

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 in der Arbeitsgruppe „Neuroprotektion“ 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)

**Der Einfluss des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten Dexmedetomidin auf die Expression  
Apoptose-assoziiierter Proteine nach inkompletter zerebraler Hemisphärenischämie bei  
der Ratte im protrahierten zeitlichen Verlauf**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Susanne Zintner

aus  
München

München, 2005



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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle  
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl  
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. H.-Ch. Siebert

Tag der Promotion: 11. Februar 2005



Der Mann der Wissenschaft muss ständig bemüht sein,  
an seinen eigenen Wahrheiten zu zweifeln.

José Ortega y Gasset

....dem „besten Chef“ gewidmet,  
der mir nicht nur fachlich, sondern auch menschlich immer ein Vorbild darin sein wird,  
bei der Suche nach Fehlern und deren Lösungen stets bei sich selbst zu beginnen  
und sich erst mit dem Besten zufrieden zu geben.



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
2	Schrifttum	14
2.1	Anatomie und Physiologie des Gehirns	14
2.1.1	Der Hippokampus	15
2.1.1.1	Anatomie des Hippokampus	15
2.1.1.2	Funktion des Hippokampus	16
2.2	Pathophysiologie der zerebralen Ischämie	16
2.2.1	Formen und Entstehung der zerebralen Ischämie	17
2.2.2	Mechanismus und Ablauf der zerebralen Ischämie	17
2.2.3	Folgen der zerebralen Ischämie	18
2.2.3.1	Nekrose	19
2.2.3.2	Apoptose	19
2.2.3.2.1	Pro-apoptotische Proteine	24
2.2.3.2.2	Anti-apoptotische Proteine	26
2.2.3.2.3	Verwendete Analyseverfahren der Apoptose-assoziierten Proteine	27
2.3	Neuroprotektive Therapieansätze bei zerebraler Ischämie	30
2.3.1	Tiermodelle zerebraler Ischämie	30
2.3.1.1	Tiermodelle für die globale zerebrale Ischämie	30
2.3.1.2	Tiermodelle für die fokale zerebrale Ischämie	31
2.3.2	Prinzipien der Neuroprotektion	32
2.3.3	Möglichkeiten der Neuroprotektion	33
2.3.3.1	Physikalische Interventionsmöglichkeiten	33
2.3.3.2	Pharmakologische Interventionsmöglichkeiten	34
2.4	Dexmedetomidin	36
2.4.1	Pharmakologie	36
2.4.2	Einsatz in der Medizin	39
3	Eigene Untersuchungen	43
3.1	Zielvorstellung	43
3.2	Material und Methodik	43
		10

3.2.1	Versuchstiere	43
3.2.2	Versuchsplan	44
3.2.3	Operative Phase	46
3.2.3.1	Narkose und maschinelle Beatmung	46
3.2.3.2	Operationsvorbereitung und Präparation der Gefäßzugänge	47
3.2.3.3	Präparation und Installation der Messgeräte	48
3.2.3.4	Äquilibration	49
3.2.3.5	Blutentzug	49
3.2.3.6	Ischämie	50
3.2.3.7	Reinfusion	51
3.2.3.8	Erholung	51
3.2.4	Entnahme und Verarbeitung des Gehirns	53
3.2.5	Untersuchung und Auswertung der Proben	55
3.2.5.1	Immunfluoreszenz-Färbung	55
3.2.5.2	Western-Blot-Analyse	60
3.2.6	Verwendete Geräte und Materialien	66
3.2.6.1	Geräte	66
3.2.6.2	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	66
3.2.6.3	Antikörper	67
3.2.6.4	Verwendete Lösungen	68
3.2.7	Statistische Befundbewertung	70
3.3	Ergebnisse	70
3.3.1	Intraoperativ erhobene Parameter	71
3.3.2	Immunfluoreszenz-Färbung	77
3.3.3	Western-Blot-Analyse	86
4	Diskussion	95
4.1	Methoden der Versuchsdurchführung	96
4.1.1	Das Tiermodell	96
4.1.2	Semi-quantitative Proteinbestimmung durch Immunfluoreszenz-Färbung	97
4.1.3	Proteinkonzentrationsbestimmung durch die Western-Blot-Analyse	98
4.2	Diskussion der Ergebnisse	100
4.2.1	Intraoperativ erhobene Parameter	100
4.2.2	Potentiell neuroprotektive Wirkung von Dexmedetomidin	103



4.2.3	Proteinanalyse mit Immunfluoreszenz-Färbung und Western-Blot-Analyse	104
4.2.3.1	Analyse des Bax-Proteins	104
4.2.3.2	Analyse des p53-Proteins	105
4.2.3.3	Analyse des Bcl-2-Proteins	106
4.2.3.4	Analyse des Mdm-2-Proteins	107
4.3	Fazit und Ausblick	109
5	Zusammenfassung	111
6	Summary	113
7	Literaturverzeichnis	114
8	Verwendete Abkürzungen	134
9	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	136
10	Danksagung	138
11	Lebenslauf	139

# 1 Einleitung

Zerebrovaskuläre Erkrankungen stehen in der Statistik der Todesursachen beim Menschen hinter Herzkreislauf- und Krebserkrankungen auf Rang drei und stellen zudem eine der häufigsten Ursachen für Invalidität im höheren Lebensalter dar. Allein in den alten Bundesländern sterben jährlich etwa 100.000 Menschen an den Folgen eines zerebralen Infarktes, weitere 70.000 bis 90.000 überleben mit bleibenden neurologischen Schäden wie Halbseitenlähmung, Sprach- und Verhaltensstörungen. Der ischämische Insult ist neben dem Schlaganfall eine Folge von Schädel-Hirn-Trauma, von neuro-, kardio- oder gefäßchirurgischen Eingriffen und kardio-pulmonaler Reanimation. Eine zerebrale Ischämie in der Neurochirurgie ist jedoch im Gegensatz zum Schlaganfall häufig vorhersehbar. Die temporäre Unterbindung der Hirnarterie ist bei einer Vielzahl von Operationen, wie z.B. Karotisendarterektomie, Anastomose- oder Bypassoperationen, unumgänglich. Die daraus resultierende fokale Ischämie birgt das Risiko eines dauerhaften neurologischen Defizits.

In den letzten Jahren wurde besonders intensiv nach neuen Behandlungsmöglichkeiten und geeigneten therapeutischen Verfahren geforscht. Die zunehmende Kenntnis der pathologischen Abläufe nach einem ischämischen Insult eröffnen neue Ansatzpunkte der Intervention. Das verzögerte Auftreten von Nervenzelluntergängen, der Apoptose (ENDRES et al. 1998), erweitert die Zeitspanne für therapeutisches Vorgehen und bietet neue therapeutische Ansätze an Apoptose-assoziierten Schädigungsmechanismen.

Eine Reihe von Methoden und Pharmaka haben im Tiermodell und in klinischen Versuchen neuroprotektive Wirkungen gezeigt. In tierexperimentellen Studien konnten HOFFMAN et al. 1991 das neurologische Defizit, das unmittelbar eine Stunde nach inkompletter zerebraler Ischämie zu beobachten war, durch Infusionen mit  $\alpha_2$ -Agonisten deutlich reduzieren. In der vorliegenden Arbeit wird im tierexperimentellen Ischämiemodell unter Einfluss des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonisten Dexmedetomidin die Expression der Apoptose-assoziierten Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 qualitativ und semi-quantitativ über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie könnten mögliche Ansätze zur Entwicklung neuroprotektiver Therapiekonzepte aufzeigen und als Grundlage für zukünftige klinische Anwendungen dienen.

## 2 Schrifttum

### 2.1 Anatomie und Physiologie des Gehirns

Das Gehirn ist der kraniorostrale Teil des zentralen Nervensystems und lässt sich in folgende 5 Abschnitte aufteilen:

- *Telencephalon* mit rechter und linker Hemisphäre, *Basis cerebri* und *Cortex*
- *Diencephalon* mit *Thalamus*, *Hypothalamus* und *Epithalamus*
- *Mesencephalon* mit *Tectum* und *Tegmentum*
- *Metencephalon* mit *Pons* und *Cerebellum*
- und der *Medulla oblongata* (HEBEL und STROMBERG 1976, NICKEL et al. 1991)

Umgeben von den drei Hirnhäuten (*Pia mater*, *Arachnoidea* und *Dura mater*) liegt es in der soliden Knochenkapsel (*Cavum cranii*) des Schädels.

Die arterielle Blutversorgung des Gehirns erfolgt hauptsächlich über die paarig angelegten *Aa. carotides internae*, die aus der *A. carotis communis* entspringen, sowie zusätzlich über die *Aa. vertebrales*, *occipitales* und *spinales*.

Die *A. carotis interna* teilt sich auf in die *A. cerebri anterior*, die kraniale und mediale Abschnitte der Hemisphäre vaskularisiert, und in die *A. cerebri media*, die den lateralen Teil der Hemisphäre versorgt. Die *A. basilaris*, entspringend aus der *A. vertebralis*, bildet mit den aus ihr hervorgehenden *Aa. cerebri posteriores* eine Anastomose mit den *Aa. cerebri anteriores*. Der dadurch entstandene Kollateralkreislauf (*Circulus arteriosus Willisii*) verbindet somit anteriores und posteriores Stromgebiet (NICKEL et al. 1991, LIEBMANN 1993).

Das Gehirn ist eines der stoffwechselaktivsten Organe des Körpers. Es erhält etwa 15 % des Herzminutenvolumens in Ruhe, was einem Blutdurchfluss von 50 ml/100 g/min entspricht, und verbraucht unter physiologischen Bedingungen etwa 20 % der Gesamtmenge des dem Körper zur Verfügung stehenden Sauerstoffs, entsprechend 3 bis 5 ml/100 g/min. 25 % des Glukoseverbrauchs finden im Zentralnervensystem (ZNS) statt. Im Vergleich dazu beträgt das Gewicht des Gehirns nur etwa 2 bis 3 % des Gesamtkörpergewichts (FITCH 1994, FORTUNE et al. 1994).

Der zerebrale Energiebedarf lässt sich unterteilen in den Struktur- oder Erhaltungsstoffwechsel und den Funktionsstoffwechsel (NEMOTO et al. 1996).

Der Funktionsstoffwechsel mit 40 % Anteil am zerebralen Gesamtstoffwechsel umfasst alle höheren neuronalen Funktionen sowie die Generierung von elektrischen Signalen. Der

Erhaltungsstoffwechsel (60 %) sorgt für das Aufrechterhalten der zellulären Integrität, z.B. des Ruhemembranpotentials und der Ionengradienten (MICHENFELDER und THEYE 1973).

Bei Absinken der zerebralen Durchblutung unter Werte von 18 ml/100 g/min wird der Funktionsstoffwechsel eingestellt, eine weitere Senkung des Blutflusses auf Werte zwischen 18 und 12 ml/100 g/min induziert die Entstehung einer ischämischen Penumbra, eine Zone verminderten zerebralen Blutflusses, in der noch keine vollständige Infarzierung eingetreten und die potentiell heilbar ist (ASTRUP et al. 1981, HEISS 2000).

Sinkt die Durchblutung im Gehirn unter 12 ml/100 g/min kommt es zu morphologischen Veränderungen und Zelluntergang im Rahmen der zerebralen Ischämie (KEMPSKI 1994). Folglich kann der zerebrale Metabolismus bis zu 60 % abnehmen, bevor es zu einer Einschränkung des Erhaltungsstoffwechsels kommt und die zelluläre Integrität bedroht ist.

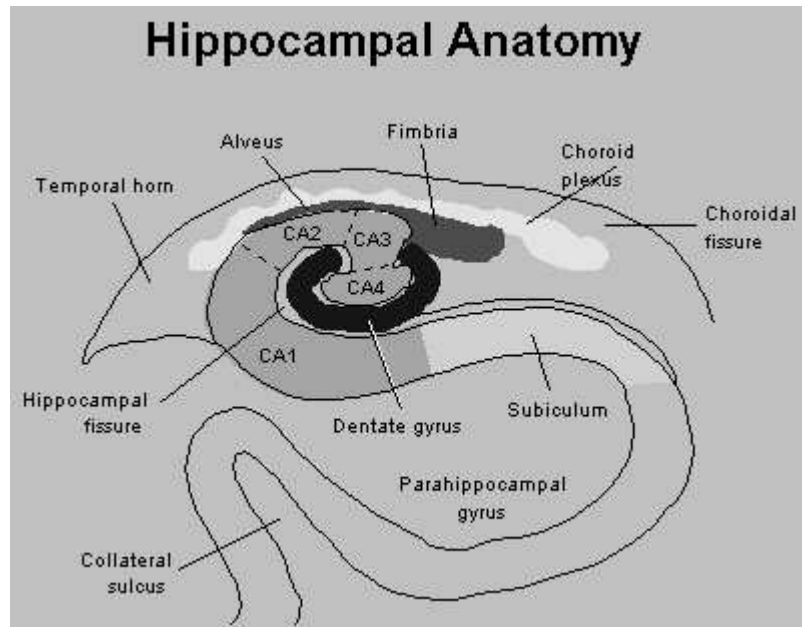
### **2.1.1 Der Hippokampus**

Der Hippokampus erweist sich bei Untersuchungen von Ischämieschäden anhand eines Tiermodells als besonders geeignet, da dieser Anteil des Gehirns selektiv vulnerabel auf Störungen des zerebralen Metabolismus reagiert (BONNEKOH et al. 1990).

#### 2.1.1.1 Anatomie des Hippokampus

Als bogenförmiger Teil des Telenzephalons besteht der Hippokampus (Ammonshorn) aus dem *Gyrus parahippocampalis*, dem *Gyrus dentatus*, den *Fimbria hippocampi* und der *Fornix*. Er liegt als Teil des limbischen Systems bogenförmig ausgezogen entlang des Unterhorns des Seitenventrikel (dessen mediale Begrenzung er bildet) und lässt sich aufgrund der Packungsdichte der Pyramidenzellen in die CA1-, CA2-, CA3- und in die CA4-Regionen unterteilen, welche sich zwischen dem oberen und dem unteren Ast des *Gyrus dentatus* einfügt (NICKEL et al. 1991). Alle Regionen sind aus folgenden Schichten aufgebaut:

- das *Stratum moleculare* mit Spitzendendriten der großen Pyramidenzellen
- das *Stratum pyramidale* mit kleinen und großen Pyramidenzellen
- und das *Stratum multiforme* mit Assoziationszellen.



**Abbildung 1: Anatomie des Hippokampus (nach HESSELINK 1999).**

#### 2.1.1.2 Funktion des Hippokampus

Aufgrund der hochgradig komplexen neuronalen Strukturen ist eine genaue, eindeutige Aussage über die Funktion des limbischen Systems und des Hippokampus nur schwer zu formulieren. Noch heute gehen die Meinungen über seine spezifischen Aufgaben auseinander. Unter dem Überbegriff „Gedächtnis“ kann eine Vielzahl von Aufgabenbereichen dieser Gehirnregion differenzierter unterschieden werden, von denen hier nur einige Beispiele genannt werden: Lernen und Konsolidieren, episodisches und kontextuales Gedächtnis, Entdeckung von Neuem und räumliche Erinnerung (HENKE et al. 1999).

## 2.2 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

Eine Reduzierung oder Unterbrechung des Blutflusses im Gehirn induziert die zerebrale Ischämie, die ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf des Gewebes darstellt. In den betroffenen Arealen entsteht eine Unterversorgung mit Energie und Glukose, die schließlich zu einer Schädigung des Gewebes führt (WERNER 2000).

### **2.2.1 Formen und Entstehung der zerebrale Ischämie**

Je nach räumlicher Ausdehnung und Schweregrad können zwei Formen der zerebralen Ischämie unterschieden werden. Man spricht von globaler zerebraler Ischämie, wenn die Blutzufuhr des gesamten Gehirns unterbrochen wird. Dabei liegen primär keine Störungen der Hirndurchblutung, sondern Störungen der Oxygenierung vor. Ursachen hierfür können z.B. Herz-Kreislauf-Stillstand (komplette globale zerebrale Ischämie) oder diffuse Hirnödeme (inkomplette globale zerebrale Ischämie) sein (WERNER 2000).

Fokale Ischämien entstehen bei Verschluss einzelner Gehirnarterien oder deren Äste, z.B. nach dem Einschwemmen von Thromben oder durch regional bedingte Ödeme (BRIERLEY et al. 1976, WERNER 2000). Dabei hängt das Ausmaß des Schadens von der Effizienz der Kollateralgefäße, der Konfiguration des *Circulus arteriosus Willisii*, des Zustandes der großen Halsgefäße und des systemischen Blutdrucks ab (HUTCHINSON und YATES 1961, GRAHAM 1985).

Das Kapitel 2.3.1 gibt einen Überblick über die Vielzahl von Modellen, die zur Erzeugung einzelner Formen der zerebralen Ischämie zur Verfügung stehen.

### **2.2.2 Mechanismus und Ablauf der zerebralen Ischämie**

Bereits minimale Störungen der Gehirndurchblutung aktivieren eine pathophysiologische Kaskade, die je nach Ausmaß und Dauer der Schädigung in nekrotischem oder apoptotischem Zelltod endet. Ursächlich hierfür ist die Empfindlichkeit des Gehirns gegenüber Substratmangel. Seine geringe Energie-Speicherfähigkeit macht es von einer kontinuierlichen Energiezufuhr und somit ungestörter Perfusion abhängig (KRAUSE et al. 1988). Im Verlauf einer Ischämie sind in Folge von Membrandepolarisation und Blockade der oxidativen Phosphorylierung schon nach kurzer Zeit die zerebralen Energiereserven in Form von ATP erschöpft. Es kommt zur ATP-Produktion durch anaerobe Glykolyse. Die daraus resultierende Gewebsazidose nach Laktat-Akkumulation kann in Abhängigkeit vom Glukosespiegel pH-Werte von 5,6 bis 6,4 erreichen (KEMPSKI 1994). Die Laktazidose des Gewebes induziert eine Änderung der Zellmembranpermeabilität und verursacht eine Denaturierung der Membranproteine und Enzyme. Daraus resultierende Ödeme des Gefäßendothels, der Astrozyten und anderer neuronaler Strukturen vermindern zusätzlich die Durchblutung lokaler Bezirke (WERNER 2000).

Das anaerob generierte ATP kann den Energiebedarf des Gehirns nur kurzfristig decken. Folge der rasch entleerten ATP-Speicher und Insuffizienz der anaeroben ATP-Produktion ist

ein Funktionsverlust der energieabhängigen Ionenpumpen, die das Membranpotential nicht mehr aufrechterhalten können. Na<sup>+</sup>-Ionen, Cl<sup>-</sup>-Ionen und Wasser strömen unkontrolliert in die Zelle ein, K<sup>+</sup>-Ionen strömen aus (KEMPSKI 1994).

Die Depolarisation der Zellmembran initiiert eine massive Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter, vor allem Glutamat, aus den präsynaptischen Vesikeln (WERNER 2000).

Infolge des Energiemangels unter ischämischen Bedingungen können Gliazellen und Neuronen das Glutamat nicht mehr aufnehmen (SILVERSTEIN et al. 1986). Die extrazelluläre Glutamat-Konzentration steigt an.

Durch Stimulation postsynaptischer spezifischer Glutamat-Rezeptoren und Rezeptor-assoziiierter Ionenkanäle und gleichzeitiger Depolarisierung der Nervenzelle erfolgt ein pathologischer Einstrom von Ca<sup>2+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Ionen in die Zelle (KEMPSKI 1994). Eine zusätzlich induzierte Ausschüttung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus intrazellulären Speichern wie z.B. dem endoplasmatischen Reticulum (ER) lässt die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>- Ionenkonzentration exzessiv ansteigen. Dieser unphysiologische Stimulus aktiviert eine Vielzahl von Enzymsystemen, wie den Lipasen, den Proteasen und den Endonukleasen, die Zellmembranen und intrazelluläre Organellen lysieren (SIESJÖ 1992). Die Folgen sind Veränderungen der Zellpermeabilität und Bildung freier Fettsäuren. Insbesondere eine Akkumulation der Arachidonsäure verursacht durch ihre Oxidation zu Eikosanoiden physiologische und pathophysiologische Reaktionen der Neuronen und Störungen der Mikrozirkulation. Als Ausgangssubstanz für die Bildung von Radikalen hat die Arachidonsäure zusätzliches zellschädigendes Potential (CHEN et al. 1986, KEMPSKI 1994).

### **2.2.3 Folgen der zerebralen Ischämie**

Bei neurologischen Erkrankungen, wie der zerebralen Ischämie, galt der nekrotische Zelltod als einzige Form des Zelluntergangs, bis erste Hinweise für apoptotische Charakteristika in einem *In-vivo*-Modell für fokale zerebrale Ischämie in der Ratte gefunden wurden (LINNIK et al. 1993).

Inzwischen finden sich bei neurologischem Zelluntergang immer mehr Hinweise für das gleichzeitige Vorkommen sowohl von Apoptose als auch von Nekrose (MARTIN et al. 1998).

### 2.2.3.1 Nekrose

Unter Nekrose (*Nekros* = tot) versteht man den örtlichen, d.h. geweblich umschriebenen Zelltod (KITT 1990). Diese Form des Zelltodes wird auch als „passiver Zelltod“ bezeichnet, da die Nekrose ohne eine „aktive“ Beteiligung der Zelle und ohne weiteren Energieverbrauch stattfindet und betrifft immer einen ganzen Verband von Zellen (GRAHAM und LANTOS 1997). Nekrose tritt immer dann auf, wenn eine Zelle extremem physikalischen Stress oder starken chemischen Reizen ausgesetzt ist und eine kontrollierte Reparatur des Schadens, z.B. aufgrund eines Energiemangels, nicht mehr möglich ist oder die Zellhomöostase nicht aufrecht erhalten werden kann (WANG 2000).

Nach Zusammenbruch der Homöostase kommt es zum hyperosmotischen Schock. In Folge der gestörten Membranpermeabilität schwellen die Zelle und ihre Zellorganellen, vor allem die Mitochondrien, an (HUTCHINS und BARGER 1998). Die lysierte Zellmembran gibt ihre Inhaltsstoffe explosionsartig in den Extrazellulärraum frei, in dem diese eine entzündliche Begleitreaktion hervorrufen (MAJNO und JORIS 1995, PADOSCH et al. 2001).

Histologisch manifestiert sich die irreversible Zelldestruktion nach ungefähr 5 bis 10 Stunden. Elektronenmikroskopisch fassbare intrazelluläre Veränderungen, wie Mitochondrienschwellung, Vesikulation und Fragmentation von ER und Golgiapparat, gehen den Strukturveränderungen am Zellkern voraus. Es können grundsätzlich drei Formen des Zellkernuntergangs (Karyopyknose, Karyorhexis, Karyolyse) unterschieden werden, die jedoch fließende Übergänge zeigen. Das Schicksal der nekrotischen Zelle endet entweder unter Wasserverlust in einer Proteindenaturierung bei zunächst erhaltener Gewebsstruktur (Koagulationsnekrose) oder aus einem primären Zustand der Gewebsüberwässerung in kompletter Autolyse und Autodigestion (Kolliquationnekrose) (KITT 1990).

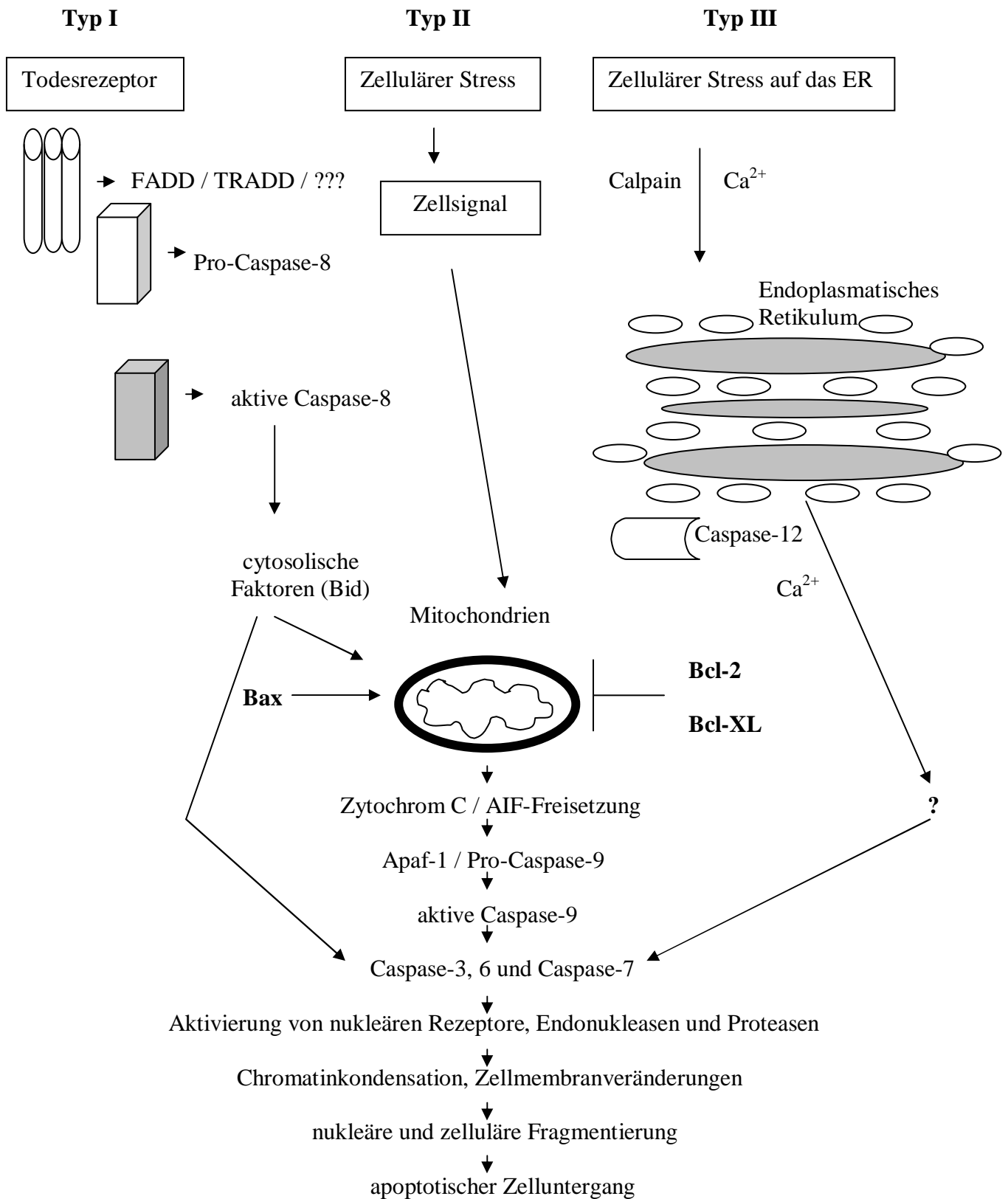
### 2.2.3.2 Apoptose

Der Begriff der Apoptose wurde von KERR und seinen Mitarbeitern 1972 eingeführt und beschreibt typische morphologische und biochemische Veränderungen dieses Absterbens einer Zelle. Im ZNS ist die Apoptose die wesentliche Form des physiologischen Zelltods. Während der Ontogenese des Gehirns bis zur adulten Hirnreife sterben 20 bis 80 % der Neuronen durch Apoptose (OPPENHEIM 1991). Im adulten Gehirn wird die Apoptose als aktiver zellulärer Suizid induziert, um Zellen, die ihre physiologische Funktion nicht erfüllen können, zu entfernen (WILLIAMS 1991).



Außerhalb des ZNS wird Apoptose in verschiedenen Geweben genutzt, um Zellen zu vernichten ohne systemische Entzündungskaskaden mit daraus resultierendem Gewebsuntergang auszulösen. Neben diesem hohen Stellenwert der Apoptose bei der Aufrechterhaltung des physiologischen Gleichgewichts zwischen Proliferation und kontrolliertem Zellsterben ist sie außerdem an pathologischen Prozessen im ZNS beteiligt (THOMPSON 1995).

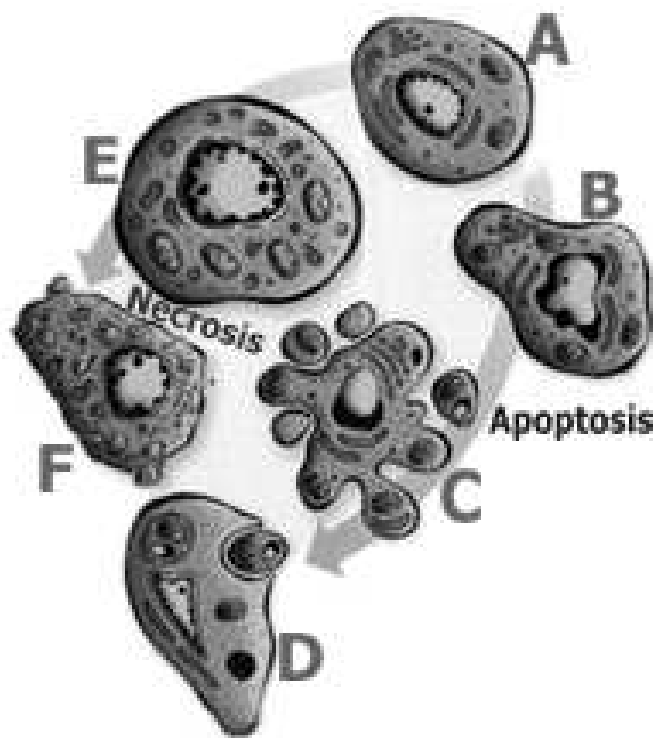
Durch milde pathologische Reize ausgelöst, kann das zelleigene Todesprogramm über mehrere Apoptose-Kaskaden, die in der Abbildung 2 aufgezeigt werden, ablaufen. Spezifische Signale aus der Umgebung der Zelle initiieren Rezeptor-vermittelt (durch sogenannte membranständige Todesrezeptoren) das extrinsische System (*extrinsic pathway*). Das intrinsische System wird durch eine Vielzahl unspezifischer Noxen, die eine mitochondriale Dysfunktion verursachen, induziert (ELDADAH und FADEN 2000, PADOSCH et al. 2001). Ein dritter Weg führt über zellulären Stress auf das endoplasmatische Retikulum zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (MEHMET 2000). Die gemeinsame Endstrecke aller Kaskaden stellt die Aktivierung der sogenannten Effektorcaspasen dar. Das sind Proteasen, die im Zytosol in einer Pro-Caspase-Form vorliegen und durch apoptogene Signale aktiviert zahlreiche Enzymmechanismen in Gang setzen, die vielfältige morphologische und biochemische Veränderungen der Zelle auslösen (KOTHAKOTA et al. 1997, WANG 2000).



**Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Apoptosewege mit den wichtigsten pro- und anti-apoptischen Modulatoren (nach MEHMET 2000).**

Erste morphologische Anzeichen einer apoptotischen Degeneration findet man im Zellkern. Die Kondensation der Chromosomen und internukleosomale Fragmentierung der DNS finden bei erhaltener Zellmembranintegrität statt. Die Kernmembran hingegen wird abgebaut, es kommt zur Abschnürung membranumschlossener Vesikel (sog. Apoptose-Körperchen), die kondensiertes Intrazellulär-Material enthalten. Die daraus resultierende Zellschrumpfung geht einer sekundären Zellmembranschädigung voran. Die Zellreste werden von benachbarten Zellen ohne Auftreten inflammatorischer Prozesse phagozytiert (KERR et al. 1972).

Eine Gegenüberstellung morphologischer Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose zeigt folgende Abbildung:



**Abbildung 3: Gegenüberstellung von Apoptose und Nekrose (HUSLEY und PURDY 1997).**

**Eine gesunde Zelle (A) beginnt im Verlauf der Apoptose zu schrumpfen (B), ihre Chromosome kondensieren. Es folgt die Bildung von Apoptose-Körperchen (C), die von anderen Zellen phagozytiert werden (D). Im Gegensatz dazu schwillt eine nekrotisch zu Grunde gehende Zelle an (E), bevor ihre Zellmembran rupturiert (F).**

**Tabelle 1: Gegenüberstellung von Apoptose und Nekrose nach PADOSCH et al. (2001)**

<b>NEKROSE</b>	<b>APOPTOSE</b>
pathophysiologisch	physiologisch und pathophysiologisch
nicht genetisch determiniert	genetisch determiniert
nicht energieabhängig	energieabhängig
verminderte Proteinbiosynthese	Proteinbiosynthese notwendig
keine Änderung des intrazellulären ATP-Gehalts	Abfall des intrazellulären ATP-Gehalts
K <sup>+</sup> konstant, kein Na <sup>+</sup> -Einstrom	K <sup>+</sup> -Verlust, Na <sup>+</sup> -Einstrom, Abfall des Membranpotentials
synchrones Auftreten in mehreren Zellen	asynchroner Prozess einzelner Zellen
unmittelbar eintretende passive Atrophie	zeitlich verzögerte aktive Degeneration
Zellschwellung	Zellschrumpfung
Zerstörung von Zellorganellen	intakte Zellorganellen
Zerfall nukleärer Chromatinstrukturen	Chromatinkondensation
früher Verlust der Membranintegrität	später Verlust der Membranintegrität
entzündliche Begleitreaktion	keine entzündliche Begleitreaktion

Um die Integrität des Gesamtorganismus nicht zu gefährden, ist die Eliminierung der Zellen einer genauen Regulation unterworfen (GREEN und REED 1998). Auf unterschiedlichen Ebenen aller „*pathways*“ gibt es Angriffspunkte zur Unterbrechung der Kaskaden und somit

zur Inhibition der Apoptose (EKERT et al. 1999). Ein Großteil des Wissens über die Regulation der Apoptose basiert auf Grundlagenforschung an dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. ELLIS et al. (1991) und HENGARTNER und HORVITZ (1994) beschreiben insgesamt 14 Gene, die je nach Funktion in drei Gruppen eingeteilt werden können:

- Gene der direkten Exekution der Apoptose
- Gene zur Vermittlung der Phagozytose
- und Gene mit regulierender pro- und anti-apoptotischer Wirkung.

Die Regulation des apoptotischen Zelluntergangs wird größtenteils über die gencodierte Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine (z.B. Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2) gesteuert (KRAJEWSKI et al. 1994).

#### 2.2.3.2.1 Pro-apoptotische Proteine

##### Bax-Protein = *Bcl-associated X protein*

Das Bax-Protein gehört zur Gruppe der Bcl-2-Homologen (OLTVAI et al. 1993). Unter den von der Bax-RNA codierten Proteinen kann man drei verschiedene nach ihrem Molekulargewicht unterscheiden:

- das Bax  $\alpha$ -Protein mit 21 kD
- das Bax  $\beta$ -Protein mit 24 kD
- und das Bax  $\gamma$ -Protein mit 5 kD (KRAJEWSKI et al. 1994).

Unter physiologischen Bedingungen liegt es frei im Zytosol, ein Apoptose-auslösender Stimulus induziert die Zusammenlagerung zweier Bax-Moleküle und deren Translokation als Homodimer zu den Mitochondrien (WOLTER et al. 1997). Im Gesamtorganismus ist das Bax-Protein assoziiert an Gewebe mit hoher Apoptoserate, wie den Epithelien von Darm, Brustdrüse, Prostata, Haut und den Luftwegen. Innerhalb des Nervensystems ist es in den Neuronen der Purkinje-Zellen des Zerebellum, den großen Neuronen im Kortex, im Hirnstamm und in den sympathischen Ganglien lokalisiert (KRAJEWSKI et al. 1994).

Eine z.B. ischämiebedingte Überexpression von Bax führt zur Bildung von Heterodimeren mit Bcl-2, dessen anti-apoptotische Wirkung dadurch inaktiviert wird (OLTVAI et al. 1993). Zusätzlich wirken Bax-Homodimere, die durch Porenbildung in den Mitochondrienmembranen eine Membrandepolarisation induzieren (NARITA et al. 1995), Apoptose-fördernd (YIN et al. 1994).

## P53-Protein

Das p53-Protein stellt einen der wichtigsten Zellzyklus-regulierenden Faktoren dar. Aufgrund seiner enormen Rolle bei der Induktion von Zellarrest und programmiertem Zelltod wird dieses Protein auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (LANE 1992). Es hat eine bedeutende Funktion bei der Entstehung maligner Tumore und sein codierendes p53-Tumorsupressor-Gen ist in mehr als 50 % aller humanen Krebsarten mutiert (HOLLSTEIN et al. 1994, LEVINE 1997).

In einer gesunden Zelle ist p53 mit einem Molekulargewicht von 53 kD im Zellkern lokalisiert und liegt in Form von Tetrameren in einer relativ geringen Konzentration vor. Es ist verhältnismäßig instabil mit einer Halbwertszeit von circa 20 Minuten (LEVINE 1997). Unter physiologischen Bedingungen wird die übermäßige Expression von p53 durch eine Vielzahl von Regulationsmechanismen verhindert (MOLL et al. 1992, HAUPT et al. 1997).

Liegt ein Schaden, z.B. nach zerebraler Ischämie, am Genom vor, bindet p53 spezifisch an die geschädigte DNS (KERN et al. 1991). Ein Anstieg der p53- Konzentration erfolgt in erster Linie infolge einer Halbwertszeitverlängerung des Proteins durch verstärkte Translation. Erst sekundär kommt es zum Anstieg der Transkriptionsrate (MALTZMAN und CZYZYK 1984, KASTAN et al. 1991).

Die Akkumulation von p53 aktiviert eine Vielzahl von Proteinen, einschließlich Bax (MYIYASHITA und REED 1995) und Mdm-2 (HAINES et al. 1994), welche differenzierte Schutzmechanismen der Zelle in Gang setzen. Bei milden DNS-Schäden ermöglicht eine temporäre Blockierung des Zellzyklus und zwischenzeitlicher DNS-Replikation deren Reparatur (COX und LANE 1995). Ist der Schaden am Genom zu schwerwiegend, um behoben zu werden, wird schließlich die Apoptose der Zelle eingeleitet (HUGHES et al. 1996).

Aufgrund der von p53 aktivierten Expression von Mdm-2 und dessen gleichzeitiger Fähigkeit, durch Binden an p53-Protein-Tetramere diese wirkungsvoll zu hemmen, besteht zwischen den beiden Proteinen ein sich selbst regulierendes *Feedback*-system (PICKSLEY und LANE 1993).

#### 2.2.3.2.2 Anti-apoptotische Proteine

##### *B cell lymphoma protein* = Bcl-2-Protein

HENGARTNER und HORVITZ identifizierten 1994 das Bcl-2-Protein als funktionelles und strukturelles Pendant zu einem von *ced-9*-Gen (*C. elegans death-gene*) codierten Protein, das in ihren Untersuchungen am Fadenwurm *C. elegans* den programmierten Zelltod unterdrückte.

Die Familie der Bcl-2-Proteine besteht aus pro- und anti-apoptotisch wirkenden Mitgliedern, wie Bcl-2, Bax, Bak, Bcl-x und anderen, die als gemeinsames Charakteristikum das Auftreten von maximal vier Domänen hoher Sequenzhomologie *bcl-2 homology* (BH) 1 bis 4 haben (TSUJIMOTO und SHIMIZU 2000). Entsprechend ihrer Struktur und Funktion werden sie in mehrere Gruppen unterteilt. Hauptmitglied und Namensgeber dieser Proteinfamilie ist das Protoonkogen *B cell lymphoma gene* (Bcl-2), welches eine vielfältige Zellschutzfunktion gegenüber verschiedensten pro-apoptotischen Stimuli, wie z.B. Chemotherapeutika und Hitzeschock zeigt (HOCKENBERRY et al. 1993). Codiert von dem Bcl-2-Gen ist das 26 kD schwere Bcl-2-Protein C-terminal über eine Transmembrandomäne mit der äußeren Mitochondrienmembran, der Kernhülle und dem ER verbunden (HOCKENBERRY et al. 1990).

Pro- und anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie regulieren das mitochondriale Membranpotential (TSUJIMOTO und SHIMIZU 2000). Bcl-2 als Apoptose-inhibierendes Protein stabilisiert das mitochondriale Membranpotential und verhindert so die apoptotische Zytochrom c-Freisetzung aus dem Intermembranraum der Mitochondrien (KLUCK et al. 1997). Eine Vielzahl komplexer und selektiver Interaktionen durch Homo- und Heterodimerbildung mit anderen Proteinen der Bcl-2-Familie (Bcl-x, A1, Bad, Bak, Bik) beeinflusst die Funktion des Bcl-2-Proteins (MERRY und KORSMEYER 1997). Eine Bindung, z.B. an Bax, hemmt die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-2 (OLTVAI et al. 1993).

##### *murine double minute protein 2* = Mdm-2-Protein

Entdeckt als tumorauslösendes Onkogen rückte das Mdm-2-Protein in das Blickfeld des Interesses, als seine anti-apoptotische Fähigkeit, an p53 zu binden und dieses effizient zu inaktivieren, realisiert wurde (MOMAND et al. 1992). Das Mdm-2-Gen besteht aus 12 Exons, die verschiedene Proteine generieren können, und kommt in unterschiedlichen Isomeren vor, die durch die Nutzung mehrerer Promotoren oder durch alternatives Splicen entstehen

(HAINES et al. 1994). Das größte Transkript codiert für das im Zellkern lokalisierte Polypeptid Mdm-2 mit 90 kDa (CHEN et al. 1996).

Unter physiologischen Bedingungen bindet das Mdm-2-Protein an p53-Tetramere, und hält damit die Menge an freiem, funktionell aktiven p53 auf einem geringen Niveau (BOTTGER et al. 1997). Im Gegenzug dafür steuert das p53-Protein die Transkription des Mdm-2-Gens. Diese Autoregulation wird auch als p53-Mdm-2-Feedback-Loop bezeichnet (PICKSLEY und LANE 1993).

Nach Transaktivierung durch p53 wird das Mdm-2-Protein synthetisiert, welches eine Ubiquitinligase-Aktivität besitzt. Durch kovalente Anbindung an p53 wird dieses zum Abbau in das zelluläre Proteasom überführt (HONDA et al. 1997). Da Mdm-2 im Bereich der Transaktivierungsdomäne an p53 bindet, wirkt es gleichzeitig als Transrepressor (CHEN et al. 1995). Durch Induktion seines eigenen Inhibitors etabliert p53 somit eine geschlossene regulatorische Schleife mit Mdm-2.

Eine Vielzahl anderer Proteine interagieren mit Mdm-2 entweder hemmend (sog. *downstream* oder *effectors*) oder fördernd (sog. *upstreams* oder *effectors*), genaue Mechanismen bedürfen jedoch weiterer Studien (IWAKUMA und LOZANO 2003).

#### 2.2.3.2.3 Verwendete Analyseverfahren der Apoptose-assoziierten Proteine

In der hier vorliegenden Studie werden die Apoptose-assoziierten Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 als Indikator für das Ausmaß des apoptotischen Zellschadens durch die Immunfluoreszenzfärbung und die Western-Blot-Analyse qualitativ und semiquantitativ untersucht.

##### Immunfluoreszenz-Färbung

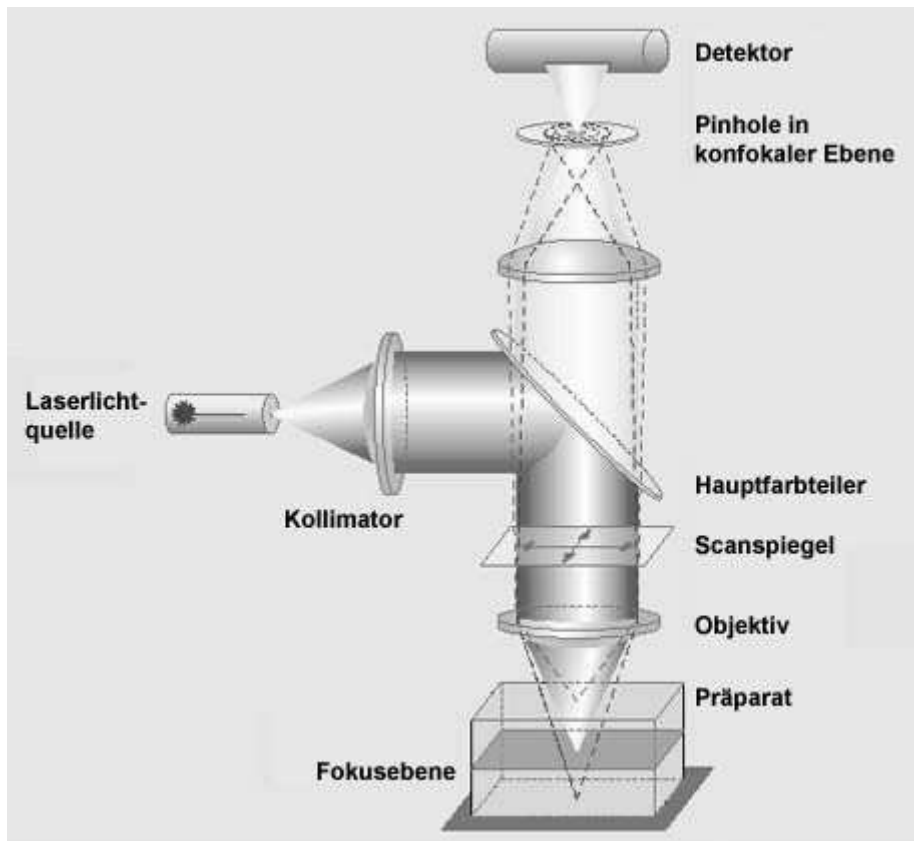
Diese Methode der Immunhistochemie wird routinemäßig zur Markierung der oben genannten Proteine verwendet (MATSUMOTO et al. 1993, KRAJEWSKI et al. 1994). Dabei werden Zellen mit fluoreszierenden polyklonalen Antikörpern, die sehr spezifisch nur am jeweiligen gesuchten Protein binden, markiert und anschließend anhand der Lichtstreuung und Fluoreszenz-Intensität mit Hilfe eines konfokalen Laserscan-Mikroskops (CLSM) analysiert. (Im vorliegenden Versuch sollen mit dieser Methode die quantitative und räumliche Verteilung der Apoptose-assoziierten Proteinen Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 ermittelt werden.)



Da diese Proteine physiologischer Weise in hoher Konzentration in der Leber vorliegen (HARADA et al. 2000), dienen Proben dieses Organes zur Positivkontrolle des Färbeerfolges. Um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, werden als Negativkontrolle zusätzliche Gewebsschnitte ohne den spezifischen Antikörper gefärbt, der die Bindung zwischen gesuchtem Protein und Fluoreszenzfarbstoff darstellt.

Die Analyse der Proben erfolgt nach korrekter Färbung mit dem CLSM, das Fluorochrome in hoher Auflösung darstellen kann, da Streulicht weitestgehend eliminiert wird.

In der Abbildung 9 ist schematisiert der Strahlengang durch ein LSM dargestellt, das Pinhole wirkt als Raumfilter. An dem uns zur Verfügung stehenden Zeiss LSM 410 kann gleichzeitig mit drei Lasern angeregt werden.



**Abbildung 4: Funktionsweise des konfokalen Laserscan Mikroskops.**

**Produktbroschüre von Zeiss (2003): Laser Scanning Mikroskop LSM 510, Zelluläre Dynamik optimal darstellen.**

Der große Vorteil der konfokalen Mikroskopie ist die Möglichkeit, das von einer Probe reflektierte oder emittierte Licht aus einer einzigen Ebene zu sammeln. Eine Lochblende, die zur Fokusebene konjugiert (konfokal) angeordnet ist, sorgt dafür, dass sämtliches Licht, das nicht aus dieser Ebene stammt, auch nicht vom Detektor erfasst werden kann. Beim Laserscan

Mikroskop wird ein Bild aus einer Menge von Daten zusammengesetzt, wobei die Probe Punkt für Punkt und Zeile für Zeile sequentiell abgetastet wird. Der so erzeugte optische Schnitt ist ein kontrastreiches in x, y und z hochaufgelöstes Abbild der Probe. Indem man die Fokusebene schrittweise verschiebt, lassen sich einzelne Bilder (optische Schnitte) zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammensetzen und anschließend digital verarbeiten. Das monochromatische Anregungslicht des Lasers wird durch das Objektiv in den Grenzen der wellenoptischen Auflösung auf einen Punkt im Präparat fokussiert. Das Fluoreszenzlicht, welches vom Objekt zurückstrahlt, wird durch eine kleine Lochblende in der Zwischenbildebene über einen Photomultiplier aufgenommen. Bei kleinem Pinhole ergibt sich eine geringe optische Schnittdicke, bei offenem Pinhole entspricht das Bild einer normalen digitalen Epifluoreszenzaufnahme (ZEISS PRODUKTINFORMATION 2003).

Um eine konstante Laserleistung zu gewährleisten, werden ein Powermeter und sog. „beads“ verwendet. Darunter versteht man „Leuchtperlen“, die auf einem Objektträger unter Lichtausschluss und gekühlt gelagert über Monate die gleiche Fluoreszenzintensität behalten und somit ebenfalls zur Überprüfung einer konstanten Laserleistung verwendet werden können. Bei unterschiedlich gemessener Leuchtkraft der „Beads“ ist von einer Schwankung der Laserleistung auszugehen. Sowohl Messungen des Powermeters als auch Aufnahmen der „Beads“ werden dokumentiert und archiviert. Sie ermöglichen, bei geringen Schwankungen der Laserleistung Umrechnungsfaktoren zu erstellen, mit denen die aufgenommenen Bilder der Proben objektiv verglichen werden können.

### Western-Blot-Analyse

Um die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung zu überprüfen, wird mit der Western-Blot-Analyse eine weitere Proteindetektion durchgeführt, die ein anerkanntes und bewährtes Verfahren zur qualitativen und semi-quantitativen Untersuchung von Proteinen darstellt (WESTERMEIER 1997). Dabei sollen ebenfalls die Apoptose-assoziierten Antikörper Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 nachgewiesen werden.

Die Western-Blot-Analyse ist ein spezifischer immunologischer Nachweis von Proteinen nach deren Auftrennung, Fixierung auf eine Trägermembran und Sichtbarmachen durch eine enzymatische Farbreaktion. Dabei werden die verschiedenen Proteine in einem Gel elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend erfolgen Elektrotransfer und Fixierung der Proteine auf eine Membran, auf der die gesuchten Antigene durch Antikörper markiert und mit Hilfe eines lumineszierenden Farbstoffs, der an die Antikörper gekoppelt ist, sichtbar gemacht werden (WESTERMEIER 1997).

## **2.3 Neuroprotektive Therapieansätze bei zerebraler Ischämie**

### **2.3.1 Tiermodelle zerebraler Ischämie**

Obwohl eine direkte Übertragung der Ergebnisse von neuroprotektiv wirksamen Behandlungen im Tiermodell nur selten vergleichbare Effekte in der Praxis erzielen, sind sie in der Erforschung der Pathophysiologie der zerebralen Ischämie und deren Bekämpfung nicht ersetzbar (WAHLGREN und AHMED 2004). Seit 160 Jahren versuchten Wissenschaftler, im Tier erzeugte Ischämie der des Menschen so identisch als möglich nachzuahmen (COOPER 1836) und entwickelten eine Vielzahl verschiedener Modelle. Trotz ausstehender Erfolge in der direkten Übertragbarkeit gibt es eine überwiegende Anzahl an Vorteilen des Tiermodells gegenüber klinischen Studien:

Reproduzierbarkeit in Ausdehnung und Schweregrad eines ischämischen Schadens und Kontrollierbarkeit dieser Parameter ermöglichen eine umfassende Analyse und gezielte Interaktion in das komplexe Geschehen der Gehirnschädigung (GINSBERG und BUSTO 1989). Dabei erweisen sich Modelle mit kleinen Tieren, wie Ratten und Mäusen, hinsichtlich Kostenintensität und Praktikabilität denen größerer Säugetiere überlegen. Nicht zuletzt erfordert die Anwendung eines Therapeutikums am Patienten ohne jeden Zweifel vorausgehende umfassende Studien am Tier (ZIVIN et al. 1990).

Man kann zwischen Modellen, die eine globale zerebrale Ischämie und denjenigen, die eine fokale zerebrale Ischämie verursachen, unterscheiden.

#### **2.3.1.1 Tiermodelle für die globale zerebrale Ischämie**

Bei Erzeugung einer globalen zerebralen Ischämie wird die gesamte Durchblutung des Gehirns unterdrückt. Dabei kann zwischen kompletter und inkompletter (residuale Durchblutung noch vorhanden) Ischämie unterschieden werden.

##### Methoden zur Erzeugung kompletter globaler Ischämie

Die einfachste, aber ohne jede Variationsmöglichkeit durchzuführende Methode, den Blutfluss im Gehirn zu stoppen, ist die Dekapitation (LOWRY et al. 1964).

Die Anwendung des „*neck-torniquet*“, bei der den Tieren eine aufblasbare Halsmanschette angelegt und soweit gefüllt wird, bis eine Komprimierung der Gefäße erfolgt (SIEMKOWICZ

und GJEDDE 1980), erzeugt auf Grund von Komplikationen wie Nervenkompression und venöser Kongestion unterschiedliche Ergebnisse. Eine Variante hierzu ist die Methode des „neck cuff“, bei dem die Vertebralarterien gesondert abgeklemmt werden müssen (KABAT et al. 1941). Eine zusätzliche Absenkung des Blutdrucks wurde 1977 von NEMOTO et al. an Affen durchgeführt.

Die Induktion eines Herzstillstandes durch verschiedenste Techniken, unter anderem durch K<sup>+</sup>-Applikation, erzeugt eine globale zerebrale Ischämie (NAKASHIMA et al. 1995), allerdings ebenso eine Ischämie des gesamten Körpers. Um dies zu vermeiden, und gezielt den Blutfluss nur im Gehirn zu beeinflussen, wurde eine Vielzahl verschiedener Methoden entwickelt, bei der Gefäße im Thorax- und Halsbereich verschlossen werden (TRAYSTMAN 2003).

#### Methoden zur Erzeugung inkompletter globaler Ischämie

Im „two-vessels occlusion“ Modell werden beide *Aa. carotides communes* vorübergehend geschlossen und zusätzlich eine Absenkung des Blutdrucks durch systemische Hypotension erzielt (EKLÖF und SIESJÖ 1972).

PULSINELLI und BRIERLEY entwickelten 1979 die Methode der „four-vessel occlusion“, bei der der Verschluss aller das Gehirn direkt versorgender Arterien vorgenommen wird. In einem ersten Schritt werden unter Anästhesie die Vertebralarterien mit einem Elektrokauter koaguliert und bilateral um die *Aa. carotides communes* atraumatische Clips angebracht. Am nächsten Tag werden die Clips verschlossen.

Eine weitere Methode ist die Erhöhung des zerebrospinalen Flüssigkeitsdrucks. LJUNGGREN et al. (1974) infundieren künstliche Zerebrospinalflüssigkeit (ZSF) in die *Cisterna magna* und erhöhen damit den ZSF-Druck über den arteriellen Blutdruck. Eine Kompression der Gefäße verhindert somit die Perfusion.

#### 2.3.1.2 Tiermodelle für die fokale zerebrale Ischämie

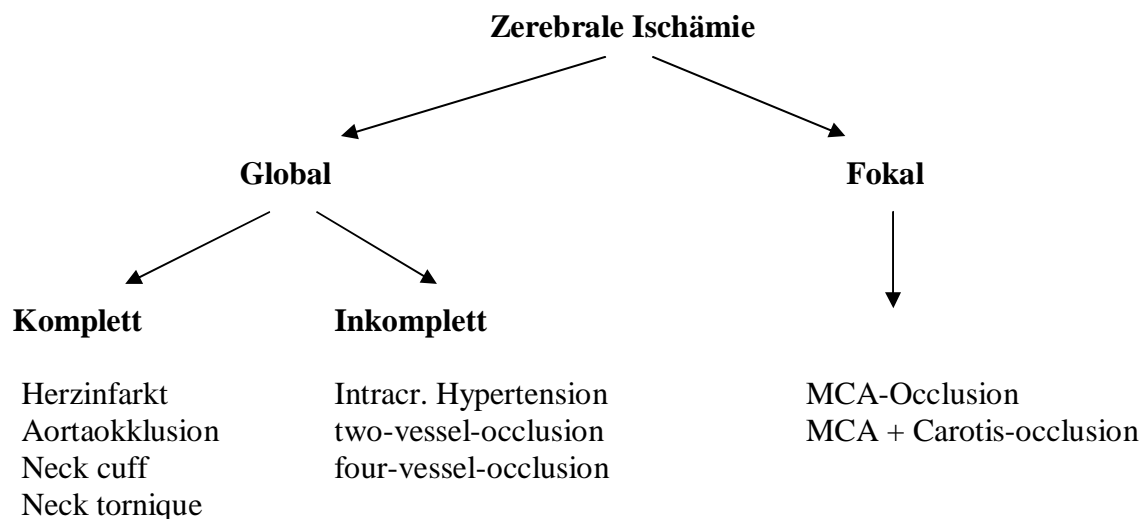
Die meisten Modelle zur Erzeugung fokaler zerebraler Ischämien beinhalten den Verschluss eines der Hauptgefäße, der mittleren zerebralen Arterie (MCA). Die erzeugten Infarkte sind allerdings in Ausdehnung und Schweregrad oft unterschiedlich. Es gibt eine Vielzahl an Variationen dieses Modells, die sich in Lokalisation, Dauer und Technik der Okklusion unterscheiden (TRAYSTMAN 2003). Auch Kombinationen mit einem gleichzeitigen

Verschluss der *Aa. carotides communes* werden angewendet (CHARRIAUT-MARLANGUE et al. 1998).

Das Tiermodell der MCA-Okklusion ist eines der meist verwendeten, da es den Verhältnissen eines menschlichen Hemisphäreninfarkts sehr ähnelt (GARCIA 1984). TAMURA et al. beschreiben 1981 Operationstechnik und daraus resultierende neuropathologische Veränderungen der MCA-Okklusion.

Eine Variation von HOFFMAN et al. (1990), bei der nur die rechte *A. carotis communis* verschlossen und eine gleichzeitige Absenkung des arteriellen Blutdrucks durch Hypotension erzeugt wird, entspricht größtenteils dem in der vorliegenden Studie verwendeten Modell.

Eine aktuelle Übersicht über Tiermodelle zur zerebralen Ischämie gibt folgende Abbildung:



**Abbildung 5: Aktuelle Übersicht über Tiermodelle der zerebralen Ischämie (nach TRAYSTMAN 2003) (vereinfachte Darstellung).**

### 2.3.2 Prinzipien der Neuroprotektion

Unter dem Begriff der „Neuroprotektion“ werden alle Bemühungen zusammengefasst, die das Ziel verfolgen, die Ausbreitung eines Gehirnfarktes und das Absterben des ihn umgebenden Gebietes zu verhindern. Dabei handelt es sich notwendigerweise nicht nur um pharmakologische Interventionen, sondern ebenso um physikalische Behandlungsweisen, die effektiv in das Ablaufen der Ischämie-Kaskade eingreifen können (WAHLGREN und AHMED 2004).

Erfolgreiche und weiter intensiverte Erforschung der komplexen pathophysiologischen Abläufe eröffnen zunehmend therapeutische Ansatzpunkte, diese an zentralen Schlüsselstellen zu unterbrechen.

### **2.3.3 Möglichkeiten der Neuroprotektion**

Eine Vielzahl von Behandlungsweisen und Medikamenten wurden in den letzten Jahrzehnten in tierexperimentellen und klinischen Studien getestet. Trotzdem häufig die potentiell neuroprotektive Wirkung einer Methode nicht mehr reproduziert oder sogar widerlegt werden konnte, gibt es eine Reihe gesicherter und gängiger physikalisch und medikamentös einsetzbarer Maßnahmen der Neuroprotektion, über die im Folgenden ein Überblick gegeben wird.

#### 2.3.3.1 Physikalische Interventionsmöglichkeiten

##### Hypothermie

Bereits vor 40 Jahren wurde die zerebroprotektive Wirkung von Hypothermie beschrieben und teilweise eingesetzt (ROSOMOFF und HOLADAY 1954). BUSTO et al. zeigten 1987 im Tierexperiment, dass schon eine milde Absenkung der Körpertemperatur um 2 bis 3 °C vor den Folgen der zerebralen Ischämie schützt. Untersuchungen in der eigenen Arbeitsgruppe bestätigten diesen neuroprotektiven Effekt einer Temperaturabsenkung (EBERSPÄCHER 2001).

Die protektive Wirkung der Hypothermie scheint auf verschiedenen Mechanismen zu basieren. Eine Reduzierung des Struktur- und Funktionsstoffwechsels des ZNS führt zu einer temperaturabhängigen Suppression des Metabolismus im Gehirn (KABAT et al. 1941). Folge davon ist eine Absenkung des Substratbedarfs und Mangelversorgungen werden abgefangen (NEMOTO et al. 1996). Weitere mögliche Mechanismen liegen in der Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke, einer Verminderung der Glutamat-Freisetzung in den Extrazellulärraum sowie der Hemmung von freien Radikalen und Stickstoffmonoxid (DIETRICH et al. 1990, BAKER et al. 1995, GLOBUS et al. 1995). Eine erhöhte Temperatur verstärkt analog zur Neuroprotektion der Hypothermie das klinische Defizit nach ischämischen Ereignissen (KUROIWA et al. 1990).

### Hyperventilation

Bei Patienten mit erhöhtem intrakraniellen Druck hat der spezifische Einsatz der Hyperventilation positive Effekte. Durch induzierte Absenkung des CO<sub>2</sub>-Partialdrucks kommt es in Folge reflektorischer Vasokonstriktion zur Reduzierung der Hirndurchblutung und des intrakraniellen Drucks (WERNER 2000).

#### 2.3.3.2 Pharmakologische Interventionsmöglichkeiten

### Verbesserung der Reperfusion

Eine schnelle Reperfusion der ischämischen Territorien wirkt sich positiv auf Größe und Schweregrad des neurologischen Schadens aus. Ein Ansatzpunkt der Intervention hierfür ist die Gewährleistung der Rekanalisation durch thrombolytisch wirksame Substanzen (HACKE et al. 1995).

Andere Maßnahmen, wie die hypervoläme Hämodilution oder der Einsatz von Mannitol, verändern die Fließeigenschaften des Blutes und zielen somit auf eine Verbesserung der Mikrozirkulation ab (JAFAR et al. 1986, COLE et al. 1994).

### Antagonisten der exzitatorischen Aminosäuren

Der Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration und deren Auswirkungen sind eine der Schlüsselpunkte, an denen die Kaskade der neuronalen Zellschädigung durch verschiedene Mechanismen blockiert werden kann: eine präsynaptische Blockierung spannungsabhängiger Natriumkanäle, an die der Glutamat-Transport gekoppelt ist, wird durch sogenannte „*Glutamat Release Inhibitors*“ initiiert (GOLDIN et al. 1995) und eine vermehrte Freisetzung des Glutamats gehemmt.

Postsynaptische Rezeptoren (NMDA und AMPA) des Glutamats können durch Gabe von kompetitiv und nicht-kompetitiv wirksamen Antagonisten blockiert werden. In der Folge wird die intrazelluläre Akkumulation von Ca<sup>2+</sup> und Na<sup>+</sup> vermindert und die Aktivierung kataboler Prozesse begrenzt (WERNER 2000).

### Sauerstoffradikalfänger

Abhängig von normalen Stoffwechsellleistungen können Zellen Sauerstoffradikale selbst beseitigen. Bei deren Akkumulation nach Ischämie sind zelleigene Abwehrmechanismen jedoch schnell erschöpft (SIESJÖ et al. 1990).

Tierexperimentelle Studien zeigen, dass hochdosierte Gaben von Vitamin E als Radikalfänger neuroprotektiv wirksam sind (KOC et al. 1999), dessen langsames Anfluten im Hirnparenchym jedoch eine länger andauernde Applikation nötig macht (HALL et al. 1992). Synthetisch hergestellte 21-Aminosteroide zeigen eine 100-fach verstärkte neuroprotektive Wirkung gegenüber Vitamin E (HALL et al. 1988).

### Anästhetika

Schon früh wurde das neuroprotektive Potential der Anästhetika bei zerebralen Schädigungen entdeckt (MICHENFELDER und THEYE 1975) und gilt trotz kontroverser Diskussion als wichtiges Element in der Bekämpfung des Zelluntergangs. Dabei muss zwischen Inhalationsanästhetika und solchen, die intravenös verabreicht werden, unterschieden werden. Ihre Effektivität hängt meist vom Zeitpunkt ihrer Anwendung und dem Ausmaß des zu Grunde liegenden Insults ab.

Bezüglich des Wirkungsmechanismus wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt:

- verbesserte Balance zwischen Substratangebot und -bedarf
- Suppression des Sympathikus und der Krampfpotentiale
- Reduktion des intrakraniellen Drucks (nur intravenöse Anästhetika)
- Umverteilung der zerebralen Durchblutung zugunsten der Ischämieareale
- Abfangen freier Radikale (WERNER 2000).

Weitere Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zur potentiellen Neuroprotektivität von Propofol und Sevofluran wurden bereits durchgeführt und zum Teil veröffentlicht (HACZEK 2004, STEGEMANN 2004).

### $\alpha_2$ -Agonisten

In Folge der zerebralen Ischämie kommt es nach Stimulierung des sympathischen Anteils des vegetativen Nervensystems zu einer zentral gesteuerten Ausschüttung von Noradrenalin aus Vesikeln in den synaptischen Spalt (LAVYNE et al. 1975).

$\alpha_2$ -Agonisten stimulieren zentrale präsynaptische  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren, was zu einer Reduktion der sympathischen Aktivität und zu einem Abfall der zirkulierenden und synaptischen NoradrenalinKonzentration führt (WERNER 2000).

Die Stimulierung postsynaptischer  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren induziert durch zentrale Vasokonstriktion eine Reduktion der Hirndurchblutung offenbar ohne nennenswertes Absenken des zerebralen Blutvolumens. Der Hirnmetabolismus bleibt dabei unverändert (KANAWATI et al. 1986, ZORNOW et al. 1992).



$\alpha_2$ -Adrenozeptoren können in drei unterschiedliche Isozeptoren ( $\alpha_2A$ ,  $\alpha_2B$ ,  $\alpha_2C$ ) unterteilt werden, die im zentralen und peripheren Nervensystem, in den meisten Organen und im Auge lokalisiert sind. Funktion und Wirkung können dabei mit der Lokalisation variieren. Alle  $\alpha_2$ -Adrenozeptortypen wirken analog über eine Aktivierung von G-Proteinen (*Guanine-nucleotid regulatory binding proteins*). Diese üben ihren Effekt auf die Zelle durch Modulation von *second messenger*-Systemen oder Aktivitätsänderung zellulärer Ionenkanäle und damit einhergehender Hyperpolarisation der Zellmembran aus (GERTLER et al. 2001).

In tierexperimentellen Studien konnten HOFFMAN et al. 1991 das neurologische Defizit nach inkompletter zerebraler Ischämie durch Infusionen mit  $\alpha_2$ -Agonisten wie Clonidin und dem um ein Vielfaches potenteren Dexmedetomidin deutlich reduzieren. Für den genauen Wirkungsmechanismus der neuroprotektiven Wirkung von Dexmedetomidin gibt es eine Vielzahl von Theorien, die im Kapitel 4.2.2 gegenüber gestellt werden.

Das neuroprotektive Potenzial von Dexmedetomidin, vor allem im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf, soll in der vorliegenden Studie am Tiermodell untersucht werden.

## **2.4 Dexmedetomidin**

$\alpha$ -Adrenozeptor Agonisten werden erfolgreich seit den 1970er Jahren bei der klinischen Behandlung von Bluthochdruck und bei Patienten während des Alkohol- und Drogenentzugs eingesetzt (KAHN et al. 1999). In den 1980er Jahren wurde Dexmedetomidin als ein wesentlich selektiverer  $\alpha_2$ -Agonist, der bei gleicher Wirksamkeit kürzere Halbwertzeiten als das bis dahin gebräuchliche Clonidin aufweist, entwickelt. Ende 1999 wurde Dexmedetomidin von der *US Food and Drug Administration* (FDA) für den amerikanischen Markt zum Einsatz am Menschen zur Analgesie und Sedation zugelassen. Dexmedetomidin ist das pharmakologisch aktive Dextro-Isomer des in der Veterinärmedizin häufig angewendeten Medetomidin (COURSIN et al. 2001). Dieses Sedativum (Handelsbezeichnung Domitor) mit analgetischen und myorelaxierenden Eigenschaften, ist wie das Dexmedetomidin ein selektiver, spezifischer und stark wirksamer  $\alpha$ -Adrenozeptor Agonist.

### **2.4.1 Pharmakologie**

Das Imidazolderivat Dexmedetomidin unterscheidet sich in seiner Wirkungsweise von allen anderen gebräuchlichen Sedativa. Eine Aktivierung der Rezeptoren in Gehirn und Rückenmark hemmt neuronale Reize und verursacht Hypotension, Bradykardie, Sedation und Analgesie. Effekte in anderen Organen sind Kontraktion der Gefäß- und anderer glatter

Muskulatur, Verringerung von Speichelfluss, verminderte Darmmotilität und –sekretion, Hemmung der Renin- und Insulinfreisetzung und Absenkung des intraokkularen Drucks sowie ein Anstieg der glomerulären Filtration und vermehrte Sekretion der Nieren von Wasser und  $\text{Na}^{2+}$  (METZ et al. 1978).

Dexmedetomidin ist ein  $\alpha$ -Adrenozeptor Agonist mit dosisabhängiger Selektivität zu  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren. Bei Tieren, denen eine geringe oder mittlere Dosis Dexmedetomidin (10 bis 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) langsam infundiert wurde, kann man eine hohe Selektivität an  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren beobachten. Höhere Dosen ( $> 1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) oder eine schnellere Infusionsrate aktivieren sowohl  $\alpha_1$ - als auch  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren (VIRTANEN et al. 1988).

Grundsätzlich können zwei Wirkmechanismen unterschieden werden: Stimulation der präsynaptischen Rezeptoren hemmen die Noradrenalinfreisetzung und unterbrechen eine Schmerzweiterleitung, Stimulation zentraler postsynaptischer Rezeptoren hemmt das sympathische System und verringert Blutdruck und Herzfrequenz (GERTLER et al. 2001).

Veränderungen von Herzfrequenz und Blutdruck nach Applikation von Dexmedetomidin resultieren wahrscheinlich nicht aus einem direkten Effekt auf das Herz (HOUSMANS 1990), sondern auf eine reflektorische Antwort in zwei Phasen: die Gabe eines Bolus von 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Dexmedetomidin induziert über Stimulation von peripheren  $\alpha_2\text{B}$ -Adrenozeptoren in der Muskelschicht der Gefäße einen kurzzeitigen Blutdruckanstieg und eine daraus folgende reflektorische Zunahme der Herzfrequenz. Nach 5 bis 10 Minuten folgt in der 2. Phase ein Abfall des Blutdrucks um durchschnittlich 10 bis 20 % unter den Ausgangswert und eine Stabilisierung der Herzfrequenz (BLOOR et al. 1992). Beide Effekte sind Folge der Rezeptorvermittelten Hemmung des Sympathischen Systems (XU et al. 1998). Auch Stimulation der präsynaptischen  $\alpha_2\text{A}$ -Adrenozeptoren und eine damit verbundene Absenkung der NoradrenalinKonzentration um maximal 92 % werden als dem Blutdruckabfall und der Herzfrequenzsenkung zu Grunde liegenden Mechanismen diskutiert (KALLIO et al. 1989, AANTAA et al. 1990).

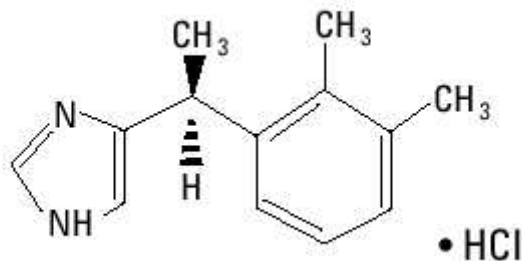
In klinisch effektiven Dosen verursacht Dexmedetomidin erheblich geringere respiratorische Depression als andere Sedativa (BELLEVILLE et al. 1992). Klinische Studien zeigen keine wesentlichen Veränderungen respiratorischer Parameter während oder nach Applikation des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten (VENN et al. 2002).

Im ZNS findet eine Blockierung der  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren vor allem im *locus coeruleus*, der Ursprungsregion noradrenerger Nervenbahnen, statt. Der *locus coeruleus* ist ein bläulich-grau pigmentiertes Kerngebiet unter dem Boden der rostralen Rautengrube, welches die größte

Ansammlung noradrenerger Zellen im ZNS darstellt. Zentrale Folgen der Dexmedetomidin-Applikation sind Analgesie, Sedation, Anxiolyse und Hypnose (GERTLER et al. 2001).

### Pharmakokinetik

Nach intravenöser Applikation von Dexmedetomidin werden 94 % des Medikaments an Plasmaproteine gebunden, 6 % können ungebunden die Blut-Hirn-Schranke passieren. Nach einer kurzen Verteilungsphase mit einer Halbwertszeit von durchschnittlich 6 Minuten ist das Medikament im Durchschnitt nach 2 Stunden ( $t_{1/2} = 2 \text{ h}$ ) zur Hälfte ausgeschieden. Das durchschnittliche Verteilungsvolumen beträgt 118 l bei einer Clearance von 39 l pro Stunde (ABBOTT LABORATORIES 2000).



**Abbildung 6: Strukturformel von Dexmedetomidin (ABBOTT LABORATORIES 2000).**

Die Biotransformation von Dexmedetomidin findet fast vollständig in der Leber statt. 95 % der Metabolite werden über die Nieren ausgeschieden, 5 % verlassen über Fezes den Organismus. Dexmedetomidin wird sowohl direkt glukoronidiert sowie durch das Enzym Zytochrom P-450 inaktiviert. Die Hauptmechanismen der Biotransformation sind direkte N-Glukoronidation, Hydroxilierung und N-Methylation. Diese Konjugate sind inaktiv und gut über Niere und Leber ausscheidbar (ABBOTT LABORATORIES 2000).

### Toxikologie

Dexmedetomidin kann die Blut-Plazenta-Schranke passieren, teratogene Effekte sind jedoch bisher noch nicht untersucht worden. Ebenso wenig gibt es Studien über Langzeitanwendung von Dexmedetomidin und deren Folgen (GERTLER et al. 2001).

Mögliche Nebenwirkungen einer Dexmedetomidin-Applikation sind Blutdruckabfall oder -anstieg, Nasenbluten, Bradykardie, Vorkammerflimmern und Sauerstoffmangel. Überdosierungen können zu einem Atrioventrikularblock ersten und zweiten Grades führen.

Die meisten dieser Nebeneffekte treten während oder kurz nach Einnahme des Wirkstoffs auf (EBERT et al. 2000).

#### **2.4.2 Einsatz in der Medizin**

Eine Vielzahl der Wirkungen von Dexmedetomidin können sowohl positive, als auch negative Effekte im Patienten hervorrufen. Durch Auslösen von Bradykardie und Blutdruckabfall muss der Einsatz von Dexmedetomidin individuell auf den Patienten abgestimmt und bei Risikopatienten unterlassen werden (GERTLER 2001).

##### Präoperativ

Wegen seiner analgetischen, anxiolytischen, sedativen und sympatholytischen Effekte ist Dexmedetomidin ein nützliches Adjuvans zur Prämedikation, insbesondere bei Patienten mit zu erwartender Stressproblematik. Während einer Anästhesie erzeugt es hämodynamische Stabilität und vermag den Sauerstoffverbrauch intraoperativ um bis zu 8 % und die Herzfrequenz um bis zu 18 % zu verringern (TAITTONEN et al. 1997).

##### Intraoperativ

Dexmedetomidin potenziert die Wirksamkeit aller gebräuchlichen Anästhetika, gleichgültig welcher Art der Applikation, und verringert somit deren erforderliche Dosis (GERTLER et al. 2001).

Die Fähigkeit des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten, die Pharmakokinetik intravenös verabreichter Anästhetika zu beeinflussen, führt bei kombinierter Anwendung durch hämodynamische Effekte und Änderung des Metabolismus zu Verringerung der notwendigen Applikationsdosis des Anästhetikums (KHARASCH et al. 1991, BHRER et al. 1994).

Ähnliche Effekte, die ebenso eine Dosis-Verringerung bewirken, wurden in zahlreichen Studien für Inhalationsanästhetika bewiesen. 1991 zeigten AHO et al. eine 25% ige, KAHN et al. (1999) sogar 35 bis 50% ige Reduktion von Isofluran bei vorheriger oder gleichzeitiger Applikation von Dexmedetomidin. Auch der erforderliche Bedarf von Sevofluran kann mit Dexmedetomidin um 17 % verringert werden (FRAGEN und FITZGERALD 1999).

Die reflektorische Antwort bei endotrachealer Intubation wird von  $\alpha_2$ -Agonisten gemildert. Deren sympatholytische Komponente fängt einen Anstieg des arteriellen Blutdrucks, der Herzfrequenz und der Plasmakonzentration von Katecholaminen ab (SCHEININ et al. 1992).

Die analgetische Wirksamkeit des Dexmedetomidin zeigten AHO et al. (1991) in kleineren chirurgischen Eingriffen, während derer kein zusätzliches Schmerzmittel verabreicht wurde. Es wird vermutet, dass eine Ausschüttung endogener Opiatkomponenten im Rückenmark diesem analgetischen Effekt zu Grunde liegt (FLEETWOOD-WALKER et al. 1985). Somit verringert die Applikation von Dexmedetomidin intra- und postoperativ den Bedarf an Opioiden und andere Analgetika zur Schmerzlinderung (SCHEININ et al. 1992).

Die mit Dexmedetomidin erzeugte Sedation ist einzigartig, da sedierte Patienten aufweckbar bleiben, ohne weitere Stimulation jedoch wieder in das Stadium der zuvor erreichten Bewusstseinsdämpfung zurückfallen. Bei Gehirnoperationen am wachen Patient unter Sedation mit Dexmedetomidin erweist sich der  $\alpha_2$ -Agonisten hinsichtlich seiner analgetischen und nicht-atemdepressiven Komponenten als wertvolle Medikation, deren genaue Wirkung allerdings in weiteren Studien untersucht werden muss (MACK et al. 2004). Die Phase der Bewusstseinsbeschränkung nach Sedation ist ohne Antidot nach maximal 4 Stunden beendet (HALL et al. 2000).

Die Gehirndurchblutung wird unter Anwendung von hochdosiertem Dexmedetomidin bis zu 25 % gesenkt. ZORNOW et al. (1993) dokumentierten diesen Effekt sogar bei erhöhtem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck ( $\text{paCO}_2 = 39\text{-}45 \text{ mmHg}$ ). Zwei Stunden nach Absetzen des  $\alpha_2$ -Agonisten kehren die Werte auf das Ausgangsniveau zurück.

Eine Hemmung thermoregulatorischer Mechanismen mit Dexmedetomidin reduziert intra- und postoperatives Zittern, hat aber keinen Einfluss auf die Schweißproduktion (GERTLER et al. 2001).

### Postoperativ

Auf Grund ihrer sympatholytischen und analgetischen Komponenten, ohne dabei wesentliche respiratorische Veränderungen hervorzurufen, bieten  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten Vorteile in der postoperativen Phase. Die induzierte intensive analgetische Wirkung nach einem chirurgischen Eingriff durch Gabe von Dexmedetomidin verringert den Bedarf an Schmerzmedikamenten um 50 %, das Anwenden einer „Notfall-Sedation“ kann bei 80 % der Patienten vermieden werden (VENN et al. 1999). Alle Effekte von Dexmedetomidin sind durch sein Antidot Atipamezol, ein  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Antagonist mit einer Halbwertszeit von 1,5 bis 2 Stunden, antagonisierbar (SCHEININ et al. 1998). Damit bietet sich eine Möglichkeit der reversiblen intravenösen Anästhesie mit zeitunabhängiger Erholungsphase (TALKE 1998).

Respiratorische Effekte sind postoperativ minimal, eine Dexmedetomidin-Infusion kann sogar während Extubation und Einsetzen der Spontanatmung fortgeführt werden (GERTLER et al. 2001). Eine Vielzahl der Medikamente, die bei der postoperativen Intensivbetreuung (ICU *intensive care unit*) angewendet werden, beeinträchtigen das Immunsystem. Dexmedetomidin in klinisch relevanter Dosierung hat keinen Einfluss auf Chemotaxis, Phagozytose oder die Bildung freier Radikale (NISHINA et al. 1999). Die postoperativen hämodynamischen Effekte des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten sind vergleichbar mit den intraoperativen: Bradykardie und Blutdrucksenkung können insbesondere bei Risikopatienten zu Komplikationen der Kreislaufstabilität führen.

Das zu Dexmedetomidin in der Veterinärmedizin gebräuchliche Pendant Medetomidin ist in Wirkungsweise und Pharmakokinetik nahezu identisch. Die Stimulation der  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren bewirkt eine Verminderung der Freisetzung und des Umsatzes von Noradrenalin im Zentralnervensystem. Es kommt zu Sedation, Analgesie und Bradykardie. In der Peripherie verursacht Medetomidin eine Vasokonstriktion im Bereich der glatten Gefäßmuskulatur, was vorübergehend zu einem höheren arteriellen Blutdruck führt. Innerhalb von ein bis zwei Stunden sinkt der arterielle Blutdruck in den Normalbereich zurück oder leicht darunter. Die Atemfrequenz kann zeitweise verlangsamt sein. Dauer und Stärke von Sedation und Analgesie sind dosisabhängig. Bei voll ausgeprägter Wirkung ist das Tier entspannt und reagiert nicht mehr auf äussere Reize. Zwischen Medetomidin und Opiaten kommt es zu synergistischen Wirkungen, was eine bessere Anästhesie bewirkt. Ebenso vermindert Medetomidin den Bedarf an gasförmigen Anästhetika wie z.B. Halothan (PFIZER GMBH, 2003).

Tierexperimentelle Studien an Ratten (HOFFMAN et al. 1991), Kaninchen (MAIER et al. 1993) und Gerbils (KUHMONEN et al. 1997) zeigen eine eindrucksvolle Reduktion des neurologischen Defizits unter Dexmedetomidin in einigen, aber nicht in allen Modellen (KARLSSON et al. 1995) nach zerebraler Ischämie.

(Klinische Studien zur Neuroprotektion des Dexmedetomidin sind der Autorin zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht bekannt.) Im Rahmen des „Lund-Konzepts“ werden  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten erfolgreich in der Behandlung von Schädel-Hirn-Trauma Patienten eingesetzt. Dabei wird der intrakranielle Druck mit einer Kombinationstherapie abgesenkt (GRÄNDE et al. 2002).

Der genaue Mechanismus, der dieser Neuroprotektion zu Grunde liegen könnte, wird in Kapitel 4.2.2 diskutiert. Eine frühzeitige Beeinflussung der Apoptose-Kaskade des

Dexmedetomidin auf Modulation von Apoptose-assoziierten Proteinen zeigt die Studie von ENGELHARD et al. (2003), in der eine Hemmung des pro-apoptotischen Proteins Bax und zugleich vermehrte Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Mdm-2 vier Stunden nach Applikation von Dexmedetomidin erzielt wird. Die Konzentration dieser Proteine ist unabhängig von den zu Grunde liegenden Mechanismen ein Indikator für Ausmaß eines apoptotischen Zellschadens und wird in der folgenden Studie auf ihre Beeinflussbarkeit durch Dexmedetomidin untersucht.

## **3 Eigene Untersuchungen**

### **3.1 Zielvorstellung**

Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit ist es, die Expression der Apoptose-assoziierten Proteine nach inkompletter zerebraler Ischämie mit Reperfusion und gleichzeitiger Applikation des  $\alpha_2$ -Agonisten Dexmedetomidin im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen an der Ratte zu untersuchen.

Die Induktion einer zerebralen Ischämie löst eine pathophysiologische Kaskade aus, die je nach Schweregrad der Schädigung im schnellen nekrotischen oder langsamen apoptotischen Zelltod endet (KEMPSKI 1994). Bei Aktivierung der Apoptose kommt es zur Expression sogenannter Apoptose-assoziiierter Proteine mit pro-apoptotischer (Bax und p53) und anti-apoptotischer (Bcl-2 und Mdm-2) Wirkung (CHARRIAUT-MARLANGUE et al. 1998).

Die vorliegende Studie untersucht, ob durch Behandlung mit Dexmedetomidin die Expression der Apoptose-assoziierten Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen nach einer induzierten zerebralen Ischämie mit Reperfusion beeinflusst werden kann.

Durch Immunfluoreszenz-Färbung und Western-Blot-Analyse an vier definierten Zeitpunkten (1., 3., 7. und 28. Tag postischämisch) wird die Expression der genannten Apoptose-assoziierten Proteine qualitativ und semi-quantitativ untersucht.

Mit diesen Untersuchungen sollen bereits bestehende Studien über das neuroprotektive Potential von Dexmedetomidin ergänzt und Ansätze für mögliche therapeutische Anwendungen in der Klinik geschaffen werden.

### **3.2 Material und Methodik**

#### **3.2.1 Versuchstiere**

Als Versuchstiere werden 72 männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) mit einem Durchschnitts-Gewicht von  $410\text{g} \pm 60\text{g}$  eingesetzt.

Die Ratten werden während der Adaptionszeit von mindestens 8 Tagen in Gruppenkäfigen (Makrolon IV) gehalten. Während der Adaptionszeit stehen den Tieren Futter (Alleinfutterpellets „ssniff R/M-Haltung, 10 mm, nitrosaminarm“, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser ad libitum zur Verfügung, zwölf Stunden präoperativ erfolgt Futterentzug.



Gemäß den Vorgaben zur Versuchstierhaltung sind die Ratten unter standardisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 20 bis 23 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 50 % und 60 % sowie einem 12-stündigem Tag-Nacht- Beleuchtungsrythmus (50 bis 100 Lux innerhalb des Käfigs) untergebracht.

Präoperativ werden die Tiere einer allgemeinen Untersuchung unterzogen und nur klinisch gesunde Tiere für den Versuch eingesetzt. Postoperativ erfolgt die Haltung der Ratten unter gleichen äußeren Bedingungen im Einzelkäfig.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG i.d.F. vom 25.05.1998, BGBl I S.1105) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

### 3.2.2 Versuchsplan

Die Durchführung des Versuchs gliedert sich in mehrere Abschnitte, bestehend aus einem operativen Teil, in dem bei Ratten eine inkomplette Hemisphärenischämie durch Okklusion der rechten *Arteria carotis communis* mit hämorrhagischer Hypotension durch Blutentzug (MAP = 40 mmHg) und anschließender Reperfusion induziert wird. An den operativen Teil anschließend folgen unterschiedlich lang dauernde Beobachtungsphasen, die Euthanasie, Entnahme der Gehirne sowie deren Aufbereitung als Proben zur immunhistologischen und immunhistochemischen Analyse durch die Immunfluoreszenz-Färbung und die Western-Blot-Analyse.

Die Tiere werden randomisiert folgenden Gruppen (jeweils acht Tiere n = 8) zugeteilt:

I. Die Tiere der **Dexmedetomidin-Gruppe (Gruppe D<sub>ges</sub>)** durchlaufen den gesamten Versuch. Während der Ischämiephase erhalten die Tiere zusätzlich zu einer Fentanyl-Lachgas-Narkose einen intraperitoneal verabreichten Bolus Dexmedetomidin. Innerhalb der Gruppe werden die Tiere weiter nach der Überlebensdauer, die an die Operation anschließt, unterteilt in:

- 1 Tages-Tiere (**Gruppe D/1**)
- 3 Tages-Tiere (**Gruppe D/3**)
- 7 Tages-Tiere (**Gruppe D/7**)
- 28 Tages-Tiere (**Gruppe D/28**)

II. Die Tiere der **Kontroll-Gruppe (Gruppe K<sub>ges</sub>)** durchlaufen ebenfalls den gesamten Versuch, allerdings lediglich unter Fentanyl-Lachgas-Anästhesie ohne Dexmedetomidin-Applikation. Innerhalb der Gruppe werden die Tiere ebenfalls weiter nach Überlebensdauer unterteilt in:

- 1 Tages-Tiere (**Gruppe K/1**)
- 3 Tages-Tiere (**Gruppe K/3**)
- 7 Tages-Tiere (**Gruppe K/7**)
- 28 Tages-Tiere (**Gruppe K/28**)

III. **Nativ-Tiere** (n = 8): völlig unbehandelt euthanasierte Tiere, die die physiologischen Referenzwerte liefern.

Im Folgenden soll ein schematischer Überblick über die einzelnen Abschnitte der operativen Phase des Versuchs gegeben werden:

1. Präparation

Dauer ca. 90 Minuten

Sedation und Intubation des Versuchstieres, Einleiten der Anästhesie mit Isofluran, Katheterisierung der Gefäße, Applikation der Messsonden

2. Äquilibration

Dauer 52 Minuten

Tiere beider Versuchsgruppen: Anästhesie durch Fentanyl und N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> im Verhältnis 2:1, Applikation von 0,8 ml/h des nicht depolarisierenden Muskelrelaxans Rocuronium

Die Tiere der Dexmedetomidin-Gruppe erhalten zusätzlich 30 Minuten vor Ischämiebeginn einen einmaligen Bolus von 0,04 mg Dexmedetomidin i.p.

3. Blutentzug

Dauer 8 Minuten

Gleichmäßiger Blutentzug zur hämorrhagischen Hypotension

4. Ischämie

Dauer 45 Minuten

Phase der Hypotension (MAP bei 40mmHg) und Verschluss der rechten *A. carotis communis*

### 5. Reinfusion

Dauer 15 Minuten

Reinfusion des entzogenen Blutes und Reperfusion des Gehirns

### 6. Erholung

Dauer 45 Minuten

Nach Wundverschluss und Versorgung mit Analgetika kontrollierte Entwöhnung von der Beatmung

### 7. Aufwachen

Zurücksetzen der wachen Tiere in ihren Käfig

Je nach Überlebensdauer erfolgt die Euthanasie der Tiere nach 1, 3, 7 oder 28 Tagen. Anschließend werden die entnommenen Gehirne tief gefroren, geschnitten und mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbung und Western-Blot-Analyse auf Apoptose-assoziierte Proteine untersucht.

Um potentielle gehirnprotektive Auswirkungen von Dexmedetomidin nachzuweisen, vergleichen wir die Ergebnisse dieser Versuchsgruppe mit denen der Kontroll-Gruppe. Der zeitliche Verlauf der Ischämie und deren Folgen auf das Gehirn werden durch Gegenüberstellen gleicher Überlebenszeiten in der Dexmedetomidin- und Kontroll-Gruppe analysiert.

## **3.2.3 Operative Phase**

### **3.2.3.1 Narkose und maschinelle Beatmung**

In einem geschlossenen Glaszylinder wird die Ratte mit in Halothan (Halothan, Hoechst AG, Frankfurt am Main) getränkten Zellstoff bis zur Bewusstlosigkeit (circa 30 bis 50 Sekunden) anästhesiert. Es folgt die Intubation der Ratte unter Sichtkontrolle mit einem speziell von STEIGENBERGER konstruierten Laryngoskop. Als Tubus dient ein abgestumpfter 18G Herzkatheter (Cavafix Certo 358, Braun, Melsungen).

Die Aufrechterhaltung der Narkose während des gesamten operativen Teils erfolgt kontrolliert mit Hilfe einer volumengesteuerten Beatmungspumpe (Harvard Rodent Ventilator, Model 683, Harvard Apparatus Inc., South Nantick, Massachusetts, USA). Als Anästhetikum während der Präparationsphase wird eine Sauerstoff/Lachgasmischung im Verhältnis 1:2 zusammen mit 2 % Isofluran (Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden) verwendet.

Die durch einen Atemgasmonitor (Capnomac, Datex, Helsinki, Finnland) überwachte endexpiratorische Gaskonzentrationen von CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O und Isofluran hält man durch die Regulation der Beatmungsfrequenz bei konstanten Werten zwischen 38 und 42 mmHg.

Das verwendete Narkosesystem ist ein halboffenes System ohne Rückatmung mit einer konstanten Frischluftzufuhr von mindestens 2 l/min und einer Gasabsaugung.

### 3.2.3.2 Operationsvorbereitung und Präparation der Gefäßzugänge

Zur Vorbereitung der Präparationsstellen an der rechten Halsseite, der rechten Inguinalgegend und am Kopf legt man die Ratte auf den Rücken und fixiert sie in dieser Position. Die Präparationsstellen werden rasiert und desinfiziert. Zum Schutz vor Austrocknung werden die Augen der Ratte mit Augensalbe (Bepanthen, Roche, Mannheim) und Gaze abgedeckt. Zur Vermeidung von Thrombodisierungen erfolgt vor Operationsbeginn das Spülen sämtlicher zur Verwendung vorgesehener Katheter mit heparinierter (Liquemin N 25000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) Vollelektrolytlösung (Sterofundin, Braun AG, Melsungen).

Zur Katheterisierung der *A. femoralis* und *V. femoralis* wird in der rechten Inguinalgegend die Haut etwa 1cm weit eröffnet und stumpf durch das subkutane Fettgewebe in die Tiefe präpariert. Das im Leistenspalt liegende Gefäßpaket enthält von kaudal betrachtet die *V. femoralis*, die *A. femoralis* und den *N. femoralis*. Unter Schonung des *N. femoralis* trennt man die Gefäße von Faszen und Bindegeweben und stellt sie voneinander isoliert dar.

Die *A. femoralis* wird zur invasiven Blutdruckmessung (Cardicap II, Datex, Helsinki, Finnland) und zur arteriellen Blutentnahme für Blutgas- und Blutglukosebestimmung mit einem Katheter versehen.

In die *V. femoralis* wird ebenfalls ein Katheter eingeführt, welcher später dem Blutentzug zur hämorrhagischen Hypotension als Teil der zerebralen Ischämie dient. Auch die Reinfusion des entnommenen Blutes wird durch diesen Katheter vorgenommen.

Die Präparation der rechten *V. jugularis* und *A. carotis communis* erfolgt an der rechten Halsseite paramedian kaudoventral.

Die *V. jugularis* wird im *Sulcus jugularis* aufgesucht, freipräpariert und mit zwei Kathetern zur Applikation von Medikamenten (Fentanyl, Rocuronium, Natriumbicarbonat) versehen. Blutungen werden durch Abdichtung des Gefäßes mit Tabotamp (Ethicon, Norderstedt) vermieden.

Die *A. carotis communis*, die in der Tiefe ventrolateral der Trachea liegt, wird vorsichtig vom *Truncus vagosympaticus* gelöst und mit einem Gummiband umschlungen, um später das

Gefäß leicht vorlagern zu können. Der temporäre Verschluss des Gefäßes erfolgt mit einem Gefäß-Mikrochip.

### 3.2.3.3 Präparation und Installation der Messgeräte

Um einen konstanten Versuchsablauf zu gewährleisten, wird eine Reihe von physiologischen Messdaten erhoben und kontrolliert.

An der *A. femoralis* werden sowohl Blutentnahmen zur weiteren Analyse, als auch die Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks durchgeführt. Zur Erhebung intraoperativer physiologischer Parameter werden periphere und perikranielle Temperatur gemessen sowie ein Elektrokardio- und Elektroenzephalogramm erstellt. Zusätzlich wird die lokale kortikale Gehirndurchblutung mittels Laser-Doppler-Flussmessung registriert.

Die Installation einer Sonde (Hypodermic needle probe, Omega Technologies Co, Stanford CT, USA) zur Messung der perikraniellen Temperatur erfolgt knochenah im rechten *M. temporalis*. Diese Sonde ist mit einer Rotlichtlampe, die direkt über dem Tier hängt, gekoppelt, so dass bei einem Temperaturabfall unter die physiologische Körpertemperatur von 37,4 °C ein Kontrollgerät (Omega Technologies Co, Stanford CT, USA) die Wärmelampe einschaltet und so die Körpertemperatur konstant gehalten wird.

Die Körpertemperatur wird über ein in das Rektum eingeführtes Thermometer bestimmt und dokumentiert.

Zur Ableitung eines Elektrokardiogramms (EKG) (Cardiocap II, Datex, Helsinki, Finnland) werden in der Thoraxmitte beidseits vom Brustbein in einem ungefähren Abstand von 2 cm zwei Nadelelektroden subkutan angebracht. Mit Hilfe des EKG wird zusätzlich die Herzfrequenz bestimmt.

Das Elektroenzephalogramm (EEG) (Oscilloscope, Hameg 20 MHz, HM205-3, Frankfurt am Main) wird über zwei Sonden abgeleitet, die auf jeder Kopfseite circa 2 mm lateral des kaudalen Augenwinkels senkrecht zur Haut so weit eingestochen werden, bis Kontakt zum Knochen besteht. Zwei weitere Nadelelektroden werden auf gleiche Weise beidseits kranial der Ohrbasis platziert. Eine Erdungselektrode in der Schwanzwurzel ermöglicht die störungsfreie Ableitung des EEG der beiden Hirnhälften. Mit Hilfe von EKG und EEG kann die Narkosetiefe und die physiologische Hirntätigkeit überwacht werden.

Die Präparation für die Laser-Doppler-Flussmessung (Laser-Doppler Periflux 4001 Master, Perimed, Järfälla, Schweden) erfordert das Freilegen des Schädeldachs. Nach Entfernen von Haut und Periost wird das Schädeldach beidseits der *sutura sagittalis* mit einem

Diamantbohrer flächig abgefräst. Das Schädeldach darf hierbei nicht penetriert werden. Die Messsonden, deren Reichweite maximal 1mm beträgt, können nun ausreichend nahe am Gehirn platziert und mit Hilfe des stereotaktischen Rahmens fixiert werden.

Eine durch CO<sub>2</sub>-Provokation induzierte Vasokonstriktion im Gehirn wird der korrekte Sitz der Sonden überprüft. Dazu hyperventiliert man nach Verringerung der Isoflurankonzentration auf 1 % die Ratte kurzzeitig. Ein Abfall der CO<sub>2</sub>-Konzentration im Blut induziert durch Kontraktion der Gefäße eine Verminderung der Durchblutung im Gehirn. Nur bei einem Absinken der Durchblutung um mindestens 10% in kurzer Zeit kann von einem positiven Testergebnis ausgegangen werden, d.h. es liegt eine korrekte Positionierung der Sonden vor, die die Durchblutung des Gehirnes und nicht des Knochens oder anderer großer Gefäße messen.

#### 3.2.3.4 Äquilibration

Ist die Präparation abgeschlossen, wird die Narkose auf Fentanyl i.v. und Sauerstoff/Lachgas (1:2) umgestellt. Nach Applikation eines initialen Bolus von 10µg/kg Fentanyl (Fentanyl 0,1 mg, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) pro Tier über die rechte *V. jugularis* erfolgt eine Dauerinfusion i.v. per Infusor mit 25 µg/kg/h Fentanyl. Zur Muskelrelaxation wird über den Katheter der *V. jugularis* mit einem Infusomat 50 mg/ml Rocuroniumbromid (Esmeron®, Organon, Oss, Niederlande) in einer Dosierung von 0,8 ml/Tier/h verabreicht

Die Tiere der Dexmedetomidin-Gruppe erhalten zusätzlich 30 Minuten vor Beginn der Ischämie eine einmalige Applikation von 1 ml Dexmedetomidinlösung (Kennan Marsh, Abbott Laboratories, North Chicago, USA) intraperitoneal in einer Konzentration von 0,04 mg/ml.

(Die Äquilierungsphase dient der Gewöhnung des Körpers an die Auswirkungen der Narkose und zur Stabilisierung des Kreislaufs. Damit werden nahezu gleich bleibende Ausgangsbedingungen zwischen den einzelnen Individuen geschaffen.)

Am Ende der 52minütigen Äquilierungsphase werden die präischämischen Messparameter erhoben, die als Ausgangswert (AW) dienen.

#### 3.2.3.5 Blutentzug

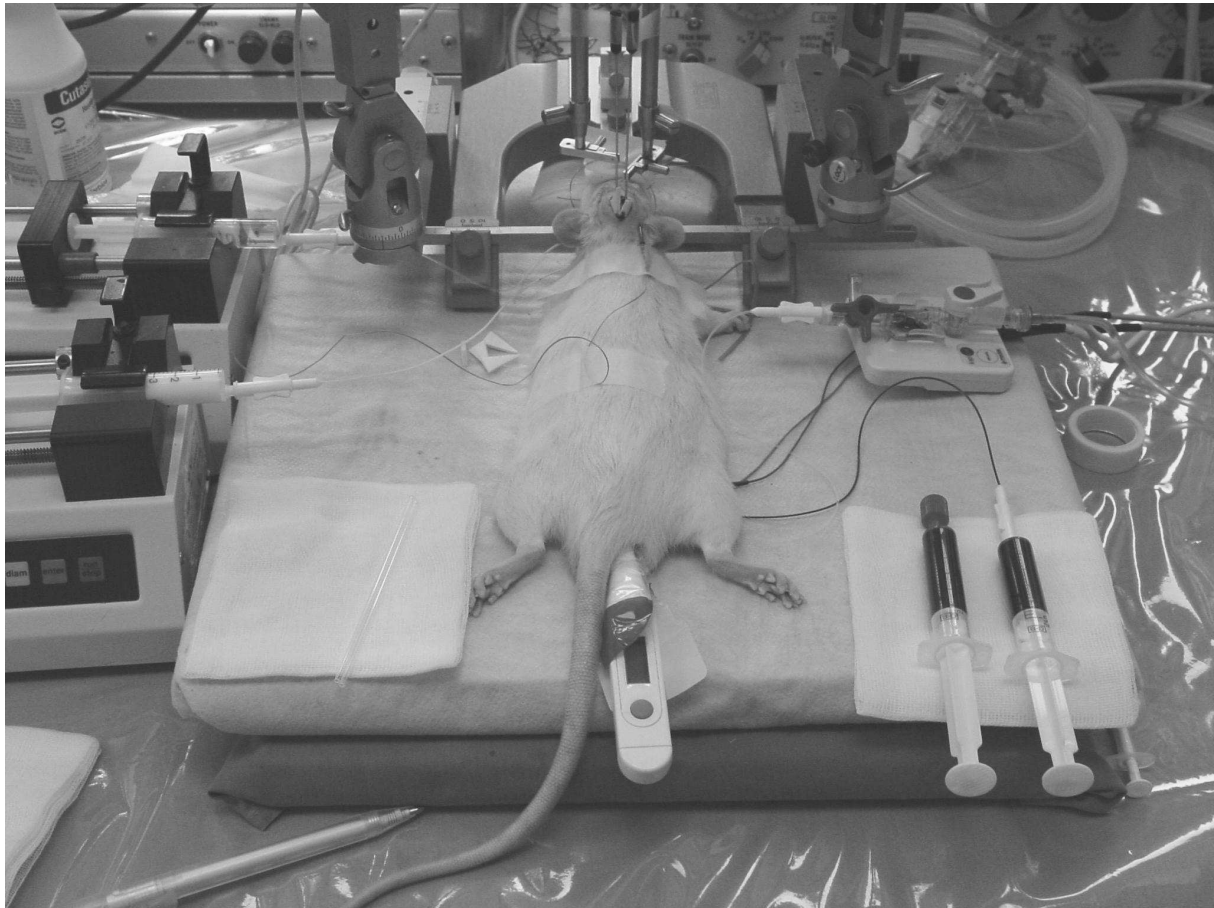
In der Hypoperfusionsphase wird innerhalb von 8 Minuten über den Katheter der *V. femoralis* langsam und konstant soviel Blut entzogen, dass der MAP auf 40 mmHg abfällt. Die

entzogene Blutmenge entspricht hierbei je nach Gewicht und Konstitution der Ratte einem Volumen zwischen 7 und 12 ml. Bis zur Reinfusion wird das entnommene Blut in einer heparinisierten Spritze geschwenkt und in der Hand gewärmt.

Gleichzeitig zur Hypoperfusion wird die Muskelrelaxansgabe unterbrochen und 8,4 % Natriumbikarbonat (Delta-Pharma GmbH, Pfullingen) appliziert. In einer Dosierung von 1,4 ml/Tier/h wird damit durch Ausgleich des Säure-Basen-Haushalts einer Azidose vorgebeugt.

#### 3.2.3.6 Ischämie

Nach Erreichen eines MAP von 40 mmHg wird mit einem Gefäßclip die rechte *A. carotis communis* temporär verschlossen. Die bereits bestehende Hypoperfusion des gesamten Gehirns verstärkt sich dadurch in der rechten Hemisphäre. Während der Ischämie wird der MAP durch kontrollierten Blutentzug bzw. Blutzufuhr bei 40 mmHg konstant gehalten. Die Ischämie endet nach 45 Minuten mit Entfernung des Gefäßclips und erneuter Erhebung der Messparameter (**Isch 45**).



**Abbildung 7: Versuchstier nach Installation aller Sonden und Gefäßzugänge im stereotaktischen Rahmen.**

#### 3.2.3.7 Reinfusion

Das entnommene Blut wird nach Entfernung des Clips gleichmäßig und langsam innerhalb von 15 Minuten reinfundiert, es kommt zur Reperfusion des Gehirns.

Am Ende der Reinfusionsphase werden nochmals Blut zur Analyse entnommen und alle weiteren Messparameter dokumentiert (**15 Rep**).

#### 3.2.3.8 Erholung

Im letzten Abschnitt der 45minütigen Erholungsphase, die zur Kreislaufstabilisierung notwendig ist, werden vor Entfernung aller Sonden und Katheter ein letztes Mal physiologische Parameter gemessen (**45 Erh**). Die Präparationsstellen werden nach Unterspritzen mit dem langwirksamen Lokalanästhetikum Bupivacainhydrochlorid (Bucain® 0,5 %) mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (4/0 Prolene, Ethicon, Brüssel, Belgien)



chirurgisch verschlossen. Zuletzt erhält das Tier als Flüssigkeitsdepot 10 ml einer angewärmten Vollelektrolytlösung (Thomaejonin ®) subkutan.

Nach Ausleiten der Narkose wird die Ratte mit Sauerstoff und Luft beatmet, bis die Spontanatmung wieder einsetzt. Von der Extubation mit Rückkehr der Reflexe bis zum Aufwachen wird das Tier sorgfältig überwacht und anschließend in seinen Heimkäfig umgesetzt.

**Tabelle 2: Definierte Messzeitpunkte und physiologischen Parameter intraoperativ**

<b>MESSZEITPUNKT</b>	Ausgangswert (AW)	45 min in der Ischämie (45 Isch)	15 min nach Beginn der Reperfusion (15 Rep)	45 min in der Erholungsphase (45 Erh)
<b>MESSPARAMETER</b>	MAP; HF; EEG LDF li und LDF re (Laser-Doppler-Flussmessung) Rektale und perikranielle Temperatur paO <sub>2</sub> ; pa CO <sub>2</sub> Base Excess; pH-Wert Gesamthämoglobin; Blutglukose			

**Tabelle 3: Physiologische Messparameter während des operativen Teils**

BEZEICHNUNG	PARAMETER	ORT DER MESSUNG
Mittlerer arterieller Blutdruck	MAP (mmHg)	A. femoralis
Arterieller Sauerstoffpartialdruck	PaO <sub>2</sub> (mmHg)	
Arterieller Kohlendioxidpartialdruck	PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	
Basenexzess	BE	
Blut-pH-Wert	pH (-logH <sup>+</sup> )	
Blutglukose	Glu (mg/dl)	
Temperatur perikraniell	T <sub>peric</sub> (°C)	M. temporalis
Gesamthämoglobin	tHb (mg%)	A. femoralis
Temperatur peripher	T <sub>per</sub> (°C)	Rektum
Herzfrequenz	Hfq (1/min)	EKG

Dem operativen Teil folgt eine unterschiedlich lange Überlebensphase, während der die Tiere unter gleichen Bedingungen wie präoperativ in Einzelkäfigen gehalten werden. Die Tötung, je nach Gruppenzugehörigkeit nach 1, 3, 7 oder 28 Tagen, erfolgt unter tiefer Halothannarkose durch Dekapitierung.

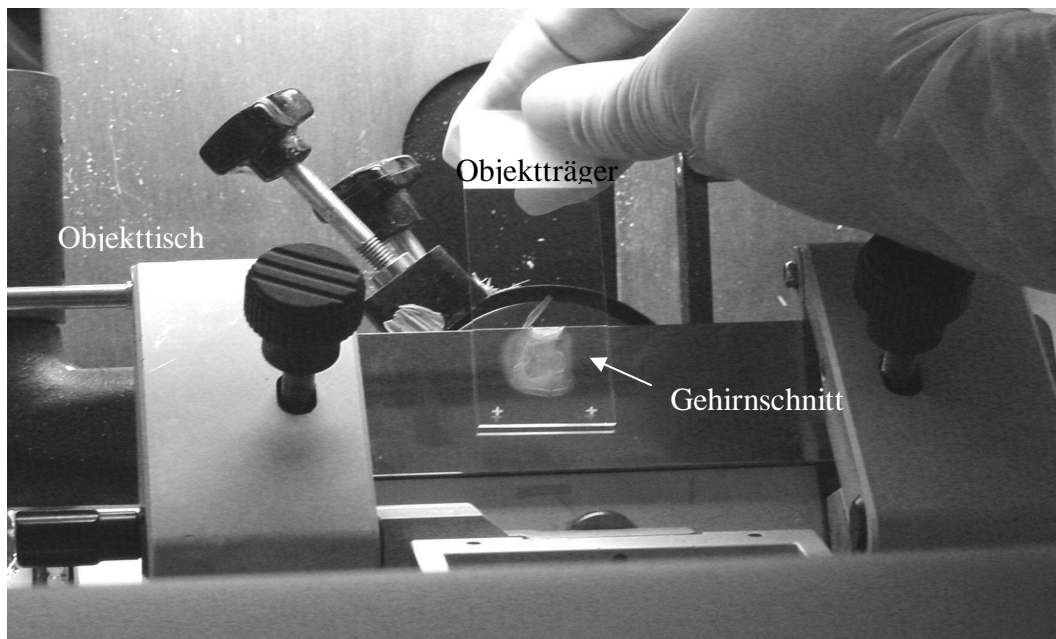
### 3.2.4 Entnahme und Verarbeitung des Gehirns

Die Schädelkalotte des dekapitierten Tiers wird von Haut und Muskulatur befreit und anschließend die Schädeldecke vorsichtig mit einer Hohlmeißelzange entfernt. Um das Hirn aus der Schädelkapsel herauszulösen, werden kranial und basal gelegene Gehirnnerven

durchtrennt. Von dem entnommenen Gehirn wird kaudal das Kleinhirn abgetrennt und rostral und kaudal ungefähr 1 mm dicke Scheiben vom Großhirn entfernt. In einem mit Einfriermedium (Tissue Freezing Medium, Jung, Leica Instruments, Nussloch) gefüllten Aluminiumzylinder wird das Gehirn mit auf Trockeneis stehendem Methylbutan durchgefroren. Nach Beschriftung kann das so vorbereitete Gehirn bis zur weiteren Verarbeitung bei -70 °C aufbewahrt werden.

Zur Anfertigung von histologischen Schnitten für die Immunfluoreszenz-Färbung wird das Gehirn nach Entnahme aus der Tiefkühlung von Aluminium und Einfriermedium vollständig befreit. Bei einer Kammertemperatur von -24 °C des Kryotoms (Microtom-Kryostat, HM 500 OM, Microm GmbH, Walldorf) wird das Gehirn auf den Objektisch aufgefroren und zunächst Probeschnitte angefertigt. Dabei überprüft man die Ausrichtung des Hirns zum Schneidemesser, so dass exakt die Schnittebene Bregma (Schnittpunkt der *sutura coronalis* und *sagittalis*) -2,3 mm getroffen wird. Ist die Schnittebene erreicht, werden 60 Schnitte von 7 µm Dicke angefertigt, von denen jeweils zwei auf einen Objektträger (Objektträger SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgetragen werden, der auf -18 °C bis -24 °C abgekühlt ist.

Das übrige Gewebe wird für die Western-Blot-Analyse weiter zerkleinert und aufbereitet.



**Abbildung 8: Objektträger im Kryotom mit Gewebsschnitt.**

### 3.2.5 Untersuchung und Auswertung der Proben

Eine Auflistung aller im folgenden analytischen Versuchsabschnitt verwendeten Geräte, Materialien, Chemikalien und Antikörper ist im Kapitel 3.2.6 zusammengefasst.

#### 3.2.5.1 Immunfluoreszenz-Färbung

In der Immunfluoreszenz-Färbung werden alle Gewebsschnitte nach folgendem Schema mit fluoreszierenden polyklonalen Antikörper markiert, mit Hilfe eines konfokalen Laserscan-Mikroskops aufgenommen und anschließend durch spezielle Software ausgewertet:

Schema der Immunfluoreszenz-Färbung:

<u>1. Fixieren:</u> in 100 % Ethanol, alle Objektträger	10 Minuten
<u>2. Waschen:</u> in PBST, alle Objektträger	30 Minuten
<u>3. Blockieren:</u> in 10 % FKS, alle Objektträger	60 Minuten
<u>4. Inkubation mit 1. Antikörper:</u> mit dem jeweiligen 1. Antikörper, nicht Negativkontrollen	60 Minuten
<u>5. Waschen:</u> in PBST, nicht Negativkontrollen	40 Minuten

#### **Lichtexposition vermeiden**

<u>6. Inkubation mit 2. Antikörper:</u> mit dem 2. Antikörper, alle Objektträger	60 Minuten
<u>7. Waschen:</u> in PBST, alle Objektträger	40 Minuten
<u>8. Konservieren:</u> mit Mounting Medium und Klarlack, alle Objektträger	

Die Färbung erfolgt dabei streng nach Protokoll, sodass für alle Färbevorgänge von gleichen Bedingungen ausgegangen werden kann.

Für jeden Antikörper werden jeweils zwei Objektträger mit je zwei Gewebeschnitten eines Tieres gefärbt, so dass pro Tier und Antikörper vier Gehirnschnitte ausgewertet werden können. Dabei werden jeweils ein Objektträger aus einer kaudal liegenden, sowie ein zweiter Objektträger aus einer weiter rostral liegenden Position des Hippokampus verwendet. Zur Überprüfung der Färbung werden bei jedem Durchgang Positiv- und Negativkontrollen angefertigt. Ein Vergleich der Fluoreszenz zwischen Negativ- und Positivkontrollen untereinander sowie zu den Versuchstierproben dienen dem Nachweis eventueller Fehler eines Färbedurchgangs, sowie dem Erkennen eines Qualitätsverlustes der verwendeten Materialien und Antikörper und führen zu Ausschluss und Wiederholung des fehlerhaften Durchgangs.

#### Färben der Gehirnschnitte

Die Objektträger werden vor Beginn des Färbedurchgangs unmittelbar nach Entnahme aus dem -70 °C-Tiefkühlschrank mit einem nicht abwaschbaren Stift beschriftet (Nummer des Tieres, Antikörper, Position des Gehirnschnittes), in zwei mit 100 % Ethanol gefüllten Standküvetten verteilt und bei Raumtemperatur 10 Minuten auf einer Schüttelmaschine fixiert. Die Fixierung erfolgt durch Austrocknung.

Nach oben angegebenem Schema werden die Schnitte nun mehrmals in einer Lösung aus gepuffertem Natriumphosphat mit Tween (PBST) gewaschen und anschließend zur Blockierung unspezifischer Bindungen mit 10 % fetalem Kälberserum (10 % FKS) für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Zur optimalen Einwirkung des 10 % FKS werden hierzu alle Objektträger einzeln aus dem PBST entnommen, gründlich abgeschüttelt, vorsichtig, ohne den Gewebeschnitt zu beschädigen, an den Rändern abgetrocknet und mit einem Fettstift (PAP-Pen) umrandet. Anschließend werden 500 µl 10 %iges FKS direkt auf die Objektträgeroberfläche pipettiert. Das 10 % ige FKS wird tiefgekühlt aufbewahrt und während der Verarbeitung bis zum Aufbringen auf die Objektträger auf Eis gelagert.

Analog dieser Arbeitstechnik werden die Gewebsschnitte nun nach Schema mit dem 1. und 2. Antikörper inkubiert und zwischenzeitlich mehrfach gewaschen.

Das Herstellen der Antikörper-Suspensionen erfolgt während der Blockierung. Hierzu werden die 2 ml-Originalverpackungen von Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge 4 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert, um Verunreinigungen im

Bodensatz zu binden. Transport und Bearbeitung der Antikörper findet stets auf Eis statt, gelagert werden sie bei 4 °C im Kühlschrank. Für jeden Antikörper wird eine Suspension aus 10 % FKS und dem jeweiligen Antikörper hergestellt. Dabei werden folgende Verdünnungen benutzt:

Bax:	1:80
P53:	1:80
Bcl-2:	1:60
Mdm-2:	1:60

Diese Mischverhältnisse wurden vor Beginn des Versuches experimentell ermittelt und stellen die Konzentration der Antikörper da, bei der maximale Fluoreszenz mit minimaler Hintergrundfärbung eine optimale Auswertung gewährleistet.

Während die Suspensionen von Bcl-2, p53 und Mdm-2 aus jeweils einem Antikörper und 10 % FKS bestehen, werden bei Bax zwei verwandte Antikörper (Bax P-19 und Bax I-19) zu gleichen Teilen in 10 % FKS verwendet. Auch dieses Verhältnis wurde als optimale Verdünnung experimentell ermittelt.

Die Herstellung und Verwendung der 2. Antikörper-Suspension erfolgt auf Eis und im abgedunkelten Raum und unter strengem Lichtschutz, da sie den Fluoreszenzfarbstoff enthält und damit lichtempfindlich ist. Die Verdünnung des 2. Antikörpers mit 10 % FKS beträgt 1:800. Die Negativkontrollen, die bis zu diesem Zeitpunkt mit Blockiermedium bestückt sind, werden gründlich abgeschüttelt und ohne Waschen ebenfalls mit dem 2. Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation mit dem 2. Antikörper werden alle Objektträger ausschließlich unter Lichtschutz weiter behandelt und transportiert. Zur Konservierung und Transportsicherung bestückt man die Objektträger mit Deckgläsern, unter denen ein Tropfen Mounting Medium den Verlust der Fluoreszenz-Intensität minimieren soll. Zum Schutz vor Austrocknung werden die Ränder der Deckgläser mit Klarlack umfahren.



**Abbildung 9: Feuchte Kammer bestückt mit Objektträgern.**

#### Aufnahme mit dem konfokalen Laserscan Mikroskop

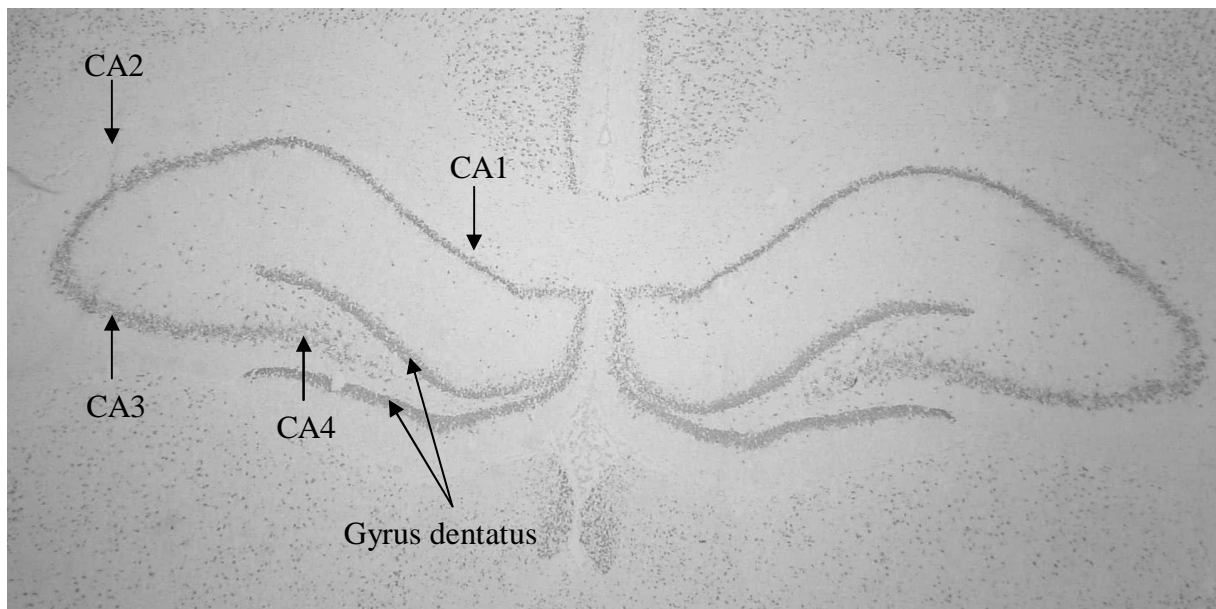
Die Aufnahmen der Gewebeschnitte werden innerhalb von maximal 24 Stunden an einem konfokalen Laserscan Mikroskop (CLSM) in der Arbeitsgruppe von Dr. P. Hutzler, Institut für Pathologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg angefertigt.

Qualität und Auswertbarkeit des Färbedurchgangs wird zuerst anhand der Positiv- und Negativkontrollen beurteilt. Nur bei einwandfreier Färbung der Kontrollen werden die Proben ausgewertet, andernfalls verworfen und die Färbung wiederholt. Die Kontrollen werden ebenfalls archiviert. Nach Aktivieren und vollständigem circa 30minütigen Aufwärmen des Lasers (Argon 488 nm Wellenlänge, max. Power 25,0 mW) wird die Laserleistung direkt anhand eines Powermeters und indirekt mit Hilfe sog. „Beads“ überprüft, um konstante Laserleistung und somit vergleichbare Fluoreszenzemissionen zu erhalten

Die Aufnahme der Gewebsschnitte erfolgt durch einen Fluoreszenzfilter (FITC) und ein spezielles Objektiv (Plan-Neofluar 20x/0,5 Ph2).

Unter der Fluoreszenzlampe wird von den jeweils zwei zur Verfügung stehenden Gehirnschnitten eines Objektträgers der qualitativ bessere (ohne Artefakte) ausgewählt und ausgewertet. Von jedem Tier stehen pro Antikörper vier Gehirnschnitte für die Begutachtung zur Verfügung, von denen die beiden qualitativ hochwertigeren je Objektträger ausgewählt werden. Man scannt nun in beiden Gehirnhälften im Bereich des Hippokampus jeweils zwei Aufnahmen aus den CA1- und CA-3 Regionen und dem unteren Ast des Gyrus dentatus.

Vor jeder Aufnahme wird mit Hilfe des sog. *Fast Scan* die optimale Schärfe, d.h. die richtige Schnittebene eingestellt, bevor im sog. *Single Scan* ein Einzelbild mit maximaler Auflösung erstellt und gespeichert wird. Beim Vorgang des *Fast Scans* muss ein häufiges Wiederholen vermieden werden, da die Lichtexposition jedes Scan-Durchlaufs die Fluoreszenzintensität der Antikörper mindert.



**Abbildung 10: Darstellung des Hippokampus und seiner Regionen CA1, CA2, CA3, CA4 und Gyrus dentatus (NeuN-DAB-Färbung) (Vergr.: 25 fach).**

Die Aufnahmen werden mit Hilfe der Software LSM 510 (Zeiss, Jena) gespeichert und anschließend mit dem Computerprogramm KS RUN (Zeiss, Jena) ausgewertet. Dabei wird eine Maske um die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen gelegt. Die Intensität der Fluoreszenz im Durchschnitt wird relativ zur Fläche innerhalb der Maske berechnet und die unspezifische Hintergrundfluoreszenz abgezogen.

Die vier (je zwei Gehirnschnitte mit je zwei Aufnahmen pro Region) errechneten Werte werden gemittelt. Dieser Wert ist der Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität pro Fläche und geht in die statistische Auswertung ein.



### 3.2.5.2 Western-Blot-Analyse

Durch die Western-Blot-Analyse wird das Protein-Gemisch (=Antigen) der Probe mit Polyacrylamidgelelektrophorese in Banden verschiedener Molekulargewichte aufgetrennt. Ein Transfer auf eine Membran macht die Antigen-Banden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern sichtbar.

#### Aufbereiten der Proben

Die Teile des Hippokampus, die nach dem Kryoschnitt für die Immunhistochemie zur Verfügung stehen, werden für die Western-Blot-Analyse standardisiert aufbereitet. Dazu werden sie weiter zerkleinert, lysiert, in ihrem Proteingehalt an einen vorgegebenen Standard angeglichen und konserviert.

Aus 1 mm dicken Querscheiben des Gehirns wird der Hippokampus der jeweiligen Hemisphäre herauspräpariert und das Gewebe jeder Seite getrennt in einem Eppendorfgefäß homogenisiert. Mit einer Kugelmühle werden aus zwölf kleinen Kugeln, sog. „Beads“, Lysispuffer und dem Probenmaterial ein Lysat erstellt, das anschließend 10 Minuten mit 13000 U/min zentrifugiert wird. Aus dem Überstand pipettiert man 220 µl und verdünnt diese mit 440 µl PBS im Verhältnis 1:2. Das Gewebelysat wird nun einer Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) unterzogen, da für eine semi-quantitative Auswertung mittels Western-Blot-Analyse der Gesamtproteingehalt aller Proben gleich sein muss.

Nach Erstellen einer Proteinstandardkurve (bovines Serum-Albumin (BSA) in den Konzentrationen von 50, 100, 200, 500, 1000 und 2000 µg/ml in PBS) werden 1000 µl Bradfordreagenz mit jeweils 5 µl des Gewebelysats bzw. der BSA-Verdünnungsreihe vermischt und deren Extinktion innerhalb einer Stunde mit einem Spektrophometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Dabei dienen die Werte der BSA-Kurve mit bekannten Proteingehalten als Standardkurve, an der die Absorptionsmaxima der Gewebelysate ermittelt werden können.

Alle Messungen erfolgen durch Doppelbestimmung, bei Abweichungen von mehr als 20 % wird die gesamte Messung wiederholt.

Das Grundprinzip der hier angewendeten Methode nach BRADFORD (1976) beruht auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bradfordreagenz) bei der Bindung an ein Protein von 465 nm auf 595 nm verschiebt.

Die Herstellung der Lysate und Reagenzien erfolgt durchwegs gekühlt, bzw. auf Eis.

Nach Errechnen der Proteinkonzentration der Gewebslysate werden diese an ein gewünschtes Endvolumen von 700 µl angeglichen (Verdünnung mit PBS im Verhältnis 2:1), mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:3 vermischt und bei 95 °C für 5 Minuten in einem Schüttelinkubator denaturiert. Damit sind die nun fertigen Proben bei maximal 8 °C bis zu einem Jahr auswertbar.

### Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das hier angewandte System nach LÄMMLI (1970) ist eine diskontinuierliche Gelelektrophorese in Vertikalgelen, die in ihrem Polyacrylamid-Anteil der Größe und dem Molekulargewicht der gesuchten Proteine angepasst sind. Je kleiner das gesuchte Protein, desto engmaschiger, d.h. mit höherem Polyacrylamid-Anteil muss das Trenngel sein.

Molekulargewichte und verwendetes Trenngel:

- Bax:	21 kD	15 % Polyacrylamid-Anteil
- p53 :	53 kD	10 % Polyacrylamid-Anteil
- Bcl-2:	26 kD	15 % Polyacrylamid-Anteil
- Mdm-2:	90 kD	7 % Polyacrylamid-Anteil

Zwischen zwei vertikale Glasplatten, die in Gelkammern im Abstand von 1,5 mm montiert sind, werden die jeweiligen Trenngele zu zwei Dritteln aufgegossen. Das letzte Drittel wird nach vollständigem Auspolymerisieren der Trenngele mit einem 5%igen Sammelgel aufgefüllt. Dieses dient zur Konzentration der Proteine und bildet durch in das Gel eingelegte Kämme 12 Taschen für das Einfüllen des Probenmaterials. Nach Lagerung von mindestens 24 Stunden in feuchter und kühler Umgebung sind die Gele vollständig auspolymerisiert und können mit den Proben befüllt werden (WESTERMEIER 1997).

Die Probenmenge zwischen 20 µl und 40 µl, die in eine Tasche pipettiert wird, errechnet sich aus der vorher bestimmten Gesamtproteinkonzentration und enthält eine Menge von exakt 20 µg Gesamtprotein.

In jedem Gel werden neben den Proben drei Taschen mit einem sog. „Standard“ befüllt. Dies ist die Gehirnprobe eines Nativ-Tieres (völlig unbehandelt euthanasiert), die nach dem gleichen Verfahren wie die zu untersuchende Proben hergestellt, aliquotiert und tiefgefroren wird.

Für jede Western-Blot-Analyse wird ein „Standard“ frisch aufgetaut und dient bei der Auswertung als konstanter Vergleichsparameter der einzelnen Analysen zueinander.

Zusätzlich wird eine Tasche mit einem Rainbow-Marker als Größenstandard befüllt. Der Rainbow-Marker wird 1:2 mit SDS-Probenpuffer verdünnt.

In der Elektrophorese-Kammer werden die Gele bei konstanter Spannung von 220 Volt und Gleichstrom für circa 3,5 Stunden angeschlossen. Mit Hilfe eines SDS-Laufpuffers, der sich in Kammern über und unter dem Gel befindet, wandern die Proteine durch das Gel und werden nun ihrer Größe entsprechend aufgetrennt.

### Elektrotransfer von Proteinen

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine im Gel werden nach dem „Semi-dry“-Verfahren auf eine Polyvinyliden-Fluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert. Unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems wird das Trenngel nach Abtrennen des Sammelgels für zwei Stunden bei einer Spannung von 16-18 Volt und einer angelegten Stromstärke von 1,0 mA/cm<sup>2</sup> Geloberfläche geblottet.

Der „Semi-dry“-Blot ist folgendermaßen aufgebaut:

Transfergerät Kathode (-)

6 Whatmann 3 MM Filterpapiere, getränkt in Kathodenpuffer

Polyacrylamidgel mit aufgetrennten Proteinen

PVDF-Membran, getränkt in 100 % Ethanol

2 Whatmann 3 MM Filterpapiere, getränkt in Anodenpuffer II

4 Whatmann 3 MM Filterpapiere, getränkt in Anodenpuffer I

Transfergerät Anode (+)

Sämtliche Papiere, die Membran und das Gel müssen dabei exakt gleich groß sein, um Spannungsverluste außerhalb des „Blot-Stapels“ zu vermeiden. Luftblasen werden sorgfältig ausgestrichen, damit keine „Blot-Löcher“ entstehen.



**Abbildung 11: Blotkammer bestückt mit „Blot-Stapel“ aus Filterpapieren, Gel und PVDF-Membran**

### Immunoblot

Die Proteine, die sich nun auf der PVDF-Membran befinden, werden durch Bindung mit Antikörpern markiert und anschließend durch enzymatische Farbreaktionen sichtbar gemacht.

#### Blockierung:

Nach Entnahme aus den Transfergeräten werden die PVDF-Membranen einzeln 30 Minuten in PBST gewaschen. Hierbei wird das PBST einige Male gewechselt, um letzte Reste der Pufferlösungen zu entfernen.

Um unspezifische Bindungen der Proteine zu blockieren, werden die Membranen der Bax- und p53-Antikörper mit 40 ml Milchpulver in PBST (10 %), die von Bcl-2 und Mdm-2 mit 40 ml FKS in PBST (10 %) inkubiert. Die Blockierung erfolgt auf dem Schüttler bei Raumtemperatur mindesten für 90 Minuten oder unter Kühlung über Nacht.

## 1. Antikörper:

Die Membranen werden anschließend mit dem jeweiligen spezifischen 1. Antikörper inkubiert. Aus den zentrifugierten Antikörper-Lösungen werden folgende Suspensionen im Verhältnis 1:200 hergestellt:

Bax:	50 $\mu$ l (P-19, polyklonal, rabbit) in 10 ml FKS in PBST (10 %)
P53:	50 $\mu$ l (DO-1, monoklonal, mouse) in 10 ml FKS in PBST (10 %)
Bcl-2:	50 $\mu$ l (C-2, monoklonal, mouse) in 10 ml Milchpulver in PBST (10 %)
Mdm-2:	50 $\mu$ l (C-2, polyklonal, rabbit) in 10 ml Milchpulver in PBST (10 %)

Die Membranen werden mit der jeweiligen Antikörper-Suspension blasenfrei in eine Plastiktüte eingeschweißt und auf dem Schüttler bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert.

Danach nicht gebundener Antikörper wird während 45minütigem Waschen in PBST (PBST mehrfach wechseln) entfernt.

## 2. Antikörper:

Der 2. Antikörper ist gegen das Kaninchen- bzw. Mausserum/Protein des 1. Antikörpers gerichtet und an das Enzym Horseradish Peroxidase (HRP) gekoppelt.

Auch hier werden verschiedene Antikörper-Suspensionen hergestellt:

Bax:	5 $\mu$ l 2. Antikörper rabbit in 10 ml FKS in PBST (10 %)
P53:	5 $\mu$ l 2. Antikörper mouse in 10 ml FKS in PBST (10 %)
Bcl-2:	5 $\mu$ l 2. Antikörper mouse in 10 ml Milchpulver in PBST (10 %)
Mdm-2:	5 $\mu$ l 2. Antikörper rabbit in 10 ml Milchpulver in PBST (10 %)

Die Membranen werden auf gleiche Weise mit der jeweiligen Antikörper-Suspension blasenfrei in eine Plastiktüte eingeschweißt und auf dem Schüttler bei Raumtemperatur für 90 Minuten inkubiert.

Anschließend werden sie noch einmal unter einmaligem Wechseln des PBST 20 Minuten gewaschen.

## Entwicklung

Zur Sichtbarmachung der gesuchten Proteine werden die Membranen einzeln für genau eine Minute unter Schwenken mit dem Reagenz Chemiluminescence Plus (Western Lightning, Perkin Elmer Life Sciences Inc., Boston, USA), bestehend aus Luminol und Oxidationsreagenz inkubiert. Die Horseradish Peroxidase (HRP) des 2. Antikörpers katalysiert die Oxidation des Luminol, wodurch es zu einer Lichtemission der Wellenlänge 428 nm kommt. Diese wird von der Fotolinse der Image Station 440 CF, eines Aufnahmesystems zur Abbildung chemilumineszierender Membranen erfasst und am Bildschirm sichtbar gemacht.

Die Aufnahmen der Proteinbanden, die qualitativ einwandfrei sind, werden mit Hilfe der Programme Kodak 1 D 3.5 gespeichert und 1D Image Analysis ausgewertet.

Nach abgeschlossener Aufnahme werden die Membranen mit Coomassie Blau ge- und anschließend mit Destain wieder entfärbt, um die Vollständigkeit des Proteintransfers von Gel zu Membran zu kontrollieren. Fehler im Transfer führen zum Ausschluss und zur Wiederholung der Analyse.

## Auswertung der Western-Blot-Analyse

Die Proteinbanden stellen sich als unterschiedlich breite und dunkle Balken dar, welche per Hand oder mit einem Erkennungsprogramm umfahren werden. Die mittlere Intensität der Schwärzung innerhalb des umfahrenen Bereichs wird gemessen und mit der Fläche multipliziert. Anschließend wird die unspezifische Hintergrund-Chemilumineszenz abgezogen. Die Intensität der Schwärzung in Bezug auf die Fläche ermöglicht ein Errechnen der Konzentration des gesuchten Antikörpers in der Probe.

Durch das Auswerten der drei „Standard“-Banden ist eine Bestimmung der prozentualen Abweichung jeder einzelnen Probe vom Standard möglich und erlaubt es, die einzelnen Ergebnisse aller Western-Blot-Analysen miteinander zu vergleichen.

Alle Messungen werden dreimal durchgeführt, der errechnete Mittelwert geht in die statistischen Berechnungen ein.

### 3.2.6 Verwendete Geräte und Materialien

#### 3.2.6.1 Geräte

- Elektrophorese Power-supply, EPS-301, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA
- Elektrophoresekammer, Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
- Feuchte Kammer, Eigenbau
- Folienschweißgerät, HM 3000CD Polythene, Jencons Scientific Limited, Bedfordshire, England
- Image-Station, Eastman Kodak Company, New York, USA
- Konfokales Laserscanmikroskop, (CLSM) Axiovert 100M mit zugehöriger Software LSM 510, Version 2.5 Expert Mode, Zeiss in cooperation with Microsoft, Carl Zeiss, Jena
- Kugelmühle, Art.-Nr. 20.738.0001, Retsch GmbH & Co KG, Haan, Deutschland
- Kühlzentrifuge, Biofuge fresco, Heraeus, Osterode
- Powermeter, Liconix Model 35 PM Power Meter, Mountain View, CA, USA
- Schüttelinkubator, Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
- Schüttler, Rocky 3D, Fröbel Labortechnik, Lindau
- Sonifiziergerät, Sonifier Labsonic 2000, Braun, Meisungen
- Spektrometer, DU 640, Beckmann-Coulter, Oberschleißheim
- Transfergerät, Roth, Karlsruhe
- Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
- Vortexer, MS2, Minishaker, IKAWorks, Wilmington, USA
- Wasservollentsalzer, Seradest SD, USF Wallace&Tiernan, Ransbach

#### 3.2.6.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

- „Beads“ InSpeck Green I-7219 Microscope Image Intensity Calibration Kit, Molecular Probes, Leiden, Niederlande
- Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, München
- Bromphenolblau, Serva, Heidelberg
- BSA, bovines Albumin, Fraction V, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Butylalkohol, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Capronsäure ( $\epsilon$ -Amino-n-Caproic Acid), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Coomassie Brilliant Blue R 250, Fluka, Neu-Ulm
- DDT (Dithiothreitol), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Deckgläser 22 mm x 50 mm, Marienfeld
- Einmal-Küvetten PS, Plastibrand, Brand, Wertheim
- Eisessig 100 %, Merck, Darmstadt
- Eppendorf-Reaktionsgefäße, Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
- Ethanol 100 % pro analysi, Merck, Darmstadt
- FKS, fetales Kälberserum, Biochrom AG, Berlin
- Immobilon-P (PVDF-) Transfer Membran, Milipore, Bedford, MA, USA
- Kombitablette Aprotinin und PMSF, Complete Mini, EDTA free, Boehringer, Mannheim
- Milchpulver (0,1 % Fett), Naturaflor, Töpfer, Dietmannsried
- Mounting-Medium, Vectashield H-1000, Vectorlabs, Burlingame, USA
- Natriumhydrogencarbonat-Lösung 8,4 %, Delta-Pharma, Pfullingen
- Objektträger Superfrost Plus, Menzelgläser, Braunschweig
- PAP-Pen Fettstift, Daido Sangyo Co., Peske, Aindling

- PBS-Dulbecco w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Biochrom AG, Berlin
- Plastiktüten, Plastibrand Entsorgungsbeutel, Brand, Wertheim
- PMSF Complete, Mini EDTA-free, Boehringer, Mannheim
- Rainbow RPN 756 protein molecular weight marker, Amersham Life Science Inc, Piscataway, USA
- Rotiphorese Gel 40 Acrylamid / Bisacrylamid, Rpth, Karlsruhe
- SDS (Na-Dodecylsulfat), Bio-Rad Laboratories, München
- TEMED (N,N,N',N') Tetramethylenethyldiamid, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Tissue Freezing Medium, Jung, Leica Instruments, Nussloch
- TPP-Röhrchen, Trasadingen, Schweiz
- Tris, Roche, Mannheim
- TritonX-100, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Tween 20 (Polyoxyethylensorbitolmonolaurat), Fluka Chemica, Buchs, Schweiz
- Western Lightning Enhanced Luminol Reagent, Perkin Elmer, Boston, MA, USA
- Whatman Chromatographiepapier, Meldstone, England

### 3.2.6.3 Antikörper

#### **Immunfluoreszenz-Färbung:**

##### 1. Antikörper:

- Bax (I-19) cat # sc-930, rabbit polyclonal IgG, 200 µl/ml
- Bax (P-19) cat # sc-526, rabbit polyclonal IgG, 200 µl/ml
- P53 (FL-393) cat # sc 6243, rabbit polyclonal IgG, 200 µl/ml
- Bcl-2 (ΔC21) cat # sc-783, rabbit polyclonal IgG, 200 µl/ml
- Mdm-2 (C-18) cat# sc-812, rabbit polyclonal IgG, 200 µl/ml

##### 2. Antikörper:

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

#### **Western-Blot-Analyse:**

##### 1. Antikörper:

- Bax: (P-19) cat # sc-526, rabbit polyclonal IgG, 200 µl/ml
- P53: (DO-1) cat # sc-126, mouse monoclonal IgG, 200 µl/ml
- Bcl-2: (C-2) cat # sc-7382, mouse monoclonal IgG, 200 µl/ml
- Mdm-2: (C-18) cat# sc-812, rabbit polyclonal IgG, 200 µl/ml

Alle Antikörper von Santa Cruz Biotechnology, USA

##### 2. Antikörper:

Bcl-2 und p53: Anti-mouse Ig, horseradish peroxidase, linked whole antibody (from sheep), 1 ml, NA 931  
 Bax und Mdm-2: Anti-rabbit Ig, horseradish peroxidase, linked whole antibody (from donkey) 1 ml, Na 934

Amersham Life Science, Piscataway, USA



### 3.2.6.4 Verwendete Lösungen

#### **Immunfluoreszenz-Färbung:**

##### PBST (1x)

100 ml PBS (20x)  
1000 µl Tween 20  
ad 2000 ml ddH<sub>2</sub>O

#### **Western-Blot-Analyse:**

##### Anodenpuffer I

300 mM Tris  
20 % Ethanol pro analysi

##### Anodenpuffer II

25 mM Tris  
20 % Ethanol pro analysi

##### Kathodenpuffer

40 mM Capronsäure  
20 % Ethanol pro analysi

##### Coomassie-Färbelösung

0,8 g Coomassie Brilliant Blue R250  
200 ml Ethanol 100 % pro analysi  
40 ml Eisessig  
ad 500 ml mit ddH<sub>2</sub>O

##### Destain

25 % Ethanol 100 % pro analysi  
10 % Eisessig  
65 % ddH<sub>2</sub>O

##### Laufpuffer (10x)

30,28 g Tris  
144 g Glyzin  
10 g SDS  
0,1 g NaN<sub>3</sub>  
ad 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O

##### Sammelgel 5 %

5 ml Rotiphorese Gel 40  
10 ml Sammelgelpuffer  
25 ml ddH<sub>2</sub>O  
320 µl Ammoniumpersulfat (10 %)  
30 µl TEMED

Sammelgelpuffer (4x)

0,5 M Tris-HCl pH 6,8

0,4 % SDS

0,1 % NaN<sub>3</sub>

Trenngel 7 %

7 ml Rotiphorese Gel 40

10 ml Trenngelpuffer

23 ml ddH<sub>2</sub>O

240 µl Ammoniumpersulfat (10 %)

30 µl TEMED

Trenngel 10 %

10 ml Rotiphorese Gel 40

10 ml Trenngelpuffer

20 ml ddH<sub>2</sub>O

240 µl Ammoniumpersulfat (10 %)

30 µl TEMED

Trenngel 15 %

15 ml Rotiphorese Gel 40

10 ml Trenngelpuffer

15 ml ddH<sub>2</sub>O

240 µl Ammoniumpersulfat (10 %)

30 µl TEMED

Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

0,4 % SDS

0,01 % NaN<sub>3</sub>

**Probenaufbereitung:**

Lysispuffer

0,5 % Triton X-100

20 mM Tris-HCl pH 8,0 / 7,4

137 mM NaCl

2 mM EDTA

auf 10 ml 1 Tablette Combi Aprotinin und PMSF

PBS (20x)

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 ddH<sub>2</sub>O

auf pH 7,4 einstellen

### PBS (1x)

200 ml PBS 20x  
mit Aqua dest. auf 2000 ml auffüllen

### Reduzierender SDS-Probenpuffer

0,2 M Tris-HCl pH 6,8  
6 % SDS  
20 % Glycerol  
10 % DTT  
0,1 mg/ml Bromphenolblau  
aliquotiert bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  lagern

## **3.2.7 Statistische Befundbewertung**

Aus den Einzelwerten der verschiedenen Messparameter und Proteinanalysen wird innerhalb der Gruppen (Gruppe  $D_{\text{ges}}$  und Gruppe  $K_{\text{ges}}$ ) das arithmetische Mittel (MW) mit der Standardabweichung ( $\pm$  SD) errechnet. Diese Ergebnisse werden gegenübergestellt und auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen überprüft, um Hinweise auf potentielle Neuroprotektivität von Dexmedetomidin zu finden.

Zusätzlich wird der zeitliche Verlauf der durch die Ischämie erzeugten Veränderungen durch Vergleich der Tiere mit gleicher Überlebensdauer (1, 3, 7 und 28 Tagen) innerhalb der jeweiligen Gruppen  $D_{\text{ges}}$  und  $K_{\text{ges}}$  analysiert und auf Unterschiede zwischen den Gruppen  $D_{\text{ges}}$  und  $K_{\text{ges}}$  untersucht. Bei dieser Gegenüberstellung wird ebenfalls das arithmetische Mittel (MW) mit der Standardabweichung ( $\pm$  SD) aus den Einzelgruppen errechnet.

Die Bewertung der physiologischen Parameter der einzelnen Messzeitpunkte erfolgt im Vergleich zum Ausgangswert.

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

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

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

## **3.3 Ergebnisse**

In der vorliegenden Studie, in der die Ergebnisse der Dexmedetomidin-Gruppe mit denen der Kontroll-Gruppe verglichen werden, gehen insgesamt 72 Tiere ein. Physiologische

Referenzwerte aus der Gruppe der Nativtiere werden mit den Resultaten beider Versuchsgruppen verglichen.

Es ergeben sich folgende Einteilungen:

Dexmedetomidin-Gruppe:

**D<sub>ges</sub>** (n = 32) bestehend aus **D/1** (n = 8), Überlebensdauer 1 Tag  
**D/3** (n = 8), Überlebensdauer 3 Tage  
**D/7** (n = 8), Überlebensdauer 7 Tage  
**D/28** (n = 8), Überlebensdauer 28 Tage

Kontrollgruppe:

**K<sub>ges</sub>** (n = 32) bestehend aus **K/1** (n = 8), Überlebensdauer 1 Tag  
**K/3** (n = 8), Überlebensdauer 3 Tage  
**K/7** (n = 8), Überlebensdauer 7 Tage  
**K/28** (n = 8), Überlebensdauer 28 Tage

Nativ-Gruppe (n = 8)

### 3.3.1 Intraoperativ erhobene Parameter

Blut- und Blutgasanalyse, Herzfrequenz und Temperatur

In folgender Tabelle werden die während der operativen Phase gemessenen Parameter der Dexmedetomidin-Gruppe **D<sub>ges</sub>** in Mittelwert und Standardabweichung denen der Kontroll-Gruppe **K<sub>ges</sub>** gegenübergestellt. Es wird nicht nach verschiedenen Tötungszeitpunkten unterschieden, da innerhalb der Gruppe keine Unterschiede festgestellt werden konnten.

**Tabelle 4: Ergebnisse der physiologischen Messparameter**

PARAMETER	GRUPPE	MESSZEITPUNKT			
		AW	45 ISCH	15 REP	45 ERH
MAP (mmHg)	K <sub>ges</sub>	127 ± 10	40 ± 1●○	126 ± 9	114 ± 14
	D <sub>ges</sub>	143 ± 16	40 ± 1●○	139 ± 11	94 ± 18
Herzfrequenz (Schläge/min)	K <sub>ges</sub>	387 ± 38	467 ± 41	388 ± 40	419 ± 47
	D <sub>ges</sub>	326 ± 35	355 ± 41*	295 ± 41*	327 ± 33*
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	K <sub>ges</sub>	144 ± 22	153 ± 23	141 ± 26	120 ± 34
	D <sub>ges</sub>	143 ± 24	125 ± 26*	116 ± 18*	113 ± 37
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	K <sub>ges</sub>	37,8 ± 3,8	37,6 ± 5,7	40,0 ± 4,6	40,8 ± 5,0
	D <sub>ges</sub>	39,6 ± 3,9	41,1 ± 5,5*	44,4 ± 4,9*	44,1 ± 4,9*
Hämoglobin (mg/dl)	K <sub>ges</sub>	12,8 ± 1,0	9,0 ± 1,0●○	12,4 ± 1,0	12,1 ± 1,2
	D <sub>ges</sub>	13,5 ± 1,0	9,7 ± 0,8●○	12,6 ± 1,0	12,3 ± 1,1
Glukose (mg/dl)	K <sub>ges</sub>	65 ± 9	53 ± 11	66 ± 12	81 ± 18
	D <sub>ges</sub>	82 ± 18*	80 ± 20*	81 ± 18*	83 ± 18
pH-Wert	K <sub>ges</sub>	7,41 ± 0,03○	7,42 ± 0,06○	7,41 ± 0,05○	7,43 ± 0,05○
	D <sub>ges</sub>	7,41 ± 0,03○	7,44 ± 0,05○	7,42 ± 0,04○	7,41 ± 0,04○
T. perik (°C)	K <sub>ges</sub>	37,5 ± 0,2	37,5 ± 0,2	37,8 ± 0,4	37,7 ± 0,3
	D <sub>ges</sub>	37,5 ± 0,1	37,5 ± 0,1	37,6 ± 0,1	37,6 ± 0,1
T. rektal (°C)	K <sub>ges</sub>	37,8 ± 0,4○	38,1 ± 0,3○	38,1 ± 0,3○	38,1 ± 0,3○
	D <sub>ges</sub>	37,7 ± 0,4○	37,9 ± 0,5○	38,0 ± 0,5○	37,0 ± 0,4○

Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen ( $\pm$ SD) der Kontroll-Gruppe (K<sub>ges</sub>) und der Dexmedetomidin-Gruppe (D<sub>ges</sub>) des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP)(mmHg), der Herzfrequenz (Schläge pro Minute), des Sauerstoffpartialdrucks (mmHg), des Kohlendioxidpartialdrucks (mmHg), des pH-Wertes, der Blutglukose (mg/dl), der perikraniellen und rektalen Temperatur (°C) an vier definierten Messzeitpunkten intraoperativ.

● signifikante Veränderung im Vergleich zum Ausgangswert (AW), Signifikanz  $p < 0,05$

\* signifikante Unterschiede der Dexmedetomidin-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, Signifikanz  $p < 0,05$

○ kontrolliert veränderter Parameter

## MAP

Zwischen der Dexmedetomidin- und der Kontroll-Gruppe bestehen keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ) bezüglich des mittleren arteriellen Blutdrucks. Im Vergleich zum Ausgangswert **AW** ist der mittlere arterielle Blutdruck MAP bei beiden Gruppen protokollgemäß artifiziell während der ischämischen Phase **Isch 45** signifikant erniedrigt.

## Herzfrequenz

Die Durchschnittswerte der Dexmedetomidin-Gruppe sind im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant erniedrigt ( $p < 0,01$ ), zum Ausgangswert **AW** bestehen in beiden Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede.

## paO<sub>2</sub>

Bei den Messwerten des Sauerstoffpartialdrucks im arteriellen Blut kann in der Dexmedetomidin-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe eine signifikante Erniedrigung ( $p < 0,001$ ) zu den Messzeitpunkten **45 Isch** und **15 Rep** erkannt werden. Im Vergleich zum Ausgangswert **AW** gibt es bei beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

## paCO<sub>2</sub>

Die Mittelwerte des Kohlendioxidpartialdrucks der Dexmedetomidin-Gruppe sind gegenüber der Kontroll-Gruppe von Beginn der Ischämiephase bis zum Versuchsende signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ), im zeitlichen Verlauf und im Vergleich zum Ausgangswert **AW** zeigt keine der beiden Versuchsgruppen signifikante Unterschiede.

## Hämoglobin

Der Vergleich der Werte der Dexmedetomidin-Gruppe zur Kontroll-Gruppe zeigt keine signifikanten Unterschiede, die Mittelwerte des Gesamthämoglobins während der ischämischen Phase **Isch 45** beider Versuchsgruppen sind im Vergleich zum Ausgangswert **AW** protokollgemäß signifikant erniedrigt.

## Blutglucose

Die Blutglucosewerte der Dexmedetomidin-Gruppe zu den Messzeitpunkten **AW**, **Isch 45** und **Rep 15** sind im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ). Innerhalb der Versuchsgruppen unterscheiden sich die Ergebnisse der Blutglucose nur geringfügig.

### pH-Wert, perikranielle und rektale Temperatur

Der pH-Wert und die Körpertemperaturen werden kontinuierlich gemessen und weitestgehend konstant gehalten, so dass erwartungsgemäß keine signifikanten Veränderungen im zeitlichen Verlauf oder zwischen den Versuchsgruppen gemessen werden können.

### Hirndurchblutung

Bei kontinuierlicher Messung während des gesamten operativen Teils werden an den vier definierten Messzeitpunkten Werte gewonnen, die in Bezug zum Ausgangswert (**AW** = 100 %) prozentuale Ab- bzw. Zunahme der Hirndurchblutung dokumentieren. Die Gehirndurchblutung wird mit der Laser-Doppler-Flussmessung erfasst. Die Reflexion des Lichts durch bewegte Erythrozyten wird über Detektoren gemessen und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Das im vorliegenden Versuch verwendete System hat den Vorteil, dass kein direkter Kontakt zum Gewebe nötig ist. Die Glasfaseroptiksonde hat eine Eindringtiefe von 1 mm und ermöglicht so eine Messung ohne vollständige Eröffnung des Schädelsknochens.

**Tabelle 5: Ergebnisse der Laser-Doppler-Flussmessung in %**

GRUPPE	HIRNDURCHBLUTUNG	AW	45 ISCH	15 REP	45 ERH
K <sub>ges</sub>	LDF isch. in % (rechts)	100	51 ± 20●	104 ± 63	101 ± 55
	LDF nicht-isch. in % (links)	100	73 ± 17●	97 ± 24	109 ± 36
D <sub>ges</sub>	LDF isch. in % (rechts)	100	81 ± 33●	111 ± 49	102 ± 39
	LDF nicht-isch. in % (links)	100	98 ± 36	112 ± 44	117 ± 55

*Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (±SD) der mit Laser-Doppler-Flussmessung LDF ermittelten Hirndurchblutung (%) der ischämischen und der nicht-ischämischen Hemisphäre in Bezug zum Ausgangswert AW = 100 % beider Gruppen an den vier definierten Messzeitpunkten.*

*Signifikanzen: (●) = p < 0,05 zwischen dem Ausgangswert und dem Zeitpunkt der Ischämie.*

Protokollgemäß nimmt die zerebrale Perfusion in der ischämischen (rechten) Hemisphäre zu dem Messzeitpunkt während der ischämischen Phase in beiden Versuchsgruppen signifikant ab und steigt in der Reperfusion und Erholung wieder auf einen physiologischen Bereich an.

In der nicht-ischämischen (linken) Hemisphäre erfolgt ebenfalls ein zum Ausgangswert **AW** in der Kontroll-Gruppe signifikanter, in der Dexmedetomidin-Gruppe tendenzieller Abfall der Hirndurchblutung in der ischämischen Phase.

Die Mittelwerte der linken Hemisphäre sinken während der Ischämie auf bis nahezu 70 %, die der rechten auf Werte nahe 50 % des Ausgangswertes.

Wie erwartet ist die Gehirndurchblutung der rechten Hemisphäre deutlich niedriger als die der linken, da während der ischämischen Phase zusätzlich zur Hypotension die rechte *A. carotis communis* mit einem Clip temporär verschlossen wird.



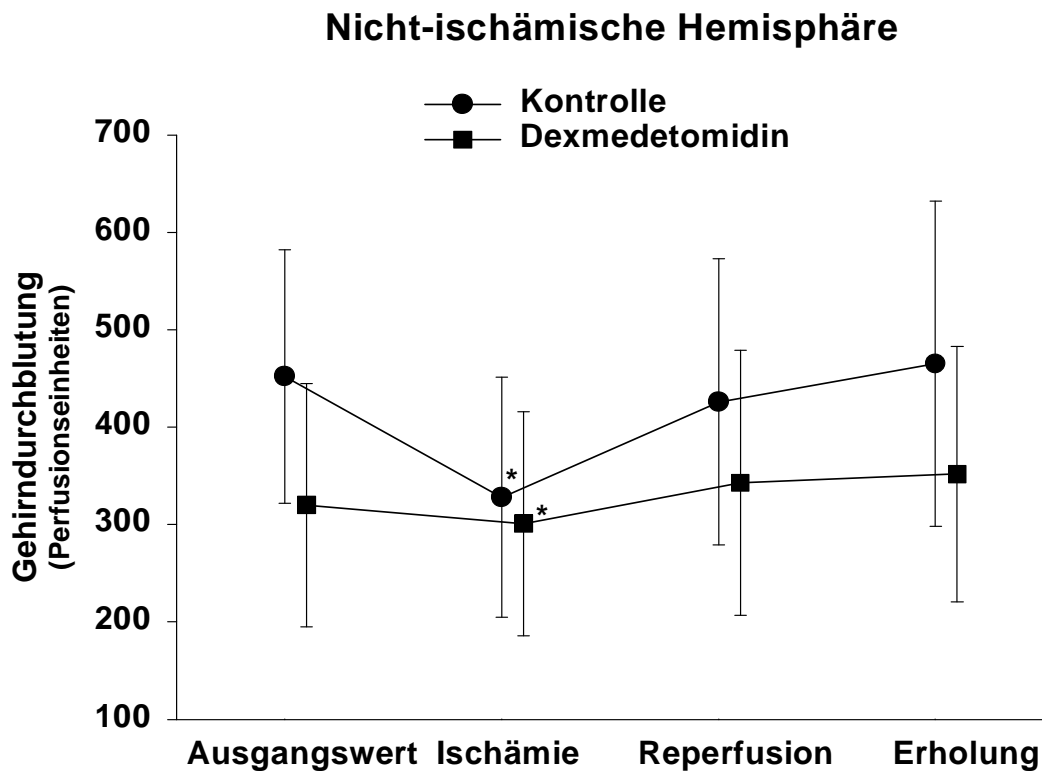
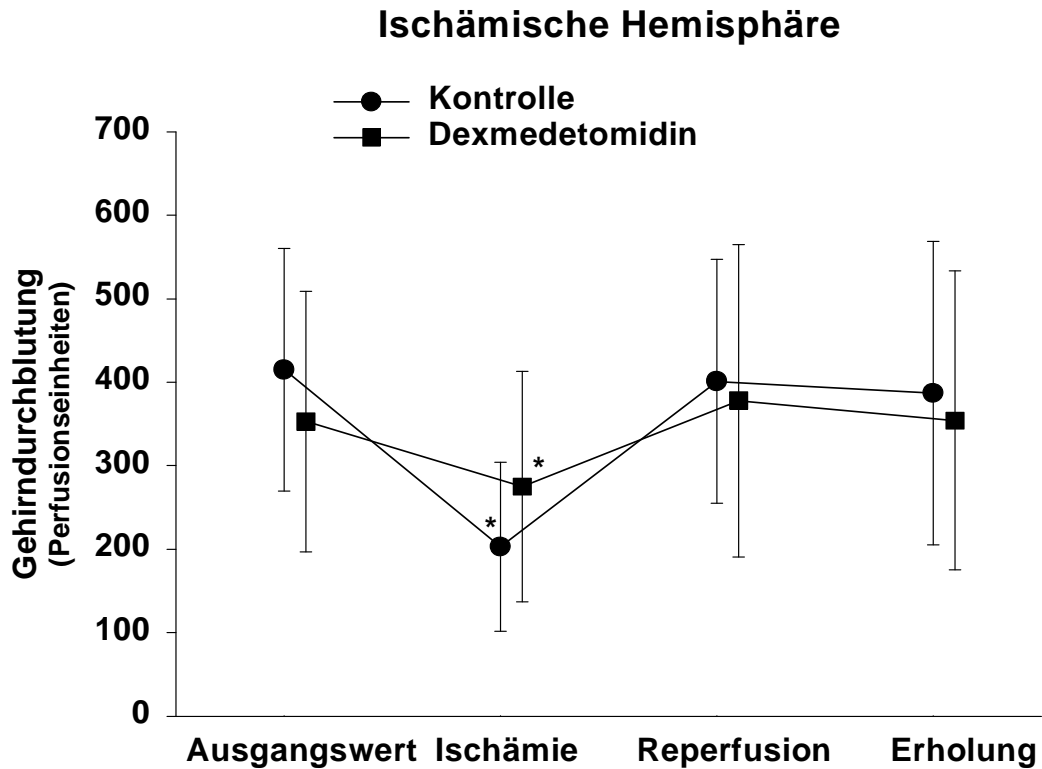


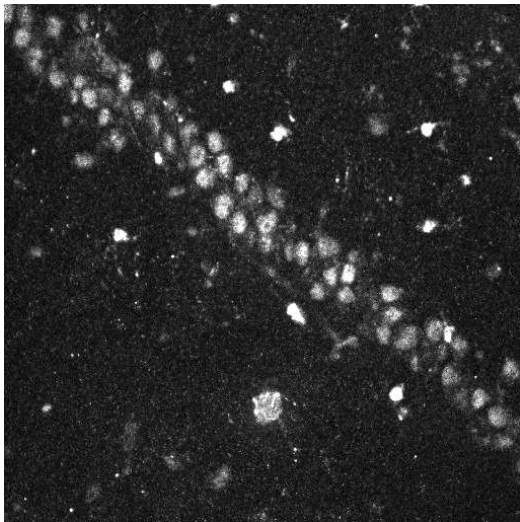
Abbildung 12 und Abbildung 13: Graphische Darstellung der Mittelwerte (MW) mit deren Standardabweichungen ( $\pm$ SD) der Laser-Doppler-Flussmessung in der ischämischen und nicht-ischämischen Gehirnhälfte zu den definierten Messzeitpunkten für beide Gruppen.

Signifikanzen: (\*) =  $p < 0,05$  zwischen dem Ausgangswert und dem Zeitpunkt der Ischämie.

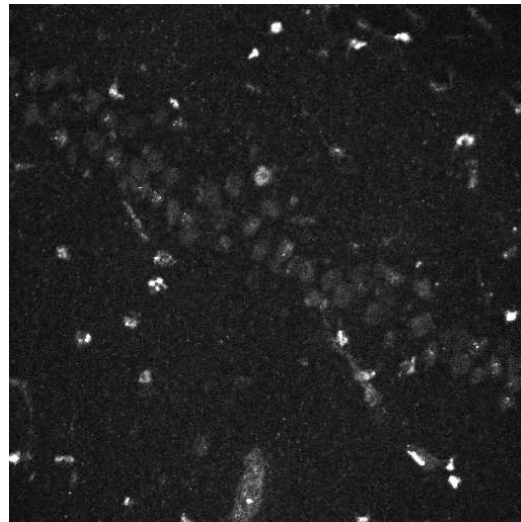
### 3.3.2 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Apoptose-assoziierten Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 der Hippokampusregionen sind mit der Immunfluoreszenzfärbung markiert, durch ein Laserscan-Mikroskop erfasst und mit der Software KS 400 ausgewertet worden.

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



**Abbildung 14: Bax-Expression der Kontroll-Gruppe.**



**Abbildung 15: Bax-Expression der Dexmedetomidin-Gruppe.**

**Bax-Expression in den Neuronen der CA1-Region des rechten Hippokampus am Untersuchungstag 3 (Vergr.: 160 fach).**

## Bax-Protein

**Tabelle 6: Immunfluoreszenz-Intensität des Bax-Proteins zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten**

	ISCHÄMISCHE (RECHTE) HEMISPHERE		NICHT-ISCHÄMISCHE (LINKE) HEMISPHERE	
Versuchsgruppe (allg. Ischämie)	K <sub>ges</sub>	D <sub>ges</sub>	K <sub>ges</sub>	D <sub>ges</sub>
Tag 1	80 ± 16	40 ± 9●	89 ± 15	41 ± 12●
Tag 3	76 ± 11	44 ± 18●	82 ± 20	40 ± 20●
Tag 7	72 ± 38	33 ± 17●	66 ± 33	34 ± 20●
Tag 28	71 ± 32	43 ± 13	74 ± 37	40 ± 14●
<b>Nativtiere</b> (ohne Ischämie)	25 ± 7		24 ± 9	

Summe der Mittelwerte (MW) und Standardabweichung ( $\pm$ SD) der Immunfluoreszenz-Intensität des Bax-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Regionen des Hippokampus und des unteren Astes des Gyrus dentatus der ischämischen (rechten) und nicht-ischämischen (linken) Gehirnhälfte der Kontroll-Gruppe (K<sub>ges</sub>) und Dexmedetomidin-Gruppe (D<sub>ges</sub>) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkte, sowie der Nativtiere als physiologische Vergleichswerte.

Signifikanzen:

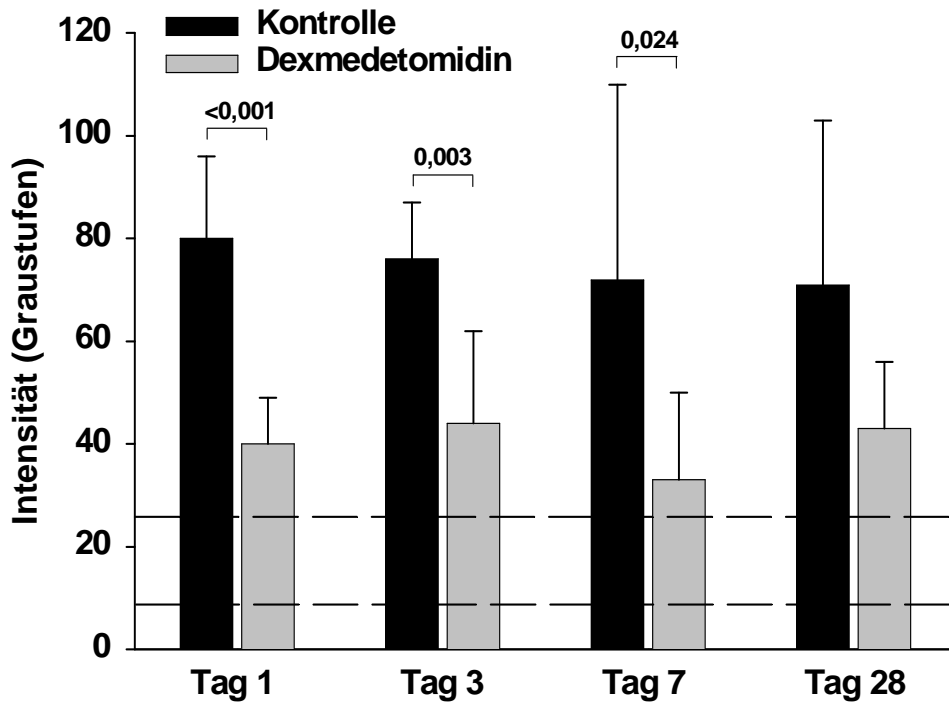
Sonderzeichen (●) = Signifikanz ( $p < 0,05$ ) Dexmedetomidin-Gruppe vs. Kontroll-Gruppe.

Die Expression des Bax-Proteins der mit Dexmedetomidin behandelten Tiere zeigt in der ischämischen (rechten) Gehirnhälfte am 1., 3. und 7. Tag, in der nicht-ischämischen (linken) Hemisphäre zu allen Untersuchungszeitpunkten einen signifikant niedrigeren Wert als der Tiere aus der Kontroll-Gruppe. Den deutlichsten Unterschied zeigen hierbei die Werte beider Hemisphären am 3. Tag und in der ischämischen Hemisphäre am 1. Tag. Die p-Werte können der folgenden Graphik entnommen werden. Am 28. Tag ist die Expression des Bax-Proteins in der ischämischen (rechten) Gehirnhälfte tendenziell erniedrigt.

Der Vergleich der rechten und der linken Gehirnhälfte zeigen keine signifikanten Unterschiede.

Beide Versuchsgruppen zeigen im Gesamtüberblick eine tendenziell höhere Expression des pro-apoptischen Bax-Proteins im Vergleich zu den physiologischen Referenzwerten der Nativtiere, im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen sind die Werte der Dexmedetomidin-Gruppe um 45 bis 60 % niedriger als in der Kontroll-Gruppe.

## Bax Immunfluoreszenz Ischämische Hemisphäre



## Bax Immunfluoreszenz Nicht-Ischämische Hemisphäre

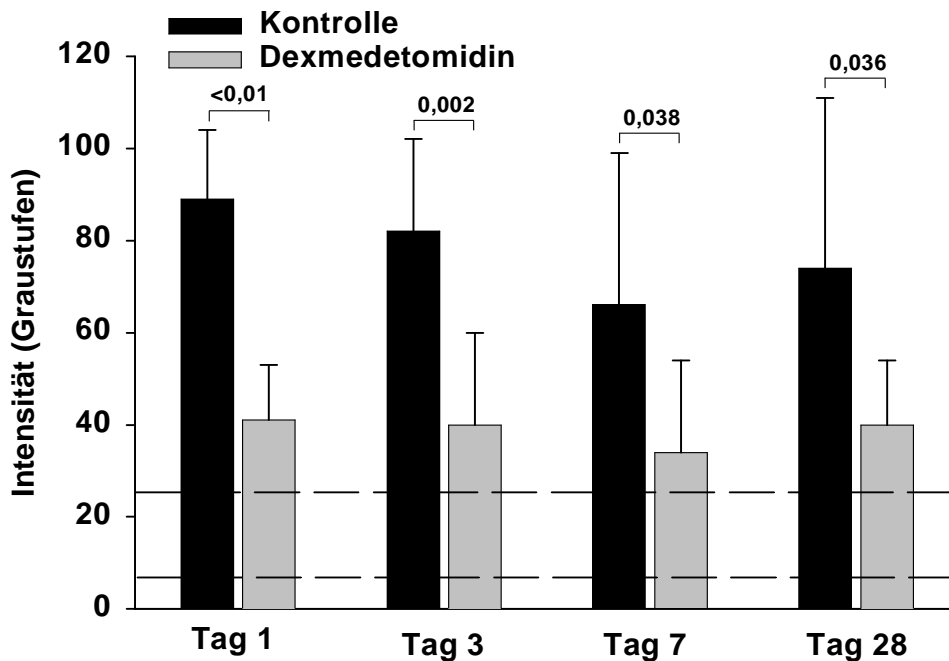


Abbildung 16 und Abbildung 17: Durchschnittliche Immunfluoreszenzintensität (Graustufen) des Bax-Proteins im Hippokampus der rechten (= ischämischen) und linken (= nicht-ischämischen) Hemisphären an den vier untersuchten Tagen. Signifikanzen: Signifikanzgrenze  $p < 0,05$ , einzelne Werte in der Graphik; zwischen den gestrichelten Linien liegen die physiologischen Vergleichswerte im Gehirn eines Nativtieres.

P53-Protein

**Tabelle 7: Immunfluoreszenz-Intensität des p53-Proteins zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten**

	ISCHÄMISCHE (RECHTE) HEMISPHERE		NICHT-ISCHÄMISCHE (LINKE) HEMISPHERE	
Versuchsgruppe (allg. Ischämie)	K <sub>ges</sub>	D <sub>ges</sub>	K <sub>ges</sub>	D <sub>ges</sub>
Tag 1	28 ± 13	30 ± 20	35 ± 18	38 ± 6
Tag 3	17 ± 4	28 ± 15	28 ± 13	32 ± 10
Tag 7	19 ± 6	25 ± 19	23 ± 8	26 ± 20
Tag 28	45 ± 25	36 ± 19	42 ± 17	39 ± 14
<b>Nativtiere</b> (ohne Ischämie)	35 ± 8		35 ± 6	

Summe der Mittelwerte (MW) und Standardabweichung ( $\pm$ SD) der Immunfluoreszenz-Intensität des p53-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Regionen des Hippokampus und des unteren Astes des Gyrus dentatus der ischämischen (rechten) und nicht-ischämischen (linken) Gehirnhälfte der Kontroll-Gruppe (K<sub>ges</sub>) und Dexmedetomidin-Gruppe (D<sub>ges</sub>) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkte, sowie der Nativtiere als physiologische Vergleichswerte.

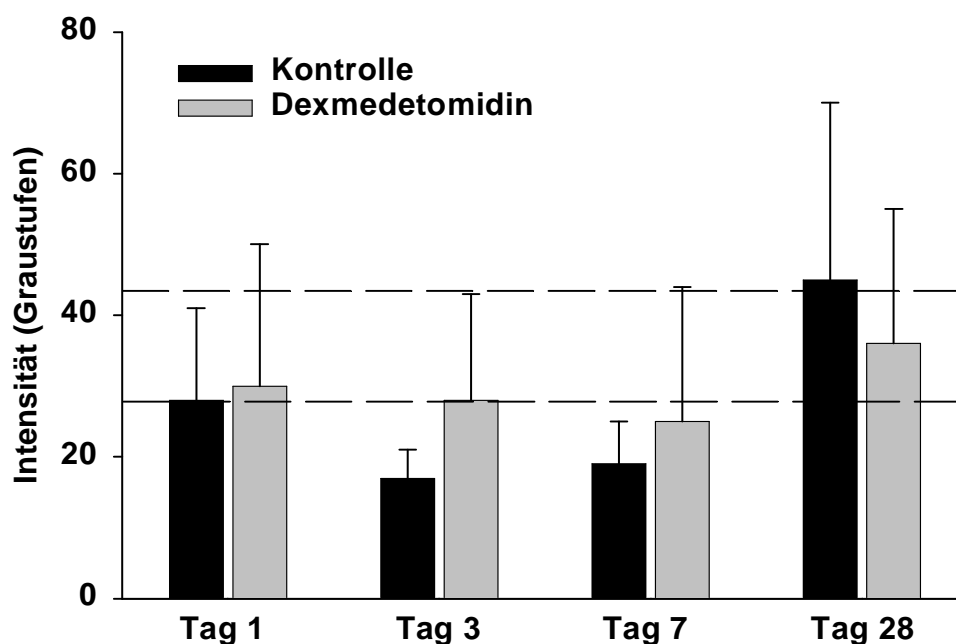
Signifikanzen:

Sonderzeichen (●) = Signifikanz ( $p < 0,05$ ) Dexmedetomidin-Gruppe vs. Kontroll-Gruppe.

Die Expression des p53-Proteins zeigt bei einer Signifikanzgrenze von  $p < 0,05$  zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Folgende Trends können beobachtet werden: Die Expression des p53-Proteins in der Dexmedetomidin-Gruppe ist in beiden Gehirnhälften am 1., 3. und 7. Tag tendenziell höher als in der Kontroll-Gruppe, am 28. Tag zeigt der Vergleich zwischen den Versuchsgruppen eine tendenzielle Erniedrigung der Werte der Dexmedetomidin-Gruppe. Am 1. und 28. Tag liegen die Werte beider Versuchsgruppen nahezu im Normbereich der Nativtiere, an den Untersuchungstagen 3 und 7 sind sie leicht unterhalb bzw. vergleichbar zum Normbereich anzusiedeln.

### p53 Immunfluoreszenz Ischämische Hemisphäre



### p53 Immunfluoreszenz Nicht-Ischämische Hemisphäre

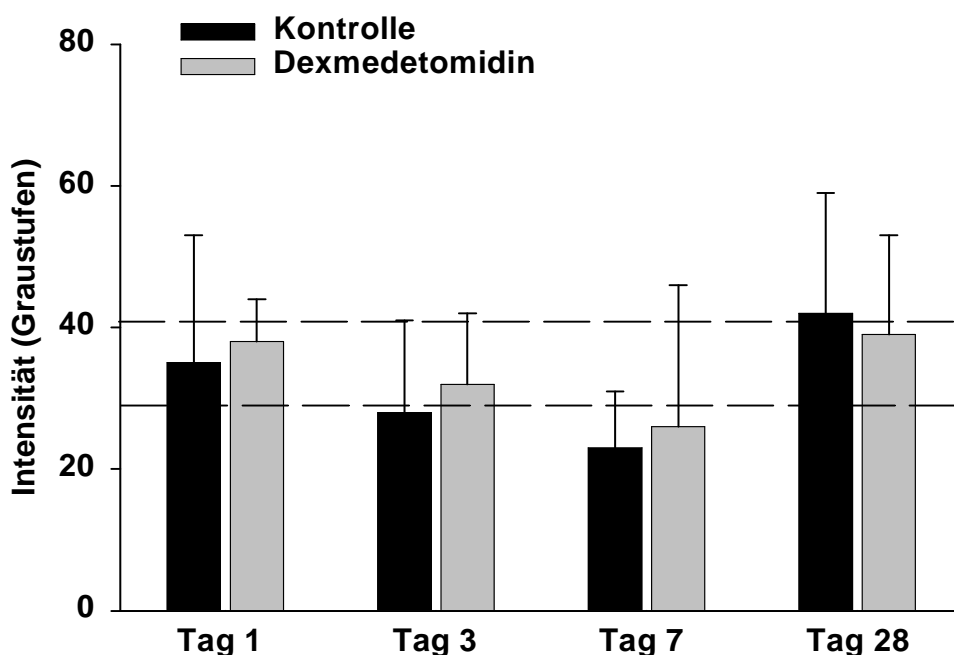


Abbildung 18 und Abbildung 19: Durchschnittliche Immunfluoreszenzintensität (Graustufen) des p53-Proteins im Hippokampus der rechten (= ischämischen) und linken (= nicht-ischämischen) Hemisphäre an den vier untersuchten Tagen. Signifikanzen: Signifikanzgrenze  $p < 0,05$ , einzelne Werte in der Graphik; zwischen den gestrichelten Linien liegen die physiologischen Vergleichswerte im Gehirn eines Nativtieres.

## Bcl-2-Protein

**Tabelle 8: Immunfluoreszenz-Intensität des Bcl-2-Proteins zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten**

	ISCHÄMISCHE (RECHTE) HEMISPHERE		NICHT-ISCHÄMISCHE (LINKE) HEMISPHERE	
Versuchsgruppe (allg. Ischämie)	K <sub>ges</sub>	D <sub>ges</sub>	K <sub>ges</sub>	D <sub>ges</sub>
Tag 1	16 ± 6	27 ± 9	19 ± 7	27 ± 11
Tag 3	17 ± 7	30 ± 10●	13 ± 4	29 ± 9●
Tag 7	24 ± 13	17 ± 7	20 ± 11	15 ± 7
Tag 28	29 ± 9	24 ± 8	25 ± 11	16 ± 4
<b>Nativtiere</b> (ohne Ischämie)	27 ± 4		23 ± 4	

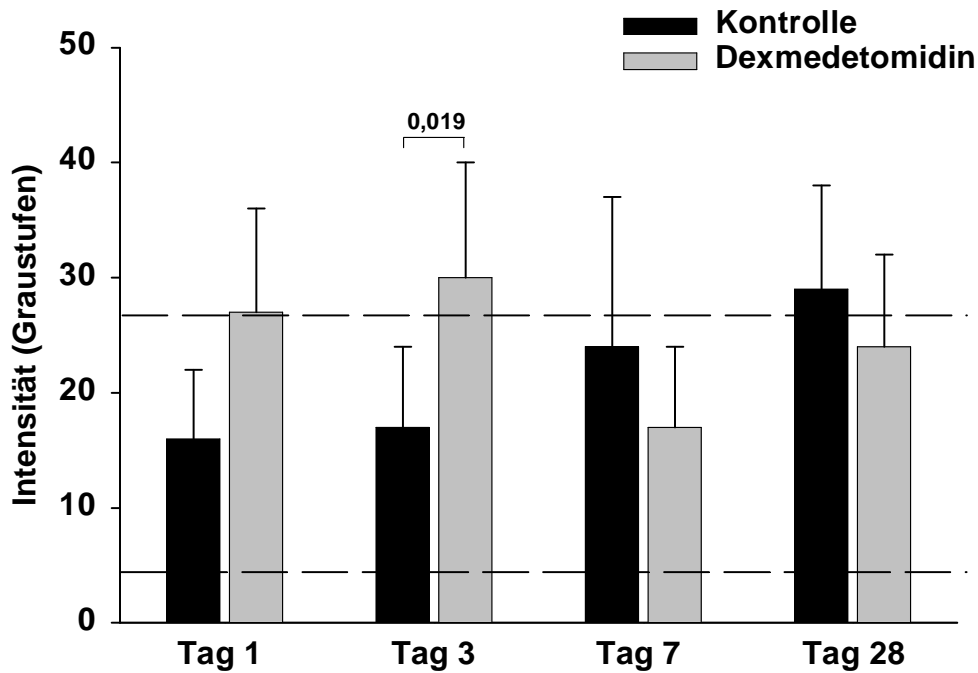
Summe der Mittelwerte (MW) und Standardabweichung ( $\pm$ SD) der Immunfluoreszenz-Intensität des Bcl-2-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Regionen des Hippokampus und des unteren Astes des Gyrus dentatus der ischämischen (rechten) und nicht-ischämischen (linken) Gehirnhälfte der Kontroll-Gruppe (K<sub>ges</sub>) und Dexmedetomidin-Gruppe (D<sub>ges</sub>) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkte, sowie der Nativtiere als physiologische Vergleichswerte.

Signifikanzen:

Sonderzeichen (●) = Signifikanz ( $p < 0,05$ ) Dexmedetomidin-Gruppe vs. Kontroll-Gruppe.

Das Bcl-2-Protein wird in der Dexmedetomidin-Gruppe in beiden Gehirnhälften am 1. Tag tendenziell, am 3. Tag in der ischämischen Hemisphäre signifikant und in der nicht-ischämischen Hemisphäre signifikant stärker exprimiert als in der Kontroll-Gruppe. An den Untersuchungstagen 7 und 28 ist die Expression des Proteins der Kontroll-Gruppe in beiden Hemisphären tendenziell höher als bei den mit Dexmedetomidin behandelten Tieren, wobei sich die Werte nahezu im Bereich der Nativtiere bewegen. Am 7. Tag ist das gemessene Bcl-2 beider Untersuchungsgruppen sowohl in der ischämischen als auch in der nicht-ischämischen Seite im Messbereich der Nativtiere aufzufinden.

### Bcl-2 Immunfluoreszenz Ischämische Hemisphäre



### Bcl-2 Immunfluoreszenz Nicht-Ischämische Hemisphäre

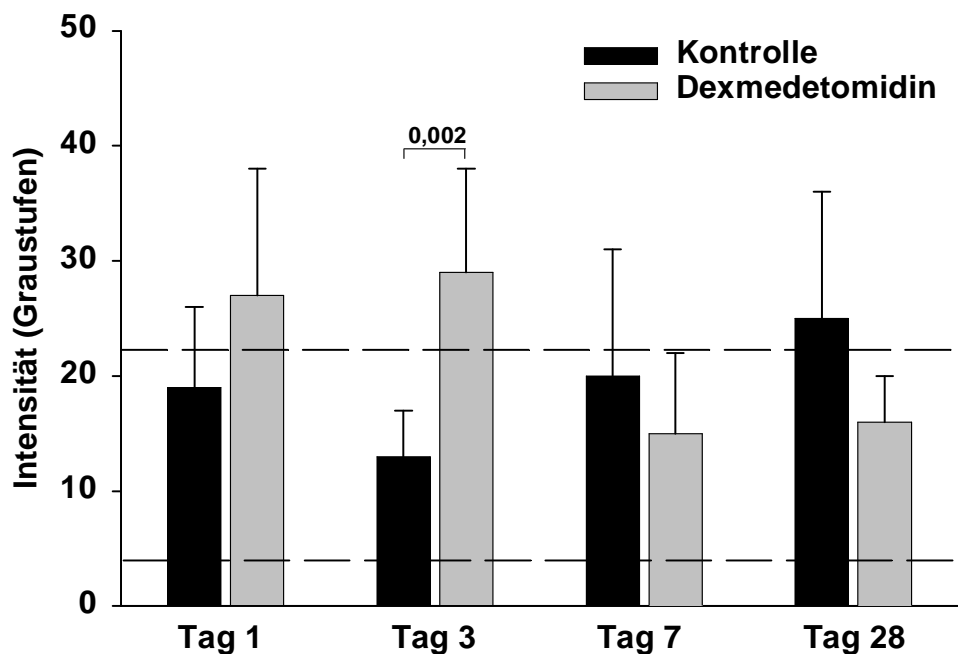


Abbildung 20 und Abbildung 21: Durchschnittliche Immunfluoreszenzintensität (Graustufen) des Bcl-2-Proteins im Hippokampus der rechten (= ischämischen) und linken (= nicht-ischämischen) Hemisphären den vier untersuchten Tagen. Signifikanzen: Signifikanzgrenze  $p < 0,05$ , einzelne Werte in der Graphik; zwischen den gestrichelten Linien liegen die physiologischen Vergleichswerte im Gehirn eines Nativtieres.



## Mdm-2-Protein

**Tabelle 9: Immunfluoreszenz-Intensität des Mdm-2-Proteins zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten**

	ISCHÄMISCHE (RECHTE) HEMISPHERE		NICHT-ISCHÄMISCHE (LINKE) HEMISPHERE	
Versuchsgruppe (allg. Ischämie)	K <sub>ges</sub>	D <sub>ges</sub>	K <sub>ges</sub>	D <sub>ges</sub>
Tag 1	24 ± 4	21 ± 7	21 ± 3	21 ± 8
Tag 3	14 ± 5	27 ± 14	16 ± 9	20 ± 10
Tag 7	35 ± 25	22 ± 9	15 ± 7	20 ± 7
Tag 28	25 ± 12	80 ± 71	26 ± 16	43 ± 30
<b>Nativtiere</b> (ohne Ischämie)	25 ± 7		26 ± 5	

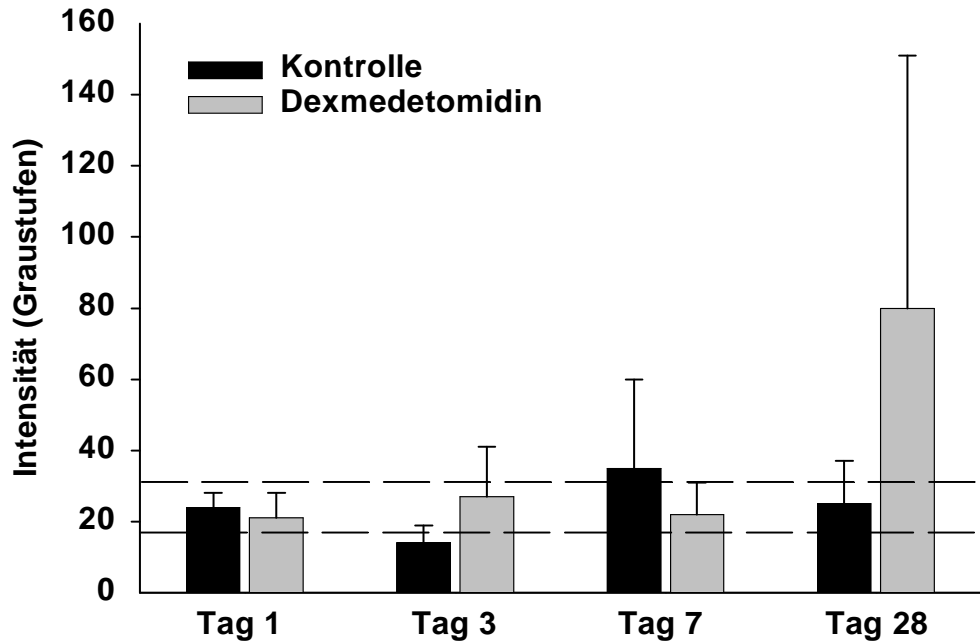
*Summe der Mittelwerte (MW) und Standardabweichung ( $\pm$ SD) der Immunfluoreszenz-Intensität des Mdm-2-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Regionen des Hippokampus und des unteren Astes des Gyrus dentatus der ischämischen (rechten) und nicht-ischämischen (linken) Gehirnhälfte der Kontroll-Gruppe (K<sub>ges</sub>) und Dexmedetomidin-Gruppe (D<sub>ges</sub>) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, sowie der Nativtiere als physiologische Vergleichswerte.*

*Signifikanzen:*

*Sonderzeichen (●) = Signifikanz ( $p < 0,05$ ) Dexmedetomidin-Gruppe vs. Kontroll-Gruppe.*

Die Expression des Mdm-2-Proteins zeigt zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die Mdm-2-Werte sind in beiden Gehirnhälften am 1. Untersuchungstag sowohl in der mit Dexmedetomidin behandelten Untersuchungsgruppe als auch in der Kontroll-Gruppe nahezu identisch und an der unteren Grenze des Normbereiches anzusiedeln. Am 3. und 28. Untersuchungstag sind die Werte der Dexmedetomidin-Gruppe tendenziell höher als die der Kontroll-Gruppe. Am 7. Tag kann eine Tendenz zwischen der ischämischen und der nicht-ischämischen Hemisphäre beobachtet werden: während in ersterer die Mdm-2-Konzentration in der Dexmedetomidin-Gruppe erniedrigt ist, sind die Verhältnisse der nicht-ischämischen Hemisphäre umgekehrt.

### Mdm-2 Immunfluoreszenz Ischämische Hemisphäre



### Mdm-2 Immunfluoreszenz Nicht-Ischämische Hemisphäre

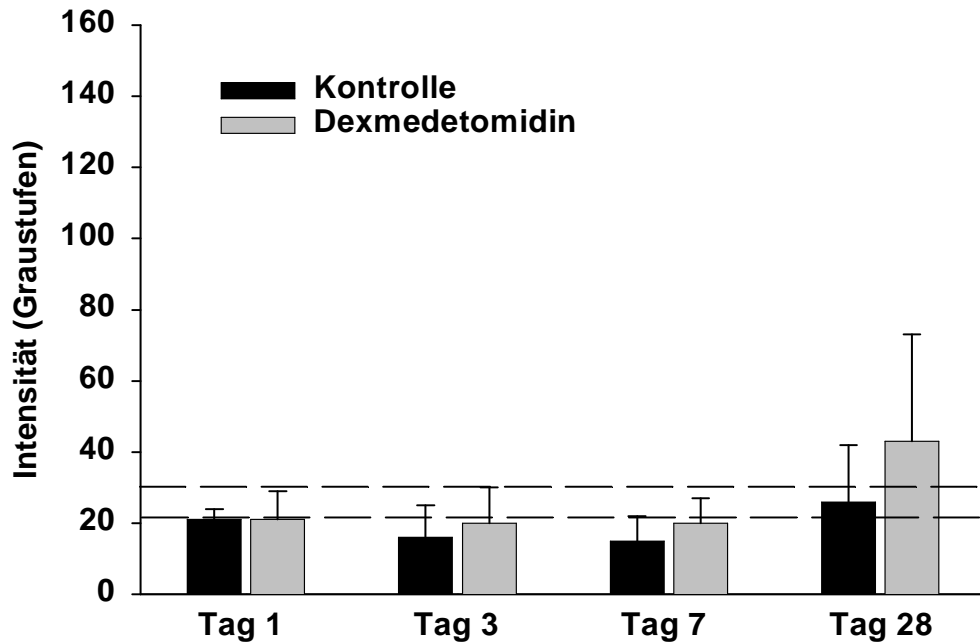


Abbildung 22 und Abbildung 23: Durchschnittliche Immunfluoreszenzintensität (Graustufen) des Mdm-2-Proteins im Hippokampus der rechten (= ischämischen) und linken (= nicht-ischämischen) Hemisphäre an den vier untersuchten Tagen. Signifikanzen: Signifikanzgrenze  $p < 0,05$ , einzelne Werte in der Graphik; zwischen den gestrichelten Linien liegen die physiologischen Vergleichswerte im Gehirn eines Nativtieres.

### 3.3.3 Western-Blot-Analyse

Die Apoptose-assoziierten Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 werden durch Markierung mit dem zweiten Antikörper, der nach Inkubation mit der Entwicklersubstanz mit der Enzymreaktion eine Chemilumineszenz entstehen lässt, sichtbar gemacht.

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

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

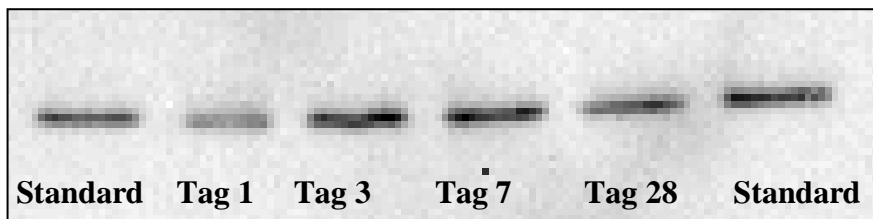


Abbildung 24: Western-Blot-Analyse: Proben der Kontroll-Gruppe.

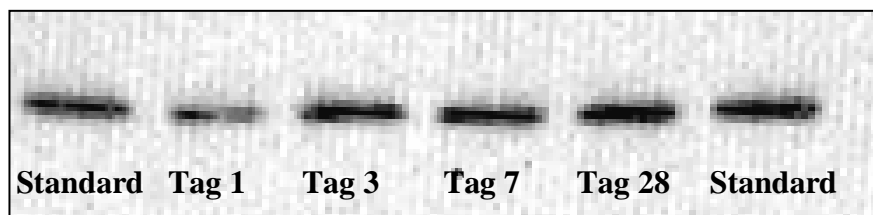


Abbildung 25: Western-Blot-Analyse: Proben der Dexmedetomidin-Gruppe.

**Abb. 24 und Abb. 25: Zwei Teilausschnitte aus einer Western-Blot-Analyse. Die Proben präsentieren die Schwärzungsintensität des durch Chemilumineszenz markierten Bcl-2-Proteinscan den vier untersuchten Tagen. Die erste und letzte Bande entspricht einem Standard (SD) mit konstanter Proteinkonzentration.**

## Bax-Protein

**Tabelle 10: Relative Schwärzungsintensität des Bax-Proteins zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in der Western-Blot-Analyse**

	ISCHÄMISCHE (RECHTE) HEMISPHERE		NICHT-ISCHÄMISCHE (LINKE) HEMISPHERE	
Versuchsgruppe (allg. Ischämie)	K <sub>ges</sub>	D <sub>ges</sub>	K <sub>ges</sub>	D <sub>ges</sub>
Tag 1	289 ± 153	210 ± 143	236 ± 69	244 ± 64
Tag 3	419 ± 344	366 ± 439	203 ± 35	205 ± 77
Tag 7	586 ± 424	575 ± 923	259 ± 63	225 ± 64
Tag 28	731 ± 983	556 ± 676	305 ± 143	217 ± 67
<b>Nativtiere</b> (ohne Ischämie)	152 ± 18		124 ± 34	

Vergleich der Mittelwerte (MW) und deren Standardabweichung ( $\pm SD$ ) der relativen Schwärzungsintensität in Prozent zum Standard (100 %) von Bax in der Western-Blot-Analyse. Messung der rechten (ischämischen) und linken (nicht-ischämischen) Hemisphäre der Kontroll-Gruppe ( $K_{ges}$ ) und der Dexmedetomidin-Gruppe ( $D_{ges}$ ) zu definierten Untersuchungszeitpunkten.

Signifikanzen:

Sonderzeichen (●) = Signifikanz ( $p < 0,05$ ) Dexmedetomidin-Gruppe vs. Kontroll-Gruppe.

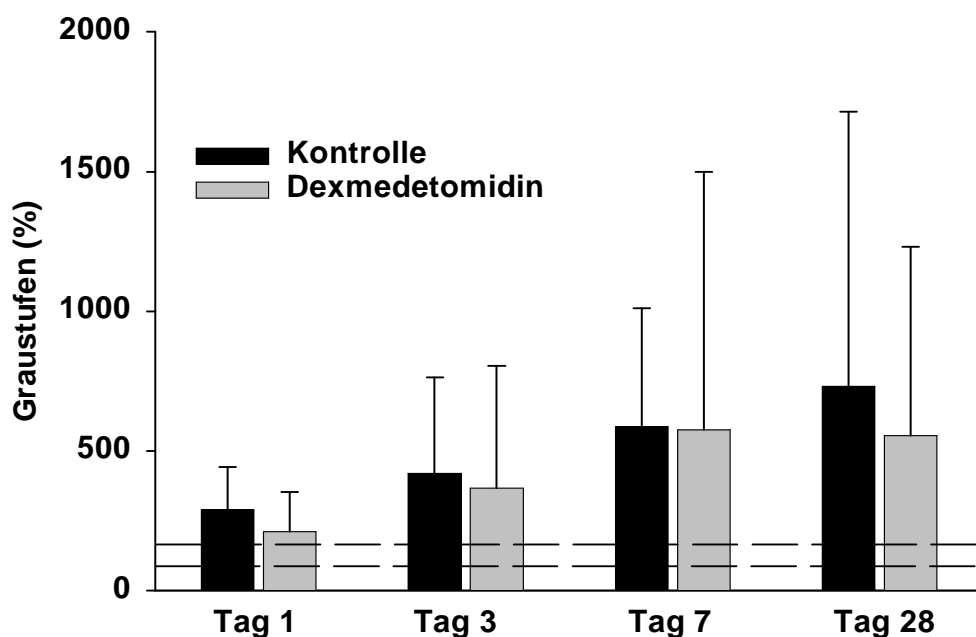
In der Western-Blot-Analyse können keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und den Untersuchungstagen festgestellt werden.

Die Proteinexpression der ischämischen Seite ist an allen Untersuchungstagen innerhalb der Kontroll-Gruppe tendenziell höher als in der Dexmedetomidin-Gruppe. In der nicht-ischämischen Hemisphäre sind die Werte beider Gruppen an Tag 1 und 3 nahezu identisch, am 7. und 28. Tag überwiegt tendenziell die Bax-Expression der Kontroll-Gruppe.

Die gemessenen Durchschnittskonzentrationen beider Gehirnhälften nehmen im zeitlichen Verlauf tendenziell zu.

Die gemessenen Werte der zwei Versuchsgruppen zeigen in der ischämischen Hälfte eine Proteinexpression über den physiologischen Vergleichswerten, in der nicht-ischämischen liegen sie darin oder an deren oberen Grenzbereich.

### Bax Western-Blot Ischämische Hemisphäre



### Bax Western-Blot Nicht-Ischämische Hemisphäre

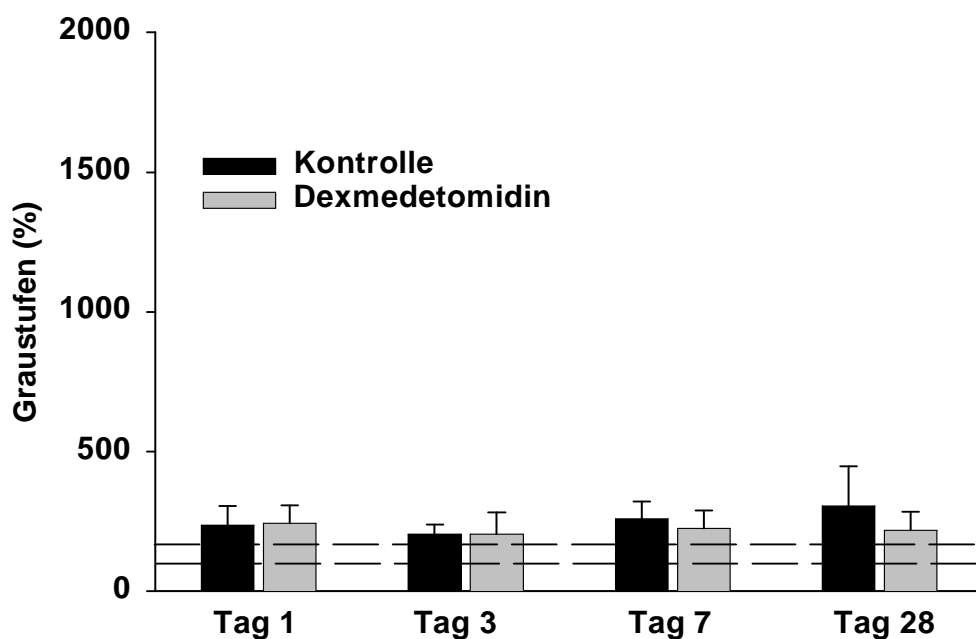


Abbildung 26 und Abbildung 27: Graphische Darstellung der Western-Blot-Analyse (durchschnittliche Schwärzungsintensität in %) des Bax-Proteins im Hippokampus der rechten (= ischämischen) und linken (= nicht-ischämischen) Hemisphäre an den vier untersuchten Tagen.

Signifikanzen: Signifikanzgrenze  $p < 0,05$ , einzelne Werte in der Graphik; zwischen den gestrichelten Linien liegen die physiologischen Vergleichswerte im Gehirn eines Nativtieres.

P53- Protein

**Tabelle 11: Relative Schwärzungsintensität des p53-Proteins zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in der Western-Blot-Analyse**

	ISCHÄMISCHE (RECHTE) HEMISPHERE		NICHT-ISCHÄMISCHE (LINKE) HEMISPHERE	
Versuchsgruppe (allg. Ischämie)	K <sub>ges</sub>	D <sub>ges</sub>	K <sub>ges</sub>	D <sub>ges</sub>
Tag 1	139 ± 50	158 ± 59	144 ± 62	124 ± 70
Tag 3	125 ± 44	151 ± 31	124 ± 51	150 ± 54
Tag 7	126 ± 33	145 ± 41	135 ± 32	145 ± 37
Tag 28	146 ± 41	155 ± 34	128 ± 31	153 ± 45
<b>Nativtiere</b> (ohne Ischämie)	101 ± 14		102 ± 22	

Vergleich der Mittelwerte (MW) und deren Standardabweichung ( $\pm SD$ ) der relativen Schwärzungsintensität in Prozent zum Standard (100 %) von p53 in der Western-Blot-Analyse. Messung der rechten (ischämischen) und linken (nicht-ischämischen) Hemisphäre der Kontroll-Gruppe (K<sub>ges</sub>) und der Dexmedetomidin-Gruppe (D<sub>ges</sub>) zu definierten Untersuchungszeitpunkten.

Signifikanzen:

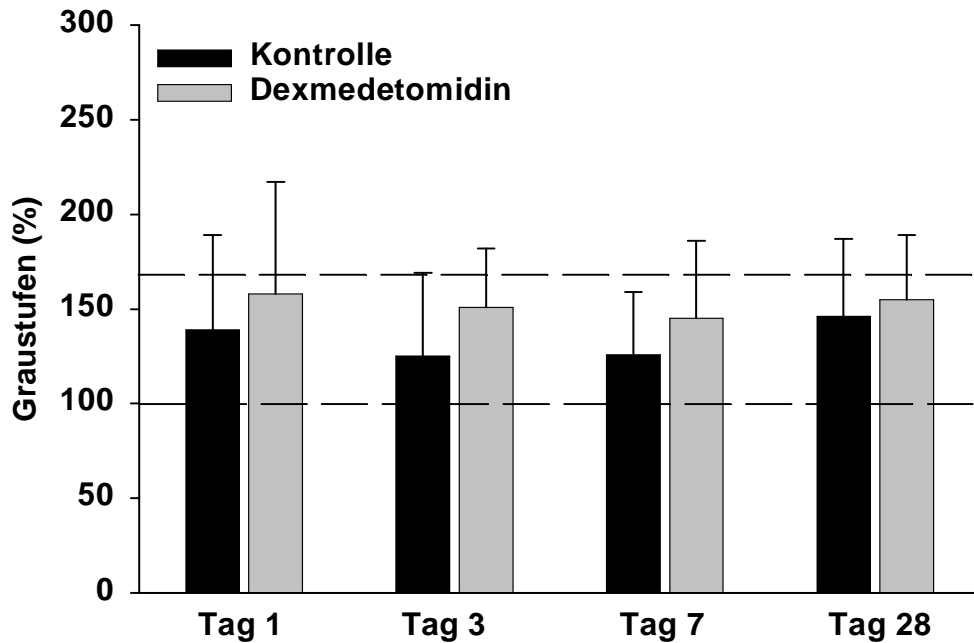
Sonderzeichen (●) = Signifikanz ( $p < 0,05$ ) Dexmedetomidin-Gruppe vs. Kontroll-Gruppe.

Die Untersuchung der p53-Konzentration durch die Western-Blot-Analyse ergibt in keiner Versuchsgruppe zu keinem Messzeitpunkt ein signifikantes Ergebnis.

Die Werte der Dexmedetomidin-Gruppe sind in der ischämischen Seite durchgehend, in der nicht-ischämischen Hälfte am 3., 7. und 28. Untersuchungstag tendenziell höher als die der Kontroll-Gruppe. Am Tag 1 ist die p53-Expression in der nicht-ischämischen Hemisphäre tendenziell im Vergleich zu den Kontrolltieren erniedrigt.

Die Werte der beiden Gruppen befinden sich zu allen Untersuchungszeitpunkten im physiologischen Referenzbereich, der aus den Untersuchungsergebnissen der unbehandelten Nativtiere hervorgeht und in den graphischen Darstellungen zwischen den gestrichelten Linien liegt.

### p53 Western-Blot Ischämische Hemisphäre



### p53 Western-Blot Nicht-Ischämische Hemisphäre

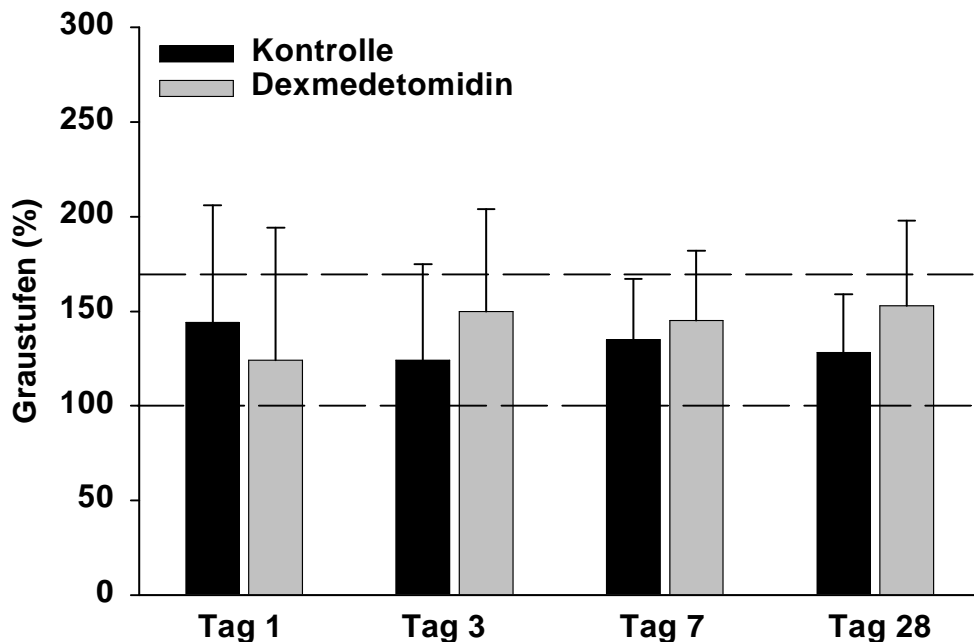


Abbildung 28 und Abbildung 29: Graphische Darstellung der Western-Blot-Analyse (durchschnittliche Schwärzungsintensität in %) des p53-Proteins im Hippokampus der rechten (= ischämischen) und linken (= nicht-ischämischen) Hemisphäre an den vier untersuchten Tagen.

Signifikanzen: Signifikanzgrenze  $p < 0,05$ , einzelne Werte in der Graphik; zwischen den gestrichelten Linien liegen die physiologischen Vergleichswerte im Gehirn eines Nativtieres.

## Bcl-2-Protein

**Tabelle 12: Relative Schwärzungsintensität des Bcl-2-Proteins zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in der Western-Blot-Analyse**

	ISCHÄMISCHE (RECHTE) HEMISPHERE		NICHT-ISCHÄMISCHE (LINKE) HEMISPHERE	
Versuchsgruppe (allg. Ischämie)	K <sub>ges</sub>	D <sub>ges</sub>	K <sub>ges</sub>	D <sub>ges</sub>
Tag 1	83 ± 56	106 ± 80	100 ± 46	141 ± 55
Tag 3	104 ± 72	127 ± 38	90 ± 23	143 ± 56●
Tag 7	91 ± 51	97 ± 17	100 ± 40	104 ± 29
Tag 28	114 ± 54	166 ± 91	103 ± 37	136 ± 63
<b>Nativtiere</b> (ohne Ischämie)	116 ± 34		94 ± 27	

Vergleich der Mittelwerte (MW) und deren Standardabweichung ( $\pm SD$ ) der relativen Schwärzungsintensität in Prozent zum Standard (100 %) von Bcl-2 in der Western-Blot-Analyse. Messung der rechten (ischämischen) und linken (nicht-ischämischen) Hemisphäre der Kontroll-Gruppe ( $K_{ges}$ ) und der Dexmedetomidin-Gruppe ( $D_{ges}$ ) zu definierten Untersuchungszeitpunkten.

Signifikanzen:

Sonderzeichen (●) = Signifikanz ( $p < 0,05$ ) Dexmedetomidin-Gruppe vs. Kontroll-Gruppe.

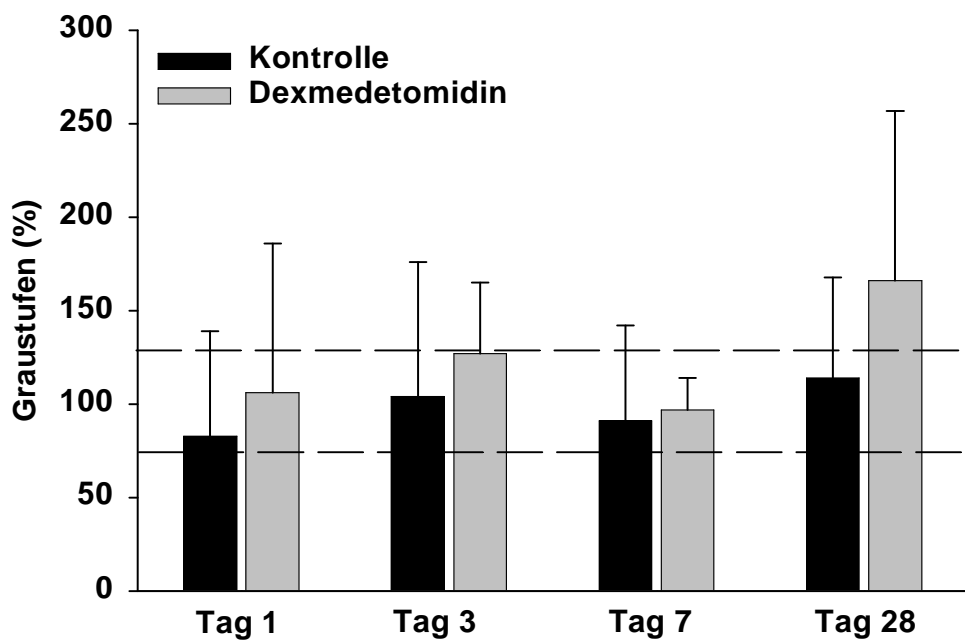
Die einzige signifikante Veränderung bei der Bcl-2-Proteinanalyse kann am 3. Untersuchungstag in der nicht-ischämischen Gehirnhälfte beobachtet werden. Messbar ist eine signifikante Erhöhung des Proteins in der Dexmedetomidin-Gruppe verglichen mit dem Wert der Kontrolltiere des 3. Tages. Für die Konzentration des Bcl-2-Proteins sind zu allen anderen Messzeitpunkten keine weiteren signifikanten Unterschiede feststellbar.

Tendenziell ist die Bcl-2-Expression der Dexmedetomidin-Gruppe zu allen Untersuchungszeitpunkten und in beiden Gehirnhälften im Vergleich zur Kontroll-Gruppe erhöht.

Die Bcl-2 Expression der Versuchsgruppen befinden sich in beiden Hemisphären stets im oder leicht über dem physiologischen Referenzbereich, der aus den Werten der Nativtiere hervorgeht.



### Bcl-2 Western-Blot Ischämische Hemisphäre



### Bcl-2 Western-Blot Nicht-Ischämische Hemisphäre

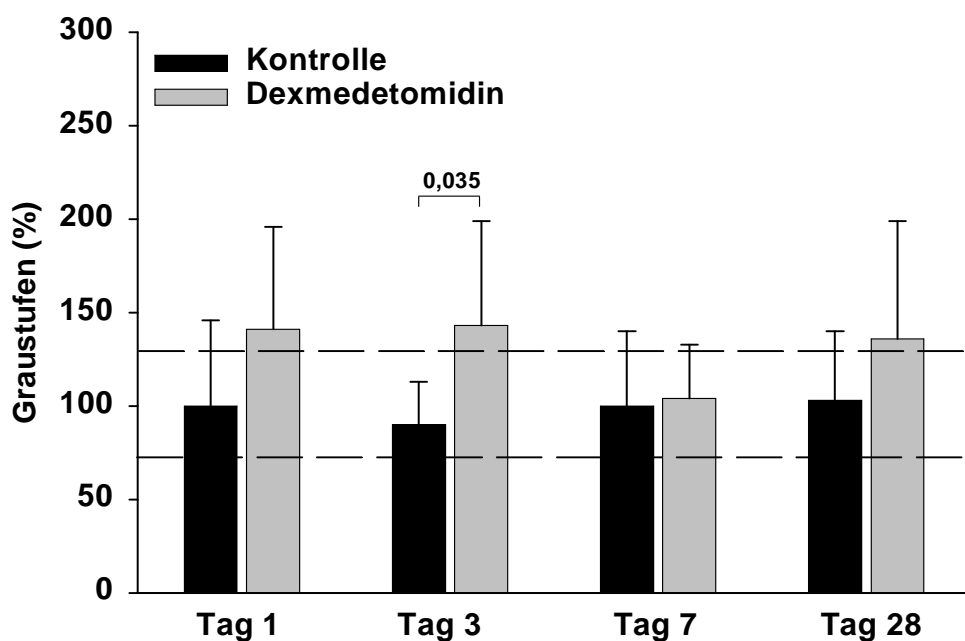


Abbildung 30 und Abbildung 31: Graphische Darstellung der Western-Blot-Analyse (durchschnittliche Schwärzungsintensität in %) des Bcl-2-Proteins im Hippokampus der rechten (= ischämischen) und linken (= nicht-ischämischen) Hemisphäre an den vier untersuchten Tagen.

Signifikanzen: Signifikanzgrenze  $p < 0,05$ , einzelne Werte in der Graphik; zwischen den gestrichelten Linien liegen die physiologischen Vergleichswerte im Gehirn eines Nativtieres.

Mdm-2-Protein

**Tabelle 13: Relative Schwärzungsintensität des Mdm-2-Proteins zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in der Western-Blot-Analyse**

	ISCHÄMISCHE (RECHTE) HEMISPHERE		NICHT-ISCHÄMISCHE (LINKE) HEMISPHERE	
Versuchsgruppe (allg. Ischämie)	$K_{ges}$	$D_{ges}$	$K_{ges}$	$D_{ges}$
Tag 1	122 ± 44	255 ± 101●	193 ± 114	264 ± 211
Tag 3	128 ± 56	275 ± 129●	198 ± 91	291 ± 191
Tag 7	117 ± 40	267 ± 122●	173 ± 89	294 ± 230
Tag 28	127 ± 42	205 ± 133	167 ± 109	215 ± 120
<b>Nativtiere</b> (ohne Ischämie)	205 ± 87		206 ± 64	

Vergleich der Mittelwerte (MW) und deren Standardabweichung ( $\pm SD$ ) der relativen Schwärzungsintensität in Prozent zum Standard (100 %) von Mdm-2 in der Western-Blot-Analyse. Messung der rechten (ischämischen) und linken (nicht-ischämischen) Hemisphäre der Kontroll-Gruppe ( $K_{ges}$ ) und der Dexmedetomidin-Gruppe ( $D_{ges}$ ) zu definierten Untersuchungszeitpunkten.

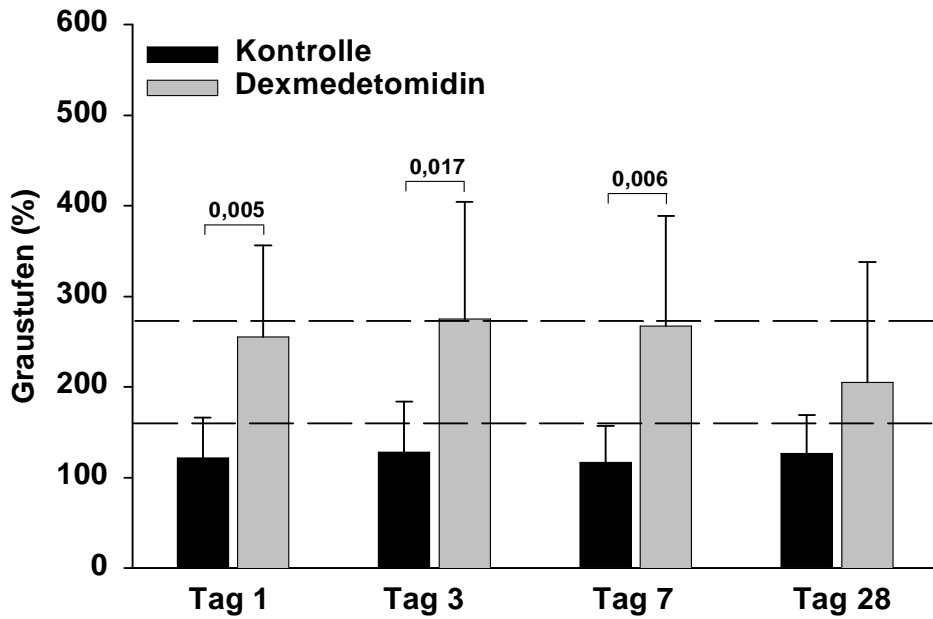
Signifikanzen:

Sonderzeichen (●) = Signifikanz ( $p < 0,05$ ) Dexmedetomidin-Gruppe vs. Kontroll-Gruppe.

Die Expression des Mdm-2-Proteins der Dexmedetomidin-Gruppe ist in der ischämischen Gehirnhälfte am 1. und 7. Untersuchungstag signifikant, am 3. Tag signifikant höher als die der Kontroll-Gruppe. Am 28. Untersuchungstag kann nur eine tendenzielle Erhöhung in der Dexmedetomidin-Gruppe verglichen zu den Kontrolltieren gemessen werden.

In der nicht-ischämischen Gehirnhälfte wird zu allen Untersuchungszeitpunkten eine tendenzielle Erhöhung des Proteins der Dexmedetomidin-Gruppe erkennbar. Deren Expression des Proteins ist im oder geringgradig über dem Wertebereich der Nativtiere vorzufinden, die der Kontroll-Gruppe in oder unterhalb der physiologischen Referenzwerte der Nativtiere.

### Mdm-2 Western-Blot Ischämische Hemisphäre



### Mdm-2 Western-Blot Nicht-Ischämische Hemisphäre

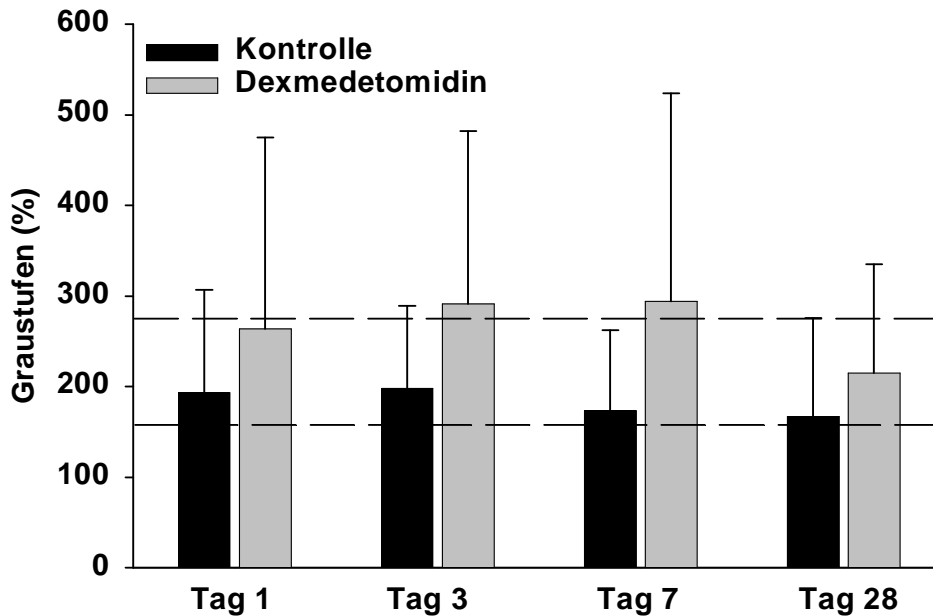


Abbildung 32 und Abbildung 33: Graphische Darstellung der Western-Blot-Analyse (durchschnittliche Schwärzungsintensität in %) des Mdm-2-Proteins im Hippokampus der rechten (= ischämischen) und linken (= nicht-ischämischen) Hemisphäre an den vier untersuchten Tagen.

Signifikanzen: Signifikanzgrenze  $p < 0,05$ , einzelne Werte in der Graphik; zwischen den gestrichelten Linien liegen die physiologischen Vergleichswerte im Gehirn eines Nativtieres.

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie ist es, die potentielle neuroprotektive Wirkung des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten Dexmedetomidin zu untersuchen. Anhand der Expressionsmuster der Apoptose-assoziierten Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 über einen Zeitraum von 28 Tagen nach Erzeugung einer inkompletten zerebralen Hemisphärenischämie wird die Fähigkeit des Dexmedetomidin, die Abläufe des apoptotischen Zelluntergangs im Vergleich zu den Kontrolltieren zu beeinflussen, aufgezeigt.

Die intensive Erforschung des apoptotischen Zelluntergangs und die Kenntnis über dessen Steuerung durch assoziierte Proteine als Modulatoren (KRAJEWSKI et al. 1994) machen eine Suche nach frühen Interventionsmöglichkeiten in den Ablauf der Kaskaden sinnvoll, um einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt in der Behandlung zerebraler Perfusionsstörungen zu finden.

Trotzdem im vorliegenden Tiermodell eine einseitige inkomplette Hemisphärenischämie erzeugt wird, zeigt in beiden Untersuchungsgruppen ein Vergleich der Ergebnisse zwischen der rechten (ischämischen) und der linken (nicht-ischämischen) Gehirnhälfte keine signifikanten Unterschiede. Eine ausgeprägte Kollateralgefäßversorgung des Gehirns der Ratten und die systemische hämorrhagische Hypotension, die eine generelle Minderdurchblutung im gesamten Gehirn verursacht, sind wahrscheinlich ursächlich für vergleichbare neuronale Zellschäden beider Gehirnhälften.

Der zeitliche Verlauf einer zerebralen Schädigung hängt von Schwere und Dauer der ursächlichen Noxe und dem Ausmaß der irreparablen Schäden ab. Dabei beginnt die Reaktion des Gehirns auf eine fokale zerebrale Ischämie bereits nach einigen Minuten mit einer Exzitotoxizität und kann in Form des programmierten Zelltodes über Tage anhalten (DIRNAGL und MEISEL 1999). In der vorliegenden Studie wurde ein Zeitraum von 28 Tagen ausgewählt, um einerseits umfassende Aussagen über die Expression der Apoptose-assoziierten Proteine im zeitlichen Verlauf über eine Dauer machen zu können, nach der andererseits keine schwerwiegenden Veränderungen mehr zu erwarten sind. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Beeinflussung der Protein-Expression durch Dexmedetomidin über einen Zeitraum von bis zu 4 Wochen nachweisbar ist.

## **4.1 Methoden der Versuchsdurchführung**

### **4.1.1 Das Tiermodell**

Trotz kritisch zu betrachtender Aspekte ist ein Einsetzen physiologisch kontrollierter und reproduzierbarer Tiermodelle in Studien zur zerebralen Ischämie nicht zu ersetzen. Menschliche ischämische Infarkte sind in ihrer Manifestation, Ursache und anatomischen Lokalisation so unterschiedlich, dass sie für vergleichbare klinische Studien meist nicht geeignet sind. Bei akut auftretenden Erkrankungen von Patienten gibt es kaum Gelegenheit zur präischämischen Befunderhebung, ebenso sind Untersuchungen unmittelbar nach einem Infarkt im Klinikablauf nicht zuverlässig durchführbar. Die Möglichkeit invasiver Verfahren der Diagnostik, z.B. Gewebeentnahme aus dem Gehirn, für histopathologische, biochemische und physiologische Untersuchungen ist nur selten gegeben. Studien am Tiermodell bieten die Gelegenheit, in kurzer Zeit eine größere und damit auch repräsentativere Anzahl an Individuen unter immer gleichen Bedingungen zu untersuchen. Dabei kann der Versuchsablauf jederzeit gesteuert werden, eine Überwachung und Kontrolle der relevanten Parameter ist zu jedem Zeitpunkt möglich. Nicht zuletzt erfordert die Anwendung eines Therapeutikums am Patienten ohne jeden Zweifel vorausgehende umfassende Studien am Tier.

In den meisten Modellen zur Untersuchung pathologischer Vorgänge im Gehirn haben sich Nager als geeignete Versuchstiergruppe durchgesetzt. Ihre Vorteile gegenüber größeren Säugetieren, wie z.B. Hunden, Katzen oder Primaten, liegen vor allem in ihrer Wirtschaftlichkeit. Niedrige Anschaffungs- und Unterhaltskosten, aber auch der geringere Bedarf an oft kostenintensiven Medikamenten, und geringer Platzbedarf geben den Nagern gegenüber anderen Versuchstieren den Vorzug. Eine rasche Generationsfolge, je nach Versuchsanforderungen durch Inzucht bedingte Homogenität oder wie in der vorliegenden Studie durch Auszucht breite Heterogenität der Rattenlinien gewährleistet optimale Reproduzierbarkeit. Vergleichbarkeit der Physiologie und Anatomie der Ratten mit höher entwickelten Säugern ist gegeben, wobei ihre geringe Größe für Fixiervorgänge, biochemische Untersuchungen und histologische Schnitte besonders geeignet ist.

Von Nachteil für die klinische Relevanz ist die Fähigkeit der meisten Nager, eine ausgeprägte intrakranielle Kollateralzirkulation aufrecht zu erhalten, so dass nur durch eine systemische Hypotension der zerebrale Metabolismus ausreichend gestört wird, um einen Schaden im Gehirn zu verursachen. Allerdings werden bei einer systemischen Hypoxie und Hypotension

andere Organsysteme wie z.B. das Herz oder die Nieren ebenfalls beeinträchtigt und konstante physiologische Bedingungen werden dadurch nicht vollständig erreicht.

Zusätzlich werden üblicherweise gesunde und junge Tiere, meistens nur eines Geschlechts, für den Versuch verwendet. Die erzielten Ergebnisse können somit nur bedingt auf klinische Verhältnisse, in denen größtenteils ältere Patienten jeden Geschlechts mit multiplen Erkrankungen betroffen sind, übertragen werden. Problematisch im Vergleich Tiermodell zur Klinik ist ebenfalls zu sehen, dass im Versuch die Dosis eines Medikaments an der oberen Grenze gewählt werden kann, während die klinische Applikation meist darunter liegt.

Zur Induktion einer zerebralen Ischämie stehen zahlreiche Versuchsmodelle zur Verfügung, die sich in Lokalisation und Ausmaß ihrer produzierten Schäden unterscheiden (DE LECINANA et al. 2001). In der vorliegenden Studie wird eine temporäre, inkomplette zerebrale Ischämie mit anschließender Reperfusion induziert. Durch Verschluss der rechten *A. carotis communis* und gleichzeitiger systemischer Hypotension auf einen MAP von 40 mmHg wird ein ausgeprägter Zellschaden in den selektiv vulnerablen Gebieten, insbesondere der Hippokampusformation, erzeugt.

#### **4.1.2 Semi-quantitative Proteinbestimmung durch Immunfluoreszenz-Färbung**

Mit der Immunfluoreszenz-Färbung wird die Expression der Apoptose-assoziierten Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 in den Hippokampusregionen CA1, CA3 und dem unteren Ast des Gyrus dentatus in ihrer Intensität und ihrer räumlichen Verteilung untersucht und verglichen. Diese Methode der Immunhistochemie wird routinemäßig zur Markierung der oben genannten Proteine verwendet (MATSUMOTO et al. 1993, KRAJEWSKI et al. 1994).

Der Nachweis der Proteine erfolgt hierbei sehr spezifisch und mit nur wenig Störung durch Anfärben des Hintergrunds, da der erste und zweite Antikörper in gereinigter und hochspezifischer Form vorliegen. Mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop können Fluorochrome in hoher Auflösung dargestellt werden, da Streulicht weitestgehend eliminiert wird. Von großem Vorteil ist es, die räumliche Verteilung der exprimierten Proteine erfassen zu können, um gezielt die Regionen zu untersuchen, die besonders vulnerabel sind. Die hier angewendete semi-quantitative Analytik der Proteinmenge ermöglicht es, bei einer korrekteren und protokollmäßigen Analyse, auf die Konzentration der Proteinexpression zurück zu schließen.

Als Nachteil dieser Methode muss der enorme Aufwand, sowohl an Zeit als auch an Material, genannt werden. Zusätzlich besteht ein Problem in der schnellen Abnahme der Fluoreszenzintensität durch Lichtexposition und Verblässen mit zunehmender Zeit. Weiterhin

hängt die Richtigkeit der erzielten Ergebnisse von Qualität der Antikörper und dem schonendem Umgang damit ab.

Vor Beginn der Studie erfolgt eine Etablierung der zu verwendenden Antikörper. Proben mehrerer verschiedener Chargen und in jeweils unterschiedlichen Verdünnungen werden einem gesamten Probelauf unterzogen. Im Versuch werden die Antikörper in der Konzentration benutzt, die die besten Ergebnisse (optimale Fluoreszenz bei minimaler Hintergrundfärbung) erzielt haben. Die Antikörper werden portioniert eingefroren und erst kurz vor Gebrauch aufgetaut, um einen lagerungsbedingten Qualitätsverlust zu minimieren.

Bei jedem einzelnen Färbedurchgang werden in dieser Studie Positiv- und Negativkontrollen angefertigt, um so Färbefehler ausschließen zu können. Die Untersuchung mit dem Laserscan-Mikroskop erfolgt in einem Zeitfenster von 16 bis 20 Stunden, um eine vergleichbare Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erfassen. Mögliche Schwankungen des Laserscan-Mikroskops werden durch direkte (Powermeter) und indirekte („Beads“) Messung der Laserleistung erfasst und über Umrechnungsfaktoren in die endgültigen Ergebnisse mit einbezogen.

Trotz oben genannter konstanter Versuchsparameter und optimaler Durchführung der Färbeabläufe können geringe Schwankungen in der Fluoreszenzintensität nicht ausgeschlossen werden. Unterschiedliche Lagerungszeiten der histologischen Schnitte bis zur weiteren Verarbeitung und Einflüsse nicht konstant zu haltender Umweltbedingungen könnten die zeitweiligen Abweichungen der Ergebnisse in der Fluoreszenzintensität erklären.

#### **4.1.3 Proteinkonzentrationsbestimmung durch die Western-Blot-Analyse**

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse werden Proteinsuspensionen aus dem Hippokampus auf die Apoptose-assoziierten Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 untersucht. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Überführung auf eine Membran werden diese mit Antikörpern markiert und anschließend mit Hilfe einer CCD-Kamera sichtbar gemacht.

Die Western-Blot-Analyse ist ein anerkanntes und bewährtes Verfahren zur qualitativen und semi-quantitativen Untersuchung von Proteinen, mit deren Hilfe auch geringste Konzentrationen einer gesuchten Substanz noch detektiert werden können (WESTERMEIER 1997). Bei der semi-quantitativen Bestimmung von Proteinen durch dieses Analyseverfahren besteht durch zahlreiche Einzelschritte, eine Vielzahl verwendeter Reagenzien und einem Einzelanalysezeitraum von zwei Tagen ein Risiko für die Exaktheit der Ergebnisse. Eine sichere Beurteilung der gewonnenen Daten erfordert strenges Einhalten des Versuchsprotokolls und der Versuchsdurchführung von kompetentem und geschultem

Laborpersonal. In der vorliegenden Studie wurde daher die Probenaufbereitung von immer derselben Person, die Western-Blot-Analysen des gesamten Versuchs von der Autorin und einer weiteren Doktorandin streng nach Protokoll durchgeführt

Vor Beginn der Studie erfolgt ebenso wie bei der Immunfluoreszenz-Färbung eine Etablierung verwendeter Antikörper, um deren Chargen und Konzentrationen für bestmögliche Ergebnisse (einzelne, deutliche Banden mit minimaler Hintergrundfärbung) zu ermitteln.

Die Vergleichbarkeit der Einzelergebnisse der Studie wurde zum einen durch Herstellung eines Standards gewährleistet, der während des gesamten Versuchs bei jeder Einzelanalyse mitgemessen wird und durch seine konstante Proteinmenge und sein konstantes Volumen somit eine Basis zur Berechnung schafft.

Zum anderen wurde ein Proteingleich der Proben nach BRADFORD (1976) zu Beginn der Studie durchgeführt, um gleiche Proteinmengen, in der vorliegenden Studie je 20 µg, als Ausgangswert in den Proben zu gewährleisten und untereinander vergleichen zu können.

An die Gelelektrophorese anschließend findet das Blot-Verfahren statt, um die aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu überführen. Im sogenannten Semi-Dry-Verfahren, das im Vergleich zu anderen Methoden kürzere Transferzeiten und einen geringeren Verbrauch an Transferpuffern erfordert, ist die z. T. erhebliche Erwärmung des Blottes als kritisch zu beurteilen. Einer Schädigung der Proteine wird in dieser Studie durch längere Transferzeiten unter niedrigerer Stromstärke vorgebeugt. Zum Einsatz kamen nur neuwertige, regelmäßig gewartete Geräte.

Die Spezifität des 1. Antikörpers wird vor Versuchsbeginn durch ein blockierendes Peptid bewiesen, das die Bindungsdeterminante des Antikörpers an das Zielprotein blockiert und somit unspezifische Bindungen des Antikörpers ausschließen kann. Der 2. Antikörper, der gegen konstante Bereiche des 1. Antikörpers gerichtet ist, macht die Bindung über ein Enzymsystem sichtbar, welches über eine Signalverstärkung einen Amplifikationseffekt hervorruft. Alle Antikörpersuspensionen und Reagenzien werden für jede Einzelanalyse frisch hergestellt und durchgehend gekühlt.

Im Gegensatz zu einer Auswertung der Chemilumineszenz mit dem Röntgenfilm ermöglicht es in der vorliegenden Studie die Aufnahme mit einer CCD-Kamera Intensitätsunterschiede von mehr als 5000 Graustufen exakt zu bestimmen. Die Quantifizierung der Banden lässt sich dadurch wesentlich genauer durchführen.

In der vorliegenden Studie zeigen die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse und der Immunfluoreszenz-Färbung hinsichtlich ihrer signifikanten Unterschiede nur bedingt



Übereinstimmungen, ein Trend in dieselbe Richtung kann jedoch festgestellt werden. Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich eine unterschiedliche Probengewinnung der Untersuchungsverfahren zu nennen. Während das Probenmaterial für die Western-Blot-Analyse präparationsbedingt neben dem sensitiven Hippokampus auch Gewebe aus dem weniger sensitiven hippokampalen Randbereich enthält, werden in der Immunfluoreszenz-Färbung einzelne Zellen des besonders vulnerablen Hippokampus auf Apoptose-Proteine untersucht. Zusätzlich erfordert eine semi-quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration in der Western-Blot-Analyse eine Auswertung einzelner Proteinbanden. Da die gesuchten Proteine in verschiedenen Fraktionen vorliegen können und auch andere der aufgetrennten Proteine oft ähnliche Größen aufweisen, können die einzelnen Proteinbanden nahe beieinander liegen. Ein exaktes Umranden der einzelnen Bande lässt trotz mehrfacher Vergrößerung der Aufnahmen und Verwendung des Mittelwertes aus dreifacher Wiederholung Schwankungen der Werte zu.

Insgesamt ist die Western-Blot-Analyse hinsichtlich einer qualitativen Bestimmung von Proteinen als ideales Verfahren, hinsichtlich einer semi-quantitativen Analyse allerdings vorsichtig einzustufen.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Intraoperativ erhobene Parameter**

Während der operativen Phase kontinuierlich erhobene Kreislauf-, Atem- und Stoffwechselfparameter beinhalten Messungen der Gehirndurchblutung, des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) und der Herzfrequenz, der arteriellen Blutgase ( $\text{PaO}_2$  und  $\text{PaCO}_2$ ), der Hämoglobin- und der Glukosekonzentration und des pH-Wertes des Blutes sowie der rektalen und perikraniellen Körpertemperatur.

Die Überwachung dieser Parameter gewährleistet eine konstante und vergleichbare Versuchsdurchführung, da unkontrollierte Schwankungen von Kreislauf und Metabolismus des Tieres einen möglichen Einfluss auf das Ausmaß des induzierten zerebralen Schadens haben könnten.

Während der Ischämie wird protokollgemäß durch Hypotension eine zum Ausgangswert signifikante Senkung des MAP bei den operierten Versuchstieren (Dexmedetomidin- und Kontroll-Gruppe) auf 40 mmHg induziert. In der vorhergehenden Äquilibrations- und der anschließenden Erholungsphase liegen die Werte im physiologischen Bereich. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, die nach dem im Kap. 2.4.1

beschriebenen Auswirkungen einer Dexmedetomidin-Applikation auf den Blutdruck in der Äquilibrierungsphase zu erwarten gewesen wären. Ein Grund könnte in der im Versuch verwendeten relativ hohen und als Bolus applizierten Dosierung des  $\alpha$ -Adrenozeptor Agonisten liegen, die die Fähigkeit der Regulationsmechanismen, innerhalb der Äquilibrierungsphase entgegenzuwirken, übersteigt.

Ein Vergleich zwischen den Versuchsgruppen zeigt bei den Werten der Herzfrequenz eine signifikante Erniedrigung in der Dexmedetomidin-Gruppe, alle Werte liegen jedoch innerhalb des Normbereiches. Ursächlich scheint hierfür die bradykarde Wirkung des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten, die allerdings in diesem geringen Ausmaß keine Auswirkungen auf die Ergebnisse des Versuchs hat. Ein leichter Anstieg der Herzfrequenz bei beiden Gruppen während der Ischämie ist auf die Hypotension und die damit verbundene erzwungene Leistungssteigerung des Herzens zurückzuführen.

Sowohl Sauerstoffpartialdruck  $paO_2$  (mmHg), als auch Kohlendioxidpartialdruck  $paCO_2$  (mmHg), liegen bei beiden Versuchsgruppen im physiologischen Referenzbereich und lassen intraoperativ innerhalb der Untersuchungsgruppe keine signifikanten Veränderungen erkennen. Im Vergleich der beiden Versuchsgruppen findet man auch hier eine signifikante Erniedrigung der  $paO_2$ - und Erhöhung der  $paCO_2$ -Werte in der Dexmedetomidin-Gruppe, die auf eine geringe respiratorische Depression des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten zurückgeführt werden kann. Da alle Werte im physiologischen Bereich liegen, wird das Versuchsergebnis davon nicht beeinflusst.

Die Messwerte des Hämoglobins sinken während der Ischämie signifikant zum Ausgangswert ab. Ähnlich der Senkung des MAP ist dies auf den massiven Blutentzug während der Ischämie zurückzuführen, da einerseits eine Kompensation der Volumenmangelsituation durch Mobilisation von Flüssigkeit aus dem Interstitium stattfindet. Zum anderen lässt sich unter diesen Bedingungen weniger gebundenes Hämoglobin pro Volumeneinheit feststellen. Nach Reinfusion des entzogenen Blutes normalisieren sich die Hämoglobinwerte umgehend.

Um einer Azidose vorzubeugen werden die Versuchstiere vor dem Versuch 16 Stunden nüchtern und damit niedrig normoglykäm gehalten. Ein erhöhter Glukosegehalt des Blutes während einer Ischämie hat aufgrund des  $O_2$ -Mangels eine anaerobe Energiegewinnung, einen verlangsamten Abtransport durch verringerte Stoffwechselleistung und somit eine Laktatanreicherung zur Folge (MEHMET et al. 1998). Das Ausmaß des neurologischen Schadens kann durch diese Laktatazidose beeinflusst und damit das vermeintliche Ergebnis des getesteten Medikaments verfälscht werden. 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 Konstanzhaltung 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. Der signifikant erhöhte Glukosewert in der Dexmedetomidin-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe könnte auf die Wirkung Dexmedetomidins auf den Insulinspiegel zurückzuführen sein. Die trotz gleicher Behandlung aller Tiere entstehenden Unterschiede in den Blutglukosewerten beider Versuchsgruppen, die sich durch individuelle Stoffwechselunterschiede zwangsläufig ergeben, bewegen sich alle innerhalb des physiologischen Bereichs von 60 bis 80 mg/dl und dürften somit das Gesamtergebnis zur Neuroprotektion von Dexmedetomidin nicht beeinflussen.

Der pH-Wert wird während des Versuchs überwacht und bei Bedarf abgepuffert, so dass keine Schwankungen der Werte auftreten. Eine Veränderung des Blut-pH-Wertes könnte negative Einflüsse auf das Gehirngewebe und den induzierten Schaden haben.

Ebenfalls überwacht und reguliert wird während des gesamten operativen Teils die periphere und perikranielle Körpertemperatur, da Nagetiere unter Narkose eine gestörte Thermoregulation aufweisen und sehr schnell auskühlen (PADDLEFORD und ERHARDT 1992). Mit einer an die Sensoren rückgekoppelten Wärmelampe, die sich nach Bedarf ein- und ausschaltet, wird die für diesen Versuch entscheidende perikranielle Temperatur konstant gehalten. Da Körper- und Gehirntemperatur während eines ischämischen Insultes voneinander abweichen (SEBEL et al. 1988), ist die separate Kontrolle der Gehirntemperatur notwendig, um einen neuroprotektiven Einfluss einer Hypothermie auf das Gehirn auszuschließen. Die Temperaturwerte beider Versuchsgruppen sind zu jedem Messzeitpunkt im physiologischen Bereich.

Die Werte der Gehirndurchblutung zeigen während der Ischämie in beiden Versuchsgruppen einen signifikanten Abfall zum Ausgangswert, allerdings verläuft dieser Abfall in der Dexmedetomidin-Gruppe wesentlich moderater als der der Kontroll-Gruppe. Ursächlich dafür ist eine unmittelbar nach Applikation des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten einsetzende Hypotension, die bereits das Messergebnis des Ausgangswerts absenkt und somit die prozentuale Veränderung der folgenden Werte abschwächt. Die Durchblutungsrate des Gehirns ist bei einem MAP von unter 60 mmHg direkt linear an den mittleren arteriellen Blutdruck gekoppelt. Die protokollgemäße Senkung des MAP auf 40 mmHg durch den iatrogenen Blutentzug aus der *V. femoralis* und der zusätzliche Verschluss der rechten A.

*carotis communis* haben eine Reduktion der Hirndurchblutung in der rechten Gehirnhälfte auf unter 50 %, in der linken Gehirnhälfte auf ca. 70 % zu Folge.

#### **4.2.2 Potentiell neuroprotektive Wirkung von Dexmedetomidin**

Ergebnisse der eigenen und anderer zahlreicher tierexperimenteller Studien (siehe Kap. 2.4.2) weisen darauf hin, dass durch eine Behandlung mit dem  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten das Ausmaß neurologischer Defizite und des neuronalen Zellschadens verringert werden können. Der genaue Mechanismus, der dieser Neuroprotektion zu Grunde liegt, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht aufgeklärt. Er besteht wahrscheinlich aus einer Kombination der vielfältigen physiologischen und metabolischen Veränderungen, die Dexmedetomidin verursacht.

So zeigten HOFFMAN et al. (1991) unter intraperitonealen Gabe von Dexmedetomidin bei inkompletter zerebraler Ischämie einen Abfall sympathischer Aktivitäten, insbesondere der Noradrenalin-Plasmakonzentration, der mit vermindertem neurologischem Defizit einherging. Unterstützt wird diese Theorie von WERNER et al. (1990), die nach zerebraler Ischämie eine Verbesserung der neurologischen Werte über eine Ganglienblockade erreichten, was jedoch durch Katecholamininfusion reversibel war. Weitere Studien folgten, die eine Absenkung der NoradrenalinKonzentration durch Dexmedetomidin zeigten (MATSUMOTO et al. 1993, KUHMONEN et al. 1997, TALKE et al. 2000).

Ein zweiter wichtiger Modulator in der Kaskade des Zelluntergangs ist Glutamat. Eine Möglichkeit des neuroprotektiven Mechanismus könnte darin bestehen, dass von Dexmedetomidin die vermehrte Ausschüttung von Glutamat nach Depolarisation oder ischämischen Stress gehemmt (TALKE et al. 2000) oder der Glutamat-Abbau durch Oxidation gefördert wird (HUANG et al. 2000).

Im Kontrast dazu fanden ENGELHARD et al. (2002), dass nach zerebraler Ischämie durch den  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten zwar ein Anstieg der zirkulierenden Katecholamine gehemmt, die Erhöhung von Noradrenalin und Glutamat im Gehirn jedoch nicht unterdrückt wird.

Die sympatholytische Wirkung von Dexmedetomidin als Vasokonstriktor führt zu einer verminderten Durchblutung im Gehirn, was dazu beitragen könnte, den Schaden bei Reperfusion durch freie Radikale und Lipidperoxidasen zu vermindern (YOSHIDA et al. 1980).

Bei zahlreichen anderen Effekten einer Dexmedetomidin-Anwendung, wie z.B. milde Hypothermie und Glukoseanstieg, konnte bisher kein Zusammenhang mit der neuroprotektiven Potenz des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten hergestellt werden.

Einen frühen Ansatzpunkt in der Kaskade des Zelluntergangs zeigten WITTNER et al. (1997) an Gerbils. Dexmedetomidin reduzierte die Expression des Gens c-fos und seines Hitzeschockproteins hsp70, das bei Stress auf die Zelle vermehrt gebildet wird. Ähnlich frühzeitige Auswirkungen des Dexmedetomidin auf die Abläufe des Zelluntergangs beobachteten ENGELHARD et al. (2003), in deren Studie eine Veränderung der Modulation von Apoptose-assoziierten Proteinen nach Applikation von Dexmedetomidin erzielt werden konnte.

### **4.2.3 Proteinanalyse mit Immunfluoreszenz-Färbung und Western-Blot-Analyse**

Als Modulatoren der Apoptose spielen die Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 eine wichtige Rolle im Ablauf des programmierten Zelltods (PADOSCH et al. 2001). Zur Untersuchung eventueller neuroprotektiver Einflüsse von Dexmedetomidin während einer zerebralen Ischämie sind die Expressionsmuster dieser Apoptose-assoziierten Proteine und deren quantitative Messung ausgewählt worden, da deren Einfluss bei Abläufen des programmierten Zelltodes bereits seit längerem bekannt ist (CHOI 1996, CHOPP und LI 1996, CHARRIAUT-MARLANGUE et al. 1998, LI et al. 1998).

#### **4.2.3.1 Analyse des Bax-Proteins**

Das Bax-Protein ist ein pro-apoptotisches Molekül aus der Bcl-2-Familie, das den apoptotischen Zelltod fördert (OLTVAI et al. 1993). Die vorliegende Studie zeigt, dass im Zeitverlauf von vier Wochen nach einer zerebralen Ischämie die Expression von Bax in der Dexmedetomidin-Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren unterdrückt wird. Die Werte der Behandlungsgruppe zeigen zu nahezu jedem Untersuchungszeitpunkt und in beiden Hemisphären eine signifikante Erniedrigung des pro-apoptotischen Bax-Proteins im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Eine unterdrückte Bax-Expression der Dexmedetomidin-Gruppe lässt darauf schließen, dass Versuchstiere unter Fentanyl/Lachgas-Narkose einem ischämischen Schaden ausgesetzt sind, der bei den Tieren unter Dexmedetomidin-Applikation „abgeschwächt“ wird. Die Tiere der Kontroll-Gruppe sind offenbar nicht durch das potentielle Neuroprotektivum Dexmedetomidin geschützt. Vergleichbare Ergebnisse finden sich in einer

Studie bei Ratten von GILLARDON et al. (1996) wieder, in der erhöhte Bax-Expression der Kontrolltiere sechs Stunden nach fokaler Ischämie gemessen werden konnte. Im weiteren zeitlichen Verlauf betrachtet decken sich die Ergebnisse der eigenen Studie mit den Untersuchungen von KRAJEWSKI et al. (1995), in der nach einer transienten Ischämie ein erhöhter Bax-Spiegel ungeschützter Tiere über mehrere Tage hinweg gemessen werden konnte. Auch HARA et al. untersuchten 1996 die Bax-Expression und deren zeitlicher Verlauf nach transients Frontalhirnischämie bei Gerbils, wobei allerdings anders als in der vorliegenden Studie ein Expressionsmaximum für Bax nach 72 Stunden und ein anschließendes Absinken der Proteinkonzentration beobachtet wurde. Gründe dafür liegen wahrscheinlich in erster Linie an einem unterschiedlichen Ischämiemodell und der nur 5 Minuten andauernden Ischämiezeit.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung zeigen an nahezu allen Untersuchungszeitpunkten eine signifikant höhere Expression des pro-apoptischen Proteins Bax der Kontrolltiere, während die Western-Blot-Analyse dies nur im Trend bestätigt. Mögliche Ursachen sind der Methodenkritik in Kap. 4.2.3 zu entnehmen.

#### 4.2.3.2 Analyse des p53-Proteins

Als einer der wichtigsten Modulatoren des programmierten Zelltodes war nach Induktion eines zerebralen Schadens in vorliegender Studie eine temporäre Erhöhung des Tumorsuppressor-Proteins p53 vor allem in der Kontroll-Gruppe zu erwarten. Seine Interaktion mit dem Bax-Protein (MYIYASHITA und REED 1995) ließ, passend zu dessen signifikanten Erhöhungen, eine deutlich vermehrte Expression von p53 in den eigenen Untersuchungen vermuten. Sowohl immunhistologische als auch -chemische Analysen zeigen während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine Unterschiede der p53-Expression zwischen den Versuchsgruppen. In Studien von LI et al. (1994) konnte ein Expressionsmaximum des mutierten Proteins (m-p53) nach 12 Stunden beobachtet werden, nach 168 Stunden war es nicht mehr nachweisbar. Die wild-typ Form des p53 (w-p53) konnte zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Auch in der vorhergehenden Studie von CHOPP et al. (1992) konnte eine erhöhte p53-Konzentration zwölf Stunden nach inkompletter, zerebraler Ischämie festgestellt werden. Ursache für die Ergebnisse der eigenen Studie könnte die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers sein, der durch Hintergrundfärbung und nur schwer identifizierbarer Banden eine Auswertung schwierig und fehleranfällig macht. Außerdem stammt der verwendete Antikörper aus hyperimmunisierten Mäusen mit

rekombinantem wt-p53. Die Reaktion des Antikörpers mit m-p53 wird vom Hersteller zwar zugesichert, könnte aber theoretisch durch die Blockade des wt-p53 durch m-p53 die Ergebnisse verfälschen. Ein dritter Kritikpunkt ist die schwache Spezifität des verwendeten Antikörpers, der nach Herstellerangaben vor allem wt-p53 und m-p53 menschlichen Ursprungs detektiert. Das in dieser Studie verwendete Untersuchungsmaterial stammt jedoch von Ratten, wodurch eventuell eine nur schwache Kreuzreaktion ausgelöst werden kann. Die Fähigkeit des p53-Proteins zur Bildung von Komplexen mit Mdm-2 oder anderen Proteinen stellt eine weitere Schwierigkeit in der Antikörperbindung dar, da bisher nicht geklärt ist, inwieweit der verwendete Antikörper in Komplexe gebundenes p53 detektieren kann. Oben genannte Problematik bei der Spezifität des Antikörpers könnte die insgesamt schwachen und nicht signifikanten Ergebnisse unserer Analytik erklären. Aus Mangel an Alternativen zum derzeitigen Zeitpunkt kann der verwendete Antikörper nicht ersetzt werden, da spezifischere Antikörper bisher nicht erhältlich sind. Eine zusätzliche Analyse der p53 mRNA könnte zur genaueren Untersuchung der Proteinexpression herangezogen werden.

#### 4.2.3.3 Analyse des Bcl-2-Proteins

In der vorliegenden Studie ergeben sich immunhistochemisch am 1. und 3. Untersuchungstag, durch Western-Blot-Analyse bis zu 28 Tage postischämisch eine erhöhte Bcl-2-Expression in der Dexmedetomidin-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Das Bcl-2-Protein ist ein Regulator des programmierten Zelltodes und der Apoptose (KRAJEWSKI et al. 1994), das durch vermehrte Expression die Abläufe innerhalb der Apoptose-Kaskade inhibieren und Zellen vor dem Untergang bewahren kann (KLUCK et al. 1997). Eine Induktion des Bcl-2-Gens wird vor allem in Neuronen gefunden, die eine zerebrale Ischämie überlebt haben (GILLARDON et al. 1996). In der vorliegenden Studie sehen wir in beiden Gehirnhälften am ersten Untersuchungstag eine vermehrte Bcl-2-Expression in der Dexmedetomidin-Gruppe, die am Tag 3 nach zerebraler Ischämie im Vergleich zur Kontroll-Gruppe sogar signifikant erhöht ist. Im weiteren Verlauf zeigen die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung an den Untersuchungstagen 7 und 28 erniedrigte Bcl-2-Werte in der Behandlungsgruppe, während sich in der Western-Blot-Analyse eine tendenzielle Erhöhung beobachten lässt.

Verschiedene Studien beschreiben eine zeitabhängige Expression des Bcl-2-Proteins nach zerebraler Ischämie. So fanden z.B. CHEN et al. (1997) signifikante Immunreaktivität von Bcl-2 bis zu 72 Stunden nach der Ischämie in der CA3-Region und dem Gyrus dentatus. Frühere Studien beschreiben unveränderte oder verminderte Werte des Bcl-2 wenige Stunden

nach einem ischämischen Schaden (KRAJEWSKI et al. 1994). Vermutlich findet eine Expression des Proteins zu diesem frühen Untersuchungszeitpunkt noch in zu geringem Maße statt. Studien über einen Untersuchungszeitraum und der damit verbundenen Expression von Bcl-2 von mehr als 7 Tagen sind nicht verfügbar. Als Folgerung für die Ergebnisse der eigenen Studie kann der Nachweis einer erhöhten Bcl-2-Expression in der Dexmedetomidin-Gruppe zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten als Hinweis auf eine neuroprotektive Wirkung des  $\alpha_2$ -Agonisten zumindest bis zu vier Wochen betrachtet werden.

Untersuchungen an transgenen Mäusen mit Überexpression des Bcl-2-Proteins wiesen über eine Zeitspanne von 7 Tagen nach zerebraler Ischämie geringere Schäden des Gehirns auf als die Wildtyp-Kontrolltiere (MARTINOUE et al. 1994). Obwohl man diese Ergebnisse nicht unmittelbar mit denen der vorliegenden Studie vergleichen kann, sind sie dennoch ein weiteres Indiz dafür, dass erhöhte Expression des Bcl-2-Proteins mit Neuroprotektivität einhergeht.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der angewandten Analyseverfahren an den Untersuchungstagen 7 und 28 liegen vermutlich an der unter 4.2.3 diskutierten Methodik. In Hinsicht auf das Bcl-2-Protein zusätzlich zu berücksichtigen ist zum einen, dass dessen Konzentration in der CA1-Region des Hippokampus wesentlich niedriger als in der CA3-Region ist (KRAJEWSKI et al. 1995). Da in der Western-Blot-Analyse eine Gewebemischung aus allen Teilen des Hippokampus und dessen Randbezirken verwendet wird, könnten damit möglicherweise die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Analysemethoden erklärt werden. Zum anderen erscheint auf den digitalen Western-Blot-Aufnahmen der Bcl-2-Analyse nur die einzelne Bande des gesuchten Proteins, was hohe Spezifität des verwendeten Antikörpers beweist und eine exakte Umrandung erleichtert.

Als alternative und sensitive Untersuchungsmöglichkeit der Expressionsmuster von Bcl-2 wäre z.B. der Nachweis der Bcl-2-mRNA zu nennen.

#### 4.2.3.4 Analyse des Mdm-2-Proteins

Das Onkogen Mdm-2 übernimmt die Rolle des Gegenspielers zum Tumorsuppressor p53 und hat damit eine wichtige Aufgabe bei der Regulation der Apoptose. Eine Überexpression des Mdm-2 hat durch seinen Einfluss auf p53 eine hemmende Wirkung auf den Mechanismus des neuronalen Zelltodes. In der vorliegenden Studie zeigen die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse in der Dexmedetomidin-Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren in der rechten Gehirnhälfte am 1., 3. und 7. Tag eine signifikante Überexpression des Mdm-2-Proteins, in



der linken Hemisphäre zu allen Untersuchungszeitpunkten eine deutlich erhöhte Expression des Proteins. Die Werte der Immunfluoreszenz-Färbung bestätigen dies nur zum Teil im Trend. In der Studie von TU et al. (1998) wird die Expression des Mdm-2-Proteins nach einer transienten zerebralen Ischämie mit MCA-Okklusion in einem zeitlichen Verlauf von 48 Stunden untersucht. Übereinstimmend mit den eigenen Ergebnissen konnte ein erhöhter Mdm-2-Spiegel gemessen werden. Dessen maximale Expression fand in der Studie von TU et al. (1998) nach 24 Stunden statt, nach 48 Stunden konnte eine Abnahme der Expression beobachtet werden. In der eigenen Untersuchung ist die Mdm-2-Expression in der Western-Blot-Analyse nach 7 Tagen in der rechten Gehirnhälfte signifikant und nach 28 Tagen immer noch deutlich erhöht. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt liegen keine anderen Studien zum Expressionsmuster des Mdm-2 nach zerebraler Ischämie über einen längeren Untersuchungszeitraum vor. Da in der vorliegenden Studie eine erhöhte Expression des Mdm-2-Proteins auch noch nach 28 Tagen gemessen werden kann, muss davon ausgegangen werden, dass Mdm-2 nach zerebraler Ischämie auch langfristig eine Rolle bei apoptotischen Prozessen im Gehirn spielt und im zeitlichen Verlauf durch seine anti-apoptotische Wirkung zur Reduktion des neuronalen Zellschadens beiträgt. Eine signifikante Erhöhung des Proteins Mdm-2 bei den mit Dexmedetomidin behandelten Tieren bestätigt in dem hier beschriebenen Versuch die mögliche neuroprotektive Wirkung dieses  $\alpha_2$ -Agonisten auch über einen längerfristigen Zeitraum. Die Intensitätsunterschiede zwischen den Hemisphären in der Mdm-2-Expression könnten darin begründet liegen, dass der in der ischämischen Seite induzierte Schaden einen höheren Stimulus erzeugt, der die Ergebnisse der Dexmedetomidin-Gruppe dieser Gehirnhälfte signifikant von denen der Kontroll-Gruppe abhebt. Dies könnte durch weitere histologische Untersuchung überprüft werden. Die Ursachen für die schwachen Ergebnisse in der Immunfluoreszenz-Färbung sind analog mit denen der Bcl-2-Analyse zu sehen und werden bereits in den Punkten 4.2.3 und 4.1.2.2 diskutiert.

Zahlreiche Studien belegen eine neuronalen Apoptose nach globaler wie fokaler Ischämie (MAC MANUS et al. 1995, CHARRIAUT-MARLANGUE et al. 1996, CHOPP und LI 1996). Dabei ist ihr Nachweis an die Analyse Apoptose-assoziiierter Proteine gebunden, aus deren Vielzahl in der vorliegenden Studie vier ausgewählt wurden, die zur Regulation des programmierten Zelltodes dienen. Die Apoptose ist, wie die Nekrose, ein wichtiger Faktor für Entwicklung und Ausprägung des induzierten Infarkts. Die Bestimmung ihrer Aktivität kann als ein Indikator für Ausmaß und Größe des neuronalen Schadens in dem untersuchten Gebiet gesehen werden. Die quantitative Messung der Apoptose-regulierenden Proteine Bax, p53,

Bcl-2 und Mdm-2, deren Einfluss bei einer Ischämie bereits mehrfach beschrieben wurde (CHOPP et al. 1996, CHOI 1996, CHARRIAUT-MARLANGUE et al. 1998, LI et al. 1998), ist besonders zur Demonstration der zerebroprotektiven Eigenschaften von Dexmedetomidin geeignet. Diese Proteine stellen einen Teilprozess der Apoptosemechanismen dar, die durch weitere morphologische und biochemische Verfahren, wie z.B. die H&E-Färbung, die TUNEL-Färbung und die Bestimmung der aktivierten Caspase-3, ergänzt werden können.

Apoptotische Prozesse treten nach Aussage von TOMASEVIC et. al. (1999) im Hippokampus bis zu drei Tagen nach einer transienten globalen Ischämie auf. Da weitere Auswirkungen, die sich eventuell erst nach Wochen zeigen, bisher nur unzureichend untersucht worden sind, wurde in der eigenen Studie ein Zeitraum von 28 Tagen ausgewählt. Die vorliegende Studie demonstriert, dass auch bis zu einem Zeitraum von 28 Tagen nach einer inkompletten, zerebralen Hemisphärenischämie noch die Expressionsmuster der Apoptose-regulierenden Proteine durch den  $\alpha_2$ -Agonisten Dexmedetomidin beeinflusst werden können.

### **4.3 Fazit und Ausblick**

Ziel dieser Studie war es, die potentielle Neuroprotektivität des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten Dexmedetomidin anhand seines Einflusses auf die Expressionsmuster Apoptose-assoziiierter Proteine im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass bei Ratten, die einer temporären Hemisphärenischämie mit Reperfusion ausgesetzt werden, durch eine Behandlung mit Dexmedetomidin über einen Untersuchungszeitraum von 28 Tagen eine Überexpression pro-apoptotischer Proteine gehemmt und zugleich ein Hochregulieren anti-apoptotischer Proteine gefördert werden kann. Dies kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass durch eine Behandlung mit dem  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten das Ausmaß der Apoptose und somit auch des neuronalen Zellschadens über vier Wochen verringert werden kann. Neuroprotektive Eigenschaften des Dexmedetomidin können somit angenommen werden. Über den zugrunde liegenden Wirkungsmechanismus gibt es in der Literatur diverse Theorien. Tierexperimentell wurde eine kurzfristige Neuroprotektivität des Dexmedetomidin innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von wenigen Stunden nach Ischämie bereits nachgewiesen (HOFFMAN et al. 1991). In Bezug auf eine klinische Übertragbarkeit sollten die gewonnenen Ergebnisse allerdings vorsichtig beurteilt werden. In vorliegender Studie erfolgt eine

Applikation des Medikaments bereits vor dem ischämischen Insult, was unter realistischen Bedingungen nur selten möglich ist. Denkbar wäre allerdings ein klinischer Einsatz in Bereichen, bei denen ein vorhersehbares Risiko der zerebralen Ischämie besteht, z.B. bei chirurgischen Eingriffen wie Aneurysma- oder Bypassoperationen. Die Problematik hinsichtlich der Übertragbarkeit von Tiermodell zum Einsatz am menschlichen Patienten beinhaltet anatomische und physiologische Differenzen wie auch die Tatsache, dass im Gegensatz zum klinischen Patienten vergleichsweise junge und gesunde Versuchstiere den Verlauf und das Ausmaß eines neuronalen Schadens besser tolerieren. Es sollten daher weitere Untersuchungen des Einflusses von Dexmedetomidin auf einen ischämischen Insult an Tiermodellen durchgeführt werden, bei denen neben der Verwendung von Tieren aller Altersgruppen die Applikation des Medikaments erst während der Ischämie oder postischämisch erfolgt.

Die Ergebnisse dieser Studie liefern weitere wertvolle Hinweise zum Einsatz des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten Dexmedetomidin als Neuroprotektivum und zeigen die Expressionsmuster Apoptose-regulierender Proteine im zeitlichen Verlauf bis zu 28 Tagen auf

## 5 Zusammenfassung

### **„Der Einfluss des $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten Dexmedetomidin auf die Expression Apoptose-assoziiierter Proteine nach inkompletter Hemisphärenischämie bei der Ratte im protrahierten zeitlichen Verlauf“**

Ziel der vorliegenden Studie ist es, den Einfluss des  $\alpha$ -Adrenozeptor Agonisten Dexmedetomidin auf die Expression der Apoptose-assoziierten Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 nach inkompletter Hemisphärenischämie bei der Ratte in einem Zeitraum von 28 Tagen zu untersuchen. Es werden 72 männliche Sprague-Dawley Ratten ( $400 \text{ g} \pm 60 \text{ g KGW}$ ) vor Versuchsbeginn randomisiert folgenden Untersuchungsgruppen zugeteilt:

Gruppe 1: (n = 32, Kontrolle), Anästhesie mit Fentanyl und  $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$  ( $\text{FiO}_2 = 0,33$ )

Gruppe 2: (n = 32, Dexmedetomidin), Anästhesie mit Fentanyl und  $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$  ( $\text{FiO}_2 = 0,33$ ), zusätzlich 30 Minuten vor Ischämiebeginn Verabreichung eines Dexmedetomidin-Bolus intraperitoneal.

Eine weitere Unterteilung dieser Gruppen wird randomisiert nach Überlebensdauer von 1, 3, 7 oder 28 Tagen (je n = 8) vorgenommen.

Gruppe 3: (n = 8, Nativtiere), ohne jede Behandlung, dienen zur Ermittlung der Referenzwerte

Zur Analyse der Apoptose-assoziierten Proteine wird das Gewebe des Hippokampus mittels Immunfluoreszenz-Färbung und Western-Blot-Analyse untersucht. Die Dexmedetomidin-Gruppe zeigt durchgehend eine Verminderung der Expression des pro-apoptotischen Bax-Proteins verglichen mit den Kontrolltieren, deren Werte in der Immunfluoreszenzfärbung deutlich und zu jedem Zeitpunkt über den physiologischen Referenzwerten liegen. Die Expression des Bcl-2-Proteins ist an den Untersuchungstagen 1 und 3 in der Dexmedetomidin-Gruppe verglichen mit der Kontrolle deutlich und signifikant erhöht, Tag 7 und 28 zeigen nur geringe Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Ergebnisse der p53-Analysen zeigen keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen oder den Untersuchungszeitpunkten. Die Mdm-2-Expression der Dexmedetomidin-Tiere zeigt in der Western-Blot-Analyse signifikante und hochsignifikante Erhöhungen zu allen Untersuchungszeitpunkten verglichen mit der Kontroll-Gruppe, die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung bestätigen dies im Trend.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen darauf schließen, dass durch intraintrischämische Behandlung mit dem  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Agonisten Dexmedetomidin neuroprotektive Effekte

erzielt werden können, da Überexpression des Bax-Proteins auch über einen Zeitraum bis zu 4 Wochen inhibiert und gleichzeitig ein Hochregulieren der anti-apoptischen Proteine Bcl-2 und Mdm-2 induziert werden kann.

## 6 Summary

### Long-term effects of Dexmedetomidin on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia in rats

This study investigates the effect of the  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist Dexmedetomidine on the expression of the apoptosis-regulating proteins Bax, p53, Bcl-2 and Mdm-2 following incomplete cerebral ischemia in rats within a period of 28 days from the insult. 72 fasted male Sprague-Dawley rats (400 g) were randomly assigned to one of the following groups:

Group 1: (n = 32, controls): fentanyl and N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> (FiO<sub>2</sub> = 0.33)

Group 2: (n = 32, dexmedetomidine) : fentanyl and N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> (FiO<sub>2</sub> = 0.33), administration of dexmedetomidine intraperitoneal 30 min before ischemia, the animals of these groups were randomly assigned in groups (n = 8) with a postischemic observation period of 1, 3, 7 or 28 days.

Group 3: (n = 8, naive): without treatment, show reference value

The apoptosis-regulating proteins Bax, p53, Bcl-2 and Mdm-2 in the hippocampal regions were analysed qualitatively and quantitatively by using the Immunfluorescence-technique and the Western-Blot-technique. The concentration of the pro-apoptotic protein Bax is decreased in the hippocampus for at least 28 days after cerebral ischemia. The anti-apoptotic Bcl-2 protein was increased during the first three days after cerebral ischemia in group 2 compared to group 1. The Mdm-2 protein of group 2 was significantly increased during the whole period of investigation in the Western-Blot-analysis.

## 7 Literaturverzeichnis

Aantaa R., Kanto J., Scheinin M., Kallio K. und Scheinin H.  
Dexmedetomidine, an alpha 2-adrenoceptor agonist, reduces anesthetic requirements for patients undergoing minor gynecologic surgery  
Anaesthesiology 1990; 73; 230-35

Abbott Laboratories  
Precedex. Dexmedetomidine hydrochloride injection prescribing information  
Abbott Laboratories, USA 2000;

Aho M., Lehtinen A.M., Erkola O., Kallio A. und Korttila K.  
The effect of intravenously administered dexmedetomidine on perioperative hemodynamics and isoflurane requirements in patients undergoing abdominal hystorectomy  
Anaesthesiology 1991; 74; 997-1002

Astrup J., Siesjö B.K. und Symon L.  
Threshold in cerebral ischemia - the ischemic penumbra  
Stroke 1981; 12; 723-5

Baker C.J., Fiore A.J., Frazzini V.I., Choudhri T.F., Zubay G.P. und Solomon R.A.  
Intraischemic hypothermia decreases the release of glutamate in the cores of permanent focal cerebral infarcts  
Neurosurgery 1995; 36; 994-1001

Belleville J.P., Ward D.S., Bloor B.C. und Maze M.  
Effects of intravenous dexmedetomidine in humans. I. Sedation, ventilation, and metabolic rate  
Anaesthesiology 1992; 77; 1125-33

Bhrer M., Mappes A., Lauber R., Stanski D.R. und Maitre P.O.  
Dexmedetomidine decreases thiopental dose requirement and alters distribution pharmacokinetics  
Anaesthesiology 1994; 80; 1216-27

Bloor B.C., Ward D.S., Belleville J.P. und Maze M.  
Effects of intravenous dexmedetomidine in humans. II. Hemodynamic changes  
Anaesthesiology 1992; 77; 1134-42

- Bonnekoh P., Barbier A., Oeschles U. und Hossmann K.A.  
Selective vulnerability in the gerbil hippocampus: morphological changes after 5 min ischemia and long survival time  
Acta Neuropathol 1990; 80; 18-25
- Bottger A., Bottger V., Sparks A., Liu W.L., Howard S.F. und Lane D.P.  
Design of a synthetic mdm2-binding mini protein that activates the p53 response in vivo  
Curr Biol 1997; 7; 860-9
- Bradford M.M.  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding  
Analyt Biochem 1976; 72; 248-54
- Brierley J.B., Brown A.J. und Calverley J.  
Cyanide intoxication in the rat: physiological and neuropathological aspects  
J Neurol Neurosurg Psychiatry 1976; 39; 129-40
- Busto R., Dietrich W.D., Globus M.Y.-T., Valdés I., Scheinberg P. und Ginsberg M.D.  
Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury  
J Cereb Blood Flow Metabol 1987; 7; 729-38
- Charriaut-Marlangue C., Margail I., Represa A., Popovici T., Plotkine M. und Ben-Ari Y.  
Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an situ DNA fragmentation analysis  
J Cereb Blood Flow Metab 1996; 16; 186-94
- Charriaut-Marlangue C., Remolleau S., Aggoun-Zouaoui D. und Ben-Ari Y.  
Apoptosis and programmed cell death: a role in cerebral ischemia  
Biomed Pharmacother 1998; 52; 264-69
- Chen J., Graham S.H., Nakayama M., Zhu R.L., Jin K., Stetler R.A. und Simon R.P.  
Apoptosis repressor genes bcl-2 and bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia  
J Cereb Blood Flow Metab 1997; 17; 2-10
- Chen J., Lin J. und Levine A.J.  
Regulation of transcription function of the p53 tumor suppressor by the mdm2 oncogene  
Mol Med 1995; 1; 142-52



Chen J., Wu X., Lin J. und Levine A.J.  
Mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor supressor protein  
Mol Cell Biol 1996; 16; 2445-52

Chen S.T., Hsu C.Y., Hogan E.L., Halushka P.V., Linet O.I. und Yatsu F.M.  
Thromboxane, prostacyclin, and leukotrienes in cerebral ischemia  
Neurology 1986; 36; 466-470

Choi D.W.  
Ischemia-induced neuronal death  
Curr Opin Neurobiol 1996; 6; 667-72

Chopp M. und Li Y.  
Apoptosis in focal cerebral ischemia  
Acta Neurochir 1996; 66; 21-6

Chopp M., Li Y., Zhang Z.G. und Freytag S.O.  
P53 expression in brain after middle cerebral artery occlusion in the rat  
Biochem Biophys Res Commun 1992; 182; 1201-7

Cole D.J., Drummond J.C., Patel P.M. und Marcantonio S.  
Effects of viscosity and oxygen content on cerebral blood flow in ischemic and normal rat brain  
J Neurol Sci 1994; 124; 15-20

Cooper A.  
Some experiments and observations on tying the carotid and vertebral arteries  
Guys Hosp Rep 1836; 1; 458-75

Coursin D.B., Coursin D.B. und Maccioli G.A.  
Dexmedetomidine  
Curr Opin Crit Care 2001; 7; 221-6

Cox L.S. und Lane D.P.  
Tumor suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage  
Bio Essays 1995; 17; 501-8

de Lecinana A., Diez-Tejedor E., Carceller F. und Roda J.M.  
Cerebral ischemia: from animal studies to clinical practice. Should the methods be reviewed?  
Cerebrovasc Dis 2001; 11; 20-30

Dietrich W.D., Busto R., Globus M.Y.-T. und Ginsberg M.D.  
The importance of brain temperature in alterations of the blood-brain barrier following cerebral ischemia  
J Neuropathol Exp Neurol 1990; 49; 486-97

Dirnagl U. und Meisel A.  
Zerebrale Ischämie  
Handbuch der molekularen Medizin; Springer Verlag, Berlin; 1999; 510-33

Eberspächer E. (2001)  
Die Auswirkungen von Hypothermie auf die Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen nach inkompletter zerebraler Ischämie bei der Ratte  
Vet Med Diss, München

Ebert T.J., Hall J.E., Barney J.A., Uhrich T.D. und Colinco M.D.  
The effects of increasing plasma concentrations of dexmedetomidine in humans  
Anaesthesiology 2000; 93; 382-94

Ekert.P.G., Silke J. und Vaux D.L.  
Caspase inhibitors  
Cell Death Differ 1999; 6; 1081-6

Eklöf B. und Siesjö B.K.  
The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and energy state of the rat brain  
Acta Physiol Scand 1972; 86; 155-65

Eldadah B.A. und Faden A.I.  
Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury  
J Neurotrauma 2000; 17; 811-29

Ellis R.E., Yuan J.Y. und Horvitz H.R.  
Mechanism and functions of cell death  
Annu Rev Cell Biol 1991; 7; 663-98

Endres M., Kaps M. und Moskowitz B.M.  
Apoptosis and cerebral ischemia  
Nervenarzt 1998; 69; 459-64

Engelhard K., Werner C., Eberspächer E., Bachl M., Blobner M., Hildt E., Hutzler R. und Kochs E.  
The effect of the  $\alpha_2$ -agonist dexmedetomidine and the NMDA-antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats  
Anesth Analg 2003; 96; 524-31

Engelhard K., Werner C., Kaspar S., Möllenberg O., Blobner M., Bachl M. und Kochs E.  
Effect of the  $\alpha_2$ -agonist dexmedetomidine on cerebral neurotransmitter concentrations during cerebral ischemia in rats  
Anaesthesiology 2002; 96; 450-57

Fitch W.  
Brain metabolism  
Anaesthesia and Neurosurgery; St.Louis; edited by Cottrell JE, Smith DS. St. Louis, Mosby  
3rd Edition, 1994; 1; 1-16

Fleetwood-Walker S.M., Mitchell R., Hope P.J., Molony V. und Iggo A.  
An alpha 2 receptor mediates the selective inhibition by noradrenaline of nociceptive responses of identified dorsal horn neurons  
Brain Res 1985; 334; 243-54

Fortune J.B., Feustel P.J., Weigle C.G. und Popp A.J.  
Continuous measurement of jugular venous oxygen saturation in response to transient elevations of blood pressure in head-injured patients  
J Neurosurg 1994; 80; 461-68

Fragen R.J. und Fitzgerald P.C.  
Effects of dexmedetomidine on the minimum alveolar concentration (MCA) of sevoflurane in adults age 55 to 70 years  
J Clin Anesth 1999; 11; 466-70

Garcia J.  
Experimental ischemic stroke: a review  
Stroke 1984; 15; 5-14

Gertler R., Brown C., Mitchell D. und Silviu E.  
Dexmedetomidine: a novel sedative-analgesic agent  
BUMC Proc 2001; 14; 13-21

Gillardon F., Lenz C., Waschke K.F., Krajewski S., Reed J.C., Zimmermann M. und  
Kuschinsky W.  
Altered expression of Bcl-2, Bcl-x, Bax, and c-Fos colocalizes with DNA fragmentation and  
ischemic cell damage following cerebral artery occlusion in rats  
Molec Brain Res 1996; 40; 254-60

Ginsberg M.D. und Busto R.  
Rodent models of cerebral ischemia  
Stroke 1989; 20; 1627-42

Globus M.Y.-T., Alonso O., Dietrich W.D., Busto R. und Ginsberg M.D.  
Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic  
hypothermia  
J Neurochem 1995; 65; 1704-11

Goldin S.M., Subbarao K., Sharma R., Knapp A.G., Fischer J.B. und Daly D.  
Neuroprotective use-dependent blockers of Na<sup>+</sup> and Ca<sub>2+</sub> channels controlling presynaptic  
release of glutamate  
Ann N Y Acad Sci 1995; 765; 210-29

Graham D.I.  
The pathology of brain ischemia and possibilities for therapeutic intervention  
Br J Anaesth 1985; 57; 3-17

Graham D.I., Lantos P.L.  
Greenfield's Neuropathology  
6. Edition, Arnold, London, 1997; 86-90

Grände P.-O., Asgeirsson B. und Nordström C.-H.  
Volume-targeted therapy of increased intracranial pressure: the Lund concept unifies surgical  
and non-surgical treatments  
Acta Anaesth Scand 2002; 46; 929-41

Green D.R. und Reed J.C.  
Mitochondria and apoptosis  
Science 1998; 281; 1309-13

Hacke W., Kaste M. und Fieschi C.  
Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke  
JAMA 1995; 274; 1017-25

Haczek C. (2004)  
Der Einfluss des Anästhetikums Sevofluran auf die Expression Apoptose-assoziiierter Proteine nach inkompletter zerebraler Hemisphärenischämie bei der Ratte im protrahierten zeitlichen Verlauf  
Vet Med Diss, München

Haines D.S., Landers J.E., Engle L.J. und George D.L.  
Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins  
Mol Cell Biol 1994; 14; 1171-8

Hall E.D., Pazara K.E. und Braughler J.M.  
21-Aminosteroid lipid peroxidation inhibitor U74006F protects against cerebral ischemia in gerbils  
Stroke 1988; 19; 997-1002

Hall E.D., Yonkers P.A., Andrus P.K., Cox J.W. und Anderson D.K.  
Biochemistry and pharmacology of lipid antioxidants in acute brain and spinal cord injury  
J Neurotrauma 1992; 9; 425-42

Hall J.E., Uhrich T.D., Barney J.A., Arain S.R. und Ebert T.J.  
Sedative, amnestic, and analgesic properties of small-dose dexmedetomidine infusions  
Anesth Analg 2000; 90; 699-705

Hara A., Iwai T., Niwa M., Uematsu T., Yoshimi N., Tanaka T. und Mori H.  
Immunohistochemical detection of bax and bcl-2 proteins in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia  
Brain Res 1996; 711; 249-53

Harada K., Iwata M., Kono W., Shimonishi T. und Nakanuma Y.  
Distribution of apoptotic cells and expression of apoptosis-related proteins along the intrahepatic biliary tree in normal and non-biliary diseased liver  
Histopathol 2000; 37; 347-354

Haupt Y., Maya R., Kazaz A. und Oren M.  
Mdm2 promotes the rapid degradation of p53  
Nature 1997; 387; 296-99

Henke K., Weber B., Kneifel S., Wieser H.G. und Buck A.  
Human hippocampus associates information in memory  
PNAS online 1996; 10: 5884-9

Hebel R. und Stromberg M.W.  
Anatomy of the laboratory rat  
The Williams & Wilkins Company, Baltimore; 1976; 91-111, 19-44

Heiss W.D.  
Ischemic penumbra: evidence from functional imaging in man  
J Cereb Blood Flow Metab 2000; 20; 1276-93

Hengartner M.O. und Horvitz H.R.  
C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene bcl-2  
Cell 1994; 76; 665-76

Hesselink JR.  
The temporal lobe and limbic system.  
University of California, San Diego (UCSD), 1999; 124

Hockenberry D., Nunez G., Milliman C., Schreiber R.D. und Korsmeyer S.J.  
Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death  
Nature 1990; 348; 334-6

Hockenberry D., Oltavi Z.N., Yin X., Milliman C. und Korsmeyer S.J.  
Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis  
Cell 1993; 75; 241-51

Hoffman W.E., Braucher E., Pelligrino D., Thomas C., Albrecht R.F. und Miletich D.  
Brain lactate and neurological outcome following incomplete ischemia in fasted, nonfasted, and glucose-loaded rats  
Anaesthesiology 1990; 72; 1045-50

Hoffman W.E., Kochs E., Werner C., Thomas C. und Albrecht R.F.  
Dexmedetomidine improves neurologic outcome from incomplete ischemia in the rat  
Anaesthesiology 1991; 75; 328-32

Hollstein M., Rice K., Greenblatt M.S., Soussi T., Fuchs R., Sorlie T., Hovig E., Smith-Sorensen B., Montesano R. und Harris C.C.  
Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines  
Nucleic Acids Res 1994; 22; 3551-55

Honda R., Tanaka H. und Yasuda H.  
Oncoprotein mdm2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53  
FEBS Lett 1997; 420; 25-7

Housmans P.R.  
Effects of dexmedetomidine on contractility, relaxation, and intracellular calcium transients of isolated ventricular myocardium  
Anaesthesiology 1990; 73; 919-22

Huang R., Chen Y., Yu A.C.H. und Hertz L.  
Dexmedetomidine-induced stimulation of glutamine oxidation in astrocytes: a possible mechanism for its neuroprotective activity  
J Cereb Blood Flow Metab 2000; 20; 895-8

Hughes P.E., Alexi T., Yoshida T., Schreiber S.S. und Knusel B.  
Excitotoxic lesions of rat brain with quinolinic acid induces expression of p53 messenger RNA and proteins and p53-inducible genes bax and gadd-45 in brain areas showing DNA fragmentation  
Neuroscience 1996; 74; 1143-60

Husley T. und Purdy JB.  
Suicide: a strategy for life.  
Research magazine of the university of Georgia 1997; 22; 67

Hutchins J.B. und Barger S.W.  
Why neurons die: cell death in the nervous system  
Anat. Rec. (New Anat.) 1998; 253; 79-90

Hutchinson E.C. und Yates P.O.  
Cerebral infarction: the role of stenosis of the extracranial cerebral arteries  
Special report series of the medical research council, London 1961, No. 300. London:HMSO

Iwakuma T. und Lozano G.  
Mdm2, an introduction  
Mol Cancer Res 2003; 1; 993-1000

Jafar J.J., Johns L.M. und Mullan S.F.  
The effect of mannitol on cerebral blood flow  
J Neurosurg 1986; 64; 754-59

Kabat H., Dennis C. und Baker A.B.  
Recovery of functions following arrest of the brain circulation  
Am J Pathol 1941; 132; 737-47

Kahn Z.P., Munday I.T., Jones R.M., Thornton C., Mant T.G. und Amin D.  
Effects of dexmedetomidine on isofluran requirements in healthy volunteers. 1:  
pharmacodynamic and pharmacokinetic interactions  
Br J Anaesth 1999; 83; 372-80

Kallio A., Scheinin M., Koulu M., Ponkilainen R., Ruskoaho H., Viinamaki O. und Scheinin H.  
Effects of dexmedetomidine, a selective alpha 2-adrenoceptor agonist, on hemodynamic  
control mechanism  
Clin Pharmacol Ther 1989; 46; 33-42

Kanawati I., Yaksh T.L., Anderson R.E. und Marsh R.W.  
Effects of clonidin on cerebral blood flow and the response to arterial CO<sub>2</sub>  
Cereb Blood Flow Metab 1986; 6; 358-65

Karlsson B.R., Löberg E.M. und Steen P.A.  
Dexmedetomidine, a potent alpha 2-agonist, does not affect neuronal damage following  
severe forebrain ischemia in the rat  
Eur J Anaesthesiol 1995; 12; 281-85

Kastan M.B., Radin A.I., Kuerbitz S.J., Onyekwere O., Wolkow C.A., Civin C.I., Stone K.D.,  
Woo T., Ravindranath Y. und Craig W.  
Levels of p53 protein increase with maturation in human hematopoietic cells  
Cancer Res 1991; 51; 4279-86

Kempski O.S.  
Neuroprotektion  
Anaesthesist 1994; 43; 25-33

Kern S.E., Kinzler K.W., Bruskin A., Jarosz D., Friedman P., Prives C. und Vogelstein B.  
Identification of p53 as a sequence-specific DNA binding protein  
Science 1991; 252; 1608-711

Kerr J.F.R., Wyllie A.H. und Currie A.R.  
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics  
Br J Cancer 1972; 26; 239-57



Kharasch E.D., Hill H.F. und Eddy A.C.

Influence of dexmedetomidine and clonidine on human liver microsomal alfentanil metabolism

Anaesthesiology 1991; 75; 520-4

Kitt T.

Lehrbuch der allgemeinen Pathologie

Enke Verlag, Stuttgart, 1990; 158

Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., Green D.R. und Newmeyer D.D.

The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis

Science 1997; 275; 1132-6

Koc R.K., Akdemir H., Karakucuk E.I., Oktem I.S. und Menku A.

Effect of methylprednisolone, tirilazad mesylate and vitamin E on lipid peroxidation after experimental spinal cord injury

Spinal Cord 1999; 37; 29-32

Kothakota S., Azuma A., Reinhard C., Klippel A., Tang J., Chu K., McGarry T.J., Kirschner M.W., Kohts K., Kwiatkowski D.J. und Williams L.T.

Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis

Science 1997; 278; 294-98

Krajewski S., Krajewska M., Shabaik A., Miyashita T., Wang H.G. und Reed J.C.

Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of bcl-2

Am J Pathol 1994; 145; 1323-36

Krajewski S., Mai J.K., Krajewska M., Sikorska M., Mossakowski M.J. und Reed J.C.

Upregulation of Bax protein levels in neurons following cerebral ischemia

J Neurosci 1995; 15; 6364-76

Krause G.S., White B.C., Aust S.D., Nayini N.R. und Kumar K.

Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence

Crit Care Med 1988; 16; 714-26

Kuhmonen J., Pokorny J., Miettinen R., Haapalinna A., Jolkkonen J., Riekkinen P. und Sivenius J.

Neuroprotective effects of dexmedetomidine in the gerbil hippocampus after transient global ischemia

Anaesthesiology 1997; 87; 371-77

Kuroiwa T., Bonnekoh P. und Hossmann K.A.  
Prevention of postischemic hyperthermia prevents ischemic injury of CA1 neurons in gerbils  
J Cereb Blood Flow Metab 1990; 10; 550-6

Lämmli U.K.  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4  
Nature 1970; 15; 680-85

Lane D.P.  
p53, guardian of the genome  
Nature 1992; 358; 15-6

Lavigne M.H., Moskowitz M.A. und Larin F.  
Brain H3-catecholamine metabolism in experiment cerebral ischemia  
Neurology 1975; 25; 483-5

Levine A.J.  
p53, the cellular gatekeeper for growth and division  
Cell 1997; 88; 323-31

Li Y., Chopp M., Zhang Z.G., Zaloga C., Niewenhuis L. und Gautam S.  
p53-immunoreactive protein and p53 mRNA expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats  
Stroke 1994; 25; 849-56

Li Y., Powers C., Jiang N. und Chopp M.  
Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat  
J Neurol Sci 1998; 156; 119-32

Liebmann M.  
Blutversorgung des Gehirns  
Basiswissen Neuroanatomie; Thieme Verlag, Stuttgart; 1993; 113-17

Linnik M.D., Zobrist R.H. und Hatfield M.D.  
Distinct mechanism underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons  
J Neurosci 1993; 19; 1284-93

Ljunggren B., Schutz H. und Siesjö B.K.

Changes in energy state and acid-base parameters of the rat brain during complete compression ischemia

Brain Res 1974; 73277-89;

Lowry O.H., Passonneau J.V., Hasselberger F.X. und Schulz D.W.

Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain

J Biol Chem 1964; 249; 18-30

Mac Manus J.P., Hill I.E., Prestone E., Walker T. und Buchan A.M.

Differences in DNA fragmentation following transient cerebral or decapitation ischemia in rats

J Cereb Blood Flow Metab 1995; 15; 728-37

Mack P.F., Prerrine K., Kobylarz E., Schwartz T.H. und Lien C.A.

Dexmedetomidine and neurocognitive testing in awake craniotomy

J Neurosug Anesth 2004; 16; 20-25

Maier C.M., Steinberg G.K., Sun G.H., Zhi G.T. und Maze M.

Neuroprotection by the  $\alpha_2$ -adrenoreceptor agonist dexmedetomidine in a focal model of cerebral ischemia

Anaesthesiology 1993; 79; 306-12

Majno G. und Joris I.

Apoptosis, oncosis, and necrosis-an overview of cell death

Am J Pathol 1995; 146; 3-15

Maltzman W. und Czyzyk L.

UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells

Mol Cell Biol 1984; 4; 1689-94

Martin L.J., Al-Abdulla N.A., Brambrink A.M., Kirsch J.R., Sieber F.E. und Portera-Caillian C.

Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis

Brain Res 1998; Bulletin 46; 281-309

Martinou J.-C., Dubois-Dauphin M., Staple J.K., Rodriguez I., Frankowski H., Missotten M., Albertini P., Talabot D., Catsicas S., Pietra C. und Huarte J.  
Overexpression of bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia  
Neuron 1994; 13; 1017-30

Matsumoto M., Zornow M.H., Rabin B.C. und Maze M.  
The  $\alpha_2$  adrenergic agonist, dexmedetomidine, selectively attenuates ischemia-induced increases in striatal norepinephrine concentrations  
Brain Res 1993; 627; 325-29

Mehmet H., Yue X., Penrice J., Cady E., Wyatt J., Sarraf C., Squier M. und Edwards A.  
Relation of impaired energy metabolism to apoptosis and necrosis following transient cerebral hypoxia-ischaemia.  
Cell Death Different 1998; 5: 321-329

Mehmet H.  
Caspase find a new place to hide  
Nature 2000; 403; 29-30

Merry D.E. und Korsmeyer S.J.  
Bcl-2 gene family in the nervous system  
Ann Rev Neurosci 1997; 20; 245-67

Metz S.A., Halter J.B. und Robertson R.P.  
Induction of defective insulin secretion and impaired glucose tolerance by clonidine. Selective stimulation of alpha-adrenergic pathways  
Diabetes 1978; 27; 554-62

Michenfelder J. und Milde J.H.  
Influence of anesthetics on metabolic, functional and pathologic responses to regional cerebral ischemia  
Stroke 1975; 6; 405-10

Michenfelder J.D. und Theye R.A.  
Cerebral protection by thiopental during hypoxia  
Anaesthesiology 1973; 39; 510-17

Moll U.M., Riou G. und Levine A.J.

Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion  
Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89; 7262-66

Momand J., Zambetti G.P., Olson D.C., George D. und Levine A.J.

The Mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation  
Cell 1992; 69; 1237-45

Miyashita T. und Reed J.C.

Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene  
Cell 1995; 80; 293-99

Nakashima K., Todd M. und Warner D.

The relation between cerebral metabolic rate and ischemic depolarisation  
Anesthesiology 1995; 82; 1199-208

Narita M., Shimizu S., Ito T., Chittenden T., Lutz R.J., Matsuda H. und Tsujimoto Y.

Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria  
Proc Natl Acad Sci USA 1995; 95; 14681-6

Nemoto E.M., Bleyaert A.L., Stezoski S.W., Moossy J., Rao G.R. und Safar P.

Global brain ischemia: a reproducible monkey model  
Stroke 1977; 8; 558-64

Nemoto E.M., Klementavicius R., Melick J.A. und Yonas H.

Norepinephrine activation of basal cerebral metabolic rate for oxygen (CMRO<sub>2</sub>) during hypothermia in rats  
Anesth Analg 1996; 83; 1262-67

Nickel R., Schummer A. und Seiferle E.

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

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

Nishina K., Akamatsu H., Mikawa K., Shiga M., Maekawa N., Obara H. und Niwa Y.

The effects of clonidine and dexmedetomidine on human neutrophil functions  
Anesth Analg 1999; 88; 452-58

Oltvai Z.N., Milliman C. und Korsmeyer S.J.  
Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death  
Cell 1993; 74; 609-19

Oppenheim R.W.  
Cell death during development of the nervous system  
Annu Rev Neurosci 1991; 14; 453-501

Paddleford R.R. und Erhardt W.  
Anticholinergika und Anästhetika zur Prämedikation von Allgemeinanästhesien  
Anästhesie bei Kleintieren; Schattauer, Stuttgart; 1992; 21-5

Padosch S.A., Vogel P. und Böttiger B.W.  
Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie  
Anaesthesist 2001; 50; 905-20

Pfizer GmbH  
Domitor Injektionslösung, Produktinformation  
Pfizer GmbH Karlsruhe, 2003

Picksley S.M. und Lane D.P.  
The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53  
Bio Essays 1993; 15; 689-90

Pulsinelli W. und Brierley J.B.  
The temporal profile of ischemic neuronal damage in the four-vessel occlusion rat model  
Stroke 1979; 10; 492

Rosomoff H.L. und Holaday D.A.  
Cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption during hypothermia  
Am J Phys 1954; 179; 85-8

Scheinin B., Lindgren L., Randell T., Scheinin H. und Scheinin M.  
Dexmedetomidine attenuates sympathoadrenal responses to tracheal intubation and reduces the need for thiopentone and perioperative fentanyl  
Br J Anaesth 1992; 68; 126-31

Scheinin H., Aantaa R., Anttila M., Hakola P., Helminen A. und Karhuvaara S.  
Reversal of the sedative and sympatholytic effects of dexmedetomidine with a specific alpha 2-adrenoceptor antagonist atipamezole: a pharmacodynamic and kinetic study in healthy volunteers  
Anaesthesiology 1998; 89; 574-84

Schregel W., Bredenkötter U., Sihle-Wissel M. und Cunitz G.  
Transkranielle Dopplersonographie: Effekte intravenöser Anästhetika bei neurochirurgischen Patienten  
Ultraschall Med 1995; 16; 60-4

Sebel P.S., Glass P. und Neville W.K.  
Do evoked potentials measure depth of anaesthesia?  
Int J Clin Monit Comput. 1988; 5; 163-6

Siemkowicz E. und Gjedde A.  
Post-ischemic coma in rat: effect of different pre-ischemic blood glucose levels on cerebral metabolic recovery after ischemia  
Acta Physiol Scand 1980; 110; 225-32

Siesjö B.K.  
Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia; Part I: Pathophysiology  
J Neurosurg 1992; 77; 169-84

Siesjö B.K., Lundgren J. und Pahlmark K.  
The role of free radicals in ischemic brain damage: a hypothesis.  
Pharmacology of cerebral ischemia; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart; 1990; 319-23

Silverstein F.S., Buchanan K. und Johnston M.V.  
Perinatal hypoxia-ischemia disrupts striatal high-affinity glutamate uptake into synaptosomes  
J Neurochem 1986; 47; 1614-9

Stegemann U. (2004)  
Die Auswirkungen von Propofol auf die Expression Apoptose-assoziiierter Proteine nach inkompletter zerebraler Hemisphärenischämie im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen bei der Ratte  
Vet Med Diss, München

Taittonen M.T., Kirvela O.A., Aantaa R. und Kanto J.  
Effect of clonidine and dexmedetomidine premedication on perioperative oxygen consumption and haemodynamic state  
Br J Anaesth 1997; 78; 400-06

Talke P.  
Receptor-specific reversible sedation: beginning of new era of anesthesia?  
Anesthesiology 1998; 89; 560-61

Talke P., Chen R., Thomas B., Aggarwall A., Gottlieb A., Thorborg P., Heard S., Cheung A., Son S.L. und Kallio A.  
The hemodynamic and adrenergic effects of perioperative dexmedetomidine infusion after vascular surgery  
Anesth Analg 2000; 90; 834-39

Tamura A., Graham D.I., McCulloch J. und Teasdale G.M.  
Focal cerebral ischemia in the rat: 1. description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion  
J Cereb Blood Flow Metab 1981; 1; 53-60

Thompson C.B.  
Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease  
Science 1995; 267; 1456-62

Tomasevic G., Kamme F., Stubberöd P., Wieloch M., Wieloch T.  
The tumor suppressor p53 and its response gene p21<sup>WAF/Cip1</sup> are not markers of neuronal death following transient global cerebral ischemia  
Neuroscience 1999; 90: 781-792

Traystman R.  
Animal models of focal and global cerebral ischemia  
ILAR J 2003; 44; 85-95

Tsujimoto Y. und Shimizu S.  
Bcl2-family: life or death switch  
FEBS Lett 2000; 466; 6-10

Tu Y., Hou S.-T., Huang Z., Robertson G.S. und MacManus J.P.  
Increased mdm-2 expression in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion  
J Cereb Blood Flow Metab 1998; 18; 658-69



Venn R.M., Bradshaw C.J., Spencer R., Brealey D., Caudwell E., Naughton C., Vedio A., Singer M., Feneck R., Treacher D., Willatts S.M. und Grounds R.M.  
Preliminary UK experience of dexmedetomidine, a novel agent for postoperative sedation in the intensive care unit  
*Anaesthesia* 1999; 54; 1136-42

Venn R.M., Karol M.D. und Grounds R.M.  
Pharmacokinetics of dexmedetomidine infusions for sedation postoperative patients requiring intensive care  
*Br J Anaesth* 2002; 88; 669-75

Virtanen R., Savola J.M., Saano V. und Nyman L.  
Characterization of the selectivity, specificity and potency of medetomidine as an alpha 2-adrenoceptor agonist  
*Eur J Pharmacol* 1988; 150; 9-14

Wahlgren N.G. und Ahmed N.  
Neuroprotection in cerebral ischemia: facts and fancies-the need for new approaches  
*Cerebrovasc Dis* 2004; 17; 153-66

Wang K.K.  
Calpain and caspase: can you tell the difference?  
*Trends Neurosci* 2000; 23; 20-26

Werner C.  
Neuroprotektion  
*Neuroanaesthesie*; Thieme Verlag, Stuttgart; 2000; 121-42

Werner C., Hoffman W.E., Thomas C., Miletich D.J. und Albrecht R.F.  
Ganglionic blockade improves neurologic outcome from incomplete ischemia in rats: partial reversal by exogenous catecholamines  
*Anesthesiology* 1990; 73; 923-29

Westermeier R.  
Electrophoresis in practise: a guide to methods and applications of DNA and protein separations  
2. Edition, VHC, Weinheim, 1997, S. 175ff

Williams G.T.  
Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis  
Cell 1991; 65; 1097-98

Wittner M., Sivenius J. und Koistinaho R.  
Alpha 2-adrenoceptor agonist, dexmedetomidine, alters acute gene expression after global ischemia in gerbils  
Neurosci Lett 1997; 29; 75-8

Wolter K.G., Hsu Y., Smith C.L., Nechushtan A., Xi X. und Youle R.J.  
Movement of bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis  
J Cell Biol 1997; 139; 1281-92

Xu H., Aibiki M., Seki K., Ogura S. und Ogli K.  
Effects of dexmedetomidine, an alpha 2-adrenoceptor agonist, on renal sympathetic nerve activity, blood pressure, heart rate and central venous pressure in urethane-anesthetized rabbits  
J Auton Nerv Syst 1998; 71; 48-54

Yin X., Oltavi Z.N. und Korsmeyer S.J.  
BH1 and BH2 domains of bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with bax  
Nature 1994; 369; 321-23

Yoshida S., Inoh S., Asano T., Sano K., Kubota M., Shimazaki H. und Ueta N.  
Effects of transient ischemia on free fatty acids and phospholipids in the gerbil brain  
J Neurosurg 1980; 53; 323-31

Zivin J.A., Adams H.P. und Whisnant J.P.  
Animal models of stroke: are they relevant to human disease?  
Stroke 1990; 21; 981-83

Zornow M., Maze M., Dyck J.B. und Shafer S.L.  
Dexmedetomidine decreases cerebral blood flow velocity in humans  
J Cereb Blood Flow Metab 1993; 13; 350-3

Zornow M., Scheller M.S., Sheehan P.B., Strnat M.A. und Matsumoto M.  
Intracranial pressure effects of dexmedetomidine in rabbits  
Anesth Analg 1992; 75; 232-7

## 8 Verwendete Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
BE	Basenabweichung (engl. base excess)
BGA	Blutgasanalyse
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CBF	zerebraler Blutfluss (engl. cerebral blood flow)
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
CLSM	konfokales Laserscan-Mikroskop (engl.confocal)
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CPP	zerebraler Perfusionsdruck (engl. cerebral perfusion pressure)
DAP	diastolischer Blutdruck
DNA	Desoxyribonucleinacid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMED	Dexmedetomidin
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
EEG	Elektroenzephalogramm
et al.	et alii (lat. und Mitarbeiter)
EKG	Elektrokardiogramm
Fa.	Firma
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GD	Gyrus dentatus
h	Stunde
i.v.	intravenös
ICP	intrakranieller Druck (engl. intracranial pressure)
Isch	Ischämie
K <sup>+</sup>	Kalium
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
LDF	Laser-Doppler-Flussmessung
li	links
MAC	minimale alveoläre Konzentration (engl.minimal alveolar concentration)
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck (engl. mean arterial pressure)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
M.	Musculus
mRNA	messenger ribonucleinacid
n	Anzahl
N <sub>2</sub> O	Lachgas

Na <sup>+</sup>	Natrium
Neu-N-DAB	Einfachfärbung mit Diaminobenzodin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
paCO <sub>2</sub>	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
paO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	gepuffertes Natriumphosphat (engl.phosphored buffered sodium)
PBST	gepuffertes Natriumphospat mit Tween
P <sub>et</sub>	endtidaler Druck
pH	arterieller pH-Wert
PVDF	Polyvinylidenfluorid
re	rechts
Rep	Reperfusion
SAP	systolischer Blutdruck
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
tHb	Gesamthämoglobin (total Hb)
V.	Vena
Vol. %	Volumen Prozent
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 9 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des Hippokampus. ....	16
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Apoptosewege.....	21
Abbildung 3: Gegenüberstellung von Apoptose und Nekrose .....	22
Abbildung 4: Funktionsweise des konfokalen Laserscan Mikroskops.....	28
Abbildung 5: Aktuelle Übersicht über Tiermodelle der zerebralen Ischämie .....	32
Abbildung 6: Strukturformel von Dexmedetomidin (ABBOTT LABAROTORIES 2000). ...	38
Abbildung 7: Versuchstier nach Installation aller Sonden und Gefäßzugänge im stereotaktischen Rahmen. ....	51
Abbildung 8: Objektträger im Kryotom mit Gewebsschnitt.....	54
Abbildung 9: Feuchte Kammer bestückt mit Objektträgern.....	58
Abbildung 10: Darstellung des Hippokampus und seiner Regionen. ....	59
Abbildung 11: Blotkammer bestückt mit „Blot-Stapel“ aus Filterpapieren, Gel und PVDF- Membran.....	63
Abbildung 12 u. Abbildung 13: Graphische Darstellung der Laser-Doppler-Flussmessung...	76
Abbildung 14 u 15: Bax-Expression in den Neuronen .....	77
Abbildung 16 und Abbildung 17: Durchschnittliche Immunfluoreszenzintensität (Graustufen) des Bax-Proteins im Hippokampus der rechten (= ischämischen) und linken (= nicht- ischämischen) Hemisphären den vier untersuchten Tagen. ....	79
Abbildung 18 und Abbildung 19: Durchschnittliche Immunfluoreszenzintensität (Graustufen) des p53-Proteins im Hippokampus der rechten (= ischämischen) und linken (= nicht- ischämischen) Hemisphäre an den vier untersuchten Tagen. ....	81
Abbildung 20 und Abbildung 21: Durchschnittliche Immunfluoreszenzintensität (Graustufen) des Bcl-2-Proteins im Hippokampus der rechten (= ischämischen) und linken (= nicht- ischämischen) Hemisphären den vier untersuchten Tagen. ....	83
Abbildung 22 und Abbildung 23: Durchschnittliche Immunfluoreszenzintensität (Graustufen) des Mdm-2-Proteins im Hippokampus der rechten (= ischämischen) und linken (= nicht-ischämischen) Hemisphäre an den vier untersuchten Tagen. ....	85
Abbildung 24: Western-Blot-Analyse: Proben der Kontroll-Gruppe. ....	86
Abbildung 25: Western-Blot-Analyse: Proben der Dexmedetomidin-Gruppe.....	86
Abbildung 26 und Abbildung 27: Graphische Darstellung der Western-Blot-Analyse (durchschnittliche Schwärzungsintensität in %) des Bax-Proteins im Hippokampus der rechten (= ischämischen) und linken (= nicht-ischämischen) Hemisphäre an den vier untersuchten Tagen. ....	88
Abbildung 28 und Abbildung 29: Graphische Darstellung der Western-Blot-Analyse (durchschnittliche Schwärzungsintensität in %) des p53-Proteins im Hippokampus der rechten (= ischämischen) und linken (= nicht-ischämischen) Hemisphäre an den vier untersuchten Tagen.....	90
Abbildung 30 und Abbildung 31: Graphische Darstellung der Western-Blot-Analyse (durchschnittliche Schwärzungsintensität in %) des Bcl-2-Proteins im Hippokampus der rechten (= ischämischen) und linken (= nicht-ischämischen) Hemisphäre an den vier untersuchten Tagen.....	92
Abbildung 32 und Abbildung 33: Graphische Darstellung der Western-Blot-Analyse (durchschnittliche Schwärzungsintensität in %) des Mdm-2-Proteins im Hippokampus der rechten (= ischämischen) und linken (= nicht-ischämischen) Hemisphäre an den vier untersuchten Tagen.....	94

Tabelle 1: Gegenüberstellung von Apoptose und Nekrose nach PADOSCH et al. (2001) .....	23
Tabelle 2: Definierte Messzeitpunkte und physiologischen Parameter intraoperativ.....	52
Tabelle 3: Physiologische Messparameter während des operativen Teils .....	53
Tabelle 4: Ergebnisse der physiologischen Messparameter .....	72
Tabelle 5: Ergebnisse der Laser-Doppler-Flussmessung in % .....	74
Tabelle 6: Immunfluoreszenz-Intensität des Bax-Proteins.....	78
Tabelle 7: Immunfluoreszenz-Intensität des p53-Proteins .....	80
Tabelle 8: Immunfluoreszenz-Intensität des Bcl-2-Proteins .....	82
Tabelle 9: Immunfluoreszenz-Intensität des Mdm-2-Proteins .....	84
Tabelle 10: Relative Schwärzungsintensität des Bax-Proteins in der Western-Blot-Analyse .	87
Tabelle 11: Relative Schwärzungsintensität des p53-Proteins in der Western-Blot-Analyse..	89
Tabelle 12: Relative Schwärzungsintensität des Bcl-2-Proteins i. d. Western-Blot-Analyse ..	91
Tabelle 13: Relative Schwärzungsintensität des Mdm-2-Proteins i.d. Western-Blot-Analyse .	93

## 10 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.

## 11 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Susanne Jessica Zintner

Geboren am: 1. April 1975 in Regensburg als 2. Kind von Ingeborg und Helmut Zintner

Staatsbürgerschaft: deutsch

### Ausbildung:

1985-1994: Humanistischer Zweig des Gymnasiums  
Neutraubling  
Abschluss: Hochschulreife

1994-2000: Studium der Veterinärmedizin  
Ludwig-Maximilian-Universität, München  
Abschluss: Staatsexamen und Approbation

2000–2001: Dissertation in der Klinik für Anästhesiologie im  
Klinikum Rechts der Isar in München  
Thema: Der Einfluss des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor  
Agonisten Dexmedetomidin auf die Expression  
Apoptose-assoziiierter Proteine nach inkompletter  
zerebraler Hemisphärenischämie bei der Ratte im  
protrahierten zeitlichen Verlauf  
Durchführung des praktischen Versuchsabschnitts

seit Oktober 2003: Ergebnissauswertung und Abschluss der  
Dissertation



Berufserfahrung:

- 2001-2003 Praxisvertretung und Festanstellung in der Tierärztlichen Klinik für Pferde und Kleintiere Dr. med. vet. M. Scheuerer in Schierling (Opf.)
- 2002 /2003 Hospitanz in der Tierärztlichen Klinik für Pferde Dr. med. vet. W. Jahn - Dr. med. vet. V. Sill Bargteheide Hamburg
- 2005 Assistenzärztin in der Tierklinik Seehof, Dr. S. Rattenhuber in Diessen a.A.

Praktika:

- 1998: Kleintierklinik von Dr. med. vet. Merkle / Dr. med. vet. Hener in Regensburg
- 1999: Tierärztliche Klinik für Pferde und Kleintiere Dr. med. vet. M. Scheuerer in Schierling (Opf.), Landkreis Regensburg
- 1999: Stadt Landshut, Fleischhygieneamt