

Aus der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dipl. phys. E. Kochs)

aus dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der  
Technischen Universität München

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

angefertigt unter der Leitung von Herrn 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)

**Einfluss der Anästhetika Sevofluran und Propofol auf den nekrotischen  
und den apoptotischen Zelltod nach inkompletter zerebraler  
Hemisphärenischämie und Reperfusion in der Ratte über einen  
Beobachtungszeitraum von 28 Tagen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Kristine Kellermann

aus

München

München 2004

Gedruckt mit 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. E. P. Märtlbauer

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Christine \*seek happy days and happy nights\*  
dem „ring of fire“ aus dem „Cinema“ in München, Claudia, Julia, Birgit, Claudia -for  
providing the necessary mental distraction-, Bernd, Robert und Ina, meinen  
„Leidensgenossen“ aus der HVB, Inga, Susanne, Barbara, Silvi, Sabine, meinen  
beiden Großmüttern und nicht zuletzt vor allem meinen Eltern, denn ohne eure Geduld  
und eure Unterstützung wäre das hier nie möglich gewesen ...  
go raibh míle ma agat

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Schrifttum .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Zentrales Nervensystem .....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Anatomie und Blutversorgung des Gehirns .....	4
2.1.2	Stoffwechsel des Gehirns .....	5
2.1.3	Hippokampus .....	6
<b>2.2</b>	<b>Zerebrale Ischämie .....</b>	<b>6</b>
2.2.1	Pathophysiologie .....	7
2.2.1.1	Formen des Zelltodes .....	11
2.2.1.1.1	Nekrose .....	11
2.2.1.1.2	Apoptose .....	12
2.2.1.2	Familie der Caspasen als Mediatoren der Apoptose .....	14
2.2.2	Tiermodelle der zerebralen Ischämie .....	20
<b>2.3</b>	<b>Untersuchte Anästhetika .....</b>	<b>24</b>
2.3.1	Propofol .....	24
2.3.1.1	Allgemeines .....	24
2.3.1.2	Neuroprotektives Potential .....	25
2.3.2	Sevofluran .....	26
2.3.2.1	Allgemeines .....	26
2.3.2.2	Neuroprotektives Potential .....	27
<b>3.</b>	<b>Eigene Untersuchungen .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Ziel dieser Untersuchung .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Material und Methodik .....</b>	<b>30</b>
3.2.1	Versuch .....	30
3.2.1.1	Versuchstiere .....	30
3.2.1.2	Versuchsaufbau .....	30
3.2.1.3	Gruppeneinteilung .....	31
3.2.1.3.1	Tiere der Nativ-Gruppe .....	31
3.2.1.3.2	Tiere der Kontroll-Gruppe .....	32
3.2.1.3.3	Tiere der Sevofluran-Gruppe .....	32
3.2.1.3.4	Tiere der Propofol-Gruppe .....	32
3.2.1.4	Narkose .....	33
3.2.1.5	Chirurgische Präparation .....	33
3.2.1.6	Ischämie-Modell .....	35
3.2.1.7	Physiologische Variablen .....	39
3.2.2	Probengewinnung .....	42
3.2.2.1	Dekapitierung .....	42
3.2.2.2	Präparation und Resektion des Gehirns .....	43
3.2.2.3	Aufbereitung des Gehirns .....	43
3.2.3	Untersuchung des Gehirns .....	45
3.2.3.1	HE-Färbung .....	45
3.2.3.1.1	Färbevorgang .....	45
3.2.3.1.2	Untersuchung mit dem Lichtmikroskop .....	46
3.2.3.1.3	Klassifizierung des Schadens .....	48
3.2.3.1.4	Auswertung .....	49
3.2.3.2	Immunhistochemische Detektion aktivierter Caspase-3 .....	49
3.2.3.2.1	Färbevorgang .....	49

3.2.3.2.2	Untersuchung mit dem Lichtmikroskop .....	52
3.2.3.2.3	Auswertung .....	52
3.2.3.3	Doppelfärbung von aktivierter Caspase-3 mit NeuN .....	52
3.2.3.3.1	Färbevorgang .....	53
3.2.3.3.2	Untersuchung mit dem Lichtmikroskop .....	54
3.2.3.3.3	Auswertung .....	55
3.2.4	Antikörper, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Lösungen und Geräte	55
3.2.5	Statistische Berechnung und Dokumentation .....	58
<b>3.3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
3.3.1	Physiologische Variablen .....	59
3.3.2	Untersuchung der Gehirnschnitte .....	67
3.3.2.1	HE-Färbung .....	67
3.3.2.2	Immunhistochemische Detektion aktivierter Caspase-3 .....	72
3.3.2.3	Doppelfärbung von aktivierter Caspase-3 mit NeuN .....	74
3.3.2.4	Bildübersichten I-VIII .....	80
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>89</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>90</b>
4.1.1	Physiologische Variablen .....	90
4.1.2	He-Färbung .....	94
4.1.3	Immunhistochemische Detektion aktivierter Caspase-3 .....	97
4.1.4	Doppelfärbung von aktivierter Caspase-3 mit NeuN .....	99
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Methoden .....</b>	<b>100</b>
4.2.1	Ischämiemodell .....	100
4.2.2	Einordnung des Gewebes Schadens anhand der HE-Färbung .....	103
4.2.3	Immunhistochemische Antigendetektion .....	104
<b>4.3</b>	<b>Abschlussbetrachtung .....</b>	<b>107</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>109</b>
<b>6.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>111</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>126</b>
<b>9.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>127</b>
<b>10.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>130</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>133</b>

## 1 EINLEITUNG

Laut Statistischem Bundesamt Deutschland ist der Schlaganfall mit etwa 200.000 Opfern pro Jahr nach Herz- Kreislaufkrankungen und bösartigen Tumorerkrankungen die dritthäufigste Todesursache in der BRD.

Durch die sich rasch verändernde Gesellschaftsstruktur, mit einem stetig ansteigenden Anteil älterer Menschen an der Gesamtbevölkerung, wird dem klinischen Geschehen des Schlaganfalles mit seinen mannigfaltigen Ursachen im Bereich altersbedingter, sklerotischer Gefäßveränderungen in Zukunft eine immer wichtigere Rolle zuteil werden. Dies betrifft vor allem die Ausgaben im Gesundheitswesen für Behandlung und Rehabilitation der betroffenen Patienten.

Schon heute entstehen laut Deutscher Schlaganfallhilfe jährlich Kosten für die deutsche Volkswirtschaft in Höhe von ungefähr sieben Milliarden Euro, mit steigender Tendenz.

Auch sind die unmittelbaren und mittelbaren Folgen für das soziale, berufliche und finanzielle Umfeld des einzelnen Betroffenen weitreichend. So sind etwa 70% noch ein Jahr nach dem Schlaganfall deutlich in ihrem Alltag eingeschränkt und 58% dieser Menschen benötigen sogar permanent Hilfe bei der Bewältigung ihres alltäglichen Lebens. Diese Zahlen machen deutlich, von welchem weitreichendem Interesse die Erforschung und die Entwicklung sinnvoller Therapien auf diesem Gebiet bereits ist und auch in Zukunft sein wird.

Einer dieser Therapieansätze konzentriert sich auf das Gebiet der Anästhetika. Sie stehen seit langer Zeit in dem Ruf, günstig auf den Verlauf eines ischämischen Geschehens im Zentralen Nervensystem wirken zu können, wobei die genauen Wirkmechanismen bisher nicht ausreichend bekannt sind.

Allerdings weiß man, dass Anästhetika durch die Senkung des zerebralen Metabolismus die Depolarisation von Nervenzellmembranen um zwei bis vier Minuten hinauszögern können und so den energieverbrauchenden Stoffwechsel der von Sauerstoffmangel betroffenen Zellen herabsetzen und gleichzeitig die Produktion zellschädigender Stoffwechselprodukte drosseln. Richtiges und rechtzeitiges anästhesiologisches Management spielt demnach heute eine wichtige Rolle bei der Prävention und der Therapie akuter zerebraler Durchblutungsstörungen.

So konnten beispielsweise WERNER et al. (1995) und KOCHS et al. (1992) in Studien nachweisen, dass die Anästhetika Sevofluran bzw. Propofol in der Lage sind, nach zerebraler Ischämie und Reperfusion sowohl das neurologische Endergebnis zu verbessern, als auch den histologisch sichtbaren Schaden zu reduzieren.

## **EINLEITUNG**

---

Ziel der hier vorliegenden Studie ist es, zu untersuchen ob und in welchem Ausmaß Propofol und Sevofluran einen Einfluss auf den programmierten Zelltod, die Apoptose, nehmen und ob die kurzfristigen, neuroprotektiven Effekte der beiden Anästhetika auch über einen längerfristigen Zeitraum Bestand haben.

## 2 SCHRIFTTUM

### 2.1 Zentrales Nervensystem

Unter dem Begriff des Zentralen Nervensystems (ZNS) werden die Bereiche Gehirn und Rückenmark zusammengefasst. Seine Aufgabe ist die koordinierte Reizaufnahme, -verarbeitung und -beantwortung. Das zentrale Nervensystem wird ergänzt durch das sogenannte periphere Nervensystem, bestehend aus afferenten und efferenten Nervenfasern, die Informationen von Körper und Umwelt an Rückenmark und Gehirn weiterleiten und umgekehrt Informationen von Gehirn und Rückenmark an die Erfolgsorgane vermitteln.

Das ZNS baut sich aus zwei histogenetisch unterschiedlichen Komponenten auf, dem ektodermalen Nervengewebe und dem umhüllenden Bindegewebe mit den zusätzlich sekundär einwachsenden Blutgefäßen, beide mesodermalen Ursprungs (RÜSSE und SINOWATZ 1991).

Das Nervengewebe selbst besteht aus zwei funktionell unterschiedlichen Elementen, der Neuroglia, die mit Aufgaben im Stoffwechsel und Abwehrfunktionen betraut ist, und den erregungsbildenden und -leitenden Nervenzellen mit deren Fortsätzen, verantwortlich für die eigentliche Reizaufnahme und -weiterleitung (NICKEL et al. 1992).

Der feinere Aufbau des Nervensystems offenbart sich in einem Querschnitt durch das Rückenmark. Man kann dort deutlich die zentral liegende dunklere Substanz, Substantia grisea, erkennen, die vorwiegend aus den Zellkörpern der Neurone besteht. Diese graue Substanz wird umschlossen von hellerem Gewebe, der sogenannten Substantia alba, die aus den zu- und abführenden Axonen der Neurone besteht (SILBERNAGL und DESPOPOULOS 1991).

Das Gehirn besitzt dieselben Bauelemente in ähnlicher Anordnung, ebenfalls eine zentral gelegene Substantia grisea und eine peripher darum angeordnete Substantia alba. Es besteht anatomisch aus dem verlängerten Mark, der Brücke, dem Mittel-, Klein- und Zwischenhirn sowie dem Endhirn. Verlängertes Mark, Brücke und Mittelhirn formen den sog. Hirnstamm (SILBERNAGL und DESPOPOULOS 1991).

Dem Nervensystem allgemein obliegt im höher organisierten Organismus die Koordination von Reizaufnahme, -leitung und -beantwortung, wobei die Verschaltung von Reizaufnahme und Reizbeantwortung im ZNS stattfindet (NICKEL et al. 1992).

### 2.1.1 Anatomie und Blutversorgung des Gehirns

Das ZNS an sich wird in die beiden Komponenten Rückenmark und Gehirn unterteilt. Letzteres ist wiederum zu differenzieren in das Endhirn, das sog. Telencephalon mit seinen beiden Hemisphären, dem auch die Hippokampusformation zugerechnet wird (s. 2.1.3), das Zwischenhirn (Diencephalon) mit dem Hypothalamus, das Mittelhirn (Mesencephalon) und das Rautenhirn oder Rhombencephalon, mit seinen beiden Anteilen, dem Met- und dem Myelencephalon (NICKEL et al. 1992).

Das Gehirn liegt bei den höher entwickelten Tieren innerhalb der knöchernen Schädelhöhle, Cavum cranii, umschlossen von den drei Hirnhäuten Pia mater, Arachnoidea und Dura mater. In den Zwischenräumen der Arachnoidea, der Dura mater und der knöchernen Schädelkapsel befindet sich Liquor cerebrospinalis (NICKEL et al. 1992).

Bei den Haussäugetieren ist die Schädelhöhle einer weiteren Unterteilung in eine größere vordere und kleinere hintere Schädelhöhle unterworfen, wobei die beiden Großhirnhemisphären und Teile des Hirnstammes im vorderen Bereich Platz finden und der hintere Anteil vom Rautenhirn ausgefüllt wird (NICKEL et al. 1992).

Die arterielle Blutversorgung des Gehirns erfolgt ausschließlich über die jeweils paarigen Aa. vertebrales und die Aa. carotides internae (LIEBMANN 1993).

Die Aa. vertebrales verbinden sich nach Abgabe der Aa. spinales anterior und posterior zur A. basilaris, die gemeinsam mit ihren Endaufzweigungen - die Aa. cerebri posteriores - besonders die medialen und die basilarischen Anteile der beiden Großhirnhemisphären versorgen.

Die Aa. carotides internae und ihre Aufzweigungen, die nach vorne ziehenden Aa. cerebrales anteriores und die nach lateral ziehenden Aa. cerebrales mediae durchbluten jeweils die lateralen und medialen Hemisphärenanteile (LIEBMANN 1993).

Eine Besonderheit des arteriellen Stoffwechsels ist der sog. Circulus arteriosus (Willisii), ein Kollateralkreislauf an der Gehirnbasis zwischen den Aa. vertebrales und den Aa. carotides internae (LIEBMANN 1993).

Das venöse Blut der Gehirnoberfläche gelangt über sog. Brückenvenen in große venöse Sinus im Bereich der Dura mater. Venöses Blut aus dem inneren Bereich des Gehirns fließt über die tiefen zerebralen Venen in den Sinus rectus. Von dort aus erfolgt schließlich der Abfluss über die Vv. jugulares internae in Richtung der V. cava cranialis (LIEBMANN 1993).

### 2.1.2 Stoffwechsel des Gehirns

Die wichtige Rolle des Gehirns innerhalb des menschlichen Organismus spiegelt sich vor allem in seiner hohen Stoffwechselrate wider. So liegt der Sauerstoffverbrauch allein des Gehirngewebes bei 3,5 ml O<sub>2</sub>/100 g Hirngewebe pro Minute, was in etwa 20% des Sauerstoffbedarfs des gesamten Organismus entspricht

Die Durchblutung des gesamten menschlichen Gehirns liegt, bestimmt mit Hilfe des sog. Fick'schen Prinzips, bei 50 ml/100 g Hirngewebe pro Minute (DIRNAGL und MEISEL 1999).

Wichtigstes Substrat für den Stoffwechsel des Gehirns ist die Glukose, wobei allein ein Viertel des gesamten Glukoseverbrauchs des Körpers im Gehirn stattfindet (FITCH 1994).

Der kontinuierliche Bedarf an Glukose wird durch aerobe Glykolyse beinahe ausschließlich aus den Glykogenvorkommen in Leber und Muskulatur gedeckt, wobei den größten Energieverbrauch dabei die elektrophysiologische Aktivität verzeichnet (60%) (MICHENFELDER und MILDE 1988).

Die Abhängigkeit des Gehirns von effektiver Energiegewinnung aus aerobem Stoffwechsel und damit einer kontinuierlichen Glukoseversorgung wird deutlich, wenn man den Energiegewinn aus aerober Verstoffwechslung von Glukose über Glykolyse, Zitratzyklus und Atmungskette mit dem daraus resultierenden Gewinn von 38 Mol Adenosintriphosphat (ATP) mit dem Gewinn von lediglich zwei Mol ATP aus dem anaeroben Stoffwechsel vergleicht.

Kommt es zu einer verminderten Sauerstoffzufuhr und einem Erliegen der ATP-Produktion, dauert es durchschnittlich zwischen fünf und sieben Minuten, bis der nur geringfügige ATP-Vorrat im Gehirn aufgebraucht ist und der aerobe Stoffwechsel zum Erliegen kommt (NEWBERG-MILDE und WEGLINSKI 2001). Der einsetzende anaerobe Stoffwechsel ist nicht in der Lage, den Energiebedarf des Gehirngewebes dauerhaft zu decken und es kommt zu Funktions- und Strukturverlusten innerhalb des betroffenen Gehirngewebes.

### 2.1.3 Der Hippokampus

Entstehungsgeschichtlich entwickelt sich der Hippokampus als Teil des Allokortex, der mit der Ausweitung des Telencephalons in den Temporallappen verlagert wird (RÜSSE und SINOWATZ 1990).

Er entsteht - bedingt durch den Sulcus hippocampi - als eine nach vorne-unten offene S-förmige Einrollung der dünnen, ventromedialen Hemisphärenwand und wird erst nach Eröffnung des Seitenventrikels sichtbar. Seine innere Oberfläche ist von einer dünnen Marksicht, dem sog. Muldenblatt, Alveus, überzogen. Dieses Muldenblatt geht am medialen Rand mit seiner scharfen Kante in das Adergeflecht des Seitenventrikels über.

Im Sulcus hippocampi, teilweise versenkt, sitzt der sog. Gyrus dentatus dem freien Ende der Hippokampusrinde im Querschnitt kappenartig auf. Seine Aufgabe besteht offenbar in einer Ausbreitung ihm zuströmender Membranpotentialänderungen in Richtung Hippokampusformation (NICKEL et al. 1992).

Hippokampus und Gyrus dentatus sind, neben dem Gyrus parahippocampalis, der Fimbria hippocampi und der Fornix, Teil der sog. Hippokampusformation, die insgesamt wiederum einen Bestandteil des Telencephalons darstellt.

Funktionell hat die Hippokampusformation eine Zuordnung zum sog. Limbischen System erfahren, welches allgemein als Zentrum lebens- und arterhaltender Vorgänge gilt, da dort viszerale, hormonelle und sensorische Vorgänge aufeinander abgestimmt und gesteuert werden (NICKEL et al. 1992).

Da seine Neurone bekanntermaßen besonders empfindlich gegenüber ischämischen Insulten sind (PULSINELLI et al. 1982a), steht der Hippokampus oftmals im Mittelpunkt der Forschung auf dem Gebiet der zerebralen Ischämie.

### 2.2 Zerebrale Ischämie

Unter dem Begriff der zerebralen Ischämie versteht man allgemein eine Unterbrechung der Substratzufuhr durch Mangeldurchblutung (DIRNAGL und MEISEL 1999). Diese Mangeldurchblutung führt im betroffenen Gebiet sehr schnell zu einem Missverhältnis von Sauerstoffbedarf zu Sauerstoffangebot und daraus resultierend entsprechend zu einem Missverhältnis von Glukosebedarf zu Glukoseangebot (WERNER 2000).

Je nach Grad der Einschränkung kommt es zum Zusammenbruch verschiedener metabolischer Prozesse, mit nachfolgend funktionellen und/oder strukturellen Schäden. Schwere und

Ausdehnung des Schadens hängen von der Intensität und Dauer der Ischämie ebenso wie von der Reperfusionzeit ab (ITO et al. 1975).

In Abhängigkeit von Ursache und Ausdehnung eines ischämischen Geschehens spricht man von globaler Ischämie, die komplett oder inkomplett sein kann, oder von fokaler Ischämie (WERNER 2000).

Ursache einer kompletten zerebralen globalen Ischämie ist beispielsweise der vorübergehende Herzstillstand, bei dem die zerebrale Durchblutung abrupt von etwa acht Milliliter pro Gramm im Kortex auf null abfällt (PULSINELLI et al. 1982b). Eine inkomplette zerebrale Ischämie hingegen kann zum Beispiel durch ein diffuses Hirnödem mit Erhöhung des Hirninnendrucks entstehen (WERNER 2000).

Bei globalen Ischämien kommt es nach wenigen Minuten bereits zu strukturellen Schäden, weshalb dieser Zustand vom betroffenen Organismus nur über einen relativ kurzen Zeitraum toleriert werden kann (DIRNAGL und MEISEL 1999).

Ursache einer fokalen Ischämie hingegen sind lokale Perfusionsdefizite einzelner Gebiete bestimmter Hirnarterien, wie sie zum Beispiel nach Einschwemmung von Thromben oder Luft entstehen können. Diese Perfusionsstörungen können permanent oder reversibel sein (DIRNAGL und MEISEL 1999).

Kennzeichen solch fokaler zerebraler Ischämien ist die Entstehung einer sog. Penumbra (aus dem Griechischen, „Halbschatten“), einer Randzone, die das minderdurchblutete Gefäßgebiet umgibt und in der eine Restdurchblutung durch das den Infarkt umgebende, normale Gewebe gewährleistet wird (ASTRUP et al.1981).

### **2.2.1 Pathophysiologie**

Je nach Typ der Ischämie, global oder fokal, komplett oder inkomplett, sind unterschiedliche pathophysiologische Vorgänge am Geschehen beteiligt.

Allen Ischämietypen gemein ist jedoch die Tatsache, dass ein Substratmangel bei eingeschränkter zerebraler Perfusion eine Kaskade von Schadensmechanismen in Gang setzt, die über Minuten, Stunden und Tage im betroffenen Gebiet unterschiedliche Wirkung zeigen (DIRNAGL und MEISEL 1999).

Es kommt bei allen Formen der Ischämie zu einer Dysregulation der Proteinbiosynthese (HOSSMANN 1979). Sie fällt während der Ischämie ganz aus und erlangt ihre Funktionalität erst zwischen sechs und 24 Stunden nach Ende der Ischämie wieder. Zusätzlich sistiert der

Energiehaushalt, der jedoch bereits in weniger als einer Stunde nach Ende der Ischämie wieder voll funktionsfähig sein kann (KLEIHUES und HOSSMANN 1971). Außerdem entstehen Schäden an den von der Ischämie betroffenen Zellmembranen (WERNER 1997).

Kennzeichen der kompletten globalen zerebralen Ischämie ist auf klinischer Ebene die Bewusstlosigkeit. Auf physiologischer Ebene kommt es bereits 15 bis 20 Sekunden nach Herzstillstand aufgrund des akuten Sauerstoffmangels zum Sistieren der oxidativen Phosphorylierung und die betroffenen Zellen sind nur noch zu anaerober Glykolyse in der Lage (KEMPSKI 1994).

Sobald jedoch die Glykogen- und die ATP-Vorräte in der Zelle erschöpft sind, wird auch die Glykolyse eingestellt, sämtliche energieabhängigen Reaktionen in der Zelle sistieren und bald darauf stirbt die Zelle ab (WERNER 1997).

Experimentell lässt sich eine solche komplette globale zerebrale Ischämie durch Provokation eines Herz-Kreislauf-Stillstandes mit nachfolgender Reanimation darstellen (NEWBERG-MILDE und WEGLINSKI 1994, PADOSCH et al. 2001).

Die inkomplette zerebrale Ischämie ist gekennzeichnet durch anaeroben Stoffwechsel, der aufrecht erhalten wird durch kontinuierliche, aber reduzierte Glukoselieferung. Allerdings liefert dieser anaerobe Stoffwechsel aus einem Mol Glukose lediglich zwei Mol ATP (im Gegensatz dazu entstehen aus einem Mol Glukose 38 Mol ATP im aeroben Stoffwechsel) (STRYER 1996).

Der rasche Energieverlust der Zelle führt in ihren Membranen zu einem sukzessiven Versagen der energieabhängigen Ionenpumpen mit nachfolgender Depolarisation der Zellmembranen und exzessiver Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren wie z.B. Glutamat oder Aspartat sowie der Aktivierung verschiedener  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^{+}$ -Ionenkanäle (WERNER 1997).

Dieser unphysiologische Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bedeutet einen pathologischen Stimulus, der zu übersteigerten Reaktionen von Lipasen, Proteasen und Endonukleasen führt, die wiederum Rezeptorfunktionen, Ionenkanäle und Translokasen mittels Phosphorylierung zu verändern vermögen. Durch Hydrolyse von Phospholipiden der Zellmembranen kommt es zu einem Anstieg freier Fettsäuren (u.a. Arachidonsäure), die wiederum selbst als Detergentien und Ionophoren an den Membranen wirksam werden. Nebenbei kommt es in Anwesenheit von Sauerstoff sowohl zu übersteigertem Aktivität von Enzymsystemen, wie das der Zyklooxygenasen und Lipooxygenasen, sowie zur Produktion

von Platelet Activation Factor, PAF, und zu einer Aktivierung von Proteinkinasen (SIESJÖ 1992b).

Durch die Anhäufung von Arachidonsäure im Speziellen kommt es bei Sauerstoffanwesenheit zu einer erhöhten Produktion von Eikosanoiden in Form von Prostaglandinen, Prostazyklin, Leukotrienen und Thromboxanen (die Produktion dieser Eikosanoide hängt einzig von der Menge und der Verfügbarkeit der Arachidonsäure ab). Folgen davon sind u.a. Aktivierung und Anlagerung von Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen sowie Vasokonstriktion, was lokal zu einer verstärkten Störung der Mikrozirkulation führt (SIESJÖ 1992b).

Zudem fällt Laktat als Stoffwechselprodukt der anaeroben Glykolyse an, das durch die mangelhafte Blutversorgung innerhalb des betroffenen Areals nicht in ausreichender Menge abtransportiert werden kann. Dadurch kommt es zu einer Laktatanreicherung und damit einem Absinken des pH-Wertes (NEWBERG-MILDE und WEGLINSKI 2001). Diese Laktazidose führt zu gesteigerter Membranpermeabilität mit den Folgen vasogener und zytotoxischer Ödeme (WERNER 2000).

Experimentell lässt sich diese inkomplette Form der globalen zerebralen Ischämie beispielsweise darstellen durch das Modell der sog. „Two vessel occlusion“ mit bilateralem Verschluss der Aa. carotides communes mit zusätzlicher Hypotension. Eine zweite Möglichkeit ist die sog. „Four Vessel Occlusion“, bei der zum einen bilateral die Aa. carotides communes vorübergehend verschlossen werden und zusätzlich die Aa. vertebrales beidseitig permanent kauterisiert werden (GINSBERG und BUSTO 1989).

Im Falle einer fokalen Ischämie hängt die Stoffwechselstörung von der Größe des betroffenen Areals und dessen Kollateralisierung durch nicht betroffene Gefäße ab (ASTRUP et al.1981).

Die um die zentrale ischämische Läsion gelegenen Zellen in der Penumbra bestehen aus lebensfähigen, elektrisch inaktiven Zellen deren Funktionalität durch Kollateralgefäße aufrechterhalten wird und deren Lebensfähigkeit von Energieversorgung und Energieverbrauch abhängt (ASTRUP et al. 1981, OBRENOVITCH 1995).

Ein Zusammenbruch der Ionengradienten entlang der Zellmembran bleibt bei diesen Zellen aus. Ihr Funktionsstoffwechsel ist zwar erheblich beeinträchtigt, jedoch entstehen keine irreversiblen strukturellen Schäden, wenn rechtzeitig eine ausreichende Reperfusion gewährleistet werden kann. Zellen innerhalb der Penumbra können Minderdurchblutung über einen Zeitraum von vier bis acht Stunden überleben (ASTRUP et al.1981, SIESJÖ 1992a).

Auch bei der fokalen zerebralen Ischämie ist der Energie- und Sauerstoffmangel zentraler Dreh- und Angelpunkt des Stoffwechselgeschehens. Unter Mangeldurchblutung begleitet von

einem Energie- und Sauerstoffdefizit beginnt die Zelle mit anaerober Glykolyse, was zu intra- und extrazellulärer Azidose führt (SIESJÖ 1992a).

Der Energiemangel bringt das Ionengleichgewicht der Zelle aus dem Lot,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  sowie  $\text{Ca}^{2+}$  strömen, begleitet von Wasser, in die Zelle ein.

Außerdem erschöpfen sich die ATP-Speicher, die Resynthese von Molekülen der Zellmembran und des Zytoskeletts sistiert, Phospholipide werden abgebaut und die Zellstruktur bricht zusammen (SIESJÖ 1992a). Werden demnach kritische Durchblutungsgrenzen für längere Zeit unterschritten, kann eine solche Penumbra-Zone einer sekundären Infarzierung zum Opfer fallen.

Experimentell lässt sich diese fokale Ischämie durch temporären oder permanenten Verschluss der Arteria cerebri media darstellen, deren Ausmaß sich über die Dauer der Okklusion und den Blutdruck regulieren lässt (GINSBERG und BUSTO 1989).

Ein wichtiges Problem im Anschluss an die Ischämie ist die wiedereinsetzende Perfusion des ischämischen Gewebes.

Während der ischämischen Phase sammeln sich durch den anaeroben Stoffwechsel im Gewebe saure Stoffwechselprodukte und andere dilatierende Mediatoren wie z.B.  $\text{K}^+$ -Ionen an (s.o.), die zu einer maximalen Dilatation der Widerstandsgefäße führen und ihre Autoregulation außer Kraft setzen. In der frühen Rezirkulations-Phase kommt es dann, bedingt durch die geringere Viskosität des neu zufließenden Blutes und eine Verringerung des Gefäßtonus zu einer 15 - 20 Minuten währenden Hyperämie, die nach und nach in eine Phase der Hypoperfusion übergehen kann, bei der der Blutfluss auf bis zu 50% des normalen Wertes verringert sein kann.

Ursachen dieser Hypoperfusion sind neben der Ausbildung eines Gewebeödems Vasospasmen, die durch Freisetzung vasokonstriktiver Substanzen wie Thromboxan  $\text{A}_2$  und Endothelin entstehen, so wie eine Ansammlung von Erythrozyten-Überresten, die den Blutfluss im betroffenen Gebiet zusätzlich einschränken (NEWBERG-MILDE und WEGLINSKI 1994).

Die wichtigste Folgeerscheinung, egal welcher Art zerebraler Ischämie, ist jedoch der Zelltod.

### 2.2.1.1 Formen des Zelltodes

Zelltod spielt, so paradox es klingt, für den Organismus eine lebenswichtige Rolle (LINNIK 1993).

Er findet auf zwei unterschiedliche Arten statt: passiv, in Form einer Nekrose oder aktiv, in Form einer Apoptose, dem sog. programmierten Zelltod. Welche Art Tod die betroffene Zelle ereilt, hängt von der Schwere des sie schädigenden Einflusses wie auch Reizstärke und Reizdauer, dem Entwicklungsstand und dem Energiegehalt der betroffenen Zelle ab (BREDESEN 2000, PADOSCH et al. 2001).

#### 2.2.1.1.1 Nekrose

Diese Form des Zelltodes wird auch als „passiver Zelltod“ bezeichnet, da die Nekrose ohne eine „aktive“ Beteiligung der Zelle und ohne weiteren Energieverbrauch stattfindet.

In der Regel ist Nekrose die unmittelbare Folge eines vorausgehenden pathologischen Ereignisses (wie z.B. Anoxie oder Zelltrauma) (BANASIAK 2000) und betrifft immer einen ganzen Verband von Zellen (GRAHAM und LANTOS 1997).

Makroskopisch unterscheidet man zwei Formen der Nekrose:

- zum einen die Koagulationsnekrose, eine Gerinnungsnekrose, bei der die Zellstruktur zwar erhalten bleibt, die Zellproteine aber denaturiert werden. Diese Form der Nekrose tritt meist in Folge lokal hypoxischer Zustände vereinzelt in Herz- und Skelettmuskulatur sowie Organen wie Nieren oder Milz auf.
- zum anderen spricht man von einer Kolliquationsnekrose (Verflüssigungsnekrose), bei der sich durch Permeabilitätsstörungen der Zellmembran vermehrt intrazellulär Flüssigkeit ansammelt. Hier überwiegen in der Regel lytische Prozesse ohne nennenswerte Proteindenaturierung. Eine solche Kolliquationsnekrose tritt vor allem in der weißen Substanz des zentralen Nervensystems und im Pankreas auf (STÜNZI und WEISS 1990).

Den lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen gehen pathologische Prozesse in der Ultrastruktur voraus, wie beispielsweise Desintegration von Ribosomen und Zerfall des Zytoskeletts (CHALMERS-REDMAN et al. 1997).

Auf biochemischer Ebene ist eine veränderte Mitochondrienfunktion, gestörte Proteinbiosynthese und ein vermehrter Zustrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle entscheidend.

Exzitatorische Aminosäuren binden an N-methyl-D-Aspartat-Kanäle, die Rezeptor-assoziierte  $\text{Na}^+$ -Kanäle öffnen. Die daraus resultierende Depolarisation öffnet wiederum spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle ermöglichen.

Der erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel innerhalb der Zelle führt zu Schwellung der Zellorganellen und zu Desintegration der äußeren Zellmembran durch Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerter Enzymsysteme und raschem ATP-Verbrauch durch ATP-gesteuerte Ionenpumpen (CHALMERS-REDMAN et al.1997).

Nachfolgend desintegrieren die Zellorganellen zusehends, die Plasmamembran reißt ein und der Zellinhalt ergießt sich in den Extrazellulärraum, was in der Regel zu einer Entzündungsreaktion im umgebenden Gewebe führt (STELLER 1995).

Unter dem Lichtmikroskop werden Veränderungen im Zellkern (Karyolysis, Pyknose und Karyorrhexis) sowie im Zytoplasma (Strukturverlust, Fragmentation und Eosinophilie) sichtbar (GRAHAM und LANTOS 1997).

### **2.2.1.1.2 Apoptose**

Mit „Apoptose“ (aus dem Griechischen beschreibt der Begriff das physiologische „Herunterfallen“ von Blütenblättern oder Blättern eines Baumes im Herbst) (KERR et al. 1971) bezeichnet man die morphologischen Veränderungen einzelner Zellen, ausgelöst durch den sogenannten „programmierten Zelltod“ (SIESJÖ und SIESJÖ 1996). Es sind meist einzelne Zellen innerhalb eines Zellverbandes betroffen, die, ohne eine Entzündungsreaktion in ihrer Umgebung zu verursachen, zugrunde gehen und phagozytiert werden.

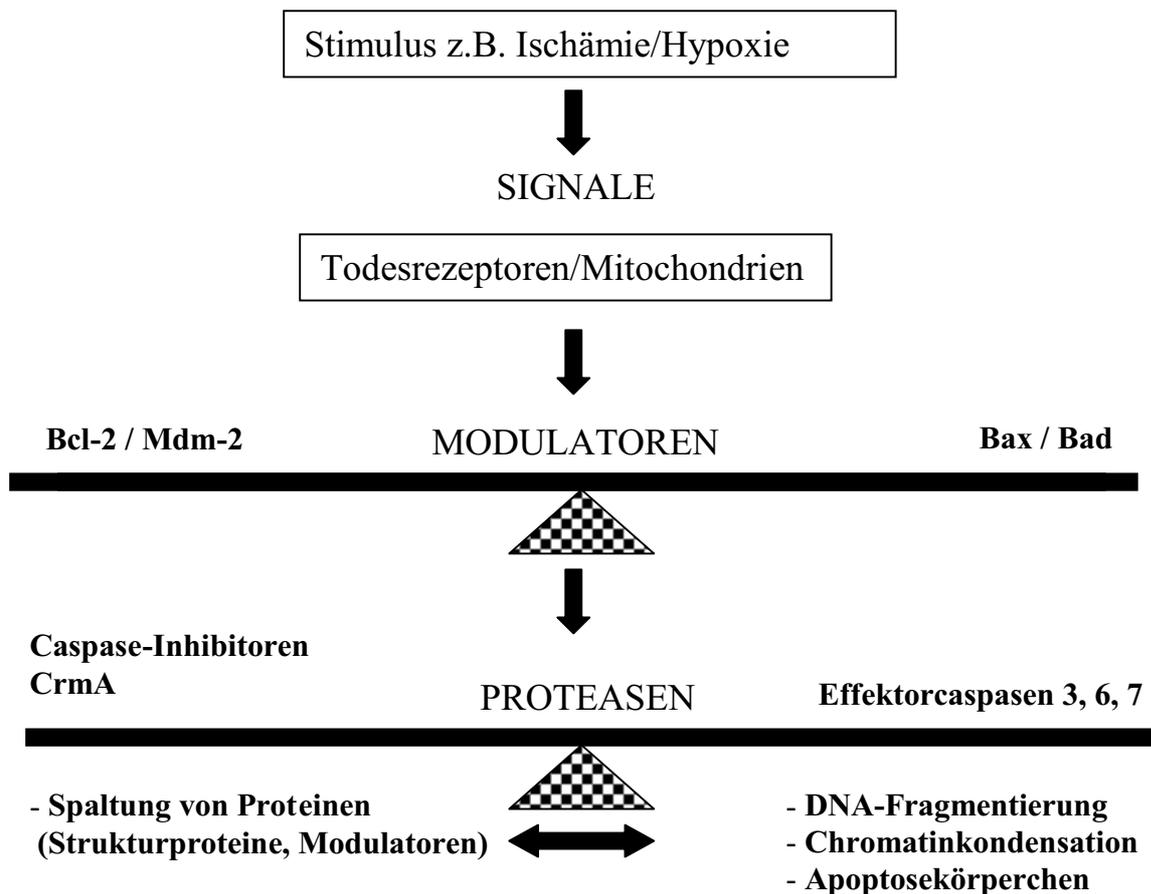
Der programmierte Zelltod läuft unter physiologischen Bedingungen im Rahmen der Ontogenese ab und spielt eine entscheidende Rolle sowohl als physiologischer Gegenpol zur Mitose bei der Aufrechterhaltung der Gewebemöostasis, als auch bei Atrophie und Involution bestimmter Gewebe. Apoptose ist aber auch ebenso wichtig während pathologischer Prozesse, wobei man zwischen Erkrankungen mit pathologisch gesteigerter Apoptose (z.B. zerebrale Ischämie) und Erkrankungen mit pathologisch inhibierter Apoptose (z.B. Tumorerkrankungen) unterscheidet (BANASIAK 2000, ELDADAH und FADEN 2000, PADOSCH et al. 2001).

Für den Ablauf des programmierten Zelltodes ist eine Art genetisches Programm notwendig (BANASIAK 2000), das in allen Zellen der Säugetiere vorhanden ist, dessen Aktivierung jedoch von einer bestimmten Signalkombination sowohl aus dem intra- als auch dem

## SCHRIFTTUM

extrazellulären Raum abhängt. Die unterschiedlichen Signalwege laufen am Ende alle an einer Stelle zusammen, um ein gemeinsames Apoptose-Programm zu aktivieren (STELLER 1995). So haben beispielsweise genetische Studien an *Drosophila melanogaster* ergeben, dass die allermeisten pro- apoptotischen Signale in einem einzigen, gemeinsamen Mechanismus zusammenlaufen, der von einem sog. „reaper“ Gen gesteuert wird (WHITE et al. 1994).

Der momentane Stand der Wissenschaft geht von einem Ablauf mehrstufiger Kaskaden zwischen initialem Reiz und finaler DNA-Fragmentierung in der Zelle aus. Dabei wird beginnend mit den Signalfaktoren über die Ebene der Modulatoren am Ende die gemeinsame Endstufe, die Effektorprotease, aktiviert. Auf der Ebene der Modulatoren konkurrieren dabei verschiedene mit dem Tod oder dem Leben der Zelle assoziierte Proteine untereinander und letztlich entscheidet das Gleichgewicht bzw. ein konzertiertes Zusammenwirken dieser Faktoren über Tod oder Leben der betroffenen Zelle (s. Abb. 01) (PADOSCH et al 2001).



**Abb. 01:**

*Schematische Darstellung der pro- und anti- apoptotischen Faktoren (nach PADOSCH et al. 2001).*

Histologisch zeichnen sich apoptotische Zellen durch kleine, mehr oder weniger sphärisch oder ovoid geformte zytoplasmatische Körperchen aus, die manchmal pyknotische Reste des Zellkernes enthalten können. Diese Strukturen werden als „Apoptosekörperchen“ bezeichnet (KERR et al. 1971).

Die betroffenen Zellen schrumpfen, ihr Chromatin kondensiert, die DNA wird kontrolliert an den internukleosomalen Brücken in Segmente von ca. 180 Basenpaaren (bzw. Vielfachen davon) aufgespalten und es tritt das charakteristische Phänomen des „DNA laddering“ auf (SIESJÖ und SIESJÖ 1996).

Es treten keine Entzündungszellen in Erscheinung, da die Zellorganellen und -membranen ihre Integrität behalten und phagozytiert werden, bevor der Zellinhalt nach außen freigesetzt werden kann und die charakteristischen Entzündungszellen angelockt werden (SIESJÖ und SIESJÖ 1996, WATERS 1996).

### **2.2.1.2 Familie der Caspasen als Mediatoren der Apoptose**

Eine wichtige Rolle innerhalb der Apoptose spielen die sog. Caspasen.

Der Begriff „Caspase“ entsteht als eine Kurzform für „Cysteine-dependent Aspartate-specific Protease“ und bezeichnet die Familie von Cystein-Proteasen, die einen zentralen Bestandteil des Apoptosegeschehens darstellen (ELDADAH und FADEN 2000). Ungewöhnlich hierbei ist ihre Spezifität für Aspartat, die außer diesen Caspasen lediglich Granzym B, eine Serinprotease im Bereich des lymphozytären Zelltodes, aufweist (ELDADAH und FADEN 2000). Es sind bisher 14 unterschiedliche Caspasen bekannt, wobei die Caspasen -11 und -12 bisher lediglich in Mäusen identifiziert werden konnten. Die übrigen zwölf kommen sowohl in Ratten als auch im Menschen vor (THORNBERRY und LAZEBNIK 1998).

Die Caspasen werden anhand der Länge ihrer Prodomänen in zwei verschiedene Klassen eingeteilt. Caspasen der Klasse I besitzen lange Prodomänen, Caspasen der Klassen II hingegen besonders kurze Prodomänen (NICHOLSON 1999).

Die langen Prodomänen der Klasse I-Caspasen spielen eine wichtige Rolle bei ihrer Aktivierung. Sie medieren die Oligomerisation der Proenzyme und helfen bestimmte Caspase-Vorläufer den richtigen Todesrezeptoren zuzuführen (KUMAR 1999), was zur Autoaktivierung des Enzyms führt.

Klasse II-Caspasen fehlt neben der langen Prodomäne auch die Fähigkeit, sich selbst zu aktivieren. Hierzu benötigen sie anscheinend Caspasen der Klasse I, die sie spalten, weshalb man von den Klasse I-Caspasen auch als Initiator-Caspasen (oder „upstream caspases“) und von den Klassen II-Caspasen als Effektor-Caspasen (oder „downstream caspases“) spricht (KUMAR 1999).

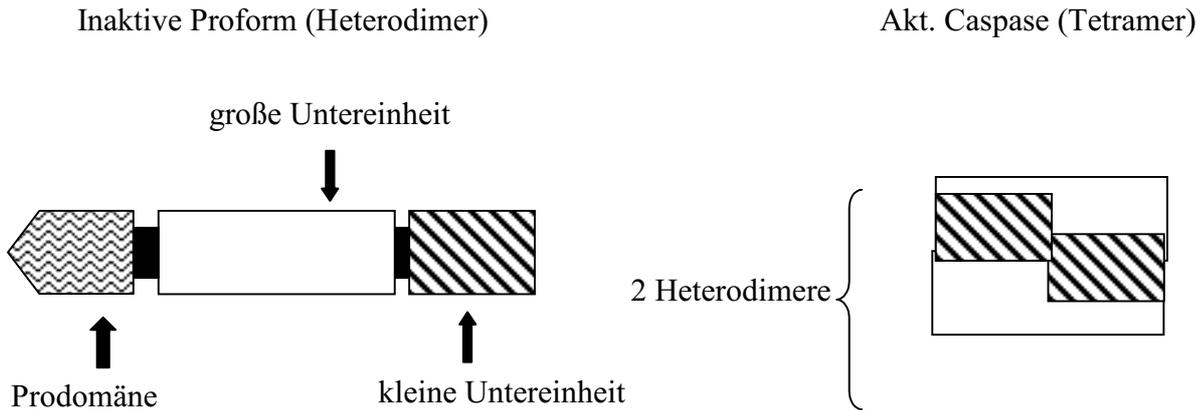
Während der Apoptose werden Caspasen sowohl als Initiatoren bei der Reaktion auf proapoptotische Signale tätig, als auch in der Rolle von Effektoren in die Zelldisintegration involviert (KUMAR 1999).

Die Initiator-Caspasen (Caspasen-2, -8, -9 und -10) sind bereits früh im apoptotischen Geschehen platziert und entsprechend ihrer Funktion an der Zelloberfläche und auf den Mitochondrien lokalisiert. Sie besitzen alle lange N-terminale Pro-Domänen, bestehend aus sechs anti-parallel verlaufenden  $\alpha$ -Helices mit der Fähigkeit komplementär binden zu können. Die Caspasen-8 und -10 besitzen zwei solcher N-terminalen Domänen. Diese Domänen werden auch als „Death Effector Domains“, kurz DED, bezeichnet. Die Caspasen-2 und -9 besitzen lediglich eine dieser Domänen, die dort als „Caspase Recruitment Domains“, kurz CARD, bezeichnet werden (KUMAR 1999).

Die Effektor-Caspasen umfassen die Caspasen-3, -6 und -7. Sie mediiieren einige der morphologisch sichtbar werdenden Veränderungen innerhalb der Apoptose wie Plasmamembranausstülpung, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung. Sie besitzen kurze N-terminale Domänen, deren genaue Funktion allerdings noch unklar ist (KUMAR 1999).

Die verbleibenden Caspasen-1 und -11 werden den Entzündungsmediatoren zugerechnet. Ihr Prototyp, die Caspase-1, ist die erste Caspase, die beim Menschen entdeckt wurde und zuerst unter dem Namen „Interleukin-1 $\beta$ -converting Enzyme“, kurz ICE, geführt worden ist (THORNBERRY und LAZEBNIK 1998, KLICHE et al. 1999, ELDADAH und FADEN 2000).

Alle Caspasen werden in der Zelle zunächst als dreiteilige, weitgehend inaktive Proenzyme mit einem Gewicht zwischen 30 und 50 kDa synthetisiert. Jedes dieser Proenzyme besteht aus drei verschiedenen Einheiten: einer in Sequenz und Länge hochvariablen NH<sub>2</sub>-terminalen Domäne (22-200 Aminosäuren), einer großen Untereinheit mit ungefähr 14-20 kDa und einer kleinen Untereinheit mit ungefähr 10-12 kDa (ELDADAH und FADEN 2000).



**Abb. 02:** Schematische Darstellung einer inaktivierten und aktivierten Caspase, modifiziert nach ELDADAH und FADEN 2000.

Der C-terminale Abschnitt der großen Untereinheit trägt dabei den katalytisch wirksamen Cysteinrest, der von einem genetisch konservierten Pentapeptid, dem sog. QACXG (bestehend aus den Aminosäuren Gln-Ala-Cys-X-Gly), flankiert ist.

Die Caspasen benötigen zu ihrer Aktivierung zwei Aspartat-Reste innerhalb der Domänen, sowie vier bestimmte Aminosäuren, die N-terminal an der vorgesehenen Spaltungsstelle liegen. Dieses Tetrapeptid variiert innerhalb der Caspase-Familie deutlich, was die Unterschiede bezüglich ihrer biologischen Funktion erklärt.

Nach der Spaltung des Proenzym kommt es zu einer Assoziation von kleiner und großer Untereinheit zu einem Heterodimer.

Von den Caspasen-1 und -3 ist bekannt, dass sich in vivo nachfolgend zwei Heterodimere zu einem strukturell wesentlich stabileren Tetramer zusammenlagern (s. Abb. 02)

Die Tatsache, dass die Spaltung des Proenzym zur Aktivierung an derselben Stelle stattfindet, an der aktivierte Caspasen später ihr Substrat spalten, gibt Anlass zur Vermutung, dass Caspasen autokatalytisch tätig werden können.

Diese sehr hohe Spezifität bestätigt den Eindruck, dass während einer ablaufenden Apoptose Proteine niemals willkürlich gespalten werden, vielmehr der gesamte Ablauf zu einem bestimmten Zeitpunkt genau definierte Proteine betrifft, die dann entsprechend in ihren Funktionen eingeschränkt oder ihrer gänzlich beraubt werden (THORNBERRY und LAZEBNIK 1998, BREDESEN 2000, ELDADAH und FADEN 2000).

Für die Aktivierung der Caspasen existieren mindestens drei unterschiedliche Wege: einmal Aktivierung durch Rekrutierung bestimmter Todesfaktoren, gegenseitige Aktivierung der Caspasen untereinander und Autoaktivierung (NICHOLSON 1999).

Aktivierung durch Rekrutierung von Todesfaktoren läuft über zwei unterschiedliche Kaskaden ab, die in ihrer Komplexität an die Kaskaden des Komplementsystems oder der Blutgerinnung erinnern: über den sog. „extrinsischen“ Weg und über den sog. „intrinsischen“ Weg.

Der extrinsische Weg wird durch die Ligation eines Todesrezeptors an der Zelloberfläche initiiert. Diese Todesrezeptoren, unter ihnen TNF-Rezeptor 1 - kurz TNFR1 - und Fas, gehören zu der sog. TNF (Tumor Necrosis Factor)/Nerve Growth Factor-Rezeptor Superfamilie.

TNFR1 und Fas sind transmembranöse Rezeptorproteine und besitzen in ihrem zytoplasmatischen Teil beide eine sog. „death domain“, eine aus 68 Aminosäuren bestehende Struktur (WHITE et al. 1994).

Binden Liganden wie z.B. „Fas-associating protein“ oder „TNF-receptor associated death domain“ mit einer komplementären C-terminalen „death domain“ (kurz FADD bzw. TRADD) an diese Rezeptoren, kommt es zu einer Konformationsänderung am Rezeptor, die dann die Bindung eines Adaptermoleküls an die „death domain“ dieses Rezeptors ermöglicht. Der N-terminale Teil des FADD besitzt eine der Procaspase komplementäre „death effector domain“ (DED), wohingegen TRADD zwischen FADD und dem Todesrezeptor vermittelt.

Ist der Rezeptor/Adapter Proteinkomplex entstanden („death-inducing receptor complex“, kurz DISC), kann die DED des Adaptermoleküls Procaspase-8 binden und das Proenzym in das aktive Enzym Caspase-8 überführen (KLICHE et al. 1999, ELDADAH und FADEN 2000).

Die aktive Caspase-8 spaltet und aktiviert damit nachfolgend die Effektor-Caspasen wie Caspase-3 oder Caspase-7 (BREDESEN 2000).

Der intrinsische Weg wird durch Mitochondrien aktiviert, nachdem diese ein proapoptotisches Signal (beispielsweise Sauerstoffmangel und daraus resultierender Energiemangel) erhalten haben. Sie entlassen Zytochrom-c aus ihrem intermembranösen Raum ins Zytosol, das dort ein sog. „Apoptosom“ bildet, in dem es an den sog. „apoptose activating factor“, kurz APAF-1, bindet, der wiederum eine N-terminale „caspase recruitment domain“, CARD besitzt.

Unter Anwesenheit von ATP rekrutiert APAF-1 Procaspase-9 über die CARDs beider Proteine, die sich selbst aktiviert, sobald ausreichend Proenzym zusammengelagert worden ist. Im Zuge der Caspase-9 Aktivierung werden nachfolgend weitere Effektor-Caspasen aktiviert (BREDESEN 2000).

Beide Aktivierungskaskaden, extrinsisch wie intrinsisch, laufen schließlich in einen gemeinsamen Endaktivierungsweg zusammen, mit dessen Hilfe Effektor-Caspasen aktiviert werden, die wiederum bestimmte Proteine spalten, deren Anhäufung zum Tod der Zelle führt (THORNBERRY und LAZEBNIK 1998).

Prototyp eines solchen Effektors ist die Caspase-3, die eine der am Besten beschriebenen Caspasen überhaupt ist (ELDADAH und FADEN 2000).

Die Rolle der Caspase-3 im Ablauf der Apoptose wird unterstrichen durch Caspase-3-knockout-Modelle, in denen Mäuse schwere Anomalien im Bereich des ZNS entwickeln (Megaloenzephalie, ektopisches Wachstum von Neuronen und Glia) (KUIDA et al. 1996).

Procaspase-3 ist durch ihre Struktur zwischen großer und kleiner Untereinheit als Substrat für die Initiator-Caspasen (Caspasen-2, -8, -9 und -10) prädestiniert, wird aber auch von Caspase-6 und akt. Caspase-3 selbst aktiviert (SRINIVASULA et al. 1996).

Sie wird synthetisiert als 32 kDa Proenzym, das während der Aktivierung in eine große Untereinheit mit etwa 20 kDa, und eine kleine Untereinheit mit etwa 12 kDa gespalten wird (NAMURA et al. 1998).

Substrate für die akt. Caspase-3 sind unter anderem Gelsolin, ein wichtiges strukturgebendes Protein des Zytoskeletts, das von akt. Caspase-3 gespalten wird und der apoptotischen Zelle ihr charakteristisches Aussehen verleiht (KLICHE et al. 1999).

Ein weiteres Substrat ist das  $\alpha$ -Fodrin, ebenso ein Protein des Zytoskeletts, welches Mikrotubuli an der Oberfläche des Zytoplasmas verankert. Die Spaltung dieses Proteins mag wohl die Ursache für die während der Apoptose auftretende Vergrößerung der Zelle sein (ELDADAH und FADEN 2000).

Ein weiteres Substrat der akt. Caspase-3 ist das DFF-45, ein 40 kDa Protein aus dem Bereich der DNA-assoziierten Enzyme, das den sog. „DNA fragmentation factor-40 (DFF-40)“ inhibiert und durch Spaltung seine Inhibitorfunktion verliert, was den Weg für DFF-40 in den Zellkern freimacht, wo es direkt die nukleäre DNA abbaut (LIU et al. 1997).

Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase, kurz PARP, ein wichtiges DNA-Reparaturenzym, das Chromatin reparaturbedürftiger DNA über seine „zinc finger portion“ ADP-ribosyliert,

gehört ebenfalls zu den Substraten der akt. Caspase-3. Mit der Spaltung von PARP verliert die Zelle die Möglichkeit, beschädigte DNA erkennen und reparieren zu können (KLICHE et al. 1999, ELDADAH und FADEN 2000).

Zusätzlich interferiert die akt. Caspase-3 mit Mechanismen der DNA-Replikation und Regulatorproteinen wie Bcl-2. Normalerweise anti-apoptotisch, spaltet Caspase-3 Bcl 2- und Bcl-x<sub>L</sub> und erzeugt so C-terminale Bruchstücke, die pro-apoptotisch wirksam werden (CHENG et al. 1997).

Eine zusätzliche Möglichkeit der Caspase-Aktivierung ist Interaktion dieser Enzyme untereinander. Dabei aktivieren in der Regel Caspasen, die zu Beginn des Apoptosezyklus stehen (z.B. Caspase-8 oder -9) Caspasen, die im Ablauf der Apoptose später auftreten (z.B. Caspase-3 oder -7) durch Proteolyse am Aspartat-Rest zwischen großer und kleiner Untereinheit (BUDIARDJO et al. 1999).

Eine dritte Variante der Caspase-Aktivierung ist die Autoaktivierung, für die allerdings im Moment noch keine ausführlich beschriebene Theorie existiert (NICHOLSON 1999).

Die Abfolge der Ereignisse, die zu einer Aktivierung der Caspase führen, so wie die Aktivierungsprozesse selbst, sind komplex und am Ende für die betroffene Zelle tödlich.

Aus diesem Grund existieren eine Reihe von zelleigenen Inhibitoren, die den Ablauf des programmierten Zelltodes an verschiedenen Punkten zu regulieren vermögen.

Diese Inhibitoren umfassen einmal die Gruppe der IAP, „inhibitors of apoptosis“ wie auch Mechanismen von Scheinrezeptoren und kompetitive Adaptermoleküle. Die ersten IAP wurden bei dem Baculovirus *Cydia pomonella* und *Orgyia pseudotsugata* entdeckt und mittlerweile sind fünf IAP, die im humanen Zellstoffwechsel wirken, identifiziert worden (ELDADAH und FADEN 2000).

Sie zeichnen sich aus durch N-terminale Abfolgen von etwa 65 Aminosäuren, die als „baculovirus IAP repeats“, kurz BIR, bezeichnet werden. Zusätzlich besitzen die meisten IAP C-terminal eine RING Domäne (eine spezielle Art von „Zink-Finger“ mit 40 bis 60 Resten, die zwei Atome Zink binden und Interaktionen zwischen Proteinen vermitteln), die mittels einer Zink-Finger ähnlichen Region die Interaktion zwischen den Proteinen moduliert, wobei die allermeisten IAP nicht nur eine solche BIR-Region sondern zwei oder drei solcher Abfolgen besitzen.

Diese IAP blockieren die Caspasen durch mindestens zwei unterschiedliche Mechanismen:

entweder durch direkte Inhibition der aktiven Enzyme oder durch die Blockierung der Procaspasen. Das Prinzip der Scheinrezeptoren beruht darauf, dass sie zwar homolog z.B. zu Fas sind, aber keine funktionsfähige zytoplasmatische „death domain“ besitzen. Somit sind sie zwar in der Lage einen entsprechenden Liganden zu binden, ohne dabei allerdings den funktionsfähigen Todesrezeptor zu aktivieren (GOLSTEIN 1997).

Kompetitive Adaptermoleküle, bezeichnet als sog. „vFLIPs“ („viral FADD-like ICE inhibitor proteins“) sind Proteine, die zwei N-terminale „death effector domains“ besitzen, die ihre Bindung an FADD, Procaspase-8 oder Procaspase-10 medieren. Als Folge davon wird die Anlagerung der Procaspase an DISC blockiert und damit die Rezeptor-vermittelte Apoptose verhindert (ELDADAH und FADEN 2000).

### **2.2.2 Tiermodelle der zerebralen Ischämie**

Studien zu beinahe jedem Krankheitsprozess setzen Tiermodelle als einen Ansatz zu ihrer Erforschung ein, einmal um das klinische Problem so akkurat wie möglich nachzuvollziehen, zum anderen um in Frage kommende therapeutische Ansätze zu evaluieren (GREEN und CROSS 1997).

Gerade für die Erforschung ischämischer Läsionen des zentralen Nervensystems, die dabei ablaufenden Mechanismen und therapeutischen Möglichkeiten, sind reproduzierbare Tiermodelle aus verschiedenen Gründen von großer Bedeutung.

Der Schlaganfall des Menschen ist in seinem Vorkommen, seiner Ausprägung, seiner Entstehung und seinem Verlauf so mannigfaltig, dass das Ausmaß an Präzision und Kontrolle, wie es im Tiermodell vor allem in den ersten Minuten nach stattgefundenener Schädigung möglich ist, dort niemals zu finden sein würde (GINSBERG und BUSTO 1989).

Zudem erfordern zahlreiche Fragestellungen aus Histopathologie, Biochemie und Physiologie direkten Zugang zum Gehirn und damit invasive chirurgische Eingriffe, die ebenfalls aus ethisch-moralischen Gründen am Menschen nicht in der Form, wie es im Tierversuch möglich ist, durchführbar sind (GINSBERG und BUSTO 1989).

Grundsätzlich unterscheidet man bei Modellen zur zerebralen Ischämie zwischen den zwei verschiedenen Prinzipien der globalen Ischämie und der fokalen Ischämie:

Zu dem Modell der inkompletten globalen zerebralen Ischämie gehört das sog. „Two Vessel Occlusion Model of Forebrain Ischemia“, bei dem bilateral die beiden Aa. carotides

communes verschlossen werden und eine systemische Hypotension auf 50 mmHg herbeigeführt wird. Dieses Modell hat sich als Alternative zum „Four Vessel Occlusion Model“ etabliert und führt zu einem ischämischen Zellschaden im Bereich selektiv-vulnerabler Zellen wie z. B. in der CA1-Region des Hippokampus, im Kaudoputamen und Neokortex. Die Vorteile dieses Modells liegen in der weniger aufwändigen chirurgischen Präparation, der hochgradigen Vorderhirnischämie und der Eignung für Studien, die eine längere Überlebenszeit der Versuchstiere vorsieht. Nachteile sind die für den Eingriff notwendige Anästhesie und die variablen pathologischen Ergebnisse bei nicht präzise induzierter Hypotension. Ferner kann dieses Modell wegen der Anästhesie nicht zu unmittelbar postischämisch durchzuführenden Verhaltenstests herangezogen werden (GINSBERG und BUSTO 1989, GREEN und CROSS 1997).

Weitere Möglichkeiten sind die Dekapitation mit Untersuchung des Gehirns unmittelbar im Anschluss an die Tötung des Tieres, oder die „Levine Preparation of Hypoxia-Ischemia and it's Modifications“, eine Methode bei der unilateral die A. carotis communis verschlossen wird und die Tiere am darauffolgenden Tag graduell bis zu 45 min einer anoxischen Umgebung ausgesetzt werden.

Vorteile dieses Modells sind, dass es relativ leicht zu realisieren ist und sich die Auswirkungen von Hypoxie und Ischämie parallel gut vergleichen lassen.

Das Problem bei diesem Modell ist allerdings, dass das Gehirn nicht wirklich ischämisch ist und sich die Ergebnisse wohl nicht auf eine tatsächliche globale zerebrale Ischämie übertragen lassen (GINSBERG und BUSTO 1989).

Das „Four Vessel Occlusion Model of Forebrain Ischemia“ erlaubt es, eine hochgradige Vorderhirnischämie bei vollem Bewusstsein und voller Mobilität der Tiere zu induzieren.

Dabei werden 24 Stunden nach dem temporalen Verschluss der beiden bilateralen Aa. carotides communes die Aa. vertebrales mit Hilfe einer Elektrokoagulation permanent verschlossen. Vorteile dieses weit verbreiteten und gründlich studierten Modells ist die variable Anwendbarkeit bei wachen oder anästhesierten Tieren. Bedeutender Nachteil ist allerdings, dass bei gleichem Prozedere nicht alle damit arbeitenden Labors zufriedenstellende Ergebnisse erzielen können und die Operation in zwei Teilen erfolgen muss (PULSINELLI und BRIERLEY 1979, GINSBERG und BUSTO 1989, GREEN und CROSS 1997,).

Das „Bihemispherical forebrain compression-ischemia model“ arbeitet mit einer Erhöhung des zerebrospinalen Flüssigkeitsdruckes über Zugabe von künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit in die Zisterna magna. YOSHIDA et al. haben 1985 das Konzept dahingehend modifiziert, dass

sie zusätzlich zu einer Erhöhung des Flüssigkeitsdrucks bilateral die Aa. carotides communes verschlossen haben. Über eine variierte Erhöhung des intrazerebralen Drucks lässt sich so eine komplette (90-130 mmHg) oder eine inkomplette (10-15 mmHg) Ischämie induzieren.

GINSBERG und BUSTO (1989) haben die temporäre unilaterale Okklusion der A. carotis communis mit einer Erhöhung des intrazerebralen Drucks kombiniert und gleichzeitig den arteriellen Blutdruck konstant bei 100-110 mmHg gehalten. Diese Variante führt zu einem stark reduzierten Blutfluss im dorsolateralen und lateralen Neokortex, im Hippokampus und im ipsilateralen Kaudoputamen. Diese Methoden kommen ohne chirurgische Interventionen aus und führten zu einer einseitigen Hemisphärenläsion immer gleicher Topographie.

Weitere Methoden globale zerebrale Ischämie zu induzieren sind zum einen das aufblasbare Nackenband (unter Anästhesie), das den zerebralen Blutfluss auf unter 1% des normalen Wertes reduzieren soll (SIEMKOWICZ und HANSEN 1978). Neben den Kopfarterien und -venen, die abgedrückt werden, lastet auch auf den übrigen zervikalen Strukturen deutlicher Druck.

Das am häufigsten verwendete Modell zur Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie ist das der sog. „Middle Cerebral Artery Occlusion“, kurz MCAO. Es ist ein Modell, das wegen seiner Bedeutung gerade für Fragestellungen in der Humanmedizin (die A. cerebri media ist das am öftesten betroffene Gefäß während eines Schlaganfalles beim Menschen) über die letzten Jahre stark an Bedeutung gewonnen hat (MOLINARI 1988, GREEN und CROSS 1997).

Um eine Okklusion der A. cerebri media herbeizuführen finden Kauterisation, Clips, Fäden, intraluminale Einführung eines Fadens oder die photochemische Induktion eines Thrombus Anwendung. Dieses Modell ist bestens beschrieben, und die zahlreichen Modifikationen erlauben eine gewisse Auswahl, was die betroffenen Gehirnbereiche angeht.

Ein Nachteil dieses Modells ist die große Varianz was die Durchführung der Okklusion und die Größe der Läsion und die Effizienz therapeutischer Ansätze angeht. Sie haben zu großen Unterschieden in den Ergebnissen zwischen verschiedenen Labors geführt hat, was die Größe der Läsion und die Effizienz therapeutischer Ansätze angeht. Ebenso haben sich Unterschiede aus der Verwendung verschiedener Rattenstämme ergeben (GREEN und CROSS 1997).

Eine weitere Variante der MCAO-Induktion ist unter anderem der Schlaganfall bei einem spontan hypertensiven Versuchstier (GINSBERG und BUSTO 1989).

Die photochemisch induzierte Thrombosierung umgeht das Problem massiver chirurgischer Intervention. Mit einem photosensitiven Farbstoff (Rose Bengal), der in das Gefäßsystem injiziert wird und durch Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge zu einer Aggregation von Thrombozyten und Erythrozyten führt, wird eine Thrombosierung der Gefäße einer gewünschten Region verursacht. Einer der großen Vorteile, die diese Methode bietet, ist die Möglichkeit an jeder beliebigen Stelle des Kortex eine konstante ischämische Läsion zu setzen, wobei die Schwere der Läsion abhängt von der Intensität des Laserstrahls, der Dauer der Bestrahlung und der Menge des gegebenen Farbstoffes. Großer Nachteil dieses Modells ist die endarterielle Okklusion, die keinen Therapieansatz durch Perfusion durch Kollateralgefäße erlaubt (GINSBERG und BUSTO 1989).

Ein weiterer Ansatz, die Anfänge thromboembolischer Veränderungen nachzustellen, ist die Injektion von kleinen (35  $\mu\text{m}$ ) Karbon Mikrosphären in die A. carotis interna, die dort zu multifokalen Infarkten führen (KOGURE et al. 1974).

Das Problem bei dieser Methode ist jedoch, dass sich die Verteilung dieser Mikrosphären nicht kontrollieren oder beeinflussen lässt. Somit ist es nicht möglich, von Größe und Lokalisation her gleichartige Läsionen zu induzieren (GREEN und CROSS 1997).

In der hier vorliegenden Studie wird das Modell einer temporären (45 min), rechtsseitigen, inkompletten Hemisphärenischämie durch Okklusion der rechten A. carotis communis kombiniert mit hämorrhagischer Hypotension (MAP = 40 mmHg) und anschließender Reperfusion verwendet, erstmals beschrieben bei BAUGHMAN et al. (1988).

Es hat sich gezeigt, dass diese Versuchsmodelle die Möglichkeiten zur Erforschung der zerebralen Ischämie, deren begleitende Mechanismen, ihre Prävention und Behandlung bieten, wenn die physiologischen Variablen, die die Schwere einer solchen Läsion modulieren, genau überwacht und möglichst konstant gehalten werden (GINSBERG und BUSTO 1989).

Das in dieser Studie verwendete Tiermodell simuliert ischämische Verhältnisse im Gehirn, wie sie in klinischen Situationen, z. B. Schlaganfall, Trauma sowie neuro- und herzchirurgische Eingriffe, am Patienten vorkommen.

### 2.3 Untersuchte Anästhetika

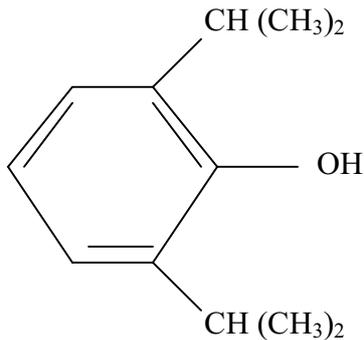
Für Anästhetika werden neuroprotektive Wirkungen postuliert. Als Mechanismen werden dabei unter anderem eine verbesserte Balance zwischen Substratangebot und -bedarf, Suppression der Sympathikusaktivität und der Krampfpotentiale, Umverteilung der Gehirndurchblutung zugunsten ischämischer Bereiche, Hypothermie, Radikalfängereigenschaften und, bei Gabe intravenöser Anästhetika, eine Senkung des intrakraniellen Drucks diskutiert (WERNER 2000).

Zahlreiche Studien beschäftigen sich in unterschiedlichen Ansätzen mit verschiedenen Anästhetika und deren neuroprotektiven Potentialen. So untersuchten beispielsweise CAVAZZUTI et al. (1987) die Auswirkungen von Ketamin auf den zerebralen Blutfluss und Metabolismus. Ketamin wird neben Radikalfängerfunktionen eine nicht-kompetitive, antagonistische Wirkung an den N-Methyl D-Aspartat-Rezeptoren (kurz NMDA-Rezeptoren) zugesprochen. Den Barbituraten beispielsweise werden sowohl Radikalfängereigenschaften als auch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonistische Wirkung zugesprochen. Propofol reduziert u.a. die elektrische Aktivität im Gehirn (AMORIM et al. 1995). Und auch Inhalationsanästhetika wie Isofluran, Desfluran oder Sevofluran werden funktionelle  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonistische Eigenschaften zugesprochen (HENNES und JANTZEN 1997).

#### 2.3.1 Propofol

##### 2.3.1.1 Allgemeines

Propofol ist ein einfach gebauter Phenolabkömmling, der seit den 1980er Jahren als allgemeines Anästhetikum und Hypnotikum in Form einer Öl in Wasser Emulsion mit 1% oder 2% 2,6-Diisopropylphenol (s. Abb. 03) in 10% Sojabohnenöl, 2,5% Glycerol und 1,2% Eiphosphatiden Verwendung findet.



**Abb. 03:** Molekülstruktur von Propofol (2,6-Diisopropylphenol).

Es zeichnet sich aus durch eine hohe Lipophilie und seine schnelle Biotransformation (fast ausschließlich in der Leber). Seine kurze Wirkungsdauer (5-10 Minuten) wird gewährleistet einmal durch die rasche Umverteilung innerhalb des Körpers, bedingt durch die hohe Lipophilie und zum anderen durch rasche Biotransformation (FREY et al. 1996).

Seine Metaboliten sind inaktiv und werden zu knapp 90% über die Nieren ausgeschieden (WIEBALCK und VAN AKEN 1995).

### 2.3.1.2 Neuroprotektives Potential

Der Einfluss von Propofol auf zerebrale Strukturen beinhaltet einen Abfall sowohl des arteriellen Mitteldrucks als auch des intrazerebralen Drucks, wobei der Perfusionsdruck des neuronalen Gewebes nahezu konstant bleibt (WIEBALCK und VAN AKEN 1995).

Die Propofol-induzierte verringerte elektrische Aktivität (burst-suppression) des EEG ist die Folge einer Aktivierung der  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Rezeptoren (kurz GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren) (HARA et al. 1993). Dieser inhibitorische Effekt verringert die synaptische Aktivität und könnte die Reduktion der elektrischen Aktivität erklären (AMORIM et al. 1995).

Propofol verringert außerdem den zerebralen Blutfluss und führt zu einer geringeren Stoffwechselrate von Glukose und Sauerstoff (KELLY et al. 1999).

Der ATP-Verbrauch sinkt unter dem Einfluss von Propofol ebenfalls ab, was als eine Folge der reduzierten elektrischen Aktivität erklärt werden könnte, aber ebenso ein Effekt der mit dem Propofol applizierten Lipide ist (AMORIM et al. 1995, ZHU et al. 1997).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Propofol wohl in der Lage ist, nach einer kurzen ischämischen Phase mit anschließender Reperfusion den „delayed neuronal death“ zu verhindern (YAMAGUCHI et al. 1999).

So demonstrieren BIANCHI et al. (1991) in einem Versuch an Ratten, dass Propofol in der Lage ist, Glutamat-abhängigen Eintritt von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Synaptosomen zu verhindern. Dies ist ein Effekt, der unter Umständen mit der Blockade der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle nach Depolarisation durch Glutamat zusammenhängt.

KOCHS et al. weisen 1992 nach, dass Propofol, in Dosen die zu einer „burst-suppression“ des EEG führen, gegenüber einer Fentanyl/Lachgas-Anästhesie nach inkompletter zerebraler Ischämie zu einem verbesserten neurologischem Endergebnis führt und weniger Neurone absterben.

HANS et al. zeigen 1994, dass hohe Dosierungen von Propofol in der Lage sind, NMDA-Rezeptor mediierte Glutamat-Neurotoxizität abzuschwächen.

ZHU et al. hingegen stellen 1997 in einer Studie eine Erhöhung des neuronalen Zellschadens durch NMDA unter Propofolgabe und Normothermie ( $37^{\circ}\text{C}$ ) fest.

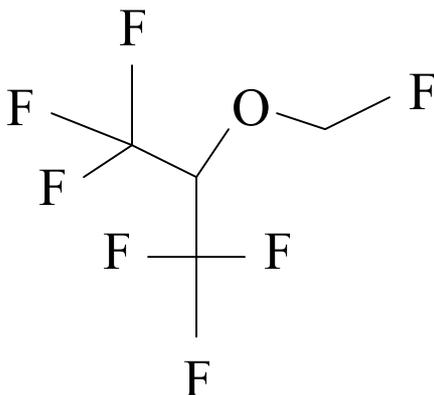
Auch AMORIM et al. können 1995 nachweisen, dass Propofol unter normothermen Bedingungen ( $37^{\circ}\text{C}$ ) zu keiner Reduktion des anoxischen Schadens führt, unter hyperthermen Bedingungen bei  $39^{\circ}\text{C}$  allerdings eine Schädigung durch elektrophysiologische Vorgänge signifikant verringert werden kann. Wobei dieser Effekt nur dann eintritt, wenn Propofol vor Erhöhung der Temperatur appliziert wird.

### **2.3.2 Sevofluran**

#### **2.3.2.1 Allgemeines**

Sevofluran (Fluormethyl-1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propylether) gehört zu den neueren, volatilen Anästhetika .

Es ist ein nichtentzündlicher Methylpropyläther (s. Abb. 04), der durch seine Halogenierung mit Fluor im Vergleich zu beispielsweise Isofluran eine geringere Löslichkeit im Blut aufweist, allerdings in dem Isofluran ähnlicher Weise den zerebralen Sauerstoffverbrauch sowie metabolische und die elektroenzephalographische Aktivität reduziert (CONZEN und NUSCHELER 1996).



**Abb. 04:** Strukturformel von Sevofluran (Fluormethyl-1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propylether).

Die reduzierte Löslichkeit des Sevofluran drückt sich in dem sog. Blut-Gas-Verteilungskoeffizienten aus (Sevofluran 0,65 im Vergleich zu 1,40 von Isofluran). Die geringere Löslichkeit bedeutet bessere Steuerbarkeit der Narkose, die An- und Abflutungszeiten sind kürzer (CONZEN und NUSCHELER 1996).

Sevofluran wird zu etwa 2 bis 5% in der Leber verstoffwechselt, wobei das Stoffwechselprodukt Hexafluoroisopropanol aufgrund schneller Entgiftung keine Risiken für die Leber birgt.

Die dabei entstehenden Fluoridionen führten zu einer Einstufung als potentiell nephrotoxischer Stoff. Die bei Ratten festgestellte Nephrotoxizität konnte allerdings beim Menschen nicht bestätigt werden (CONZEN und NUSCHELER 1996).

### 2.3.2.2 Neuroprotektives Potential

Der Einfluss von Sevofluran auf das zentrale Nervensystem umfasst entsprechend einer reduzierten elektro-enzephalographischen Aktivität dosisabhängig eine Verminderung des zerebralen Sauerstoffverbrauchs und eine minimale Reduktion des zerebralen Blutflusses.

WERNER et al. konnten 1995 bei Ratten unter Sevoflurananästhesie ein verbessertes neurologisches Ergebnis nach inkompletter zerebraler Ischämie im Vergleich zu Tieren feststellen, die mit der Kombination Fentanyl/Lachgas anästhesiert worden waren.

Als hypothetischer Wirkmechanismus wird unter anderem eine Reduktion sowohl des peripheren als auch des zentralen Katecholamin-Umsatzes angenommen.

So stellten HOFFMAN et al. (1993) unter Fentanyl/Lachgas-Narkose intraschämisch einen Anstieg der zerebralen NoradrenalinKonzentration fest, wohingegen unter Halothan- bzw. Isofluran -Narkose eine erniedrigte Katecholaminkonzentration gemessen wurde, so dass diese beiden Inhalationsanästhetika wohl durch einen erniedrigten Sympathikotonus zu einer Reduktion des zerebralen Schadens führen können.

Ein weiterer Protektionsmechanismus könnte der Einfluss des Sevofluran auf inhibitorische GABA-Rezeptoren sein, die unter Sevofluran-Anästhesie stimuliert werden und so die betroffene Zelle hyperpolarisieren. So wird das Membranpotential der Zelle stabilisiert und die Zelle selbst weniger anfällig gegenüber exzitatorischen Impulsen (HIROTA und ROTH 1997).

KITAGUCHI et al. konnten 1995 in ihrer Studie zeigen, dass Sevofluran keinerlei Einfluss auf die zerebrale Autoregulation und die CO<sub>2</sub>-Reaktivität entwickelt, und gleichzeitig sowohl den zerebralen Sauerstoffverbrauch als auch den zerebralen Blutfluss zu senken vermag.

TONER et al. (2001) konnten in ihrer Studie nachweisen, dass Sevofluran, ähnlich dem Halothan, eine Reduktion des Ischämie-induzierten Dopaminaustritts sowie eine Verringerung der Glutamat- und Aspartat-Freisetzung bewirkt.

Als weitere Wirkungen von Sevofluran werden unter anderem eine dosisabhängige Vasodilatation mit Erhöhung des zerebralen Blutflusses und einer Reduktion des zerebralen Gefäßwiderstandes diskutiert (BUNDGAARD et al. 1998).

Insgesamt zeigt sich, dass Sevofluran in der Lage ist in ischämischem, neuronalen Gewebe neuroprotektiv zu wirken. Es sind jedoch nur wenige Details über die Auswirkungen von Sevofluran oder Propofol über einen längeren Reperfusionzeitraum (bis 28 Tage) auf den programmierten Zelltod und eine Aktivierung des Apoptose-assoziierten Proteins Caspase-3 bekannt.

### 3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### 3.1 Ziel dieser Untersuchung

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von Sevofluran und Propofol auf den nekrotischen und apoptotischen Zelltod einen, drei, sieben und 28 Tage nach inkompletter zerebraler Ischämie mit Reperfusion in der Ratte.

Bisherige Studien, die sich desselben oder eines sehr ähnlichen tierexperimentellen Modells der inkompletten zerebralen Ischämie bedient haben, konnten bereits nachweisen, dass Tiere nach einer inkompletten zerebralen Ischämie sowohl unter Propofol- als auch unter Sevoflurananästhesie ein deutlich besseres Ergebnis in nachfolgenden neurologischen sowie histologischen Untersuchungen aufwiesen als Tiere, die demselben ischämischen Insult unter Fentanyl/Lachgas-Anästhesie ausgesetzt waren (KOCHS et al. 1992, HOFFMAN et al. 1993, WERNER et al. 1995). Allerdings sind die Folgen der Ischämie auf die Apoptose weitgehend unklar.

Akt. Caspase-3 gehört zu den sogenannten Apoptose-assoziierten Proteinen und wird erwartungsgemäß verstärkt dort exprimiert und aktiviert, wo im Verlauf des Tierversuches im neuronalen Gewebe Apoptose induziert wurde (THORNBERRY und LAZEBNIK 1998). Mit Hilfe spezifischer Antikörper kann gezielt akt. Caspase-3 in einer einfachen und einer doppelten Färbung detektiert werden.

Weiterhin wird mit Hilfe der HE-Färbung unter dem Lichtmikroskop eine Differenzierung in ischämisch geschädigte, nekrotische (eosinophile Anfärbung) Neurone und ungeschädigte (lila-blaue Anfärbung) Neurone vorgenommen und so das Ausmaß der Zell- und Gewebeschädigung bei allen Versuchstieren ermittelt.

Die hier zugrundeliegende Studie beschäftigt sich mit einer qualitativen und quantitativen Bestimmung dieses Apoptose-spezifischen Proteins und bedient sich dabei unterschiedlicher immunhistochemischer Nachweismethoden.

Ziel dieser Untersuchung ist es, zu vier bestimmten Zeitpunkten (nach einem, drei, sieben und 28 Tagen Reperfusionszeit) tiefere Einblicke in die genaueren Abläufe der Apoptose zu erhalten. So sollen die neuroprotektiven Eigenschaften von Propofol und Sevofluran über einen Zeitraum von 28 Tagen näher definiert werden, um möglicherweise ischämische Geschehnisse und deren mittelbare und unmittelbare Folgen mit diesen Anästhetika gezielt beeinflussen zu können.

### 3.2 Material und Methodik

#### 3.2.1 Versuch

Der Versuch (genehmigt nach §8 des deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25.05.1998, BGBl I S. 1105) umfasst Untersuchungen an 104 männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Fa. Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) mit einem Gewicht von ca. 450 g.

##### 3.2.1.1 Versuchstiere

Die Tiere werden spätestens eine Woche vor dem Versuch in Gruppen zu höchstens fünf Tieren in einen Gruppenkäfig (Makrolon Typ 4) gesetzt, wobei Futter und Wasser den Tieren bis 16 h vor Beginn der Operation ad libitum zur Verfügung stehen. 16 Stunden vor Versuchsbeginn wird den Tieren dann das Futter entzogen, Wasser steht ihnen weiterhin ad libitum zur Verfügung.

Dieser Nahrungsentzug soll zu einem niedrigen normoglykämischen Zustand (60-80 mg/dl Glukose) vor und während der Operation führen.

##### 3.2.1.2 Versuchsaufbau

Der Versuch besteht aus einem operativen Teil, der die Ischämie und die anschließende Reperfusion umfasst, und aus der sich anschließenden, laboranalytischen Untersuchung des Gehirns mit HE-Färbung und dem qualitativen und quantitativen Nachweis des Apoptose-assoziierten Proteins akt. Caspase-3.

Alle Tiere werden unmittelbar vor der Operation einer kurzen Allgemeinuntersuchung unterzogen, um sicherzustellen, dass nur klinisch gesunde Tiere in diesen Versuch eingehen. Zudem werden vor Operationsbeginn sämtliche technischen Geräte auf ihre Funktionalität hin überprüft.

Alle Tiere werden während der Phase der Präparation (1,5 h) mit 2,0 Vol% Isofluran (Forene, Fa. Abbot GmbH, Wiesbaden) in O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O (FiO<sub>2</sub>=0,33) anästhesiert, bis zu Beginn der Äquilibrations-Phase entsprechend der Gruppenzuordnung die Umstellung der Narkose auf entweder Propofol oder Sevofluran erfolgt.

### **3.2.1.3 Gruppeneinteilung**

Um die 96 Tiere des Versuchs auf die insgesamt 12 unterschiedlichen Gruppen aufzuteilen, wird vor Versuchsbeginn zweimal randomisiert: das Versuchstier wird per Los einer der drei Anästhetika-Gruppen sowie einem der vier Überlebenszeitpunkte zugewiesen.

Zu den oben aufgeführten 96 Tieren kommen noch acht Ratten, die Tiere der sog. Nativ-Gruppe hinzu.

*Tab. 01: Gruppeneinteilung der Versuchstiere*

<b>Postoperative Überlebenszeit</b>	<b>Tiere der Kontroll-Gruppe</b>	<b>Tiere der Propofol-Gruppe</b>	<b>Tiere der Sevofluran-Gruppe</b>
<b>Tag 01</b>	8	8	8
<b>Tag 03</b>	8	8	8
<b>Tag 07</b>	8	8	8
<b>Tag 28</b>	8	8	8
<b>Gesamtzahl</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>

*Gruppeneinteilung der Versuchstiere in die Kontroll-Gruppe und die Propofol- bzw. Sevofluran-Gruppe dieses Versuchs, aufgeteilt nach den vier Überlebenszeitpunkten.*

#### **3.2.1.3.1 Tiere der Nativ-Gruppe**

Die acht Tiere dieser Gruppe durchlaufen keinen Versuch und werden nach der üblichen Eingewöhnungs-Phase von einer Woche zum Zweck der Gehirnentnahme in tiefer Narkose euthanasiert.

Das neuronale Gewebe dieser unbehandelten Nativ-Tiere soll einen physiologischen Vergleichswert der Konzentration an akt. Caspase-3 und eosinophilen Zellen im Hippokampus und Gyrus dentatus zu den Tieren der Propofol-, Sevofluran- und Kontroll-Gruppe liefern.

Die Ergebnisse dieser Gruppe werden im Folgenden mit den Resultaten der beiden Behandlungsgruppen Sevofluran und Propofol sowie mit den Ergebnissen aus der Kontroll-Gruppe verglichen.

### 3.2.1.3.2 Tiere der Kontroll-Gruppe

Die 32 Tiere der Kontroll-Gruppe durchlaufen alle sechs Phasen des Versuches von Präparation über Ischämie bis hin zur Erholungs-Phase (s. Abb. 06) und erhalten dabei eine Narkose bestehend aus Fentanyl (Fa. Janssen-Cilag GmbH, Neuss) in einer Dosierung von 25µg/kg/min in Kombination mit Lachgas (N<sub>2</sub>O) in O<sub>2</sub> im Verhältnis von 1:2.

Diese Narkose hat nachweislich keinen protektiven Effekt auf neuronales Gewebe (MORIMOTO et al. 1997). In dieser Gruppe kommt kein weiteres Narkotikum zum Einsatz.

Mit Hilfe der Kontroll-Gruppe sollen die Auswirkungen der Ischämie auf das ungeschützte neuronale Gewebe sichtbar gemacht werden, wobei die Ergebnisse dieser Kontroll-Tiere später in Bezug zu den Tieren aus beiden Behandlungs-Gruppen (Sevofluran und Propofol) und den unbehandelten Nativ-Tieren gesetzt werden.

### 3.2.1.3.3 Tiere der Propofol-Gruppe

Die 32 Tiere der Propofol-Gruppe durchlaufen ebenfalls alle sechs Phasen des Versuches (s. Abb. 06). Hier wird zu Beginn der Äquilibrierungs-Phase die Narkose auf Propofol (Fa. Astra-Zeneca, Wedel) (Bolus 10 µg/kg, danach Infusion 25 µg/kg/h i.v.) umgestellt. Zusätzlich wird das Muskelrelaxans Rocuroniumbromid (Esmeron, Fa. Organon, Oberschleißheim) in der Dosierung 25 mg/kg/h verabreicht. Beatmet werden die Tiere mit O<sub>2</sub>/Luft (FiO<sub>2</sub>=0,33). Diese Narkose wird in dieser Gruppe immer beibehalten.

### 3.2.1.3.4 Tiere der Sevofluran-Gruppe

Die 32 Tiere dieser Gruppe durchlaufen ebenfalls alle sechs Phasen des Versuches (s. Abb. 06). Zu Beginn der Äquilibrierungs-Phase wird die Narkose von Halothan auf Sevofluran (Abbot GmbH, Wiesbaden) in einer Dosierung von 2 Vol% in Kombination mit O<sub>2</sub> in Luft (FiO<sub>2</sub>=0,33) umgestellt. Zusätzlich wird ebenfalls das Muskelrelaxans Rocuroniumbromid (Esmeron, Fa. Organon, Oberschleißheim) in der Dosierung 25 mg/kg/h verabreicht. Diese Narkose wird bis zum Versuchsende beibehalten.

### 3.2.1.4 Narkose

Zur Narkoseeinleitung werden die Tiere in einen Glaszylinder, Durchmesser ca. 25 cm, gesetzt, in dem sich ein mit Halothan (Halothan ASID, Rüscher Hospital Vertriebs GmbH, Böblingen) getränkter Tupfer befindet.

Sobald bei dem Tier Bewusstlosigkeit eingetreten ist, entnimmt man es aus dem Glaszylinder und fixiert es sorgsam mit den Schneidezähnen des Oberkiefers in einer Drahtschlinge, um die endotracheale Intubation durchzuführen. Ein Tubus (Cavafix certo 255, Fa. Braun AG, Melsungen) wird mit einem eigens für den Versuch konstruierten Laryngoskop nach STEIGENBERGER intubiert.

Im Anschluss daran wird das Tier an eine volumengesteuerte Beatmungspumpe (Harvard Rodent Ventilator, Model 683, Harvard Apparatus Inc., South Nantick Massachusetts, USA) angeschlossen und mit einer Sauerstoff/Lachgas Mischung im Verhältnis 1:2 in Kombination mit Isofluran 2,0-2,5 Vol% (Forene, Abbot GmbH, Wiesbaden) kontrolliert beatmet. Hierbei handelt es sich um ein halboffenes System ohne Rückatmung mit einer konstanten Frischgaszufuhr von ungefähr 2 l/min und einer Gasabsaugung.

Diese Form der Narkose wird während der gesamten Phase der Präparation aufrechterhalten.

Sobald dann die Präparation der Gefäße abgeschlossen ist und die Messsonden sicher verankert liegen, wird die Narkose des Tieres entsprechend der jeweiligen Behandlungsgruppe (Sevofluran- oder Propofol-Gruppe) umgestellt.

### 3.2.1.5 Chirurgische Präparation

Zur chirurgischen Präparation wird das Tier auf den Rücken gelegt.

Die Haut über den Präparationsstellen (am rechten Oberschenkel medial, ventromedial am Hals) wird rasiert und mit Desinfektionsmittel eingesprüht (Cutasept F, Fa. Bode, Hamburg).

Die nachfolgend verwendeten Katheter werden im Vorfeld mit heparinisierendem (Liquemin N 25000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen) Sterofundin (Sterofundin, Fa. Braun AG, Melsungen) gespült um später einer Thrombosierung des entnommenen Blutes entgegenzuwirken. In der rechten Inguinalgegend wird mit einer Skalpellklinge eine Inzision der Haut vorgenommen, die weitere Präparation in die Tiefe erfolgt stumpf bis zur Freilegung von jeweils A., V. und N. femoralis.

Nun wird der N. femoralis möglichst schonend aus dem Gefäß-/Nervenpaket herauspräpariert und A. und V. femoralis werden beide von dem sie umgebenden Bindegewebe befreit und

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

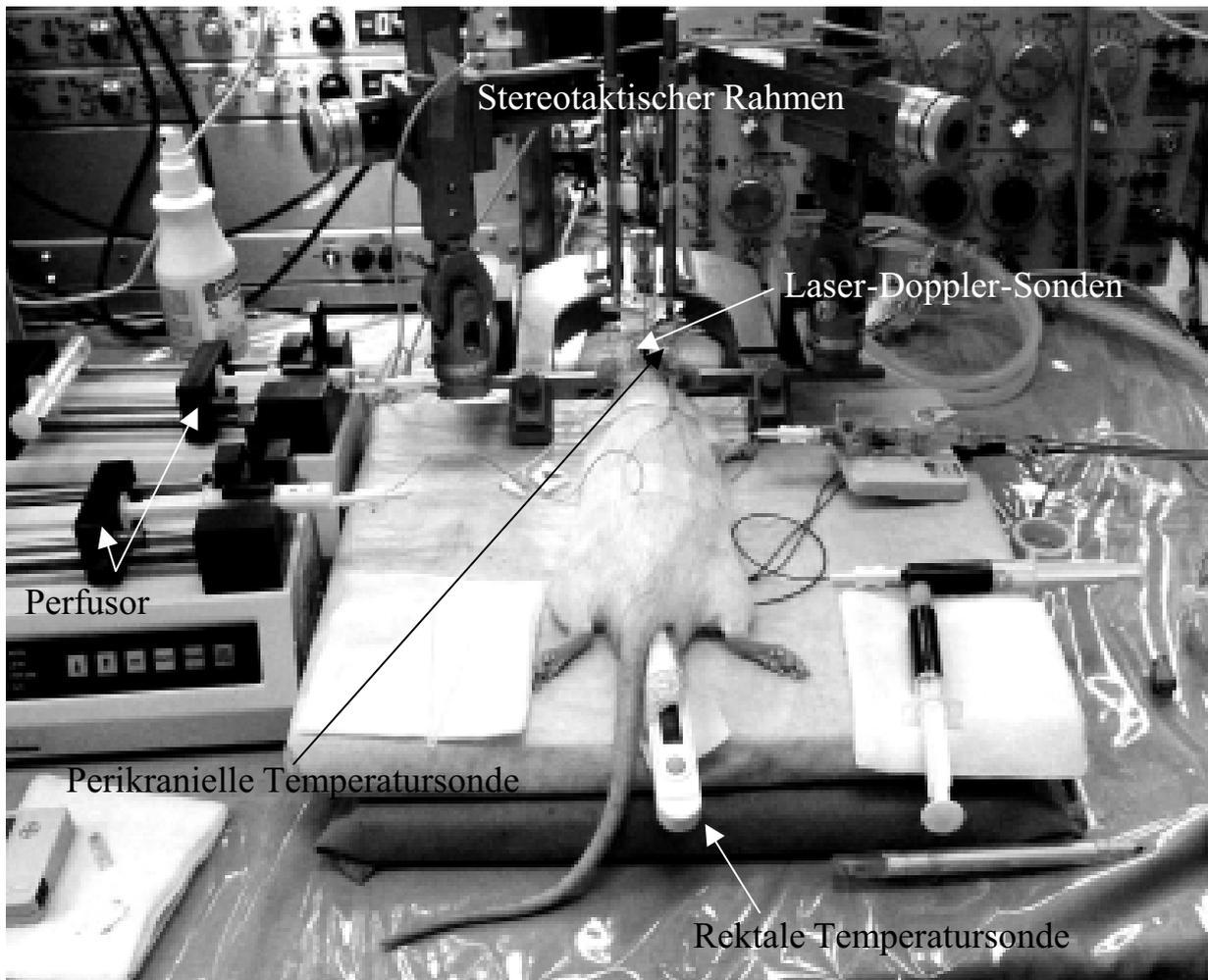
---

jeweils isoliert dargestellt. Unter Zuhilfenahme eines angespitzten Polyethylen-Katheters (Außendurchmesser 0,97 mm, Innendurchmesser 0,58 mm, eigene Herstellung) schafft man sich den Zugang zur A. femoralis. Dieser dient später sowohl der invasiven Blutdruckmessung (mittels Cardiocap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) als auch der Entnahme arteriellen Blutes zur Blutgasanalyse.

In die V. femoralis wird ein stumpfer Katheter gelegt, um später den für die Herbeiführung der Ischämie benötigten Blutentzug sowie die Reinfusion durchführen zu können. Beide Katheter werden jeweils mit Fäden gut fixiert.

Für die Darstellung der A. carotis communis und der V. jugularis führt man an der rechten Halsseite kaudoventral paramedian einen Schnitt aus und präpariert auch hier wieder stumpf in die Tiefe. Zuerst wird die V. jugularis im Sulcus jugularis zwischen M. brachiocephalicus und M. sternooccipitalis liegend dargestellt. Es werden zwei stumpfe PE-Katheter in die V. jugularis eingeführt und ebenso mit Faden gut fixiert, um die i.v. Applikation der Medikation leicht durchführen zu können. Als nächstes wird die A. carotis communis dargestellt. Sie liegt in der Tiefe ventrolateral der Trachea, wobei hier besonders vorsichtig mit dem Truncus vagosympathicus zu verfahren ist, der der Arteria im Bereich der Trachea unmittelbar anliegt. Sobald der Vagusnerv von der Arterie behutsam abpräpariert worden ist, wird das isolierte Gefäß lose mit einem Gummiband von 1 mm Breite (Fa. Ethicon, Norderstedt) umschlungen und wieder in die Tiefe zurückverlegt, ohne hierbei jedoch den Blutdurchfluss zu unterbrechen.

Damit ist die Phase der Präparation abgeschlossen.



**Abb. 05:** Versuchsanordnung mit den wichtigsten Gerätebezeichnungen: die Ratte lagert (hier während der Ischämie-Phase) im stereotaktischen Rahmen fixiert und die Messsonden sind vollständig angebracht.

### 3.2.1.6 Ischämie-Modell

#### Phase der Äquilibration:

Die 52-minütige sog. Äquilibrations-Phase, die dem eigentlichen Ischämiebeginn vorgeschaltet ist, soll eine Umstellung der Narkose von Isofluran auf das Anästhetikum der jeweiligen Gruppe, also Fentanyl/Lachgas, Propofol oder Sevofluran, sicherstellen und eine Stabilisierung des Kreislaufs nach der Präparation ermöglichen. Somit werden gleiche Ausgangsbedingungen für sämtliche Versuchstiere geschaffen.

Gegen Ende dieser Äquilibrations-Phase werden die sog. präischämischen Basiswerte bestimmt (Ausgangswert).

### Phase des Blutentzugs:

Nach 52 Minuten der Äquilibration und Stabilisierung folgt die Phase der Hypoperfusion.

Es wird in einem Zeitraum von exakt acht Minuten möglichst genau die Menge Blut entnommen (über den in der V. femoralis liegenden Katheter), die notwendig ist, um im Tier einen mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) von 40 mmHg zu erzeugen und zu erhalten.

Die dabei entnommene Blutmenge schwankt in einem Bereich von  $13 \pm 3$  ml Blut.

Dieses Blut wird in heparinisierten 5 ml-Spritzen (Fa. Braun AG, Melsungen) bis zur Reinfusion unter die Wärmelampe neben dem Tier gelegt, um einem zu starken Auskühlen vorzubeugen. Zusätzlich werden die Spritzen alle fünf Minuten geschwenkt um eine Blutzellsenkung in der Spritze zu verhindern. Sobald der MAP einen Wert von 40 mmHg erreicht hat, wird zusätzlich die rechte A. carotis communis mit einem Clip verschlossen.

Zum Ende der Äquilibrations-Phase ersetzt man für die Dauer der Ischämie-Phase das Muskelrelaxans Rocuroniumbromid durch Natriumhydrogencarbonat 8,4% (Fa. Braun AG, Melsungen) in einer Dosierung von 2,8 ml/kg/h zur Vorbeugung einer durch die Ischämie entstehenden Azidose.

### Phase der Ischämie:

Erreicht der MAP einen Wert von 40 mmHg und ist die A. carotis communis mit dem Clip verschlossen, beginnt die 45-minütige Ischämie-Phase. Um den MAP soweit wie möglich konstant zu erhalten, wird je nach Bedarf während der Ischämie Blut in geringfügigen Mengen aus der V. femoralis entnommen oder wieder zugegeben.

Gegen Ende der 45-minütigen Ischämie-Phase werden ein weiteres Mal die physiologischen Messwerte dokumentiert (45 Isch) (s. Abb.06 und Tab. 02).

### Phase der Reperfusion:

Die Phase der Reperfusion beginnt mit dem Lösen des Clips an der A. carotis communis. Weiter wird das vor der Ischämie entnommene Blut gleichmäßig langsam über 15 min reinfundiert.

Gegen Ende der Reperfusion nach 15 Minuten wird erneut Blut zur Blutgasanalyse über den Katheter der A. femoralis entnommen und alle weiteren Messwerte dokumentiert (s. Abb. 06 und Tab. 02).

### Phase der Erholung:

Nach der vollständigen Rückgabe des zuvor entnommenen Blutes beginnt die 45-minütige Erholungs-Phase, auch Recovery-Phase genannt.

Diese Phase dient der Erholung und Stabilisierung des Kreislaufes bei allen Tieren, um später eine möglichst gleiche Ausgangsbasis für die Untersuchung des Gehirnes zu schaffen.

Nach 45 Minuten wird aus dem Katheter in der A. femoralis eine Blutprobe zur Blutgasanalyse und Dokumentation der übrigen Messwerte entnommen (45 Rec) (s. Abb. 06 und Tab. 02).

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

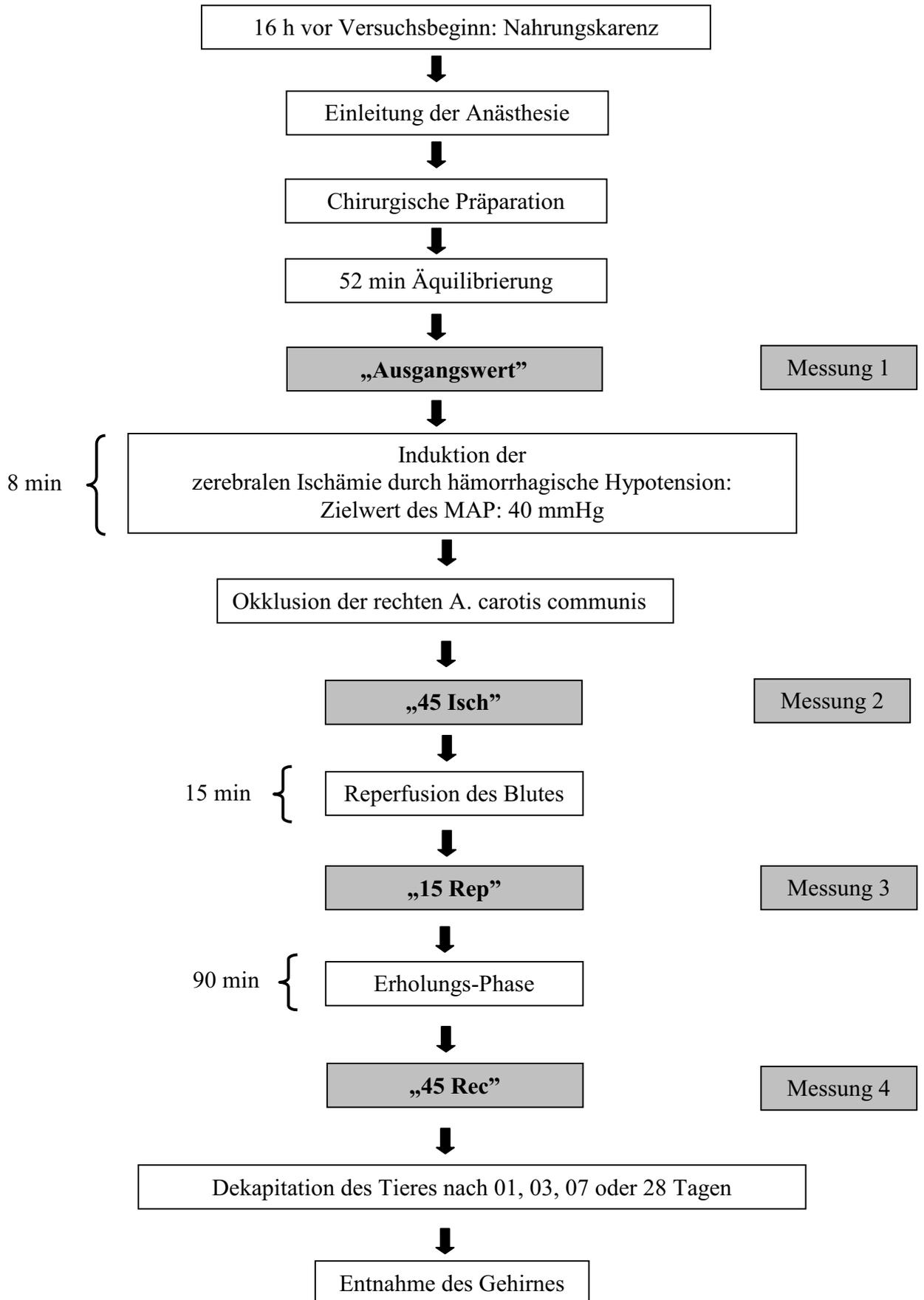


Abb. 06: Schematische Übersicht über den Versuchsablauf.

### 3.2.1.7 Physiologische Variablen

Während des gesamten operativen Geschehens werden zu bestimmten Zeiten bestimmte Werte gemessen, um einerseits einen konstanten Versuchsablauf zu gewährleisten, und andererseits kritische Situationen frühzeitig erkennen zu können.

Die erste Messung erfolgt gegen Ende der Äquilibration (Ausgangswert).

Die zweite Bestimmung der Messwerte erfolgt 45 min nach Beginn der Ischämie (45 Isch), die dritte Messung gegen Ende der 15-minütigen Reperfusion (15 Rep). Die vierte und letzte Bestimmung der physiologischen Variablen erfolgt nach 45 min in der Erholungs-Phase (45 Rec).

Die untenstehende Tabelle soll eine Übersicht über die erhobenen Messwerte liefern:

**Tab. 02: Messzeitpunkte der Messparameter**

Messzeitpunkt	Messwert	Gemessene Parameter
Gegen Ende der Äquilibration-Phase	Ausgangswert	MAP
45 min nach Einsetzen der Ischämie	45 min Ischämie (45 Isch)	periphere Temperatur perikranielle Temperatur
Nach Abschluss der Reinfusion des zuvor entnommenen Blutes	15 min Reperfusion (15 Rep)	paCO <sub>2</sub> , paO <sub>2</sub> , pH-Wert Gesamthämoglobin
Nach 45 min in der Erholungs-Phase	45 min Erholung (45 Rec)	Blutglukose

*Messzeitpunkte und Messwerte, die während der operativen Phase im Versuch erhoben werden.*

#### Blutdruck:

Die Blutdruckmessung erfolgt durch einen Katheter in der rechten A. femoralis.

Dieser Katheter ist an einen sog. Druckdom gekoppelt (MX 960, Fa. Medex, Lancashire, Großbritannien). Ein angeschlossener, mit NaCl 0,9% gefüllter Beutel hält den nötigen Gegendruck aufrecht und dient gleichzeitig als Gegenspülung. Von diesem Druckdom existiert eine weitere Verbindung zu der eigentlichen Messapparatur (Cardiicap II, Fa. Datex,

Helsinki, Finnland), mit der neben dem systolischen (SAP) und dem diastolischen Blutdruck (DAP) auch noch der arterielle Mitteldruck (MAP) angezeigt wird.

Vor Versuchsbeginn wird jeweils eine Kalibrierung der Messapparatur mit einem Druckausgleich durchgeführt, um sie den herrschenden äußeren Druckverhältnissen anzupassen.

### Atmung:

Die Atmung wird mit Hilfe eines Atemgasmonitors (Capnomac, Fa. Datex Helsinki, Finnland) überwacht.

Gemessen werden Atemdruck, Atemfrequenz, Atemvolumen sowie die endexpiratorischen Gaskonzentrationen von jeweils Isofluran, Sauerstoff, Lachgas und Kohlendioxid.

### Laser-Doppler-Flussmessung:

Mit dem Laser-Doppler Periflux 4001 Master (Fa. Perimed, Järfälla, Schweden) werden relative Veränderungen der lokalen kortikalen Hirndurchblutung in willkürlichen Einheiten (beispielsweise in Perfusion Units, PU) gemessen (FASANO et al. 1988).

Bereits in der Präparations-Phase wird dazu die Haut am Schädeldach rasiert, desinfiziert und anschließend auf ca. 1,5 cm Länge median eröffnet.

Das darunter liegende Periost wird mit einem Knochenschaber beiseite geschoben und mit vier Moskitoklemmen fixiert, um das knöcherne Schädeldach für die weitere Versuchsdurchführung zugänglich zu halten.

Anschließend wird das Schädeldach mit einem kleinen Diamantbohrer (Diamant-Schleifstift Kugelform; Durchmesser 1 mm, Fa. Proxxon, Niersbach) beidseitig rechts und links neben der Sutura sagittalis flächig, nicht penetrierend bis auf die innerste Knochenlamelle abgefräst.

Die Messsonden besitzen eine Reichweite von 1mm, weshalb das Abfräsen der knöchernen Schädeldecke nötig ist. Auf exakt diesem abgeschliffenen Bereich werden die beiden Messsonden platziert; die Ratte wird dabei mit dem Kopf in einen stereotaktischen Rahmen (Fa. Kopf, Tujunga, USA) eingespannt, um eine exakte Fixation des Kopfes und der darauf angebrachten Messsonden zu ermöglichen.

Da es wichtig ist, dass die Sonden auch tatsächlich die Gehirndurchblutung messen und nicht etwa die Knochendurchblutung oder die Durchblutung eines größeren Gefäßes, wird der Sitz der Sonden vor der Versuchsdurchführung mit einer sog. CO<sub>2</sub>-Provokation überprüft: die Beatmung mit Isofluran wird auf 1 Vol% reduziert und das Tier gleichzeitig kurz hyperventiliert. Als Reaktion auf diese Hyperventilation fällt der CO<sub>2</sub>-Partialdruck im Blut ab,

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

was wiederum über eine Vasokonstriktion der kleineren Gehirngefäße zu einer Reduktion der Gehirndurchblutung führt. Sinkt nun die Gehirndurchblutung durch die Hyperventilation um mehr als 10%, gilt der CO<sub>2</sub>-Provokationstest als positiv und die Sonden sitzen korrekt.

Fällt der Test negativ aus, werden die beiden Sonden neu platziert und die CO<sub>2</sub>-Provokation nach kurzer Erholung wiederholt.

### Temperatur:

Die Messung der perikraniellen Temperatur erfolgt mit einer Temperatursonde (Hypodermic Needle Probes Hyp f-30-1/2-T-G-60-SMP-M, Stamford, USA), die in den rechten M. temporalis eingestochen wird. Diese Sonde ist gekoppelt mit einem Temperatur-Kontrollgerät (Ω Omega, Stamford, USA) und einer über dem Tier angebrachten Wärmelampe.

Diese Wärmelampe schaltet sich bei einem Abfall der perikraniellen Temperatur auf unter 37,4°C ein und beim Erreichen einer perikraniellen Temperatur von 37,6°C wieder ab.

Die Messung der peripheren Temperatur erfolgt über eine in den Enddarm eingeführte Temperatursonde.

### Blutgasanalyse, BGA:

Zur Durchführung der BGA wird zu den genannten Messzeitpunkten (s. Tab. 02) über den arteriellen Katheter Blut mit einer heparinisierten Kapillare (MultiCap 175µl, Chiron Diagnostics GmbH, Fernwald) abgenommen.

Folgende Parameter werden mit Hilfe des pH/Blutgas Analyzer 1306 (Fa. Instrumentation Laboratory, Mailand, Italien) bestimmt:

pH-Wert

arterieller Sauerstoffpartialdruck, paO<sub>2</sub>

arterieller Kohlendioxidpartialdruck, paCO<sub>2</sub>

Hämoglobinkonzentration

Hämatokrit

Die Bestimmung der Blutglukose erfolgt mit Hilfe eines Schnelltests (Glucometer Elite , Fa. Bayer Diagnostics, München).

### Elektrokardiographie, EKG:

Die Ableitung des EKG erfolgt über zwei Nadelelektroden, die ventral am Thorax rechts und links etwa einen Zentimeter neben dem Brustbein auf Höhe der Achselhöhle eingestochen werden. Die Elektroden sind mit dem selben Gerät verbunden, welches auch den MAP anzeigt (Cardiocap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland). Die Herzfrequenz wird durch Anlegen eines EKG-Lineals am kurzzeitig gestoppten EKG-Monitor ausgemessen. Diese Maßnahme ist erforderlich, da die Ruhfrequenz bei Ratten ca. 400 Schläge pro Minute beträgt und dieser hohe Messwert mit der numerischen Anzeige, die auf 250 begrenzt ist, nicht erfasst werden kann.

### Elektroenzephalographie, EEG:

Die Messung des EEG erfolgt über fünf Nadelelektroden, wobei jeweils zwei Elektroden auf beiden Seiten des Kopfes etwa 5 mm kaudal des lateralen Augenwinkels senkrecht zur Haut so eingestochen werden, dass die Elektroden den Schädelknochen berühren.

Zwei weitere Nadelelektroden werden rechts und links über dem Ohransatz auf die selbe Weise platziert. Die Erdungselektrode wird an der Schwanzwurzel angebracht. Somit wird eine weitgehend störungsfreie Ableitung des EEG der rechten und linken Gehirnhälfte gewährleistet (Oscilloscope, Hameg 20 MHz, HM205-3, Frankfurt).

Das EEG wird während des laufenden Versuches beurteilt und die Narkosetiefe über das Vorhandensein eines sog. „burst-suppression“-Musters gesteuert. Eine weitere Auswertung erfolgt nicht.

## **3.2.2 Probengewinnung**

Nach der einen, drei, sieben oder 28 Tage dauernden Überlebenszeit werden die Tiere euthanasiert und das Gehirn zur histologischen Bearbeitung entnommen.

### **3.2.2.1 Dekapitierung**

Das Tier wird in einen Glaszylinder mit einem Durchmesser von ca. 25 cm gesetzt, in dem ein mit Halothan getränkter Tupfer liegt. Die Ratte wird bis zur tiefen Bewusstlosigkeit betäubt, aus dem Gefäß entnommen und schließlich nach dem Durchtrennen der Nackenmuskulatur mit einem Scherenschlag durch Genickbruch getötet.

### 3.2.2.2 Präparation und Resektion des Gehirnes

Um das Gehirn darstellen zu können, wird zuerst die Kopfhaut, beginnend rostral der Ohren hinunter bis zu den Augen abpräpariert. Anschließend wird der M. temporalis beiderseits vom Schädelknochen abgehoben und beiseite gelegt. Mit Hilfe einer Hohlmeißelzange wird dann die verbliebene Nackenmuskulatur sowie Os occipitale und Os parietale entfernt. Kranial des Gehirnes werden die Nn. optici mit einem feinen Spatel abgetrennt, ebenso die übrigen, basal gelegenen Gehirnnerven.

Man platziert den Spatel basal des Gehirnes und hebt es anschließend vorsichtig aus seiner knöchernen Umgebung heraus. Sobald das Gehirn entnommen worden ist, wird von dessen rostralem Ende ein 1 mm langes Stück abpräpariert. Kaudal wird sowohl das gesamte Kleinhirn wie auch ein 1 mm großes Stück des Großhirnes mit einem Skalpell abgetrennt und verworfen.

Anschließend verbringt man das so vorbereitete Gehirn vorsichtig mit einer Pinzette in einen Aluminiumzylinder (Durchmesser 1,5 cm, Höhe 2,5 cm).

Dieser Zylinder ist bereits zur Hälfte mit einem Einfriermedium (Tissue Freezing Medium, Fa. Jung, Leica Instruments, Nussloch), gefüllt. Das Gewebe wird vorsichtig bis an den Boden des Zylinders gedrückt und mit Einfriermedium vollständig aufgefüllt.

Mit Hilfe einer Klemme wird das von Gefriermedium bedeckte Gewebe in ein mit Trockeneis gekühltes Gefäß mit 2-Methylbutan (Fa. Merck, Darmstadt) gehalten und tiefgefroren, um so einen Schutz vor kältebedingten Gewebeläsionen zu gewährleisten.

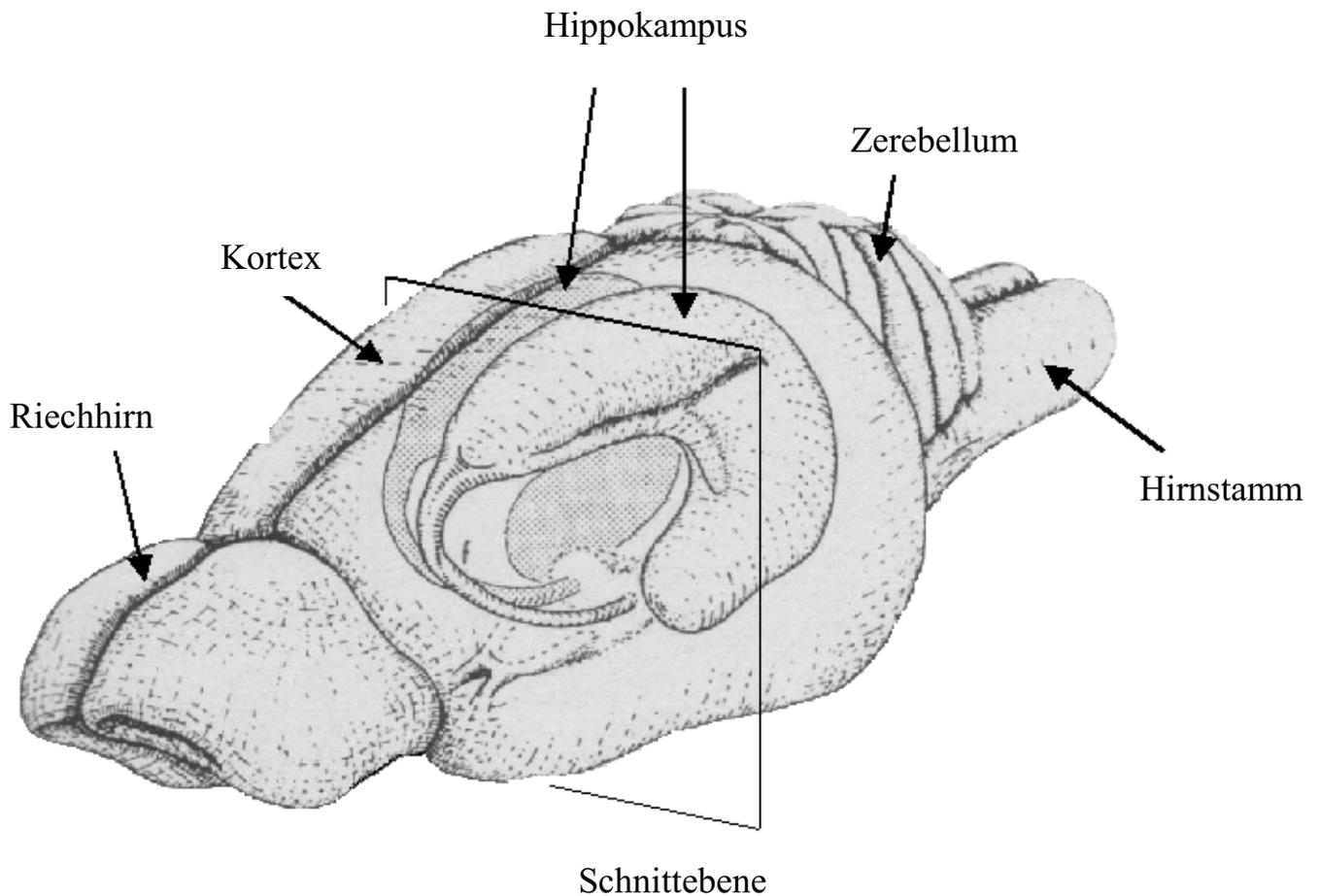
Ist das Einfriermedium nach etwa zehn Minuten komplett durchgefroren, wird der Zylinder bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zu seiner weiteren Verarbeitung gelagert.

### 3.2.2.3 Aufbereitung des Gehirns

Vor dem Schneiden wird das Gewebe aus dem Aluminiumzylinder entnommen und das Einfriermedium möglichst vollständig entfernt. Das Gehirn wird auf einen Objektisch mit Hilfe von Einfriermedium aufgefroren und in den Objektischhalter des Kryotoms eingespannt.

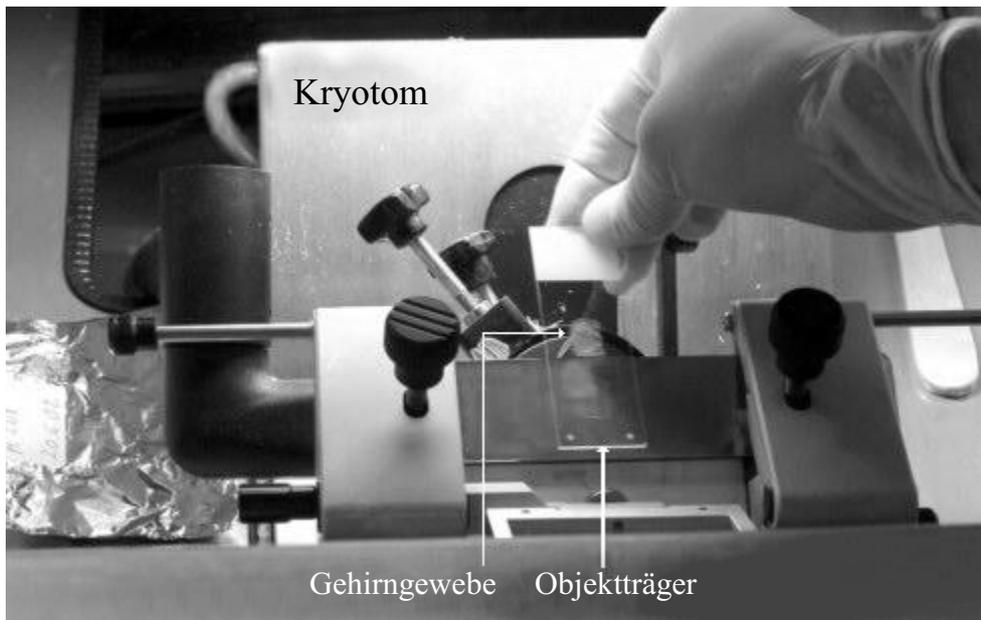
Nach einer Äquilibrationszeit von etwa 30 Minuten auf eine Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  werden von rostral beginnend mit dem Kryotom (Microtom-Kryostat, HM 500 QM, Fa. Microtom GmbH, Walldorf), Kammertemperatur  $-24^{\circ}\text{C}$ , 20  $\mu\text{m}$  dicke Scheiben des Gehirns abgehobelt um die Ausrichtung des Gewebes zum Messer zu prüfen und gegebenenfalls zu ändern. Es

wird hierbei die Schnittebene 33 nach PAXINOS und WATSON (1998) (Bregma -3,3 mm) angestrebt.



**Abb. 07:** Schematische Darstellung des Gehirns mit Hippokampus und der Schnittebene, modifiziert nach AMARAL und WITTER (1998).

Ist die richtige Schnittebene erreicht, fertigt man 100 Schnitte à 7  $\mu\text{m}$  bei einer Objekttemperatur zwischen  $-18$  und  $-20^\circ\text{C}$  an, wobei jeweils zwei Schnitte auf einen Objektträger aufgenommen werden. Eine konstante Kammertemperatur von  $-24^\circ\text{C}$  und eine Objekttemperatur von  $-20^\circ\text{C}$  minimieren die Varianz in der Schnittdicke. Die fertigen Schnitte werden in entsprechende Objektträgerkästen (Fa. Neo Lab, Heidelberg) einsortiert und für die weitere Verarbeitung bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.



*Abb. 08: Anfertigung der Schnittpräparate am Kryotom.*

### 3.2.3 Untersuchung des Gehirns

#### 3.2.3.1 HE-Färbung

##### 3.2.3.1.1 Färbevorgang

Die Schnitte werden zügig aus dem  $-70^{\circ}\text{C}$  Gefrierschrank entnommen, mit Bleistift beschriftet (zusätzlich zur Nummer des Objektträgers die Nummer des jeweiligen Tieres) und 10 min lang in Ethanol 100% pro analysi (Fa. Merck, Darmstadt) durch Flüssigkeitsentzug fixiert. Nach dieser Fixierung werden die Proben zur Rehydrierung in eine absteigende Alkoholreihe verbracht: 1 min in Ethanol 96% (Fa. Merck, Darmstadt) und dann 1 min in Ethanol 70% (Fa. Merck, Darmstadt).

Danach erfolgt die Färbung mit Hämalaun nach Mayer (eigene Herstellung), wobei die Schnitte für fünf Minuten im Farbstoff belassen werden. Anschließend wird unter Verwendung von normalem, kaltem Leitungswasser 10 min gewaschen, wobei in den ersten 5 min das Wasser jede Minute gewechselt wird, bis es auch nach dem Eintauchen des Objektträgerhalters klar bleibt. Sobald die Färbung mit dem Hämalaun abgeschlossen ist und die Schnitte gewaschen sind, werden sie 30 sec in Eosin (wässrige Eosin-Dinatrium Lösung, eigene Herstellung) getaucht. Danach wäscht man die Schnitte zwei Mal jeweils 30 sec in destilliertem Wasser.

Darauf folgt eine aufsteigende Alkoholreihe um die Schnitte vor dem Eindecken wieder zu dehydrieren, wobei die Objektträger zuerst 2 min in Ethanol 70% belassen werden und anschließend jeweils für 1 min in Ethanol 96% und in Ethanol 100% getaucht werden.

Nach der aufsteigenden Alkoholreihe werden die Schnitte zuerst für 2 min, danach für 5 min in Rotihistol (Fa. Roth, Karlsruhe) verbracht. Die Schnitte bleiben 5 min im zweiten Gefäß Rotihistol (Fa. Roth, Karlsruhe). Danach wird jeweils ein Objektträger aus der Rotihistol-Küvette entnommen und der Schnitt unter Verwendung von Roti Histokitt (Fa. Roth, Karlsruhe) eingedeckt. Danach trocknen die Proben zwei Tage an der Raumluft bevor sie endgültig beschriftet, einsortiert und in entsprechenden Objektträgerkästen bei Raumtemperatur gelagert werden.

### **3.2.3.1.2 Untersuchung mit dem Lichtmikroskop**

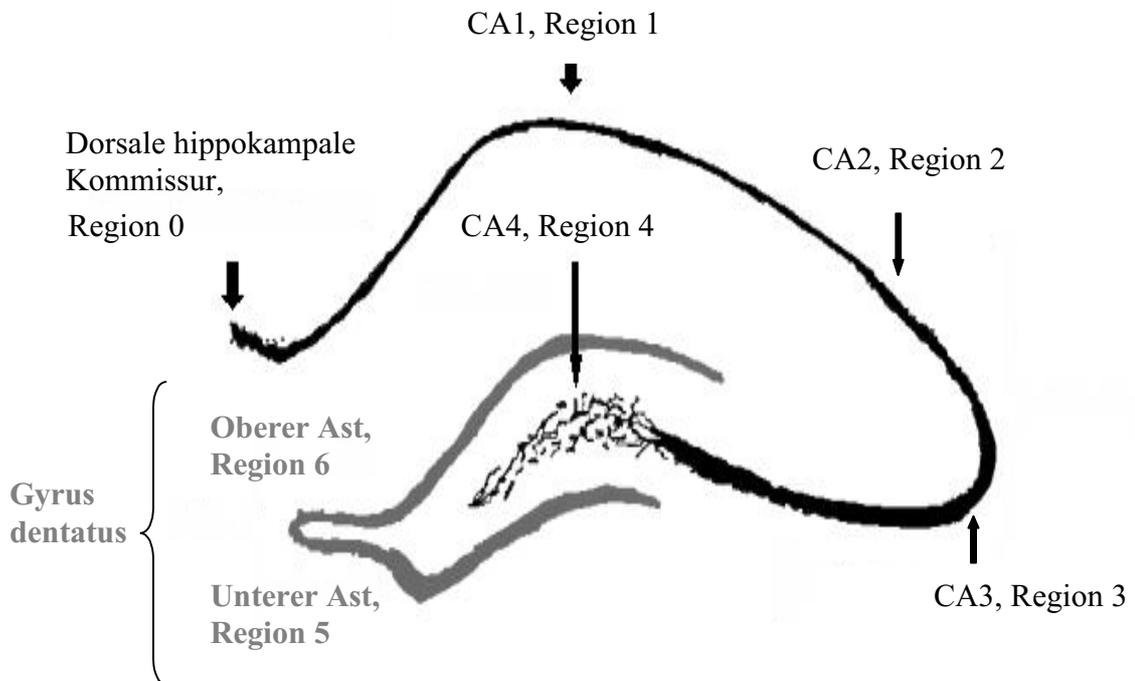
Um eine aussagekräftige Auswertung der gefärbten Schnitte zu ermöglichen, wird der Hippokampus in sieben verschiedene Abschnitte eingeteilt (s. Abb. 09):

Die CA1-Region unterteilt sich in die Region null, die die dorsale hippokampale Kommissur umfasst und die Region eins, die die restliche CA1-Region darstellt.

Region zwei und drei erstrecken sich über die Regionen CA2 bzw. CA3, die Region vier liegt zwischen den beiden Ästen des Gyrus dentatus und erstreckt sich über die CA4-Region des Hippokampus. Der Gyrus dentatus mit seinem oberen und unteren Ast ist aufgeteilt in Region fünf (oberer Ast) und Region sechs (unterer Ast).

Bei manchen Gehirnschnitten erstreckt sich ein Zellstrang von der Spitze des Gyrus dentatus an der Stelle an der oberer und unterer Ast zusammenlaufen, hinauf zum Beginn der CA1-Region. Dieser Bereich wird als Region sieben bezeichnet.

## Hippokampusformation und Gyrus dentatus



**Abb. 09:** Schematische Darstellung des Hippokampus und des Gyrus dentatus mit Bezeichnung der sechs Regionen aus der Schnittebene nach Abb. 07. Die siebte Region ist nicht dargestellt, sie zieht von der Spitze des Gyrus dentatus zur dorsalen hippocampalen Kommissur.

Es werden von jedem Tier insgesamt vier Gehirnschnitte HE gefärbt, wobei zwei Schnitte auf einen Objektträger sind. Von beiden Objektträgern wird jeweils der Hippokampus des rechten Schnittes unter dem Lichtmikroskop betrachtet; zuerst in einer Übersichtsvergrößerung (25-fach) mit eingeklappter Lupe, dann wird langsam hochvergrößert auf 400-fache Vergrößerung.

In der Übersicht achtet man dabei auf das Gesamtbild des Schadens, das sich im schwersten Fall als Gewebsverlust mit Verlagerung des Gehirnventrikels darstellt. In den höheren Vergrößerungen (100-, 200- und 400-fach) wird der Hippokampus stets nach dem gleichen

Prinzip untersucht: man beginnt in der Region CA1 und fährt den gesamten Hippokampus entlang ab bis an das Ende der Region vier, danach zuerst den oberen Ast des Gyrus dentatus und zuletzt den unteren Ast.

### 3.2.3.1.3 Klassifizierung des Schadens

Die unterschiedlichen Schadensbilder, die sich unter dem Lichtmikroskop in der HE-Färbung darstellen, werden in eine in Anlehnung an REMMELE (1984) und DAVID (1970) selbst erarbeitete Klassifizierung eingefügt. So wird eine Einordnung der verschiedenen Schadensbilder ermöglicht.

Hierbei unterscheidet man vier verschiedene Schweregrade, A bis D (s. Übersicht I und II, Bilder 01 bis 06).

A steht für die geringste Schadensausprägung, es ist lediglich eosinophile Zellschädigung ohne Ausbildung eines Gewebeödems zu erkennen. Grad B zeigt eosinophile Zellschädigung mit zusätzlich sichtbarem Gewebeödem, erkennbar an den aufgequollenen Gewebestrukturen in der unmittelbaren Umgebung des Hippokampus. Grad C ist gekennzeichnet durch eine sichtbare Organisation des geschädigten Gewebes und eine Einwanderung von Makrophagen in das Zellband von Hippokampus und Gyrus dentatus. Grad D steht für den größten Schaden, der durch Gewebsverlust und Zystenbildung in der rechten Hemisphäre gekennzeichnet ist.

Schnitte, die keinen sichtbaren Schaden und keine eosinophile Anfärbung von Zellen zeigen, sind dem Grad 0 zugeordnet.

Um zusätzlich nach dem Grad der Ausdehnung des Schadens differenzieren zu können, werden vier verschiedene Ausdehnungsgrade, eins bis vier, unterschieden.

Grad 1 ist der geringste Grad der Ausbreitung, es sind nur Teile des Hippokampus betroffen.

Bei Grad 2 sind im gesamten Hippokampus eosinophile Zellen sichtbar.

Grad 3 ist dadurch gekennzeichnet, dass neben der Hippokampusformation auch der Kortex mitbetroffen ist und dort eosinophile Zellen auftreten. Grad vier ist der schwerste Grad der Ausdehnung, hier ist neben der Hippokampusformation und dem Kortex auch das Basalganglion mit betroffen

### 3.2.3.1.4 Auswertung

Es werden mit einer Zählvorrichtung (Four Digit Hand-Held Tally Counter, Fa. Aldrich, Milwaukee, USA) in der 400-fachen Vergrößerung alle eosinophilen und basophilen Zellen der Hippokampusformation ausgezählt. Sie werden je nach Region erfasst und getrennt notiert.

Aus den Werten der eosinophilen und basophilen Zellen wird die Gesamtzellzahl der Hippokampusformation ermittelt und die Anzahl der eosinophilen Zellen in Prozent an der Gesamtzellzahl angegeben.

### 3.2.3.2 Immunhistochemische Detektion aktivierter Caspase -3

#### 3.2.3.2.1 Färbevorgang

Es werden pro Tier jeweils zwei Schnitte gefärbt.

Pro Färbedurchgang werden insgesamt 18 Schnitte gefärbt: acht Tiere mit je zwei Schnitten, ein Schnitt eines Nativ-Tieres als Negativkontrolle und ein Objektträger (OT) mit Thymusschnitten als Positivkontrolle (s.u.).

Die OT werden aus dem  $-70^{\circ}\text{C}$  Gefrierschrank entnommen, beschriftet und für 5 min bei Raumtemperatur in 4%iges Paraformaldehyd (PFA) (eigene Herstellung) verbracht und fixiert. Anschließend werden die Schnitte 5 min lang in einer Standkuvette auf dem Schüttler in einfachem PBS (1x PBS) (eigene Herstellung) gewaschen. Nach diesem Waschgang verbringt man die Schnitte in 3%iges  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Methanol (eigene Herstellung).

Im Anschluss daran werden die OT erneut in 1x PBS verbracht und gewaschen, um die Reste des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Methanol von den Schnitten zu entfernen.

Man entnimmt die OT aus der mit 200 ml PBS gefüllten Standkuvette einzeln. Das PBS wird abgeschüttelt und die Objektträgerrückseite getrocknet. Anschließend umfährt man das Gehirngewebe möglichst eng mit einem inerten Fettstift (Pap Pen, Daido Sangyo Co, Bezug über Fa. Peske, Augsburg), um ein Abfließen der aufgetragenen Flüssigkeiten während ihrer Inkubationszeit zu verhindern. Danach trägt man das Blockierungsmedium (Fa. DAKO, Hamburg) - jeweils 70  $\mu\text{l}$  pro Schnitt - innerhalb des Fettringes auf, platziert den OT in der feuchten Kammer und inkubiert das Gewebe 20 min lang mit dem Blockierungsmedium.

In der Zwischenzeit wird der Primärantikörper (Purified Rabbit Anti-Active-Caspase-3 Monoclonal Antibody, BD PharMingen, San Jose, USA) vorbereitet.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

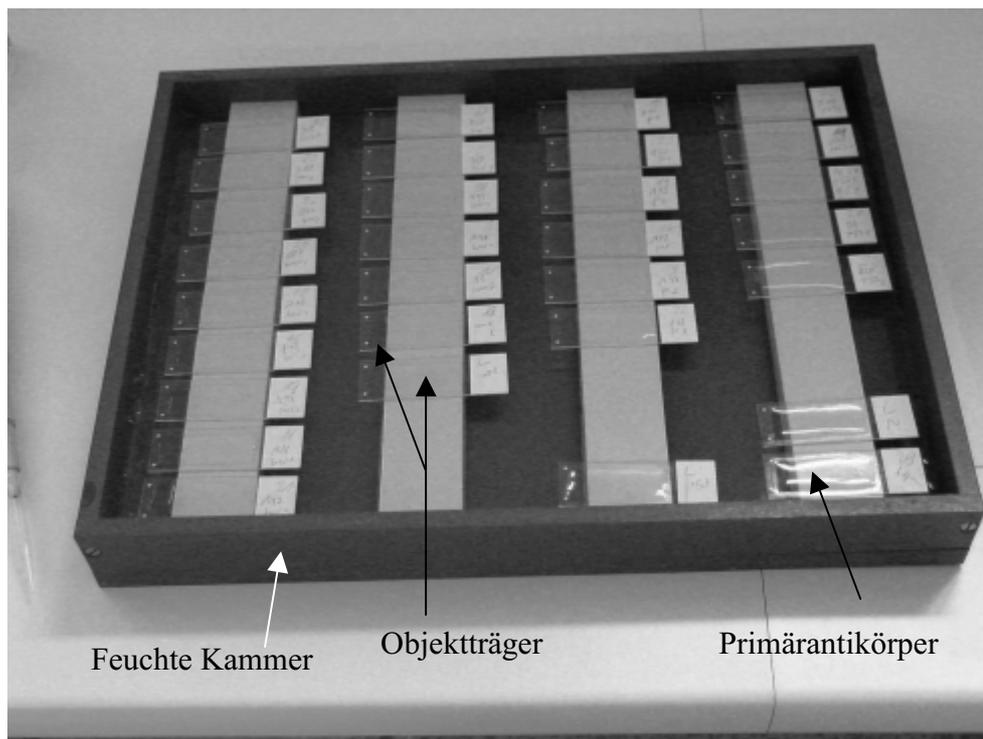
---

Die entsprechende Verdünnung wurde im Vorfeld über Verdünnungsreihen ermittelt, wobei die Verdünnung Verwendung findet, in der die geringste Hintergrundaktivität bei nach wie vor eindeutiger Färbung der positiven Zellen auftritt. Die in dieser Arbeit verwendete Verdünnung liegt bei 1:200.

Der Antikörper gegen akt. Caspase-3 wird bei Raumtemperatur in der Tischzentrifuge zentrifugiert, damit sich eventuell vorliegende Verunreinigungen des Antikörpers auf dem Boden des Gefäßes absetzen und nicht pipettiert werden. Nach dem Zentrifugieren entnimmt man die entsprechende Menge (4 µl) des Antikörpers und gibt sie in das Eppendorf-Gefäß, in dem sich schon die vorgelegte Menge, 800 µl, Blockierungsreagenz (Fa. DAKO, Hamburg) befindet.

Bevor der verdünnte Antikörper aufgetragen wird (45 µl pro Schnitt), wird das Eppendorf-Gefäß noch einmal geschüttelt, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten.

Nach der Inkubation wird das Blockierungsmedium ohne Waschen entfernt und der vorbereitete Antikörper gegen akt. Caspase-3 in der Verdünnung von 1:200 aufgetragen.



**Abb. 10:** Lagerung der Objektträger in der feuchten Kammer während der Inkubationszeit.

Nach einer Inkubationszeit von 50 min werden die OT wieder einzeln aus der feuchten Kammer entnommen, der aufgebrauchte Antikörper gegen akt. Caspase-3 wird abgeschüttelt und die OT wieder in einen Objektträgerhalter, stehend in 200 ml PBS, einsortiert.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

Die Küvette wird mit dem Objektträgerhalter auf den Schüttler gestellt und 6 min lang gewaschen, wobei wieder nach den ersten 3 min das PBS gewechselt wird.

Danach entnimmt man die OT erneut jeweils einzeln aus dem Objektträgerhalter, schüttelt sie ab, trocknet die Rückseite und reiht sie in der feuchten Kammer auf. Danach pipettiert man pro Schnitt je 40 µl Sekundärantikörper (aus dem Detektionskit Universal-LSAB TM, Fa. DAKO, Hamburg).

Nach 30 min Inkubationszeit folgt ein weiterer Waschgang, die Schnitte werden abermals aus der feuchten Kammer entnommen, der Sekundärantikörper abgeschüttelt und die OT rasch in den in 200 ml PBS stehenden Objektträgerhalter einsortiert, auf den Schüttler gestellt und 6 min lang gewaschen (nach 3 min wieder Wechsel des PBS).

Nach dem Waschen entnimmt man die Schnitte wieder, schüttelt das PBS ab, trocknet die Rückseite der OT und reiht sie in der feuchten Kammer auf. Dann wird das Streptavidin (aus dem Detektionskit Universal-LSAB TM, Fa. DAKO, Hamburg) pipettiert, jeweils wieder 45 µl pro Schnitt. Nach 45 min Inkubationszeit schüttelt man erneut den Antikörper ab und sortiert die OT wieder in den Objektträgerhalter, der in einer Glasküvette steht (mit 200 ml 1x PBS gefüllt). Es folgt ein Waschgang, wieder 2 x 3 min.

Diesem Waschgang schließt sich die Färbung mit braunem Chromogensubstrat (Fa. DAKO, Hamburg) an: Die OT werden einzeln aus der Glasküvette entnommen, abgetrocknet und auf einem weißen Papiertuch platziert, wo je Schnitt ein Tropfen Chromogensubstrat aufgetragen wird. Nach je 2 min wird das Chromogensubstrat abgeschüttelt und die OT in ein Gefäß mit destilliertem Wasser sortiert.

Die Schnitte werden 3x 10 min in destilliertem Wasser gewaschen.

Nach dem Waschen folgt die Gegenfärbung 1 min lang mit 4° C kaltem Hämalaun nach Mayer, dem sich erneut ein Waschgang mit normalem, kaltem Leitungswasser anschließt.

Die Schnitte werden dann aus der Küvette entnommen und auf einem Papiertuch fünf Minuten lang bei Raumtemperatur unter dem Abzug getrocknet.

Dem Trocknen schließt sich eine aufsteigende Alkoholreihe an, erst 70%iges Ethanol, dann 96%iges Ethanol und zuletzt 100%iges Ethanol, jeweils 1 min lang.

Zuletzt taucht man die Schnitte erst 2 und dann 5 min lang in Rotihistol (Fa. Roth, Karlsruhe) bevor sie mit Roti Histokitt (Fa. Roth, Karlsruhe) eingedeckt werden.

Die OT trocknen zwei Tage bei Raumtemperatur, bevor sie in Kästen einsortiert und bei Raumtemperatur gelagert werden.

Als Negativkontrolle bei dieser Färbung dient ein Schnitt von Tieren aus der Nativ-Gruppe (der Antikörper reagiert spezifisch mit akt. Caspase-3; da die Tiere aus der Nativ-Gruppe keiner ischämischen Provokation ausgesetzt sind, findet sich in ihren Gehirnen auch keine akt. Caspase-3). Als Positivkontrolle wird ein Gewebeschnitt Thymus juveniler Ratten mitgefärbt (im Thymus junger Ratten findet kontinuierlich Apoptose statt, weshalb sich dieses Gewebe als Positivnachweis eignet (UCKER et al. 1994, URBAN et al. 2002)). Bei erfolgreicher Färbung müssen also positive Resultate in Form braungefärbter Zellen unter dem Lichtmikroskop zu sehen sein.

### **3.2.3.2.2 Untersuchung mit dem Lichtmikroskop**

Die Schnitte werden zuerst in der geringsten Vergrößerung bei eingeklappter Lupe (25-fach) betrachtet, um einen Überblick über den Schnitt zu erhalten.

Anschließend klappt man die Lupe heraus und erfasst bei höchster Vergrößerung (400-fach) mit einer Zählvorrichtung (s. unter 3.2.3.1.4) alle akt. Caspase-3-positiven Zellen, die sich unter dem Lichtmikroskop braun darstellen.

Sie werden, wie auch in der HE-Färbung, entsprechend der Regionen-Einteilung (Abb. 09) ausgezählt und aufgeschrieben.

### **3.2.3.2.3 Auswertung**

Die Auswertung erfolgt rein zählerisch, wobei die einzelnen Werte der drei Behandlungsgruppen nach Abschluss der Auswertung in verschiedenen Tabellen miteinander verglichen werden.

### **3.2.3.3 Doppelfärbung von aktivierter Caspase-3 mit NeuN**

In einer einfachen akt. Caspase-3-Färbung lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, ob die detektierte Zelle tatsächlich ein Neuron darstellt, da von der Apoptose nicht nur Neurone, sondern ebenso Gliazellen wie z.B. Astrozyten betroffen sein können. Deshalb verwendet man zusätzlich zu dem Antikörper gegen die akt. Caspase-3 noch einen Antikörper gegen ein ausschließlich neuronales Strukturprotein, das sogenannte NeuN, um in der lichtmikroskopischen Betrachtung im Anschluss an die Färbung eine Unterscheidung

zwischen akt. Caspase-3-positiven Zellen und akt. Caspase-3-positiven Neuronen treffen zu können.

Die Verwendung unterschiedlicher Enzymsysteme und Farbstoffe macht es im letzten Färbeschritt möglich, zwischen akt. Caspase-3-positiven Neuronen und anderen akt. Caspase-3-positiven Zellen, wie z.B. Gliazellen, zu diskriminieren, indem sich Neurone rot und die sich darin befindende akt. Caspase-3 braun anfärben.

### 3.2.3.3.1 Färbevorgang

Jeweils ein OT mit zwei Gehirnschnitten wird von jedem Tier gefärbt.

In jedem Färbedurchgang wird ein Thymus-Präparat als Positivkontrolle mitgeführt, sowie ein Nativ-Tier als Negativkontrolle (s. Einfachfärbung unter 3.2.3.2.1)

Die OT werden aus dem  $-70^{\circ}$  C Gefrierschrank entnommen, beschriftet und sofort zur Fixierung in eine Standküvette, die mit 4% PFA (eigene Herstellung) gefüllt ist, für 5 min fixiert.

Anschließend wäscht man die Schnitte 5 min lang in PBS-Pufferlösung.

Danach verbringt man die OT für 10 min in 3%  $H_2O_2$ -Methanol, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Im Anschluss daran folgt ein weiterer Waschgang, in dem das Untersuchungsmaterial für 2x3 min in PBS-Pufferlösung verbracht wird. An diesen Waschgang schließt sich die Blockierung an. Man trägt, nachdem die beiden jeweiligen Schnitte mit dem inerten Fettstift umrandet worden sind, 50  $\mu$ l einer Serum-freien Blockierungslösung auf und inkubiert die Schnitte für 20 min in einer feuchten Kammer, um ein Austrocknen zu verhindern.

Anschließend trägt man pro Schnitt je 80  $\mu$ l des ersten Primärantikörpers aus dem Kaninchen (s. Einfachfärbung unter 3.2.3.2.1) gegen akt. Caspase-3 (Arbeitskonzentration 1:100) auf und inkubiert für 50 min in der feuchten Kammer. Im Anschluss daran werden die Schnitte 2x 3 min in PBS-Pufferlösung gewaschen, um anhaftende Reste von Primärantikörper vor dem nächsten Inkubationsschritt zu entfernen.

Der Sekundärantikörper (Biotinylated Anti-Rabbit, Fa. VectorLabs, Burlingame, USA) ist gegen Kaninchen-Antigen gerichtet und mit Biotin konjugiert. Es werden pro Objektträger 80  $\mu$ l in einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen und das Untersuchungsmaterial 45 min lang in der feuchten Kammer inkubiert. Danach schließt sich ein weiterer Waschgang an (2x 3 min in 1x PBS).

Im Anschluss daran trägt man das bereits gebrauchsfertig vorverdünnte, mit Peroxidase konjugierte Streptavidin (Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA) auf und inkubiert diesmal für 30 min in der feuchten Kammer. Es folgt ein weiterer Waschgang mit PBS-Pufferlösung (2x 3min), bevor der Farbstoff Diaminobenzidin (Fa. DAKO, Hamburg) aufgetragen und während 20 min in der feuchten Kammer die braune Farbe entwickelt wird. Wobei die Peroxidase das Diaminobenzidin in ein unlösliches braunes Farbstoffprodukt umsetzt.

Darauf folgt ein weiterer Waschgang (2x 3 min) in PBS-Pufferlösung, um Farbstoffreste zu entfernen.

Sobald der letzte Waschgang in diesem ersten Teil der Doppelfärbung beendet ist, entnimmt man die OT wieder aus der Pufferlösung, reiht sie in der feuchten Kammer auf und überschichtet mit dem zweiten, ebenfalls monoklonalen Primärantikörper (allerdings aus der Maus) gegen das neuronale Strukturprotein NeuN (Arbeitskonzentration 1:1000).

Das Untersuchungsmaterial verbleibt über eine Inkubationszeit von 50 min in der feuchten Kammer. An diesen Inkubationsschritt schließt sich ein Waschgang an (2x 3 min in 1x PBS). Danach folgt ein weiterer Inkubationsschritt, bei dem der biotinylierte Sekundärantikörper - gerichtet gegen Maus-Antigen- (Biotinylated Anti-Mouse Antibody, Fa. VectorLabs, Burlingame, USA) in einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen, und für 45 min auf dem zu untersuchenden Material in der feuchten Kammer belassen wird.

Nachdem die OT erneut 2x 3 min in 1x PBS auf dem Schüttler gewaschen worden sind, trägt man pro OT 80 µl mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Streptavidin (Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA) in der Verdünnung 1:200 auf und inkubiert über 30 min in der feuchten Kammer. Darauf folgt erneut ein Waschgang (2x 3 min in 1x PBS).

Anschließend gibt man den roten Farbstoff VectorRed (Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA) in vorgefertigter Pufferlösung auf die Gehirnschnitte und belässt ihn dort für 30 min. Danach werden die Schnitte wie schon nach der Einfachfärbung (siehe 3.2.3.2) eingedeckt und bei Raumtemperatur in Objektträgerkästen gelagert.

### **3.2.3.3.2 Untersuchung mit dem Lichtmikroskop**

Die fertig getrockneten Präparate werden ebenfalls mit dem Lichtmikroskop untersucht.

Dabei wird grundsätzlich unterschieden in Zellen, die lediglich akt. Caspase-3-positiv markiert sind und Zellen, Neurone in diesem Fall, die sowohl akt. Caspase-3-positiv als auch

NeuN-positiv angefärbt sind, also eine Kombination der beiden Farbstoffe rot (NeuN) und braun (akt. Caspase-3) zeigen.

Innerhalb dieser Unterscheidungskriterien wird noch die Intensität des braunen Farbstoffes bei akt. Caspase-3-positiven Zellen unterschieden in schwach positiv und stark positiv.

Die Werte werden, wie schon für die HE-Färbung und die Einfachfärbung, für jeden Schnitt einzeln ermittelt und notiert.

### 3.2.3.3.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgt auch hier rein zählerisch und die einzelnen Werte der drei unterschiedlichen Behandlungsgruppen werden innerhalb verschiedener Tabellen miteinander verglichen.

## 3.2.4 Antikörper, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Lösungen und Geräte

### Antikörper:

#### Einfachfärbung aktivierter Caspase-3

- Antikörper, monoklonal, gegen akt. Caspase-3, Cat.# 559565, Fa. BD PharMingen, San Jose, USA
- Detektionskit: Universal-LSAB TM 2Kits; Cat.# K0609, Kaninchen/Maus, Fa. DAKO, Hamburg

#### Doppelfärbung

##### 1. Antikörper:

- Antikörper, monoklonal, gegen akt. Caspase-3, Cat.# 559565, Fa. BD PharMingen, San Jose, USA
- Mouse Anti-Neuronal Nuclei Monoclonal Antibody, NeuN, Fa. Chemicon International, Temecula, USA

##### 2. Antikörper:

- Biotinylierter anti-mouse Antikörper, Fa. VectorLabs, Burlingame, USA
- Biotinylierter anti-rabbit Antikörper, Fa. VectorLabs, Burlingame, USA

### **Chemikalien:**

- Alkalische Phosphatase-konjugiertes Streptavidin, Fa. VectorLabs, Burlingame, USA
- BSA, bovine Albumin Fraktion V, Fa. Sigma, Steinheim
- DAB liquid DAB Substrate-Chromogen System, Fa. DAKO, Hamburg
- Ethanol 100% pro analysi, Fa. Merck, Darmstadt
- Ethanol 96%, Fa. Merck, Darmstadt
- Horseradish Peroxidase-konjugiertes Streptavidin in einer “ready-to-use-solution”, Fa. VectorLabs, Burlingame, USA
- Methanol 100% pro analysi, Fa. Merck, Darmstadt
- Paraformaldehyd, Fa. Merck, Darmstadt
- Proteinblockierungsreagenz, serumfrei, Fa. DAKO, Hamburg
- Rotihistol, Fa. Roth, Karlsruhe
- Roti Histokitt, Fa. Roth, Karlsruhe
- Saures Hämalaun nach Mayer, hausinterne Apotheke
- Tris (Puffer 2-Amino-2-(hydroxy methyl)-1,3 propanediol
- Universal-LSAB TM 2 Kit, Fa. DAKO, Hamburg
- VectorRed alkalische Phosphatase Substrat Kit I, Fa. VectorLabs, Burlingame, USA
- Wasserstoffperoxid 30%, Fa. Merck, Darmstadt
- Wässrige Eosin DiNatrium Lösung, NRF 11.95, 0,5% / 1%, hausinterne Apotheke

### **Verbrauchsmaterialien:**

- Deckgläser 22 x 50 mm, #1, Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig
- Eppendorf Reference Pipetten 100-1000 µl; 20-200 µl; 10-100 µl; 2-20 µl; 0,5-10 µl
- Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml mit Deckel, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
- Fettstift PapPen, Daido Sangyo Co., Fa. Peske, Aindling
- Feuchte Kammer, Eigenbau
- Objektträger SuperFrost Plus, Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig
- Reamix Assistent, Fa. Karl Hecht, Sondheim
- Rocky 3D, Fa. Fröbel Labortechnik, Lindau

- Tischzentrifuge, Fa. Neo Lab, Heidelberg
- Vielzweck Etiketten #3321, Fa. Zweckform, Holzkirchen

### **Lösungen:**

- Ethanol, 70%, 200 ml  
140 ml Ethanol pro analysi  
60 ml destilliertes Wasser
- Ethanol, 96%, 200 ml  
192 ml destilliertes Wasser  
8 ml Ethanol pro analysi
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Methanol, 3%, 200 ml  
194 ml Methanol pro analysi  
6 ml destilliertes Wasser
- Paraformaldehyd, 4%  
200 ml destilliertes Wasser  
8 g Paraformaldehyd  
15 µl 15M NaOH
- PBS 20-fach, Phosphate Buffered Saline  
320 g NaCl  
57,6 g NaHPO<sub>4</sub>  
9,6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8 g KCL  
ad 2000 ml destilliertes Wasser
- Saures Hämaun nach Mayer  
1,0 g Hämatoxilin  
0,2 g Natriumjodat  
50 g Kaliumaluminiumsulfat-12-Hydrat  
50 g Chloralhydrat

0,91 g Zitronensäure wasserfrei

in 1 l destilliertem Wasser

- Wässrige Eosin-Dinatrium Lösung; NRF 11.95; 0,5% / 1%

80 ml Eisessig

200 ml Eosin

### 3.2.5 Statistische Berechnung und Dokumentation

Es werden die Ergebnisse aller Tiere aus den drei Untersuchungsgruppen innerhalb der Gruppen zu den jeweiligen vier Zeitpunkten (01, 03, 07 und 28 Tage) untereinander verglichen. Zudem vergleicht man jeweils die Propofol- mit der Kontroll-Gruppe und die Sevofluran-Gruppe mit der Kontrolle.

Die Ergebnisse werden mittels einer 2-Wege ANOVA auf signifikante Unterschiede hin überprüft.

Zielsetzung dieser Studie ist es, einen Vergleich zu schaffen zwischen Anästhetika mit neuroprotektivem Potential (hier Propofol und Sevofluran) und einem Anästhetikum, das nachweislich während einer Ischämie keine neuroprotektive Wirkung besitzt (Fentanyl/Lachgas, s. BAUGHMAN et al. 1988, MORIMOTO et al. 1997). Deshalb wurden jeweils die Anästhetika Propofol bzw. Sevofluran mit der Kontroll-Gruppe verglichen und der direkte Vergleich von Propofol und Sevofluran nicht untersucht.

Ziel des Vergleichs der verschiedenen Zeitpunkte ist es nachzuvollziehen, welchen Einfluss die Reperusionszeit auf die Ausprägung des Schadens und die Aktivierung des Proteins Caspase-3 hat.

Der Vergleich der Propofol- mit den Tieren der Kontroll-Gruppe und der Sevofluran-Gruppe mit den Tieren der Kontroll-Gruppe dient dazu, den Einfluss von Propofol bzw. Sevofluran auf das Ausmaß des Schadens und die Aktivierung der Caspase-3 im Vergleich zu Fentanyl/Lachgas zu ermitteln.

Zu diesem Zweck werden die Ergebnisse der intraoperativ zu vier Zeitpunkten erhobenen Parameter, der HE-Färbung sowie der Einfach- und Doppeldetektion akt. Caspase-3 aller Tiere aus den drei Untersuchungsgruppen ausgewertet.

Aus den ermittelten Einzelwerten wird das arithmetische Mittel (MW) mit der Standardabweichung ( $\pm$ SD) errechnet.

### 3.3 Ergebnisse

104 Tiere, die randomisiert in vier Gruppen eingeteilt werden (s. Kapitel 3.2.1.3), gehen in die hier vorliegende Studie ein.

In den nachfolgenden Kapiteln finden die bereits in Kapitel 3.2.1.3 eingeführten und dort näher erläuterten Gruppenbezeichnungen Verwendung.

#### 3.3.1 Physiologische Variablen

Es findet eine Darstellung der Ergebnisse statt, die sich aus den während des Versuchs ermittelten Daten ergeben. Dabei werden die Ergebnisse der beiden Behandlungsgruppen Propofol und Sevofluran jeweils mit den Ergebnissen der Kontroll-Gruppe, sowie die während des Versuchs erhobenen Parameter zum Ausgangswert verglichen.

##### Hämodynamische Parameter und Blutglukose

In der folgenden Tabelle sind, ebenfalls aufgeteilt nach den drei Untersuchungsgruppen, die Mittelwerte und die Standardabweichungen von mittlerem arteriellem Blutdruck (mmHg), Herzfrequenz (Schläge/min) und Blutglukose (mg/dl) dargestellt.

**Tab. 03: Mittlerer arterieller Blutdruck, Herzfrequenz und Blutglukose**

Parameter	Gruppe	Ausgangswert	45 Isch	15 Rep	45 Rec
<b>MAP (mmHg)</b>	Kontrolle	127 ± 10	40 ± 1* a	124 ± 9	112 ± 14
	Propofol	100 ± 13 #	40 ± 1* a	110 ± 16 #	100 ± 20
	Sevofluran	82 ± 12 §	40 ± 1* a	116 ± 12	89 ± 14
<b>HF (Schläge/Minute)</b>	Kontrolle	400 ± 38	466 ± 38	397 ± 40	416 ± 39
	Propofol	362 ± 34	374 ± 30 #	330 ± 33	353 ± 26 #
	Sevofluran	356 ± 50	369 ± 43 §	328 ± 38 §	346 ± 39 §
<b>Blutglukose (mg/dl)</b>	Kontrolle	63 ± 10	55 ± 10	66 ± 11	80 ± 16
	Propofol	74 ± 16	59 ± 11	56 ± 8	56 ± 8
	Sevofluran	56 ± 8	91 ± 32 *§	85 ± 16 *	86 ± 15 *

Darstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks (mmHg), der Herzfrequenz (Schläge/Minute) und der Blutglukose (mg/dl) der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32) zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten (MW±SD).

a= kontrollierter Parameter

Signifikanzen: \*= p< 0,05 Ischämie, Reperfusion bzw. Erholung vs. Ausgangswert;

#= p< 0,05 Propofol vs. Kontrolle; §= p< 0,05 Sevofluran vs. Kontrolle

45 Isch = Messung nach 45 min in der Ischämie-Phase

15 Rep = Messung nach 15 min in der Reperfusion-Phase

45 Rec = Messung nach 45 min in der Erholungs-Phase

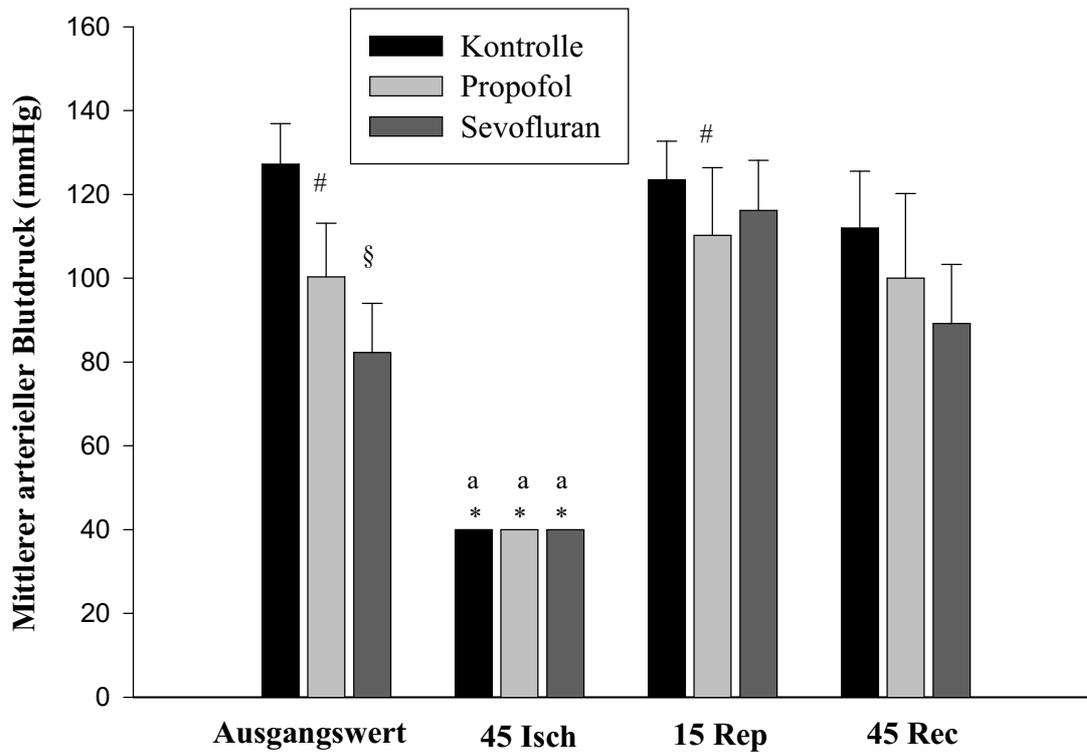
Die Ausgangsmesswerte des MAP der Tiere der Propofol- bzw. Sevofluran-Gruppe sind im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant erniedrigt.

Während der ischämischen Phase ist der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) gegenüber der Ausgangsmessung protokollgemäß signifikant erniedrigt.

Zum Zeitpunkt 15 Rep sind die Messwerte in der Propofol-Gruppe ebenfalls im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe signifikant erniedrigt. In der Sevofluran- und der Kontroll-Gruppe sind sie weder bei 15 Rep noch 45 Rec signifikant verändert.

Die Werte der Herzfrequenz (Schläge/min) der Propofol- und Sevofluran-Gruppe sind im Vergleich zur Kontroll-Gruppe während der Ischämie (45 Isch) und zu den Zeitpunkten 15 Rep und 45 Rec verglichen mit der Kontroll-Gruppe, zu diesen Zeitpunkten signifikant niedriger.

Die Blutglukose weist in der Kontroll- und der Propofol-Gruppe zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede auf. Jedoch zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Glukose in der Sevofluran-Gruppe während der Ischämie, der Reperfusion und der Erholung gegenüber dem Ausgangswert, und während der Ischämie gegen die Kontroll-Gruppe (s. Abb. 11).



**Abb. 11:** Graphische Darstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks (mmHg) Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je  $n=32$ ) zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten ( $MW \pm SD$ ).

*a* = kontrollierter Parameter

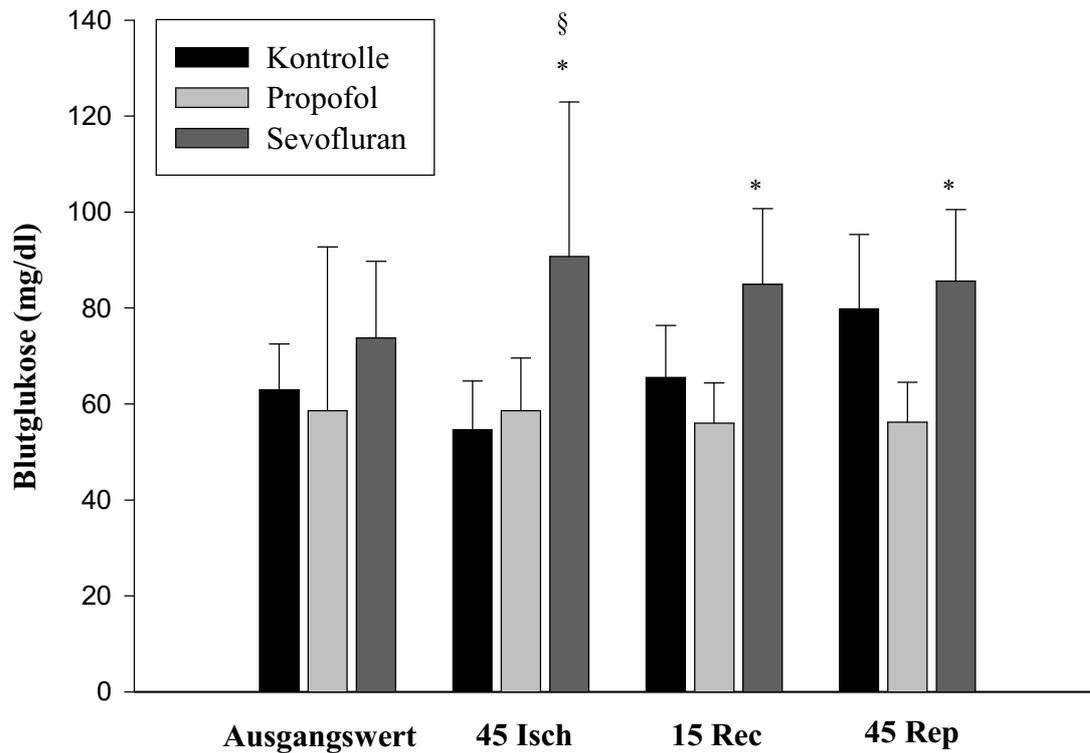
Signifikanzen: \* =  $p < 0,05$  vs. Ausgangswert; # =  $p < 0,05$  Propofol vs. Kontrolle;

§ =  $p < 0,05$  Sevofluran vs. Kontrolle.

45 Isch = Messung nach 45 min in der Ischämie-Phase

15 Rep = Messung nach 15 min in der Reperfusions-Phase

45 Rec = Messung nach 45 min in der Erholungs-Phase



**Abb. 12:** Graphische Darstellung der Blutglukose (mg/dl) der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32) zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten (MW±SD).

Signifikanzen: \*=  $p < 0,05$  vs. Ausgangswert; §=  $p < 0,05$  Sevofluran vs. Kontrolle.

45 Isch = Messung nach 45 min in der Ischämie-Phase

15 Rec = Messung nach 15 min in der Reperfusion-Phase

45 Rec = Messung nach 45 min in der Erholungs-Phase

### Blutgasanalyse

Es werden arterielle Messungen des Sauerstoffpartialdrucks ( $paO_2$ ), des Kohlendioxidpartialdrucks ( $paCO_2$ ), des Gesamthämoglobins (Hb), des pH-Wertes und des Hämatokrits (%) zu den bekannten vier Messzeitpunkten durchgeführt.

**Tab. 04: Blutgasanalyse**

Parameter	Gruppe	Ausgangswert	45 Isch	15 Rep	45 Rec
<b>paO<sub>2</sub></b> <b>(mmHg)</b>	Kontrolle	141 ± 25	151 ± 22	141 ± 27	117 ± 35
	Propofol	131 ± 28	143 ± 36	136 ± 31	125 ± 33
	Sevofluran	157 ± 26	162 ± 26	154 ± 27	137 ± 32
<b>paCO<sub>2</sub></b> <b>(mmHg)</b>	Kontrolle	37 ± 4	38 ± 6	40 ± 5	42 ± 9
	Propofol	41 ± 4	40 ± 4	41 ± 5	42 ± 5
	Sevofluran	37 ± 4	40 ± 25	39 ± 4	40 ± 5
<b>Hb</b> <b>(g/dl)</b>	Kontrolle	13,0, ± 1,2	9,3 ± 1,2	12,7 ± 1,1	12,3 ± 1,3
	Propofol	11,3 ± 1,0	9,1 ± 1,0	11,3 ± 0,9	12,2 ± 6,2
	Sevofluran	12,0 ± 0,8	8,3 ± 1,0	11,2 ± 0,7	11,0 ± 1,0

*Darstellung des Sauerstoffpartialdrucks (paO<sub>2</sub>) (mmHg), des Kohlendioxidpartialdrucks (paCO<sub>2</sub>) (mmHg) und des Gesamthämoglobins (Hb) (g/dl) der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32) zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten (MW±SD).*

*Signifikanzen: keine*

*45 Isch = Messung nach 45 min in der Ischämie-Phase*

*15 Rep = Messung nach 15 min in der Reperfusion-Phase*

*45 Rec = Messung nach 45 min in der Erholungs-Phase*

Die errechneten Mittelwerte des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks weisen zu keinem der vier festgeschriebenen Messzeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen auf. Während der Erholungs-Phase ist tendenziell bei allen drei Versuchstier-Gruppen eine leichte Erniedrigung des paO<sub>2</sub> zu erkennen.

Die Mittelwerte des Kohlenstoffpartialdrucks weisen zu keinem der vier Messzeitpunkte in keiner der drei Gruppen signifikante Unterschiede auf.

Die Werte der Hämoglobin-Bestimmung weisen bei den Tieren aller drei Gruppen einen protokollgemäßen, signifikanten Abfall während der Ischämie auf.

Die Werte des Hämatokrit (%) weisen nach der Äquilibrations-Phase in allen drei Gruppen Werte von 40±2 auf. Während der Ischämie-Phase findet in allen drei Gruppen erwartungsgemäß ein Abfall um etwa 20% auf 27 ± 3 statt. Der Hämatokrit normalisiert sich

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

in der Erholungs-Phase wieder bis auf beinahe Baseline (die Werte bei 45 Rec liegen 1-2% unter den Ausgangswerten).

### Messung der Gehirndurchblutung mit der Laser-Doppler-Flussmessung (LDF)

Die Gehirndurchblutung wird bei allen Versuchstieren kontinuierlich mittels eines Laser-Dopplers ermittelt und aufgezeichnet.

Während des Versuchs werden Messungen der absoluten Werte in sog. Perfusion Units (PU) durchgeführt.

**Tab. 05: Messung der Gehirndurchblutung mittels Laser-Doppler-Flussmessung**

Parameter	Gruppe	Ausgangswert	45 Isch	15 Rep	45 Rec
<b>Hirndurchblutung links (PU)</b>	Kontrolle	445 ± 153	325 ± 126	442 ± 168	476 ± 197
	Propofol	362 ± 133	263 ± 111 *	365 ± 137	390 ± 149
	Sevofluran	420 ± 149	331 ± 111	425 ± 173	442 ± 164
<b>Hirndurchblutung rechts (PU)</b>	Kontrolle	425 ± 162	223 ± 140 *	394 ± 169	396 ± 192
	Propofol	340 ± 137	186 ± 82 *	298 ± 148	342 ± 157
	Sevofluran	418 ± 137	291 ± 137 *	431 ± 152	457 ± 146

*Darstellung der Gehirndurchblutung in Perfusion Units (PU) der rechten und linken Hemisphäre mittels Laser-Doppler-Flussmessung der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32) zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten (MW±SD).*

*Signifikanzen: \*= p < 0,05 vs. Ausgangswert*

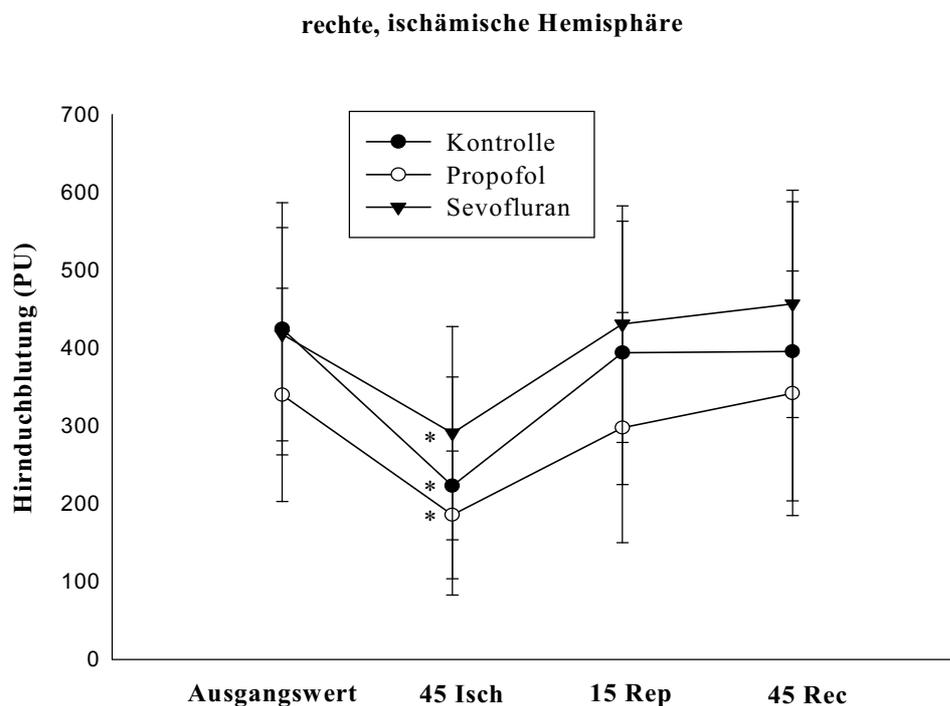
*45 Isch = Messung nach 45 min in der Ischämie-Phase*

*15 Rep = Messung nach 15 min in der Reperfusion-Phase*

*45 Rec = Messung nach 45 min in der Erholungs-Phase*

Bedingt durch die Ischämie entsteht in der rechten, ischämischen Hemisphäre protokollgemäß ein signifikanter Unterschied der Messwerte bei 45 Isch gegenüber den Messwerten zu den übrigen drei Zeitpunkten (Ausgangswert, 15 Rep, 45 Rec).

Die Werte der rechten Hemisphäre sinken, bedingt durch den zusätzlichen Verschluss der A. carotis communis, bis auf etwa 50% des Ausgangswertes ab. Hier zeigt der Vergleich der Propofol- bzw. Sevofluran-Gruppe mit der Kontroll-Gruppe keine weiteren signifikanten Veränderungen (s. Abb. 13). Die Werte der linken, nicht-ischämischen Hemisphäre weisen zwischen Propofol- bzw. Sevofluran-Gruppe und Kontroll-Gruppe keine signifikanten Unterschiede auf. Lediglich die Propofol-Gruppe zeigt bei 45 Isch verglichen mit dem Ausgangswert dieser Gruppe eine signifikante Erniedrigung des Messwertes (s. Abb. 14).



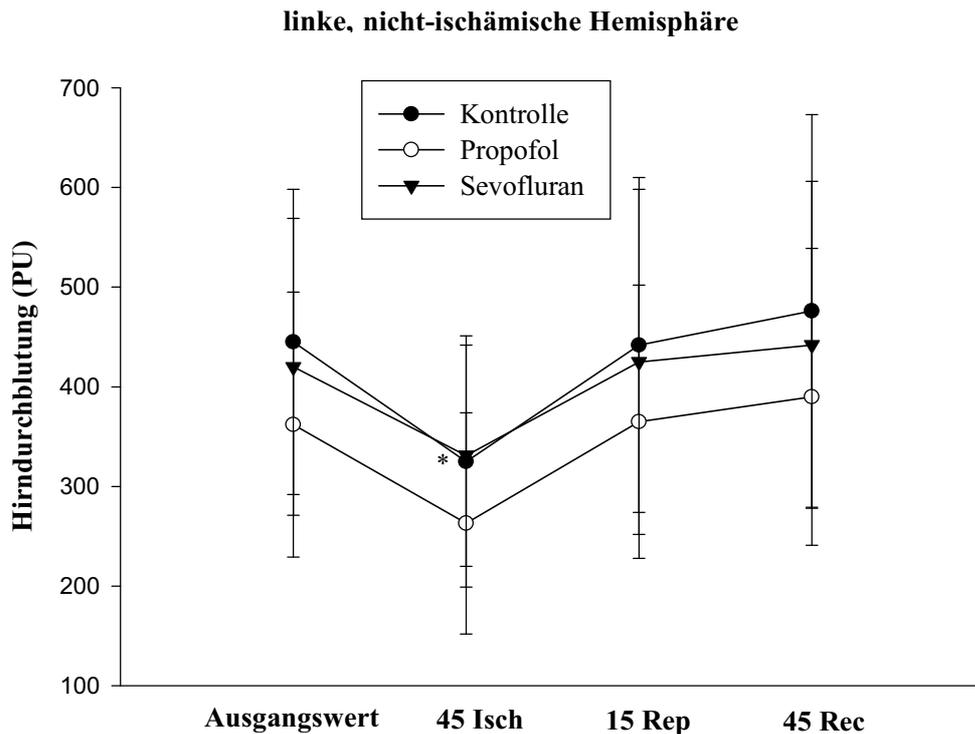
**Abb. 13:** Graphische Darstellung der Durchblutung der rechten, ischämischen Hemisphäre in Perfusion Units (PU) der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je  $n=32$ ) zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten ( $MW \pm SD$ ).

Signifikanzen:  $*= p < 0,05$  vs. Ausgangswert

45 Isch = Messung nach 45 min in der Ischämie-Phase

15 Rep = Messung nach 15 min in der Reperfusion-Phase

45 Rec = Messung nach 45 min in der Erholungs-Phase



**Abb. 14:** Graphische Darstellung der Durchblutung der linken, nicht-ischämischen Hemisphäre in Perfusion Units (PU) der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je  $n=32$ ) zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten ( $MW \pm SD$ ).

Signifikanzen:  $* = p < 0,05$  vs. Ausgangswert

45 Isch = Messung nach 45 min in der Ischämie-Phase

15 Rep = Messung nach 15 min in der Reperfusion-Phase

45 Rec = Messung nach 45 min in der Erholungs-Phase

#### Perikranielle und periphere Temperatur

Es werden während der gesamten Dauer des Versuches als kontrollierte Parameter sowohl die periphere, als auch die perikranielle Körpertemperatur konstant bei  $37,5\text{ °C}$  gehalten.

Reguliert wird die Temperatur mit Hilfe einer automatischen rückgekoppelten Wärmelampe.

### 3.3.2 Untersuchung der Gehirnschnitte

#### 3.3.2.1.1 HE-Färbung

Die zerebrale Ischämie induziert einen Schaden, der in der HE-Färbung unter dem Lichtmikroskop beurteilt und klassifiziert wird. Dabei wird sowohl die linke als auch die rechte Gehirnhälfte anhand gefärbter Schnitte untersucht, wobei besonderes Augenmerk auf der Hippokampusformation liegt. Die einzelnen Zellen, die sich im Hippokampus und Gyrus dentatus zum sog. Zellband formieren, werden in eosinophile (rot angefärbt) und nicht-eosinophile (blau-lila angefärbt) Zellen unterschieden, entsprechend ausgezählt und notiert.

Folgendes lässt sich erkennen:

Es finden sich in der linken, nicht-ischämischen Gehirnhemisphäre bei keinem der untersuchten Tiere aller Gruppen eosinophile Zellen bzw. Neurone.

Auch die Gehirnpräparate von Tieren aus der Nativ-Gruppe weisen weder in ihrer linken noch in der rechten Hemisphäre oder der Hippokampusformation eosinophil angefärbte Zellen auf.

Eine eosinophile Anfärbung hingegen findet sich in Zellen der Hippokampusformation und der übrigen Hemisphäre bei Präparaten von Tieren aus der Kontroll-Gruppe (s. Abb. 15 und Übersicht IV, Bilder 05 und 06). Die höchste Anzahl eosinophil angefarbter Neurone findet sich bei Tieren aus der Kontroll-Gruppe mit einer Überlebenszeit von sieben Tagen, wo durchschnittlich etwa 42% aller im Zellband zählerisch erfassbaren Neurone eosinophil angefärbt sind.

Bei Tieren aus den Kontroll-Gruppen mit Überlebenszeiten von einem, drei und 28 Tagen sind etwa 20% aller zählerisch erfassbaren Neurone eosinophil markiert.

Innerhalb der Gruppe der mit Propofol behandelten Tiere kann in keinem einzigen Gehirnpräparat Eosinophilie nachgewiesen werden (s. Übersicht III, Bilder 01 und 02).

In der Gruppe der während der Ischämie mit Sevofluran behandelten Tiere gibt es ein einziges Tier, bei dem eosinophile Zellen in der HE-Färbung nachweisbar sind. Alle übrigen Tiere aus dieser Sevofluran-Gruppe sind ohne eosinophil-markierte Neurone (s. Tab. 06).

Demnach ist die Anzahl eosinophiler Zellen der Hippokampusformation in der Propofol- und Sevofluran-Gruppe über den gesamten Untersuchungszeitraum von 28 Tagen signifikant verringert gegenüber der Kontroll-Gruppe.

Bei den Tieren der Nativ-Gruppe werden erwartungsgemäß keine eosinophilen Zellen gefunden.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

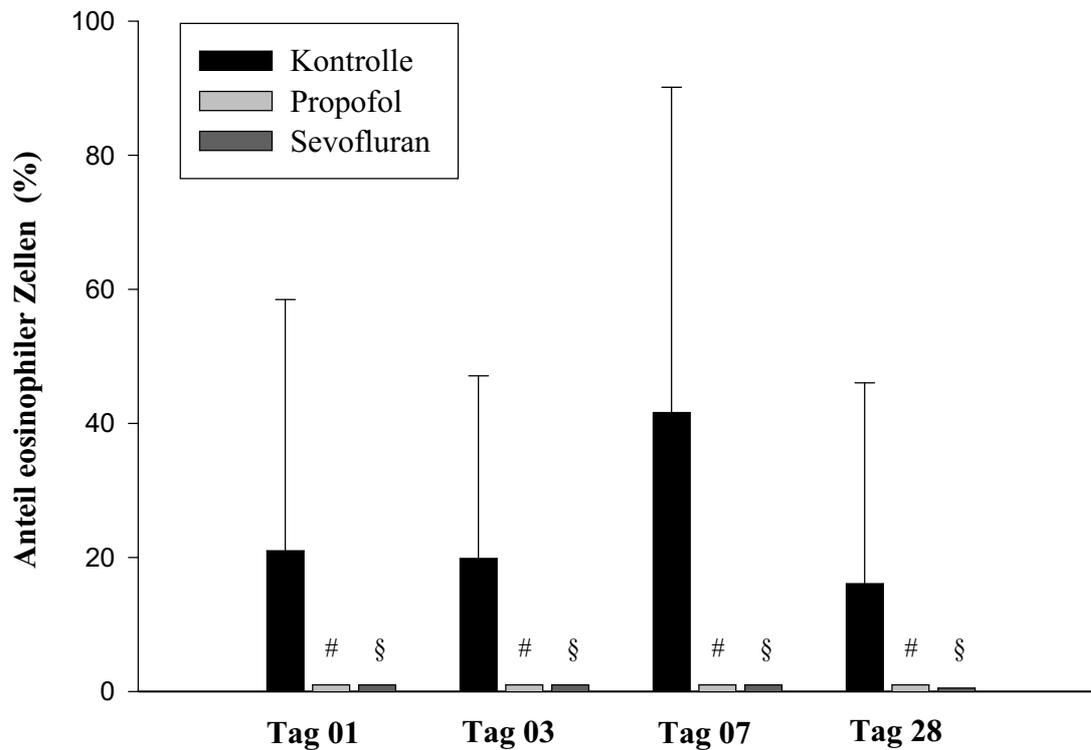
**Tab. 06: Prozentualer Anteil der eosinophilen Zellen an der Gesamtzellzahl**

Prozentualer Anteil eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl	Tag 01	Tag 03	Tag 07	Tag 28
<b>Kontrolle (n=32)</b>	20,9 ± 37,4	19,8 ± 27,2	41,6 ± 48,5	16,0 ± 29,9
<b>Propofol (n=32)</b>	0,0 ± 0,0 #	0,0 ± 0,0 #	0,0 ± 0,0 #	0,0 ± 0,0 #
<b>Sevofluran (n=32)</b>	0,1 ± 0,3 §	0,0 ± 0,0 §	0,0 ± 0,0 §	0,0 ± 0,0 §

*Darstellung des prozentualen Anteils eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl des jeweils rechten, ischämischen Hippokampus der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32) zu den vier festgelegten Untersuchungszeitpunkten (01, 03, 07, 28 Tage) (MW±SD).*

*Signifikanzen: # =  $p < 0,05$  Propofol vs. Kontrolle; § =  $p < 0,05$  Sevofluran vs. Kontrolle*

Anteil der eosinophilen Zellen an der Gesamtzellzahl



**Abb. 15:** Graphische Darstellung des prozentualen Anteils der eosinophilen Zellen an der Gesamtzellzahl des rechten, ischämischen Hippokampus der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32) zu den vier festgelegten Untersuchungszeitpunkten (01, 03, 07, 28 Tage) (MW±SD).

Signifikanzen: # =  $p < 0,05$  Propofol vs. Kontrolle; § =  $p < 0,05$  Sevofluran vs. Kontrolle

Eine weitere Beobachtung sind die Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen Propofol bzw. Sevofluran und der Kontroll-Gruppe, was die Schwere des Gewebes Schadens anbelangt.

**Tab. 07: Verteilung der Tiere der Kontroll-Gruppe auf die Schadensklassen (%)**

	<b>Klasse</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Grad</b>	Verteilung der Tiere auf die Grade 0-D (%)	Verteilung der Tiere innerhalb der Grade 0-D auf die fünf Klassen 0-4				
<b>0</b>	56,2	100%	-----	-----	-----	-----
<b>A</b>	12,5	-----	100%	-----	-----	-----
<b>B</b>	15,6	-----	20%	40%	40%	-----
<b>C</b>	15,6	-----	20%	20%	60%	-----
<b>D</b>	0,0%	-----	-----	-----	-----	-----

*Verteilung (%) der Tiere der Kontroll-Gruppe (n=32) auf die fünf Schweregrade 0–D in Kombination mit ihrer Verteilung auf die je fünf unterschiedlichen Grade der Schadensverteilung 0-4 gemäß den Erläuterungen im Text in Kapitel 3.2.3.1.3 auf Seite 48 und den Bildübersichten I und II Seite 80 ff.*

Kein einziges Tier der Propofol-Gruppe zeigt einen Schaden, alle 32 Tiere gehören dem Grad 0 - weder Schaden noch eosinophile Zellen - an.

In der Sevofluran-Gruppe weist ein einzelnes Tier einen Schaden der Kategorie A1 (s. Übersicht I, Bild 01) auf, die übrigen 31 Tiere gehören, wie alle Tiere der Propofol-Gruppe, dem Grad sowie der Klasse 0 an.

Die Tiere der Kontroll-Gruppe weisen insgesamt zu 43,8% einen Schaden unterschiedlicher Einordnung auf. 56,2% der Tiere der Kontroll-Gruppe gehören der Schadensklasse 0 an (s. Tab. 07). Sie weisen entsprechend in der gesamten rechten Hemisphäre weder eosinophil-markierte Zellen auf, noch sind Veränderungen im Gewebe wie Gewebsverlust, Makrophagen- oder Lymphozyteneinwanderung zu erkennen.

12,5% der Tiere der Kontroll-Gruppe gehören in die Klassifikation A1 (s. Übersicht I, Bild 01), mit lediglich eosinophilen Zellen, was ihre Zuordnung zu Grad A rechtfertigt, die sich wiederum nur in Teilen des Hippokampus finden, ohne ödemartige Veränderungen im Hippokampus oder dem ihn umgebenden Gewebe. Daraus ergibt sich die Schadensklasse 1 (s. Tab. 07).

Weitere 15,6% der Tiere der Kontroll-Gruppe lassen sich Grad B zuordnen (s. Tab. 07 und Übersicht I, Bild 02 bzw. 03). Sie weisen eosinophile Zellen in Kombination mit ödemartigen Gewebeveränderungen im Hippokampus selbst auf, sichtbar anhand der aufgelockerten Gewebsstruktur und den exsudativen Vorgängen an den Blutgefäßen. Bei wiederum 20%

davon sind lediglich Teile des Hippokampus von Zelleosinophilie betroffen, zählen also in die Schadensklassifikation B1. Bei jeweils 40% sind im gesamten Hippokampus (Schadensklasse B2, s. Übersicht I, Bild 02) bzw. im Hippokampus und zusätzlich im Kortex (Schadensklasse B3, s. Übersicht I, Bild 03) eosinophile Zellen zu finden.

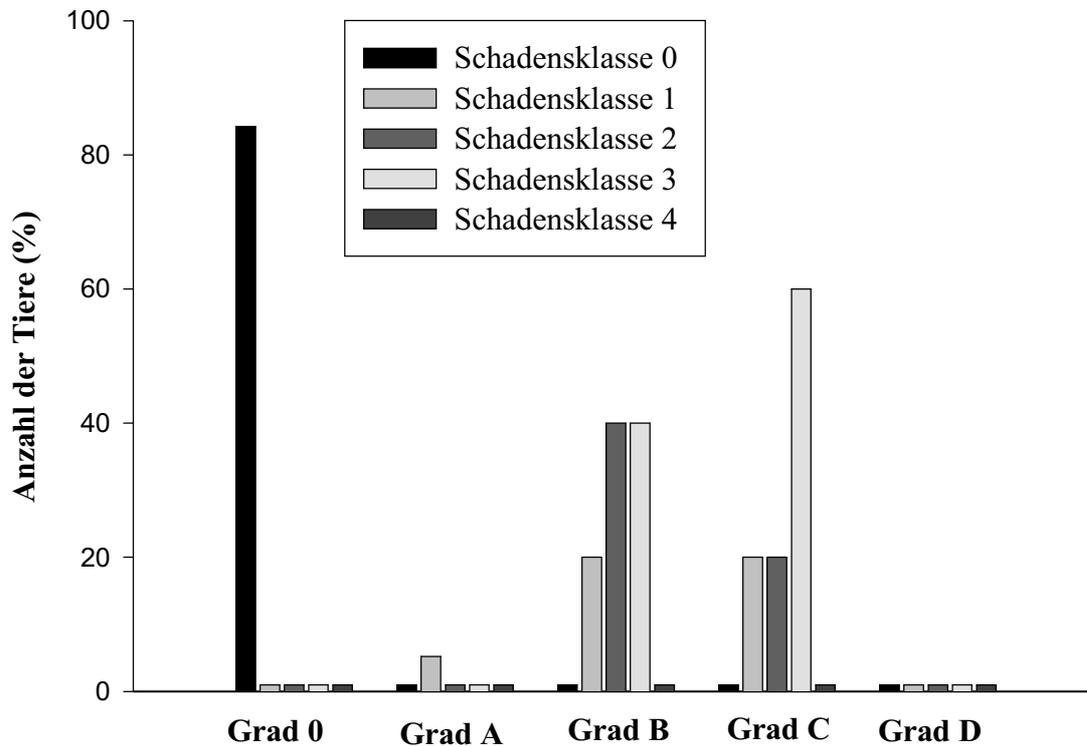
Mit dem Schadensgrad B finden sich ausschließlich Tiere der Kontroll-Gruppe.

15,6% der Tiere der Kontroll-Gruppe schließlich sind dem Grad C zugeordnet (s. Tab. 07). Dort ist deutlich eine Einwanderung von Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten) und eine Organisation des geschädigten Gewebes in Form von diffuser Narbenbildung zu erkennen. Bei 20% dieser zu Grad C zählenden Präparate sind Teile des Hippokampus betroffen (C1, s. Übersicht II, Bild 04), bei weiteren 20% ist der gesamte Hippokampus in Mitleidenschaft gezogen (C2) und bei den verbleibenden 60% der Tiere ist neben dem gesamten Hippokampus auch der Kortex mitbetroffen (C3, s. Übersicht II, Bild 05).

Diesen Schadensgrad C weisen ausschließlich Tiere der Kontroll-Gruppe auf.

Der Schadensgrad D (s. Übersicht II, Bild 06) mit Substanzverlusten und Ventrikelverlagerung ist in keiner der drei Untersuchungsgruppen zu beobachten.

Schadensverteilung innerhalb der Kontroll-Gruppe



**Abb. 16:** Graphische Darstellung der Verteilung (%) der Tiere der Kontroll-Gruppe (n=32) auf die fünf Schweregrade 0-D in Kombination mit ihrer Verteilung auf die je fünf unterschiedlichen Schadensklassen 0-4 gemäß den Erläuterungen im Text in Kapitel 3.2.3.1.3 auf Seite 48 den Bildübersichten I und II Seite 80 ff.

**3.3.2.2 Immunhistochemische Detektion aktivierter Caspase -3**

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate erfolgt ebenfalls mit dem Lichtmikroskop.

Man unterscheidet hier in akt. Caspase-3-positive, braun angefärbte Zellen, und akt. Caspase-3-negative, lediglich bläulich angefärbte Zellen.

Die Anzahl der braungefärbten Zellen wird im Bereich der Hippokampusformation gezählt und dokumentiert, die Gesamtzellzahl der Neurone wird jeweils durch Auszählen des konsekutiven Schnittes in der HE-Färbung ermittelt und ebenfalls notiert.

Akt. Caspase-3-positive Zellen sind in allen drei Gruppen, den beiden Behandlungsgruppen Propofol und Sevofluran sowie in der Kontroll-Gruppe nachweisbar (s. Übersicht V, Bilder 07 bis 10 und Übersicht VI, Bilder 11 und 12).

**Tab. 08: Prozent aktivierter Caspase-3 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl**

<b>Prozentualer Anteil aktivierter Caspase-3-positiver-Zellen an der Gesamtzellzahl</b>	<b>01. Tag</b>	<b>03. Tag</b>	<b>07. Tag</b>	<b>28. Tag</b>
<b>Kontrolle</b>	0,9 ± 1,4	0,6 ± 0,9	1,3 ± 1,5	2,1 ± 3,6
<b>Propofol</b>	0,2 ± 0,4	0,6 ± 0,8	1,3 ± 2,1	0,3 ± 0,6
<b>Sevofluran</b>	0,7 ± 0,8	0,6 ± 0,9	1,0 ± 0,9	0,6 ± 0,7

*Darstellung des Anteils akt. Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl (%) der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32) zu den vier festgelegten Untersuchungszeitpunkten (01, 03, 07, 28 Tage) (MW±SD).*

*Signifikanzen: keine*

In dieser Untersuchung zeigen sich keinerlei signifikante Unterschiede. Es gibt jedoch folgende Tendenzen:

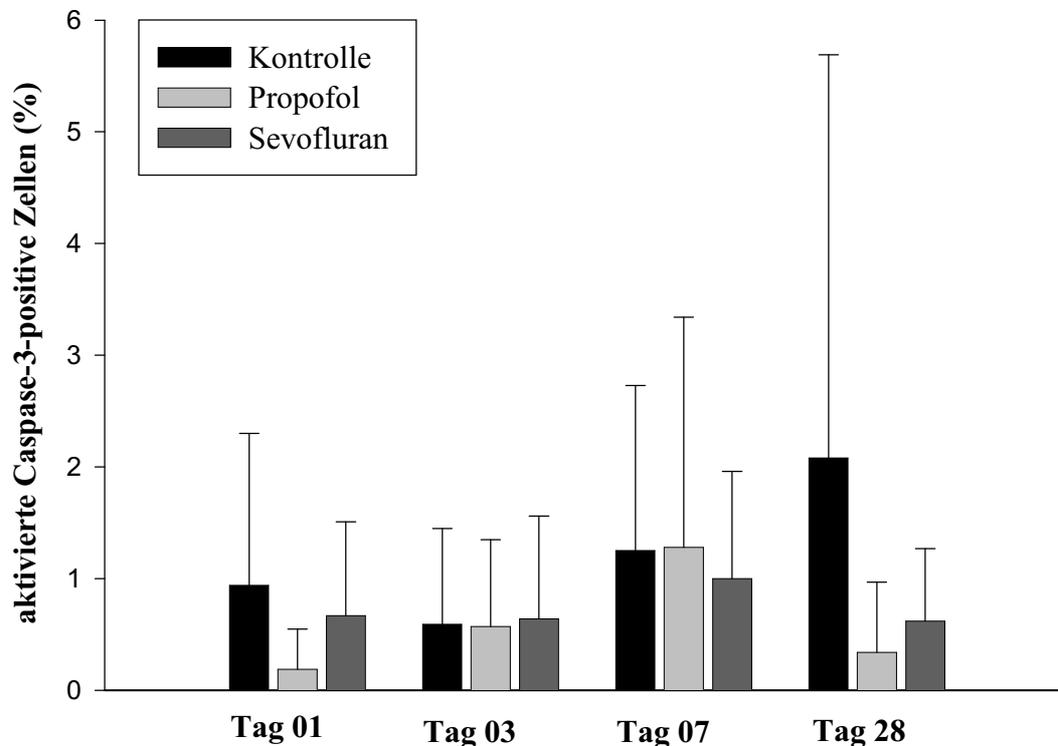
Die größte Anzahl akt. Caspase-3-positiver Zellen weisen die Tiere der Kontroll-Gruppe mit einer Überlebenszeit von 28 Tagen auf (2,1 ± 3,6 aller zählerisch erfassten Zellen).

Die Werte der Tiere aus allen drei Gruppen mit Überlebenszeiten von drei bzw. sieben Tagen weisen alle ähnliche, geringe Mengen akt. Caspase-3-positiver Zellen auf, zwischen 0,6 ± 0,9 bzw. 1,3 ± 2,1 aller zählerisch erfassten Zellen (s. Tab.08).

Die geringste Anzahl akt. Caspase-3-positiver Zellen weisen Tiere aus der Behandlungsgruppe Propofol mit der Überlebenszeit von einem Tag auf. Dort liegt der Anteil positiver Zellen an der Gesamtzellzahl bei 0,2 ± 0,4.

Die Verteilung der akt. Caspase-3-positiven Zellen innerhalb des Hippokampus sieht so aus, dass die meisten positiven Zellen in der CA1-Region des Hippokampus und im oberen Ast des Gyrus dentatus lokalisiert sind. In den Gehirnschnitten von Tieren aus der Nativ-Gruppe werden erwartungsgemäß in keiner der beiden Hemisphären akt. Caspase-3 positive Zellen detektiert.

Anzahl aktivierter Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl



**Abb. 17:** Graphische Darstellung des Anteils akt. Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl (%) der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je  $n=32$ ) zu den vier festgelegten Untersuchungszeitpunkten (01, 03, 07, 28 Tage) ( $MW \pm SD$ ).

Signifikanzen: keine

### 3.3.2.3 Doppelfärbung von aktivierter Caspase-3 mit NeuN

Die Ergebnisse der Doppelmarkierung, betrachtet über den gesamten Überlebenszeitraum von 28 Tagen, weisen keinerlei signifikante Unterschiede auf. Es zeigt sich jedoch tendenziell eine Verschiebung zugunsten der Gruppe mit Propofol behandelte Tiere, was die Menge akt. Caspase-3-positiver Neurone anbelangt.

Tiere der Propofol-Gruppe weisen nach sieben Tagen tendenziell die meisten doppelmarkierten Zellen auf, Neurone, die sowohl NeuN in der Farbe rot als auch akt. Caspase-3 in brauner Farbe zeigen (s. Tab. 09).

Das Verhältnis einfach akt. Caspase-3-positiv markierter Zellen zu doppelt akt. Caspase-3-positiv und NeuN markierten Zellen liegt in dieser Gruppe bei etwa 2:1.

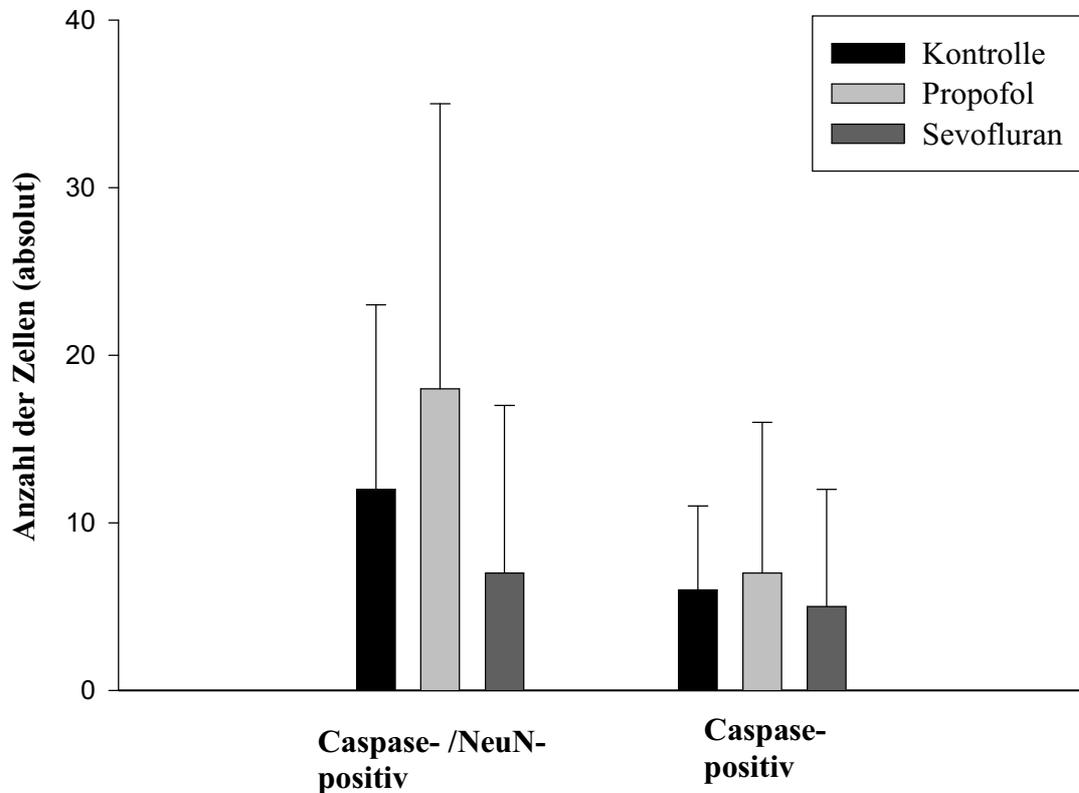
**Tab. 09: Vergleich der Menge doppelt- und einfach markierter Zellen innerhalb der Doppelfärbung (absolut)**

<b>Gruppe</b>	<b>aktivierte Caspase-3- und NeuN-positiv</b>	<b>aktivierte Caspase-3- positiv</b>
<b>Kontrolle</b>	12 ± 11	6 ± 5
<b>Propofol</b>	18 ± 17	7 ± 9
<b>Sevofluran</b>	7 ± 10	5 ± 7

*Darstellung des Vergleichs von Gesamtzellmenge akt. Caspase-3-/ NeuN-positiver Neurone mit den einfach markierten, lediglich akt. Caspase-3-positiven Zellen der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32), zusammengefasst über den gesamten Untersuchungszeitraum (MW±SD).*

*Signifikanzen: keine*

**Anzahl aktivierter Caspase-3-positiver Neurone und aktivierter Caspase-3-positiver Zellen**

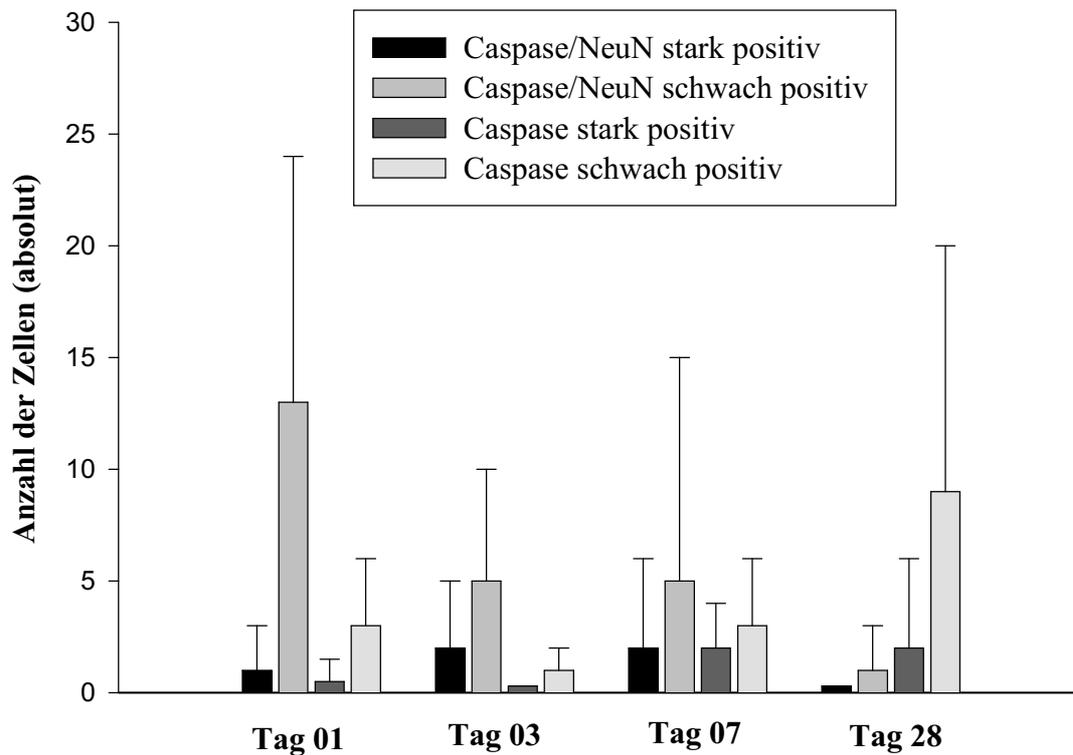


**Abb. 18:** Graphische Darstellung der Gesamtmenge (absolut) akt. Caspase-3-positiver Zellen und akt. Caspase-3-positiver/NeuN-positiver Neurone aller Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je  $n=32$ ), zusammengefasst über den gesamten Untersuchungszeitraum (01,03,07 und 28 Tage) ( $MW \pm SD$ ).

Signifikanzen: keine

Auch bei den Tieren aus der Kontroll-Gruppe liegt dieses Verhältnis von doppelt zu einfach markierten Zellen in diesem Bereich. Gleichzeitig weisen sie bereits nach einem Tag sowie nach 28 Tagen Reperfusionzeit die meisten akt. Caspase-3-positiven Zellen auf.

Sevofluran



**Abb. 19:** Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der stark oder schwach einfach akt. Caspase-3-positiv gefärbten Zellen im Vergleich zu stark oder schwach doppelt akt. Caspase-3-positiv/NeuN-positiv gefärbten Neuronen der Tiere aus der Sevofluran-Gruppe (n=32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten.

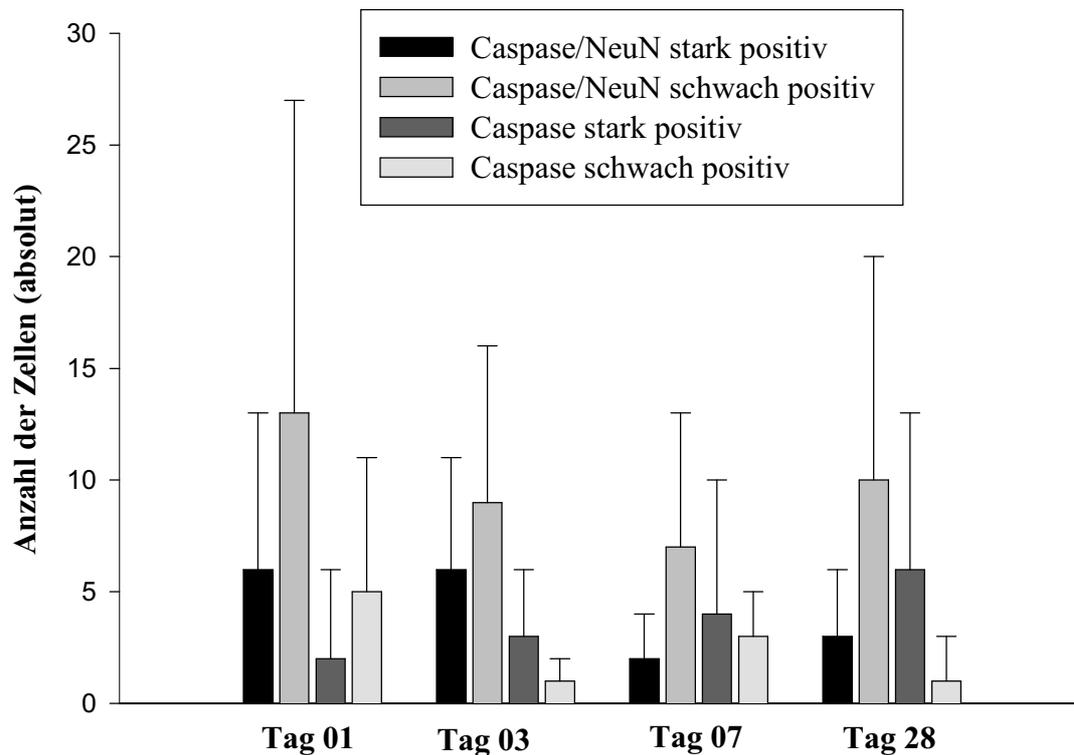
Signifikanzen: keine

Die Tiere der Sevofluran-Gruppe (s. Übersicht VII, Bilder 15 und 16) weisen die insgesamt geringste Menge akt. Caspase-3-positiver Zellen auf (doppelt- und einfach markiert).

Dort liegt dafür allerdings das Verhältnis akt. Caspase-3-positiver Neurone zu einfach markierten akt. Caspase-3-positiven Zellen tendenziell höher, nämlich bei etwa 2:1,5 (s. Abb. 19).

Die Kontroll-Gruppe (s. Übersicht VIII, Bilder 17 und 18) zeigt im zeitlichen Verlauf eine eher gleichmäßige Verteilung sowohl der nur akt. Caspase-3-positiven Zellen als auch der doppelt markierten Neurone (s. Abb. 20). Die Anzahl der doppelt-markierten Neurone liegt tendenziell zwischen den Werten der Propofol-Gruppe (höher) und der Sevofluran-Gruppe (niedriger). Es sind dennoch keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Kontrolle



**Abb. 20:** Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der stark oder schwach einfach akt. Caspase-3-positiv gefärbten Zellen im Vergleich zu stark oder schwach doppelt akt. Caspase-3-positiv/NeuN-positiv gefärbten Neuronen der Tiere aus der Kontroll-Gruppe (n=32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten.

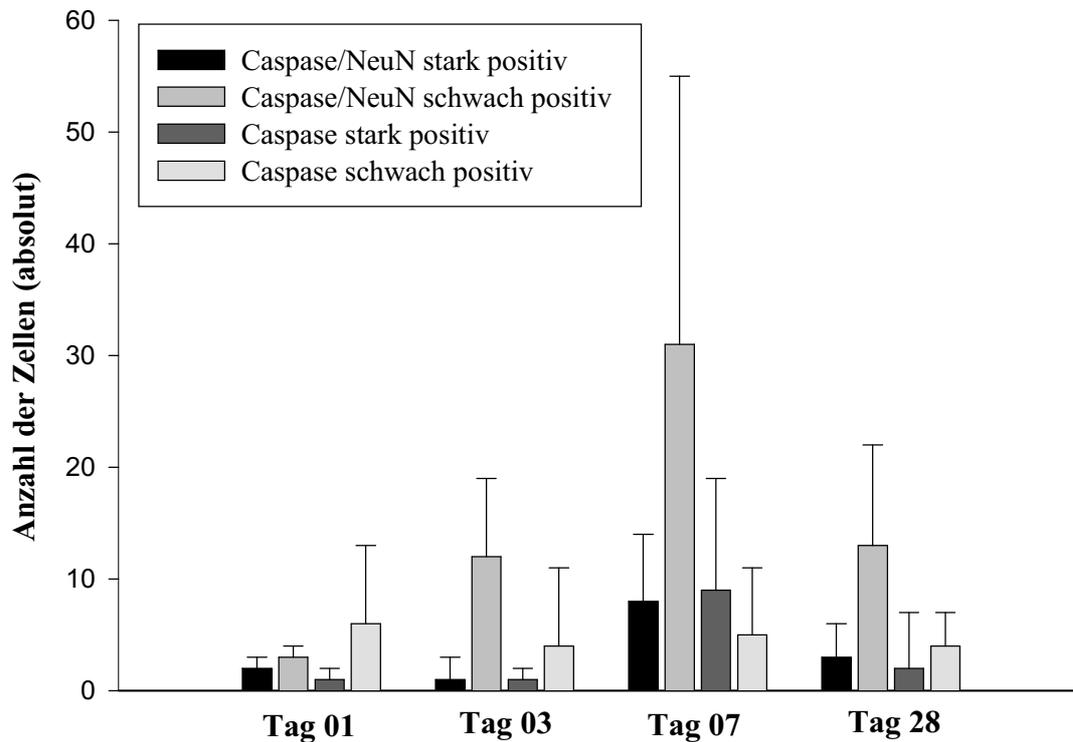
Signifikanzen: keine

Präparate der mit Propofol behandelten Tiere (s. Übersicht VII, Bilder 13 und 14) weisen im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen, Kontrolle und Sevofluran, tendenziell die meisten akt. Caspase-3-positiv-markierten Zellen auf.

Dabei steigt der Wert dieser Caspase und NeuN doppelt markierten Neurone bis zu einer Reperfusionsdauer von sieben Tagen kontinuierlich an, um nach einer Reperusionszeit von 28 Tagen wieder in Bereiche des Wertes von drei Tagen Reperusionszeit zurückzugehen.

Es sind jedoch auch hier keine signifikanten Unterschiede feststellbar (s. Abb. 21)

Propofol



**Abb. 21:** Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der stark oder schwach einfach akt. Caspase-3-positiv gefärbten Zellen im Vergleich zu stark oder schwach doppelt akt. Caspase-3-positiv/NeuN-positiv gefärbten Neuronen der Tiere aus der Propofol-Gruppe (n=32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten.

Signifikanzen: keine

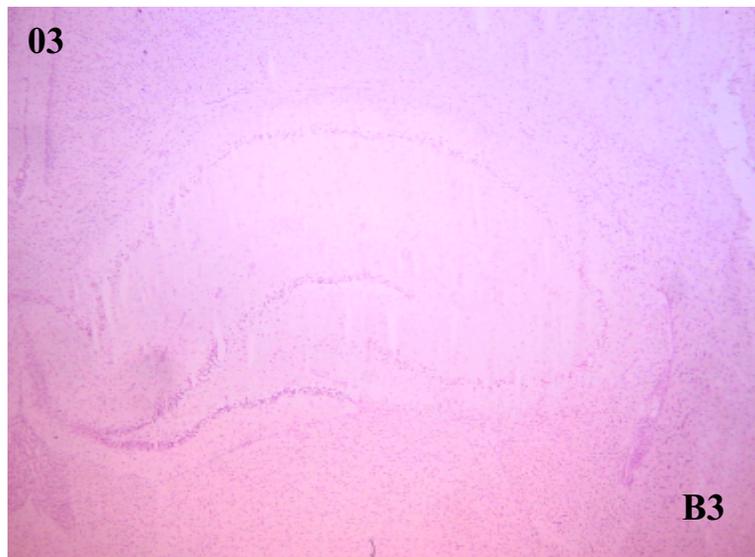
Bei den auch hier als Negativkontrolle mitgefärbten Präparaten gänzlich unbehauelter Tiere (Nativ-Tiere) können keine akt. Caspase-3-positiven Zellen detektiert werden, die jeweiligen Neurone färben sich nur NeuN-positiv rot an.

Somit wird die Spezifität des Antikörpers gegen akt. Caspase-3 und die Funktionalität des Antikörpers gegen NeuN in jedem Färbedurchgang erneut überprüft.

Der als Positivkontrolle mitgefärbte Thymus juveniler Ratten weist stets positiv braun-gefärbte Zellen ohne Rotfärbung auf, womit die Funktionalität des Antikörpers gegen akt. Caspase-3 und die Spezifität des Antikörpers gegen NeuN stets bestätigt wird.

**3.3.2.4 Bildübersicht I-VIII**

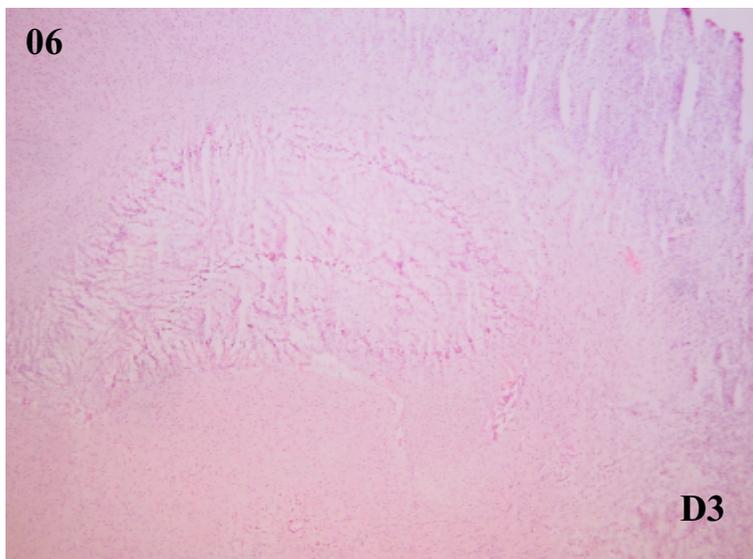
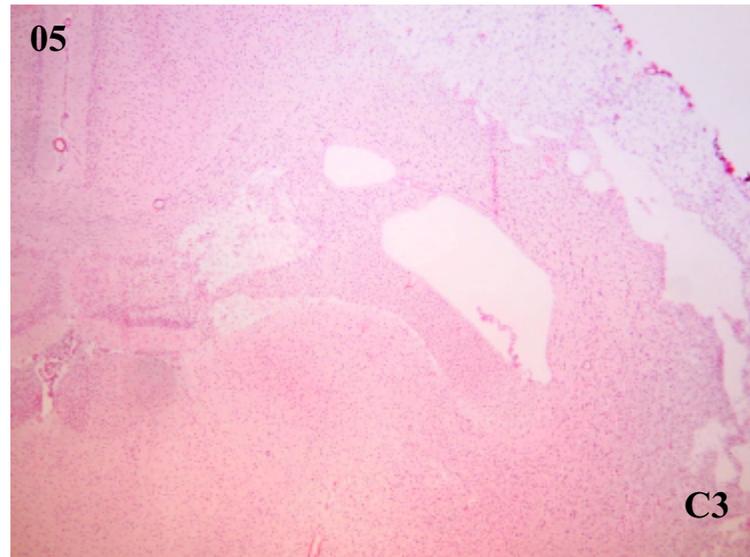
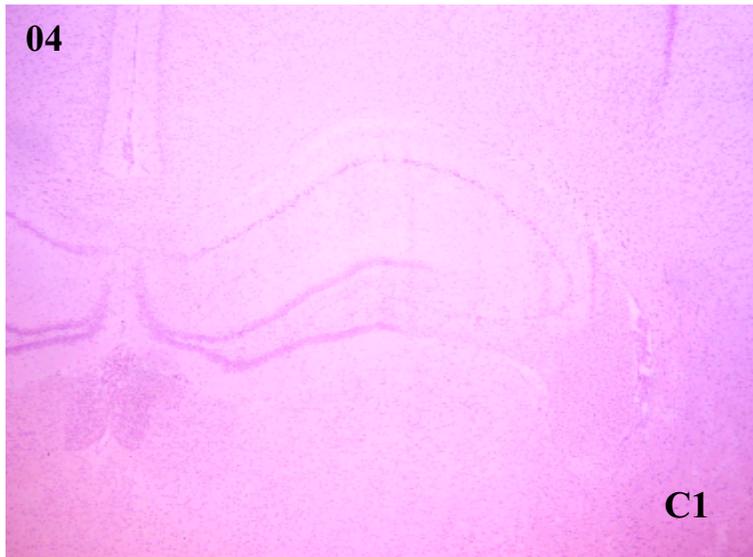
### Übersicht I: HE-Färbung-Übersicht über die Schadensklassen



*Übersicht I zeigt in 25-facher Vergrößerung Beispiele für die Schadensklassifikation:*

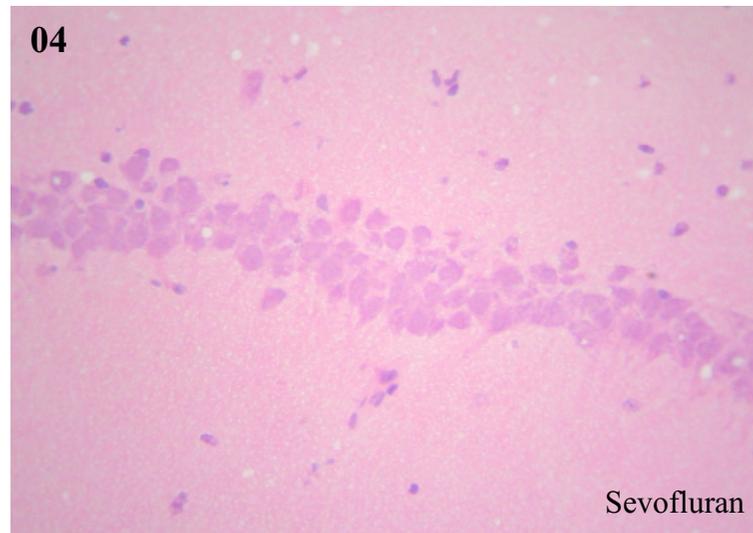
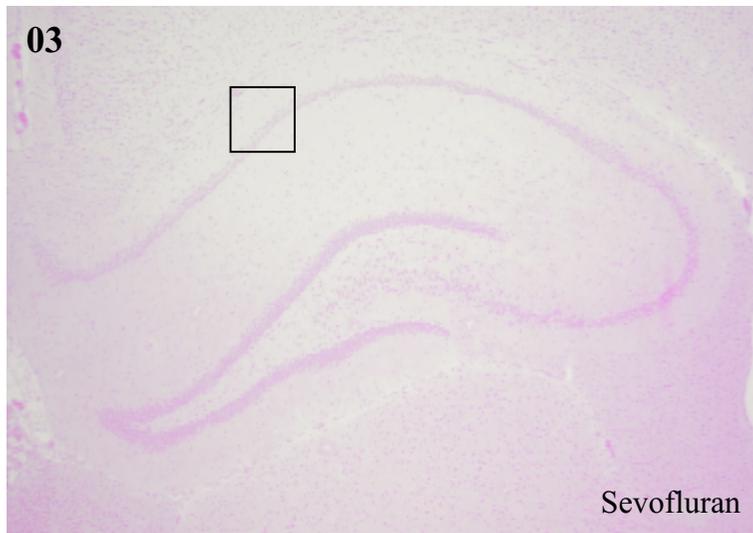
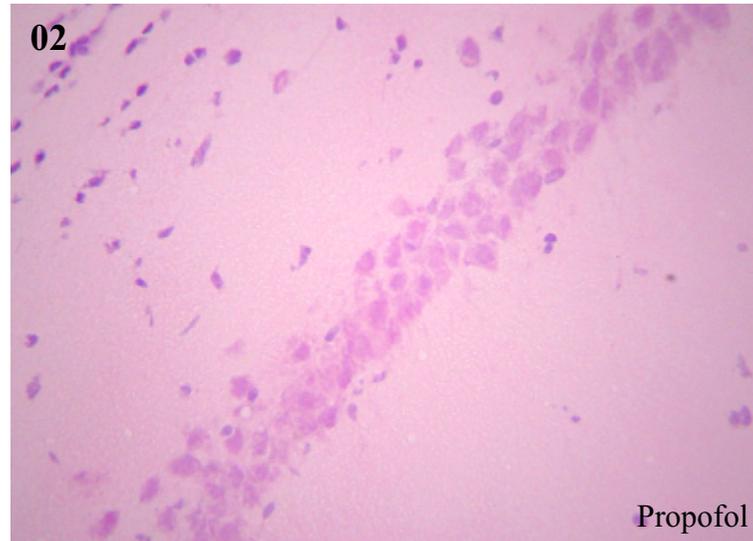
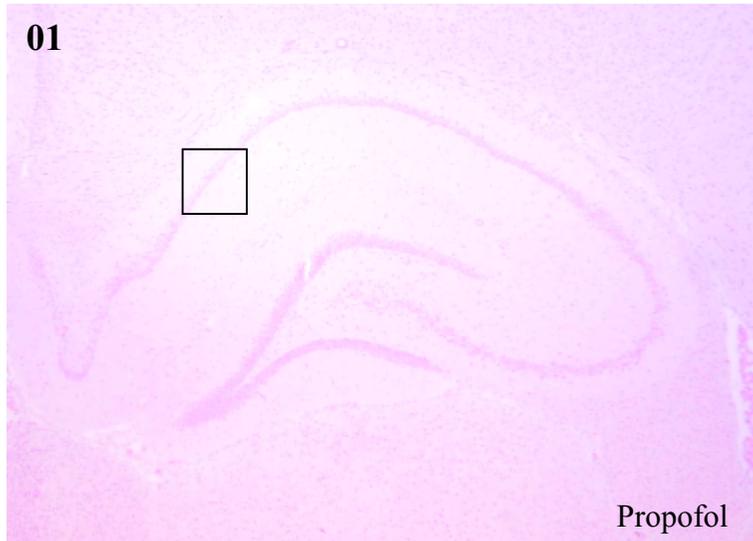
*Bild 01 zeigt die Klassifikation A1, ohne Gewebeödem mit eosinophil-markierten Zellen in Teilen des Hippokampus. Bild 02 zeigt die Klassifikation B1 mit sichtbarem Gewebeödem im Bereich des Hippokampus, wobei das Zellband teilweise aufgelockert scheint und eosinophile Zellen in Teilen Hippokampus zu finden sind. Bild 03 zeigt die Klassifikation B2, mit sichtbarem Gewebeödem im Bereich der Hippokampusformation und eosinophilen Zellen im gesamten Hippokampus.*

### Übersicht II: HE-Färbung-Übersicht über die Schadensklassen



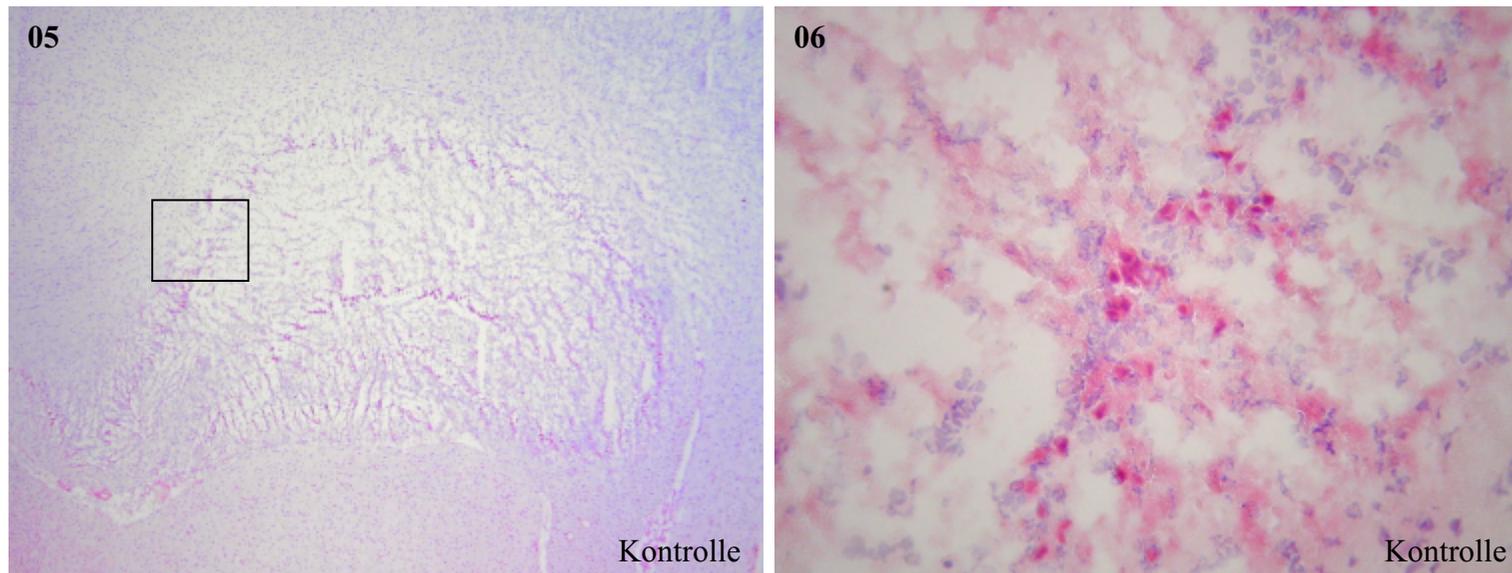
*Bild 04 zeigt die Klassifikation C1 mit beginnender Organisation und Makrophageneinwanderung in Teilen des Hippokampus. Bild 05 zeigt exemplarisch die Klassifikation C3, es ist deutlich eine Auflockerung des Gewebes sowohl im Bereich der Hippokampusformation als auch im Kortex zu erkennen. Bild 06 zeigt die Klassifikation D3 und man erkennt deutlich die Bildung von Vakuolen und Pseudozysten im Bereich von Hippokampus und Kortex.*

Übersicht III: HE-Färbung Tag 07: Propofol und Sevofluran



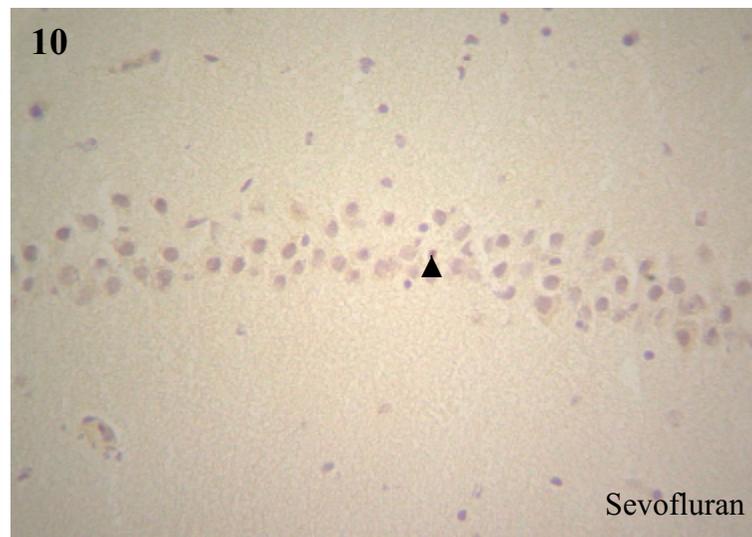
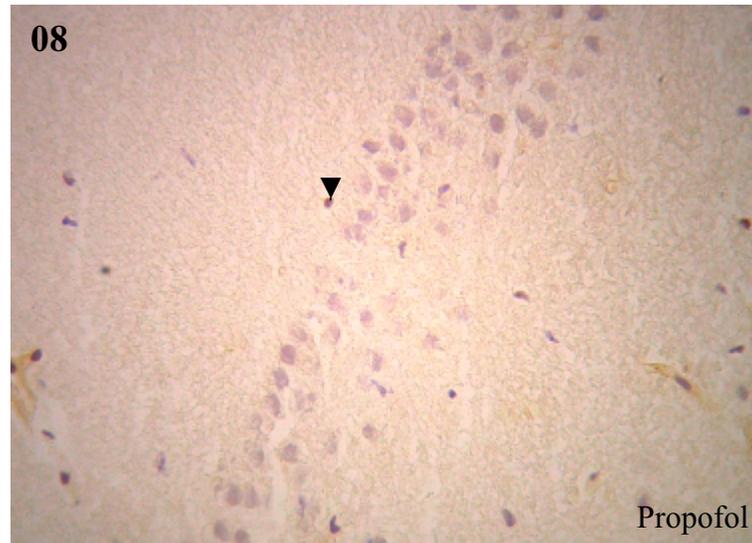
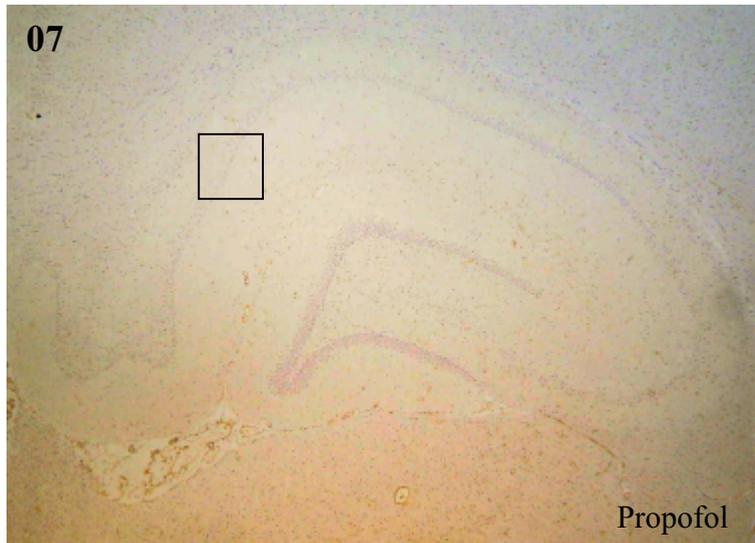
**Übersicht III:** Die Bilder 01 und 02 zeigen ein Tier aus der Propofol-Gruppe mit einer Überlebenszeit von sieben Tagen. Die Übersicht in Bild 01 zeigt den rechten Hippokampus in 25-facher Vergrößerung. Bild 02 zeigt als einen Ausschnitt (gekennzeichnet durch die schwarze Umrandung in Bild 01) der CA1-Region aus Bild 01 in 200-facher Vergrößerung. Es sind bei diesem Tier keine rot gefärbten, eosinophilen Neurone zu erkennen. Die Bilder 03 und 04 zeigen jeweils ein Tier aus der Sevofluran-Gruppe, ebenfalls mit einer Überlebenszeit von sieben Tagen, wobei Bild 03 hier in 25-facher Vergrößerung eine Übersicht über den gesamten rechten Hippokampus liefert und Bild 04 einen Ausschnitt (in Bild 03 gekennzeichnet durch die schwarze Umrandung) der CA1-Region desselben Tieres in 200-facher Vergrößerung zeigt.

### Übersicht IV: HE-Färbung Tag 07: Kontrolle



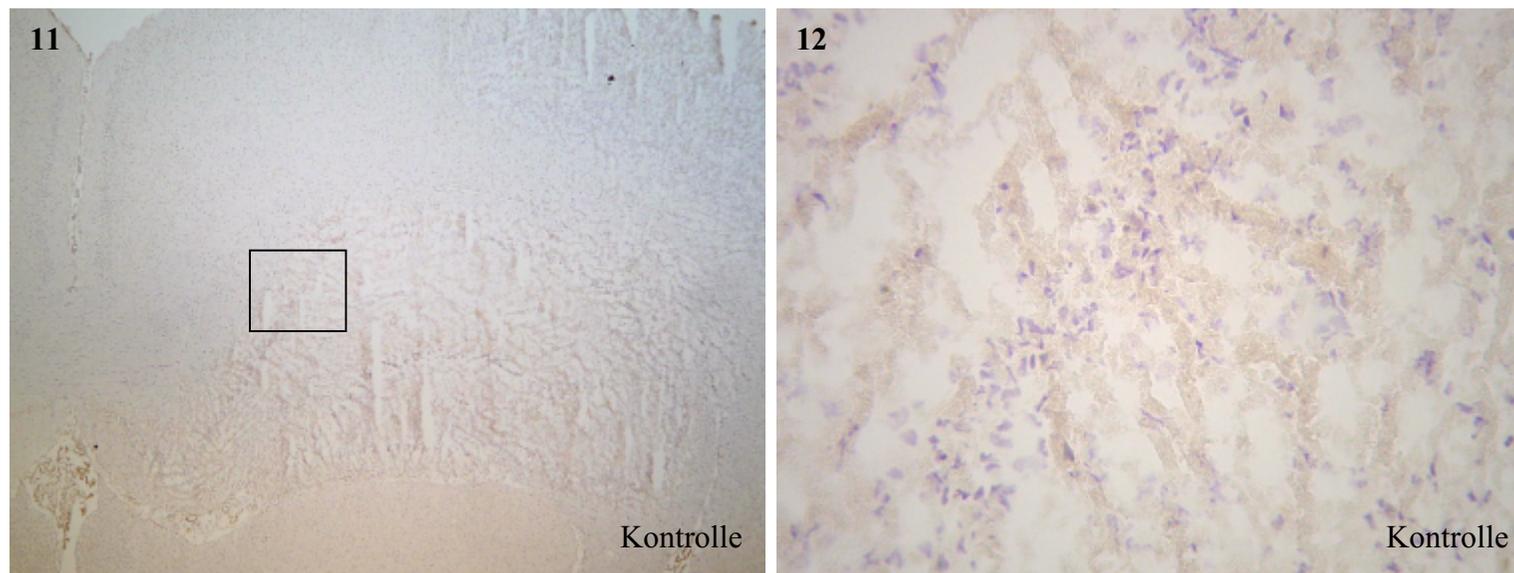
**Übersicht IV:** Die Bilder 05 und 06 zeigen ein Tier aus der Kontroll-Gruppe, mit einer Überlebenszeit von sieben Tagen. Die Übersicht in Bild 05 zeigt den rechten Hippokampus in 25-facher Vergrößerung und vermittelt einen Gesamteindruck über das Ausmaß des Schadens. Bild 06 zeigt als einen Ausschnitt (als schwarzer Kasten gekennzeichnet in Bild 05) der CA1-Region aus Bild 05 in 200-facher Vergrößerung, wobei die eosinophil angefärbten Neurone mit Pfeilsymbolen gekennzeichnet sind (➤).

Übersicht V: aktivierte Caspase-3-Färbung Tag 07: Propofol und Sevofluran



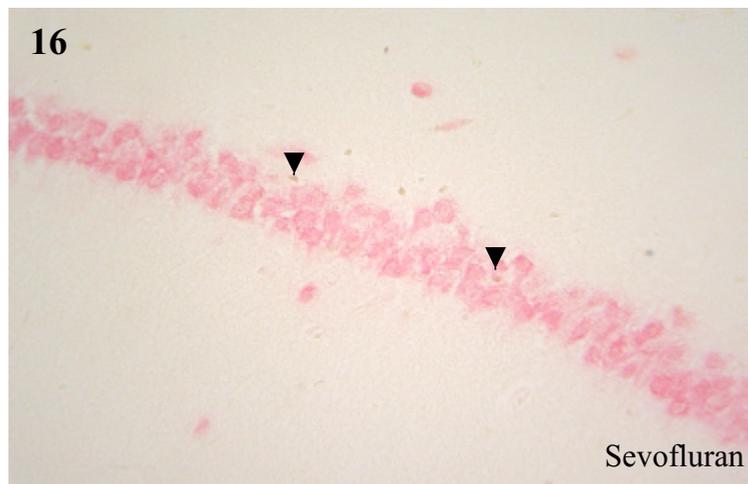
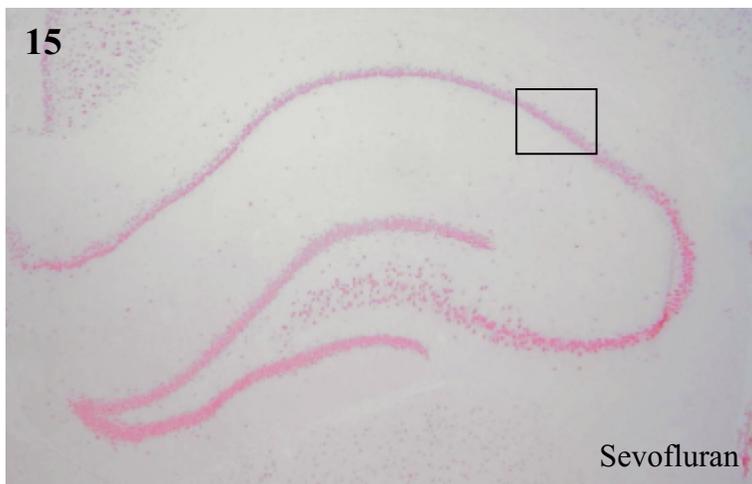
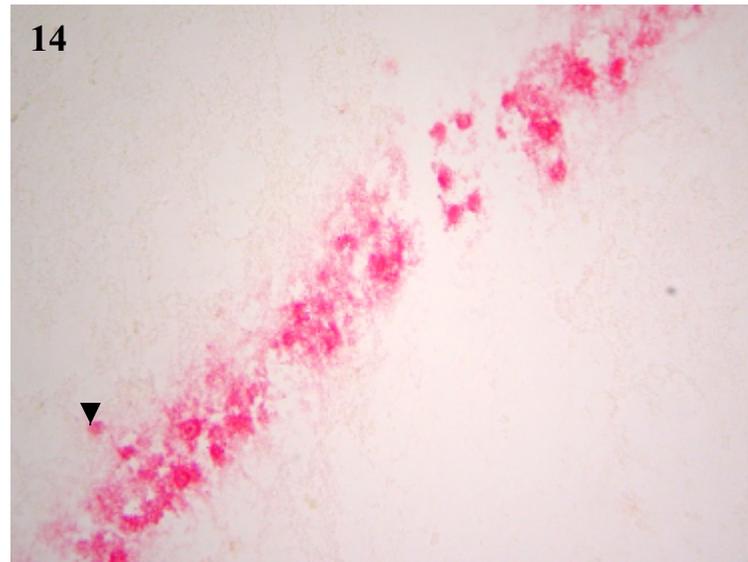
**Übersicht V:** Die Bilder 07 und 08 zeigen ein Tier aus der Gruppe Propofol mit einer Überlebenszeit von sieben Tagen. Die Übersicht in Bild 07 zeigt den rechten Hippokampus in 25-facher Vergrößerung. Bild 08 zeigt einen Ausschnitt aus der CA1-Region von Bild 07 (markiert durch den schwarzen Rahmen in Bild 07) in 200-facher Vergrößerung. Die akt. Caspase-3-positiv markierten Zellen sind mit einem Pfeilsymbol gekennzeichnet ( ➤). Die Bilder 09 und 10 zeigen jeweils ein Tier aus der Sevofluran-Gruppe, ebenfalls mit einer Überlebenszeit von sieben Tagen, wobei Bild 09 hier in 25-facher Vergrößerung eine Übersicht über den gesamten rechten Hippokampus liefert und Bild 10 einen Ausschnitt der CA1-Region desselben Tieres zeigt (in 200-facher Vergrößerung, der Ausschnitt aus Bild 09 ist dort entsprechend mit einem schwarzen Rahmen gekennzeichnet). Die akt. Caspase-3-positiven Zellen sind jeweils mit einem Pfeilsymbol gekennzeichnet ( ➤).

### Übersicht VI: aktivierte Caspase-3-Färbung Tag 07: Kontrolle



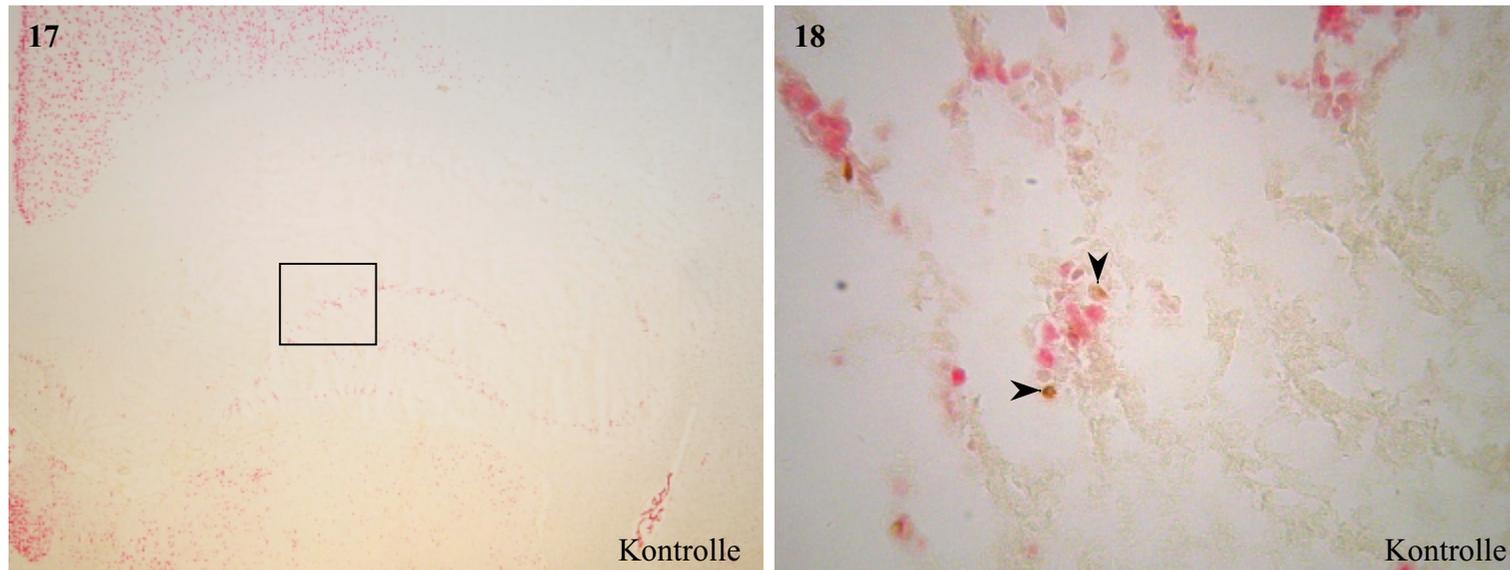
**Übersicht VI:** Die Bilder 11 und 12 zeigen ein Tier aus der Kontroll-Gruppe, mit einer Überlebenszeit von sieben Tagen.. Bild 11 zeigt den rechten Hippokampus in 25-facher Vergrößerung und vermittelt einen Gesamteindruck über das Ausmaß des Schadens. Bild 12 zeigt einen Ausschnitt (als schwarzer Kasten gekennzeichnet in Bild 11) der CA1-Region aus Bild 11 in 200-facher Vergrößerung, wobei hier keine akt. Caspase-3- positiv angefärbte Neurone detektiert sind.

Übersicht VII: Färbung aktivierter Caspase-3 und NeuN Tag 07: Propofol und Sevofluran



**Übersicht VII:** Die Bilder 13 und 14 zeigen ein Tier aus der Propofol-Gruppe mit einer Überlebenszeit von sieben Tagen. Die Übersicht in Bild 13 zeigt den rechten Hippokampus in 25-facher Vergrößerung. Bild 14 zeigt als einen Ausschnitt (gekennzeichnet durch die schwarze Umrandung in Bild 13) der CA1-Region aus Bild 13 in 200-facher Vergrößerung. Die Bilder 15 und 16 zeigen jeweils ein Tier aus der Sevofluran-Gruppe, ebenfalls mit einer Überlebenszeit von sieben Tagen, wobei Bild 15 hier in 25-facher Vergrößerung eine Übersicht über den gesamten rechten Hippokampus liefert und Bild 16 einen Ausschnitt (in Bild 15 gekennzeichnet durch die schwarze Umrandung) der CA1-Region desselben Tieres in 200-facher Vergrößerung zeigt. Die doppelt (rot und braun) markierten Neurone sind mit einem schwarzen Pfeilsymbol ( ) ➤ gekennzeichnet.

### Übersicht VIII: Färbung aktivierter Caspase-3 und NeuN Tag 07: Kontrolle



**Übersicht VIII:** Die Bilder 17 und 18 zeigen ein Tier aus der Kontroll-Gruppe, mit einer Überlebenszeit von sieben Tagen. Die Übersicht in Bild 17 zeigt den rechten Hippokampus in 25-facher Vergrößerung. Bild 18 zeigt als einen Ausschnitt (als schwarzer Kasten gekennzeichnet in Bild 05) der CA1-Region aus Bild 17 in 200-facher Vergrößerung, wobei die doppelt-markierten Neurone mit Pfeilsymbolen gekennzeichnet sind ( ➤).

### 4 DISKUSSION

Lange Zeit wurde der Begriff des Zelltodes mit dem Begriff und dem Bild der Nekrose gleichgesetzt. Bis 1951 GLÜCKSMANN zugrunde gehende Zellen beobachtete, die sich morphologisch nicht in das etablierte Schema der Nekrose einordnen ließen.

Er hatte erstmals den sog. „programmierten Zelltod“ beobachtet. Von diesem Zeitpunkt an ist das Interesse am programmierten Zelltod stetig gewachsen. 1971 prägten KERR und Kollegen den Begriff der Apoptose für diese Form des Zelluntergangs. Seither befassen sich weltweit zahlreiche Projekte und Forschungsgruppen mit den genauen morphologischen und physiologischen Abläufen und den daran beteiligten Proteinen.

Gerade bei der Therapie ischämisch-hypoxischer Zustände und deren Folgen spielt jedes einzelne vom Zelltod bedrohte Neuron eine wichtige Rolle, was die Entdeckung der Apoptose zu einem Meilenstein in der Erforschung erfolgreicher Therapieansätze werden ließ.

Ziel der hier vorliegenden Studie ist es, zunächst mit einer artifiziell erzeugten, inkompletten zerebralen Ischämie mit Reperfusion bei der Ratte die Aktivierung der Caspase-3, einem Apoptose-spezifischen Protein, zu untersuchen. Um Aussagen über ein mögliches neuroprotektives Potential von Propofol oder Sevofluran machen zu können, wird die Menge an akt. Caspase-3 pro ausgewähltem Gehirnschnitt immunhistochemisch markiert, zählerisch erfasst und ausgewertet. Im Anschluss werden die Ergebnisse der zwei unterschiedlichen Behandlungsgruppen mit denen der Kontroll-Gruppe und im zeitlichen Verlauf verglichen.

Es hat sich gezeigt, dass bei den Tieren der Propofol-Gruppe in der HE-Färbung keinerlei eosinophil markierte Zellen nachweisbar sind, alle Tiere gehören der Schadensklassifikation 0 an. Das nahezu gleiche Ergebnis entsteht für die Sevofluran-Gruppe. Es sind nur bei einem Tier eosinophile Zellen nachweisbar, die Tiere gehören mit einer Ausnahme alle der Schadensklassifikation 0 an.

Die Kontroll-Gruppe zeigt in knapp der Hälfte (43,6%) der Gehirnschnitte eosinophile Zellen sowie mindestens die Schadensklassifikation A1 (s. Tab. 07 und Abb. 16).

Die Färbung akt. Caspase-3 in Einfach- und Doppelfärbung zeigt tendenziell in den Gehirnschnitten der Tiere aus den Kontroll-Gruppen ebenfalls mehr akt. Caspase-3-positive Neurone, als in den Gehirnschnitten der Tiere aus der Propofol- bzw. der Sevofluran-Gruppe.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass beide Anästhetika die Aktivierung des Apoptose-spezifischen Proteins Caspase-3 zu unterdrücken in der Lage sind und so bis zu einem gewissen Grad zur Neuroprotektion befähigt sind.

### 4.1 Diskussion der Ergebnisse

#### 4.1.1 Physiologische Variablen

Um einen konstanten Ablauf des Versuchs zu gewährleisten, werden eine Reihe von Messungen vor, während und nach dem Versuch vorgenommen.

Standardisierte Ausgangsbedingungen und standardisierte Bedingungen während des Versuchs spielen eine wichtige Rolle hinsichtlich der Vergleichbarkeit und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb des Modells.

Während des eigentlichen Versuchs werden neben der Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP), der Blutglukose und der Herzfrequenz eine arterielle Blutgasanalyse durchgeführt, um neben arteriellem  $\text{paCO}_2$  und  $\text{paO}_2$  ebenfalls das Gesamthämoglobin und den pH-Wert zu ermitteln.

Eine Bestimmung der Gehirndurchblutung mit der Laser-Doppler-Flussmessung und Sonden zum Erfassen der perikraniellen und rektalen Temperatur runden das Bild ab. Alle diese Messungen liefern unverzichtbare Informationen über den Versuchsablauf.

#### Körpergewicht (g)

Die Tiere aller drei Gruppen (Propofol, Sevofluran und Kontrolle) zeigen keine signifikanten Unterschiede in ihrem Körpergewicht, die zu einer Beeinflussung der bei dem Versuch ermittelten Ergebnisse hätte führen können. Das Körpergewicht spielt zudem, wenn die Atemgaskonzentration durch die Atemfrequenz konstant gehalten wird, laut BAUGHMAN et al. (1988), ebenso wie das Alter, an das das Körpergewicht ja unmittelbar gekoppelt ist, keine bedeutende Rolle, wenn es um eine entscheidende Beeinflussung der Ergebnisse bei einem solchen Versuchsmodell geht.

#### Mittlerer arterieller Blutdruck, MAP (mmHg)

Da alle drei Versuchstiergruppen dem Versuchsprotokoll entsprechend eine 45-minütige Ischämie-Phase durchlaufen, während welcher der MAP auf 40 mmHg erniedrigt ist, sind entsprechend die Werte dieser Tiere gegenüber den Normal- und den Ausgangswerten in der Zeit während der Hypoperfusion signifikant erniedrigt.

In der Propofol- und der Sevofluran-Gruppe liegen die MAP-Werte vor und nach der Ischämie-Phase unter den Werten der Kontroll-Gruppe. Es ist bekannt, dass sowohl Propofol

## **DISKUSSION**

---

als auch Sevofluran den peripheren Gefäßwiderstand und damit den MAP senken (WIEBALCK und VAN AKEN 1995, CONZEN und NUSCHLER 1996).

### Blutglukose (mg/dl)

Glukose spielt als der Energielieferant des ZNS eine immens wichtige Rolle bei Versuchen, die sich mit ischämisch-hypoxischen Zuständen des ZNS befassen. Glukose wird unter normalen Umständen, in denen das ZNS mit ausreichend Sauerstoff versorgt ist, zu Energie umgesetzt (38 Mol ATP aus einem Mol Glukose). Steht nicht ausreichend Sauerstoff zur Verfügung, findet anaerobe Energiegewinnung statt, bei der neben lediglich zwei Mol ATP noch das saure Stoffwechselprodukt Laktat entsteht. Durch eine vermehrte Bildung aufgrund des O<sub>2</sub>-Mangels und einen verlangsamten Abtransport durch verringerte Stoffwechselleistung kommt es zu einer Anhäufung von Laktat vor Ort (MEHMET et al. 1998).

Ein zu hoher Glukosespiegel während einer Ischämie kann sich durch einen Anstieg des Laktatspiegels negativ auf das Ausmaß des neurologischen Schadens auswirken (HOFFMAN et al. 1990). Aus diesem Grund ist die Konstanthaltung auf einem normoglykämischen Niveau von großer Wichtigkeit. Es werden also die Versuchstiere präoperativ 16 Stunden nüchtern gesetzt, um so bei Versuchsbeginn und während des Versuchs möglichst alle Tiere in einem vergleichbar normoglykämischen Zustand zu wissen. Die trotz gleicher Behandlung aller Tiere entstehenden Unterschiede in den Blutglukosewerten, die sich durch individuelle Stoffwechselunterschiede zwangsläufig ergeben, bewegen sich unterhalb des physiologischen Bereichs von 60-80 mg/dl.

Nach HOFFMAN et al. (1990) ist jedoch bei einer während der Ischämie bestehenden Hyperglykämie mit weitreichenderen negativen Folgen auf das Ausmaß des neuronalen Schadens und das neurologische Endergebnis zu rechnen, als es bei Hypoglykämie während der Ischämie der Fall ist.

Sevofluran (WERNER et al. 1995) und Propofol (KOCHS et al. 1992) entfalten unabhängig von der Plasma-Glukosekonzentration ihre neuroprotektive Wirkung.

### Herzfrequenz (Schläge/min)

Die Herzfrequenz liegt bei allen Versuchstieren während des gesamten Versuchsablaufs im physiologischen Bereich. Die signifikanten Unterschiede der Propofol- und Sevofluran-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe erklären sich aus der bekannt negativ-chronotropen Wirkung der Anästhetika.

Sevofluran erniedrigt bekanntermaßen die Herzfrequenz (CONZEN und NUSCHLER 1996)

## DISKUSSION

---

und auch Propofol ist für seine kardiodepressive Wirkung bekannt (WIEBALCK und VAN AKEN 1995).

### Blutgase

Eine Überwachung der Blutgase, vor allem von  $\text{paCO}_2$ , ist von weitreichender Bedeutung, wird doch einer Hyperventilation mit nachfolgender Reduktion des  $\text{paCO}_2$  eine neuroprotektive Wirkung nachgesagt (VANICKY et al. 1992).

Daher wird der  $\text{paCO}_2$  während des gesamten Versuchs kontinuierlich überwacht und unter Zuhilfenahme der Atemfrequenz- und Atemvolumenregulierung konstant im physiologischen Bereich gehalten, um eventuelle Einflussnahme auf das Ausmaß des Schadens ausschließen zu können.

Bei dem vorliegenden Versuch liegen die Werte des  $\text{paCO}_2$  bei allen Versuchstieren fortwährend in physiologischen Bereichen, weshalb sich nach heutigem Kenntnisstand der Forschung eine Einflussnahme auf das Ergebnis des Versuchs ausschließen lässt.

### Gesamthämoglobin (g/dl)

Die gemessenen Werte des Gesamthämoglobin bewegen sich während des Versuchs bei allen Tieren bis zum Zeitpunkt des Blutentzuges in physiologischen Bereichen.

Durch den Blutentzug kommt es protokollgemäß bei allen Tieren der drei Untersuchungsgruppen auch zu einem Abfall des Hb.

Der Wert normalisiert sich während der Reperfusion-Phase, in der das vorher entzogene Blut wieder zurück infundiert wird. Da der Abfall des Hb bei den Tieren aus allen drei Untersuchungsgruppen in gleichem Ausmaß stattfindet, nimmt diese Erscheinung keinen Einfluss auf die Aussagekraft dieser Studie.

### Hämatokrit (%)

Der gemessene Hämatokrit (%) bewegt sich während des Versuchs bei den Tieren aller drei Gruppen bis zum Zeitpunkt des Blutentzuges in physiologischen Bereichen. Durch den Blutentzug kommt es protokollgemäß bei allen Tieren der drei Untersuchungsgruppen auch zu einem Abfall des Hämatokrit um ca. 20%. Nach Beendigung der Reperfusion-Phase, in der das vorher entzogene Blut wieder zurück infundiert wird, normalisieren sich die Werte auf ca. 1 bis 2% unter dem Ausgangswert.

Da der Abfall des Hämatokrit bei den Tieren aus allen drei Untersuchungsgruppen in gleichem Ausmaß stattfindet, nimmt diese Erscheinung keinen Einfluss auf die Aussagekraft dieser Studie.

### pH-Wert

Das Konstanthalten des pH-Wertes spielt eine wichtige Rolle im Hinblick auf das Ausmaß des später zu erwartenden ischämischen Schadens.

Eine Erniedrigung des pH kann negative Auswirkungen auf geschädigtes Gewebe haben und eine Verschiebung des pH in den alkalischen Bereich kann potentiell neuroprotektiv wirksam werden (ANDERSON und MEYER 2002), weshalb der pH-Wert während des gesamten Versuchs Basenabweichungs-gesteuert konstantgehalten wird. Bei Bedarf wird dem Tier geeignete Puffersubstanz (8,4% Natriumhydrogenkarbonat) i.v. injiziert.

So wird der pH während der gesamten Operation konstant im physiologischen Bereich gehalten und kann somit keinen Einfluss auf die Ausprägung des Schadens haben.

### Gehirndurchblutung (PU)

Die Gehirndurchblutung erfährt, bedingt durch das Versuchsprotokoll, bei allen Tieren der drei Behandlungsgruppen während des Versuchs weitreichende Veränderungen.

Während der Ischämie-Phase der Operation kommt es, bedingt durch den Blutentzug und das Absenken des MAP auf 40 mmHg in der linken Hemisphäre, zu einem signifikanten Absinken der Durchblutung um 50%.

Die rechte Hemisphäre wird nur zu 30% durchblutet, da dort zusätzlich zu dem Blutentzug noch die Arteria carotis communis durch einen Clip für die Zeit der Ischämie reversibel verschlossen wird und so die Durchblutung signifikant um 70% gegenüber dem Ausgangswert absinkt.

### Temperatur (°C)

Neben der rektalen Temperatur wird zusätzlich die perikranielle Temperatur gemessen, da die beiden Werte während eines ischämisch-hypoxischen Zustandes voneinander abweichen können (BUSTO et al. 1987).

Die lückenlose Überwachung der Temperatur während des gesamten Versuchs spielt eine wichtige Rolle, denn es ist bekannt, dass schon geringe Erniedrigungen der perikraniellen Temperatur neuroprotektive Effekte auf das betroffene Gewebe entfalten können (WERNER 1997, BONA et al. 1998).

Mittels einer an die Temperaturmessung gekoppelten Wärmelampe wird die Temperatur bei 37,5 °C konstant gehalten. Sowohl die periphere als auch die perikranielle Temperatur liegt bei allen Versuchstieren während des gesamten Versuchs ohne signifikante Schwankungen im physiologischen Bereich. Somit lassen sich Beeinflussungen des Ergebnisses durch Unterschiede in der Temperatur ausschließen.

### 4.1.2 HE-Färbung

Die HE-Färbung wird hier eingesetzt, um einen Überblick über die Schwere und die Ausdehnung des Schadens zu erhalten, anhand dessen dann eine erste Einteilung der Schadensbilder nach REMMELE (1984) und DAVID (1970) erfolgt.

Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen Tieren der beiden Behandlungs-Gruppen und Tieren der Kontroll-Gruppe.

Dieser Unterschied zwischen den Tieren der Behandlungs-Gruppen Propofol bzw. Sevofluran einerseits und der Kontroll-Gruppe andererseits erklärt sich aus der neuroprotektiven Wirkung der beiden Anästhetika. Da die Anästhetika Fentanyl und N<sub>2</sub>O, eingesetzt bei Tieren der Kontroll-Gruppe, keinen Einfluss auf die Folgen der Ischämie haben (MORIMOTO et al. 1997), treten dort auch erwartungsgemäß die größeren Gewebeschäden auf. Diese Erwartung erfüllt sich in dem Ergebnis dieser Studie, Tiere der Schadensklassifikation B und C gehören ausschließlich der Kontroll-Gruppe an (s. Tab. 07).

Der lange Zeitraum erlaubt Beobachtungen von Reaktionen hämatogener Zellen wie beispielsweise die Einwanderung von Granulozyten und Makrophagen, die sich unmittelbar im Anschluss an die Okklusion der A. carotis communis entwickelt und sieben Tage nach Ischämie ihren Höhepunkt erreicht (STOLL et al. 1998).

CLARK et al. (1994) konnten nach einer Reperfusionzeit von fünf Tagen nach temporärer inkompletter Ischämie mit Reperfusion (MCAO) eine Aktivierung der Astroglia, Einwanderung von Makrophagen und die Ausbildung von Fibroblasten-ähnlichen Zellen nachweisen. Nach 15 Tagen begann weiterhin die Entwicklung eines grobmaschigen, narbigen Ersatzgewebes, die nach 30 Tagen abgeschlossen war.

Die Tatsache, dass innerhalb der Kontroll-Gruppe die Ausprägung des Schadens ebenfalls Unterschiede aufweist, die von lichtmikroskopisch unauffälligen Präparaten (56,2% der Tiere der Kontroll-Gruppe) über ödemartige Veränderungen des umgebenden Gewebes und eosinophiler Zellfärbung in der CA1-Region des Hippokampus bis hin zu deutlicher

## DISKUSSION

---

Narbenbildung mit zahlreichen segmentkernigen Neutrophilen und zahlreichen eosinophilgefärbten Zellen im gesamten Hippokampusbereich reichen, gründet sich einmal in der Tatsache der unterschiedlich langen Überlebenszeiträume, die von einem bis hin zu 28 Tagen reichen.

Zum anderen könnte die Ursache darin liegen, dass die Dauer der Ischämie von 45 Minuten eine Art Schwellenwert ist (LIN et al. 1998). Tiere, die aufgrund anatomischer Unterschiede (GARCIA et al. 1995) empfindlicher auf ischämische Einflüsse reagieren, zeigen in der Auswertung einen ausgeprägteren Gewebe- und Zellschaden als Tiere, die weniger empfindlich reagiert haben. Zwar sind die Versuchstiere durch Inzucht genetisch so vergleichbar wie möglich gehalten, jedoch niemals absolut identisch. So würde bei einer Ischämiedauer von 50 Minuten die Ausprägung des Schadens bei mehr Tieren stärker auftreten und bei einer Ischämiedauer von deutlich unter 45 min die Anzahl der Tiere mit starker Schädigung abnehmen. Dies sind Vermutungen, die allerdings durch weitere Studien mit unterschiedlichen Ischämie-Zeiten erst belegt werden müssen.

Eosinophile Zellen treten, bis auf eine Ausnahme in der Gruppe der mit Sevofluran behandelten Tiere, ausschließlich bei Tieren der Kontroll-Gruppe und lediglich in der rechten Hemisphäre auf, dieses allerdings bereits nach 24 h Reperfusion, eine Beobachtung, die sich mit Ergebnissen von NEWCOMB et al. (1999) deckt.

Eosinophilie wird als ein Anzeichen für Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels und Vorbote der Nekrose gewertet (REMMELE 1984, GARCIA et al. 1993). Ob diese Eosinophilie ein Anzeichen für eine irreversible Zellschädigung in Form der Nekrose ist, wird kontrovers diskutiert (CHANG und BARAM 1994). WYLLIE et al. (1980) vertreten die Ansicht, dass eosinophile Zellen, die Zellschwellung und Karyolysis aufweisen, als nekrotische Zellen angesprochen werden können, wohingegen eosinophile Zellen mit Karyopyknose und Zellschrumpfung als apoptotisch gelten.

Damit ziehen sie den Schluss, dass allein durch Eosinophilie nicht auf Nekrose rückgeschlossen werden kann.

ITO et al. (1975) gehen davon aus, dass eosinophil angefärbte Zellen, die morphologische Veränderungen wie Chromatolyse, Vakuolenbildung und deutliche Hyperchromasie zeigen, aufgrund intensiver enzymatischer Aktivität dennoch überlebensfähig sind.

KIERNAN et al. (1998) verweisen allerdings auf die Azidophilie geschädigter Neurone in nekrotischem Gewebe als Indikator für das Ausmaß des nekrotischen Schadens, und GARCIA et al. (1993) sprechen eosinophile Zellen mit den charakteristischen

## DISKUSSION

---

morphologischen Kennzeichen der Zellschwellung, Kernpyknose, Karyolyse als bereits abgestorben an.

Ob Eosinophilie als sicherer Hinweis auf Zellnekrose oder irreversible Zellschädigung gewertet werden kann, ist zu diesem Zeitpunkt nicht mit Bestimmtheit zu klären und bleibt Gegenstand weiterführender Studien.

Die Tatsache, dass aus den beiden Behandlungsgruppen Propofol und Sevofluran im Gegensatz zur Kontroll-Gruppe lediglich ein einziges Tier eosinophil markierte Zellen aufweist, spricht für eine protektive Wirkung der beiden Anästhetika auch über den langen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen, den diese Studie untersucht und bestätigt Ergebnisse aus vorangegangenen Untersuchungen (BIANCHI et al. 1991, KOCHS et al. 1992, HANS et al. 1994).

Interessant ist die Beobachtung, dass innerhalb der Kontroll-Gruppe zwischen einem und drei Tagen Überlebenszeit praktisch kein Unterschied in der Anzahl eosinophiler Zellen an der Gesamtzellzahl besteht (ca. 20%, s. Tab. 07) und den höchsten Gehalt eosinophiler Zellen Tiere aus der Gruppe mit einer Überlebenszeit von sieben Tagen aufweisen (knapp 42%).

Letzteres deckt sich mit der Beobachtung von NAKANO et al. (1990), die ebenfalls nach einer temporären Okklusion der A. carotis communis die typischen Zellveränderungen (Kernpyknose und Eosinophilie) erst eine Woche nach Ende der Ischämie beobachteten und diese Veränderungen deshalb zum progressiven neuronalen Schaden rechnen (GARCIA et al. 1993), dessen Ursachen noch nicht im Detail geklärt sind, möglicherweise aber verursacht werden durch exzessive Freisetzung von Neurotransmittern und -modulatoren (NAKANO et al. 1990).

Der Anteil eosinophiler Zellen halbiert sich bei Tieren mit einer Überlebenszeit von 28 Tagen auf 16% und es kann laut Aussagen von NAKANO et al. (1990) mehrere Monate dauern, bis die letzten, durch die Ischämie verursachten Zellschäden beseitigt sind.

Die unterschiedlichen Ergebnisse innerhalb gleicher Überlebenszeiten in der Kontroll-Gruppe haben ihre Ursache vermutlich in den individuell unterschiedlichen anatomischen Strukturen der verschiedenen Tiere und ihren unterschiedlichen physiologischen Reaktionen auf die Okklusion einer großen Arterie (GARCIA et al. 1995).

Dies dürfte auch der Grund für die Eosinophilie bei einem einzigen Tier aus der Behandlungs-Gruppe mit Sevofluran sein.

Innerhalb der Gruppe der unbehandelten Nativ-Tiere finden sich in keiner der beiden Hemisphären eosinophil-markierte Zellen, die normalen Neurone färbten sich gleichmäßig blau in der Färbung mit Hämatoxylin.

Interessant ist, dass auch die linke Hemisphäre, nachweislich von Eosinophilie nicht betroffen, doch unter dieser temporären Ischämie ebenfalls zu Schaden kommt. Ein Schaden, der sich lediglich anhand einer Reduktion der Zellzahl gegenüber den völlig unbehandelten Tieren der Nativ-Gruppe bemerkbar macht.

Wie genau die Neurone dabei zugrunde gehen, kann in dieser Studie nicht nachvollzogen werden und sollte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

### **4.1.3 Immunhistochemische Detektion aktivierter Caspase-3**

Mit dieser Einfachfärbung soll das spezifisch während der Apoptose in der betroffenen Zelle vorkommende Protein akt. Caspase-3 nachgewiesen werden, da es als sicherer Indikator für den programmierten Zelltod gilt (ZHU et al. 2000, NIWA et al. 2001).

Die Aufmerksamkeit richtet sich, wie schon zuvor in der HE-Färbung, hauptsächlich auf die besonders empfindlichen Neurone des Hippokampus und des Gyrus dentatus.

Es fällt zunächst auf, dass die Menge der akt. Caspase-3-positiven Zellen insgesamt, mit einem Maximalwert von gut 2% innerhalb der Kontroll-Gruppe mit einer Überlebenszeit von 28 Tagen, eher gering ist.

Im Vergleich dazu fanden LI et al. (1995) bei zwei Stunden MCAO mit einer Überlebenszeit von 46 Stunden post ischaemiam zwischen 5,4% apoptotische Zellen im Randbereich der ischämischen Läsion und knapp 1% apoptotische Zellen im äußeren Randbereich der Läsion.

Und auch bei CHOPP und LI (1996) lag der Anteil apoptotischer Zellen um die 4% nach vorübergehendem Verschluss (zwei Stunden) der A. cerebri media.

Eine mögliche Ursache für die geringen Mengen akt. Caspase-3 könnte eine nicht ausreichende Spezifität des Antikörpers für das gesuchte Protein sein. Diese Möglichkeit kann allerdings weitgehend ausgeschlossen werden, da die bei jedem Färbedurchgang mitgeführten Positivkontrollen (Thymus juveniler Ratten) stets positiv markierte Zellen enthielten und somit der Antikörper den Beweis für die erforderliche Sensitivität für akt. Caspase-3 in jedem Färbedurchgang erneut erbracht hat. Im Thymus junger Ratten findet kontinuierlich Apoptose statt, weshalb sich dieses Gewebe als Positivnachweis eignet (UCKER et al. 1994, URBAN et al. 2002). Bei erfolgreicher Färbung müssen also positive Resultate in Form braungefärbter Zellen unter dem Lichtmikroskop zu sehen sein.

Ein weiterer Grund für diese geringere Menge akt. Caspase-3-positiver Zellen mag die in vorliegender Studie verwendete, andere Versuchsanordnung sein (45 min Okklusion der A. carotis communis bei einem Blutdruck von 40 mmHg und Überlebenszeiten zwischen einem

## DISKUSSION

---

und 28 Tagen), da die Menge der apoptotischen Zellen und die Ausprägung des Schadens, für den akt. Caspase-3 ein Indikator ist, direkt von der Schwere der Schädigung abhängt (CHOPP und LI 1996) und schon geringe Variationen der Okklusionszeit die Schadensbilder verändern (NAKANO et al. 1990).

Zudem spielt die kurze Halbwertszeit apoptotischer Zellen gerade im Vergleich zu nekrotischen Zellen eine wichtige Rolle. Denn die Histologie erlaubt immer nur Momentaufnahmen eines dynamischen Prozesses und kann niemals einen Ablauf in seiner Komplettheit darstellen (CHOPP und LI 1996).

Die größte Menge akt. Caspase-3-positiver Zellen insgesamt findet sich bei den Tieren der Kontroll-Gruppe. Allerdings besteht innerhalb der Überlebenszeiten von drei und sieben Tagen zwischen den drei Gruppen, Kontrolle, Propofol und Sevofluran, kein nennenswerter Unterschied.

Die Aktivierung von Caspase-3 beginnt etwa 24 Stunden bis drei Tage nach Ende der Ischämie (DU et al. 1996) und ist eine Entwicklung, die auch noch Wochen nach Beendigung der eigentlichen Ischämie nicht abgeschlossen ist (CHOPP und LI 1996, LI et al. 1998), was die Tatsache erklärt, dass auch nach 28 Tagen akt. Caspase-3-positive Zellen auftreten.

Die größte Menge akt. Caspase-3-positiver Zellen innerhalb der beiden Behandlungsgruppen findet sich nach einer Reperfusionzeit von sieben Tagen.

Ein Grund dafür kann sein, dass die Neurone zwischen drei und vier Tage Zeit benötigen, um die Apoptose-typischen Kernveränderungen nach der Ischämie zu entwickeln (NITATORI et al. 1995), was auch die Tatsache erklären könnte, dass drei bzw. sieben Tage nach der Reperfusion kein Unterschied zwischen den drei unterschiedlichen Gruppen besteht.

Der Rückgang akt. Caspase-3-positiver Zellen innerhalb der mit Propofol- bzw. Sevofluran-behandelten Tiere nach 28 Tagen Reperfusion ist als eine Folge der Behandlung mit Propofol bzw. Sevofluran anzusehen, denn bei Tieren der Kontroll-Gruppe ist im Gegensatz dazu ein Anstieg akt. Caspase-3-positiver Zellen nach 28 Tagen Reperfusion zu verzeichnen.

Innerhalb der Gruppe der Nativ-Tiere finden sich erwartungsgemäß zu keinem Zeitpunkt in keiner der beiden Hemisphären akt. Caspase-3-positive Zellen.

Insgesamt lässt sich demnach beobachten, dass Tiere, die während der Ischämie mit einem der beiden Anästhetika behandelt wurden, nach 28 Tagen einen geringeren Anteil apoptotischer Zellen aufweisen, als die Tiere, die unbehandelt der Ischämie ausgesetzt waren.

So können sowohl Propofol als auch Sevofluran längerfristig gesehen die Expression akt. Caspase-3 nach temporärer Ischämie im Sinne einer Einschränkung günstig beeinflussen. Die ansteigende Zahl akt. Caspase-3-positiver Zellen gegen Ende des Beobachtungszeitraumes

innerhalb der Tiere der Kontrollgruppe zeigt, dass eine Intervention mit neuroprotektiven Maßnahmen auch zu diesem späten Zeitpunkt noch sinnvoll sein kann, da die Apoptose ein Prozess ist, der sich über Wochen post ischaemiam weiterentwickelt.

### 4.1.4 Doppelfärbung aktivierter Caspase-3 in Kombination mit NeuN

Bei den als Negativkontrolle mitgefärbten Präparaten von gänzlich unbehandelten Tieren können keine akt. Caspase-3-positiven Zellen detektiert werden, was noch einmal die bereits bei der Einfachfärbung gezeigten Ergebnisse bestätigt. Es färbten sich bei diesen Präparaten erwartungsgemäß lediglich die Neurone NeuN-positiv - rot - an, was die Funktionalität des Antikörpers gegen das neuronale nukleäre Protein und die Spezifität des Antikörpers gegen akt. Caspase-3 bestätigt.

Der als Positivkontrolle mitgefärbte Thymus juveniler Ratten (UCKER et al. 1994, SUN und SHI 2001, URBAN et al. 2002) weist bei jedem Färbedurchgang erwartungsgemäß akt. Caspase-3-positive Zellen auf und keinerlei Rotfärbung, was die Funktionalität des Antikörpers gegen das gesuchte Protein akt. Caspase-3 und die Spezifität des Antikörpers gegen NeuN in jedem Färbedurchgang erneut bestätigt.

Es ist notwendig einen neuronalen Marker einzusetzen, da als Reaktion auf die Gewebeschädigung zahlreiche Entzündungszellen in das betroffene Gebiet einwandern (STOLL et al. 1998) und akt. Caspase-3 neben Neuronen ebenfalls in Mikroglia lokalisiert werden kann (VELIER et al. 1999). Die Einfachfärbung unterscheidet nicht zwischen neuronaler akt. Caspase-3 und in Mikroglia oder anderen Entzündungszellen lokalisierter akt. Caspase-3, was den Einsatz des neuronalen Markers NeuN sinnvoll macht.

BRECHT et al. (2001) lokalisierten zwar akt. Caspase-3 lediglich in Neuronen, aber Daten dieser Studie deuten an, dass die akt. Caspase-3 nicht ausschließlich auf Neurone beschränkt ist und die kontroverse Diskussion um eben diese Frage nach der Beschränkung akt. Caspase-3 auf Neurone zu Recht geführt wird (BEER et al. 2000).

Es finden sich neben den doppelt positiv markierten Neuronen in allen drei Behandlungsgruppen Zellen, die lediglich akt. Caspase-3-positiv markiert waren. Innerhalb der Gruppe der mit Propofol behandelten Tiere überschreitet die Zahl der einfach-positiv-markierten Zellen sogar die der zweifach-positiv-markierten Neurone.

Um Klarheit über diesen Sachverhalt zu erlangen, wird es notwendig und von großem Interesse sein, die Zellen, die nachweislich akt. Caspase-3 enthalten, mit Hilfe zusätzlicher, spezifischer Marker zu diskriminieren.

Auch stellt sich die Frage, wie viele der lediglich einfach markierten Zellen nicht doch Neurone sind, deren neuronales Strukturprotein, bedingt durch die ischämische Zellschädigung, zum Zeitpunkt der Färbung bereits so weit abgebaut ist, dass es von Antikörpern nicht mehr detektiert werden kann und so die fragliche Zelle nicht mehr als Neuron zu identifizieren ist.

### **4.2 Diskussion der Methoden**

#### **4.2.1 Ischämiemodell**

Viele Untersuchungen zur Funktion bestimmter Ursache-Wirkungsprinzipien können in Zell- bzw. Organkulturen ohne Weiteres durchgeführt werden. Doch lassen sich die Eigenschaften sehr komplexer Fragestellungen, wie es die Detektion von Apoptose nach Ischämie in neuronalem Gewebe beispielsweise ist, mit solchen Analysemethoden nicht ausreichend realisieren. Gegen ein In-Vitro-Modell mit Gewebeschnitten oder Gliazellen in Kultur spricht in erster Linie die dort nicht gegebene, normale Perfusion des zu untersuchenden Gewebes.

Ein besonders wichtiger Aspekt ist weiterhin die Reproduzierbarkeit der ablaufenden pathologischen Prozesse. Eine solche kontrollierte Reproduzierbarkeit bietet auf diesem Untersuchungsgebiet der Tierversuch, denn der Schlaganfall beim Menschen hat vielfach variable anatomische und pathophysiologische Ursachen und ebenso viele unterschiedliche Manifestationen. Diese Komplexität und klinische Variabilität machen präzise Studien, die untereinander vergleichbare Ergebnisse liefern, unmöglich (BIRCHMEIER et al. 1997).

Zusätzlich bietet das Tiermodell die Möglichkeit, gründliche histopathologische, biochemische und physiologische Studien, die intra- oder postoperativen Zugang zum Gehirn erfordern, durchzuführen. Ein weiterer, sehr wichtiger Aspekt ist die umfassende Kontrollierbarkeit des Geschehens vor, während und nach der Ischämie, denn es sind oftmals die ersten Minuten eines ischämischen Geschehens, denen besonderes Augenmerk gilt.

Diesen oben genannten Problemen (mangelnde Reproduzierbarkeit und Überwachung, nicht ausreichender Zugang zu Untersuchungsmaterial) schließen sich zudem noch ethische Aspekte an, die es verbieten, bestimmte medizinische Fragestellungen und neue therapeutische Ansätze primär an Menschen zu erforschen.

Tiermodelle sind folglich unabdingbare Voraussetzung für diese Art von Studien.

## DISKUSSION

---

Neben den heute vorwiegend verwendeten Nagetieren fanden in früheren Studien größere Säugetiere wie Katzen (KLEIHUES und HOSSMANN 1971), Kaninchen und Ferkel (MEHMET et al. 1998) Verwendung.

Warum heute hauptsächlich Nagetiere verwendet werden, hat folgende Gründe:

Sie sind gut verfügbar und leicht zu halten und während des Versuchs ergibt sich durch ihr wesentlich geringeres Gewicht ein geringerer Medikamentenbedarf.

Die geringere Größe der Nagetiere führt zu einer Vereinfachung der Probengewinnung, -verarbeitung und späteren Lagerung von Untersuchungsmaterialien und macht sie zu einer kostengünstigeren Alternative im Vergleich zu größeren Säugetieren. Zudem sind sie durch Inzucht genetisch relativ homogen und ihr zerebrovaskuläres System ähnelt stark dem höherer Tiere. Nicht zuletzt spricht die in der Bevölkerung größere Akzeptanz von Tierversuchen an Nagern als an höheren Säugetieren für diese Spezies (GINSBERG und BUSTO 1989).

Es steht eine Anzahl unterschiedlicher Modellansätze für die Induktion einer zerebralen Ischämie bei Ratten zur Verfügung, die je nach Ansatz an unterschiedlicher Stelle im zentralen Nervensystem eine Ischämie mit unterschiedlicher Ausprägung des Schadens hervorrufen (GINSBERG und BUSTO 1989).

Für die Fragestellung dieser Studie wird das Modell einer inkompletten rechtsseitigen Hemisphärenischämie mit anschließender Reperfusion unter Fentanyl/Lachgas-Anästhesie gewählt.

Für die Induktion der rechtsseitigen Hemisphärenischämie wird die rechte A. carotis communis für 45 Minuten mit einem Clip verschlossen und der mittlere arterielle Blutdruck durch sukzessiven Blutentzug auf einen Wert von 40 mmHg gesenkt. Dieses Modell verursacht gezielt einen ausgeprägten neuronalen Schaden in selektiv vulnerablen Neuronen gerade in der Hippokampusformation (PULSINELLI et al. 1982a) (hier vor allem auf der rechten Seite, bedingt durch den Verschluss der rechten A. carotis communis) und bietet dabei die Möglichkeit des direkten Vergleichs von geschädigter rechter mit ungeschädigter linker Hippokampus-Seite. Zu beachten ist allerdings die Einflussnahme des Blutentzugs auch auf die linke Seite, was bei der Auswertung der Ergebnisse Berücksichtigung finden muss.

Ziel dieser Studie ist es, ein mögliches neuroprotektives Potential der beiden Anästhetika Sevofluran und Propofol nachzuweisen, wobei man bei der Gestaltung des Versuches den Situationen, wie sie täglich in der Anästhesie eintreten, so nahe wie möglich kommen will. Deshalb ist es von Bedeutung, eine Beeinflussung des Ergebnisses durch die für den Versuch

## DISKUSSION

---

notwendige Hintergrundanästhesie der Kontroll-Gruppe so gering wie möglich zu halten, weshalb die Kombination von Fentanyl mit Lachgas gewählt wird.

Zum einen nehmen diese beiden Substanzen weder signifikant Einfluss auf die Autoregulation des zerebralen Blutflusses, noch ist der zerebrale Sauerstoffverbrauch, wie unter Anästhesie ausschließlich unter Verwendung von Lachgas, verringert. Und zum anderen entspricht der spinale und zerebrale Blutfluss dem wacher Tiere (CARLSSON et al. 1982, HOFFMAN et al. 1992). Zudem beeinflusst hoch dosiert Fentanyl das ischämiebedingte Schadensausmaß nicht (MORIMOTO et al. 1997).

Anhand eines „burst-suppression“-Musters im EEG lässt sich feststellen, dass diese Kombination von Fentanyl mit Lachgas bei nicht gestressten Versuchstieren für eine ausreichende Analgesie und Sedation sorgt, wobei alle Wunden nach dem chirurgischen Eingriff zusätzlich mit dem lange wirksamen Lokalanästhetikum Bupivacain 0,5% infiltriert werden (ENGELHARD et al. 1999).

Die Tiere erhalten zusätzlich noch das Muskelrelaxans Rocuroniumbromid per Dauerinfusion (25 mg/kg/h), um eine neuromuskuläre Blockade aufrechtzuerhalten, um die Tiere kontrolliert zu beatmen. So wird der  $\text{pCO}_2$  in einem bestimmten Bereich gehalten und zudem der durch Fentanyl verursachte Muskelrigor kontrolliert.

Gaben von Natriumbikarbonat während der Ischämie-Phase halten den pH-Wert in einem physiologischen Bereich.

Es ist bekannt, dass das durch diesen Versuch induzierte Schadensbild durch die Nekrose der betroffenen Zellen geprägt ist und nur ein Teil der Zellen apoptotisch zugrunde geht (CHALMERS-REDMAN et al. 1997).

So fanden LI et al. (1998) 46 Stunden nach Ischämie im Kern der ischämischen Schädigung nur noch 75% der Zellen (im Vergleich zur ungeschädigten Gegenseite), etwa 25% der Zellen waren verschwunden. 55% der noch vorhandenen Zellen waren irreversibel geschädigt, wobei davon wiederum etwa 50% nekrotisch und etwa 5% apoptotisch zugrunde gegangen waren.

In den Randzonen der Läsion waren zwischen 16% (im inneren Bereich) und 9% (im äußeren Bereich) aller Zellen verschwunden und 62% der vorhandenen Zellen waren überlebensfähig.

Untersuchungen von CHOPP und LI (1996) fanden die höchste Zahl apoptotischer Zellen zwischen 24 und 48 Stunden nach der Ischämie, lokalisiert vor allem im inneren Grenzgebiet der Läsion, wobei dort auch vier Wochen nach dem Versuch noch apoptotische Zellen zu finden waren. Sie gaben den relativen Wert mit etwa 4% an.

### 4.2.2 Einordnung des Gewebeschadens anhand der HE-Färbung

Die HE-Färbung wird in der Histologie und der Histopathologie als Standard-Färbung eingesetzt. Sie ist eine schnell (Dauer eines Färbedurchgangs etwa eine Stunde) durchzuführende und relativ unkomplizierte Färbemethode.

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung bedient sich zweier unterschiedlicher Farbstoffe.

Eine Komponente ist der Naturfarbstoff Hämatoxylin, eine Leukoverbindung des Hämateins, die durch Ätherextraktion aus dem zerkleinerten roten Kernholz des in Mittelamerika beheimateten Campechenbaumes (*Haematoxylon campechianum*) gewonnen wird.

Die während der Färbung wirksame Substanz ist allerdings das Hämatein, eine aus dem Hämatoxylin durch Oxidation entstandene Verbindung.

Dieses Hämatein färbt basophile Strukturen (hier den Zellkern) dunkel blau an.

Die zweite Komponente ist das Eosin, ein vom Fluoreszein abgeleiteter, saurer, roter Xanthinfarbstoff, der die eosinophilen Bestandteile der Zellen leuchtend pink färbt.

Das Prinzip der Färbung beruht auf der sog. Elektroadsorption, deren Grundlage der amphotere Charakter der Proteine ist. Hier dient sie dazu, eine Übersicht über das Ausmaß des Schadens und die Verteilung der geschädigten Zellen zu erhalten, denn durch die Auswirkungen der Ischämie (Sauerstoffmangel, Energiemangel und Blutmangel) auf den Stoffwechsel der betroffenen Zellen reichern sich saure Stoffwechselprodukte in diesen Zellen an, die dann das Eosin pink anfärbt. Nicht in ihrem Stoffwechsel beeinträchtigte Zellen hingegen färben sich dunkel blau an.

So ermöglicht die HE-Färbung eine Unterscheidung in Zellen, die in ihrem Stoffwechsel zum Zeitpunkt ihrer Fixierung eingeschränkt waren und solche, die keine sichtbaren Einschränkungen in ihrem Stoffwechsel erfahren haben.

Ob diese eosinophil angefärbten Zellen allerdings nekrotisch oder apoptotisch untergehen, oder sich wieder erholen, lässt sich anhand der HE-Färbung alleine nicht sagen.

Um eine Differenzierung in Nekrose und Apoptose vornehmen zu können, müssen morphologische Kriterien zu Rate gezogen werden, denn der „Goldstandard“ für die Unterscheidung der beiden Arten des Zelltodes ist nach wie vor die Bestimmung der Morphologie mittels Elektronenmikroskopie (SLOOP et al. 1999).

So umfassen die morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen (WYLLIE et al. 1980) eine Schrumpfung der Zelle durch Zytoplasma- und Zellkernkondensation, typische Veränderungen der DNA in Form von „DNA-laddering“ (LINNIK et al. 1993) und die

Entstehung der „Apoptosekörperchen“ als ovoid geformte Ausstülpungen der Zellmembran bei intakten Zellmembranen.

Nekrotische Zellen hingegen zeichnen sich nach FARBER et al. (1981) aus durch Kernpyknose, Karyorrhesis oder Karyolysis, Dekondensation von Chromatin mit Zellschwellung, desintegrierende Zellorganellen und eine diffuse Auflösung der DNA-Struktur als „smear pattern“, sichtbar in Form einer einzigen vertikalen Bande in der Elektrophorese (BANASIAK 2000).

Die HE-Färbung liefert wichtige Informationen über das Schadensbild in Form der Menge der eosinophilen Zellen absolut und in Relation zu den verbliebenen basophilen Zellen (LI et al. 1998) und erlaubt eine übersichtliche Einteilung der Präparate anhand ihrer Schadensausdehnung bzw. der Art und Menge der eingewanderten Zellen (WASS et al. 1996) und gemäß den von REMMELE (1984) und DAVID (1970) beschriebenen Kriterien.

Diese umfassen einmal die Verteilung der eosinophilen Zellen im Hippokampus (nur die CA1-Region, oder CA1 und CA2, CA1 bis CA3 und CA4 oder sogar CA1 bis CA4 und der Gyrus dentatus) und zum anderen die Ausdehnung (Hippokampus alleine, Hippokampus und Kortex oder Hippokampus, Kortex und Basalganglion) und die Schwere (lediglich diffuse Auflockerung des Gewebes, Makrophageneinwanderung oder Substanzverlust) des Schadens. Um gezielt Aussagen über Apoptose und Nekrose machen zu können, sind andere Nachweisverfahren angezeigt, unter anderem die Markierung akt. Caspase-3.

### **4.2.3 Immunhistochemische Antigendetektion**

Die immunhistochemische Antigendetektion dient dazu, spezifisch das nur während der Apoptose in der Zelle exprimierte und aktivierte Protein Caspase-3 mit Hilfe eines Antikörpers zu markieren.

Diese Methode bietet die Möglichkeit, gezielt apoptotische Zellen anhand ihrer Aktivierung von Caspase-3, einem Protein, das eine wichtige Rolle innerhalb der Ablaufs der neuronalen Apoptose spielt (s. unter 2.2.1.2), zu markieren und von den übrigen Zellen zu differenzieren (SRINIVASAN et al. 1998, BRECHT et al. 2001).

Die Detektion gerade der akt. Caspase-3 stellt eine mögliche Alternative zur mittlerweile kontrovers diskutierten TUNEL-Färbung (CHARRIAUT-MARLANGUE und BEN-ARI 1995, SLOOP et al. 1999) und zu den aufwändigeren Immunfluoreszenznachweisen

## DISKUSSION

---

(TAYLOR 1978) dar, und sie erlaubt die Markierung eines Proteins, das in der Kaskade der Apoptose relativ weit „stromabwärts“ gelegen ist.

Ein weiterer Vorteil ist, dass diese Methode relativ einfach in ihrer Anwendung ist (Dauer der Färbung ca. fünf Stunden) und über einen längeren Zeitraum haltbare Präparate liefert.

Voraussetzung ist allerdings eine hohe Spezifität des Primärantikörpers für das aktivierte Protein. Denn sonst sind keine sicheren Aussagen über Caspase-3-positiv markierte Zellen möglich, da beispielsweise das inaktive Proenzym der Caspase-3 in allen Zellen zu finden ist.

Bei dem in dieser Studie verwendeten Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper. Diese strukturell identischen Antikörper reagieren nur mit einer einzigen antigenen Determinante des gesuchten Proteins und besitzen deshalb eine höhere Spezifität als polyklonale Antikörper, die ein Gemisch mehr oder weniger zum gesuchten Antigen passender Antikörper darstellen (PASTERNAK 1997).

Akt. Caspase-3 wird hier mit Hilfe der indirekten „Sandwichmethode“ **Labeled Avidin Biotin/Labeled Streptavidin Avidin Biotin-Nachweismethode** (auch als LAB/LSAB-Methode bezeichnet) detektiert (TAYLOR 1978, NOLL und SCHAUB-KUHNEN 2000). Sie wird deshalb als indirekte Methode bezeichnet, da nicht der spezifische Antikörper gegen akt. Caspase-3 mit dem später farbgebenden Enzymsystem gekoppelt ist, sondern ein sekundärer, mit Biotin konjugierter Antikörper, der sich spezifisch gegen die Tierart, aus der der erste Antikörper stammt, richtet.

Der große Vorteil dieser Methode ist die einfache Handhabung, die höhere Empfindlichkeit (HSU et al. 1981) im Vergleich zu direkt enzymgekoppelten Primärantikörpern und die weitreichende Anwendungsmöglichkeit dieser enzymgekoppelten Sekundärantikörper, was sich auch im Anschaffungspreis niederschlägt.

Da in dem Gehirngewebe neben den Neuronen auch andere Zellen wie zum Beispiel Gliazellen, Leukozyten und Endothelzellen, um nur eine kleine Auswahl zu nennen, vorkommen und auch bei diesen Zellen der apoptotische Zelltod gerade nach einer Ischämie auftritt, kann es manchmal schwierig sein, sicher die apoptotischen Neurone gegen andere apoptotische Zellen abzugrenzen. Um dieses Problem zu lösen wurde erfolgreich eine Doppelmarkierung etabliert (DAVOLI et al. 2002). Dabei wird neben der akt. Caspase-3, die mit dem monoklonalen Antikörper, der auch in der Einfachmarkierung Verwendung findet, detektiert wird, das sog. NeuN mit einem spezifischen, ebenfalls monoklonalen Antikörper markiert. **Neuron-specific nuclear protein (NeuN)** ist ein Strukturprotein, welches nur in voll

## DISKUSSION

---

ausgereiften Neuronen zu finden ist (MULLEN et al. 1992, WOLF et al. 1996, JONGEN-RELO und FELDON 2002, SCHMIDT und REYMANN 2002).

Um die beiden Antikörper in der fertigen Färbung mit dem Lichtmikroskop differenzieren zu können, werden zwei unterschiedliche Enzym-Farbstoffsysteme verwendet. Akt. Caspase-3 wird, wie oben bereits besprochen, mittels Peroxidase-konjugiertem Streptavidin und dem braunen Farbstoff Diaminobenzidin, kurz DAB, markiert. NeuN wird ebenfalls in indirekter Färbemethode mittels alkalischer Phosphatase-gekoppeltem Streptavidin und einem roten Farbstoff - VectorRed - rot markiert.

Als Qualitätskontrolle wird auch hier stets eine Positivkontrolle in Form eines Thymuspräparates und zusätzlich eine Negativkontrolle in Form eines Gehirnschnittes von unbehandelten Ratten mitgeführt.

Alle Färbungen werden, um mögliche Fehlerquellen zu vermeiden, immer nach dem selben Protokoll durchgeführt und immer von der gleichen Person.

Auch die Auswertung mit dem Lichtmikroskop wird stets von demselben geblindeten Untersucher durchgeführt, um Untersucher-bedingte Schwankungen im Untersuchungsergebnis zu vermeiden.

### 4.3 Abschlussbetrachtung

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen zusammenfassend, dass bei Ratten, die im Versuch einer künstlich erzeugten, temporären Hemisphärenischämie mit Reperfusion ausgesetzt waren und deren Kontrollparameter überwacht und konstantgehalten wurden, eine Behandlung mit den beiden Anästhetika Propofol und Sevofluran in der Lage ist, die Anzahl der akt. Caspase-3-positiven Zellen über einen Zeitraum von 28 Tagen zu reduzieren. Auch die Menge der eosinophilen Zellen in den beiden Behandlungsgruppen ist geringer als in der Kontrollgruppe. Zusätzlich ist dort die Ausprägung des geweblichen Schadens reduziert.

Mit der HE-Färbung, Einfachmarkierung akt. Caspase-3 und einer Doppeldetektion akt. Caspase-3 in Kombination mit dem neuronalen Marker NeuN wurden die notwendigen immunhistochemischen Untersuchungen der Gehirne durchgeführt und die Ergebnisse sorgfältig dokumentiert.

Diese Ergebnisse der HE-Färbung zeigen deutlich, dass Propofol und Sevofluran in der Lage sind, den eosinophilen Zellschaden über einen Zeitraum von 28 Tagen zu reduzieren.

Die Detektion akt. Caspase-3 zeigt, dass lediglich ein kleiner Teil der Zellen die günstigere Form des Zelltodes, die Apoptose durchmacht. Es gehen einzelne Zellen ohne das umliegende Gewebe in Mitleidenschaft zu ziehen, zugrunde, was durch die Bestimmung der Schadensklasse bestätigt wird. Nur Kontroll-Tiere zeigen einen deutlichen Schaden der Klasse B und C.

Die Apoptose ist als einer der Mechanismen, der durch Ischämie getriggert wird, identifiziert. Sie leistet, wie die Nekrose, einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung und Ausprägung des neuronalen Schadens. Nachdem die akt. Caspase-3 ein Indikator für Apoptose ist, lassen sich über den Nachweise der akt. Caspase-3 Aussagen zum Ausmaß der Apoptose-Aktivität in dem untersuchten Gebiet machen.

Hier zeigt sich, dass unter Behandlung mit Propofol bzw. Sevofluran die Anzahl Apoptose-positiver Zellen reduziert werden kann und somit eine neuroprotektive Tendenz von Propofol bzw. Sevofluran in Bezug auf die Apoptose festgestellt werden kann.

Seit einiger Zeit schon sucht die Wissenschaft verstärkt auf dem noch jungen Forschungsgebiet des programmierten Zelltodes nach ungenutzten Möglichkeiten, neuronalen Schaden einzudämmen oder ihn bereits im Entstehen zu verhindern.

Die Ergebnisse dieser Studie liefern einen weiteren, nicht unbedeutenden Baustein auf der Suche nach dem endgültigen Verständnis der Geschehnisse, die mit einer solchen temporären

## **DISKUSSION**

---

globalen Ischämie einhergehen und Nekrose oder die Apoptose, den programmierten Zelltod auslösen.

Zahlreiche Fragestellungen, nach u.a. den genauen Mechanismen der Apoptose und der Neuroprotektion, bleiben offen und machen, auf der Suche nach einer wirkungsvollen Therapie ischämischer Zustände, fraglos zukünftige experimentelle Untersuchungen notwendig.

### 5 ZUSAMMENFASSUNG

#### **Einfluss der Anästhetika Sevofluran und Propofol auf den nekrotischen und den apoptotischen Zelltod nach inkompletter zerebraler Hemisphärenischämie und Reperfusion in der Ratte über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen**

Die hier vorliegende Studie befasst sich mit dem Einfluss der Anästhetika Sevofluran und Propofol auf den nekrotischen und apoptotischen Zelltod nach inkompletter zerebraler Hemisphärenischämie mit Reperfusion in der Ratte über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen.

Zu diesem Zweck wurden 96 männliche Sprague-Dawley-Ratten (415±40g) im Versuch mit Isofluran (2,0 Vol% in O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O mit FiO<sub>2</sub>=0,33) anästhesiert, intubiert und beatmet. Um die physiologischen Variablen zu überwachen (arterielle Blutdruckmessung und Blutentnahme) und konstant zu halten (Applikation von Medikamenten), wurden in die rechte A. und V. femoralis sowie in die V. jugularis Katheter gelegt und verschiedene Sonden angebracht (perikranielle sowie rektale Temperaturmessung, Messung der Hirndurchblutung).

Nach abgeschlossener Präparation wurden die Tiere randomisiert einer der folgenden Gruppen zugewiesen: Kontroll-Gruppe (n=32): Ischämie mit einer Fentanyl/N<sub>2</sub>O-Narkose, Propofol-Gruppe (n=32): Ischämie unter Propofol-Narkose i.v. (25µg/kg/h), Sevofluran-Gruppe (n=32): Ischämie unter Sevofluran-Narkose (2 Vol%). Mittels eines temporären Verschlusses der A. carotis communis und einer gleichzeitigen hämorrhagischen Hypotension (MAP bei 40 mmHg), induzierte man in den drei Gruppen eine 45-minütige inkomplette zerebrale Ischämie. Nach einer Reperusionszeit von einem, drei, sieben und 28 Tagen

(je n=8) wurden die Tiere in Narkose getötet, die Gehirne entnommen, um sie nach dem Schneiden für die weitere Bearbeitung bei -70° C zu gefrieren. In der HE-Färbung wurde die Anzahl der eosinophil gefärbten Zellen ermittelt und das Ausmaß des ischämischen Schadens bestimmt. Über die immunhistochemische Detektion des Proteins akt. Caspase-3, einem Apoptose-Indikator, wurde in den Gehirnschnitten Apoptose nachgewiesen. Um im Anschluss an diese Einfachfärbung eine Differenzierung der akt. Caspase-3-positiven Zellen in Neurone und andere Zellen zu ermöglichen, wurden die Gehirnpräparate einer Doppelfärbung von akt. Caspase-3 und NeuN, einem ausschließlich neuronalen Strukturprotein, unterzogen.

Es zeigte sich in den Ergebnissen der HE-Färbung, dass in den mit Propofol und Sevofluran behandelten Gruppen die Anzahl der eosinophilen Zellen und die Ausprägung des ischämischen Schadens signifikant niedriger war als in der Kontroll-Gruppe. Die Menge der akt. Caspase-3-positiven Zellen ist in allen drei Gruppen gering, was an der Art des gewählten Tiermodells oder an der Art der Untersuchung mit der Immunhistochemie liegen kann. Tendenziell erkennt man eine Reduktion akt. Caspase-3-positiver Zellen in den Gruppen Propofol und Sevofluran im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.

Die Ergebnisse der Doppelfärbung zeigen, dass neben Neuronen als Hauptexpressionsort akt. Caspase-3 auch andere, nicht neuronale Zellen diesen Apoptose-Indikator herstellen. Auch hier zeigen Gehirnschnitte von mit Propofol bzw. Sevofluran behandelten Tieren tendenziell eine geringere Menge akt. Caspase-3-positiver Neurone. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die beiden untersuchten Anästhetika Propofol und Sevofluran in vivo eine neuroprotektive Wirkung auf neuronales Gewebe besitzen. Es werden jedoch sicherlich weitere Untersuchungen notwendig sein, um mehr über die Wirkmechanismen dieser beiden Anästhetika in Erfahrung zu bringen und so gezielt ein Konzept für erfolgreiche Therapien ischämischer Ereignisse und ihrer Folgeerscheinungen formulieren zu können.

## 6 SUMMARY

### **The long-term effect of sevoflurane and propofol on necrotic and apoptotic cell death after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in the rat**

The present study investigates the effect of the anesthetic agents propofol and sevoflurane on irreversible cell damage (necrosis) and programmed cell death (apoptosis) for a time period of 28 days after incomplete transient cerebral ischemia and reperfusion in the rat.

Ninety-six fasted male Sprague-Dawley rats (415±40g) were anesthetized, intubated and ventilated with 2 Vol% isoflurane and N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> (FiO<sub>2</sub>=0.33). Catheters were inserted into the right femoral artery and vein as well as in the right jugular vein for drug administration and blood withdrawal. At the end of surgery animals were randomly assigned to one of the following groups: control (n=32): 25 µg/kg/h fentanyl i.v. and N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> (FiO<sub>2</sub>=0.33); propofol (n=32): 25 µg/kg/h propofol i.v. and O<sub>2</sub>/air (FiO<sub>2</sub>=0.33); sevoflurane (n=32) 2 Vol% sevoflurane in O<sub>2</sub>/air (FiO<sub>2</sub>=0.33). Ischemia (45min) was produced by unilateral common carotid artery occlusion plus hemorrhagic hypotension (MAP=40 mmHg). Pericranial temperature (37.5°C), arterial blood gases and pH were maintained constant.

Animals were then randomly assigned to a postischemic reperfusion time of 01, 03, 07, or 28 days. At the end of the observation period the animals were deeply anesthetized and killed, the brains were removed, frozen at -70 °C, and sectioned for further evaluation.

Hematoxylin-Eosin staining was used to evaluate eosinophilic cell damage and tissue damage in 7 µm sections in the hippocampus, dentate gyrus and surrounding tissues. Immunohistochemistry was used to detect activated caspase-3 as a marker of apoptotic cell death. To distinguish activated caspase-3-positive neurons from other cells, a double staining, using the specific neuronal marker NeuN was used additionally.

The results showed that with the exception of one animal in the sevoflurane group there is no tissue damage or eosinophilic cell damage in either the propofol or the sevoflurane treated animals up to 28 days after ischemia. The only eosinophilic tissue damage was present in the control group. About one percent of the hippocampal neurons of all three groups were activated caspase-3-positive, independently of the observation period. Though there was a tendency in both treatment groups to a lower number of activated caspase-3-positive cells.

Results of the double staining showed that activated caspase-3, though mainly expressed in neurons, is also expressed in other cells.

The present study showed that propofol and sevoflurane both produce a sustained inhibition of eosinophilic cell damage up to 28 days after incomplete cerebral ischemia in rats. Although the amount of activated caspase-3-positive neurons was similar in the three groups there was a tendency towards a lower number in the treatment groups compared to control.

This suggests that neuroprotection seen with both, propofol and sevoflurane, involves anti-necrotic mechanisms rather than anti-apoptotic mechanisms.

Further investigations will be required in the future to investigate the detailed mechanisms of propofol and sevoflurane to develop a successful treatment of ischemic insults and their consequences.

### 7 LITERATURVERZEICHNIS

AMARAL DG, WITTER MP

Hippocampal Formation *In: Paxinos G (Hrsg.)*

The rat nervous system, 2. Edition, Academic Press, San Diego, USA, 1995; 443-493

AMORIM P, CHAMBERS G, COTTRELL J, KASS IS

Propofol reduces neuronal transmission damage and attenuates the changes in calcium, potassium and sodium during hyperthermic anoxia in the rat hippocampal slice.

Anesthesiology 1995; 83: 1254-1265

ANDERSON RE, MEYER FB

Protection of focal cerebral ischemia by alkalinization of systemic pH.

Neurosurgery 2002; 51: 1256-1265

ASTRUP J, SIESJÖ BK, SYMON L

Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra.

Stroke 1981; 12: 723-725

BANASIAK K

Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis.

Prog Neurobiol 2000; 62: 215-249

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

Neurologic outcome in rats following incomplete cerebral ischemia during halothane, isoflurane, or N<sub>2</sub>O anaesthesia.

Anesthesiology 1988; 69: 192-198

BEER R, FRANZ G, SRINIVASAN A, HAYES RL, PIKE BR, NEWCOMB JK, ZHAO X, SCHMUTZHARD E, POEWE W, KAMPFL A

Temporal profile and cell subtype distribution of activated caspase-3 following experimental traumatic brain injury.

J Neurochem 2000; 75: 1264-1273

BIANCHI M, BATTISTIN T, GALZIGNA L

2,6-Diisopropylphenol, a general anesthetic, inhibits glutamate action on rat synaptosomes.

Neurochem Res 1991; 16: 443-446

BIRCHMEIER C, BLADT F, BRITSCH S

Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung *In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg.)*

Handbuch der molekularen Medizin, Band I: Molekular- und zellbiologische Grundlagen, Springer Verlag, Berlin, 1997; 338-340

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- BONA E, HAGBERG H, LOBERG EM, BAGENHOLM R, THORESEN M  
Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia: short- and long-term outcome.  
Pediatr Res 1998; 43: 738-745
- BUNDGAARD H, VON OETTINGEN G, LARSEN KM, LANDSFELDT U, JENSEN KA, MIELSEN E, COLD GE  
Effects of sevoflurane on intracranial pressure, cerebral blood flow and cerebral metabolism.  
Acta Anaesthesiol Scand 1998; 42: 621-627
- BRECHT S, GELDERBLOM M, SRINIVASAN A, MIELKE K, DITYATEVA G, HERDEGEN T  
Caspase-3 activation and DNA fragmentation in primary hippocampal neurons following glutamate excitotoxicity.  
Mol Brain Res 2001; 94: 25-34
- BREDESEN DE  
Apoptosis: overview and signal transduction pathways.  
J Neurotrauma 2000; 17: 801-810
- BUDIARDJO I, OLIVER H, LUTTER M, LUO X, WANG X  
Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis.  
Annu Rev Cell Dev Biol 1999; 15, 269-290
- BUSTO R, DIETRICH WD, GLOBUS MY, VALDES I, SCHEINBERG P, GINSBERG MD  
Small differences in intraischemic brain temperature critical determine the extent of ischemic neuronal injury.  
J Cereb Blood Flow Metab 1987; 7: 729-738
- 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
- CAVAZZUTI M, PORRO CA, BIRAL GP, BENASSI C, BARBIERI GC  
Ketamine effects on local blood flow and metabolism in the rat.  
J Cereb Blood Flow Metab 1987; 7: 806-811
- CHALMERS-REDMAN RME, FRASER AD, JU WY, WADIA J, TATTON NA  
Mechanisms of nerve cell death: apoptosis or necrosis after cerebral ischemia *In*: Green AR, Cross AJ (Hrsg.)  
Neuroprotective agents and cerebral ischemia, , Academic Press, San Diego, 1997; 1-15

CHANG D, BARAM TZ

Status epilepticus results in reversible neuronal injury in infant rat hippocampus: a novel use of a marker.

Dev Brain Res 1994; 77: 133-136

CHARRIAUT-MARLANGUE C, BEN-ARI Y

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

Neuroreport 1995; 7: 61-64

CHOPP M, LI Y

Apoptosis in focal cerebral ischemia.

Acta Neurochir 1996; 66: 21-26

CHENG EH-Y, KIRSCH D, CLEM RJ, RAVI R, KASTAN MB, BEDI A, UENO K, HARDWICK JM

Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by Caspases.

Science 1997; 278: 1966-1968

CLARK RK, LEE EV, WHITE RF, JONAK ZL, FEUERSTEIN GZ, BARONE FC

Reperfusion following focal stroke hastens inflammation and resolution of ischemic injured tissue.

Brain Res Bul 1994; 35: 397-392

CONZEN P, NUSCHELER M

Neue Inhalationsanästhetika

Anaesthesist 1996; 45, 674-693

DAVID E

Das Gehirn und das Rückenmark nebst ihren Häuten, Kreislaufstörungen *In: Kettler LH (Hrsg.)*

Lehrbuch der speziellen Pathologie, Gustav Fischer Verlag Jena, 1970; 631-632

DAVOLI MA, FOURTOUNIS J, TAM J, XANTHOUDAKIS S, NICHOLSON D, ROBERTSON GS, NG GYK, XU D

Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat.

Neuroscience 2002; 115: 125-136

DIRNAGL U, MEISEL A

Zerebrale Ischämie *In: Ganten A (Hrsg.)*

Handbuch der molekularen Medizin Band 5, Springer Verlag, Berlin 1999; 510-533

DU C, CSERNANSKY CA, HSU CY, CHOI DW

Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis?  
J Cereb Blood Flow Metab 1996; 16: 195-201

ELDADAH BA, FADEN AI

Caspase pathways, neuronal apoptosis and CNS injury.  
J Neurotrauma 2000; 10: 811-829

ENGELHARD K, WERNER C, REEKER W, LU H, MÖLLENBERG O, MIELKE L, KOCHS E.

Desflurane and isoflurane improve neurological outcome after incomplete cerebral ischemia in rats.

Br J Anaesth 1999; 83: 415-421

FARBER JL, KENNETH R, CHIEN KR, MITTNACHT jr S

The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia.

Am J Pathol 1981; 102: 271-281

FITCH W

Brain Metabolism *In: Cottrell JE und Smith DS (Hrsg.)*

Anaesthesia and Neurosurgery, 3. Edition, Mosby, St Louis, 1994; 1-16

FREY HH, SCHULZ R, WERNER E

Pharmakologie des zentralen Nervensystems (ZNS) *In: Frey HH, Löscher W (Hrsg.)*

Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin,

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1996; 139-202

GARCIA JH, WAGNER S, LIU KF, HU XJ

Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats.

Stroke 1995; 26: 627-635

GARCIA JH, YOSHIDA Y, CHEN H, Li Y, ZHANG G, LIAN J, CHEN S, CHOPP M

Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat.

Am J Pathology 1993; 142: 623-635

GINSBERG MD, BUSTO R

Rodent models of cerebral ischemia.

Stroke 1989; 20: 1627-1642

GLÜCKSMANN A

Cell deaths in normal vertebrate ontogeny.

Biol Rev 1951; 26: 59-86

GOLSTEIN P

TRAIL and its receptors.

Curent Biol 1997; 7: 705-753

GRAHAM DI, LANTOS PL

Greenfield's Neuropathology

6. Edition, Arnold, London, 1997; 86-90

GREEN AR, CROSS AJ

Techniques for examining neuroprotective drugs in vivo *In:*

Neuroprotective Agents and Cerebral Ischemia, Vol. 40, Academic Press, 1997; 47-69

HARA M, KAI Y, IKEMOTO Y

Propofol activates GABA<sub>A</sub> receptor-chloride ionophore complex in dissociated hippocampal neurons of the rat.

Anesthesiology 1993; 79: 781-788

HANS P, BONHOMME V, COLLETTE J, ALBERT A, MOONEN G

Propofol protects cultured rat hippocampal neurons against N-Methyl-D-Aspartat receptor-mediated glutamat toxicity.

J Neurosurg Anes 1994; 6: 249-253

HENNES HJ, JANTZEN JP

Brain protection in emergency situations: are anaesthetics neuroprotective?

Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 1997; 32: 291-295

HIROTA K, ROTH SH

The effects of sevoflurane on population spikes in CA1 and dentate gyrus of the rat hippocampus in vitro.

Anesth Analg 1997; 85: 426-430

HOFFMAN WE, BRAUCHER E, PELLEGRINO 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, THOMAS C, ALBRECHT RF

The effect of halothane and isoflurane on neurologic outcome following incomplete cerebral ischemia in the rat.

Anesth Analg 1993; 76: 279-283

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

Cerebral and spinal cord blood flow in awake and fentanyl-N<sub>2</sub>O anesthetized rats: evidence for preservation of blood flow autoregulation during anesthesia.

J Neurosurg Anesth 1992; 4: 31-35

## LITERATURVERZEICHNIS

---

HOSSMANN K

Disturbances of cerebral protein synthesis and ischemic cell death.

J Clin Path 1979; 32: 971-978

HSU S, RAINE L, FANGER H

Use of the avidin-biotin-peroxidase complex in peroxidase techniques.

J Histochem Cytochem 1981; 29: 577-581

ITO U, SPATZ M, WALKER JT jr, KLATZO I

Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils.

A Neuropathol 1975; 32: 209-223

JONGEN-RELO AL, FELDON J

Specific neuronal protein: a new tool for histological evaluation of excitotoxic lesions

Physiol Behav 2002; 76: 449-456

KELLY DF, GOODALE DB, WILLIAMS J, HERR DL, CHAPPELL T, ROSNER M, JACOBSON J, LEVY ML, CROCE MA, MANIKER AH, FULDA GJ, LOVETT JV, MOHAN O, NARAYAN RK

Propofol in the treatment of moderate and severe head injury: a randomized, prospective double-blinded pilot trial.

J Neurosurg 1999; 90: 1042-1052

KEMPSKI O

Neuroprotektion: Modelle und Grundprinzipien.

Anaesthesist 1994; 43,25-33

KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

Br J Cancer 1971; 43: 239-257

KIERNAN JA, MACPHERSON CM, PRICE A, SUN T

A histochemical examination of the staining of kainate-induced neuronal degeneration by anionic dyes.

Biotech Histochem 1998; 73: 244-253

KITAGUCHI K, OSHUMI H, KURO M, NAKAJIMA T, HAYASHI Y

Effects of sevoflurane on cerebral circulation and metabolism in patients with ischemic cerebrovascular disease.

Anesthesiology 1995; 79: 704-709

KLEIHUES P, HOSSMANN K

Protein synthesis in the cat brain after prolonged cerebral ischemia.

Brain Res 1971; 35, 409-418

KLICHE KO, CLEMENT JH, HÖFFKEN K

Apoptose, Mechanismen, Regulationen und therapeutische Modulationen als klinische Perspektive.

Onkologie 1999; 5: 891-897

KOCHS E, HOFFMAN W, 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

KOGURE K, BUSTO R, SCHEINBERG P, REINMUTH OM

Energy metabolites and water content in rat brain during the early stage of development of cerebral infarction.

Brain 1974; 97: 103-114

KUIDA K, ZHENG TS, NA S, KUAN C, YANG D, KARASUYAMA H, RAKIC P, FLAVELL RA

Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice.

Nature 1996; 384:368-372

KUMAR S

Mechanisms mediating caspase activation in cell death.

Cell Death Diff 1999; 6: 1060-1066

LI Y, CHOPP M, JIANG N, YAO F, ZALOGA C

Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat.

J Cereb Blood Flow Metab 1995; 15: 389-397

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

LIEBMANN M

Makroskopische Grundlagen der Neuroanatomie, Blutversorgung des Gehirns *In:*

Basiswissen Neuroanatomie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1993, 9-16, 113-117

LIN B, GINSBERG MD, BUSTO R, DIETRICH WD

Sequential analysis of subacute and chronic neuronal, astrocytic and microglial alterations after transient global ischemia in rats.

Acta Neuropathol 1998; 95: 511-523

LINNIK MD, ZOBRIST RH, HATFIELD MD

Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats.

Stroke 1993; 24: 2002-2009

## LITERATURVERZEICHNIS

---

LIU X, SLAUGHTER C, ZOU H, WANG X

DFF a heterodimeric protein that functions downstream of caspase -3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis.

Cell 1997; 89: 175-184

MEHMET H, YUE X, PENRICE J, CADY E, WYATT JS, SARRAF C, SQUIER M, EDWARDS AD

Relation of impaired energy metabolism to apoptosis and necrosis following transient cerebral hypoxia-ischaemia.

Cell Death Different 1998; 5: 321-329

MICHENFELDER JD, MILDE JH

The interaction of sodium nitroprusside, hypotension and isoflurane in determining cerebral vasculature effects.

Anesthesiology 1988; 69: 870-875

MOLINARI GF

Why model strokes?

Stroke 1988; 19: 1195-1197

MORIMOTO Y, MORIMOTO Y, BART RD, PEARLSTEIN RD, DEXTER F, WARNER DS

High-dose fentanyl does not adversely affect outcome from forebrain ischemia in the rat.

J Neurosurg Anaesth 1997; 9: 316-323

MULLEN RJ, BUCK CR, SMITH AM

NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates.

Development 1992; 116: 210-211

NAKANO S, KOGURE K, FUJIKURA H

Ischemia-induced slowly progressive neuronal damage in the rat brain.

Neuroscience 1990; 38: 115-124

NAMURA S, ZHU J, FINK K, ENDRES M, SRINIVASAN A, TOMASELLI KJ, YUAN J, MOSKOWITZ MA

Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia.

J Neuroscience 1998; 18: 3659-3668

NEWBERG-MILDE L, WEGLINSKI MR

Pathophysiology of metabolic brain injury *In*: Cottrell JE, Smith DS (Hrsg.)

Anaesthesia and Neurosurgery, Mosby Verlag, St. Louis, 1994; 3. Band, 59-84

NEWCOMB JK, ZHAO X, PIKE BR, HAYES RL

Temporal profile of apoptotic-like changes in neurons and astrocytes following controlled cortical impact injury in the rat.

Exp Neurol 1999; 158: 76-88

## LITERATURVERZEICHNIS

---

NICHOLSON DW

Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death.  
Cell Death Diff 1999; 6: 1028-1042

NICKEL R, SCHUMMER A, SEIFERLE E

Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen *In: Böhme G (Hrsg.)*  
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Bd. IV, 3. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin und  
Hamburg, Deutschland, 1992; 2-228

NITATORI T, SATO N, WAGURI S, KARASAWA Y, ARAKI H, SHIBANI K,  
KOMINAMI E, UCHIYAMA Y

Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following  
transient ischemia is apoptosis.  
J Neurosci 1995; 15: 1001-1011

NIWA M, HARA A, IWAI T, WANG S, HOTTA K, MORI H, UEMATSU T

Caspase activation as an apoptotic evidence in the gerbil hippocampal CA1 pyramidal cells  
following transient forebrain ischemia.  
Neurosci Lett 2001; 300: 103-106

NOLL S, SCHAUB-KUHNEN S

Praxis der Immunhistochemie, Höfler H und Müller KM (Hrsg.)  
Urban und Fischer Verlag, München, 2000; 1-143

OBRENOVITCH T

The ischemic penumbra: twenty years on.  
Cerebrovasc Brain Metab Rev 1995; 7: 297-323

PADOSCH SA, VOGEL P, BÖTTIGER BW

Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie.  
Anästhesist 2001; 50: 905-920

PASTERNAK G

Monoklonale Antikörpertechnik *In: Ganten A (Hrsg.)*  
Handbuch der molekularen Medizin, Band I, Springer Verlag, Berlin, 1997; 145-173

PAXINOS G, WATSON C

The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press, San Diego, 1998

PULSINELLI WA, BRIERLEY JB

The temporal profile of ischemic neuronal damage in the four-vessel occlusion rat model.  
Stroke 1979; 492

## LITERATURVERZEICHNIS

---

PULSINELLI WA, BRIERLY JB, PLUM F

Temporal Profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia.  
Ann Neurol 1982a; 11: 491-498

PULSINELLI WA, LEVY DE, DUFFY TH

Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia.  
Ann Neurol 1982b; 11: 499-509

REMMELE W

Nekrosetadien und -muster *In*: Remmele W (Hrsg.)  
Pathologie 4 Neuropathologie, Sinnesorgane, Stoffwechselkrankheiten,  
Springer Verlag, Berlin, 1984; 55-63

RÜSSE I, SINOWATZ F

Lehrbuch der Embryologie der Haustiere, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg 1991;  
247-284

SCHMIDT W, REYMANN KG

Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after  
global cerebral ischemia.  
Neurosci Lett 2002; 334: 153-156

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 ischemia; Part I: pathophysiology.  
J Neurosurg 1992a; 77: 169-84

SIESJÖ BK

Pathophysiology and treatment of focal ischemia; Part II: mechanisms of damage and  
treatment.  
J Neurosurg 1992b; 77: 337-354

SIESJÖ BK, SIESJÖ P

Mechanisms of secondary brain injury.  
Europ J Anaesthes 1996;13: 247-268

SILBERNAGL S, DESPOPOULOS AA

Zentralnervensystem und Sinnesorgane *In*: Taschenatlas der Physiologie  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1991, 4. Auflage, 272-324

SLOOP GD, ROA JC DELGADO AG, BALART JT, HINES MO, HILL JM

Histologic sectioning produces TUNEL reactivity.  
Arch Pathol Lab Med 1999; 123: 529-532

## LITERATURVERZEICHNIS

---

SRINIVASAN A, ROTH KA, SAYERS RO, SHINDLER KS, WONG AM, FRITZ LC, TOMASELLI KJ

In situ immunodetecting of activated caspase-3 in apoptotic neurons in the developing nervous system.

Cell Death Diff 1998; 5: 1004-1015

SRINIVASULA SM, FERNANDES-ALNEMRI T, ZANGRILLI J, ROBERTSON N, ARMSTROMG RC, WANG L, TRAPANI JA, TOMASELLI KJ, LITWACK G, ALNEMRI ES

The Ced-3/Interleukin 1 $\beta$  Converting Enzyme-like homolog Mch6 and the Lamin-cleaving enzyme Mch2 $\alpha$  are substrates for the apoptotic mediator CPP32.

J Biol Chem 1996; 271: 27099-27106

STELLER H

Mechanisms and genes of cellular suicide.

Science 1995; 267: 1445-144

STOLL G, JANDER S, SCHROETER M

Inflammation and glial response in ischemic brain lesions.

Prog Neurobiol 1998; 56: 149-171

STRYER L

Biochemie

4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 1996; 487-589

STÜNZI H, WEISS E

Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin

8. Edition, Verlag Paul Parey Berlin, 1990; 148-150

SUN EW, SHI YF

Apoptosis: the quiet death silences the immune system.

Pharmacol Therapeu 2001; 92: 135-145

TAYLOR CR

Immunoperoxidase techniques - practical and theoretical aspects.

Arch Pathol Lab Med 1978; 102: 113-121

THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y

Caspases: enemies within.

Science 1998; 281: 1312-1316

## LITERATURVERZEICHNIS

---

TONER CC, CONNELLY K, WHELPTON R, BAINS S, MICHAEL-TITUS AT, MCLAUGHLIN DR, STAMFORD JA

Effects of sevoflurane on dopamine, glutamate and aspartate release in an in vitro model of cerebral ischemia.

Br J Anesth 2001; 86: 550-554

UCKER DS, HEBISHI LD, BLOMQUIST JF, TORBETT ET

Physiological T-cell death: susceptibility is modulated by activation, aging and transformation, but the mechanism is constant.

Immunol Rev 1994; 142: 273-299

URBAN L, BESENYEI B, MARKA M, SEMSEI I

On the role of aging in the etiology of autoimmunity.

Gerontology 2002; 48: 179-184

VANICKY I, MARSALA M, MURAR J, MARSALA J.

Prolonged postischemic hyperventilation reduces acute neuronal damage after 15 min of cardiac arrest in the dog.

Neurosci Lett 1992; 135: 167-170

VELIER JJ, ELLISON JA, KIKLY KK, SPERA PA, BARONE FC, FEUERSTEIN GZ

Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat.

J Neurosci 1999; 19: 5932-5941

WASS CT, SCHEITHAUER BW, BRONK JT, WILSON RM, LANIER LW

Insulin treatment of corticosteroid-associated hyperglycemia and its effects on outcome after forebrain ischemia in rats.

Anesthesiology 1996; 84: 644-651

WATERS CM

Mechanisms of neuronal cell death.

Mol Chem Neuropathol 1996; 28: 145-151

WERNER C

Milde und moderate Hypothermie in der Anästhesie und Intensivmedizin – Neuroprotektive Ansätze *In: Deutsche Akademie für Anästhesisten (Hrsg.)*

Refresher Course – Aktuelles Wissen für Anästhesisten, Springer Verlag, Berlin, 1997; 189-197

WERNER C

Neuroprotektion *In: Löffler W (Hrsg.)*

Neuroanästhesie, Jantzen J-P, Thieme Verlag, Stuttgart, 2000; 121-142

WERNER C, MÖLLENBERG O, KOCHS E, SCHULTE AM ESCH J

Sevoflurane improves neurologic outcome after incomplete cerebral ischemia in rats.

Br J Anaesth 1995; 75: 756-760

## LITERATURVERZEICHNIS

---

WHITE K, GREYER ME, ABRAMS JM, YOUNG L, FARRELL K, STELLER H  
Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*.  
*Science* 1994; 264: 677-683

WIEBALCK A, VAN AKEN H,  
Propofol: Das ideale Langzeitsedativum?  
*Anaesthesist* 1995; 44: 178-185

WOLF HK, BUSLEI R, SCHMIDT-KASTNER R, SCHMIDT-KASTNER PK, PIETSCH T,  
WIESTLER OD, BLÜMCKE I  
NeuN: a useful marker for diagnostic histopathology.  
*J Histochem Cytochem* 1996; 44: 1167-1171

WYLLIE AH, KERR JFR, CURRIE AR  
Cell death: the significance of apoptosis.  
*Int Rev Cytol* 1980; 68, 251-306

YAMAGUCHI SH, MIDORIKAWA Y, OKUDA Y, KITAJIMA T  
Propofol prevents delayed neuronal death following transient forebrain ischemia in gerbils.  
*Can J Anesth* 1999; 46: 593-598

YOSHIDA S, BUSTO R, MARTINEZ E, SCHEINBERG P, GINSBERG MD  
Regional brain energy metabolism after complete versus incomplete ischemia in the rat in  
absence of severe lactic acidosis.  
*J Cereb Blood Flow Metab* 1985; 5: 490-501

ZHU H, COTTRELL J, KASS IS  
The effect of thiopental and propofol on NMDA- and AMPA-mediated glutamate  
excitotoxicity.  
*Anesthesiology* 1997; 87: 944-951

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

**8            TABELLENVERZEICHNIS**

*Tab. 01: Gruppeneinteilung der Versuchstiere ..... 31*

*Tab. 02: Messzeitpunkte der Messparameter ..... 39*

*Tab. 03: Mittlerer arterieller Blutdruck, Herzfrequenz und Blutglukose ..... 60*

*Tab. 04: Blutgasanalyse ..... 63*

*Tab. 05: Messung der Gehirndurchblutung mittels Laser-Doppler-Flussmessung ..... 64*

*Tab. 06: Prozentualer Anteil der eosinophilen Zellen an der Gesamtzellzahl ..... 68*

*Tab. 07: Verteilung der Tiere der Kontroll-Gruppe auf die Schadensklassen (%) ..... 70*

*Tab. 08: Prozent aktivierter Caspase-3 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl ..... 73*

*Tab. 09: Vergleich der Menge doppelt- und einfach markierter Zellen innerhalb  
der Doppelfärbung (absolut) ..... 75*

**9      ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<i>Abb. 01: Schematische Darstellung der pro- und anti- apoptotischen Faktoren (nach PADOSCH et al. 2001).....</i>	13
<i>Abb. 02: Schematische Darstellung einer inaktivierter und aktivierter Caspase, modifiziert nach ELDADAH und FADEN 2000.....</i>	16
<i>Abb. 03: Molekülstruktur von Propofol (2,6-Diisopropylphenol).....</i>	25
<i>Abb. 04: Strukturformel von Sevofluran (Fluormethyl-1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propylether).....</i>	27
<i>Abb. 05: Versuchsanordnung mit den wichtigsten Gerätebezeichnungen: die Ratte lagert (hier während der Ischämie-Phase) im stereotaktischen Rahmen fixiert und die Messsonden sind vollständig angebracht.....</i>	35
<i>Abb. 06: Schematische Übersicht über den Versuchsaufbau.....</i>	38
<i>Abb. 07: Schematische Darstellung des Gehirns mit Hippokampus und der Schnittebene, modifiziert nach AMARAL und WITTER (1998).....</i>	44
<i>Abb. 08: Anfertigung der Schnittpräparate am Kryotom.....</i>	45
<i>Abb. 09: Schematische Darstellung des Hippokampus und des Gyrus dentatus mit Bezeichnung der sechs Regionen aus der Schnittebene nach Abb. 07. Die siebte Region ist nicht dargestellt, sie zieht von der Spitze des Gyrus dentatus zur dorsalen hippocampalen Kommissur.....</i>	47
<i>Abb. 10: Lagerung der Objektträger in der feuchten Kammer während der Inkubationszeit.....</i>	50

<b>Abb. 11:</b> <i>Graphische Darstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks (mmHg) der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32) zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten.....</i>	61
<b>Abb. 12:</b> <i>Graphische Darstellung der Blutglukose (mg/dl) der Tiere der drei Untersuchungsgruppen zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten.....</i>	62
<b>Abb. 13:</b> <i>Graphische Darstellung der Durchblutung der rechten, ischämischen Hemisphäre (PU) der Tiere der drei Untersuchungsgruppen zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten.....</i>	65
<b>Abb. 14:</b> <i>Graphische Darstellung der Durchblutung der linken, nicht-ischämischen Hemisphäre (PU) der Tiere der drei Untersuchungsgruppen zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten.....</i>	66
<b>Abb. 15:</b> <i>Graphische Darstellung des prozentualen Anteils der eosinophilen Zellen an der Gesamtzellzahl des rechten, ischämischen Hippokampus der Tiere der drei Untersuchungsgruppen zu den vier festgelegten Untersuchungszeitpunkten (01, 03, 07, 28 Tage).....</i>	69
<b>Abb. 16:</b> <i>Graphische Darstellung der Verteilung (%) der Tiere der Kontroll-Gruppe auf die fünf Schweregrade 0-D in Kombination mit ihrer Verteilung auf die je fünf unterschiedlichen Schadensklassen 0-4 gemäß den Erläuterungen im Text in Kapitel 3.2.3.1.3 auf Seite 48 den Bildübersichten I und II Seite 80 ff.....</i>	72
<b>Abb. 17:</b> <i>Graphische Darstellung des prozentualen Anteils akt. Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl (%) der Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32) zu den vier festgelegten Untersuchungszeitpunkten (01, 03, 07, 28 Tage).....</i>	74
<b>Abb. 18:</b> <i>Graphische Darstellung der Gesamtmenge (absolut) akt. Caspase-3-positiver Zellen und akt. Caspase-3-positiver/NeuN-positiver Neurone aller Tiere der drei Untersuchungsgruppen (je n=32), zusammengefasst über den gesamten Untersuchungszeitraum (01,03,07 und 28 Tage).....</i>	76

- Abb. 19:** *Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der stark oder schwach einfach akt. Caspase-3-positiv gefärbten Zellen im Vergleich zu stark oder schwach doppelt akt. Caspase-3-positiv/NeuN-positiv gefärbten Neuronen der Tiere aus der Sevofluran-Gruppe (n=32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten.....* 77
- Abb. 20:** *Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der stark oder schwach einfach akt. Caspase-3-positiv gefärbten Zellen im Vergleich zu stark oder schwach doppelt akt. Caspase-3-positiv/NeuN-positiv gefärbten Neuronen der Tiere aus der Kontroll-Gruppe (n=32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten.....* 78
- Abb. 21:** *Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der stark oder schwach einfach akt. Caspase-3-positiv gefärbten Zellen im Vergleich zu stark oder schwach doppelt akt. Caspase-3-positiv/NeuN-positiv gefärbten Neuronen der Tiere aus der Propofol-Gruppe (n=32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten.....* 79

### 10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb	Abbildung
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
ANOVA	Analyse der Abweichungen zwischen Gruppen (ANalysis Of VAriance between groups)
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Basenabweichung (engl. <b>b</b> ase <b>e</b> xcess)
BGA	Blutgasanalyse
BRD	Bundesrepublik Deutschland
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DAP	Diastolischer Blutdruck (engl.: diastolic arterial pressure)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
Fa.	Firma
ff.	Folgende
g	Gramm
Hb	Gesamt-Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin
h	Stunden
i.v.	Intravenös
ICP	intrakranieller Druck (engl.: intracranial pressure)
K <sup>+</sup>	Kalium
kDa	Kilodalton

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
li	links
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck (engl.: pressure)
MCAO	Okklusion der Arteria cerebri media (engl.: middle cerebral artery occlusion)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
M.	Musculus
n	Anzahl
N <sub>2</sub> O	Lachgas
Na <sup>+</sup>	Natrium
NeuN	<b>N</b> euronal <b>n</b> uclear protein
NH <sub>2</sub>	Amino-Gruppe
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OT	Objektträger
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
paCO <sub>2</sub>	arterieller Kohlenstoffpartialdruck
paO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	gepuffertes Natriumphosphat (engl.: phosphored buffered sodium)
pH	arterieller pH-Wert
PU	Einheit der Gehirndurchblutung (engl.: Perfusion Unit)
re	rechts
SAP	systolischer Blutdruck (engl.:systolic <b>a</b> rterial <b>p</b> ressure)
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
s.u.	siehe unten
SD	Standardabweichungen (engl.: standard <b>d</b> eviation)
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

u.a.	unter anderem
V.	Vena
vs.	versus
Vv.	Venae
Vol. %	Volumen Prozent
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

### 11 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.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Direktor des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein großer Dank gilt zugleich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dipl. phys. 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 die stets vorhandene Bereitschaft zur hilfreichen Diskussion.

Zudem bedanke ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt für die Durchsicht des Manuskripts und die jederzeit freundliche Beratung.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Kolleginnen der Forschungsgruppe „Neuroprotektion“ in der Klinik für Anaesthesiologie der TU München, Frau Dr. med. Kristin Engelhard, Frau Dr. med. Monika Pape und Frau Dr. med. vet. Eva Eberspächer für ihre entscheidende Hilfe und Beratung in allen Dingen rund um diese Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Doris Droese, Herrn Sepp Straßmair und Frau Anne Frye für ihre große Hilfe, ebenso wie den Kolleginnen und Kollegen des Labors Gebäude 522.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre unermüdliche finanzielle, moralische und sonstige Unterstützung.