelt sich nach Stunden oder Tagen (SIESJÖ und SIESJÖ 1996). Deswegen ist in der vorliegenden Studie ein Zeitraum von 28 Tagen ausgewählt worden, um Aussagen über die Expression der Apoptosefaktoren im zeitlichen Verlauf über eine verhältnismäßig lange Dauer machen zu können.

Die hier erhobenen Daten weisen auf einen möglichen neuroprotektiven Effekt des volatilen Anästhetikums Sevofluran über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 4 Wochen hin.

Für die Bestimmung der Apoptose-regulierenden Proteine wird für diese Studie der Hippocampus des Rattenhirns ausgewählt, da die Regionen des Hippocampus als selektiv vulnerabel und einer Ischämie gegenüber als besonders empfindlich gelten (SMITH et al. 1984).

In der vorliegenden Studie wird eine inkomplette Hemisphärenischämie durch die reversible Ligatur der rechten A. carotis communis mit gleichzeitiger Hypotension verwendet. Signifikante Unterschiede zwischen den Gehirnhälften bezüglich der zu erhebenden Proteine sind kaum zu messen. Eine Erklärung ist vermutlich in der hämorrhagischen Hypotension zu finden, die auch eine systemische Minderdurchblutung im gesamten Gehirn verursacht. Der Einfluss der einseitigen Gefäßligatur hinsichtlich der Folgen der cerebralen Ischämie spielt damit eine untergeordnete Rolle. Hinzu kommt, dass Ratten über eine ausgeprägte Kollateralgefäßversorgung des Gehirnes verfügen, die bei einem temporären Ausfall eines der Hauptversorgungsgefäße weitgehend die Durchblutung der betroffenen Areale übernehmen kann. Auch HOFFMAN et al. (1990) haben in einem vergleichbaren experimentellen Ischämiemodell neuronale Zellschäden auf der nicht-ligierten Seite erkennen können. Folglich ist der ischämische Schaden in der eigenen Studie vor allem auf die Senkung des MAP auf 40 mmHg zurückzuführen.

4.1 Diskussion der Versuchsdurchführung

4.1.1 Ischämiemodell

Die Verwendung physiologisch kontrollierter und reproduzierbarer Tiermodelle für Studien am Gehirn ist unumgänglich, um pathologischen Mechanismen und potenzielle therapeutische Strategien untersuchen und bewerten zu können (GINSBERG und BUSTO 1989).

Im Folgenden sind die wichtigsten Gründe aufgezählt, die eine Entwicklung von In-vivo-Modellen cerebraler Ischämien am Tier notwendig machen.

Cerebrale Ischämien des Menschen sind in ihrer Manifestation, Ursache und anatomischen Lokalisation so unterschiedlich, dass sie in den seltensten Fällen für klinische Studien geeignet sind. Histopathologische, biochemische und physiologische Untersuchungen sind wegen der meist invasiven und chirurgischen Methoden nicht möglich. Präischämische Untersuchungen und auch Studien unmittelbar nach dem Insult sind im meist akut auftretenden klinischen Fall nicht möglich. Das Tiermodell ermöglicht die Fortführung der Versuche In-vitro in Zellkulturen oder an Gewebeschnitten.

Obwohl auch größere Spezies wie Hunde, Katzen oder Primaten bereits für Studien der cerebralen Ischämie verwendet wurden (MOLINARI und LAURENT 1976, GARCIA 1984), haben sich die Nager als geeignete Tiergruppe durchgesetzt.

Vor allem die niedrigen Anschaffungs- und Unterhaltskosten, aber auch der geringere Bedarf an oft kostenintensiven Medikamenten erklärt die häufige Verwendung in der Forschung. Das kleine Hirnvolumen ist für Fixiervorgänge, biochemische Untersuchungen und histologische Schnitte besonders geeignet. Ein weiterer Vorteil ist die rasche Generationsfolge und die durch Inzucht bedingte Homogenität der einzelnen Rattenlinien.

Ein Nachteil ist jedoch, dass aufgrund der speziesbedingten Unterschiede vor allem bezüglich der Effekte von Anästhetika laut WALTZ (1979) teilweise nur bedingt eine Übertragbarkeit vom Tiermodell zur klinischen Situation einer Ischämie beim Menschen angenommen werden kann.

Jedoch weisen Ratten eine Ähnlichkeit in ihrer cerebrovaskulären Anatomie und Physiologie gegenüber höherentwickelten Spezies auf und erweisen sich in dieser Hinsicht für die Simulation im Tiermodell als geeignet. Die Arbeit mit Versuchsratten wird, verglichen mit der Arbeit mit Primaten, aus ökologischer und ethischer Perspektive bei wissenschaftlichem Personal erfahrungsgemäß besser akzeptiert (GINSBERG und BUSTO 1989).

Die wichtigste Überlegung bei der Entwicklung von Tiermodellen für die cerebrale Ischämie ist die klinische Relevanz dieser Modelle.

Die meisten Nager besitzen eine ausgeprägte intracranielle Kollateralcirculation, so dass ein singulärer Verschluss der A. carotis communis nicht ausreicht, um die cerebrale Metabolisierungsrate zu stören und einen cerebralen Schaden zu verursachen. Aus diesem Grund muss der Eingriff um eine systemische Hypotension erweitert werden. Systemische Hypoxie und Hypotension kann wiederum Organsysteme wie z.B. das Herz oder die Nieren schädigen (TAMURA et al. 1981). Unter diesen Umständen ist die Möglichkeit zur Herstellung physiologischer und konstanter Bedingungen zur Beurteilung des Ausmaßes eines cerebralen Schadens kritisch zu betrachten.

Nach GINSBERG und BUSTO (1989) können verschiedene Versuchsmodelle an der Ratte für die Entstehung einer cerebralen Ischämie verwendet werden.

Das Ziel des in der vorliegenden Studie verwendeten Ischämie-modells ist eine temporäre, inkomplette cerebrale Ischämie mit anschließender Reperfusion zu induzieren. Durch Verschluss der rechten A. carotis communis und gleichzeitiger systemischer Hypotension verursacht diese „low-flow“-Ischämie je nach Behandlung einen cerebralen Schaden. Es wird der klinische Zustand beim Menschen nach cerebralem Trauma, Verschluss cerebraler Gefäße oder cardiopulmonaler Reanimation simuliert.

4.1.2 Untersuchungszeitpunkte

Studien zum Expressionsmuster Apoptose-assoziierten Proteine unmittelbar nach cerebraler Ischämie sind bereits bekannt (CHOPP und LI 1996, CHOI 1996, CHARRIAUT-MARLANGUE et al. 1998, LI et al. 1998). Diese untersuchen aber nicht, oder nur unvollständig, den zeitlichen Verlauf solcher Expressionsmuster und lassen somit keine Rückschlüsse über eine langfristige Beeinflussung potenziell neuroprotektiver Substanzen bei Behandlung cerebraler Ischämien zu. Ischämische Vorgänge im Gehirn verursachen aber eine komplexe Folge pathophysiologischer Ereignisse, die sich über einen gewissen Zeitraum erstrecken. Neuere Experimente beweisen, dass sich ein cerebraler Schaden in langsameren Schritten entwickelt als ursprünglich angenommen (DIRNAGL et al. 1999).

Bereits in einer Studie von CHOPP und LI (1996) wird das Zeitprofil apoptotischer Zellen in Abhängigkeit von einer fokalen Ischämie untersucht. Dabei wurden das Auftreten und die Verteilung apoptotischer Zellen nach einer zweistündigen MCA-Okklusion bei der Ratte nach verschiedenen Überlebenszeiten gemessen. Zwar hatte die Anzahl der apoptotischen Zellen einen maximalen Peak nach 24 und 48 Stunden, dennoch war die Apoptoserate im Ischämiegebiet auch noch nach 4 Wochen signifikant erhöht. Das weist auf den programmierten Zelluntergang über Wochen hinweg als Teil eines dynamischen Prozesses hin.

Die Anzahl der apoptotischen Zellen steigt mit der Dauer der Ischämie. Bereits eine kurzzeitige Ischämie von 10 Minuten kann eine Apoptose induzieren. Eine Ischämiedauer von 45 Minuten, wie in der vorliegenden Studie, reicht also bezüglich der Schadensintensität aus, um die Expression der Apoptose-assoziierten Proteine Bax, Bcl-2, p53 und Mdm-2 im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen messen zu können.

4.1.3 Semiquantitative Proteinbestimmung durch Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz stellt die älteste Variante der Immunhistochemie dar. In den 1940er Jahren gelang dem Mikrobiologen ALBERT COONS die Darstellung bakterieller Erreger mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren. Auch heute noch ist die Immunfluoreszenz ein wichtiges diagnostisches Mittel vor allem im Bereich der Mikrobiologie. In der diagnostischen Pathologie spielt die Immunfluoreszenz eine eher untergeordnete Rolle. Zur Markierung der Apoptose-assoziierten Proteine wie Bax, Bcl-2, p53 und Mdm-2 wird die Immunfluoreszenz aber routinemäßig verwendet (CHOPP et al. 1992, KRAJEWSKI et al. 1994).

Vor Beginn der Studie erfolgt die Überprüfung der Spezifität der Antikörper. Durch ein blockierendes Peptid, das spezifisch an den Antikörper bindet, wird eine Fusion mit dem nachzuweisenden Gewebeantigen verhindert. Das Ergebnis der Färbung ist in diesem Fall negativ. Bei einem positiven Färberesultat handelt es sich um unspezifische Wechselwirkungen des Antikörpers mit dem Gewebe und macht den verwendeten Antikörper für diesen Versuch ungeeignet.

Die Möglichkeit, eine räumliche Verteilung der exprimierten Proteine zu erfassen, macht die indirekte Immunfluoreszenz zum idealen Analyseverfahren für diese Studie. Durch das konfokale Laser-Scan-Mikroskop kann sowohl eine semiquantitative Analytik der Proteinmenge, als auch eine Lokalisation der Proteine innerhalb des histologischen Schnittes stattfinden. Bei jeder einzelnen Färbung werden in dieser Studie Positiv- und Negativkontrollen mit angefertigt, um so Färbefehler jeweils ausschließen zu können. Schließlich werden zur exakten Messung der Fluoreszenz der Apoptoseproteine mögliche Schwankungen des Laser-Scan-Mikroskop erfasst.

Eine direkte Messung der Laserleistung wird mit einem Powermeter durchgeführt, das die Laserleistung im Strahlengang misst. Die indirekte Messung findet mit den sogenannten Beads statt, auf einem Objektträger fixierte Leuchtkugeln, die eine definierte Fluoreszenzemission abgeben. Für gemessene Schwankungen der Laserleistung können somit Umrechnungsfaktoren erarbeitet werden. Trotz Einhalten einer konstanten Zeitspanne zwischen Färbung und Auswertung mit dem Mikroskop können gewisse Schwankungen in

der Fluoreszenzintensität nicht ausgeschlossen werden. Allein die unterschiedliche Lagerungszeit der histologischen Schnitte und deren Auseinandersetzung mit nicht konstant zu haltenden Umweltbedingungen könnten die zeitweiligen Abweichungen der Ergebnisse in der Fluoreszenzintensität erklären.

4.1.4 Proteinkonzentrationsbestimmung mit der Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Analyse werden die einzelnen Komponenten der Proteinmischung gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran überführt und dort den für bestimmte Proteine spezifischen Nachweisreaktionen unterzogen. Das Blotten der getrennten Proteine auf eine Membran als Trägermatrix bietet den Vorteil der möglichen Antikörper-Exprimierung.

Die Qualität des zu trennenden Proteingemisches ist von entscheidender Bedeutung. Die Trennung nach Molekulargewicht kann durch Abbauprodukte gestört werden, die eine Reaktion bei niedrigerem Molekulargewicht als angenommen aufzeigt. Vor allem das Kochen der Proben in SDS-haltigen Puffern für die denaturierende SDS-Gelelektrophorese kann Proteine unerwünscht fragmentieren (KOWIT und MALONEY 1982, KUBO 1995).

Die Western-Blot-Analyse ist eine relativ fehleranfällige Untersuchungsmethode, aber bei strengem Einhalten des Protokolls zuverlässig in der Beurteilung von Proteinen. Die Einzelanalyse dauert zwei Tage und ist genau nach Versuchsprotokoll und möglichst von laborerfahrenem Personal durchzuführen.

Die Vergleichbarkeit der Einzelergebnisse der vorliegenden Studie wird durch die Etablierung eines Standards (konstante Proteinmenge und konstantes Volumen) gewährleistet, der in Doppelbestimmung in jeder Analyse erneut mitgemessen wird. Zu Beginn der Studie ist ein Proteinangleich der Proben notwendig.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Proben untereinander stellt man Einzelproben her, in denen die gleichen Proteinmengen von je 20 µg vorhanden sind. Der Blot-Vorgang im Semi-Dry-Verfahren, der unmittelbar nach der Gelelektrophorese folgt, findet immer senkrecht zur Trennrichtung statt, damit das Trennmuster des Gels exakt dem der Membran entspricht. Das Semi-Dry-Verfahren ermöglicht, verglichen mit anderen Methoden, eine kürzere Transferzeit und einen geringeren Verbrauch an Transferpuffern.

Als Nachteil muss allerdings die z. T. erhebliche Erwärmung des Blottes gesehen werden. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Studie eine relativ lange Transferzeit mit niedrigen Ampere gewählt. Besonders bei älteren Blottingapparaturen können die äußerst empfindlichen Graphitelektroden die Membran verfärben und bei minimalen Schäden an der

DISKUSSION

Oberfläche den Proteintransfer durch Luftblasen stören. Deswegen wurden im eigenen Versuch nur neuwertige Geräte verwendet, die auch regelmäßig gewartet wurden.

Die Nachweisreaktion, d. h. der Antikörper-Overlay, muss vor dem Versuch getestet und optimiert werden. Die Spezifität des 1. Antikörpers wird durch ein blockierendes Peptid bewiesen, das die Bindungsdeterminante des Antikörpers an das Zielprotein blockiert und somit unspezifische Bindungen des Antikörpers ausschließen kann.

Der 2. Antikörper ist gegen konstante Bereiche des 1. Antikörpers gerichtet und macht die Bindung über ein Enzymsystem sichtbar. Vorteil gegenüber einer direkten Visualisierung des 1. Antikörpers ist die Signalverstärkung durch einen Amplifikationseffekt.

Die Quantifizierung der Banden wird in der vorliegenden Studie mit Hilfe einer CCD-Kamera durchgeführt. Mit diesem System können Intensitätsunterschiede von > 5000 Graustufen exakt bestimmt werden und ist deswegen besser geeignet als die Dokumentation der Chemilumineszenz mit dem Röntgenfilm, der nur einen Messbereich von max. 20 bis 50 Graustufen aufweist.

Für ein repräsentatives Ergebnis wird die digitale Aufnahme der Proben und des Standards dreifach ausgewertet und gemessen. Das Endergebnis wird aus dem Mittelwert der drei Einzelergebnisse gebildet.

Die semi-quantitative Proteinanalyse dieses Versuches durch den Western-Blot wird in vergleichbaren Untersuchungen eingesetzt (KRAJEWSKI et al. 1995, HEATON et al. 1999).

Die Western-Blot-Analyse der vorliegenden Studie zeigt bei der Bestimmung der Apoptose-relevanten Proteine oft keine signifikanten oder nur Ergebnisse im Trend, obwohl bei der entsprechenden Immunfluoreszenzuntersuchung oft ein signifikantes Ergebnis messbar ist. Vermutlich ist dies auf die unterschiedliche Probengewinnung der Untersuchungsverfahren zurückzuführen. Während in der Immunfluoreszenz-Analyse einzelne Zellen des ischämieempfindlichen Hippocampus auf Apoptose-Proteine untersucht werden, beinhaltet das Probenmaterial für die Western-Blot-Untersuchung neben dem sensitiven Hippocampus auch weniger sensitives Gewebe aus dem hippocampalen Randbereich.

Im Vergleich zu den sensitiven Regionen des Hippocampus, die eine starke Reaktion der Apoptose-regulierenden Proteine hervorrufen, sind die präparierten Gehirnschnitte für die Western-Blot-Analyse gegenüber einem ischämischen Schaden weniger empfindlich.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Operativer Teil

4.2.1.1 Physiologische Messparameter

Eine Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) auf 40 mmHg ist protokollgemäß bei den operierten Versuchsgruppen (Kontrolle, Sevofluran) zu einem definierten Zeitpunkt eingeleitet worden. Nach Beendigung der Ischämie erreicht der MAP-Wert wieder den physiologischen Normbereich.

Prinzipiell ist der MAP bei den mit Sevofluran anästhesierten Tieren im unteren physiologischen Bereich anzusiedeln. Zu erklären ist dies mit der vasodilatatorischen Wirkung des Sevofluran (BERNARD et al. 1990) und einem Blutdruckabfall durch Schwächen der Herzmuskelkontraktilität, der nach Dosiserhöhung auftritt (BERNARD et al. 1990, MALAN et al. 1994, HARKIN et al. 1994).

Das signifikante Absinken des Hämoglobinwertes während der Ischämie liegt, wie schon bei dem Abfall des MAP, an dem massiven Blutentzug während der Ischämie. Durch den temporären Blutmangel lässt sich zum einen weniger gebundenes Hämoglobin pro Volumeneinheit feststellen, zum anderen wird aufgrund der Volumenmangelsituation vermutlich Flüssigkeit aus dem Interstitium (3. Raum) mobilisiert. Die vasodilatatorische Wirkung des Sevofluran und eine gleichzeitige Erhöhung des MAP bedingt durch die Narkose mit Fentanyl/N₂O könnte den niedrigeren Wert der Behandlungsgruppe verglichen zur Kontrollgruppe erklären.

Die Versuchstiere sind, um einer Acidose vorzubeugen, vor dem Versuch 12 Stunden nüchtern und damit niedrig normoglycäm. Eine Lactatacidose kann laut HOFFMAN et al. (1990) den neurologischen Schaden beeinflussen und somit das vermeintliche Ergebnis des getesteten Medikaments verfälschen. Hyperglykämische Tiere weisen zwar unmittelbar in der Ischämie einen besseren Energiestatus auf, entwickeln aber im Langzeitergebnis einen größeren neuronalen Schaden durch die Lactatacidose. Ein hypoxischer Zustand kann sich unter ischämischen Bedingungen und einer gleichzeitig erhöhten Glucosekonzentration im Blut noch verstärken (SIESJÖ 1992, SIESJÖ und SIESJÖ 1996).

Die teilweise signifikanten Erhöhungen der Glucosewerte sind auf die bereits bekannte vorübergehende diabetogene Wirkung des Sevofluran zurückzuführen. Laut Herstellerangaben (ABBOTT GmbH, Wiesbaden, Fachinformation für SEVOrane®) kann als Nebenwirkung bei Einsatz des Sevofluran eine temporäre Erhöhung des Blutglucosespiegels

DISKUSSION

beobachtet werden. Auch HIKASA et al. (1996) können unter Sevoflurannarkose bei Katzen eine Hyperglykämie messen.

Der erniedrigte Glucosewert in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Ischämie kann ebenfalls aus einem Verdünnungseffekt des Blutes rühren. Wie schon beim Hämoglobinwert beschrieben, wird vermutlich wegen der Volumenmangelsituation, dem osmotischen Weg folgend, Flüssigkeit aus dem Interstitium mobilisiert. Die geringgradigen Schwankungen bei den hier erhobenen Glucosewerten dürften das Gesamtergebnis zur Neuroprotektion von Sevofluran nicht beeinflussen. WERNER et al. (1995) können eine Neuroprotektion durch Sevofluran mit normoglycämischen Tieren auch nach intranschämischer Glucoseerhöhung feststellen.

Der paO_2 (mmHg) der Kontrollgruppen weist den unter O_2/N_2O -Beatmung üblichen Normbereich auf und lässt sowohl intraoperativ innerhalb der Untersuchungsgruppe als auch im Vergleich zu der anderen Versuchsgruppe keine signifikanten Veränderungen erkennen.

Der Kohlendioxidpartialdruck $paCO_2$ (mmHg) liegt durchgehend im physiologischen Bereich und zeigt ebenfalls weder eine signifikante Veränderung zwischen den Versuchsgruppen, noch innerhalb des Operationsablaufs.

Der pH-Wert wird, in Anlehnung an vergleichbare Ischämie Modelle (WERNER et al. 1990, WERNER et al. 1995), während der Operation konstant gehalten und bei Bedarf abgepuffert.

Nagetiere weisen unter Narkose eine gestörte Thermoregulation auf und kühlen sehr schnell aus (PADDLEFORD und ERHARDT 1992). Da auch Sevofluran zusätzlich die Körpertemperaturregulierung hemmt (EGER 1994), ist eine Kontrolle der peripheren und pericraniellen Körpertemperatur notwendig.

Deswegen wird zu definierten Messzeitpunkten sowohl die rektale als auch die pericranielle Körpertemperatur überwacht und mit einer rückgekoppelten Wärmelampe reguliert. Insbesondere die Kontrolle der Gehirntemperatur ist wichtig, um einen neuroprotektiven Einfluss einer Hypothermie auf das Gehirn auszuschließen (BUSTO et al. 1989). Die Temperaturwerte sind zu jedem Messzeitpunkt im physiologischen Bereich.

4.2.1.2 Gehirndurchblutung

Die cerebrale Durchblutung wird mit der Laser-Doppler-Flussmessung erfasst. Die Reflektion des Lichts durch bewegte Erythrozyten wird über Detektoren gemessen und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Das im eigenen Versuch verwendete System (Periflux 4001 Master, Fa. Perimed, Järfälla, Schweden) hat den Vorteil, dass kein direkter Kontakt zum Gewebe nötig ist. Die Glasfaseroptiksonde hat eine Eindringtiefe von 1 mm und ermöglicht so eine Messung ohne vollständige Eröffnung des Schädelknochens.

Während der Ischämie kommt es sowohl in den Kontrollgruppen als auch in den Sevoflurangruppen zu einem drastischen Abfall der cerebralen Durchblutung. Zurückzuführen ist dies auf die protokollgemäße Senkung des MAP auf 40 mmHg durch den iatrogenen Blutentzug aus der V. femoralis.

Die Durchblutungsrate des Gehirns ist bei einem MAP von unter 60 mmHg direkt linear an den mittleren arteriellen Blutdruck gekoppelt. Durch den zusätzlichen Verschluss der rechten A. carotis communis kommt es in der rechten Gehirnhälfte zu einer Reduktion der Hirndurchblutung auf 40 %. Die Durchblutung der linken Gehirnhälfte sinkt auf ca. 70 %. Trotz eines tendenziell geringeren Absinken des Blutflusses in der rechten Hemisphäre der Sevoflurangruppe verglichen zur Kontrollgruppe, kann zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Gruppenunterschied erhoben werden.

4.2.2 Analytischer Teil

4.2.2.1 Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse

Die Entdeckung der Aktivierung Apoptose-regulierender Gene im ischämischen Gehirn liefert einen wichtigen Beweis für die Beteiligung apoptotischer Prozesse bei ischämischen neuronalen Zelltod (KRAJEWSKI et al. 1995, CHEN et al. 1996). Diese Gene synthetisieren entsprechende Proteine welche als Apoptosefaktoren eine wichtige Rolle spielen. Zur Untersuchung eventueller neuroprotektiver Einflüsse von Sevofluran während einer cerebralen Ischämie sind die Expressionsmuster der Apoptosefaktoren Bax, Bcl-2, p53 und Mdm-2 ausgewählt worden, da deren Einfluss bei cerebralen Ischämien bereits seit längerem bekannt sind (CHOPP und LI 1996, CHOI 1996, CHARRIAUT-MARLANGUE et al. 1998, LI et al. 1998). Ob nach einem ischämischen Insult Apoptose oder Nekrose entsteht, hängt von der Schwere und der Zeitdauer ab. Ein sekundärer Hirnschaden tritt nicht unmittelbar nach dem Insult auf, sondern entwickelt sich nach Stunden oder Tagen (SIESJÖ und SIESJÖ 1996). Laut TOMASEVIC et. al. (1999) treten im Hippocampus, dessen Zellen selektiv vulnerabel sind, bis zu drei Tage nach einer transienten globalen Ischämie noch apoptotische Prozesse auf. Nicht oder nur unzureichend bekannt sind jedoch die Auswirkungen, die nach Wochen oder sogar Monaten auftreten. Deswegen ist in der Studie ein Zeitraum von 28 Tagen ausgewählt worden, um Aussagen über die Expressionsmuster der Apoptosefaktoren in einem zeitlichen Verlauf von mehreren Wochen treffen zu können.

Die vorliegende Studie zeigt, dass bis zu einem Zeitraum von 28 Tagen und vielleicht noch darüber hinaus nach einer inkompletten, cerebralen Hemisphärenischämie die Expressionsmuster der Apoptose-regulierenden Proteine Bax, Bcl-2, p53 und Mdm-2 beeinflusst werden können.

Bei der Untersuchungsgruppe Sevofluran kann das pro-apoptotische Protein Bax über die Immunfluoreszenztechnik während des gesamten Beobachtungszeitraumes und in beiden Hemisphärenhälften im Vergleich zur Kontrollgruppe als signifikant erniedrigt gemessen werden.

Für die Kontrollgruppe wird eine Hintergrundanästhesie mit Fentanyl/ Lachgas gewählt, da unter dieser Narkose der cerebrale und spinale Blutfluss mit dessen Autoregulation wacher Tiere simuliert werden kann (HOFFMANN et al. 1992b). Da der cerebrale Sauerstoffverbrauch unter Fentanyl/ Lachgas nicht reduziert ist (CARLSON et al. 1982), können hinsichtlich der Durchblutung und des Metabolismus des Gehirns Bedingungen

geschafft werden, die dem Wachzustand sehr ähnlich sind aber trotzdem eine ausreichende Analgesie gewährleisten.

Bei den Kontrolltieren (Fentanyl/Lachgas-Narkose), wird der ischämische Insult ungeschützt, also ohne das vermeintliche Neuroprotektivum Sevofluran, artifiziell hervorgerufen und zeigt demzufolge eine erhöhte Bax-Expression. In der Western-Blot-Analyse sind keine signifikanten Unterschiede für das Protein Bax messbar.

Für das anti-apoptotische Protein Bcl-2 können sowohl durch Immunfluoreszenztechnik als auch durch Western-Blot-Analyse in beiden Hemisphären signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Die signifikante Erhöhung der Bcl-2-Konzentration kann durch die Immunfluoreszenzfärbung in der Versuchsgruppe Sevofluran im Vergleich zur Kontrollgruppe jeweils am 1. und 3. Untersuchungstag festgestellt werden. Auch im Western-Blot-Verfahren ist auf der ischämischen Seite am 1., 7. und 28. Untersuchungstag und auf der nicht-ischämischen am 1., 3. und 28. Untersuchungstag ein signifikanter Einfluss des anti-apoptotischen Proteins in der Sevoflurangruppe verglichen zur Kontrollgruppe messbar. Eine Wirkung des anti-apoptotischen Bcl-2 als Antagonist des Bax-Protein (OLTVAI et al. 1993) kann demnach ebenso wie das Bax-Protein über den Zeitraum von 4 Wochen nachgewiesen werden.

Für die Expression des Proteins p53 kann am 3. Untersuchungstag in der Versuchsgruppe Sevofluran eine signifikante Erhöhung des Proteins auf der ischämischen Seite analysiert werden. Zu den weiteren Messzeitpunkten ist mit keinem der verwendeten Untersuchungsverfahren ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu erheben. Eine Interpretation dieses Ergebnisses findet in Kapitel 4.2.2.4 statt.

Die Konzentration des anti-apoptotischen Proteins Mdm-2 ist durch Analytik über Immunfluoreszenz in beiden Gehirnhälften am 1. und 3. Untersuchungstag in der Sevoflurangruppe signifikant erhöht, am 7. Tag ist nur in der nicht-ischämischen Seite der Sevoflurangruppe eine signifikante Vermehrung des Proteins verglichen zur Kontrollgruppe zu finden. Dies bekräftigt die Annahme, dass auch für die Mdm-2-Expression ein Beobachtungszeitraum von mehreren Wochen anzusetzen ist. Die Western-Blot-Analyse ergibt für Mdm-2 keine signifikanten Ergebnisse.

Die hier erhobenen Daten weisen auf einen neuroprotektiven Effekt des volatilen Anästhetikums Sevofluran über einen Beobachtungszeitraum von 4 Wochen hin.

Zur Demonstration der cerebroprotektiven Eigenschaften von Sevofluran ist die quantitative Messung der Apoptose-regulierenden Proteine, deren Einfluss bei einer Ischämie bereits

mehrfach beschrieben wurde (CHOPP und LI 1996, CHOI 1996, CHARRIAUT-MARLANGUE et al. 1998, LI et al. 1998), besonders geeignet.

Für die Bestimmung der Apoptose-regulierenden Proteine wird für diese Studie der Hippocampus des Rattenhirns als repräsentative und bereits intensiv untersuchte Region gewählt. Die Regionen des Hippocampus sind gegenüber einer Ischämie besonders empfindlich. Durch den intraoperativen Gefäßverschluss mit zeitgleicher Hypotension ist der Hippocampus bei einer Minderperfusion besonders anfällig.

Bei der Untersuchung der exprimierten Apoptose-assoziierten Proteine in dieser Studie handelt es sich um einen Teilprozess der Apoptosemechanismen. In weiteren morphologischen und biochemischen Verfahren könnte die Verzögerung bzw. Verhinderung der Apoptose nachgewiesen werden. Eine morphologische Analyse durch H&E-Färbung kann die vorhandenen Ergebnisse bestätigen. Weitere Analyseverfahren, wie z.B. die TUNEL-Färbung (CHARRIAUT-MARLANGUE und BEN-ARI 1995, CHEN et al. 1997b) und die Bestimmung der aktivierten Caspase-3 (ELDADAH und FADEN 2000, XU et al. 1999), könnten die vorhandenen Ergebnisse bestätigen.

4.2.2.2 Bax-Protein

Das Protein Bax, ein potentes pro-apoptotisches Molekül aus der Bcl-2-Familie, beschleunigt die Zelltodrate (KRAJEWSKI et al. 1994). Die vorliegende Studie zeigt, dass im Zeitverlauf von vier Wochen nach einer cerebralen Ischämie die Expression von Bax durch Sevofluran im Vergleich zu einer Kontrollgruppe unterdrückt wird. Die erhöhte Bax-Expression in der Kontrollgruppe bestätigt, dass Versuchstiere unter Fentanyl/Lachgas-Narkose stärker einem ischämischen Schaden ausgesetzt sind als Tiere der Untersuchungsgruppe Sevofluran. Die Tiere der Kontrollgruppe sind offenbar nicht durch das potentielle Neuroprotektivum Sevofluran geschützt. Die ungeschützte Kontrollgruppe zeigt zu jedem Untersuchungszeitpunkt und in beiden Hemisphären eine signifikante Erhöhung des pro-apoptotischen Bax-Proteins im Vergleich zu der behandelten Sevoflurangruppe. Vergleichbare Ergebnisse finden sich auch in einer Studie von GILLARDON et al. (1996) wieder. Dort wird in ähnlichen Untersuchungen bei Ratten nach fokaler Ischämie eine signifikant erhöhte Bax-Expression nach sechs Stunden gemessen. Auch ANTONAWICH et al. (1998) untersuchen den hippocampalen Bax-Proteinspiegel und stellen signifikante Erhöhungen für eine Dauer von 72 Stunden fest. Der Bax-Spiegel bleibt in der eigenen Studie über den Untersuchungszeitraum von 28 Tagen hinweg in der Kontrollgruppe immer signifikant erhöht. Dies deckt sich mit der Untersuchung von KRAJEWSKI et al. 1995, in der ein früh erhöhter Bax-Spiegel in degenerierenden Neuronen nach einer transienten Ischämie über Tage hinweg erhöht bleibt.

Ein zeitlicher Verlauf der Bax-Expression wird bereits 1996 von HARA et al. gemessen. In dieser Studie wird in einem Zeitraum von sieben Tagen die Bax-Expression in der CA1-Region des Hippocampus bei Gerbils nach transienter Frontalhirnischämie untersucht. Anders als bei der vorliegenden Studie, bei der nach 28 Tagen eine signifikante Erhöhung von Bax gemessen werden kann, erfolgt in der Studie von HARA et al. (1996) das Expressionsmaximum für Bax nach 72 Stunden und in den nachfolgenden sieben Tagen ein Abstieg der Proteinkonzentration. Die Ursache hierfür liegt vermutlich am unterschiedlichen Ischämiemodell, an der Messung der Bax-Expression ausschließlich in der CA-1-Region und der nur 5 min andauernden Ischämiezeit. Auch CHEN et al. (1996) untersuchen das Auftreten von Bax mRNA und deren Genprodukten im zeitlichen Verlauf von 72 Stunden. Eine signifikante Erhöhung kann in der CA1-Region nach 8 Stunden und nachfolgend zu jedem weiteren Untersuchungszeitpunkt festgestellt werden. Spätere Untersuchungszeitpunkte werden nicht angesetzt. Allerdings kann eine andauernde Erhöhung von Bax nur in der CA1-Region des Hippocampus festgestellt werden. Andere Regionen wie die CA3-Region oder der Gyrus dentatus zeigen nur eine vorübergehende Erhöhung. In der eigenen Studie können innerhalb des Untersuchungszeitraumes keinerlei Intensitätsunterschiede des Bax-Proteins in den Regionen des Hippocampus gemessen werden. Die Erklärung liegt hier vermutlich in der Stärke und Dauer der Ischämie. Prinzipiell reagieren neuronale Zellen, auch innerhalb der Regionen des Hippocampus, unterschiedlich vulnerabel auf eine globale Ischämie (CHEN et al. 1996). In der vorliegenden Untersuchung wird mit einer Ischämiedauer von 45 min und gleichzeitiger Hypotension auf einen MAP von 40 mmHg ein vergleichsweise starker Reiz gesetzt, so dass die Ischämieresistenz überschritten wird und die unterschiedliche Sensitivität der einzelnen Regionen nicht mehr erkennbar ist. Die Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax zeigt in der Immunfluoreszenz-Färbung an allen Untersuchungstagen eine signifikant höhere Intensität. In der Western-Blot-Analyse kann keine signifikanten Beziehungen der einzelnen Untersuchungsgruppen festgestellt werden. Mögliche Ursachen sind der Methodenkritik in Kap.4.1.3 zu entnehmen.

4.2.2.3 p53-Protein

Das Tumorsuppressor-Protein p53 ist als Initiator der Apoptose bekannt (YONISH et al. 1991). Als Promotor des pro-apoptotischen Proteins Bax (MIYASHITA und REED 1995) war eine zeitweilige Erhöhung des Proteins p53 vor allem in der Kontrollgruppe über den Zeitraum von 28 Tagen zu erwarten.

LI et al. (1994) zeigen den zeitlichen Verlauf der Expression von p53 auf. Das p53 Protein wird in zwei Formen exprimiert, dem wild-type (wt-p53) und seiner mutierten Form (m-p53).

DISKUSSION

Das m-p53 kann nach Induktion des Schadens nach sechs Stunden schwach detektiert werden und zeigt nach zwölf Stunden ein Expressionsmaximum. Bei einer Untersuchung nach 168 Stunden ist es nicht mehr nachweisbar. Die wt-Form des p53 kann zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. MCGAHAN et al. (1998) messen eine Erhöhung des p53 in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus nach 24 Stunden und eine Erhöhung in der CA1-Region nach 48 Stunden.

In der selbst durchgeführten Studie kann nur mit der Immunfluoreszenzanalyse ein signifikantes Ergebnis festgestellt werden. Am 3. Untersuchungstag ist in der Sevoflurangruppe eine signifikant erhöhte p53-Expression in der ischämischen Gehirnhälfte messbar. Dieses Ergebnis kann durch die Western-Blot-Analyse nicht bestätigt werden. An den übrigen Untersuchungstagen ist im direkten Gruppenvergleich mit keiner der verwendeten Untersuchungsmethoden ein Unterschied feststellbar.

Das Protein p53 gehört zu den pro-apoptotischen Proteinen und wird vermehrt bei Apoptose exprimiert. Aus diesem Grund wäre in der eigenen Studie, passend zu der erhöhten Bax-Expression, auch eine vermehrte p53-Expression in der Kontrolltiergruppe zu vermuten gewesen. CHOPP et al. (1992) können einen erhöhten Spiegel von p53 zwölf Stunden nach inkompletter, cerebraler Ischämie (durch Verschluss der A. cerebri media) feststellen.

Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse der eigenen Studie fallen bei einzelnen Tieren am Tag 3 der Sevoflurangruppe Messwertausreißer auf, die ein scheinbar signifikantes Ergebnis bedingen. In der Sevoflurangruppe weisen zwei der untersuchten Tiere große Messwertabweichungen nach oben auf, verglichen mit den übrigen Werten dieser Gruppe. In der Kontrollgruppe sind Abweichungen von den sonst üblichen Werten nach unten aufgetreten. Diese Messwertausreißer könnten eventuell an dem in der eigenen Studie verwendeten polyklonalen Antikörper liegen. Dieser macht eine Bandenauswertung schwierig und fehleranfällig, kann aber aus Mangel an Alternativen nicht ersetzt werden.

HUGHES et al. (1996) untersuchen die Expression von p53 nach intracerebraler Applikation von Quinolinsäure bei Ratten. Nach deren intracerebralen Applikation kann die Erregung der NMDA-Rezeptoren mit Erhöhung der p53-Expression und konsekutiver Induktion von Bax beobachtet werden. Obwohl p53-mRNA zuvor nachgewiesen worden ist, reagiert nur einer der sechs verwendeten Antikörper. Die ausschließlich gegen die Wildform des p53 gerichteten Antikörper zeigen keine Reaktion und bestätigen das Vorliegen verschiedener Konformationszustände. Eine übermäßige Menge des m-p53 kann die Wildform des p53 inaktivieren. Dies könnte auch die insgesamt schwachen und nicht signifikanten Ergebnisse unserer Analytik erklären. Der eigene verwendete Antikörper stammt aus mit rekombinantem

wt-p53 hyperimmunisierten Mäusen. Laut Herstellerangaben reagiert der Antikörper sowohl mit der Wildform als auch mit m-p53. Ein verfälschtes Ergebnis durch die Blockade des wt-p53 durch m-p53 kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Andere Studien ergeben, dass das Protein p53 einen Komplex mit Hitzeschockproteinen eingehen kann (PINHASI-KIMHI et al. 1986). Inwieweit der verwendete Antikörper an den p53-Hitzeschockprotein-Komplex noch binden kann und für die Visualisierung vollständig detektiert werden kann, ist ungeklärt. Gleiches gilt auch für die Interaktion des p53 mit dem anti-apoptotischen Mdm-2. In dem bereits im Schrifttum beschriebenen Mdm-2-p53-Feedback-Loop bindet Mdm-2 an wt-p53 und formiert ebenfalls einen Komplex, der durch die selbst verwendeten Antikörper nicht nachweisbar ist.

Ein weiterer Erklärungsansatz für den fehlenden Gruppenunterschied wäre die schwache Spezifität des verwendeten, polyklonalen Antikörpers für das in dieser Studie verwendete Untersuchungsmaterial nichtmenschlichen Ursprungs. Laut Herstellerangaben detektiert der in der Immunfluoreszenzanalyse verwendete Antikörper vor allem wt-p53 und m-p53 menschlichen Ursprungs. Untersuchungsmaterial aus Ratten oder Mäusen können eventuell nur eine schwache Kreuzreaktion aufweisen. Um weitere Aussagen zur Expression von p53 machen zu können, sind zusätzliche Studien notwendig aber momentan noch nicht möglich, da spezifischere Antikörper bisher nicht erhältlich sind. Bei fehlendem Nachweis einer signifikanten Steigerung des Proteins p53 könnte zusätzlich das Vorhandensein von mRNA, der Vorstufe des p53, überprüft werden. Um zusätzliche Aussagen über die Expression des Proteins p53 im Gehirn nach cerebraler Ischämie im zeitlichen Verlauf machen zu können, kann in zukünftigen Untersuchungen nicht nur das Protein, sondern auch dessen Vorstufe die p53 mRNA Expression im Gehirn detektiert werden.

4.2.2.4 Bcl-2-Protein

Obwohl der genaue Mechanismus, der zum verzögerten Zelltod nach cerebraler Ischämie führt, unbekannt ist, zeigen neuere Studien, dass das Bcl-2-Gen in Neuronen induziert wird, die eine cerebrale Ischämie überleben (SHIMAZAKI et al. 1994, CHEN et al. 1995, GRAHAM et al. 2001).

Das Protein Bcl-2, welches durch das Bcl-2-Gen kodiert wird, ist ein Regulator des programmierten Zelltodes und der Apoptose (KRAJEWSKI et al. 1994). Die vermehrte Expression des Bcl-2-Protein kann Zellen vor Apoptose bewahren (HOCKENBERRY et al. 1990). Auch CHEN et al. (1995) können in einer Studie demonstrieren, dass das Bcl-2 Protein, welches den apoptotischen Zelltod in vielen In-vitro- und In-vivo-Systemen blockiert, im Gehirn der Ratte nach fokaler Ischämie exprimiert wird. Frühere Studien

DISKUSSION

beschreiben, dass eine Untersuchung der Bcl-2-Expression wenige Stunden nach dem ischämischen Schaden einen unveränderten oder verminderten Wert des Bcl-2 ergeben (KRAJEWSKI et al. 1994, KRAJEWSKI et al. 1995, CHARRIAUT-MARLANGUE et al. 1998). Eine Expression besteht zu diesem frühen Untersuchungszeitpunkt vermutlich noch nicht in nachweisbarer Menge. In der eigenen Studie, die spätere Untersuchungszeitpunkte einschließt, ergeben sich immunhistochemisch am 1. und 3. Untersuchungstag, durch Western-Blot-Analyse sogar bis zu 28 Tage postischämisch eine erhöhte Bcl-2-Expression in der Sevoflurangruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies wird auch in dem Übersichtartikel von KOISTINAHO und HÖKFELT (1997) beschrieben. Dort wird von einer „Down-regulation“ des Bcl-2 nach drei Stunden und einer anschließenden „Up-regulation“ nach 24 Stunden gesprochen. Das bestätigen auch Untersuchungen, wie die von CHEN et al. (1997a), die in ihrer Studie nach einer globalen Ischämie bei der Ratte eine signifikante Immunreaktivität von Bcl-2 bis zu 72 Stunden nach der Ischämie in der CA3-Region und dem Gyrus dentatus feststellen können. Folglich kann auch in der eigenen Studie durch den Nachweis einer erhöhten Bcl-2-Expression in der Behandlungsgruppe zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten von einem potenziellen Schutz des Gehirnes zumindest bis zu vier Wochen ausgegangen werden. Ein weiterer Beweis für die neuroprotektiven Eigenschaften der Bcl-2 auch über einen längeren Zeitraum erbrachten MARTINOU et al. (1994) mit transgenen Mäusen. Diese Tiere, deren besondere Eigenschaft die Überexpression des Bcl-2 ist, wiesen nach einer Ischämie kleinere Infarkte auf, als die Wildtier-Kontrolltiere. Eine Überexpression des anti-apoptotischen Bcl-2 reduzierte in der Zeitspanne von sieben Tagen nach einer MCA-Okklusion einen fokalen Gehirninfrakt um 42 % (MARTINOU et al. 1994). In einer ähnlichen Studie mit transgenen Mäusen, die einer transienten globalen Ischämie ausgesetzt werden, lässt sich nach 7 Tagen ebenfalls ein verminderter Schaden im Hippocampus finden (KITAGAWA et al. 1998). Allerdings müssen diese Ergebnisse und der direkte Vergleich mit der vorliegenden Studie kritisch gesehen werden, da die Überexpression des Bcl-2 schon vor der Ischämie bestand und das Gehirn bereits vorab durch das anti-apoptotische Protein geschützt ist.

In einer anderen Studie von HARA et al. (1996) finden sich die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt. Dort ist das Expressionsmuster des Bcl-2 über einen Zeitraum von 7 Tagen untersucht worden und war zu keinem Zeitpunkt nachweisbar. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen, die die Gesamtintensität der Hippocampusregionen und des Gyrus dentatus untersuchen, wird hierbei nur die CA1-Region des Hippocampus betrachtet. Der Proteinlevel des Bcl-2 ist jedoch laut KRAJEWSKI et al. (1995) in der CA1-Region des Hippocampus

wesentlich niedriger als in der CA3-Region, was möglicherweise die unterschiedlichen Ergebnisse erklärt.

Zwischen den Bcl-2-Konzentrationen der verschiedenen Gehirnhälften können keine Unterschiede festgestellt werden. Die Gründe für die geringfügigen Seitenunterschiede in der Western-Blot-Analyse sind in der bereits unter 4.1.4 diskutierten Methodenkritik zu finden. Das unterschiedliche Zeitfenster der Proteinexpression zwischen den Analyseverfahren Immunfluoreszenz und Western-Blot liegt vermutlich ebenso an der unter 4.1.4 diskutierten Methode. Zur Abklärung des tatsächlichen zeitlichen Expressionsmuster von Bcl-2 könnte man sensitivere Untersuchungen, wie z.B. der Nachweis der Bcl-2-mRNA, einsetzen.

4.2.2.5 Mdm-2-Protein

Das anti-apoptotische Protein Mdm-2 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des proapoptotischen p53. Nach einer Überexpression des Mdm-2 wird sowohl die Transkription als auch die Repressionsfunktion des p53 inhibiert (CHEN et al. 1995, MOMAND et al. 1992). TU et al. (1998) messen nach einer transienten cerebralen Ischämie mit MCA-Okklusion einen erhöhten Mdm-2-Spiegel.

Dieses Ergebnis wird auch in vorliegender Studie bestätigt. Die Expression des Mdm-2-Proteins zeigt in der Immunfluoreszenzfärbung in der rechten Gehirnhälfte am 1. und 3. Untersuchungstag und in der linken Gehirnhälfte am 1., 3. und 7. Tag eine signifikante Erhöhung in der Untersuchungsgruppe Sevofluran. Um eine Erklärung der Seitenunterschiede innerhalb des Gehirnes aufzudecken, können weitere Untersuchungen folgen. Ob ein zu großer nekrotischer Schaden in der rechten Gehirnhälfte gesetzt wurde, so dass der Weg der Apoptose nicht mehr eingeschlagen werden konnte oder lediglich eine verzögerte Mdm-Expression stattfindet, kann eine weitere histologische Untersuchung überprüfen. Die Western-Blot-Analyse ergibt zu keinem Untersuchungszeitpunkt und in keiner Versuchsgruppe signifikante Unterschiede. TU et al. (1998) untersuchen die Expression des Mdm-2-Proteins bei 90-minütiger Okklusion der A. cerebri media zu den Zeitpunkten 1, 8, 24 und 48 Stunden. Eine maximale Expression des Proteins wird nach 24 Stunden über die Immunhistochemie und Western-Blot-Analyse detektiert. Nach 48 Stunden nimmt die Expression wieder ab. Die Mdm-2-Expression ist im eigenen Versuch in der Immunfluoreszenzanalyse auch noch nach 7 Tagen in der linken und bis zu 3 Tage in der rechten Gehirnhälfte signifikant erhöht. Andere Studien zum Expressionsmuster des Mdm-2 bei cerebraler Ischämie über einen längeren Untersuchungszeitraum liegen bis dato noch nicht vor. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen aber, dass auch nach einem Zeitraum von 7 Tagen nach cerebraler Ischämie ein erhöhter Spiegel des Mdm-2 gemessen werden kann.

Das Protein Mdm-2 spielt also auch langfristig eine Rolle bei den apoptotischen Prozessen im Gehirn. Die Überexpression des Mdm-2 reduziert den als Folge der Ischämie bedingten neuronalen Zelluntergang.

Der Beweis einer neuronalen Apoptose nach globaler wie fokaler Ischämie ist von diversen Forschungseinrichtungen bestätigt worden (MACMANUS et al. 1995, CHARRIAULT-MARLANGUE et al. 1996, CHOPP und LI 1996).

Eine Expression der Apoptose-assoziierten Proteine wie Bax und p53 kommen im ischämischen Gehirn vor, somit kann das hochregulierte Mdm-2 als Hemmvorrichtung auf den Mechanismus des neuronalen Zelltod wirken (TU et al. 1998). Eine signifikante Erhöhung des Proteins Mdm-2 bei den mit Sevofluran behandelten Tieren bestätigt in dem hier beschriebenen Versuch die mögliche neuroprotektive Wirkung dieses Anästhetikums auch über einen Zeitraum von 7 Tagen.

Das Muster der Expression weist auf eine Beeinflussung des Apoptose-assoziierten Mdm-2 in Richtung Neuroprotektion hin. Zur weiteren Abklärung des Expressionsverhaltens des Mdm-2-Proteins, besteht die Möglichkeit zusätzliche Untersuchungen folgen zu lassen.

Das Mdm-2- Protein wird von dem Mdm-2-Gen codiert. Anzuraten wäre deswegen eine zusätzliche Untersuchung des Mdm-2-Gens mit Northern-Blot-Analyse. Dadurch besteht die Möglichkeit der qualitativen und quantitativen Aussage einer zu erwartenden, nachfolgenden Mdm-2-Proteinexpression. Die Ursachen für die schwachen Ergebnisse in der Western-Blot-Analyse sind bereits im Punkt 4.1.4 diskutiert worden.

4.2.3 Der Einsatz von Sevofluran als mögliches Neuroprotektivum

Durch die Behandlung mit Sevofluran kann bei einer cerebralen Ischämie das Ausmaß des Schadens reduziert werden, was bereits WARNER et al. (1993) am Tiermodell untersuchten. Das Anästhetikum Sevofluran vermindert ähnlich wie Isofluran die elektroenzephalographische Aktivität, den cerebralen Sauerstoffverbrauch und die metabolische Aktivität (CONZEN und NUSCHELER 1996, LENZ et al. 1998).

Die mögliche neuroprotektive Potenz von Sevofluran, vor allem im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf, soll in der eigenen Studie am Tiermodell untersucht werden. Behandelte Tiere zeigten hier trotz Ischämie während des Beobachtungszeitraumes keine erhöhte Expression des pro-apoptotischen Bax-Proteins. Vielmehr sind die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Mdm-2 erhöht, demzufolge diejenigen Faktoren, die nachweislich einem verzögerten Zelltod entgegenwirken. Über den neuroprotektiven Wirkungsmechanismus des Sevofluran herrschen in der Literatur diverse Erklärungsansätze.

DISKUSSION

In einer *in vitro* Studie von MIYAZAKI et al. (1997) mit Astrocyten des Hippocampus ist unter Inkubation mit dem Anästhetikum Sevofluran eine vermehrte Glutamataufnahme aus dem Extrazellulärraum festzustellen. Eine dadurch verringerte Stimulation der NMDA-Rezeptoren kann einen ischämischen Hirnschaden reduzieren.

In einem fokalen Ischämiemodell mit Verschluss der A. cerebri media kann unter Sevofluran- und Halothannarkose ein vermindertes Infarktvolume und verbesserten neurologischen Funktionen beobachtet werden (WARNER et al. 1993). Sevofluran stimuliert die GABA-Rezeptoren (HIROTA und ROTH 1997) und erreicht durch die Hyperpolarisation der Zelle die Stabilisierung des Membranpotentials und somit eine größere Resistenz gegenüber exzitatorischen Impulsen. Diese Rezeptoren können vor allem in der CA-1 Region des ischämieempfindlichen Hippocampus vorgefunden werden. Eine durch Sevofluran bedingte Resistenz der Zellen liefert den Erklärungsansatz, warum der cerebrale Schaden weniger ausgeprägt sein kann.

WERNER und Mitarbeiter (1995) zeigen, dass das neurologische Endergebnis nach inkompletter cerebraler Ischämie bei Ratten unter Narkose mit Sevofluran signifikant besser ist als unter Narkose mit Fentanyl/Lachgas. In einer anderen Studie ist die Expressionsintensität des pro-apoptotischen Proteins Bax im Gehirn einer mit Sevofluran anästhesierten Ratte 4 Stunden post Ischämie um 50 % reduziert (ENGELHARD et al. 2001, EBERSPÄCHER et al. 2001). Das Tiermodell entspricht dem im vorliegenden Versuch verwendeten.

Während in früheren Untersuchungen die neuroprotektive Wirkung des Sevofluran in der Suppression des cerebralen Metabolismus oder einer Sympathikolyse vermutet wird (KOCHS et al. 1992, WERNER et al. 1995), untersucht die eigene Studie zusätzlich die Wirkung des Sevofluran durch dessen Eingriff in die Regulationsmechanismen der Apoptose.

Ein weiterer Erklärungsansatz zur neuroprotektiven Potenz des Sevofluran könnte in dessen Beeinflussung der Glutamatfreisetzung liegen. Obwohl einige Studien bereits andeuten, dass Anästhetika die exzitatorischen Neurotransmitterkonzentrationen und damit gleichzeitig den neuronalen Schaden verringern können (GRAHAM et al. 1993, MOE et al. 2002), stellen andere Studien den Einfluss der Neurotransmitter auf einen ischämischen neuronalen Schaden in Frage (ENGELHARD et al. 2002). Die exzitatorische Aminosäure Glutamat kann, wie schon von BAETHMANN et al. (1993) beschrieben, bei erhöhter Konzentration als Exzitotoxin wirken und zum Nervenzelluntergang führen. VINJE et al. (2002) beobachten einen Einfluss des Sevofluran auf die cerebrale Glutamatfreisetzung. Sevofluran reduziert in dieser Untersuchung linear zur Dosierung die Calcium-abhängige Glutamatfreisetzung.

ENGELHARD et al. (2003) sehen ebenfalls eine Reduzierung der Glutamatkonzentration unter Sevoflurannarkose nach inkompletter cerebraler Ischämie verglichen mit einer unbehandelten Kontrollgruppe.

Klinische Studien, die die neuroprotektive Potenz des Sevofluran untersuchen fehlen bis heute.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblicke

Der aus cerebralen Ischämien resultierende neuronale Schaden verlangt ein frühes therapeutisches Eingreifen. Neben den konservativen Therapiemöglichkeiten wie z.B. einer kontrollierten Hypothermie oder operativen Behandlungen, kann ein möglicher neuroprotektiver Effekt der Narkose den Therapieerfolg unterstützen.

Speziell für Sevofluran sind tierexperimentell bereits neuroprotektive Wirkungen durch Verbesserung des neurologischen Endergebnisses und Reduktion der Nekrose nachgewiesen worden. Der durch cerebrale Ischämie verursachte Energiemangel droht über verschiedene Stoffwechsellaskaden in einen neuronalen Zelltod in Form von Nekrose oder Apoptose überzugehen.

Ziel dieser Studie ist eine generelle Übersicht des protrahierten Expressionsmusters Apoptose-assoziiierter Proteine im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen unter Einfluss des potenziellen Neuroprotektivums Sevofluran zu liefern. Die erhobenen Daten bestätigen den Langzeiteffekt des Sevoflurans auf die Expression Apoptose-regulierender Proteine nach cerebraler Ischämie bei Ratten.

Zur weiteren Untersuchung des Verteilungsmusters von Bax und anderer Apoptosefaktoren im zeitlichen Verlauf sind weitere Studien mit geringerer Ischämiedauer und die Untersuchung weniger vulnerabler Regionen des Gehirnes möglich.

Allerdings sollten die vorliegenden Ergebnisse in Bezug auf eine klinische Übertragbarkeit vorsichtig beurteilt werden. In vorliegender Studie werden die Tiere bereits vor der Ischämie in der Äquilibrierungsphase mit Sevofluran beatmet, also bevor der ischämische Insult herbeigeführt wird. Rückschlüsse aus den Ergebnissen dieser Studie bezüglich einer eventuellen Übertragbarkeit in den klinischen Bereich sind daher kritisch zu sehen und eher im prophylaktischen Bereich anzusiedeln z.B. bei chirurgischen Eingriffen wie Carotisendartectomie oder Bypassoperationen anwendbar, bei denen das hohe Risiko einer cerebralen Ischämie besteht.

Angeborene Speziesunterschiede und die unterschiedlichen Reaktionen der einzelnen Rattenstämme auf Ischämie (LI et al. 1997), die im Gegensatz zum klinischen Patienten

DISKUSSION

vergleichsweise gute Gesundheit der jungen Versuchstiere und des künstlich hervorgerufenen Verlaufs einer cerebralen Ischämie lassen berechtigterweise eine Diskussion hinsichtlich der klinischen Übertragbarkeit aufkommen. Weitere Untersuchungen am Tiermodell, die den Einfluss von Sevofluran auf einen ischämischen Insult untersuchen, sollten daher durchgeführt werden. Von besonderem Interesse wäre hierbei die neuroprotektive Eignung des Sevofluran zur Schlaganfallbehandlung oder auch anderen unvorhergesehenen intraoperativen Ischämien, bei der die klinische Intervention erst während der Ischämie oder postischämisch erfolgen kann.

Dennoch liefert diese Studie wertvolle Hinweise zum Expressionsmuster Apoptose-regulierender Proteine im zeitlichen Verlauf einer cerebralen Ischämie unter Sevofluranbehandlung und ermöglicht vielleicht in Zukunft das therapeutische Fenster für cerebrale Ischämien zu erweitern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluss des Anästhetikums Sevofluran auf die Expression Apoptose-assoziiierter Proteine nach inkompletter Hemisphärenischämie bei der Ratte im protrahierten zeitlichen Verlauf

Die Studie untersucht den Einfluss des Anästhetikums Sevofluran auf die Expression der Apoptose-assoziierten Proteine Bax, Bcl-2, Mdm-2 und p53 nach inkompletter Hemisphärenischämie bei der Ratte in einem Zeitraum von 28 Tagen. Es werden 64 männliche Sprague-Dawley Ratten (375-455g) unter Halothan anästhesiert, intubiert und mit 2 Vol % Isofluran und N₂O/O₂ (FiO₂=0.33) beatmet. Zur arteriellen Blutdruckmessung, Blutentnahme und Medikamentenapplikation werden die rechte A. und V. femoralis sowie die rechte V. jugularis katheterisiert. Der cerebrale Blutfluss wird mit Laser-Doppler-Flussmessung durchgeführt. Nach Beendigung der Präparation wird die Anästhesie mit Isofluran beendet und die Tiere werden randomisiert folgenden Untersuchungsgruppen zugeteilt:

Gruppe 1 (n=32, Kontrolle), Anästhesie mit Fentanyl und N₂O/O₂ (FiO₂= 0.33)

Gruppe 2 (n=32, Sevofluran), Anästhesie mit Sevofluran 2 Vol % und O₂/Luft (FiO₂= 0.33)

Die Versuchstiere werden postischämisch den Beobachtungszeitpunkten 1, 3, 7 oder 28 Tagen (je n=8) zugewiesen. Durch hämorrhagische Hypotension (MAP auf 40 mmHg) und Verschluss der rechten A. carotis communis wird für 45 min eine inkomplette cerebrale Ischämie mit Reperfusion induziert. Die pericranielle Temperatur, die Blutgase und der pH-Wert werden konstant gehalten. Nach Ablauf des jeweiligen Beobachtungszeitraums werden die Tiere in Narkose getötet, das Gehirn entnommen, zur weiteren Analyse tiefgefroren und anschließend geschnitten (7µm) bzw. aufbereitet. Zusätzlich gehen 8 Nativtiere (unbehandelt) als physiologischer Referenzwert in die Analyseverfahren ein. Mit der Immunfluoreszenzfärbung werden die Apoptose-assoziierten Proteine Bax, Bcl-2, p53 und Mdm-2 mittels konfokalem Laser-Scan-Mikroskop und dem Computerprogramm KS 400 (Zeiss& Microsoft) qualitativ und semi-quantitativ erfasst. Die Western-Blot-Analyse liefert ebenfalls eine qualitative und semi-quantitative Proteinbestimmung.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression des pro-apoptotischen Bax-Proteins der Kontrolltiere verglichen mit den Tieren, die Sevofluran erhalten hatten bis zu 28 Tage in beiden Gehirnhälften signifikant erhöht war. Die Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 war ebenfalls bis zu 28 Tage nach der Ischämie bei den Kontrolltieren signifikant niedriger, verglichen mit der Versuchsgruppe Sevofluran. Die signifikante Erhöhung des p53 ist ausschließlich am 3. Untersuchungstag in der ischämischen Hemisphäre der Sevoflurangruppe verglichen zur Kontrollgruppe zu messen. Die Mdm-2-Expression der Kontrolltiere war verglichen mit der Sevoflurangruppe am 1. und 3. Untersuchungstag beidseits, in der linken Gehirnhälfte auch am 7. Untersuchungstag erniedrigt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen darauf schließen, dass nach einer cerebralen Ischämie das Anästhetikum Sevofluran die Hochregulierung des Proteins Bax auch über einen Zeitraum bis zu 4 Wochen inhibiert und gleichzeitig die Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 und Mdm-2 unterstützen kann. Die vorliegenden Daten lassen die Vermutung zu, dass eine durch Sevofluran bedingte Neuroprotektion auch noch 28 Tage nach dem ischämischen Insult anti-nekrotische und anti-apoptotische Wirkungsmechanismen zu Grunde liegen können.

6 SUMMARY

Long-Term Effects of Sevoflurane on Expression of Apoptosis-Regulating Proteins after Cerebral Ischemia in Rats

This study investigates the effect of the anesthetic gas Sevoflurane on the expression of the apoptosis-regulating proteins Bax, Bcl-2, Mdm-2 and p53 following incomplete cerebral ischemia in rats within a period of 28 days from the insult. 64 fasted male Sprague-Dawley rats (375-455g) were anesthetized with halothan, intubated and ventilated with isoflurane and N₂O/ O₂ (FiO₂=0.33). Catheters were inserted into the right femoral artery and vein and into the right jugular vein. Cerebral blood flow was measured using laser-Doppler flowmetry. At the end of preparation administration of isoflurane was terminated and animals were randomly assigned to one of the following groups:

Group 1 (n=32, controls): fentanyl and N₂O/O₂ (FiO₂=0.33)

Group 2 (n=32, sevoflurane) : sevoflurane (2 Vol %) and O₂/air (FiO₂=0.33)

Animals were then randomly assigned in groups (n=8) with postischemic observation period of 1, 3, 7 or 28 days. Ischemia (45min) was produced by unilateral carotid artery occlusion plus hemorrhagic hypotension to a mean arterial blood pressure of 40 mmHg. Pericranial temperature, arterial blood gases and pH were maintained constantly.

After the observation-period of 1, 3, 7 or 28 days the brains were removed, frozen at -70°C and cut into 7µm slices or prepared for Western blot analysis. The immunofluorescence technique was used to stain the apoptosis-regulating proteins Bax, Bcl-2, p53 and Mdm-2 in the brain slices. The protein concentration in the hippocampal regions were assessed and quantified using a confocal laserscan microscope. These proteins were also qualitatively and quantitatively analysed using Western Blot. The present study shows an increased concentration of pro-apoptotic Bax in the hippocampus for at least 28 days after cerebral ischemia. The anti-apoptotic Bcl-2 protein was also suppressed during the observation period of 28 days after ischemia in group 1 compared to group 2. The p53 protein expression of group 2 was increased in the ischemic brain site on day three. The Mdm-2 protein of group 1 was suppressed during the first three days in the ischemic and during the first seven days in the non-ischemic brain site compared to group 2.

The present data show that after cerebral ischemia sevoflurane inhibits the up-regulation of the pro-apoptotic protein Bax and supports the expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Mdm-2 over the entire observation period. The present data suggest that neuroprotection seen under sevoflurane application seems to involve anti-apoptotic and anti-necrotic mechanisms for at least 28 days after the insult.

7 LITERATURVERZEICHNIS

AKAZAWA S, SHIMIZU R, KASUDA H, NEMOTO K, YOSHIZAWA Y, INOUE S
Effects of sevoflurane on cardiovascular dynamics, coronary circulation and myocardial metabolism in dogs

J Anesth 1988; 2: 227-241

ALLSOPP TE, WYATT S, PATERSON HF, DAVIES AM

The protooncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis

Cell 1993; 73: 295-307

ANDREWS JR, MUTO RP

Retraction brain ischemia: Cerebral blood flow, evoked potentials, hypotension and hyperventilation in a new animal model

Neurol Res 1992; 14: 12-18

ANTONAWICH FJ, KRAJEWSKI S, REED J, DAVIES JN

Bcl-x₁/ bax interaction after transient global ischemia

J Cereb Blood Flow Metab 1998; 18: 882-886

ARTU AA, MERRIMAN HG

Hypocapnia added to hypertension to reverse EEG changes during carotid endarterectomy

Anesthesiology 1989; 70: 1016-1018

BAETHMANN A

Possibilities of cerebral monitoring

Infusionsther Transfusionsmed 1993; 20: 260-266

BAUGHMAN VL, HOFFMAN WE, THOMAS C, ALBRECHT RF, MILETICH DJ

The interaction of nitrous oxide and isoflurane with incomplete cerebral ischemia in the rat

Anesthesiology 1989; 70: 767-774

BECK T, BIELENBERG GW

The effects of two 21-aminosteroids on overt infarct size 48 hours after middle cerebral artery occlusion in the rat

Brain Res 1991; 560: 159-162

BERNARD JM, WOUTERS PF, DOURSOUT MF, FLORENCE B, CHELLY JE, MERIN RG

Effects of sevoflurane and isoflurane on cardiac and coronary dynamics in chronically instrumented dogs

Anesthesiology 1990; 72: 659-662

BITO H, IKEDA K

The effects of inflow rate on breakdown products with soda lime in sevoflurane anesthesia

Anesthesiology 1992; 77: A452

LITERATURVERZEICHNIS

BONNEKOH P, BARBIER A, OSCHLIES U, HOSSMANN KA

Selective vulnerability in the gerbil hippocampus: morphological changes after 5-min ischemia and long survival time

Acta Neuropathol (Berl) 1990; 80 (1): 18-25

BORIS-MÖLLER F, SMITH ML, SIESJÖ BK

Effects of hypothermia on ischemic brain damage: a comparison between preischemic and postischemic cooling

Neurosci Res Comm 1989; 5: 87-94

BRADFORD MM

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding

Analyt biochem 1976; 72: 248-254

BROWN BR, FRINK EJ

Whatever happened to sevoflurane?

Can J Anaesth 1992; 39: 207-209

BUCHAN AM, XUE D, HUANG ZG, SMITH KH, LESIUK H

Delayed AMPA receptor blockade reduces cerebral infarction induced by focal ischemia

Neuroreport 1991; 2: 473-476

BUSTO R, DIETRICH WD, GLOBUS MYT, GINSBERG MD

Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic injury

Neurosci Lett 1989; 101: 299-304

BUSTO R, GINSBERG MD

Graded focal cerebral ischemia in the rat unilateral carotid artery occlusion and elevated intracranial pressure: Hemodynamic and biochemical characterization

Stroke 1985; 16: 466-476

CAHILLY-SNYDER L, YNAG-FENG T, FRANCKE U, GEORGE DL

Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line

Somat Cell Mol Genet 1987; 13: 235-244

CAO G, MINAMI M, PEI W, YAN C, CHEN D, O'HORO C, GRAHAM S, CHEN J

Intracellular bax translocation after transient cerebral ischemia: Implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death

J Cereb Blood Flow Metab 2001; 21: 321-333

CARLSSON C, SMITH DS, KEYHAH MM, ENGLEBACH I, HARP JR

The effects of high-dose fentanyl on cerebral circulation and metabolism in rats

Anesthesiology 1982; 57: 375-380

CHARRIAUT-MARLANGUE C, BEN-ARI Y

A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis

NeuroReport 1995; 7: 61-64

LITERATURVERZEICHNIS

CHARRIAUT-MARLANGUE C, MARGAILL I, REPRESA A, POPOVICI T, PLOTKINE M, BEN-ARI Y

Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis
J Cereb Blood Flow Metab 1996; 16: 186-194

CHARRIAUT-MARLANGUE C, REMOLLEAU S, AGGOUN-ZOUAOU D, BEN-ARI Y

Apoptosis and programmed cell death: a role in cerebral ischemia
Biomed Pharmacother 1998; 52: 264-269

CHEN CY, OLINER JD, ZHAN Q, FORNACE AJ, VOGELSTEIN B, KASTAN MB

Interactions between p53 and mdm-2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway
Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 2684-2688

CHEN J, GRAHAM SH, CHAN PH, LAN J, ZHOU RL, SIMON RP

Bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat
NeuroReport 1995; 6: 394-398

CHEN J, GRAHAM SH, NAKAYAMA M, ZHU RL, JIN K, STETLER RA, SIMON RP

Apoptosis repressor genes bcl-2 and bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia
J Cereb Blood Flow Metab 1997a; 17: 2-10

CHEN J, JIN K, CHEN M, PEI W, KAWAGUCHI K, GREENBERG DA, SIMON RP

Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: Implication for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death
J Neurochem 1997b; 69: 232-245

CHEN J, WU X, LIN J, LEVINE AJ

Mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein
Mol Cell Biol 1996; 16: 2445-2452

CHEN ST, HSU C, HOGAN EI, MARICQ H, BALENTINE JD

A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction
Stroke 1986; 17: 738-743

CHOI DW

Ischemia-induced neuronal death
Curr Opin Neurobiol 1996; 6: 667-672

CHOPP M, LI Y

Apoptosis in focal cerebral ischemia
Acta Neurochir 1996; 66: S21-26

CHOPP M, LI Y, ZHANG ZG, FREYTAG SO

P53 expression in brain after middle cerebral artery occlusion in the rat
Biochem Biophys Res Commun 1992; 182: 1201-1207

CHURCH J, ZEMAN S, LODGE D

The neuroprotective action of ketamine and MK-801 after transient cerebral ischemia in rats
Anesthesiology 1988; 69: 702-709

CONZEN P, HOBBAHN J

Sevofluran-Kompendium: Inhalationsanästhetikum
Wiss.Verl.-Abt. Abbott GmbH, Wiesbaden 1996

CONZEN P, NUSCHELER M

Neue Inhalationsanästhetika
Anaesthesist 1996; 45: 674-693

CONZEN P, VOLLMAR B, HABAZETTL H, FRINK EJ, PETER K, MESSMER K

Systemic and regional hemodynamics of isoflurane and sevoflurane in rats
Anesth Analg 1992; 74: 79-88

COOK TL, BEPPU W, HITT B, KOSEK J, MAZZE R

Renal effects and metabolism of sevoflurane in Fisher 344 rats: An in vitro comparison with methoxyflurane
Anesthesiology 1975; 43: 70-77

COX LS, LANE DP

Tumor suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage
Bio Essays 1995; 17: 501-508

CRAWFORD MW, CARMICHAEL FJ, ORREGO H, SALDIVIA V, LERMAN J

Systemic hemodynamics and organ blood flow during adenosine-induced hypotension: effects of halothane and sevoflurane anaesthesia
Can J Anaesth 1990; 37: S19 (abstract)

DAVIES AM

The Bcl-2 family of proteins, and the regulation of neuron survival
Trends Neurosci 1995; 18: 355-358

DIEMER NH, CHRISTENSEN T, FRANK L, BALCHEN T, VALENTE E, BERG M, BRUHN T, JOHANSEN FF, JORGENSEN MB

Cerebral ischemia and the AMPA receptor *In:*
Kempski O (Hrsg) 1993; Glutamate-transmitter and toxin. Zuckschwerdt, München Bern Wien, S. 95-105

DIRNAGL U, IADECOLA C, MOSKOWITZ MA

Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view
Trends Neurosci 1999; 22: 391-397

DOI M, IKEDA K

Airway irritation produced by volatile anaesthetics during brief inhalation: comparison of halothane, enflurane, isoflurane, and sevoflurane
Can J Anaesth 1993; 40: 122-126

DRAKE CG, JORY TA

Hypothermia in the treatment of critical head injury
Canad Med Ass J 1962; 87: 887-891

LITERATURVERZEICHNIS

DUDZIAK R, VETTERMANN J

Aufnahme, Verteilung und Metabolismus von Sevofluran

Anaesthesist 1996; 45: 1-9

EBERSPÄCHER E, WERNER C, ENGELHARD K, BACHL M, HUTZLER P

Sevoflurane influences Apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia in rats

Anesthesiology 2001; 95: A759

EGER ED, KOBLIN DD, BOWLAND T, IONESCU P, LASTER MJ, FANG Z, GONG D, SONNER J, WEISKOPF RB

Nephrotoxicity of sevoflurane versus desflurane anesthesia in volunteers

Anesth Analg 1997; 84: 160-168

EGER EI

New inhaled anesthetics

Anesthesiology 1994; 80: 906-922

EICHINGER A

Untersuchungen zur neuroprotektiven Wirkung des Antioxidans Vit E am Modell der fokalen zerebralen Ischämie bei Vitamin E-depletierten und -repletierten Ratten

Vet. Med. Diss, München , 1998

EKLÖF B, SIESJÖ BK

The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and energy state of the rat brain

Acta Physiol Scand 1972; 86: 155-165

ELDADAH BA, FADEN AI

Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury

J Neurotrauma 2000; 17: 811-829

ELLIS HM, HORVITZ HR

Genetic control of programmed cell death in the nematode *C.elegans*

Cell 1986; 44: 817-829

ENDRES M, KAPS M, MOSKOWITZ A

Apoptosis and cerebral ischemia

Nervenarzt 1998; 69(6): 459-464

ENGELHARD K, BACHL M, EBERSPÄCHER E, WERNER C, HILT E, HUTZLER P, KOCHS E

Sevoflurane und Propofol beeinflussen die Expression apoptoseregulierender Proteine nach zerebraler Ischämie der Ratte

Anästhesiol & Intensivmed 2001; 42: 456, A3-07.2

ENGELHARD K, WERNER C, KASPAR S, MÖLLENBERG O, BLOBNER M, BACHL M, KOCHS E

Effect of the α -agonist dexmedetomidine on cerebral neurotransmitter concentrations during cerebral ischemia in rats

Anesthesiology 2002; 96: 450-457

ENGELHARD K, WERNER C, HOFFMAN WE, MATTHES B, BLOBNER M, KOCHS E
The effect of sevoflurane and propofol on cerebral neurotransmitter-concentrations during cerebral ischemia in rats
Anesth Analg 2003; 97: 1155-1161

ERIKSSON H, HAASIO J, KORTTILA K
Recovery from sevoflurane and isoflurane anaesthesia after outpatient gynaecological laparoscopy
Acta Anaesthesiol Scand 1995; 39: 377-380

FRINK EJ
The hepatic effects of sevoflurane
Anesth Anal 1995; 81: S46-50

FRINK EJ, BROWN BR
Sevoflurane
Anaesthetic Pharm Rev 1994; 2: 61-70

FRINK EJ, GHANTOUS H; MALAN TP, MORGAN S, FERNANDO J, GANDOLFI AJ, BROWN BR
Plasma inorganic fluoride with sevoflurane anesthesia: correlation with indices of hepatic and renal function
Anesth Analg 1992a; 74: 231-235

FRINK EJ, MALAN TP, ISNER RJ, BROWN EA, MORGAN SE, BROWN BR
Renal concentrating function with prolonged sevoflurane or enflurane anesthesia in volunteers
Anesthesiology 1994; 80: 1019-1025

FRINK EJ, MALAN TP, MORGAN S, BROWN E, MALCOMSON M, BROWN BR
Quantification of the degradation products of sevoflurane in two CO₂ absorbents during low-flow anesthesia in surgical patients
Anesthesiology 1992b; 77: 1064-1069

FUJIBAYASHI T, SUGIURAY, YANAGIMOTO M, HARADA J, GOTO Y
Brain energy metabolism and blood flow during sevoflurane and halothane anaesthesia: effects of hypocapnia and blood pressure fluctuations
Acta Anaesthesiol Scand 1994; 38: 413-418

FUJISHIMA M, ISHITSUKA T, NAKATOMI Y, TAMAKI K, OMAE T
Changes in local cerebral blood flow following bilateral carotid occlusion in spontaneously hypertensive and normotensive rats
Stroke 1981; 12: 874-876

FUJITA Y, YAMASAKI T, TAKAORI M, SEKIOKA K
Sevoflurane anaesthesia for one-lung ventilation with PEEP to the dependent lung in sheep: effects on right ventricular function and oxygenation
Can J Anaesth 1993; 40: 1195-1200

GARCIA J,
Experimental ischemic stroke: a review
Stroke 1984; 15: 5-14

LITERATURVERZEICHNIS

- GARCIA I, MARTINOU I, TSUJIMOTO Y, MARTONOU JC
Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene
Science 1992; 258: 302-304
- GARCIA J, YOSHIDA Y, CHEN H, LI Y, ZHANG ZG, LIAN J, CHEN S, CHOPP M
Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat
Am J Pathol 1993; 142: 623-635
- GILLARDON F, LENZ C, WASCHKE KF, KRAJEWSKI S, REED JC, ZIMMERMANN M, KUSCHINSKY W
Altered expression of bcl-2, bcl-x, bax, and c-fos colocalizes with DNA fragmentation and ischemic cell damage following middle cerebral artery occlusion in rats
Mol Brain Res 1996; 40: 254-260
- GINSBERG MD, BUSTO R
Rodent models of cerebral ischemia
Stroke 1989; 20: 1627-1642
- GONSOWSKI CT, LASTER MJ, EGER EI, FERELL LD, KERSCHMANN RL
Toxicity of compound A in rats: Effect of a 3-hour administration
Anesthesiology 1994; 80: 556-573
- GOSLINGA H, EIJZENBACH V, HEUVELMANS JHA, VAN DER LAAN DE VRIES E, MELIS VMJ, BEZEMER PD
Custom-tailored hemodilution with albumin and crystalloids in acute ischemic stroke
Stroke 1992; 23: 181-188
- GRAHAM SH, CHEN J
Programmed Cell Death in Cerebral Ischemia
J Cereb Blood Flow Metab 2001; 21: 99-109
- GRAHAM SH, CHEN J, SHARP FR, SIMON RP
Limiting ischemic injury by inhibition of excitatory amino acid release
J Cereb Blood Flow Metab 1993; 13: 88-97
- GREEN WB, ECKERSON ML, DEPA R, BROWN BR
Covalent binding of oxidative metabolites to hepatic protein not detectable after exposure to sevoflurane or desflurane
Anesthesiology 1994; 81: A437
- GROTTA JC
Hypervolemic hemodilution treatment of acute stroke
Stroke 1990; 20: 317-323
- GRUBB RL, RAICHLE ME, EICHLING JO, TER-POGOSSIAN MM
The effects of changes in PaCO₂ on cerebral blood volume, blood flow, and vascular mean transit time
Stroke 1974; 5: 630-639

HAKIM A

The cerebral ischemic penumbra
Can J Neurol Sci 1987; 14: 557-559

HARA A, IWAI T, NIWA M, UEMATSU T, YOSHIMI N, TANAKA T, MORI H
Immunohistochemical detection of bax and bcl-2 proteins in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia
Brain Res 1996; 711: 249-253

HARA H, SUKAMOTO T, KOGURE K
Mechanism and pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage
Progr Neurobiol 1993; 40: 645-670

HARADA K, IWATA M, KONO N, KODA W, SHIMONISHI T, NAKANUMA Y
Distribution of apoptotic cells and expression of apoptosis-related proteins along the intrhepatic biliary tree in normal and non-biliary diseased liver
Histopathology 2000; 37: 347-354

HARKIN CP, PAGEL PS, KERSTEN JR, HETTRICK DA, WARLTIER DC
Direct negative inotropic and lusitropic effects of sevoflurane
Anesthesiology 1994; 81: 156-167

HAUPT Y, BARAK Y, OREN M
Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm-2
EMBOJ 1996; 15: 1596-1606

HEATON MB, MOORE DB, PAIVA M, GIBBS T, BERNARD O
Bcl-2 overexpression protects the neonatal cerebellum from ethanol neurotoxicity
Brain Res 1999; 817: 13-18

HEBEL R, STROMBERG MW
Anatomy of the Laboratory Rat
The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1976; S. 91-111, S.119- 144,

HEES H, SINOWATZ F
Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie
2. Auflage, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 1992, S.142-162, S. 302-321

HENGARTNER MO, HORVITZ HR
C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2
Cell 1994; 76: 665-676

HIKASA Y, KAWANABE H, TAKASE K, OGASAWARA S
Comparisons of sevoflurane, isoflurane, and halothane anesthesia in spontaneously breathing cats
Vet Surg 1996; 25: 234-243

LITERATURVERZEICHNIS

HINDS PW, FINLAY CA, FREY AB, LEVINE AJ

Immunological evidence for the association of p53 with a heat shock protein, hsc 70, in p53-plus-ras-transformed cell lines
Mol Cell Biol 1987; 7: 2863-2869

HIROTA K, ROTH SH

Sevoflurane modulates both GABA_A and GABA_B receptors in area CA1 of rat hippocampus
Br J Anaesth 1997; 78: 60-65

HITT BA, MAZZE RI, COUSINS MJ, EDMUNDS HN, BARR GA, TRUDELL JR

Metabolism of isoflurane in Fischer 344 rats and man
Anesthesiology 1974; 40: 62-67

HOCKENBERRY D, NUNEZ G, MILLIMAN C, SCHREIBER RD, KORSMEYER SJ

Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death
Nature 1990; 348: 334-336

HOFF JT

Cerebral protection
J Neurosurg 1986; 65: 579-591

HOFFMAN B, LIEBERMANN DA

Molecular controls of apoptosis: differentiation/growth arrest primary response genes, proto-oncogenes, and tumor suppressor genes as positive & negative modulators
Oncogene 1994; 9: 1807-1812

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

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

HOFFMAN WE, PELLIGRINO D, WERNER C, KOCHS E, ALBRECHT RF, SCHULTE AM ESCH J

Ketamine decreases plasma catecholamines and improves neurologic outcome from incomplete cerebral ischemia in rats
Anesthesiology 1992a; 76: 755-762

HOFFMAN WE, THOMAS C

Effects of graded hypothermia on outcome from brain ischemia
Neurol Res 1996; 18: 185-189

HOFFMANN WE, WERNER C, KOCHS E, SEGIL L, EDELMANN G, ALBRECHT RF

Cerebral and spinal cord blood flow in awake and Fenatnyl-N₂O anesthezid rats: evidence for preservation of blood flow autoregulation during anesthesia
J Neurosurg Anes 1992b; 4: 31-35

HOLADAY DA, SMITH FR

Clinical characteristics and biotransformation of sevoflurane in healthy human volunteers
Anesthesiology 1981; 54: 100-106

HOLZNER JH

Arbeitsbuch Pathologie

5. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 1989; S. 305-311

HOSSMANN K-A

Resuscitation potentials after prolonged global cerebral ischemia in cats

Crit Care Med 1988; 16: 964-971

HOSSMANN K-A, SCHMIDT-KASTNER R, OPHOFF BG

Recovery of integrative central nervous function after one hour global cerebro-circulatory arrest in normothermic cat

J Neurol Sci 1987; 77: 305-320

HUGHES PE, ALEXI T, YOSHIDA T, SCHREIBER SS, KNUSEL B

Excitotoxic lesion of rat brain with quinolinic acid induces expression of p53 messenger RNA and proteins and p53-inducible genes bax and gadd-45 in brain areas showing DNA fragmentation

Neuroscience 1996; 74: 1143-1160

ISHII K, KOBAYASHI T, KITAJIAMA T, OGATA H

Neuromuscular blockade with vecuronium and its reversal with edrophonium during total intravenous anaesthesia, neuroleptanalgesia and sevoflurane anaesthesia

Masui 1994; 43: 1196-1200

ITO U, SPATZ M, WALKER JT, KLATZO I

Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils

Acta Physiol Scand 1975; 32: 209-223

JONES RM, CONZEN P

Toxikologie und klinische Bedeutung der basen-katalysierten Degradation von Sevofluran zu Compound A

Anaesthesist 1996; 45: 10-13

JONES SN, ROE AE, DONEHOWER LA, BRADLEY A

Rescue of embryonic lethality in mdm-2-deficient mice by absence of p53

Nature 1995; 378: 206-208

KANE DJ, ORD T, ANTON R, BREDESEN DE

Expression of bcl-2 inhibits necrotic neural cell death

J Neurosci Res 1995; 40: 269-275

KANZLER S, GALLE PR

Apoptosis in the liver

Semin Cancer Biol 2000; 10: 173-184

KAPLAN RF, CARCIA M, HANNALLAH RS

Mivacurium-induced neuromuscular blockade during sevoflurane and halothane anaesthesia in children

Can J Anaesth 1995; 42: 16-20

KAZAMA T, IKEDA K

Comparison of MAC and the rate of rise of alveolar concentration of sevoflurane with halothane and isoflurane in the dog
Anesthesiology 1988a; 68: 435-437

KAZAMA T, IKEDA K

The comparative cardiovascular effects of sevoflurane with halothane and isoflurane
J Anesth 1988b; 2: 63-68

KEMPSKI OS

Neuroprotektion
Anaesthesist 1994; 43: 25-33

KEMPSKI O

Neuroprotektion *In:*
Neuroanästhesie, Jantzen J-P, Löffler W. (Hrsg.), Thieme Verlag, Stuttgart, 2000, S. 90-104

KENNA JG, JONES RM

The organ toxicity of inhaled anesthetics
Anesth Analg 1995; 81: S51-66

KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics
Br J Cancer 1972; 26: 239-257

KERSTEN JR, BRAYER AP, PAGEL PS, TESSMER JP, WARLTIER DC

Perfusion of ischemic myocardium during anesthesia with sevoflurane
Anesthesiology 1994; 81: 995-1004

KHARASCH ED

Biotransformation of sevoflurane
Anesth Analg 1995; 81: S27-38

KHARASCH ED, THUMMEL KE

Identification of cytochrome P450 2E1 as the predominant enzyme catalyzing human liver microsomal defluorination of sevoflurane, isoflurane, and methoxyflurane
Anesthesiology 1993; 79: 795-807

KITAGAWA K, MATSUMOTO M, TSUJIMOTO Y, OHTSUKI T, KUWABARA K, MATSUSHITA K, YANG G, TANABE H, MARTINOU JC, HORI M, YANAGIHARA T

Amelioration of hippocampal neuronal damage after global ischemia by neuronal overexpression of Bcl-2 in transgenic mice
Stroke 1998; 29: 2616-2621

KITAGUSHI K, OHSUMI H, KURO M, NAKAJIMA T, HAGASHI Y

Effects of sevoflurane on cerebral circulation and metabolism in patients with ischemic cerebrovascular disease
Anesthesiology 1993; 79: 704-709

LITERATURVERZEICHNIS

KNUDSON CM, TUNG KS, TOURTELLOTTE WG, BROWN GA, KORSMEYER SJ
Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death
Science 1995; 270: 96-99

KOCHI T, IZUMI Y, ISONO S, IDE T, MIZUGUCHI T
Breathing pattern and occlusion pressure waveform in humans anesthetized with halothane or sevoflurane
Anesth Analg 1991; 73: 327-332

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

KOISTINAHO J, HÖKFELT T
Altered gene expression in brain ischemia
NeuroReport 1997; 8: i-viii

KOWIT JD, MALONEY J
Protein cleavage boiling in sodium dodecyl sulfate prior to electrophoresis
Anal Biochem 1982; 123: 86-93

KRAJEWSKI S, KRAJEWSKA M, SHABAIK A, MIYASHITA T, WANG HG, REED JC
Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of bcl-2
Am J Pathol 1994; 145: 1323-1236

KRAJEWSKI S, MAI JK, KRAJEWSKA M, SIKORSKA M, MOSSAKOWSKI MJ, REED JC
Upregulation of Bax protein levels in neurons following cerebral ischemia
J Neurosci 1995; 15: 6364-6376

KRIER C, WIEDEMANN K, FLEISCHER F, JÜRS G, HOYER S
Keine Indikation zur Barbiturattherapie nach kompletter zerebraler Ischämie
Anästh Intensivther Notfallmed 1987; 22: 56-62

KROEMER G, PETIT P, ZAMZAMI N, VAYSSIERE JL, MIGNOTTE B
The biochemistry of programmed cell death
FASEB J 1995; 9: 1277-1287

KUBO K
Variability in heat- induced fragmentation of a protein in the presence of dodecyl sulfate: the role of an intramolecular sulfhydryl/disulfide exchange
J Biochem 1995; 118: 1112-1117

LAEMMLI UK
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature 1970; 227: 680-685

LARSEN R

Inhalationsanästhesie *In:*

Larsen R. (Hrsg.) 1999: Anästhesie. Urban & Schwarzenberg Verlag München, Wien, Baltimore, 6.Auflage, 20-60

LENNON SV, MARTIN SJ, COTTER TG

Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli
Cell Prolif 1991; 24: 203-214

LENZ C, REBEL A, ACKERN V K, KUSCHINSKY W, WASCHKE KF

Local cerebral blood flow, local cerebral glucose utilization, and flow-metabolism coupling during sevoflurane versus isoflurane anesthesia in rats
Anesthesiology 1998; 89: 1480-1488

LESIUK H, SUTHERLAND G, PEELING J, BUTLER K, SAUNDERS J

Effect of U74006F on forebrain ischemia in rats
Stroke 1991; 22: 896-901

LI Y, CHOPP M, ZHANG ZG;ZALOGA C

Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats
Stroke 1995; 26: 1252-1258

LI Y, CHOPP M, POWERS C

Granule cell apoptosis and protein expression in hippocampal dentate gyrus after forebrain ischemia in the rat
J Neurol Sci 1997; 150: 93-102

LI Y, CHOPP M, ZHANG ZG, ZALOGA C, NIEWENHUIS L, GAUTAM S

P53-immunoreactive protein and p53 mRNA expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats
Stroke 1994; 25: 849-856

LI Y, POWERS C, JIANG N, CHOPP M

Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat
J Neurol Sci 1998; 156: 119-132

LITHGOW T, DRIEL RV, BERTRAM JF, STRASSER A

The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmatic reticulum, and the outer mitochondrial membrane
Cell Growth Differ 1994; 5: 411-417

LJUNGGREN B, SCHUTZ H, SIESJÖ BK

Changes in energy state and acid-base parameters of the rat brain during complete compression ischemia
Brain Res 1974; 73: 277-289

LUNDEEN G, MANOHAR M, PARKS C

Systemic distribution of blood flow in swine while awake and during 1.0 and 1.5 MAC isoflurane anesthesia with or without 50 % nitrous oxide
Anesth Analg 1983; 62: 499-512

LITERATURVERZEICHNIS

MAC MANUS JP, HILL IE, PRESTON E, RASQUINHA I, WALKER T, BUCHAN AM
Differences in DNA fragmentation following transient cerebral or decapitation ischemia in rats

J Cereb Blood Flow Metab 1995; 15: 728-737

MAJNO G, JORIS I

Apoptosis, oncosis, and necrosis

Am J Pathol 1995; 146: 3-15

MALAN TP

Sevoflurane and renal function

Anesth Analg 1995; 81: S39-45

MALAN TP, DINARDO JA, FRINK EJ, ISNER RJ, BROWN EA

Cardiovascular effects of sevoflurane and isoflurane in volunteers

Anesthesiology 1994; 81: A131

MALAN TP, DINARDO JA, ISNER RJ, FRINK EJ, GOLDBERG M, FENSTER PE, BROWN EA, DEPA R, HAMMOND LC, MATA H

Cardiovascular effects of sevoflurane compared with those of isoflurane in volunteers

Anesthesiology 1995; 83: 918-928

MALAN TP, KADOTA Y, MATA H, FRINK EJ, BROWN BR

Renal function after sevoflurane or enflurane anesthesia in the Fischer 344 rat

Anesth Analg 1993; 77: 817-821

MALVIYA S, LERMAN J

The blood/gas solubilities of sevoflurane, isoflurane, halothane, and serum consistent concentrations in neonates and adults

Anesthesiology 1990; 72: 793-796

MANOHAR M

Regional brain blood flow and cerebral cortical O₂ consumption during sevoflurane anesthesia in healthy isocapnic swine

J Cardiovasc Pharmacol 1986; 8: 1268-1275

MANOHAR M, PARKS C

Porcine systemic and regional organ blood flow during 1.0 and 1.5 minimum alveolar concentrations of sevoflurane anaesthesia without and with 50 % nitrous oxide

J Pharmacol Exp Ther 1984; 231: 640-648

MARTINOU JC, DUBOIS-DAUPHIN M, STAPLE JK, RODRIGUEZ I, FRANKOWSKI H, MISSOTTEN M, ALBERTINI P, TALABOT D, CATSICAS S, PIETRA C, HUARTE J

Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia

Neuron 1994; 13: 1017-1030

MARTIS L, LYNCH S, NAPOLI MD, WOODS EF

Biotransformation of sevoflurane in dogs and rats

Anesth Analg 1981; 60: 186-191

LITERATURVERZEICHNIS

MATTA B, HEATH KJ, TIPPING K, SUMMORS AC

Direct cerebral vasodilatory effects of sevoflurane and isoflurane
Anesthesiology 1999; 91: 677-680

MCGAHAN, HAKIM AM, ROBERTSON GS

Hippocampal Myc and p53 expression following transient global ischemia
Mol Brain Res 1998; 56: 133-145

MESSICK JM, CASEMENT B, SHARBROUGH FW, MILDE LN, MICHENFELDER JD, SUNDT TM

Correlation of regional cerebral blood flow (rCBF) with EEG changes during isoflurane anesthesia for carotid endarterectomy: critical rCBF
Anesthesiology 1987; 66: 344-349

MIELCK F, STEPHAN H, WEYLAND A, SONNTAG H

Effects of one minimum alveolar anaesthetic concentration sevoflurane on cerebral metabolism, blood flow, and CO₂ reactivity in cardiac patients
Anesth Analg 1999; 89: 364-369

MILDE LN, MILDE JH, LANIER WL, MICHENFELDER JD

Comparison of the effects of isoflurane and thiopental on neurologic outcome and neuropathology after temporary focal cerebral ischemia in primates
Anesthesiology 1988; 69: 905-913

MITSUHATA H, SAITOH J, SHIMIZU R, TAKEUCHI H, HASOME N, HORIGUCHI Y

Sevoflurane and isoflurane protect against bronchospasm in dogs
Anesthesiology 1994; 81: 1230-1234

MIYASHITA T, KRAJEWSKI S, KRAJEWSKI M, WANG HG, LIN HK, LIEBERMANN DA, HOFFMAN B, REED JC

Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo
Oncogene 1994; 9: 1799-1805

MIYASHITA T, REED J

Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene
Cell 1995; 80: 293-299

MIYAZAKI H, NAKAMURA Y, ARAI T, KATAOKA K

Increase of glutamate uptake in astrocytes, a possible mechanism of action of volatile anesthetics
Anesthesiology 1997; 86: 1359-1366

MOE MC, BERG-JOHNSEN J, LARSEN GA, ROSTE GK, VINJE ML

Sevoflurane reduces synaptic glutamate release in human synaptosomes
J Neurosurg Anesthesiol 2002; 14: 180-186

MOLINARI GF, LAURENT JP

A classification of experimental models of brain ischemia
Stroke 1976; 7: 14-17

LITERATURVERZEICHNIS

MOMAND J, ZAMBETTI GP

Mdm-2: "Big Brother" of p53

J Cell Biochem 1997; 64: 343-352

MOMAND J, ZAMBETTI GP, OLSON C, GEORGE D, LEVINE AJ

The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation

Cell 1992; 69: 1237-1245

MORITA T, TSUKAGOSHI H, SUGAYA T, SAITO S, SATO H, FUJITA T

Inadequate antagonism of vecuronium-induced neuromuscular block by neostigmine during sevoflurane or isoflurane anesthesia

Anesth Analg 1995; 80: 1175-1180

MURDOCH J, HALL R

Brain protection: physiological and pharmacological considerations. Part 1: the physiology of brain injury

Can J Anaesth 1990; 37: 663-671

MUTOH T, NISHIMURA R, KIM H, MATSUNAGA S, KADOSAWA T, MOCHIZUKI M, SASAKI N

Rapid inhalation induction of anesthesia by halothane, enflurane, isoflurane and sevoflurane and their cardiopulmonary effects in dogs

J Vet Med Sci 1995; 57: 1007-1013

MUTOH T, NISHIMURA R, KIM H-J, MATSUNAGA S, SASAKI N

Cardiopulmonary effects of sevoflurane, compared with halothane, enflurane, and isoflurane in dogs

Am J Vet Res 1997; 58: 885-890

NAKAJIMA Y, MORIWAKI G, IKEDA K, FUJISE Y

The effects of Sevoflurane on recovery of brain energy metabolism after cerebral ischemia in the rat: A comparison with isoflurane and halothane

Anesth Analg 1997; 85: 593-599

NAKASHIMA K, TODD MM, WARNER DS

The relation between cerebral metabolic rate and ischemic depolarisation

Anesthesiology 1995; 82: 1199-1208

NEMOTO EM, KLEMENTAVIVIUS R, MELICK JA, YONAS H

Norepinephrine activation of basal cerebral metabolic rate for oxygen (CMRO₂) during hypothermia in rats

Anesth Analg 1996; 83: 1262-1267

NICKEL R, SCHUMMER A, SEIFERLE E

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Band 4, Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen

3. Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin, 1991, S. 74-199

LITERATURVERZEICHNIS

- NIWA H, HARA A, IWAI T, SASSA T, MORI H, UEMATSU T
Expression of bax and bcl-2 protein in the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia and its modification by phencyclidine
Neurol Res 1997; 19: 629-633
- OGATA J, FUJISHIMA M, MOROTOMI Y, OMAE T
Cerebral infarction following bilateral carotid artery ligation in normotensive and spontaneously hypertensive rats: A pathological study
Stroke 1976; 7: 54-60
- OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ
Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death
Cell 1993; 74: 609-619
- OYAMA T, MURAKAWA T, MATSUKI A
Endocrine evaluation of sevoflurane, a new inhalation anesthetic agent
Acta Anaesthesiol Belg 1989; 40: 269-274
- OZAKI M, SESSLER DI, SUZUKI H, OZAKI K, TSUNODA C, ATARASHI K
Nitrous oxide decreases the threshold for vasoconstriction less than sevoflurane or isoflurane
Anesth Analg 1995; 80: 1212-1216
- PADDLEFORD RR, ERHARDT W
Anästhesie bei Kleintieren
Schattauer Verlag, Stuttgart, 1992, S.375
- PADOSCH SA, VOGEL P, BÖTTIGER BW
Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie
Der Anaesthesist 2001; 50: 905-920
- PAXINOS G, WATSON C
The rat brain in stereotaxic coordinates
Academic Press; San Diego, 1998
- PINHASI-KIMHI O, MICHALOVITZ D, BEN-ZEEV A, OREN M
Specific interaction between the p53 cellular tumour antigen and major heat shock proteins
Nature 1986; 320: 182-184
- PULSINELLI WA, BRIERLEY JB
The temporal profile of ischemic neuronal damage in the four-vessel occlusion rat model
Stroke 1979: 492
- PULSINELLI WA, BRIERLEY JB, PLUM MD
Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia
Ann Neurol 1982; 11: 491-498
- REED JC
Bcl-2 and the regulation of programmed cell death
J Cell Biol 1994; 124: 1-6

LITERATURVERZEICHNIS

SAITOH Y, TOYOOKA H, AMAHA K

Recoveries of post-tetanic twitch and train-of-four responses after administration of vecuronium with different inhalation anaesthetics and neuroleptanaesthesia

Br J Anaesth 1993; 70: 402-404

SANO T, DRUMMOND JC, PATEL PM, GRAFE MR, WATSON JC, COLE DJ

A comparison of the cerebral protective effects of isoflurane and mild hypothermia in a model of incomplete forebrain ischemia in the rat

Anesthesiology 1992; 76: 221-228

SHELLER MS, NAKAKIMURA K, FLEISCHER JE, ZORNOW MH

Cerebral effects of sevoflurane in the dog: comparison with isoflurane and enflurane

Br J Anaesth 1990; 65: 388-392

SHELLER MS, SAIDMAN LJ, PARTRIDGE P

MAC of sevoflurane in humans and the New Zealand white rabbit

Can J Anaesth 1988a; 35: 153-156

SHELLER MS, TATEISHI A, DRUMMOND JC, ZORNOW MH

The effects of sevoflurane on cerebral blood flow, cerebral metabolic rate for oxygen, intracranial pressure, and the electroencephalogram are similar to those of isoflurane in the rabbit

Anesthesiology 1988b; 68: 548-551

SCHOLZ J

Sevofluran und Desfluran in der Tageschirurgie: Vergleich mit Isofluran

Der Anaesthesist 1994; 43: 19 (S1)

SCHOLZ J, BISCHOFF P, SZAFARCYK W, HEETEL S, SCHULTE AM ESCH J

Sevofluran im Vergleich zu Isofluran bei ambulanten Operationen. Ergebnisse einer multizentrischen Studie

Anaesthesist 1996; 45: S63-70

SCHULZ JB, WELLER M, MOSKOWITZ MA

Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases

Ann Neurol 1999; 45: 421-429

SHIMAZAKI K, ISHIDA A, KAWAI N

Increase in Bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil

Neurosci Res 1994; 20: 95-99

SHIRAISHI Y, IKEDA K

Uptake and biotransformation of sevoflurane in humans: A comparative study of sevoflurane with halothane, enflurane, and isoflurane

J Clin Anesth 1990; 2: 381-386

SIEMKOWICZ E, HANSEN AJ

Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo-, normo- and hyperglycemic rats

Acta Neurol Scand 1978; 58: 1-8

SIESJÖ BK

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

SIESJÖ BK, SIESJÖ P

Mechanism of secondary brain injury
Eur J Anaesthesiol 1996; 13: 247-268

SIMON RP, SWAN JH, GRIFFITH T, MELDRUM BS

Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain
Science 1984; 226: 850-852

SKEEHAN TM, SCHULER HG, RILEY JL

Comparison of the alteration of cardiac function by sevoflurane, isoflurane and halothane in the isolated working heart
J Cardiothorac Vasc Anesth 1995; 9: 706-712

SMITH I, DING Y, WHITE PF

Comparison of induction, maintenance, and recovery characteristics of Sevoflurane-N₂O and Propofol-Sevoflurane-N₂O with Propofol-Isoflurane-N₂O anesthesia
Anesth Analg 1992; 74: 253-259

SMITH M-L, AUER RN, SIESJÖ BK

The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia
Acta Neuropathol 1984; 64: 319-332

STEFFEY MA, BROSNAN RJ, STEFFEY EP

Assessment of halothane and sevoflurane anesthesia in spontaneously breathing rats
Am J Vet Res 2003; 64(4): 470-474

STELLER H

Mechanisms and gene of cellular suicide
Science 1995; 267: 1445-1449

SUTTON LN, MCLAUGHLIN AC, DANTE S, KOTAPKA M, SINWELL T, MILLS E

Cerebral venous oxygen content as a measure of brain energy metabolism with increased intracranial pressure and hyperventilation
J Neurosurg 1990; 73: 927-932

TAMURA A, GRAHAM DI, MC CULLOCH J, TEASDALE GM

Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion
J Cereb Blood Flow 1981; 1: 53-60

THOMPSON CB

Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease
Science 1995; 267: 1456-1462

LITERATURVERZEICHNIS

- TOMASEVIC G, KAMME F, STUBBERÖD P, WIELOCH M, WIELOCH T
The tumor suppressor p53 and its response gene p21^{WAF/Cip1} are not markers of neuronal death following transient global cerebral ischemia
Neuroscience 1999; 90: 781-792
- TU Y, HOU S-T, HUANG Z, ROBERTSON GS, MAC MANUS JP
Increased mdm-2 expression in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion
J Cereb Blood Flow Metab 1998; 18: 658-669
- VALINTHOUT LEH, DE WOLFF MH, VAN EGMOND J, BOOIJ LHDJ, ROBERTSON EN
The effect of isoflurane and sevoflurane on the potency and the recovery of neuromuscular blockade by vecuronium, pancuronium and atracurium
Anesthesiology 1994; 81: A 1113 (Abstract)
- VAN AKEN H, VAN HEMELRIJCK
Influence of anesthesia on cerebral blood flow on cerebral metabolism. An overview
Agressologie 1991; 32: 303-306
- VAN FURTH R, VAN ZWET TL
Immunocytochemical detection of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation in individual cells
J Immunol Methods. 1988; 108: 45-51
- VINJE ML, MOE MC, VALO ET, BERG-JOHNSEN J
The effect of sevoflurane on glutamate release and uptake in rat cerebrocortical presynaptic terminals
Acta Anaesthesiol Scand 2002; 46: 103-108
- WALKER WF JR, HOMBERGER DG
Anatomy & Dissection of the Rat
3. Edition, W.H. FREEMAN AND COMPANY, New York, 1997, S.54-56, S.79-91
- WALLIN RF, REGAN BM, NAPOLI MD, STERN IJ
Sevoflurane: a new inhalational anesthetic agent
Anesth Analg 1975; 54: 758-766
- WALTZ AG
Clinical relevance of models of cerebral ischemia
Stroke, 1979; 10:211-213
- WANG Y, SZEKELY L, OKAN I, KLEIN G, WIMAN KG
Wild-typ p53-triggered apoptosis is inhibited by bcl-2 in a v-myc-induced T-cell lymphoma line
Oncogene 1993; 8: 3427-3431
- WARNER DS, MC FARLANE C, TODD MM, LUDWIG P, MCALLISTER AM
Sevoflurane and Halothane reduce focal ischemic brain damage in the rat
Anesthesiology 1993; 79: 985-992

LITERATURVERZEICHNIS

WARNER DS, TAKAODA S, WU B, LUDWIG PS, PEARLSTEIN RD, BRINKHOUS AD, DEXTER F

Electroencephalographic burst suppression is not required to elicit maximal neuroprotection from pentobarbital in a rat model of focal cerebral ischemia

Anesthesiology 1996; 84: 1475-1484

WARNER DS, ZHOU J, RAMANI R, TODD MM

Reversible focal ischemia in the rat: effects of halothane, isoflurane, and methohexital anesthesia

J Cereb Blood Flow Metab. 1991; 11: 794-802

WATERS CM

Mechanisms of neuronal cell death

Molec Brain Res 1996; 28: 145-151

WATSON JC, DRUMMOND JC, PATEL PM, SANO T, AKRAWI W, SANG H

An assessment of the cerebral protective effects of etomidate in a model of incomplete forebrain ischemia in the rat

Neurosurgery 1992; 30: 540-544

WERNER C

Milde und moderate Hypothermie in der Anästhesie und Intensivmedizin - Neuroprotektive Ansätze *In:*

Refresher Course; Aktuelles Wissen für den Anästhesisten, 23.Edition, Deutsche Akademie für Anästhesiologische Fortbildung, Springer Verlag Hamburg, 1997, S.189-197

WERNER C

Neuroprotektion *In:*

Neuroanästhesie, Jantzen J-P, Löffler W. (Hrsg.), Thieme Verlag, Stuttgart, 2000, S. 121-142

WERNER C, HOFFMANN WE, THOMAS C, MILETICH DJ, ALBRECHT F

Ganglionic blockade improves neurologic outcome from incomplete ischemia in rats: Partial reversal by exogenous catecholamines

Anesthesiology 1990; 73: 923-929

WERNER C, MÖLLENBERG O, KOCHS E, SCHULTE AM ESCH J

Sevoflurane improves neurological outcome after incomplete cerebral ischemia in rats

Br J Anaesth 1995; 75: 756-760

WHITE BC, SULLIVAN JM, DE GRACIA DJ, O'NEILL BJ, NEUMAR RW, GROSSMAN LI, RAFOLS JA, KRAUSE GS

Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury

J Neurol Sci 2000; 179: 1-33

WIESNER G, WILD K, SCHWÜRZER S, MERZ M, HOBBAHN J

Serumfluoridkonzentrationen und exokrine Nierenfunktion bei Anwendung von Sevofluran und Enfluran

Anaesthesist 1996; 45: 31-36

LITERATURVERZEICHNIS

WONG DT, LERMAN J

Factors affecting the rate of disappearance of sevoflurane in baralyme
Can J Anaesth 1992; 39: 366-369

WU X, BAYLE JH, OLSON D, LEVINE AJ

The p53-Mdm-2 Autoregulatory Feedback Loop
Genes Dev 1993; 7: 1126-1132

XU D, BUREAU Y, MCINTYRE DC, NICHOLSON DW, LISTON P, ZHU Y, FONG WG, CROCKER SJ, KORNELUK RG, ROBERTSON GS

Attenuation of ischemia-induced cellular and behavioral deficits by chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein overexpression in the rat hippocampus
J Neurosci 1999; 19: 5026-5033

YAMORI Y, HORIE R, HANDA H, SATO M, FUKASE M

Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans
Stroke 1976; 7: 46-53

YASUDA N, LOCKHART STH, EGER EI II, WEISKOPF RB, LIU J, LASTER M, TAHERI SH, PETERSON NA

Comparison of kinetics of sevoflurane and isoflurane in humans
Anesth Analg 1991; 72: 316-324

YONISH R, RESNITZKY D, LOTEM J, SACHS L, KIMCHI A, OREN M

Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6
Nature 1991; 352: 345-347

YUAN JY, HORVITZ HR

The caenorhabditis elegans genes ced-3 and ced-4 act cell autonomously to cause programmed cell death
Dev Biol 1990; 138: 33-41

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
BE	Basenabweichung (engl. base excess)
BGA	Blutgasanalyse
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
CBF	cerebraler Blutfluss (engl. cerebral blood flow)
Cl	Chlorid
CLSM	konfokales Laser-Scan-Mikroskop (engl.confocal)
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CPP	cerebraler Perfusionsdruck
DAP	diastolischer Blutdruck
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
EEG	Elektroenzephalogramm
et al.	et alii (lat. und Mitarbeiter)
EKG	Elektrokardiogramm
Fa.	Firma
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GD	Gyrus dentatus
h	Stunde
Isch	Ischämie
i.v.	intravenös
ICP	intracranieller Druck
Isch	Ischämie
K ⁺	Kalium
kD	Kilodalton

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
LDF	Laser-Doppler-Flussmessung
li	links
MAC	minimal alveolar concentration (minimale alveoläre Konzentration)
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
M.	Musculus
n	Anzahl
N ₂ O	Lachgas
Na ⁺	Natrium
Neu-N-DAB	Einfachfärbung mit Diaminobenzodin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O ₂	Sauerstoff
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
paCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
paO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	gepuffertes Natriumphosphat (engl.phosphored buffered sodium)
PBST	gepuffertes Natriumphosphat mit Tween
P _{et}	endtidaler Druck
pH	arterieller pH-Wert
PVDF	Polyvinylidenfluorid
re	rechts
Rec	Recovery
Rep	Reperfusion
SAP	systolischer Blutdruck
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunde

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Tab.	Tabelle
tHb	Gesamthämoglobin (total Hb)
V.	Vena
Vol. %	Volumen Prozent
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 DANKSAGUNG

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl danke ich für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Auch danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. E. Kochs, Direktor, und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. C. Werner, leitender Oberarzt der Klinik für Anaesthesiologie der TU München, für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes und für die Unterstützung und Durchsicht der Doktorarbeit.

Ebenso bedanke ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Ehrhardt für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts und für seine jederzeit freundliche Beratung und Betreuung.

Ein großer Dank gilt auch der Forschungsgruppe „Neuroprotektion“ der Klinik für Anaesthesiologie der TU München, besonders Frau Dr. med. Kristin Engelhard für ihre praktische und theoretische Hilfe und Frau Dr. med. vet. Eva Eberspächer für ihre ständige kollegiale Unterstützung und wiederholten sorgfältigen Durchsichten dieser Doktorarbeit.

Vielen Dank auch an Frau Doris Droese und vor allem an Anne Frye für ihre Hilfsbereitschaft im Labor.

Bei Herrn Dr. rer. nat. P. Hutzler und Herrn Mannweiler (Institut für Pathologie, GSF, München) bedanke ich mich für die Bereitstellung des Lasermikroskops und die immer freundliche Beratung.

Den Tierpflegern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung möchte ich für die fachgerechte Betreuung der Tiere danken.

Vom ganzen Herzen danke ich meinen Freunden, vor allem Frau Alexandra Bernshausen für ihren Beistand und Herrn Dr. med. Dr. med. dent. Andreas Kolk für seine technische Unterstützung und Durchsicht des Manuskripts.

Ich möchte mich ganz besonders herzlich bei meiner Familie bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht hat und mich immer mit Rat und Tat unterstützt hat.

10 LEBENS LAUF

Name: Cornelia Haczek
Geburtsdatum und Ort: 18.03.1971 in München
Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Dipl. Ing. Kurt Haczek
Bozena Haczek, geb. Meixner, Lehrerin

Geschwister: Thomas Haczek, Rechtsanwalt
Corinna Haczek, Medizinstudentin

Schulbildung: 1978-1982 Grund- und Volksschule Neubiberg
1982-1992 Gymnasium mit Abitur am
Theodolindengymnasium München

Berufsausbildung: 1992-1994 Ausbildung zur Medizinisch Technischen
Laboratoriumsassistentin (MTLA) an den
Walner Schulen in München
Abschluss: Staatsexamen

Studium: 1994-2000 Studium der Veterinärmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Approbation: August 2000

Promotion: seit Oktober 2000 als Promotionsstudent der Ludwig-
Maximilians-Universität in der Forschungsgruppe
„Neuroprotektion“ der Klinik für Anaesthesiologie im
Klinikum Rechts der Isar, München

Tierärztliche Tätigkeit: seit September 2000 Assistenz in der Kleintierpraxis
Dr. C. Heerdegen, Höhenkirchen-Siegersbrunn