

Aus der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dipl. phys. E. Kochs) und
aus dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der
Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)

angefertigt unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. C. Werner

Vorgelegt über den
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
am Institut für Tierpathologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)

**Einfluss der Hypothermie auf die Expression der Apoptose-assoziierten
Proteine nach inkompletter cerebraler Hemisphären-Ischämie bei der
Ratte über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen**

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

von
Lién-Yvonne Laacke
aus
Erlangen

München 2004

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Schulz

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

In memoriam

meiner Mutter

Dr. med. Hai Len-Yvonne Laacke

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	2
2.1	Gehirn	2
2.1.1	Anatomischer Aufbau des Zentralen Nervensystems	2
2.1.2	Stoffwechsel des Gehirns	3
2.1.3	Blutversorgung des Gehirns	5
2.1.4	Hippocampus und Gyrus dentatus	7
2.2	Cerebrale Ischämie	9
2.2.1	Definition	9
2.2.2	Formen und Einteilung	9
2.2.3	Ischämie Modelle im Tierversuch	9
2.2.4	Pathophysiologie	14
2.2.5	Zelltod	16
2.2.5.1	Autophagischer Zelltod	16
2.2.5.2	Nekrose	16
2.2.5.3	Apoptose	17
2.2.5.4	Apoptose-assoziierte Proteine	19
2.2.5.4.1	Bax-Protein	19
2.2.5.4.2	p53-Protein	20
2.2.5.4.3	Bcl-2-Protein	21
2.2.5.4.4	Mdm-2-Protein	23
2.3	Hypothermie	24
2.3.1	Geschichtlicher Rückblick, Einteilung und aktuelle Anwendung	24
2.3.2	Neuroprotektion durch Hypothermie	25
2.3.3	Nebenwirkungen der Hypothermie	26
2.3.4	Einfluss von Dauer, Zeitpunkt und Tiefe der Hypothermie	27
3.	Eigene Untersuchungen	31
3.1	Zielvorstellung	31
3.2	Material und Methoden	32
3.2.1	Versuchstiere und deren Haltung	32
3.2.2	Allgemeiner Versuchsplan	32
3.2.3	Experimentell-operativer Abschnitt	34
3.2.3.1	Vorbereitung und Narkoseeinleitung	34
3.2.3.2	Präparation	35
3.2.3.3	Applikation der verschiedenen Messsonden	37
3.2.3.4	Versuchsdurchführung	40
3.2.3.5	Dekapitierung, Präparation, Verarbeitung und Einfrieren des Gehirns	42
3.2.4	Laboranalytischer Abschnitt	42
3.2.4.1	Immunfluoreszenz-Färbung	42
3.2.4.1.1	Schneiden des Gehirns	42
3.2.4.1.2	Färbung	43
3.2.4.1.3	Aufnahme und Archivierung am konfokalen Laserscan Mikroskop	48
3.2.4.1.4	Auswertung	51
3.2.4.2	Western-Blot-Analyse	51
3.2.4.2.1	Probenaufbereitung	51
3.2.4.2.2	Elektrophorese, Elektrotransfer und Immunoblot	53
3.2.4.2.3	Chemilumineszenz-abhängige Detektion	56

3.2.4.2.4	Digitale Auswertung	58
3.2.5	Geräte, Materialien, Chemikalien, Antikörper und Lösungen	59
3.3	Statistische Bewertung	65
3.4	Ergebnisse.....	66
3.4.1	Erhobene Parameter während des operativen Abschnitts	66
3.4.2	Immunfluoreszenz-Färbung.....	72
3.4.3	Western-Blot-Analyse	82
4.	Diskussion.....	94
4.1	Diskussion der Ergebnisse	94
4.1.1	Versuchsparameter	94
4.1.2	Immunfluoreszenz-Färbung	97
4.1.2.1	Bax-Protein	98
4.1.2.2	p53-Protein	99
4.1.2.3	Bcl-2-Protein.....	100
4.1.2.4	Mdm-2-Protein	101
4.1.3	Western-Blot-Analyse	103
4.1.3.1	Bax-Protein	104
4.1.3.2	p53-Protein	104
4.1.3.3	Bcl-2-Protein.....	105
4.1.3.4	Mdm-2-Protein	106
4.2	Diskussion der Methoden	107
4.2.1	Ischämiemodell	107
4.2.2	Hypothermie-Induktion	110
4.2.3	Immunfluoreszenz-Färbung.....	112
4.2.4	Western-Blot-Analyse	113
4.2.5	Übertragungsmöglichkeiten auf den humanmedizinischen Bereich	114
4.3	Abschlussbetrachtung und Ausblick	115
5.	Zusammenfassung	116
6.	Summary	118
7.	Literaturverzeichnis	120
8.	Tabellenverzeichnis	133
9.	Abbildungsverzeichnis	134
10.	Abkürzungsverzeichnis	135
11.	Danksagung	138
12.	Lebenslauf	139

1 EINLEITUNG

In der westlichen Welt stellt der Schlaganfall die dritthäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf- und Krebs-Erkrankungen dar. Allein in Deutschland erleiden etwa 200.000 Menschen jährlich einen ischämischen oder hämorrhagischen Schlaganfall. Beim Schlaganfall (Apoplex) handelt es sich um eine plötzliche Unterbrechung der Hirndurchblutung (Ischämie) oder eine Massenblutung im Gehirn. Ursächlich kommen arteriosklerotisch-thrombotische Veränderungen (40 bis 50 %), Hämorrhagien (30 bis 35 %) oder Embolien (20 bis 25 %) in Frage. Entscheidend für das Überleben und die Minimierung der Folgeschäden ist eine möglichst schnelle Versorgung der betroffenen Patienten, da das Gehirn nur eine sehr geringe Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel aufweist. Wird diese kurze Phase nicht genutzt, kommt es zu irreversiblen Hirnschädigungen und als deren Folge zu dauerhaften neurologischen Ausfallserscheinungen der entsprechenden Gehirngebiete.

In der Gesamtbevölkerung liegt das Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden, im Alter unter 45 Jahren bei 0,3 %, zwischen dem 45. und 65. Lebensjahr bei 8 % und über 65 Jahren bei 30 % (www.m-wv.de/krankheiten/innere_krankheiten/schlaganfall.html). Obwohl die Letalität seit 1970 um 45 % gesenkt werden konnte, bleibt der Schlaganfall einer der Hauptgründe für die Pflegebedürftigkeit im Alter. Durch das Krankheitsbild des Schlaganfalls entstehen der Volkswirtschaft hohe Kosten. Diese reichen von der primären Versorgung auf Intensivstationen im Krankenhaus bis zu den Kosten einer jahrelangen Rehabilitation; dabei sind die durch Ausfall im Berufsleben entstehenden Kosten nicht zu vergessen. Aus diesem Grund erscheint es dringlich, Mittel und Wege zu finden, die betroffenen Patienten schnell und effektiv zu behandeln, um Letalität und neurologische Ausfallserscheinungen auf ein Minimum zu reduzieren. Diese Forderungen rücken den Apoplex in den Mittelpunkt intensiver Forschungsarbeiten. Seit Jahrzehnten bemüht man sich, möglichst genau die Ursachen und pathologischen Mechanismen aufzuklären, um so neue Therapieansätze entwickeln zu können.

In der vorliegenden Studie wird an Ratten durch ein standardisiertes Ischämie-Modell ein Schlaganfall induziert und dabei die möglicherweise neuroprotektive Wirkung der postischämischen Hypothermie über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen untersucht. Als Mittel zum Nachweis der potentiell neuroprotektiven Wirkung dienen unterschiedliche Apoptose-assoziierte Proteine (Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2). Diese stellen repräsentative Indikatoren für das Überleben oder den Untergang einer Zelle während der Apoptose dar.

2 SCHRIFTTUM

Gehirn

Das menschliche Gehirn und das der Ratte unterscheiden sich bezüglich Aufbau, Blutversorgung und Stoffwechsel, wie später genauer ausgeführt wird, nicht wesentlich. Daher kann man davon ausgehen, dass die im Tierversuch gewonnenen Erkenntnisse auf den humanmedizinischen Bereich übertragen und in der Klinik angewendet werden können (NICKEL et al. 1991; BENNINGHOFF 1993).

2.1.1 Anatomischer Aufbau des Zentralen Nervensystems

Grundsätzlich lässt sich das Nervensystem der Säugetiere in einen zentralen (Gehirn und Rückenmark) und einen peripheren Abschnitt (periphere Nerven und Ganglien) einteilen. Das Gehirn wiederum besteht aus dem Endhirn [Telencephalon] mit den beiden Großhirnhemisphären, dem Zwischenhirn [Diencephalon] mit Hypophyse und Hypothalamus, dem Mittelhirn [Mesencephalon] mit Vierhügelplatte, Haube und Hirnschenkel und dem Rautenhirn [Rhombencephalon] mit Hinterhirn [Metencephalon], Kleinhirn [Cerebellum] und Nachhirn [Myelencephalon] (NICKEL et al. 1991; BENNINGHOFF 1993).

Für die vorliegende Studie spielt die sogenannte Hippocampusformation, ein Bestandteil des Telencephalons, eine besondere Rolle. Folgende Strukturen zählt man zur Hippocampusformation: Den Hippocampus, den Gyrus parahippocampalis, den Gyrus dentatus, die Fimbria hippocampi und den Fornix (NICKEL et al. 1991).

Da einzelne Regionen des Hippocampus eine unterschiedliche Vulnerabilität gegenüber einem schädigenden Insult aufweisen, wird dieser häufig im Zusammenhang mit cerebralen Ischämie-Studien untersucht. Einzelheiten über Lage, Funktion, Einteilung und Vulnerabilität gegenüber Noxen sind dem Kapitel 2.1.4 zu entnehmen.

Frühembryonal werden Gehirn und Rückenmark von einer einheitlichen Mesenchymhülle umgeben. Diese differenziert sich im weiteren Verlauf der Entwicklung in die Ectomeninx und Endomeninx. Aus der Ectomeninx entwickelt sich die den Wirbelkanal auskleidende Endorrhachis und die äußerste, derbe Bindegewebshülle des Zentralen Nervensystems (ZNS), die Dura mater [Pachymeninx]. Aus der Endomeninx entsteht die weiche Hirnhaut [Leptomeninx], die sich wiederum in die dünne Spinnwebenhaut [Arachnoidea] und die dem Gehirn direkt aufliegende gefäßhaltige Pia mater unterteilen lässt. Da die Pia mater und die Arachnoidea durch zahlreiche Bindegewebsbälkchen verbunden sind, in denen die Blutgefäße verlaufen, entsteht hier ein Hohlraum, der mit Liquor cerebrospinalis gefüllt ist. Dieser

flüssigkeitsgefüllte Zwischenraum dient einerseits dem mechanischen Schutz des ZNS, und andererseits besteht bei lokalen Drucksteigerungen die Möglichkeit eines hydrodynamischen Druckausgleiches (NICKEL et al. 1991).

2.1.2 Stoffwechsel des Gehirns

Der cerebrale Stoffwechsel der Ratte und des Menschen lässt sich in den strukturellen und den funktionellen Stoffwechsel unterteilen (NEMOTO et al. 1996). Der funktionelle Stoffwechsel stellt den Energiefaktor dar, der notwendig ist, um die gesamten efferenten und afferenten neuronalen Prozesse, also die Zelleistung, aufrecht zu erhalten. Der strukturelle Stoffwechsel hingegen sichert die Versorgung der neuronalen Integrität (beispielsweise Aufrechterhaltung des Membranpotentials, Biosynthese von Neurotransmittern und Proteinen). Prozentual gesehen beträgt der Anteil des Funktionsstoffwechsels 60 %, der des Strukturstoffwechsels 40 % des Gesamtstoffwechsels (WERNER 1997).

Der durchschnittliche cerebrale Blutfluss beträgt beim Menschen etwa 50 ml/100 g Hirnmasse/min. Entscheidend für eine ausreichende Durchblutung des Gehirngewebes ist der cerebrale Perfusionsdruck, der sich aus der Differenz zwischen arteriellem und intrakranielltem Druck errechnen lässt. Dieser wird durch Autoregulationsmechanismen in einem Bereich von 60 bis 140 mmHg konstant gehalten. Bei dauerhafter Minderdurchblutung kommt es zu klinischen Erscheinungen wie fokalen neurologischen Ausfällen, Bewusstseinsstörungen und im Extremfall zum Hirninfarkt. Bei überhöhten Druckverhältnissen treten Beeinträchtigungen der Mikrozirkulation und als Folge davon Störungen der Membranintegrität der Bluthirnschranke auf. Kommt es zu Störungen im Bereich der Permeabilität der Blutgefäße, strömen Plasmabestandteile ins cerebrale Parenchym ein, wodurch sich ein vasogenes Ödem entwickelt (KEMPSKI 1994).

Wenn der cerebrale Blutfluss auf Werte unter 18 ml/100 g Hirnmasse/min absinkt, erlischt jegliche neuronale Funktion, das heißt, der Patient ist bewusstlos und mit dem Elektroenzephalogramm (EEG) wird keine elektrische Hirnaktivität mehr aufgezeichnet (SIESJÖ 1992). Bei Werten zwischen 12 und 18 ml/100 g Hirnmasse/min gibt es einen Grenzbereich, in dem die Ionenhomöostase noch aufrechterhalten wird. Diese Region bezeichnet man als "Penumbra" (lat. umbra=der Schatten). Sie stellt eine Grenzzone um das Infarktgebiet dar, da der Strukturstoffwechsel zunächst noch intakt bleibt und bei frühzeitiger Reperfusion die Zellen überleben können. Diese Möglichkeit der vollständigen Regeneration besteht jedoch nur in einem engen Zeitfenster von etwa 4 bis 6 Stunden. Wird dieser Zeitraum überschritten, gehen auch die Zellen dieser Grenzzone zugrunde. Zur Verdeutlichung der

Ambivalenz dieser Zellen prägten ASTRUP et al. 1981 den Begriff als halbschattigen Bereich um das Zentrum der völligen Sonnenfinsternis. Wegen der möglichen vollständigen Erholung dieser Zellen wurden diese als "schlafende Schönheiten" bezeichnet (SIESJÖ 1992). Ursächlich verantwortlich für die Ausweitung der ischämischen Zone auf die Penumbra ist das Auftreten von exzitatorischen Depolarisationswellen (DIRNAGL und MEISEL 1999). Ausgehend von der fokalen ischämischen Zone erfolgt die Ausschüttung von Kalium und Glutamat. Dadurch kommt es in der periischämischen Zone zur exzitatorischen bzw. elektrochemischen Depolarisation weiterer Zellen.

Eine weitere Definition der Penumbra stellte GINSBERG 2003 auf. In einer Studie führte er autoradiographische Messungen des cerebralen Flusses bei Ratten mit 2-stündiger **M**iddle **C**erebral **A**rtery **O**cclusion (MCAO) durch und bestimmte in seinen Untersuchungen den Bereich der Penumbra mit einer Restdurchblutung von 20 bis 40 % der Durchblutung der Kontroll-Gruppe, wohingegen der Kernbereich des ischämischen Schadens lediglich eine Restdurchblutung von 5 bis 20 % aufwies.

Im Gegensatz dazu wird als absoluter Wert für die untere Grenze eine Durchblutung von unter 12 ml/100 g Hirnmasse/min definiert. Sinkt die Restdurchblutung unter diese Marke, treten morphologische Veränderungen und Zelluntergang ein (KEMPSKI 1994).

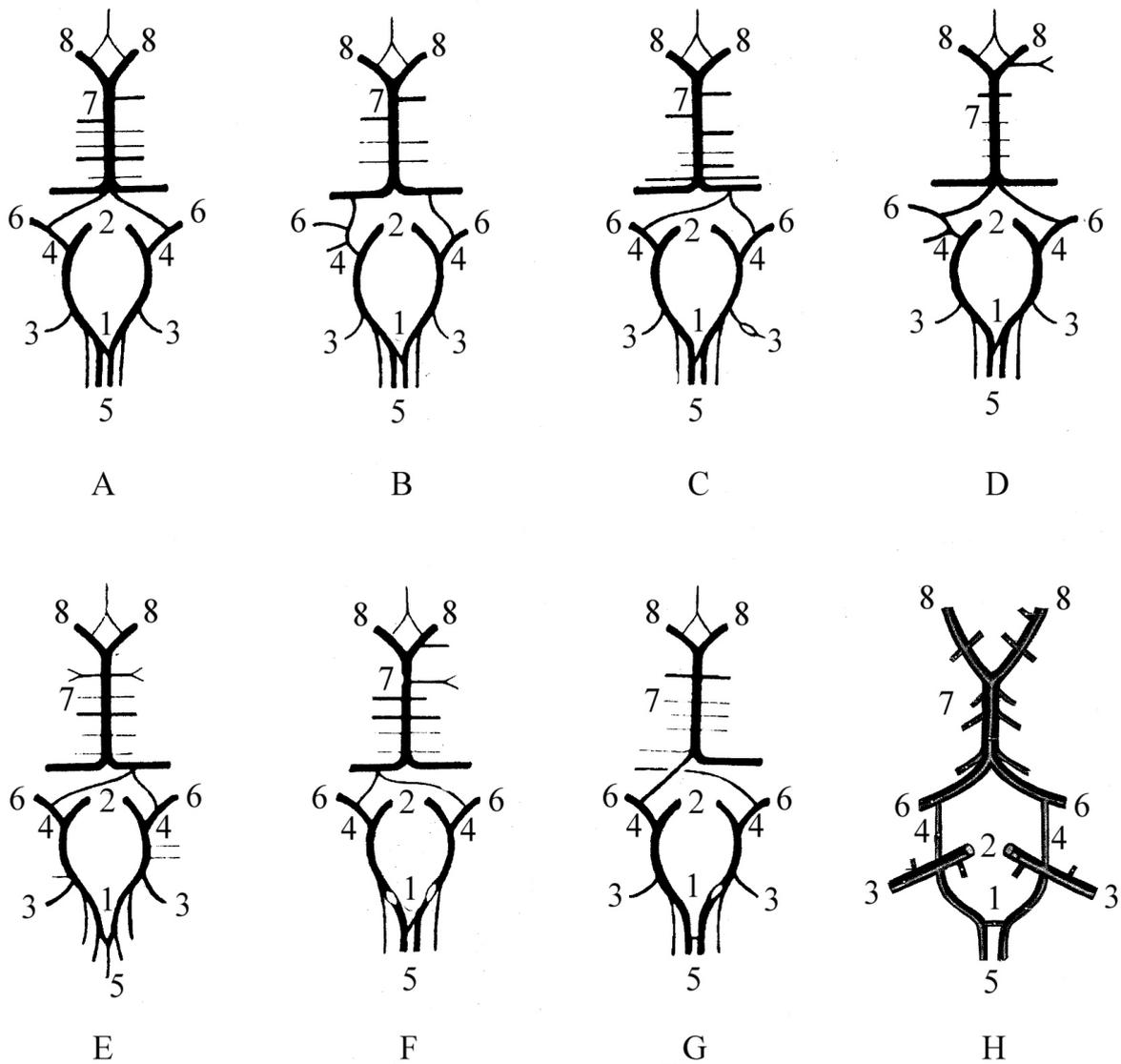
2.1.3 Blutversorgung des Gehirns

Die arterielle Blutversorgung des Gehirns erfolgt bei der Ratte und beim Menschen durch die intrakraniellen Äste der paarigen Aa. carotides internae, die aus den Aa. carotides communes entspringen, und durch die Aa. vertebrales.

Bei der Ratte bestehen zwischen dem Carotis- und Vertebralisssystem im Bereich der Hirnbasis durch die Aa. communicantes rostrales und caudales Anastomosen, die den sogenannten Circulus arteriosus (Wilisii) bilden. Wie der Abbildung 1 zu entnehmen ist, besteht eine große individuelle Variabilität bezüglich des Ursprungs und Verlaufs der A. cerebri caudalis und der A. communicans caudalis. Die A. cerebri media kann verdoppelt sein oder einseitig fehlen. Den geschilderten einzelnen Variationen muss man allerdings keine große Bedeutung beimessen, da bei keinem der untersuchten Tiere eine vollständige Trennung der vier, den Circulus arteriosus bildenden Arterien gefunden werden konnte (FIRBAS et al. 1973). Auch beim Menschen gibt es Variationen der Aa. communicantes, insbesondere der A. communicans caudalis, so dass der hier beschriebene "lehrbuchmäßige" Verlauf des Circulus arteriosus (Wilisii) nur in 53,8 % der Fälle auftritt (BENNINGHOFF 1993).

Physiologischerweise sorgt der Circulus arteriosus für gleichmäßige Druckverhältnisse im gesamten Versorgungsgebiet und kann bei Ausfall einer der zuführenden Arterien als sogenannter Kollateralkreislauf die Versorgung des ischämischen Gebietes übernehmen (BENNINGHOFF 1993; LIEBMANN et al. 1993).

Der venöse Blutabfluss erfolgt über teilweise oberflächlich verlaufende Hirnvenen (Vv. cerebri superficiales) aus dem pialen Venennetz und durch die Vv. cerebri profundae aus den tiefer gelegenen Hirnabschnitten. Letztlich sammelt sich das venöse Blut in den Vv. jugulares internae und wird über die V. cava cranialis dem Herzen zugeführt (BENNINGHOFF 1993).



- | | | | |
|---|--------------------------|---|----------------------|
| 1 | A. communicans rostralis | 5 | A. cerebri rostralis |
| 2 | A. carotis interna | 6 | A. cerebri caudalis |
| 3 | A. cerebri media | 7 | A. basilaris |
| 4 | A. communicans caudalis | 8 | A. vertebralis |

Abbildung 1 Schematische Darstellung des Circulus arteriosus von Ratten (A-G) und des Menschen (H) (modifiziert nach (HAFFERL 1957) und (FIRBAS et al. 1973))

2.1.4 Hippocampusformation

Der bogenförmig verlaufende Hippocampus entsteht in der embryonalen Entwicklung im Bereich des Telencephalons und liegt im Unterhorn des Seitenventrikels. Wie schon erwähnt worden ist, werden zur sog. Hippocampusformation der Hippocampus, das sog. Ammons-horn, der Gyrus parahippocampalis, der Gyrus dentatus, die Fimbria hippocampi und der Fornix gerechnet. Der Gyrus dentatus umfasst kappenartig das Endstück des Hippocampus und dient der Ausbreitung ihm zuströmender Erregungen aus der Hippocampusformation (NICKEL et al. 1991). Neben weiteren Strukturen gehört der Hippocampus zum limbischen System. Dieses ist vor allem für die Integration von viszeralen, psychosomatischen und emotionalen Eindrücken verantwortlich. Beim Menschen spielt es eine besondere Rolle in der Ein-schätzung für das weitere Handeln, die Beurteilung und Bewertung aktueller Ereignisse und letztlich auch für die Verarbeitung von Sinneseindrücken (BENNINGHOFF 1993).

Im transversalen Schnitt unterteilt man den Hippocampus in die Sektoren CA1-CA4. Diese Einteilung stammt von LORENTE DE NÓ (BENNINGHOFF 1993). Die CA1- und CA2-Region weisen eine Zweiteilung der Pyramidenschicht auf und lassen sich in das Stratum profundum und Stratum superficiale unterteilen. In der CA3-Region hingegen tritt eine einheitliche Schichtung der Pyramidenzellen auf. Die CA4-Region schließlich, die sich zwischen den Schenkeln des Gyrus dentatus befindet, zeigt keine einheitliche Zellstruktur. Hier sind die Pyramidenzellen unregelmäßig angeordnet.

Die genaue Lage der einzelnen Regionen des Hippocampus (CA1-CA3) und des Gyrus dentatus kann der Abbildung 2 auf der folgenden Seite entnommen werden. Die CA4-Region des Hippocampus ist nicht eingezeichnet, da sie im Verlauf der vorliegenden Studie nicht untersucht wird.

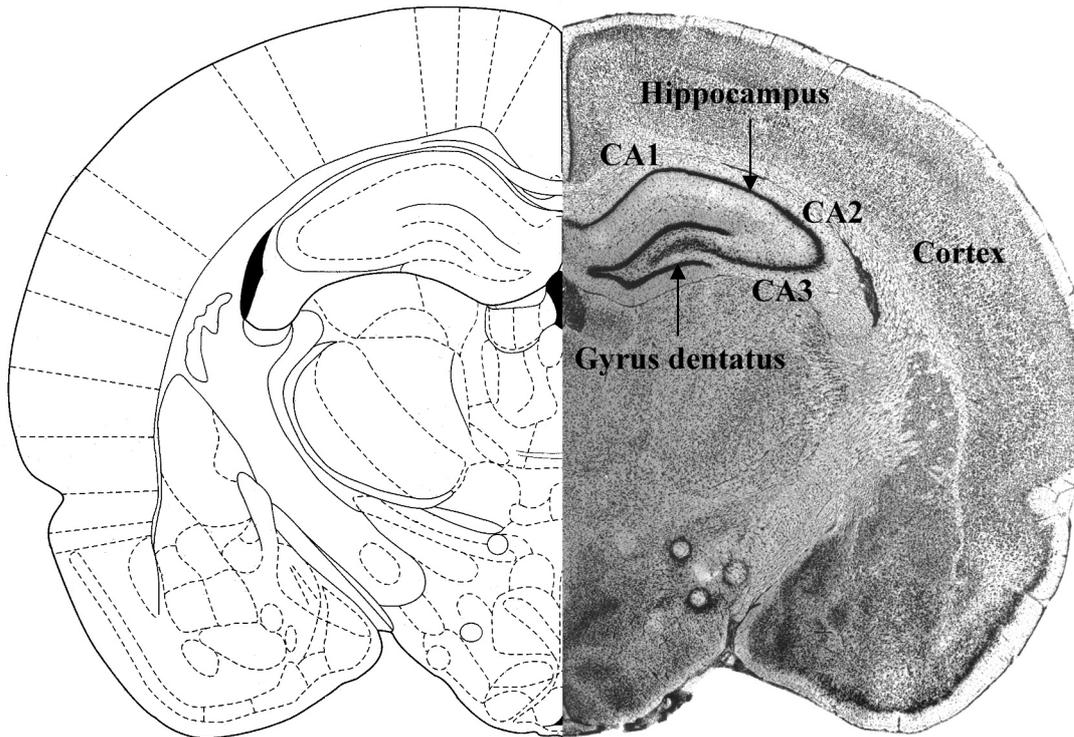


Abbildung 2 Hirnschnitt einer Ratte mit Hippocampusformation und Gyrus dentatus

Schnitt durch ein Rattengehirn mit eingezeichneter CA1-, CA2- und CA3-Region des Hippocampus und Gyrus dentatus; genaue Schnittebene: Ebene 33 (PAXINOS und WATSON 1998)

Grundsätzlich besteht eine unterschiedliche Vulnerabilität der einzelnen Regionen des Gyrus dentatus gegenüber einem schädigenden Insult, wie beispielsweise Ischämie oder Trauma. Dabei ist die CA1-Region am empfindlichsten; an zweiter Stelle folgt die CA3-Region. In zahlreichen In-vitro-Experimenten und Zellkulturstudien konnte diese Abstufung nachgewiesen werden (ANDO et al. 1993; STRASSER und FISCHER 1995; WILDE et al. 1997). Aufgrund dieser bekannten Empfindlichkeit gegenüber einem ischämischen Insult steht der Hippocampus oft im Mittelpunkt von Forschungsarbeiten zur cerebralen Ischämie.

Cerebrale Ischämie

2.1.5 Definition

Als cerebrale Ischämie wird eine Verminderung oder Unterbrechung der Hirndurchblutung bezeichnet. Diese Unterbrechung kann komplett vorliegen oder inkomplett, letzteres dann, wenn noch eine gewisse Restdurchblutung (sogenannte Residualdurchblutung) besteht. Die Ursachen hierfür sind komplex; so können Trauma, Neoplasie, Blutung, Einschwemmung von Thromben, Vasospasmus und arteriovenöse Fehlbildungen neben weiteren Faktoren eine cerebrale Ischämie induzieren (WERNER 2000).

2.1.6 Formen und Einteilung

Je nach dem Ausmaß der cerebralen Ischämie kann man eine fokale und eine globale Form unterscheiden. Während die fokale Ischämie nur in einem abgegrenzten Bereich des Gehirns auftritt, ist bei der globalen Form das ganze Gehirn betroffen. Sie kann embolisch ausgelöst werden z.B. durch Einschwemmung von Thromben, arteriosklerotischer Plaques oder Luft. Weitere Ursachen stellen traumatische Verletzungen, Subarachnoidalblutungen mit konsekutivem Gefäßspasmus, arteriovenöse Gefäßmissbildungen, Kontusionen oder ein lokal begrenztes Hirnödem dar (WERNER 2000).

Die globale Ischämie tritt je nach Größe der Restdurchblutung als komplette oder inkomplette Form in Erscheinung. So bewirkt ein Herz-Kreislauf-Stillstand eine komplette globale Ischämie, eine Perfusionsstörung durch erhöhten Hirndruck hingegen die inkomplette Form (WERNER 2000).

2.1.7 Ischämiemodelle im Tierversuch

Je nach der Wahl der Methode kann experimentell eine fokale oder eine komplette bzw. inkomplette globale cerebrale Ischämie induziert werden. Neben zahlreichen anderen Faktoren unterscheiden sich die einzelnen Modelle bezüglich der Art und Weise ein Gefäß zu verschließen. Des Weiteren bestehen Variationen, welches Gefäß verschlossen wird und, ob der Verschluss permanent oder reversibel besteht (GINSBERG und BUSTO 1989). Zusätzlich kann das Ausmaß des cerebralen Schadens durch die Dauer des Insults und durch eine zusätzliche Senkung des arteriellen Blutdrucks durch Blutentzug variiert werden.

Das Ausmaß des induzierten Schadens hängt von der Intensität und Dauer der Ischämie sowie von der Reperfusionzeit ab. So sterben beispielsweise bei einer nur wenige Minuten dauernden globalen Ischämie allein die Zellen der CA1-Region des Hippocampus ab, während andere Regionen von dem Schaden nicht beeinträchtigt werden (ITO et al. 1975).

Modelle für eine fokale cerebrale Ischämie

Je nach erwünschtem Ausmaß des induzierten fokalen Schadens gibt es eine Vielzahl an Ischämie-Modellen. Diese variieren in der Wahl des Gefäßes (A. carotis communis oder A. cerebri media), der Art der Okklusion (permanent oder temporär) und der Dauer der Ischämie. In vergangenen Studien wurde der Verschluss der **Middle Cerebral Arteri** (MCA=A. cerebri media) gewählt (GARCIA 1984). TAMURA et al. etablierten 1981 als Standardmethode der permanenten MCAO den Verschluss durch Diathermie (Diathermie=therapeutische Anwendung von Hochfrequenzströmen zur intensiven Erwärmung von Geweben im Körperinneren). Dieses Ischämie-Modell ist für die Erforschung der Vorgänge des ischämischen Infarkts beim Menschen nicht geeignet, da SAITO et al. (1987) in ihren Studien beweisen konnten, dass es beim Menschen bei Verschluss der MCA bei 24 bis 50 % der Patienten zu einer spontanen Rekanalisation der verschlossenen MCA kommt. Außerdem kann die MCAO durch gleichzeitigen Verschluss der ipsilateralen A. carotis communis variiert werden (CHEN et al. 1986). Eine weitere Variationsmöglichkeit des Ischämie-Modells besteht in der gleichzeitigen und unterschiedlich stark ausgeprägten Hypotension durch Blutentzug.

Zudem gibt es unterschiedlichste Modelle, um den Gefäßverschluss zu induzieren:

Durch Elektrokoagulation kommt es zum permanenten Verschluss des betreffenden Gefäßes. Eine andere Möglichkeit besteht darin, intraluminal Fäden oder Katheter einzulegen. So etablierten KOIZUMI et al. 1986 die Methode, über die A. carotis communis einen Katheter in die A. carotis interna vorzuschieben und diesen exakt 18 mm distal der Bifurkation der A. carotis zu platzieren (Originalartikel in japanischer Sprache, zitiert nach MACRAE 1992).

Ein großer Nachteil dieser Methode besteht in der unvermeidlichen Beschädigung endothelialer Strukturen. Durch diese Mikroverletzungen können pathologische Prozesse der Gefäßwand initiiert werden, die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke wird verändert und möglicherweise bilden sich Emboli, die später abgeschwemmt werden (MACRAE 1992). Bei einem anderen Verfahren appliziert man das Peptid Endothelin-1. Dieses löst eine Vasokonstriktion mit einer Halbwertszeit von 45 bis 60 min aus (SHARKEY et al. 1993; LYTHGOE et al. 2003). Ansonsten kann auch durch Direktinjektion von Fibrin-Fragmenten (KUDO et al. 1982; KANEKO et al. 1985) oder autologen Emboli bzw. Microsphären ein

Gefäßverschluss herbeigeführt werden. Der Vorteil dieser Methode liegt im Vergleich zum Modell mit Endothelin-1 in der leichteren Vorgehensweise. Allerdings kann man nicht die letztendliche Lokalisation des Embolus und damit den ischämischen Bereich beeinflussen (TRAYSTMAN 2003).

Eine äußerst elegante Methode unter den thromboembolischen Modellen stellt die sogenannte photochemisch-induzierte Thrombose dar. Dabei infundiert man dem Versuchstier photosensitiven Farbstoff. Dieser kann an der gewünschten Okklusionsstelle durch Licht einer spezifischen Wellenlänge aktiviert werden. Durch die Aktivierung kommt es zur Bildung von Sauerstoffradikalen, die wiederum endotheliale Lipide und Blutbestandteile peroxidieren. So löst die Aggregation von Blutplättchen eine Thrombose aus. Der Vorteil dieser Methode besteht in der genauen Lokalisation der Okklusion und der relativ leichten Vorgehensweise (WATSON et al. 1985).

Modelle für eine inkomplette globale cerebrale Ischämie

In der sog. "four-vessel occlusion" (4-VO), erstmalig 1979 beschrieben von PULSINELLI und BRIERLY, werden die vier größten Arterien des Gehirns okkludiert. Durch Elektrokoagulation okkludiert man die Aa. vertebrales auf Höhe des ersten Zervikalwirbels permanent. Im Gegensatz dazu werden die Aa. carotides communes lediglich locker mit einem Band umschlungen und können so je nach Bedarf temporär verschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die "two-vessel occlusion" (2-VO) dar. Hier erfolgt die Ligation der beiden Aa. carotides communes unter gleichzeitiger Reduktion des Blutdrucks (EKLÖF und SIESJÖ 1972). Die sog. "neck-tourniquet"-Methode stellt ein weiteres Ischämiemodell dar. Mit Hilfe einer aufblasbaren Manschette wird der gesamte Halsbereich des Tieres komprimiert. Bei entsprechend hohem Druck (etwa 600-700 mmHg) wird die cerebrale Perfusion durch Kompression der beiden kranialen Arterien und Venen auf unter 1 % der normalen Durchblutung gesenkt (GINSBERG und BUSTO 1989).

Modelle für eine komplette globale cerebrale Ischämie

Eine komplette globale Ischämie kann man durch Induktion eines Herz-Kreislauf-Stillstandes mit anschließender Reanimation herbeiführen (PADOSCH et al. 2001).

Eine weitere Methode besteht im Verschluss von 5 wichtigen Gefäßen (Aa. pterygopalatinae, Aa. carotides externae und A. basilaris), um eine generelle Drosselung der Hirndurchblutung auszulösen. SHIRANE et al. (1991) verschließen beispielsweise die Aa. pterygopalatinae und Aa. carotides externae durch Insertion eines Katheters reversibel, die A. basilaris hingegen

permanent durch Elektrokoagulation. Um den ischämischen Insult zu globalisieren, werden während der Operation zusätzlich die Aa. carotides communes mit einem Clip okkludiert.

Auf der folgenden Seite sind schematisch ausgewählte Beispiele unterschiedlicher Ischämiemodelle in der Übersicht zusammengefasst (siehe Abbildung 3).

(Das in der vorliegenden Studie verwendete Ischämiemodell besteht aus einem transienten einseitigen Verschluss der A. carotis communis in Kombination mit einer Hypotension (Absenkung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) auf 40 mmHg) durch venösen Blutentzug und wird im Kapitel 3.1.3.4 exakt beschrieben).

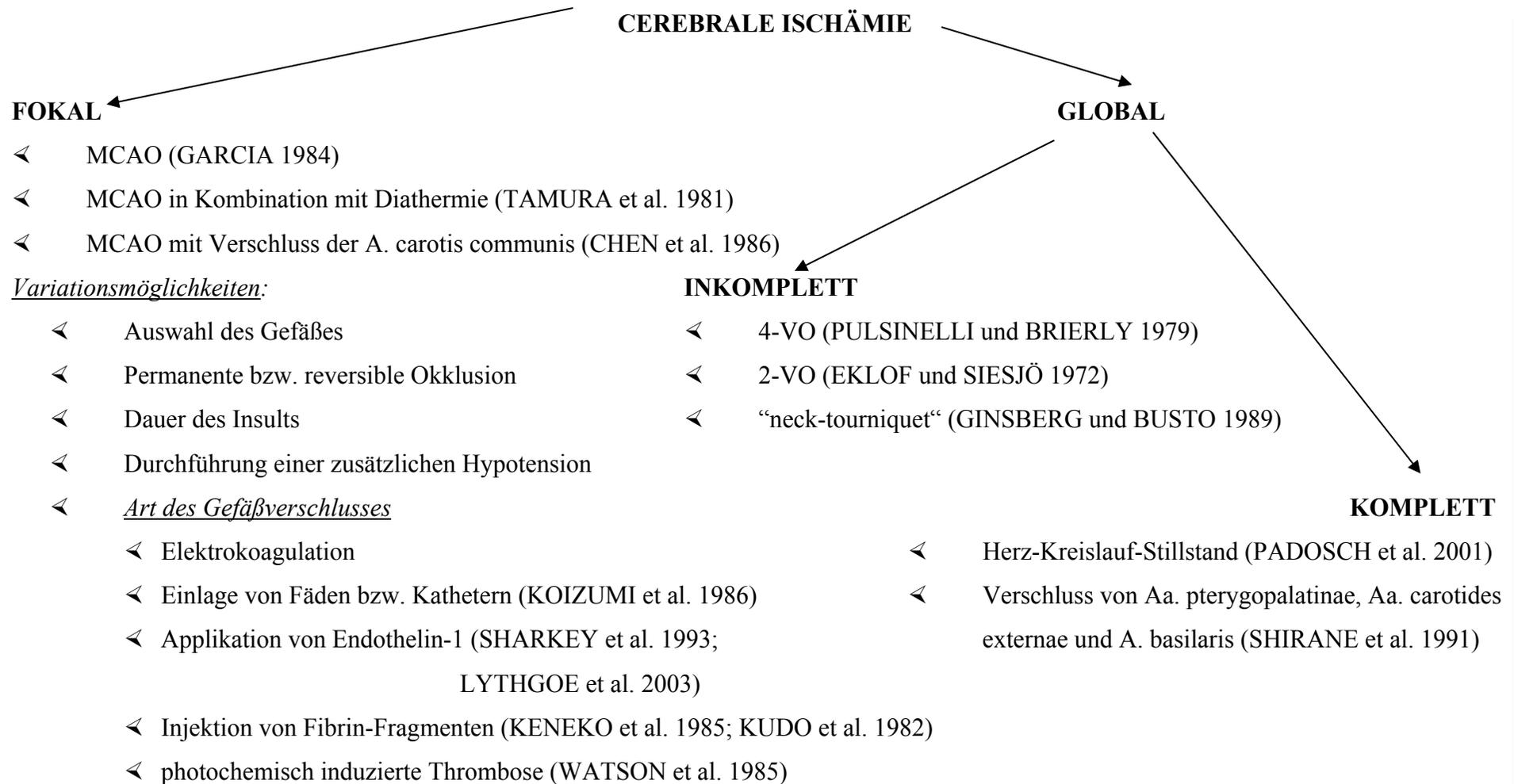


Abbildung 3 Übersicht über ausgewählte Tiermodelle der cerebralen Ischämie

2.1.8 Pathophysiologie der cerebralen Ischämie

Eine zentrale Rolle im pathophysiologischen Geschehen der Ischämie spielt der Sauerstoffmangel und die daraus resultierende Erschöpfung der Energiereserven. Physiologischerweise erfolgt die Energieproduktion aerob durch oxydative Phosphorylierung mit einem Energiegewinn von 36 Mol Adenosintriphosphat (ATP) pro Mol Glucose. Bei Sauerstoffmangel erfolgt eine Umschaltung auf die insuffizientere anaerobe Glycolyse mit dem Stoffwechselendprodukt Lactat. Jetzt werden pro Mol Glucose nur noch 2 Mol ATP gebildet (STRYER 1996). Innerhalb weniger Minuten kommt es zur Erschöpfung der ATP-Reserven. Aufgrund der vermehrten Lactat-Bildung in Kombination mit dem verminderten Abtransport der Stoffwechselprodukte durch die Mangeldurchblutung kommt es zur Anhäufung von Lactat und damit zu einer intra- und extrazellulären Azidose. Dabei ist das Ausmaß der Azidose sekundär vom Glucosegehalt des Gewebes abhängig. Als direkte Folge der Erschöpfung der ATP-Vorräte bricht die energieabhängige Natrium-Kalium-Ionenpumpe zusammen und es verschieben sich die extra- und intrazellulären Natrium- und Kaliumkonzentrationen.

Des Weiteren entsteht bei Energiemangel eine Beeinträchtigung der Membranintegrität, da energiereiche Phosphatverbindungen benötigt werden, um Makromoleküle neu zu synthetisieren oder diese zu ersetzen (SIESJÖ 1992).

Zusätzlich führt der Energiemangel zu einer Einschränkung der präsynaptischen und astrozytären Wiederaufnahme der exzitatorischen Aminosäure Glutamat. Deren Ausschüttung wird durch die Depolarisation gesteigert. Durch den exzessiven Anstieg der Glutamatkonzentration wird einerseits ein Ca-Einstrom in die Zelle forciert und andererseits die intrazelluläre Ca-Mobilisierung ausgelöst (DIRNAGL und MEISEL 1999). Durch die Entgleisung der sonst fein regulierten Ca-Werte kommt es zur unspezifischen Triggerung verschiedenster Enzymsysteme, wie beispielsweise der mitochondrialen Dehydrogenasen, Lipidperoxidasen, Proteasen und Phospholipasen, die ihrerseits einen Anstieg freier Fettsäuren und gefährlicher Radikale verursachen. Aus den Abbauprodukten der Fettsäuren entstehen freie Sauerstoffradikale, die dann bei der anschließenden Reperfusion-Phase zu einer massiven Schädigung der Zellen im ischämischen Gebiet führen (WERNER 1997).

Einerseits ist die Reperfusion des ischämischen Bereiches als Grundvoraussetzung für das Überleben der Zellen unbedingt notwendig, andererseits kann gerade dadurch eine weitere Zellschädigung eintreten. So wies SIESJÖ 1992 die verschlechternde Wirkung der Reperfusion im Tierversuch nach: 3 bis 6 Stunden nach MCAO verschlechterte sich dadurch das Krankheitsbild, histologisch nachweisbar durch massives Anschwellen des Gewebes und Ödematisierung vor allem im Zirkulationsgebiet.

Auch BOSSENMEYER-POURIE et al. bewiesen 2002 diesen schädigenden Einfluss der Reperfusion. In ihren Studien führten sie In-vitro-Experimente an fetalen Vorderhirnzellen von Ratten durch. Dabei variierten sie die Dauer der Reperfusion und zeigten, dass eine 6-stündige Hypoxie die Anzahl der überlebenden Zellen innerhalb von 96 h um etwa 40 % reduziert. Eine 3-stündige Hypoxie löste im Gegensatz dazu keine Zerstörung der Zellen aus. Der pathophysiologische Mechanismus dieses Phänomens ist noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise spielen der Zusammenbruch der Blut-Hirn-Barriere und die Zunahme des postischämischen Ödems (KARIBE et al. 1994), der sekundäre Anstieg der exzitatorischen Aminosäuren (MATSUMOTO et al. 1996), die eintretende Entzündungsreaktion (JEAN et al. 1998) und Veränderungen der Permeabilität und Integrität der feinsten Gefäße (KARIBE et al. 1994) eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung dieses Geschehens. Überwiegen die schädigenden Einflüsse, kommt es schließlich zum Zelltod.

2.1.9 Zelltod

Der Zelltod kann sich als Autophagozytose, Nekrose oder Apoptose manifestieren. Welche "Form" des Zelltodes eintritt, hängt von einer Vielzahl von Faktoren, wie zum Beispiel Art der Noxe, Alter oder Reifungsstadium der Zelle ab. Die Unterteilungen in die einzelnen Arten des Zelltodes variieren teilweise sehr stark. Hier soll die Einteilung nach CLARKE (1990) erfolgen.

2.1.9.1 Autophagischer Zelltod

Charakteristisch für diese Art ist das Absterben von Gewebe im gesamten Verband, wie beispielsweise die Rückbildung des Schwanzes eines Amphibiums während der Metamorphose. Ein weiteres Beispiel stellt die embryonale Entwicklung des Gaumens dar.

Histologisch zeichnet sich diese Art des Zelltodes durch eine große Anzahl von autophagischen Vakuolen aus, in Kombination mit einer Vergrößerung des Golgi-Apparates. Der Golgi-Apparat bildet primäre Lysosomen, die ihre hydrolytisch wirksamen Enzyme nach Verschmelzung mit den Vakuolen freisetzen (SCHWEICHEL und MERKER 1973; CLARKE 1990).

2.1.9.2 Nekrose

Durch Einwirkung starker endogener oder exogener Noxen können die Zellen so weit geschädigt werden, dass es anschließend zum nekrotischen Zelltod kommt. Nach makroskopisch-morphologischen Gesichtspunkten lässt sich die Nekrose in drei Typen unterteilen: In die fokale Zytoplasmanekrose, die Koagulationsnekrose und die Kolliquationsnekrose (RIEDE und SCHAEFER 1995).

Bei der fokalen Zytoplasmanekrose wird nur ein Bruchteil der Zelle durch Noxen geschädigt. Das betroffene Gebiet, vor allem Zytoplasmaareale und Zellorganellen, wird in Form einer sogenannten Autophagievakuole abgegrenzt.

Bei der Koagulationsnekrose hingegen kommt es zur langsamen Zerstörung der gesamten Zelle. Makroskopisch zeichnet sich die Koagulationsnekrose dadurch aus, dass die grobarchitektonische Struktur beibehalten und das Gewebe in eine gelblich trockene und mürbe Masse umgewandelt wird. Als Folge der schweren Noxe kommt es zur Beeinträchtigung des oxydativen Stoffwechsels und einer daraus resultierenden Umstellung auf die anaerobe Glycolyse und die bereits im Kapitel 2.1.8 beschriebenen Stoffwechsel-

entgleisungen. Diese Prozesse führen zu Zellmembranschädigungen und Eiweißdenaturierungen. Diese Eiweißdenaturierungen sind charakteristisch für die Koagulationsnekrose und kommen vor allem bei inneren Organen nach lokaler Ischämie vor (RIEDE und SCHAEFER 1995).

Die Kolliquationsnekrose zeichnet sich im Gegensatz dazu durch sehr schnelle enzymatische Auflösung geschädigter Zellverbände aus. Sie findet in Geweben statt, in denen wenige koagulierbare Proteine vorhanden sind (z.B. Gehirn). Weiterhin tritt sie in Geweben auf, in denen Proteasen gebildet werden (z.B. Pankreas und Magen-Darm-Trakt) oder generell nach Laugenverätzung. Auch hier kommt es durch die Noxe zum Energiemangel. Die Zellen verlieren ihre Osmoseregulationsfähigkeit, anschließend kommt es zur hydropischen Zellschwellung und Ödembildung (RIEDE und SCHAEFER 1995).

Histologisch lassen sich nekrotische Zellen aufgrund charakteristischer Veränderungen identifizieren. Als erste Zeichen treten Chromatinverdichtungen und Veränderungen im Endoplasmatischen Retikulum auf. Es folgt die Zerstörung der Membranintegrität mit Zellschwellung. Die Veränderungen im Nucleus äußern sich als Pyknosis (Verdichtung), Karyorrhesis (Zerfall) und Karyolysis (vollständige Auflösung von Zellkernbestandteilen). Im weiteren Verlauf kommt es zur Zerstörung weiterer Zellbestandteile (WYLLIE et al. 1972).

2.1.9.3 Apoptose

Neben der Autophagozytose und der Nekrose gibt es eine weitere Form des Zelltodes, die Apoptose. Der Begriff Apoptose wurde erstmals 1972 von KERR et al. eingeführt. Er stammt aus dem Griechischen und bedeutet wörtlich übersetzt "das Abfallen". Um zu verdeutlichen, dass im Gegensatz zur Nekrose nur einzelne Zellen absterben, ohne dass der gesamte Organismus dadurch Schaden nimmt, wird häufig die Metapher eines Baumes verwendet, von dem nur einzelne Blätter abfallen.

KERR et al. beschrieben 1972 allein die mikroskopisch sichtbaren Veränderungen der Apoptose, die bis heute noch als Unterscheidungsmerkmale dienen.

Neben den histologischen Veränderungen besteht ein weiterer Unterschied zwischen Nekrose und Apoptose im Auslösemechanismus. Bei Auftreten von starken exogenen Noxen, beispielsweise chemischen, physikalischen oder thermischen Ursachen, wird die Nekrose initiiert. Die Apoptose kann im Gegensatz dazu jede einzelne Zelle aktiv, ohne einen äußeren schädigenden Einfluss, auslösen. Jede Zelle verfügt durch die Apoptose über eine Art "Suizid"-Programm. Eine Vielzahl von Faktoren wie Zelltyp, Reifungszustand oder Entwicklungsstadium der Zelle entscheiden darüber, ob die Zelle zugrunde geht oder überlebt.

Die Apoptose bezeichnet man daher auch als gesteuerten Zelltod (DAHME und WEISS 1999).

Grundsätzlich lässt sich der Vorgang der Apoptose in zwei Phasen unterteilen: Zunächst kommt es zur Bildung der sogenannten "Apoptose-Körperchen", die dann im zweiten Abschnitt phagozytiert werden. Die stattfindenden histologischen Veränderungen beginnen mit einer Verdichtung von Kern und Zytoplasma. Dadurch schrumpft die Zelle. Gleichzeitig bilden sich an der Zellmembran Ausstülpungen, aus denen die Apoptose-Körperchen hervorgehen. Bei den Apoptose-Körperchen handelt es sich um transluzente zytoplasmatische Vakuolen und **Desoxyribonucleinsäure (DNS)**-Fragmente. Diese DNS-Fragmente werden durch eine Ca/Mg abhängige Endonuclease in Bruchstücke von 180 bis 200 Basenpaaren gespalten. Durch Auftrennung mit Hilfe einer Elektrophorese ergibt sich so eine typische Struktur, das sogenannte "DNA-laddering", welches eine Möglichkeit des Apoptosenachweises darstellt. Ehe es zu einer Freisetzung schädigender Inhaltsstoffe der Zellen kommen kann, findet die Digestion der dabei entstehenden Zellreste durch Phagozyten oder Nachbarzellen statt. Die Zellmembranen bleiben bis zum Schluss intakt und es kommt im Gegensatz zur Nekrose zu keiner Entzündungsreaktion (KERR et al. 1972).

Da mit Hilfe der Lichtmikroskopie immer nur ein Bruchteil der apoptotischen Zellen erkannt werden kann, bedeutet schon ein geringes Vorkommen von Apoptose-Körperchen einen massiven Zelluntergang in der betreffenden Region (KERR et al. 1972).

Eine entscheidende Bedeutung kommt der Apoptose in der Ontogenese bei der Entwicklung des Immunsystems (OPFERMAN und KORSMEYER 2003) und des Gehirns (ITOH et al. 2001) zu. Neben diesen wichtigen Funktionen im Rahmen der physiologischen Geschehnisse spielt die Apoptose auch eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson (HARTMANN et al. 2000).

Interessanterweise wurden die ersten Erkenntnisse über die ablaufenden Mechanismen des apoptotischen Zellunterganges durch die Erforschung des Fadenwurmes *Caenorhabditis elegans* gewonnen. Man fand heraus, dass im Verlauf der Entwicklung immer exakt die gleichen somatischen Zellen durch Apoptose absterben. Die entsprechenden Gene wurden identifiziert und Analogie-Gene bei den höher entwickelten Tieren gefunden. In der phylogenetischen Konservierung dieser Gene zeigt sich die immense Bedeutung der Apoptose (YUAN 1996).

Da der apoptotische Zelltod offensichtlich immer eine gewisse Zeit braucht, um sich zu entwickeln, liegt darin die Chance, das therapeutische Fenster eines ischämischen Insultes posttraumatisch zu erweitern.

2.1.9.4 Apoptose-assoziierte Proteine

Neben vielen anderen Faktoren spielen die vier Apoptose-assoziierten Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 eine wichtige Rolle bei der Induktion bzw. Verhinderung des Zelltodes (KRAJEWSKI et al. 1994).

Ausgelöst von einem initialen Reiz kommt es über eine mehrstufige Ereignis-Kaskade zur finalen DNS-Fragmentierung und Spaltung lebenswichtiger Proteine. Diese Kaskade beginnt mit den Signalfaktoren, geht in die Ebene der Modulatoren über und endet letztlich in der Endphase mit der Aktivierung der Effektorproteasen. Auf der Ebene der Modulatoren konkurrieren unter anderem die Apoptose-assoziierten Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 miteinander. Durch diese Proteine wird das Schicksal der Zelle bestimmt (PADOSCH et al. 2001). Während die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Mdm-2 den apoptotischen Zelltod verhindern, also ein Überleben der Zelle sichern, lösen die pro-apoptotischen Proteine Bax und p53 den Zelltod aus. Dabei muss man beachten, dass diese Proteine untereinander in einer Vielzahl von Wechselbeziehungen stehen. Aus didaktischen Gründen erfolgt hier eine getrennte Auflistung dieser Proteine.

2.1.9.4.1 Bax-Protein

Grundsätzlich gehört Bax zu den Apoptose-fördernden Proteinen der Bcl-2-Familie.

Von dem Bax-Gen werden unterschiedliche Bax-Proteine transkribiert: Das 21 **kDa** (kilo Dalton) schwere Bax α , das 24 kD schwere Bax β und schließlich das 5 kD schwere Bax γ .

Typischerweise tauchen Bax-Proteine beim Menschen vor allem in Geweben auf, die sich durch eine hohe Apoptoserate und damit einer schnellen Austauschrate der Zellpopulation auszeichnen, wie die Zellen der Krypten der Dünndarmmukosa, die sich sehr schnell regenerieren. Außerdem kommt es in den epithelialen Geweben des Gastro-Intestinal-Traktes, insbesondere des Dün- und Dickdarms, des Respirationstraktes, der Haut und der Prostata vor. Im ZNS ist Bax vor allem in den Purkinje-Zellen des Cerebellum, in den großen Neuronen des Cortex und im Hirnstamm lokalisiert, während es im peripheren Nervensystem vor allem in den sympathischen Ganglien auftaucht (KRAJEWSKI et al. 1994).

Das Bax-Protein ist in löslicher Form im Zytosol der Zelle gelegen und wird während der Apoptose in die Mitochondrien eingeschleust (CAO et al. 2001). Der genaue Wirkmechanismus ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht bekannt, aber man vermutet einen Zusammenhang mit der mitochondrialen Cytochrom C-Freisetzung (JÜRGENSMEIER et al. 1998; ANTONSSON und MARTINOU 2000).

So wiesen CAO et al. 2001 diese Translokation immunhistochemisch nach und zeigten eine Komplexbildung zwischen Bax und bestimmten mitochondrialen Membranproteinen. In In-vitro-Studien konnten sie diese Komplexbildung inhibieren und somit letztlich die Apoptose verhindern.

Für diese These der Interaktion mit der mitochondrialen Cytochrom C-Freisetzung spricht die Tatsache, dass auch Bcl-2 mitochondrial wirkt und durch eine Überexpression des Bcl-2-Proteins dieser Cytochrom C-medierte Mechanismus geblockt werden kann (YANG und KORSMEYER 1996). Durch Freisetzung von Cytochrom C kommt es zur Bildung eines als "Apoptosom" bezeichneten Komplexes, der wiederum über Aktivierung der Effektorcaspasen die Apoptose induziert (KLUCK et al. 1997).

Der Bax-Promotor wurde schon vor einigen Jahren geklont und stellte sich zu diesem Zeitpunkt als p53 abhängig heraus (MIYASHITA und REED 1995). Es ist auch bekannt, dass eine Bildung von Bax-Dimeren pro-apoptotisch wirkt, Bax-Bcl-2-Dimere hingegen verhindern die Apoptose (OLTVAI et al. 1993).

2.1.9.4.2 p53-Protein

Das p53-Protein weist ein Molekulargewicht von 53 kD auf (COX und LANE 1995). P53 war das erste Gen, bei dem die Tumorsuppression entdeckt wurde (VOGELSTEIN et al. 2000). Es spielt eine herausragende Rolle in der Erhaltung der Homöostase und der Zerstörung von genetisch defekten Zellen. Durch verschiedenste Stresssignale, wie beispielsweise DNS-Schäden, Hypoxie, metabolische Veränderungen oder Onkogene kommt es zur Aktivierung von p53 und dadurch zur Apoptoseinduktion (bei irreversiblen Schäden) oder zur Blockierung der Zellteilung (bei milderer Noxen). Dadurch wird die Replikation von beschädigter DNS verhindert (SIONOV und HAUPT 1999).

Vereinfachend kann man sagen, dass in der unveränderten Zelle nur sehr geringe Mengen von p53-Protein vorliegen, wobei dessen Spiegel vorwiegend durch den Grad des Abbaus bestimmt wird. Dieser Abbau wird durch eine Ubiquitin-meditierte Proteolyse ausgelöst. Dadurch kommt es zur Markierung der betreffenden Zelle für anschließende Protein-degradationsmechanismen. Neben anderen Enzymen kann diese Markierung durch Mdm-2 entstehen, da Mdm-2 als Ubiquitin-Ligase funktioniert (ASHCROFT und VOUSDEN 1999).

Außerdem stellt Mdm-2 ein Zielprotein von p53 dar, was bedeutet, dass die Transkription von Mdm-2 durch p53 induziert wird und somit ein negativer Rückkopplungsmechanismus zwischen den p53- und Mdm-2-Protein-Spiegeln besteht. Durch diese komplizierten

Mechanismen wird gewährleistet, dass in unverändertem Gewebe die Konzentration von p53 niedrig bleibt (ALMOG et al. 2001).

Während diese p53-Mdm-2-Interaktionen am N-Terminus (N-Terminus=Amino-Terminus) stattfinden, fanden ALMOG et al. (2001) heraus, dass der C-Terminus (Carboxyl-Terminus), neben der bekannten Funktion der spezifischen Erkennung und Bindung geschädigter DNS, möglicherweise die Sensitivität von p53 bezüglich der proteolytischen Degradation beeinflusst. Durch eine Vielzahl von murinen Klonierungsversuchen konnten sie für zwei alternative Spliceformen des p53 Gens (RSp53 und Asp53) deren Einfluss auf die Mdm-2-Interaktionen beweisen. Während RSp53 stärker apoptotisch wirkt als Asp53, zeichnet sich dieses wiederum durch eine selektive Resistenz gegenüber der durch Mdm-2 induzierten Degradation aus und führt zu einer höheren Ausbildung des Mdm-2-Spiegels als RSp53. Außerdem kann eine Rsp53-induzierte Apoptose durch gleichzeitige Expression von Asp53 inhibiert werden (ALMOG et al. 2001).

Zwar wurden bisher noch keine direkt vergleichbaren Produkte eines alternativen Splicings beim Menschen gefunden; jedoch besteht die Möglichkeit, dass durch erwiesene post-translationale Modifikationen am C-Terminus beim Menschen dem murinen Asp53 analoge modifizierte Proteine gebildet werden, die vergleichbare Regulations- und Kontrollmechanismen auslösen (ALMOG et al. 2001).

Neben diesen Regulationsmechanismen kann p53 weitere Apoptose-assoziierte Proteine beeinflussen. So fungiert p53 als positiver Regulator der Bax- und als negativer Regulator der Bcl-2-Expression (MIYASHITA und REED 1995).

2.1.9.4.3 Bcl-2-Protein

Ursprünglich als mutmaßliches Onkogen im humanen folliculären Lymphom (TSUJIMOTO et al. 1985) vermutet, wurde Bcl-2 als erstes Gen entdeckt, das in die Regulation der Apoptose involviert ist. Aus diesem Grunde benannte man die Gruppe nach ihm. Bis jetzt sind 19 Mitglieder der Bcl-2-Familie bekannt (siehe Abbildung 4), die sowohl pro-apoptotisch, als auch anti-apoptotisch wirkende Vertreter enthält (SCORRANO und KORSMEYER 2003). Die Zugehörigkeit zu der einen oder anderen Form begründet sich im Vorhandensein von verschiedenen homologen Domänen (BH1-4; BH=Bcl-2 Homologe), die unterschiedliche Mechanismen triggern. Beispielsweise kommt die BH3-Domäne nur bei Apoptose-auslösenden Vertretern vor (LUTZ 2000).

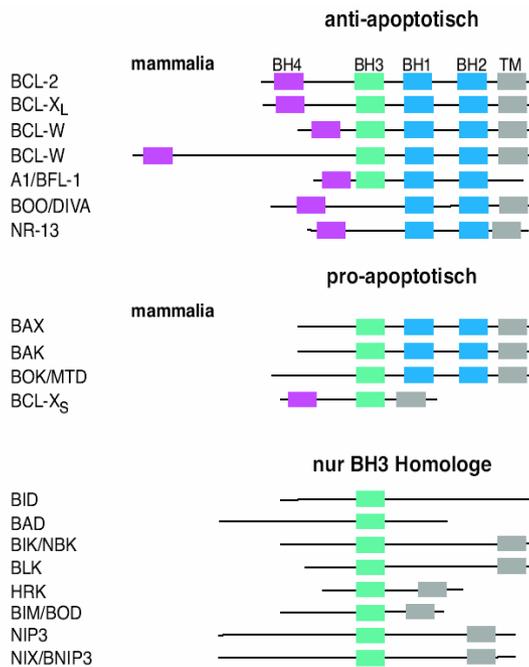


Abbildung 4 Schematische Darstellung der anti- und pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie (modifiziert nach GROSS et al. 1999)

Da die genaue Beschreibung der molekularen Konformationsänderungen, in Abhängigkeit zu den jeweiligen Domänen, den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen würde, wird auf den Artikel "Cell death regulation by the bcl-2 protein family in the mitochondria" (TSUJIMOTO 2003) verwiesen.

Bcl-2 weist ein Molekulargewicht von 26 kD auf und wird, entsprechend seiner Funktion als Schutz vor Zelluntergang, vor allem in Geweben mit starker Proliferationsfähigkeit oder mit sehr langer Lebensdauer exprimiert (KRAJEWSKI et al. 1994). Es ist lokalisiert in der äußeren Mitochondrienmembran, der Kernmembran und im Endoplasmatischen Retikulum (MONAGHAN et al. 1992). Dieses unterschiedliche Vorkommen von Bcl-2 lässt auf spezielle Wirkmechanismen schließen. So geht man davon aus, dass Bcl-2 eine Herabsetzung der Freisetzung von Cytochrom C und bewirkt dadurch den von Bax ausgelösten Mechanismus der Apoptoseinduktion blockiert (KLUCK et al. 1997). Diese Annahme bestätigen ZHAO et al. 2003 in ihren Studien mit viralen Vektoren.

Eine weitere Hypothese geht davon aus, dass eine Dimerbildung zwischen Bcl-2 und Bax zur Verhinderung des Zelltodes führt (OLTVAI et al. 1993). Im Gegensatz dazu gehen FROESCH et al. (1999) von folgender Hypothese aus: Durch Bcl-2 wird die transkriptionale Aktivierung von verschiedenen p53-abhängigen Promotoren verhindert; dadurch bleibt eine Akkumulation von p53 im Nucleus aus. Außerdem nimmt man an, dass Bcl-2 eine Rolle im

Ca-Haushalt spielt. Durch vermehrtes Abfließen von Ca in das Endoplasmatische Retikulum und durch Herabsetzen des Ca-Einstroms (PINTON et al. 2000) kommt es insgesamt zur Reduktion der intrazellulären Ca-Menge. Dadurch wird eine Entgleisung des fein regulierten Ca-Haushaltes als Startpunkt einer Vielzahl von Prozessen (siehe Kapitel 2.1.8) verhindert.

2.1.9.4.4 Mdm-2-Protein

Das Mdm-2-Protein weist ein Molekulargewicht von 90 kD auf. Den Namen verdankt es seiner Erstentdeckung (**m**urine **d**ouble **m**inute) in Tumorzellen von Mäusen (CAHILLY-SNYDER et al. 1987).

Funktionell gesehen fungiert das Mdm-2-Protein als Ligase, die sich selbst und p53 mit Ubiquitin für den zellulären Proteindegradationsmechanismus markiert. Umgekehrt ist für die Aktivierung der Mdm-2-Expression unbedingt die Interaktion mit p53 notwendig. Zwischen beiden Genen besteht ein negativer Rückkopplungsmechanismus, durch den gewährleistet wird, dass in unveränderten, gesunden Zellen der p53-Protein-Spiegel sehr niedrig ist (ASHCROFT und VOUSDEN 1999; ALMOG et al. 2001).

Die Regelung der Interaktion zwischen Mdm-2 und p53 hängt davon ab, ob Mdm-2 durch eine DNS-abhängige Protein-Kinase phosphoryliert wird oder nicht. Nach einem Zellschaden mit anschließender Reparatur kommt es zum Verlust dieser DNS-abhängigen Proteinkinase. Dadurch wird "neues", nicht phosphoryliertes Mdm-2 synthetisiert und dieses geht mit p53 eine Komplexbindung ein. Durch diese Komplexbindung kommt es zur Inhibition der p53-Wirkung und damit zum Überleben der Zelle (MAYO et al. 1997).

Hypothermie

2.1.10 Geschichtlicher Rückblick, Einteilung und aktuelle Anwendung

Der schützende Effekt der Hypothermie ist schon lange bekannt und wird seit vielen Jahrzehnten angewendet.

Am 9. Februar 1955 wurde die erste sog. "Oberflächenhypothermie" durchgeführt. Bei einer Patientin wurde ein angeborener Defekt der Vorhofscheidewand am geöffneten Herzen vernäht, nachdem die Körperkerntemperatur der Patientin in einer mit Eis gefüllten Badewanne massiv gesenkt worden war (BRANDT 1997).

Bereits 1959 führte ROSOMOFF erste Versuche an Hunden durch. Er induzierte experimentell eine massive Gehirnverletzung, um den schützenden Effekt der Hypothermie nachzuweisen. Hierfür senkte er die Körpertemperatur auf 25 °C und niedriger ab und behielt diese Temperatur über einen Zeitraum von 18 h bei. Im Vergleich zu den Kontrolltieren (n=10, Normothermie, alle Tiere verstarben) überlebten in der Hypothermie-Gruppe von 7 Tieren zwei Tiere. Außerdem konnte er mikroskopisch bei den hypothermen Tieren in dieser Studie eine Verbesserung im Sinne einer stärkeren Reparatur der verletzten Areale und Abschwächung der Symptome, wie Hämorrhagie, cerebrales Ödem und posttraumatische Inflammationsreaktionen im Vergleich zu den Kontrolltieren nachweisen. Aufgrund dieser Vorversuche wendeten 1962 DRAKE und JORY die neue Methode der Hypothermie bei Menschen mit massiven Gehirnverletzungen an, bei denen die übliche Standardtherapie versagt hätte. Mit unterschiedlichem Hypothermiemanagement (28 bis 33 oder 33 bis 36 °C) konnten sie den neuroprotektiven Effekt der Hypothermie nachweisen. Die hohen Todesraten in dieser Studie beruhen auf den sehr stark in ihrem Ausmaß variierenden Verletzungen und der häufig aufgetretenen Komplikation einer tödlich verlaufenden Staphylokokken-Pneumonie.

Während damals eine kurze, starke Absenkung der Körpertemperatur propagiert wurde, ist man nach den heutigen Erkenntnissen der Forschung dazu übergegangen, eine geringere Hypothermie für einen längeren Zeitraum anzuwenden. Je nach Grad der Temperatursenkung werden folgende Formen der Hypothermie unterschieden: Eine milde (36 bis 34 °C), eine moderate (33 bis 29 °C), eine tiefe (28 bis 17 °C) und eine profunde (16 bis 4 °C) Hypothermie (WERNER 1997; JENKINS et al. 2001).

Nachdem durch zahlreiche klinische und tierexperimentelle Studien (Einzelheiten siehe Kapitel 2.1.13) (MARION et al. 1993; SHIOZAKI et al. 1993; ZHI et al. 2003) nachgewiesen werden konnte, dass bereits durch Anwendung einer milden oder moderaten Hypothermie der gewünschte neuroprotektive Effekt ohne Auftreten von starken Nebenwirkungen erreicht

werden kann, wendet man die tiefe oder profunde Hypothermie nur noch bei speziellen Indikationen an. Dabei handelt es sich um herzchirurgische (systemischer Herz-Kreislauf-Stillstand, extrakorporale Zirkulation) oder neurochirurgische Eingriffe (Resektion intrakranieller Aneurysmen oder anderer Gefäßfehlbildungen) (WERNER 1997).

2.1.11 Neuroprotektion durch Hypothermie

Durch cerebrale Ischämie kommt es zu einem Missverhältnis von O₂-Angebot und O₂-Bedarf. Die vorhandenen Energiereserven werden schnell erschöpft und es erfolgt eine Umschaltung auf die weniger effiziente anaerobe Glycolyse, die sich in einer intra- und extrazellulären Azidose manifestiert. Im weiteren pathophysiologischen Geschehen kommt es zum Verlust der Membranintegrität und einer Entgleisung des fein regulierten Ca-Haushaltes. Diese Ca-Entgleisung, insbesondere verstärkt durch die vermehrte Ausschüttung der exzitatorischen Aminosäure Glutamat, resultiert in einer Kaskade von Reaktionen, wie unter anderem der Bildung von Proteasen und Sauerstoffradikalen.

Während man früher den neuroprotektiven Einfluss der Hypothermie größtenteils der Reduktion des cerebralen Metaboliten-Stoffwechsels, vor allem einer generellen Herabsetzung des cerebralen Sauerstoffverbrauchs, zuschrieb, hat man heute, aufgrund zunehmender Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet, Einblick gewonnen in die molekularen Zusammenhänge. So kommt die Neuroprotektion durch eine Vielzahl von ergänzenden Faktoren zustande: Beispielsweise untersuchten JENKINS et al. (2001) den direkten Einfluss der Hypothermie auf die cerebrale Flussrate der CA1-Region mit Hilfe von Laserflussonden. Sie konnten nachweisen, dass während milder Hypothermie die cerebrale Flussrate unter Ischämie weniger herabgesetzt wird und dadurch eine deutliche Verbesserung des neurologischen Endergebnisses erzielt werden kann.

Diese Hypothermie-bedingte Verbesserung des neurologischen Status wurde in weiteren Studien (HOFFMAN et al. 1991; KUBOYAMA et al. 1993; MAIER et al. 2001) bestätigt.

Des Weiteren bewirkt die Hypothermie eine verminderte Bildung von freien Radikalen (GLOBUS et al. 1995), eine Verbesserung der Proteinsynthese (WIDMANN et al. 1993) und eine Absenkung des intrakraniellen Drucks (SHIOZAKI et al. 1993).

Ein weiterer Schutzmechanismus durch Hypothermie besteht in der Aufrechterhaltung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke. Durch Reduktion der Ansammlung interstitieller Flüssigkeit und als unmittelbare Folge davon einer Rückführung der Hirndurchblutung zu normalen Werten kommt es zur Abschwächung der Folgen der postischämischen Hyperperfusion und der verzögerten Hypoperfusion (KARIBE et al. 1994).

ZHANG et al. wiesen 2001 im Tierversuch nach, dass unter hypothermen Bedingungen neben der Reduktion des Infarkt Volumens, die Ausbildung von NO-Radikalen supprimiert und damit letztlich die Folgen des Reperfusionsschadens (Entstehung des Reperfusionsschadens siehe Kapitel 2.1.8) reduziert werden können.

Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Reduktion der Infarktgröße zeigten zahlreiche analoge Studien (MORIKAWA et al. 1992; YANAMOTO et al. 1999; HUH et al. 2000; MAIER et al. 2001). Außerdem scheint es zu einer Stimulation der genetischen Reparaturmechanismen während der Apoptose zu kommen (WERNER 2000).

2.1.12 Nebenwirkungen der Hypothermie

Wie bei (fast) allen therapeutischen Ansätzen birgt auch die Behandlung mit Hypothermie das Risiko von Nebenwirkungen. Je nach gewünschtem Effekt muss dabei das Nutzen-Schaden-Verhältnis den jeweiligen Situationen angepasst werden, da das Ausmaß der Nebenwirkungen in direkter Beziehung zur Geschwindigkeit des Abkühlens und Wiedererwärmens und zur Dauer und Tiefe der Hypothermie steht (SCHUBERT 1995). Grundsätzlich gilt: Je tiefer die Absenkung der Körpertemperatur gewählt wird, mit desto stärkeren Nebenwirkungen ist zu rechnen. Aus diesem Grunde wendet man heute in den meisten Fällen eine milde oder moderate Hypothermie an.

Die Phase des Wiedererwärmens ist besonders kritisch, da eine zu schnelle Erwärmung der Peripherie zu einem massiven Abfall der zentralen Körpertemperatur führt und als Folge des falschen Temperaturmanagements die Ausprägung von Kammerflimmern und ein kardiovaskulärer Kollaps möglich ist (SCHUBERT 1992). Zusätzlich kann es indirekt durch die postoperativ weiterhin bestehende Hypothermie aufgrund des thermoregulatorischen Kältezitterns zu einem höheren Sauerstoffverbrauch kommen, dem eine metabolische Azidose folgt. So erhöht sich im Bereich von 33,5 °C bis 36,5 °C mit jeder Absenkung der Temperatur um 1 °C die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des Kältezitterns um 33 %.

Bezüglich des Herz-Kreislaufgeschehens entsteht unter Hypothermie eine Erhöhung des peripheren Widerstandes und der kardialen Belastung und eine Abnahme der myokardialen Kontraktilität in Kombination mit einer Abschwächung der Ansprechbarkeit von kardialen Rezeptoren auf Katecholamine (SCHUBERT 1992). Durch die verminderte Ansprechbarkeit tritt ein massiver Anstieg des Katecholamin-Spiegels auf; dadurch kann es zu Arrhythmien, Hypertension und myokardialer Ischämie kommen (SCHUBERT 1995).

In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass bei einer Absenkung der Körpertemperatur auf unter 32 °C die Tendenz zum Auftreten von Vorhofflimmern steigt, jedoch mit

Wiedererlangen des normothermen Zustandes in den meisten Fällen auch ohne kardiale Medikation eine Rückkehr zum Sinusrhythmus erfolgt (OKADA 1984). Aufgrund der Tatsache, dass bereits mildes Abkühlen der Körperoberfläche einen reversiblen Defekt der Blutplättchen bewirkt (VALERI et al. 1987), muss bei stark traumatischen Eingriffen mit der Gefahr stärkerer Blutungen gerechnet werden. So wiesen BERNABEI et al. (1992) bei Operationen mit explorativer Laparotomie wegen schwerer Traumen nach, dass Patienten - unabhängig von der Stärke des zugrundeliegenden Traumas - mit einer Hypothermie von 33 bis 35 °C einen signifikant höheren Blutverlust aufwiesen als Patienten mit einer Hypothermie über 35 °C (BERNABEI et al. 1992). Außerdem führt Hypothermie zum vasalen Flüssigkeitsaustritt und bewirkt dadurch eine Zunahme der Blutviskosität und des Hämatokrits (SCHUBERT 1995). Verstärkt wird dieses Phänomen der Dehydratation durch eine Suppression des antidiuretischen Hormons. Durch die Hypothermie ergibt sich auch eine Verschiebung der Hämoglobin-Sauerstoff-Dissoziationskurve, die sich in einer schlechteren Sauerstoffversorgung des Gewebes äußert.

Neben den bereits aufgeführten Nebenwirkungen verursacht Hypothermie weiterhin eine generelle Depression des Immunsystems. Diese wird durch eine Einschränkung der Phagozytoseaktivität und der Leukozytenmobilität ursächlich hervorgerufen. So kann es zum verstärkten Auftreten von Sepsis und Pneumonien kommen (SCHUBERT 1995).

2.1.13 Einfluss von Dauer, Zeitpunkt und Tiefe der Hypothermie

Grundsätzlich gibt es schon einige Studien mit unterschiedlichem Hypothermie-Management. Die Schwierigkeit der Interpretation der auf den ersten Blick zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse besteht darin, dass einerseits die Ischämie Modelle stark variieren (beispielsweise 4-VO versus MCAO) und andererseits unterschiedliche Versuchsbedingungen bezüglich Tiefe, Zeitpunkt und Dauer der Hypothermie gewählt werden.

Hypothermie-Studien

Tierexperimentelle Studien

Versuche an Hunden, Katzen und Primaten

WEINRAUCH et al. (1992) induzierten eine komplette globale cerebrale Ischämie bei Hunden durch Kammerflimmern; sie konnten dabei nachweisen, dass mit zunehmender Temperatursenkung eine Verringerung des histopathologischen Defizits erfolgt. Sie wendeten intranschämisch Hypothermien von 34 °C, 32 °C, 30 °C, 28 °C oder 15 °C an. Dabei stellte

sich eine Absenkung auf 28 °C oder 15 °C als kritische Temperaturschwelle heraus, da es bei diesen Temperaturen zur Einschwemmung von toxischen Metaboliten in Kombination mit einer massiven myokardialen Depression kommt. Die Existenz dieser Temperaturschwelle, bei deren Unterschreiten es bei Säugetieren zu einer Hypothermie-assoziierten Störung der Reperfusion kommt, wurde in weiteren Studien mit Katzen und Affen nachgewiesen (STEEN et al. 1979; STEEN et al. 1980). Eine Hypothermie von 30 °C kann somit als absoluter Schwellenwert angesehen werden, stärkere Absenkungen sollte man nur in ausgewählten Indikationen durchführen (siehe Kapitel 2.1.10).

KUBOYAMA et al. (1993) lösten bei Hunden einen experimentellen Herz-Kreislauf-Stillstand aus und konnten nachweisen, dass für den neuroprotektiven Effekt der Hypothermie ein relativ enges Zeitfenster von 15 bis 90 min besteht.

Versuche an Nagetieren

BUSTO et al. (1987) zeigten, dass die postischämische Hypothermie in einem Zeitraum von 30 bis 90 min zu einer deutlichen Verbesserung führt, längere Zeiträume jedoch keinen positiven Effekt ausüben.

HOFFMAN et al. (1991) kühlten Ratten parallel mit dem ischämischen Insult auf 31 °C herunter. Als Ischämiemodell wählten sie den einseitigen Verschluss der A. carotis communis unter simultanem Blutentzug bis auf eine Senkung des MAP auf 30 mmHg. In den anschließenden Untersuchungen konnten sie eine signifikante Verringerung der histopathologischen Schäden und eine Verbesserung des neurologischen Endergebnisses bei den Hypothermie-behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren finden.

ZHANG et al. (1993) wiesen nach, dass eine Hypothermie von 30 °C nach temporärer fokaler Ischämie bzw. von 24 °C nach permanenter fokaler Ischämie zu einer Verringerung der Infarktgröße führt. Allerdings konnte dieser neuroprotektive Effekt nur dann ausgelöst werden, wenn die Hypothermie postischämisch (innerhalb der ersten Stunde) induziert wurde.

YANAMOTO et al. zeigten 1999, dass man durch Kombination von intra- und post-ischämischer Hypothermie eine deutliche Reduktion des Infarktvolumens erreichen kann, und, dass die Hypothermie auch über einen Beobachtungszeitraum von 30 Tagen schützt. Allerdings muss die Hypothermie über mehrere Stunden der Reperfusion-Phase ausgedehnt werden, um eine deutliche Verbesserung zu erreichen. MAIER et al. (2001) hingegen untersuchten im Modell der MCAO (2-stündig) den postischämischen Langzeiteffekt der hypothermen (33 °C) neuroprotektiven Wirkung. In verschiedenen Gruppen begannen sie die Hypothermie mit einer Verzögerung auf den ischämischen Insult von 90, 120 oder 180 min;

in einer weiteren Studie konnten sie den Langzeitschutzeffekt der 2-stündigen milden Hypothermie nachweisen.

In ihrer transienten MCAO-Studie wiesen KOLLMAR et al. (2002) mit einer Magnetic Resonance Imaging-Studie den postischämischen positiven Effekt der moderaten Hypothermie innerhalb der Reperfusion-Phase nach. Die Tiere wurden nach 120-minütigem Verschluss der MCA und einer weiteren Stunde nach Reperfusion für 5 h auf 33 °C abgekühlt. Im Vergleich zur normothermen Kontroll-Gruppe wiesen diese Tiere eine höhere Überlebensrate, ein besseres neurologisches Endergebnis, eine Reduktion des Infarkt-volumens und eine geringere Ödematisierung auf.

EBERSPÄCHER et al. (2003) untersuchten in einer Vorläuferstudie den Effekt der Hypothermie 4h postischämisch auf die Expression der Apoptose-assoziierten Proteine.

Klinische Studien aus der Humanmedizin

Schon 1959 erfolgte eine klinische Studie zum Einfluss der Hypothermie. Allerdings waren die gewonnenen Ergebnisse unzuverlässig, da weder die Behandlungsmethoden standardisiert waren noch ausreichende Kontroll-Gruppen untersucht wurden (SEDZIMIR 1959).

Bereits 1962 führten DRAKE und JORY erste Studien bezüglich des neuroprotektiven Einflusses der Hypothermie durch. Bei 21 Patienten mit schweren Schädel-Hirn-Traumen und aussichtsloser Prognose bei konservativer Therapie senkten sie die Körpertemperatur artifiziell über einen Zeitraum von zwei bis zehn Tagen ab. Neun Patienten starben, zwölf überlebten. Von den Überlebenden zeigten sechs Patienten schwere bleibende neurologische Ausfallserscheinungen.

Während in den fünfziger und sechziger Jahren eine kurze, tiefe Absenkung der Körpertemperatur als Mittel der Wahl angesehen wurde, etablierte sich in den folgenden Jahren die moderate und milde Hypothermie als Standard. So wandten SHIOZAKI et al. (1993) in ihren Studien eine Hypothermie von 34 °C über einen Zeitraum von 38 h bei 33 Patienten mit schweren Schädel-Hirn-Traumen an. Sie zeigten, dass in der Hypothermie-Gruppe der intrakranielle Druck um etwa 10 mmHg gesenkt werden konnte und die Letalität auf 50 % reduziert wurde. In der Kontroll-Gruppe hingegen entwickelten sich unkontrollierbare Steigerungen des intrakraniellen Drucks, was zu einer Todesrate von 82 % führte. Eine weitere Studie führten MARION et al. 1993 durch. Innerhalb der ersten zehn Stunden nach dem Trauma kühlten sie ihre Patienten auf eine Temperatur von 33 bis 32 °C ab und hielten die Hypothermie-Behandlung über die nächsten 24 h aufrecht. Auch hier wurde

eine signifikante Senkung des intrakraniellen Drucks und der cerebralen Durchblutung ausgelöst und damit eine Verbesserung im Vergleich zur untersuchten Kontroll-Gruppe erzielt.

In einer vierjährigen Studie mit insgesamt 396 Patienten wurde wiederum der neuroprotektive Effekt der Hypothermie bei der Behandlung von schweren Schädel-Hirn-Verletzungen nachgewiesen. Innerhalb von 1 bis 20 h nach dem Trauma wurde die Behandlung begonnen und etwa 1 bis 7 Tage beibehalten. Diese bestand in einer Absenkung der rektalen Temperatur auf 32 bis 35 °C. Mit der Verbesserung und Stabilisierung des intrakraniellen Drucks wurden die Patienten mit einer Rate von 1 °C/4 h wieder langsam erwärmt. Als Ergebnis zeigte sich auch hier eine signifikante Reduktion des intrakraniellen Drucks, des Glucose-Spiegels, der Lactat-induzierten Azidose und eine Verbesserung der cerebralen Durchblutung. Des Weiteren sank die Mortalität und die Patienten boten deutliche Verbesserungen in der Phase der Rehabilitation (ZHI et al. 2003).

Anhand dieser Studien zeigt sich, dass die Hypothermie durchaus als Behandlungsmethode im Rahmen der Behandlung schwerer Schädel-Hirn-Verletzungen geeignet ist und sicherlich auch in anderen Fällen, wie beispielsweise der Schlaganfalltherapie angewendet werden kann. Um die optimalen Wirkungen zu entfalten, wie Reduktion des histopathologischen Zellschadens, Suppression des Hirnstoffwechsels und Verbesserung des neurologischen Defizits, darf die Körpertemperatur nicht zu weit abgesenkt werden. Des Weiteren muss man die Behandlung innerhalb weniger Stunden beginnen und eine unkontrollierte Erwärmung durch Fieber verhindern (WERNER 1997).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Zielvorstellung

Das Ziel dieser Studie ist es, den neuroprotektiven Einfluss der Hypothermie-Behandlung auf die Expression Apoptose-assoziiierter Proteine nach inkompletter cerebraler Ischämie mit Reperfusion bei der Ratte über Beobachtungszeiträume bis zu 28 Tagen zu untersuchen.

Als Modell für eine inkomplette cerebrale Ischämie wird der transiente Verschluss der A. carotis communis in Kombination mit Hypotension (Reduktion des MAP auf 40 mmHg) durch Blutentzug gewählt. Um die mögliche neuroprotektive Wirkung der Hypothermie zu beurteilen, werden nach unterschiedlichen Beobachtungszeiträumen (1, 3, 7 und 28 Tage) die Konzentrationen verschiedener Apoptose-assoziiierter Proteine (Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2) im Hirngewebe bestimmt, da diese genauen Einblick in das Schicksal der Zelle gewähren. Bei Zelltod überwiegen die pro-apoptotischen Proteine (Bax und p53), bei Überleben die anti-apoptotischen (Bcl-2 und Mdm-2). Mit Hilfe eines immunhistochemischen Nachweisverfahrens wird die räumliche Verteilung und Konzentration der vier Apoptose-assoziierten Proteine in bestimmten Regionen (CA1- und CA3-Region des Hippocampus und unterer Ast des Gyrus dentatus) untersucht. Außerdem stellt man diese Proteine semiquantitativ durch eine Western-Blot-Analyse dar.

EBERSPÄCHER et al. wiesen 2003 in ihren Studien den supprimierenden Effekt der Hypothermie 4 h postischämisch auf das pro-apoptotische Bax-Protein nach. Die vorliegende Arbeit beruht auf dem gleichen Versuchsdesign und soll untersuchen, ob der bereits nachgewiesene Kurzeiteffekt (4 h postischämisch) der Neuroprotektion durch Hypothermie auch über einen längeren Zeitraum (1, 3, 7 und 28 Tage) besteht.

Durch die vorliegende Studie sollen Erkenntnisse zur potentiellen Neuroprotektion der Hypothermie erweitert werden. In einer ähnlich aufgebauten Arbeit wird die Auswirkung von Propofol auf die Expression der oben genannten Apoptose-assoziierten Proteine untersucht (STEGEMANN in Vorb.).

Zielvorstellung ist es, im positiven Fall bei Nachweis einer Neuroprotektion die therapeutischen Möglichkeiten der Schlaganfalltherapie erweitern zu können.

Material und Methoden

3.1.1 Versuchstiere und deren Haltung

Für den geplanten Versuch, das Durchführen einer inkompletten cerebralen Ischämie mit postischämischer Hypothermie und anschließender Reperfusion, werden männliche Sprague-Dawley Ratten (CD8 Auszuchtstamm) mit einem Durchschnittsgewicht von 406 ± 65 g (Fa. Charles River, Sulzfeld) herangezogen. Zur Adaptation werden die Tiere mindestens eine Woche vor ihrem Versuchseinsatz in Gruppen von maximal fünf Tieren in Makrolonkäfigen (Typ 4) gehalten. Die Unterbringung erfolgt bei konstantem Klima mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60 % und einer Raumtemperatur von 20 bis 23 °C. Mit Hilfe einer automatischen Anlage wird die Beleuchtung exakt alle 12 Stunden von hell (50-100 Lux) auf dunkel umgestellt.

Gefüttert werden die Tiere mit Alleinfutterpellets für Ratten und Mäuse (Ssniff R/M-Haltung, 10 mm, nitrosaminarm, Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). 16 Stunden vor dem Eingriff wird den Tieren das Futter entzogen, um so einen standardisierten, niedrigen normoglycämischen Zustand zu erreichen. Wasser können die Tiere jedoch jederzeit ad libitum zu sich nehmen. Als Einstreu dient entkeimtes und entstaubtes Weichholzgranulat (Fa. Altromin, Lage/Lippe).

Gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes (TierschG i.d.F. vom 25.05.1998, BGB II S. 1105) wurde das Tierversuchsvorhaben durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.1.2 Allgemeiner Versuchsplan

Im Überblick gliedert sich der Versuch in einen experimentell-operativen (Präparation, Äquilibration, Ischämie, Reperfusion, Hypothermie und Erholung) und einen laboranalytischen Abschnitt (Immunfluoreszenz-Färbung und Western-Blot-Analyse).

Im ersten Teil wird bei den Tieren im Versuchsmodell eine inkomplette cerebrale Ischämie mit anschließender Reperfusion induziert und dabei der Einfluss von postischämischer Hypothermie untersucht. Nach festgelegter Überlebenszeit erfolgt die Entnahme und weitere Verarbeitung des Gehirns (Herstellung von Kryoschnitten und Probenaufbereitung). Im zweiten Abschnitt werden mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Färbung und Western-Blot-Analyse die Konzentrationen von Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 als repräsentative Vertreter der Apoptose-assoziierten Proteine gemessen.

Gruppeneinteilung

Insgesamt gehen in den Versuch 72 Ratten als Versuchstiere ein. Diese werden randomisiert den einzelnen Versuchsgruppen Normothermie (n=32), Hypothermie (n=32) oder Nativtiere (n=8) zugewiesen. Eine weitere Unterteilung der Normothermie- und der Hypothermie-Gruppe ergibt sich dadurch, dass man den Tieren randomisiert eine Überlebenszeit von 1, 3, 7 oder 28 Tagen zuweist.

Normothermie-Gruppe (Kontrolle)

Nach Vorbereitung, Präparation der Gefäßzugänge und Äquilibrations-Phase wird bei den Tieren der Normothermie-Gruppe unter Hypotension durch Blutentzug und Abklemmen der rechten A. carotis communis eine inkomplette cerebrale Ischämie über 45 min herbeigeführt. Nach anschließender Reperfusion folgt die Erholungsphase.

Hypothermie-Gruppe

Ebenso wie in der Normothermie-Gruppe durchlaufen auch diese Tiere den gesamten Versuch mit Präparation, induzierter cerebraler Ischämie, Reperfusion und Erholung. Im Unterschied zur Normothermie-Gruppe jedoch beginnt mit der Reperfusion das 30-minütige Abkühlen der Tiere durch Auflegen von Eisbeuteln. Hierauf folgt die 1-stündige Phase der Hypothermie (Erniedrigung der perikraniellen Temperatur auf 34 °C), der sich dann eine 30-minütige Phase der Wiedererwärmung anschließt. Der Versuch endet mit der Erholungsphase.

Nativtiere

Die Tiere dieser Gruppe werden ohne vorhergehende Manipulation oder Medikation unter tiefer Halothan-Narkose getötet. Sie dienen dazu, einen physiologischen Standard für die anschließenden Untersuchungen zu gewinnen und anhand der ermittelten Ergebnisse die Analysemethoden auf etwaige Unstimmigkeiten zu überprüfen.

Tabelle 1 Darstellung der Versuchstiergruppen mit Intervention und Überlebenszeit

Gruppen- bezeichnung	Intervention		Überlebenszeit			
	Ischämie	Hypothermie	1d	3d	7d	28d
Normothermie n=32	+	-	n=8	n=8	n=8	n=8
Hypothermie n=32	+	+	n=8	n=8	n=8	n=8
Nativtiere n=8	-	-	-	-	-	-

3.1.3 Experimentell-operativer Abschnitt

Zu Beginn werden die Versuchstiere allgemein untersucht, um kranke Tiere auszuschließen. Nach einem umfassenden Check der Geräte auf deren Funktionsfähigkeit beginnt der operative Abschnitt.

3.1.3.1 Vorbereitung und Narkoseeinleitung

16 Stunden vor der Versuchsdurchführung werden die Tiere nüchtern gesetzt, um einen gleichmäßig niedrigen normoglycämischen Zustand zu induzieren. Wasser können sie jederzeit ad libitum zu sich nehmen.

Zur Einleitung der Narkose setzt man die Ratte in einen Glaszylinder (ca. 25 cm groß) mit Deckel, auf dessen Boden sich ein mit Halothan (Halothan ASID, Rüsch Hospital Vertriebs GmbH, Böblingen) getränkter Zellstoff befindet. Bei ausreichender Narkosetiefe erfolgt die Intubation der auf einem Schrägbrett rücklings befestigten Ratte mit Hilfe eines modifizierten Kinderlaryngoskops (nach Steigenberger). Als Tubus dient eine angespitzte Venenverweilkanüle (Cavafix Certo 1,5 x 2,0 mm/16 G, 5 cm, Fa. Braun, Melsungen).

Bei der maschinellen Beatmung handelt es sich um ein halboffenes System ohne Rückatmung mit einer konstanten Frischgaszufuhr von mindestens 2 l/min. Das Tier wird kontrolliert beatmet mit Hilfe einer volumengesteuerten Beatmungspumpe (Harvard Rodent Ventilator, Model 683, Fa. Harvard Apparatus Inc., South Natick, USA). Als Inhalationsanästhetika werden während der Präparation Isofluran (Forene[®], Fa. Abbot GmbH, Wiesbaden) und

Lachgas (66 %) in Sauerstoff (33 %) verwendet. Mit etwa 3,5 Vol % Isofluran flutet man an, die Erhaltungsdosis liegt je nach Wirkung bei 1,5 bis 2,5 Vol %.

Laufend werden die endexpiratorischen Gaskonzentrationen von CO₂, O₂, N₂O und Isofluran, die Atemfrequenz und der Beatmungsdruck durch einen Atemgasmonitor (Capnomac, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) überwacht. Durch Variation der Beatmungsfrequenz und des Beatmungsvolumens hält man die endexpiratorische CO₂-Konzentration konstant zwischen 38 und 42 mmHg.

Nach Abschluss der Präparation zu Beginn der Äquilibrierungs-Phase wird die Anästhesie umgestellt (siehe Kapitel 3.1.3.3).

3.1.3.2 Präparation

Um einer Thrombosierung vorzubeugen, spült man die Katheter, die über Nacht in Heparin eingelegt waren, vor der Operation mit einer mit Heparin (Liquemin RF, Fa. Bode, Hamburg) versetzten Vollelektrolytlösung (Thomaejonin[®], Fa. Delta Select, Pfullingen).

Nach Rasur und Desinfektion wird die Haut in der rechten Inguinalgegend eröffnet und die rechte Vena und Arteria femoralis katheterisiert. Vor jeder Inzision infiltriert man das Operationsfeld mit dem Lokalanästhetikum Bupivacain (Bucain 0,5 %, curasan[®], Fa. Pharma AG, Kleinostheim). Als Katheter werden Polyethylenkatheter (Außendurchmesser: 0,97 mm, Innendurchmesser: 0,58 mm, Länge 33,5 mm, LL-Aufsatz, eigene Herstellung) verwendet. Der arterielle Katheter dient zur Messung des Blutdrucks, zur Blutgasanalyse (BGA, pH/Blutgasanalyser 865, Fa. Bayer Diagnostics, Fernwald) mit einer heparinisierten Kapillare (MultiCap 175 µl, Fa. Chiron Diagnostics, Fernwald) und zur Bestimmung des Blutzuckerspiegels durch ein Schnelltestgerät (Glucometer Elite[®], Fa. Bayer Diagnostics, München). Neben den Blutgaswerten bestimmt man den Gehalt an Gesamthämoglobin (CO-Oximeter 482, Fa. Instrumentation Laboratory, Mailand, Italien). Für die spätere Blutdruckmessung wird der arterielle Katheter mit einem Druckdom (MX960, Fa. Medexmedical, Lancashire, England) verbunden, dessen Gegenspülung mit einer 0,9 %igen Kochsalzlösung hergestellt wird. Bei der späteren Blutdruckmessung werden sowohl der systolische und diastolische Blutdruck, als auch der MAP durch einen Monitor dargestellt (Cardiicap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland).

Über den venösen Katheter erfolgt der Blutentzug während der Ischämie und die anschließende Reinfusion. Im weiteren Verlauf eröffnet man die Haut an der rechten Halsseite paramedian, um so die Vena jugularis im Sulcus jugularis zwischen dem M. brachio-

cephalicus und M. sternooccipitalis zweifach zu katheterisieren. Über diese Katheter erfolgt die Applikation von folgenden Medikamenten:

Während des gesamten Versuchs, abgesehen von der Phase der Ischämie, wird das Muskelrelaxans Rocuronium (Esmeron[®] 50 mg/ml, Fa. Organon, BH Oss, Niederlande) in einer Dosierung von 17,3 bis 23,3 mg/kg KGW/h mittels eines Perfusors appliziert. Während der Ischämie wird statt dessen Natriumbicarbonat 8,4 % (1,4 ml/h, Fa. Delta Pharma) gegeben, um eine Azidose auszugleichen. Die zu verabreichende Menge richtet sich nach dem aktuellen **Base excess** (BE).

Anschließend präpariert man vorsichtig die A. carotis communis, die sich in der Tiefe ventrolateral der Trachea befindet, frei. Ohne die Durchblutung zu unterbrechen wird dieses Gefäß locker mit einem ca. 1 mm dicken Gummiband angeschlungen und in die physiologische Position zurückgelegt. Das Tier wird anschließend bäuchlings in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt, um die spätere Applikation der Lasersonden über dem Gehirn zu ermöglichen. Durch die Fixierung können etwaige Lageveränderungen verhindert werden. So erfolgt die Aufzeichnung der Laserflussdaten der Gehirndurchblutung ohne Verfälschung der Messergebnisse durch Lageveränderungen des Tieres.

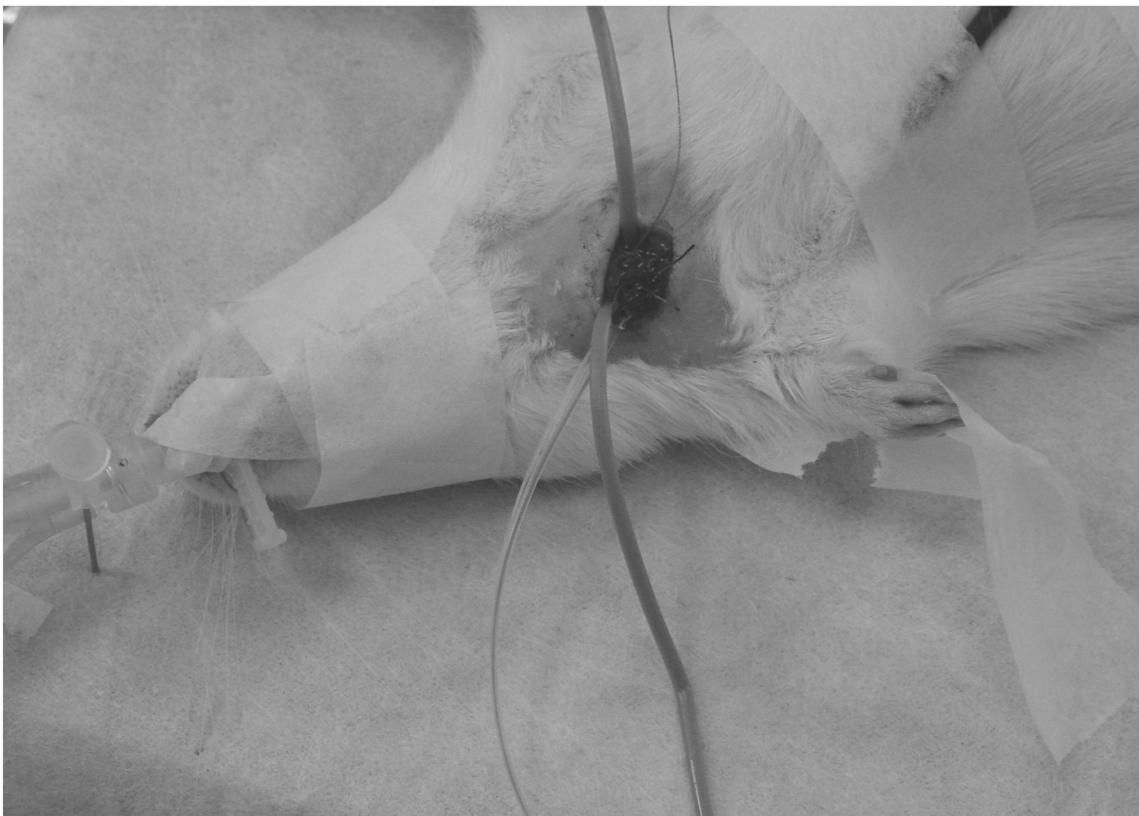


Abbildung 5 Darstellung der mit einem Gummiband locker fixierten A. carotis communis dextra und eines Katheters in der V. jugularis einer intubierten Ratte in Rückenlage

3.1.3.3 Applikation der verschiedenen Messsonden

Die Temperatursonde (Omega VIP Probe und Einstich-Fühler Modell HYP-0, angeschlossen an 3 Punkt PID-REGLER [Rückkopplung mit Wärmelampe], Fa. Omega engineering, Deckenpfronn) wird knochennah in den M. temporalis eingestochen. Um eine konstante perikranielle Temperatur von 37,5 °C zu erreichen, ist an das Messgerät eine Infrarot-Wärmelampe angeschlossen, die sich bei Abweichungen um $\pm 0,3$ °C automatisch an- bzw. abschaltet. Neben der perikraniellen findet auch die Bestimmung der peripheren Temperatur durch ein rektal eingeführtes digitales Thermometer statt.

Zur Ermittlung der Herzfrequenz wird ein Elektrokardiogramm (EKG) abgeleitet. Dafür platziert man zwei Nadelelektroden subkutan ventral am Brustkorb etwa 1 cm rechts und links des Brustbeins auf Höhe der Achselhöhlen und schließt sie an einen Monitor (Cardiocap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) an. Die EKG-Aufzeichnungen werden nicht weiter analysiert, sondern dienen lediglich der Ermittlung der aktuellen Herzfrequenz.

Nach der Fixation des Tieres im stereotaktischen Rahmen sticht man Nadelelektroden zur Ableitung des EEG der rechten und linken Gehirnhälfte (Oscilloscope Hameg 20 MHz, HM 205-3, Frankfurt) an folgenden Stellen ein: rechts und links, etwa 5 mm caudal des lateralen Augenwinkels (diese berühren den Schädelknochen), rechts und links über dem Ohransatz und oberhalb der Schwanzwurzel (Erdungselektrode). Dadurch wird eine weitgehend ungestörte Ableitung des EEG ermöglicht.

Die Beurteilung des EEG erfolgt schon während des Versuchs, für anschließende weiterführende Auswertungen werden die Aufzeichnungen mit Hilfe eines Zip[®] 250 Laufwerkes (Fa. Iomga, Roy, USA) auf Disketten gespeichert.

Durch die Laser-Doppler-Flussmessung (LDF) (Laser-Doppler Periflux 4001 Master, Fa. Perimed, Järfalla, Schweden) erfolgt die Messung der Hirndurchblutung. Dabei wird sehr exakt der Erythrozytenfluss innerhalb kleinster Gefäße bestimmt und daraus die Hirndurchblutung errechnet. Mit einem etwa 2,5 cm langen Schnitt eröffnet man die Haut über der Sutura sagittalis. Nach Präparation des Periosts wird das Schädeldach mit einem Diamantbohrer (Diamant-Schleifstift Kugelform Durchmesser 1 mm, Fa. Proxxon, Niersbach) ausgedünnt, da die LDF-Sonden nur eine Reichweite von etwa 1 mm aufweisen. Zur Überprüfung der korrekten Lage und Messung der LDF-Sonden schließt sich eine CO₂ - Provokation an. Dazu verursacht man durch Hyperventilation und Verringerung der Narkose eine künstliche Absenkung des paCO₂. Dadurch kommt es zur Vasodilatation mit Verringerung der Hirndurchblutung. Die LDF-Sonden sind dann richtig platziert, wenn nach kurzer Zeit eine Drosselung der Hirndurchblutung um etwa 10 % erreicht werden kann.

Nach Abschluss der Präparation und Überprüfung der Funktion sämtlicher Katheter, Sonden und Geräte erfolgt die Umstellung der Anästhesie auf Lachgas in O₂ (FiO₂=0,33) in Kombination mit Fentanyl (Fentanyl-Janssen, JANSSEN-CILAG GmbH, Neuss). Dieses wird in der Dosierung 10 µg/kg KGW als Bolus und dann 25 µg/kg KGW/h i.v. als Dauertropf-Infusion gegeben. Gleichzeitig verabreicht man das Muskelrelaxans Rocuronium in einer Dosierung von 17,3 bis 23,3 mg/kg KGW/h.

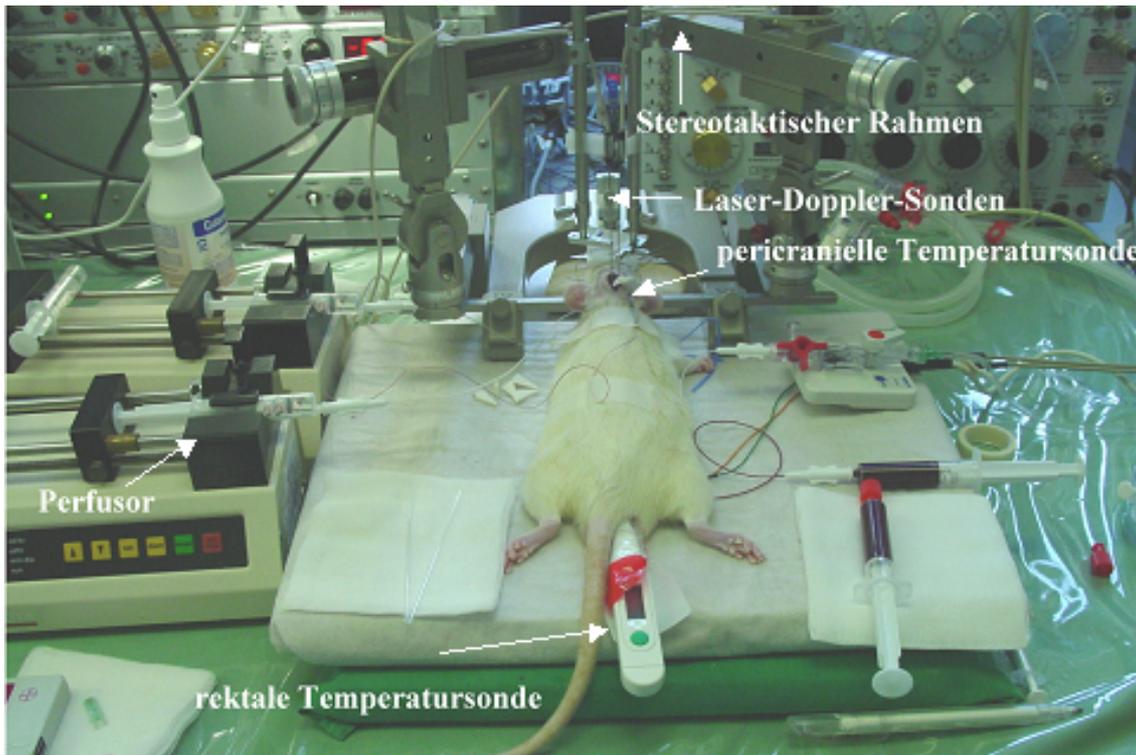


Abbildung 6 Versuchsaufbau während der Ischämie-Phase

Monitoring und erhobene Parameter während des operativen Abschnitts

Die anschließende Tabelle soll einen Überblick über die erhobenen Parameter geben und gleichzeitig als Anhaltspunkt für Normwerte der einzelnen Messungen dienen. Als Ausgangswert werden alle Werte nach Abschluss der Präparation bestimmt. Der zweite Messzeitpunkt erfolgt in der Ischämie-Phase (45 Isch=Messung nach 45 min in der Ischämie-Phase), ein weiterer während der Reperfusion (15 Rep=Messung nach 15 min in der Reperfusion-Phase) und der letzte im Verlauf der Erholungs-Phase (45 Rec=Messung nach 45 min in der Erholungs-Phase).

Tabelle 2 Übersicht über die während des operativen Abschnitts erhobenen Parameter mit Darstellung des Referenzbereiches (SHARP und LA REGINA 1998)

Messparameter während des operativen Abschnitts		
Parameter	Abkürzung	Referenzbereich
Rektale Temperatur	T_{rek}	37-38,5 °C
Perikranielle Temperatur	T_{pkran}	37-38,5 °C
Atemfrequenz	AF	70-110 Atemzüge/min
Herzfrequenz	HF	250-450 Schläge/min
Mittlerer arterieller Druck	MAP	70-105 mmHg
Arterieller CO ₂ -Partialdruck	paCO ₂	39,2 mmHg
Arterieller O ₂ -Partialdruck	paO ₂	93,2 mmHg
pH	pH	7,35
Base excess	BE	+1,8 ± 0,4
Hämoglobingehalt	Hb	110-180 g/dl
Glucose	Glc	65 mg/dl
Laser-Doppler-Fluss-Messung	LDF	Keine Angabe möglich, siehe Anmerkung
Rechte Hemisphäre	LDF _{re}	
Linke Hemisphäre	LDF _{li}	

Anmerkung zur Laser-Doppler-Fluss-Messung:

Eine Angabe eines Referenzwertes der Laser-Doppler-Fluss-Messung der Hirndurchblutung ist aufgrund der jeweils unterschiedlichen lokalen Sondenplatzierung nicht möglich.

Mit Hilfe der umfassenden Kontrolle der verschiedenen Parameter wird gewährleistet, dass kritische Zustände rechtzeitig erkannt und beherrscht werden. Dadurch wird der Versuchsablauf weitestgehend standardisiert.

3.1.3.4 Versuchsdurchführung

Äquilibration

Nach Umstellung der Narkose schließt sich die 52-minütige Äquilibrations-Phase an, um so zu gewährleisten, dass sich der Kreislauf des Tieres ausreichend an die Narkose adaptiert und im gesamten Versuch identische und damit vergleichbare Ausgangsbedingungen vorherrschen. Der Endwert dieser Phase dient als Ausgangswert für die anschließenden Messungen.

Hypoperfusion und Ischämie

Im Verlauf von 8 min entzieht man der Ratte langsam und gleichmäßig Blut über den Katheter der rechten V. femoralis. Dabei wird exakt so viel Blut (ca. 8-12 ml) entnommen, wie nötig ist, um den MAP auf 40 mmHg zu senken.

Das entnommene Blut bewahrt man bis zur Phase der Reinfusion in heparinisierten Spritzen auf. Nach Erreichen des angestrebten MAP von 40 mmHg schließt sich die Okklusion der rechten A. carotis communis mit einem Clip an, um damit die Ischämie zu induzieren. Gleichzeitig wird das Muskelrelaxans Esmeron abgesetzt und stattdessen 8,4 % Natriumhydrogencarbonat nach aktuellem BE (ca. 2,8 ml/h/kg KGW) appliziert, um so einer Azidose vorzubeugen. Die Ischämie-Phase dauert 45 min; über ständigen Entzug oder Zugabe von Blut stellt man den MAP konstant auf einen Wert von 40 mmHg ein.

Reinfusion und Hypothermieeinleitung

Diese Phase beginnt mit der Entfernung des die rechte A. carotis communis verschließenden Clips. Über einen Zeitraum von 15 min infundiert man langsam das zuvor entnommene Blut, um dadurch eine vollständige Reperfusion des Gehirns zu erreichen. Mit Beginn dieser Phase wird bei den Tieren der Hypothermie-Gruppe die perikranielle Temperatur durch Auflegen von Eisbeuteln innerhalb von 30 min kontinuierlich auf 34 °C erniedrigt.

Hypothermie

Für die nächsten 60 min senkt man die perikranielle Temperatur auf 34 °C ab.

Erwärmung

Innerhalb der nächsten 30 min erfolgt die langsame Wiedererwärmung der Tiere der Hypothermie-Gruppe mit Hilfe einer Wärmematte und einer Infrarotlampe. In diesem Zeitraum entfernt man alle Messsonden bzw. Katheter und vernäht die Wunden.

Erholung

Die Narkose wird langsam ausgeleitet und die Tiere extubiert. Bis alle Vitalfunktionen wieder hergestellt sind, beobachtet man die Tiere und setzt sie anschließend in den Käfig zurück.

Entsprechend der randomisierten Einteilung in die unterschiedlichen Gruppen schließt sich ein Überlebenszeitraum von 1, 3, 7 oder 28 Tagen an.

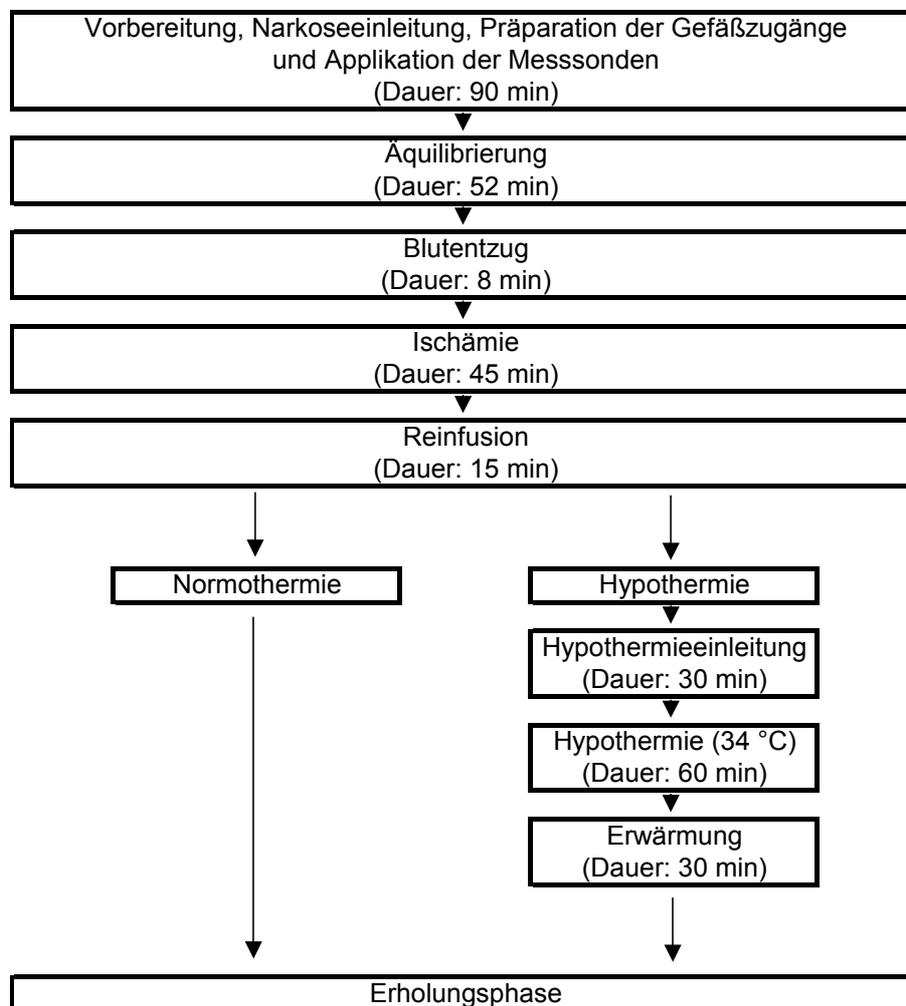


Abbildung 7 Schematische Darstellung des experimentell-operativen Abschnitts in der Übersicht

3.1.3.5 Dekapitierung, Präparation, Verarbeitung und Einfrieren des Gehirns

Entsprechend der jeweiligen Überlebenszeit wird das Tier in tiefer Halothananästhesie durch Genickbruch getötet. Zunächst entfernt man die Kopfhaut und hebt den M. temporalis beidseitig ab. Daran schließt sich die Entfernung der Nackenmuskulatur, des Os occipitale und des Os parietale an. Nach Durchtrennung der entsprechenden Gehirnnerven wird das Gehirn vorsichtig freigelegt und in ein mit Einbettmedium (Tissue Teck, Fa. Leica Instruments, Nussloch) gefülltes Aluminiumschälchen verbracht und vollständig damit bedeckt. Zum Gefrieren wird das Gehirn auf Trockeneis gelegt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -75 °C gelagert.

3.1.4 Laboranalytischer Abschnitt

Alle in diesem Abschnitt verwendeten Geräte, Materialien, Chemikalien, Antikörper und Lösungen sind einer detaillierten Auflistung in Kapitel 3.1.5 zu entnehmen.

3.1.4.1 Immunfluoreszenz-Färbung

3.1.4.1.1 Schneiden des Gehirns

Zu Beginn entfernt man möglichst vollständig das das Gehirn umgebende Einbettmedium. Mit Hilfe eines Präzisionsschneidegerätes (Kryotom HM 500, Fa. Microm, Walldorf), dessen Kammertemperatur -24 °C beträgt, werden Gehirnschnitte von jeweils 7 µm Dicke angefertigt. Zunächst hobelt man von rostral Gehirnschnitte ab, um die Messerausrichtung zu überprüfen und nötigenfalls noch einmal ändern zu können. Das Gehirn wird in der Ebene 33 in Serie geschnitten (vgl. Abbildung 8). Jeweils 2 hintereinanderliegende Schnitte (sowohl aus dem rostralen, als auch aus dem caudalen Bereich des Hippocampus) zieht man auf separate Objektträger (OT) auf. Da 2 Gehirnschnitte pro OT vorliegen, kann später jeweils der bessere Gehirnschnitt ausgewertet werden.

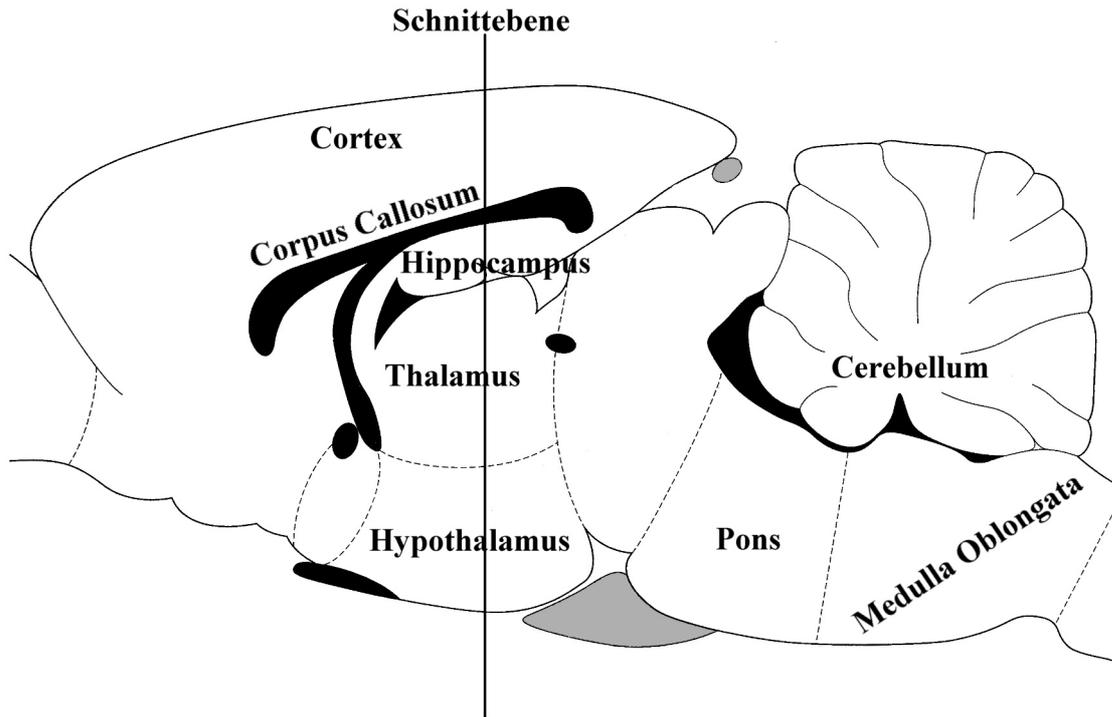


Abbildung 8 Schematische Darstellung der gewählten Schnittebene (Ebene 33) durch das Rattengehirn (PAXINOS und WATSON 1998)

3.1.4.1.2 Färbung

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Färbung werden die einzelnen Gehirnschnitte bezüglich der räumlichen Verteilung und der Quantität der Apoptose-assoziierten Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 untersucht. Dazu färbt man pro untersuchtem Apoptose-assoziierten Protein je zwei OT mit jeweils zwei rostralen und zwei caudalen Gehirnschnitten. Insgesamt benötigt man von jedem Versuchstier folglich mindestens 8 OT (siehe Übersicht der durchgeführten Färbungen auf S. 45).

Prinzip der Immunfluoreszenz-Färbung

Als immunhistochemischer Nachweis wird in dieser Studie das Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz-Technik verwendet. Ein erster spezifischer, nicht markierter Antikörper bindet an das gesuchte Zielprotein. Anschließend erfolgt die Überschichtung mit dem 2. Antikörper, der spezifisch an den 1. Antikörper bindet. Da an den 2. Antikörper ein Fluoreszenz-Farbstoff gebunden ist, kann über die Intensität der Fluoreszenz die Menge der gesuchten Proteine ermittelt werden (vgl. Abbildung 9).

Der Vorteil dieser indirekten Methode besteht in der wesentlich erhöhten Empfindlichkeit durch die Doppelbindung.

Durch Exposition mit Laserlicht erfolgt die Anregung der Fluoreszenz-Farbstoffmoleküle. Diese strahlen Licht unterschiedlicher Wellenlänge ab, das über einen Detektor gemessen und anschließend in ein Bild transformiert wird.

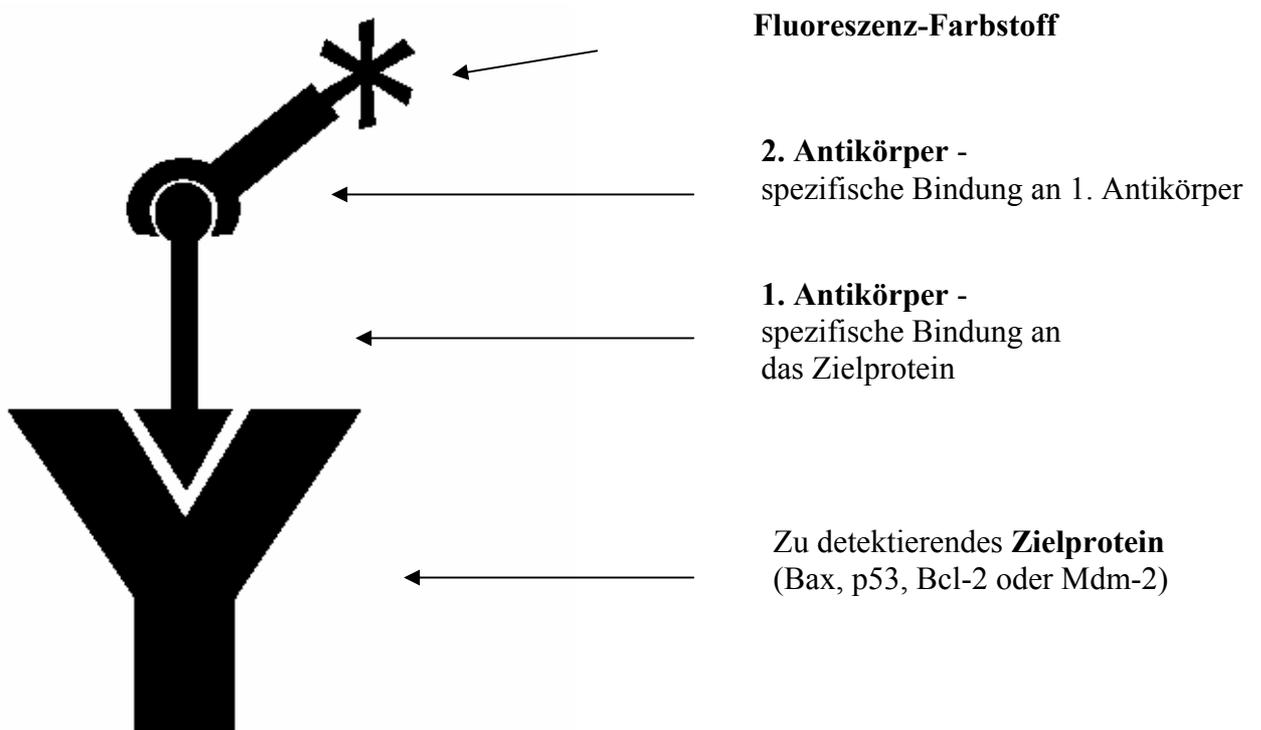
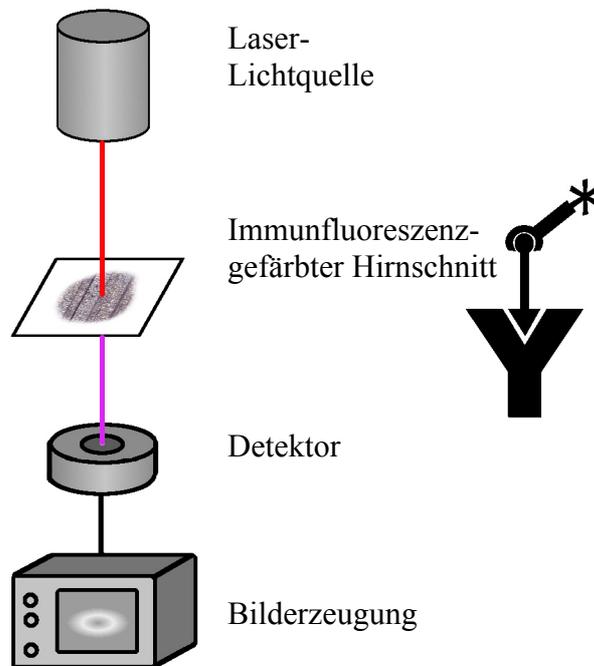


Abbildung 9 Darstellung des Prinzips der indirekten Immunfluoreszenz-Technik

EIGENE UNTERSUCHUNGEN – MATERIAL UND METHODEN

Alle Gehirnschnitte werden mikroskopisch beurteilt; auf jedem OT wird nur der qualitativ bessere ausgewertet. Der verbliebene Gehirnschnitt dient jeweils als Kontrolle und Sicherheit, da es manchmal zu Schneidefehlern oder Bildung von Artefakten kommen kann, so dass die Auswertung eines Gehirnschnittes unter Umständen unmöglich ist.

Übersicht der durchgeführten Färbungen pro Versuchstier

- 2 OT (Gehirn, Versuchstier) =>Anfärbung des Bax-Proteins
- 2 OT (Gehirn, Versuchstier) =>Anfärbung des p53-Proteins
- 2 OT (Gehirn, Versuchstier) =>Anfärbung des Bcl-2-Proteins
- 2 OT (Gehirn, Versuchstier) =>Anfärbung des Mdm-2-Proteins
- 1 OT (Leber, Nativtier) =>Positivkontrolle für das Bax-Protein
- 1 OT (Leber, Nativtier) =>Positivkontrolle für das p53-Protein
- 1 OT (Leber, Nativtier) =>Positivkontrolle für das Bcl-2-Protein
- 1 OT (Leber, Nativtier) =>Positivkontrolle für das Mdm-2-Protein
- 1 OT (Leber, Nativtier) =>Negativkontrolle der Leber
- 1 OT (Gehirn, Nativtier) =>Negativkontrolle des Gehirns

Ablauf der Immunfluoreszenz-Färbung im Überblick

- | | | |
|---|--|------------|
| 1 | Fixation durch 100 % Ethanol | 10 min |
| 2 | Waschen mit PBST
(PBST=engl.: phosphored buffered sodium and tween) | 30min |
| 3 | Blockieren mit 10 % fetales Kälber Serum (FKS) | 60 min |
| 4 | Inkubation mit 1. Antikörper | 60 min |
| 5 | Waschen mit PBST
LICHTSCHUTZ ! | 40 min |
| 6 | Inkubation mit 2. Antikörper (sehr lichtempfindlich !) | 60 min |
| 7 | Waschen mit PBST | 10 min |
| 8 | Eindecken und Versiegeln | ca. 30 min |

Gesamtdauer für einen Färbedurchgang etwa **6 Stunden**

EIGENE UNTERSUCHUNGEN – MATERIAL UND METHODEN

Zunächst fixiert man die noch tiefgefrorenen Schnitte in einem Objektträgerhalter für 10 min mit 100 % Ethanol pro analysi bei Zimmertemperatur durch Flüssigkeitsentzug. Danach werden die Präparate für 30 min auf einer Schüttelmaschine mit PBST gewaschen, wobei das PBST alle 10 min ersetzt wird. Nach Abschütteln des PBST lagert man die OT horizontal. Um das Abfließen anschließend aufgebrachtener Flüssigkeiten zu verhindern, werden die Gehirnschnitte mit einem Fettstift (PAP-Pen) umrandet. Zur Verhinderung von Verdunstungsverlusten verbringt man die OT anschließend in eine feuchte Kammer und trägt das Blockierungsmedium auf. Hierbei handelt es sich um 500 µl 10 %iges FKS pro OT. Es dient dazu, alle unspezifischen Bindungsstellen des Gehirnschnittes zu blockieren. Die OT werden für 1 h mit dem Blockierungsmedium in der feuchten Kammer inkubiert. Zwischenzeitlich zentrifugiert man den 1. Antikörper, der immer gekühlt werden muss (13000 U/min, 3 min, 4 °C), um mögliche Verunreinigungen zu entfernen.

Nach Ablauf der Stunde wird das Blockierungsmedium abgeschüttelt und 500 µl (pro OT) der 1. Antikörper-Lösung aufgetragen.

Die 1. Antikörper-Lösung stellt man in folgenden Verdünnungen her (EBERSPÄCHER 2001).

Bax	1:80	=>1.500 µl 10 % FKS + 18,75 µl Bax (P19) und Bax (I19)
p53	1:80	=>1.500 µl 10 % FKS + 18,75 µl p53
Bcl-2	1:60	=>1.500 µl 10 % FKS + 25 µl Bcl-2
Mdm-2	1:60	=>1.500 µl 10 % FKS + 25 µl Mdm-2

Diese Verdünnungen wurden ausgewählt, da sie eine geringe Anfärbung des Hintergrundes bei gleichzeitiger ausgezeichneter Darstellung der Zellen gewährleisten.

Nach Ablauf der 1-stündigen Inkubationszeit werden alle OT in PBST auf der Schüttelmaschine gewaschen. Das mehrfach gewechselte PBST dient dazu, ungebundenen und damit überschüssigen 1. Antikörper zu entfernen. Da der 2. Antikörper sehr lichtempfindlich ist, muss man jetzt mit Lichtschutz (Alufolie um alle Gefäße und abgedunkelter Raum) arbeiten. Für den 2. Antikörper wurde in o.g. Vorversuchen eine Verdünnung von 1:800 festgelegt. Für 14 OT ergibt sich eine Mischung von 7.000 µl 10 % FKS und 8,75 µl 2. Antikörper. Mit der 2. Antikörper-Lösung werden alle OT für 1 h in der feuchten Kammer inkubiert. Danach schließt sich ein weiterer Waschvorgang mit PBST an, um überschüssigen, nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Nun folgt der letzte Schritt der Färbung. Die OT werden mit einem Tropfen Mounting Medium versetzt, ein Deckglas blasenfrei aufgelegt und dieses mit

Hilfe von Nagellack versiegelt. Das Mounting Medium trägt man als Schutz für den Immunfluoreszenz-Farbstoff auf. Nach ausgiebigem Trocknen werden die OT dunkel bei 4 °C verwahrt.

Da die Intensität der Fluoreszenz nachlässt, müssen die Präparate innerhalb der folgenden 24 h mit Hilfe eines konfokalen Laserscan Mikroskops (englisch: **Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)**) gescannt und fotografiert werden.

Negativ- und Positivkontrollen

Bei jeder Färbung werden zusätzlich Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt. Dadurch garantiert man, dass die Färbungen während der gesamten Untersuchung eine gleich gute Qualität aufweisen, und es wird verhindert, dass fehlerhafte Färbungen irrtümlicherweise in die Auswertung einbezogen werden.

Für die Negativkontrolle dient jeweils ein OT mit Leber- und Gehirnschnitten eines Nativtieres. Da der 1. Antikörper bei dieser Färbung weggelassen wird, inkubiert man die OT länger mit dem Blockierungsmedium. Im Anschluss daran findet die Zugabe des 2. Antikörpers statt, an den der Immunfluoreszenz-Farbstoff gekoppelt ist. Durch das Fehlen einer spezifischen Bindung kommt es zum unspezifischen Binden des 2. Antikörpers. So wird lediglich die unspezifische Eigenfluoreszenz des jeweiligen Präparates dargestellt.

Als Ausgangsmaterial für die Positivkontrollen dienen Leberschnitte eines Nativtieres, da die gesuchten Apoptose-assoziierten Proteine hier in großer Menge vorhanden sind (HARADA et al. 2000; PAPAKYRIAKOU et al. 2003).

Für jeden Färbedurchgang der Positivkontrolle benötigt man pro gefärbtes Apoptose-assoziiertes Protein einen OT mit einem Leberschnitt. Im Gegensatz zu den Negativkontrollen wird hier der 1. Antikörper aufgetragen und es kommt so zur spezifischen Fluoreszenz-Markierung der gesuchten Apoptose-assoziierten Proteine.

Durch die Negativ- und Positivkontrollen kann man die Qualität der Immunfluoreszenz-Färbung in jedem Färbedurchgang kontrollieren. Bei korrekter Durchführung des Färbeprotokolls müssen die Positivkontrollen eine wesentlich stärkere Fluoreszenz als die Negativkontrollen aufweisen.

3.1.4.1.3 Aufnahme und Archivierung am Konfokalen Laserscan Mikroskop

Wie bereits erwähnt, werden die Präparate spätestens 24 h nach der Immunfluoreszenz-Färbung mit Hilfe des CLSM (CLSM 410, Fa. Carl Zeiss, Jena) betrachtet, gescannt und abgespeichert.

Aus den gespeicherten Daten ermittelt man anschließend die Intensität und räumliche Verteilung angefärbter Zellen bestimmter Regionen (CA1- und CA3-Region des Hippocampus und unterer Ast des Gyrus dentatus).

Die Negativ- und Positivkontrollen werden ebenfalls unter identischen Bedingungen gescannt und abgespeichert, um so später die Eigenfluoreszenz der Gehirnschnitte subtrahieren zu können. Zunächst begutachtet man die Präparate fluoreszenzmikroskopisch (Axiovert 100, Fa. Carl Zeiss, Jena) und wählt jeweils den besseren der beiden Gehirnschnitte pro OT aus. So werden Artefakte und Schneidefehler ausgeschlossen und es wird gewährleistet, dass immer die qualitativ besten Bilder in die Auswertung eingehen. Dann stellt man die auszuwertenden Regionen mit dem Mikroskop ein und scannt jeweils zwei unterschiedliche Positionen der CA1- und CA3-Region des Hippocampus und zwei weitere Stellen des unteren Astes des Gyrus dentatus mit dem CLSM (vgl. Abbildung 10).

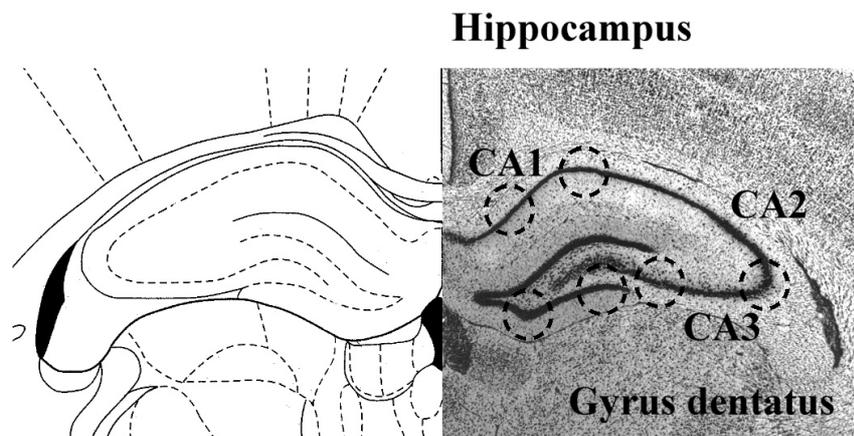


Abbildung 10 Übersichtsbild über die auszuwertenden Regionen mit den eingezeichneten sechs Scan-Positionen

Um vergleichbare Ergebnisse zu erreichen, werden standardisierte Einstellungen des Laserscan Mikroskops verwendet:

Lochblende (Pinhole):	13
Emissionsfilter:	Bandpass 512-565 nm
Anzahl der gemittelten Bilder:	8

Als Laser dient ein blauer Argon-Laser (Wellenlänge: 488 nm) mit einer maximalen Leistung von 25,0 mW. Nach Einschalten muss man etwa eine halbe Stunde warten, bis der Laser seine maximale Leistung erreicht hat, die man durch das Powermeter überprüfen kann. Um eine konstante Leistung des Lasers zu gewährleisten, wird während eines Untersuchungstages in regelmäßigen Abständen die Laserintensität mit dem Powermeter gemessen. Auf diese Weise ist es möglich, eventuell vorkommende Schwankungen der Laserleistung zu erkennen und umzurechnen und so wieder standardisierte und damit über den gesamten Untersuchungszeitraum identische Bilder aufzunehmen.

Konfokales Prinzip

Bei der konfokalen Laserscan Mikroskopie dient als Lichtquelle ein Laser, der monochromes Licht einer bestimmten Wellenlänge aussendet. Dieser Lichtstrahl durchläuft ein Linsen- und Lochblendensystem und trifft auf einen Strahlteiler, der Licht dieser Wellenlänge ungehindert passieren lässt. Durch das Objektiv wird das Licht in die Untersuchungsebene der Probe fokussiert. Innerhalb der Probe kommt es im Fokuspunkt des Laserlichts zur Anregung der fluoreszierenden Moleküle, die dadurch Licht längerer Wellenlängen aussenden. Dieses Licht erreicht rückläufig durch das Objektiv den Strahlteiler, der diese Wellenlängen über eine Lochblende in den Detektor (Photomultiplier) reflektiert. Der Detektor erzeugt je nach Stärke des Lichtsignals ein entsprechendes elektrisches Signal. Die Gesamtheit der gescannten Bildpunkte wird im letzten Schritt durch einen Computer zu einem Bild zusammengesetzt (siehe Abbildung 11).

Durch die zwischengeschaltete konfokale Lochblende (Pinhole) kann nur Licht einer bestimmten Untersuchungsebene den Detektor erreichen. Dadurch wird gewährleistet, dass sämtliches Licht, das nicht aus der Ebene stammt, nicht aufgenommen wird. So sind auch in "dickeren" Schnitten punktgenaue Aufnahmen einzelner Ebenen möglich. In der vorliegenden Studie verwendet man, wie bereits ausgeführt, einen Argon-Laser, der blaues Licht mit der Wellenlänge 488 nm aussendet. Der verwendete Fluoreszenz-Farbstoff Fluoresceinisothio-

cyanat emittiert nach Anregung durch das Laserlicht Fluoreszenzlicht mit einer maximalen Wellenlänge bei 520 nm (grüner Bereich).

Prinzipieller Strahlengang eines LSM

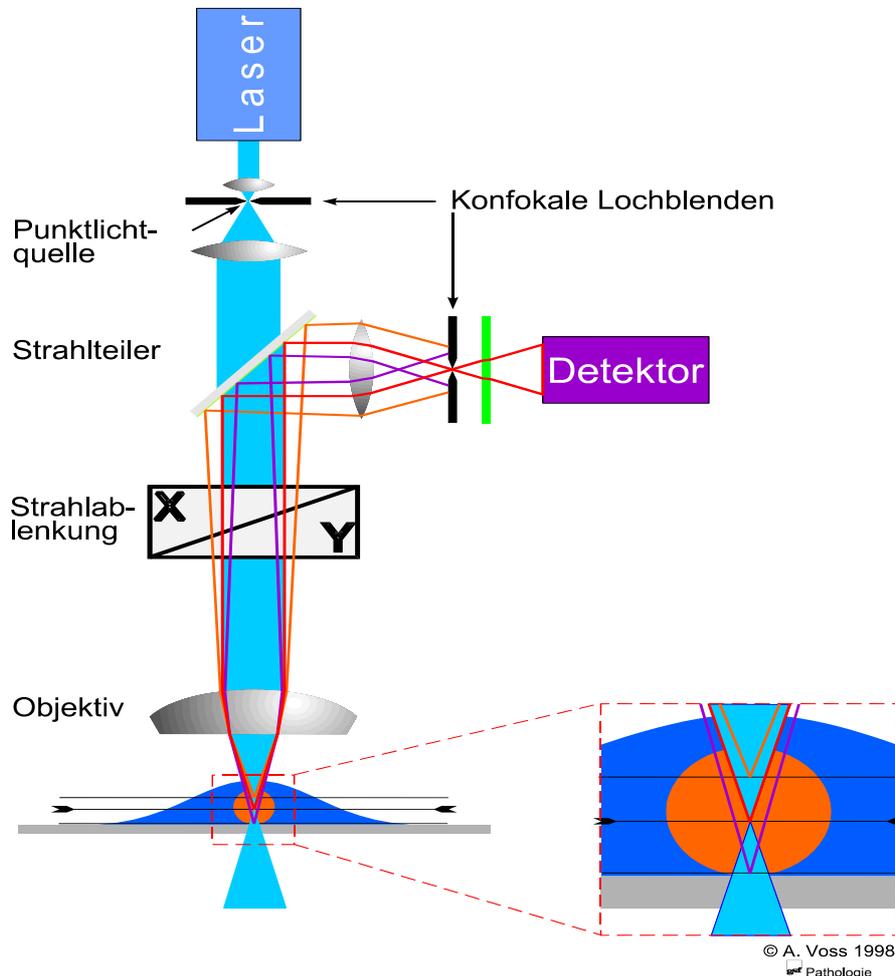


Abbildung 11 Schematische Darstellung des prinzipiellen Strahlengangs eines konfokalen Laserscan Mikroskops

(Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Herrn A. Voss, GSF, Neuherberg bei München)

Der große Vorteil der konfokalen Laserscan Mikroskopie besteht folglich darin, dass im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, bei der das gesamte Objekt gleichmäßig und stetig ausgeleuchtet wird, hier nur Licht bestimmter Untersuchungsebenen aufgezeichnet wird. So kann man auch in dickeren Gehirnschnitten exakt eine Ebene untersuchen.

3.1.4.1.4 Auswertung

Die Intensität der Fluoreszenz der gefärbten Zellen wird mit Hilfe des Computerprogramms KS 400 (Fa. Carl Zeiss, Jena) quantitativ ermittelt. Hierzu erstellt man zunächst eine Maske, die alle Zellen umschließt, die in die Auswertung eingehen sollen. Das Programm errechnet dann automatisch die Fluoreszenzintensität der markierten Zellen. Daran schließt sich die Bestimmung der unspezifischen Fluoreszenzfärbung des Hintergrundes an. Um die tatsächliche Fluoreszenzstärke der gemessenen Zellen zu erhalten, muss diese unspezifische Fluoreszenz von der Strahlungsintensität der ausgewählten Zellen subtrahiert werden.

Pro Versuchstier fertigt man alle Bildserien sowohl aus dem rostralen, als auch aus dem caudalen Gehirnschnitt der Ebene 33 an und wertet diese völlig unabhängig voneinander aus.

Für die statistische Berechnung wird der Mittelwert der gemessenen Immunfluoreszenz-Intensitäten herangezogen.

3.1.4.2 Western-Blot-Analyse

3.1.4.2.1 Probenaufbereitung

Bis zur Aufbereitung des nach dem Schneiden verbliebenen Probenmaterials muss das Gehirn bei -75 °C tiefgefroren bleiben. Bei der weiteren Verarbeitung ist unbedingt darauf zu achten, dass das Gehirn niemals auf mehr als 4 °C erwärmt wird, da es sonst zu irreversiblen Schäden kommen kann. Als Probenmaterial dienen der verbleibende Anteil des Hippocampus in einer Dicke von 1 mm. Dieses Gewebe wird aus dem Gehirn entnommen, lysiert und dessen Proteingehalt mit Hilfe einer photometrischen Messung ermittelt. Im letzten Schritt konserviert man die Proben für die anschließende Western-Blot-Analyse. Grundsätzlich erfolgt aus Kontrollgründen und zur Vermeidung von Fehlern eine Doppelbestimmung des Proteingehaltes aller Proben.

Der erste Schritt der Probenaufbereitung ist die Herstellung einer Protein-Standardreihe. Als Standard-Protein wird bovines Serum-Albumin verwendet in einer Verdünnung von 100 µg Serum-Albumin in 10 ml PBS dulbecco (PBS=engl.: **p**hosphored **b**uffered **s**odium). Von dieser Ausgangslösung stellt man eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 2,0; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05 und 0,02 mg/ml her. Als Blankwert dient pures PBS dulbecco.

Im nächsten Schritt müssen die gekühlten Gehirnabschnitte (rechter und linker Hippocampus) fein homogenisiert werden. Zunächst erfolgt eine mechanische Zerkleinerung des Ausgangsmaterials in einer Kugelmühle (12 Zirkonia beads 2,5 mm, 12 min bei 30 U/sec).

Daran schließt sich eine chemische Lysierung mit Hilfe von 300 µl Lysis-Puffer unter Zugabe von einer Tablette Complete an. Nach diesen beiden Vorgängen werden die Proben zentrifugiert (13.000 U/min, 10 min, 4 °C). Jeweils 220 µl des Überstandes pipettiert man in gekühlte Eppendorfgläser und vermischt sie mit 440 µl PBS dulbecco (im Verhältnis 1:2 verdünnt).

Diese Lösung dient dazu, vergleichbar zur Standardreihe, eine Verdünnungsreihe herzustellen. Die anschließende Proteinbestimmung erfolgt nach BRADFORD (1976). Das Bio-Rad-Protein-Assay wird im Verhältnis 1:4 mit Aqua bidest verdünnt. Jeweils 1 ml dieser Lösung wird in Einmal-Küvetten pipettiert unter Zusatz von 5 µl Probe- bzw. Standard-Verdünnungsreihe. Bei Zusammenführung der Reagenzien startet die Bradford-Reaktion, während der sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue R-250 durch Proteinbindung von 465 auf 595 nm verschiebt. Alle Proben müssen innerhalb einer Stunde analysiert werden.

Zur Auswertung findet zunächst die Bestimmung des Absorptionsmaximums aller Proben der Standard-Verdünnungsreihe mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm statt. Anschließend wiederholt man diesen Vorgang mit den Versuchstierproben. Alle Proben werden aus Sicherheitsgründen doppelt bestimmt; bei Abweichungen von mehr als 20 % wird der Pipettiervorgang und die spektrophotometrische Untersuchung komplett wiederholt. Aus den ermittelten Werten lässt sich eine Standardkurve erstellen, aus der sich dann die Werte der untersuchten Proben ablesen lassen. Es ist für die anschließende Western-Blot-Analyse vorgeschrieben, dass alle Proben eine konstante Proteinmenge enthalten. Daher muss rechnerisch die entsprechende Probenmenge ermittelt werden, unter der Vorgabe, dass eine weitere Verdünnung durch Zugabe von 600 µl PBS und 400 µl reduzierender SDS-Probenpuffer (englisch: sodium dodecyl sulfat, Natriumlaurylsulfat) erfolgt.

Die Proteinmenge muss also mindestens auf ein Endvolumen von 1200 µl angepasst werden. 600 µl dieser Lösung kann man sofort zur weiteren Verarbeitung verwenden, weitere 600 µl dienen eingefroren als Reserve. Um eine Aufbewahrung der Proben über mehrere Monate (tiefgefroren bei -75 °C) ohne Beeinträchtigung zu gewährleisten, muss man sie nach Aufschütteln für 5 min bei 95 °C aufkochen.

3.1.4.2.2 Elektrophorese, Elektrotransfer und Immunoblot

Grundsätzlich lässt sich die Western-Blot-Analyse in die Teilschritte elektrophoretische Auftrennung, Elektrotransfer und Immunoblot aufteilen. Mit dieser Analysemethode lassen sich semiquantitativ die Apoptose-assoziierten Proteine (Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2) nachweisen.

Elektrophorese

In der vorliegenden Studie dient als Verfahren ein diskontinuierliches Gелеlektrophoresesystem, das sog. Laemmli-System (LAEMMLI 1970) mit einem Trenn- und einem Sammelgel.

Zwischen zwei in einer speziellen Halterung senkrecht stehende Glasplatten wird zunächst das Trenngel gegossen und erst nach dessen Auspolymerisierung mit Sammelgel überschichtet. Für die notwendige Taschenbildung, in die später die Proben pipettiert werden, steckt man 1,5 mm dicke Kämmе in das Sammelgel ein. Bei der Anmischung des Trenngels muss man beachten, dass je nach Proteingröße der Anteil des Polyacrylamids im Gel variiert werden muss. Während kleine Proteine (beispielsweise Bax: 21 kD) besser mit einem engmaschigen Gel abgefangen werden, benötigen größere Proteine (beispielsweise Mdm-2: 90 kD) ein weitmaschigeres Gel. Daher verwendet man für Mdm-2 ein Gel mit 7 % Polyacrylamidanteil, für p53 ein Gel mit 10 % und für Bax und Bcl-2 ein Gel mit 15 % Polyacrylamid.

Die genauen Inhaltsstoffe und Anweisungen für die Herstellung der einzelnen Gele sind dem Kapitel 3.1.5 "Geräte, Materialien, Chemikalien, Antikörper und Lösungen" zu entnehmen.

Vor der weiteren Verwendung müssen die Gele mindestens 24 h feucht und kühl gelagert werden, um sicherzustellen, dass sie vollständig auspolymerisiert sind (WESTERMEIER 1997). Danach können die Gele mit dem Probenmaterial beschickt werden. Etwa 30 bis 50 µl der jeweiligen Probe, die immer exakt 20 µg Protein enthält, wird in jede Tasche pipettiert. Nun stellt man die Glasplatten in einen Behälter, der mit SDS-Laufpuffer gefüllt ist. Zur Auftrennung wird das System an eine Gleichstromquelle mit einer konstanten Spannung von 200 V angeschlossen. Um eine Überhitzung der Gele zu verhindern, müssen sie kontinuierlich gekühlt werden. Über einen Zeitraum bis zu 3,5 h, variierend je nach Proteingröße und Gel, erfolgt die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Masse.

Zusätzlich zu den Proteinproben von 8 Versuchstieren pipettiert man in 3 Taschen Standard-Proben und in eine Tasche den sogenannten Rainbow-Marker. Diese Standard-Proben werden zu Beginn der Analyse nach dem gleichen Verfahren wie die Probenaufbereitung (siehe

Kapitel 3.1.4.2.1) aus den Gehirnen von 5 Nativtieren hergestellt. Die Zerkleinerung der Standard-Proben erfolgt hier jedoch im Unterschied zu den Proteinproben mit Hilfe von Mörsern. Nach Herstellung wird der Standard aliquotiert und tiefgefroren. Für jede Western-Blot-Analyse kocht man jeweils einen dieser tiefgefrorenen Standards frisch auf. Bei dem Rainbow-Marker handelt es sich um ein käufliches Gemisch aus Proteinen verschiedener Molekülgröße, die jeweils unterschiedlich farblich markiert sind. So können die Proteinbanden in den Proben der Versuchstiere durch Vergleich mit den Proteinbanden des Rainbow-Markers zugeordnet werden.

Elektrotransfer

In diesem Schritt erfolgt der Transfer der durch die Elektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine **Polyvinylidendifluorid (PVDF)** - Membran. Bei dem hier verwendeten Verfahren handelt es sich um das "Semi-dry"-Verfahren. Über einen Zeitraum von 120 min werden die Proteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems bei einer Stromstärke von 200 mA transferiert.

Der "Semi-dry"-Blot wird folgendermaßen hergestellt:

Transfergerät Kathode (-)

6 Filterpapiere, getränkt in Kathodenpuffer

Polyacrylamidgel mit den Proteinproben (das Sammelgel wird vorher abgetrennt)

PVDF-Membran, getränkt in 100 % Ethanol

2 Filterpapiere, getränkt in Anodenpuffer II

4 Filterpapiere, getränkt in Anodenpuffer I

Transfergerät Anode (+)

Beim Aufbau des "Semi-dry"-Blots muss man unbedingt darauf achten, dass alle Filterpapiere und Membranen exakt aufeinanderliegen, so dass der Strom durch die gesamte Fläche des aufgebauten Blots fließt. Eventuell auftretende Luftblasen müssen, um einen erfolgreichen Transfer zu gewährleisten, vorher vorsichtig ausgestrichen werden.

Nach erfolgtem Elektrotransfer schließt sich ein 30-minütiger Waschvorgang in PBST an.

Immunoblot

Ähnlich wie bei der Immunfluoreszenz-Färbung werden auch beim Immunoblot zwei unterschiedliche Antikörper zur Detektion des gesuchten Proteins benötigt.

Zunächst muss man alle unspezifischen Bindungsstellen auf der PVDF-Membran blockieren. Als Blockierungsmedium dient bei den Membranen, auf denen Bax- und p53-Proteine nachgewiesen werden sollen, 10 % Milchpulversuspension und für die Membranen, auf denen Bcl-2- und Mdm-2-Proteine nachgewiesen werden sollen, 10 % FKS. Um eine vollständige Benetzung der Membranen mit dem Blockierungsmedium zu gewährleisten, legt man sie in exakt zugeschnittene Plastiktüten, gibt das Blockierungsmedium zu, verschweißt abschließend die Tüten und legt sie auf eine Schüttelmaschine. Die Inkubationszeit für die Blockierung beträgt 90 min.

Inkubation mit 1. Antikörper

Nach Ablauf der Blockierung werden die Membranen mit dem 1. Antikörper versetzt. Vor Zugabe des 1. Antikörpers zentrifugiert man diesen, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen (13.000 U/min, 3 min, 4 °C).

Die Antikörper-Mischungen werden folgendermaßen hergestellt:

- Bax: 50 µl Bax (P19) in 10 ml FKS in PBST (10 %)
- p53: 50 µl p53 in 10 ml FKS in PBST (10 %)
- Bcl-2: 50 µl Bcl-2 in 10 ml Milchpulver in PBST (10 %)
- Mdm-2: 50 µl Mdm-2 in 10 ml Milchpulver in PBST (10 %)

Die Membranen werden wiederum in Plastiktüten verbracht und die Antikörper-Mischung zugegeben. Dann streicht man alle Luftblasen sorgfältig aus, um so zu verhindern, dass an dieser Stelle keine Bindung mit dem Antikörper erfolgt. Für die nächsten zwei Stunden inkubiert man die Membranen auf dem Schüttler bei Zimmertemperatur. Um die nicht-gebundene Antikörper-Mischung vollständig zu entfernen, schließt sich ein 45-minütiger Waschvorgang in PBST an.

Inkubation mit 2. Antikörper

Nach dem Waschvorgang folgt die Inkubation mit dem 2. Antikörper. Dafür werden die Antikörper-Mischungen folgendermaßen hergestellt:

- Bax: 5 µl 2. Antikörper (rabbit) in 10 ml FKS in PBST (10 %)
- p53: 5 µl 2. Antikörper (mouse) in 10 ml FKS in PBST (10 %)
- Bcl-2: 5 µl 2. Antikörper (mouse) in 10 ml Milchpulver in PBST (10 %)
- Mdm-2: 5 µl 2. Antikörper (rabbit) in 10 ml Milchpulver in PBST (10 %)

Die Membranen werden wiederum einzeln luftfrei mit der Antikörper-Mischung eingeschweißt und für 90 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Als letzter Schritt findet wieder ein Waschvorgang in PBST statt (Dauer: 45 min), um die überschüssige Lösung zu entfernen.

3.1.4.2.3 Chemilumineszenz-abhängige Detektion

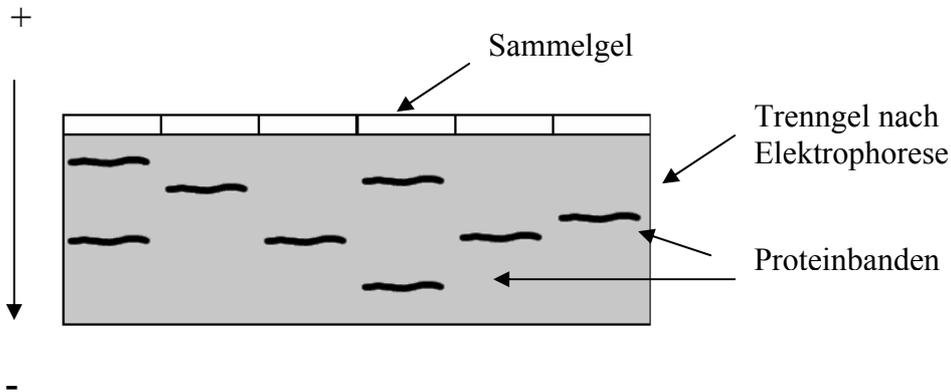
Um die auf der Membran befindlichen Proteine sichtbar zu machen, werden sie mit speziellen Reagenzien kurzfristig inkubiert. Diese Reagenzien aktivieren das an den 2. Antikörper gebundene Enzym; dieses katalysiert die Chemilumineszenz-Reaktion der beiden in den Chemilumineszenz-Reagenzien enthaltenen Substrate unter Lichtemission.

Zur Durchführung müssen die Membranen zunächst für 1 min mit den speziellen Detektionslösungen (NEN[®]) gleichmäßig geschwenkt werden. Durch das Vermischen der beiden Detektionslösungen kommt es zur Aktivierung der an den 2. Antikörper gekoppelten Peroxidase. Diese aktiviert ihrerseits einen Chemilumineszenzfarbstoff, wobei Licht der Wellenlänge 428 nm ausgesendet wird. Je mehr Proteine vorhanden sind, desto stärker fällt diese Reaktion aus. Zur anschließenden Auswertung legt man die PVDF-Membran blasenfrei mit der Proteinseite nach unten auf die Image-Station. Hier wird das emittierte Licht von einer Charged-Coupled Device (CCD)-Kamera aufgefangen und ein Bild der gesamten Membran erzeugt. Im Anschluss daran findet eine Auswertung dieses Abbildes mit der Software Kodak 1D Image Analysis statt.

Zur Kontrolle des Proteintransfers werden die Gele vor der Aufnahme und Archivierung mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt und anschließend mit Destain entfärbt. Da Coomassie Brilliant Blue unspezifisch an alle Proteine bindet, kann man so die Vollständigkeit des Elektrotransfers kontrollieren.

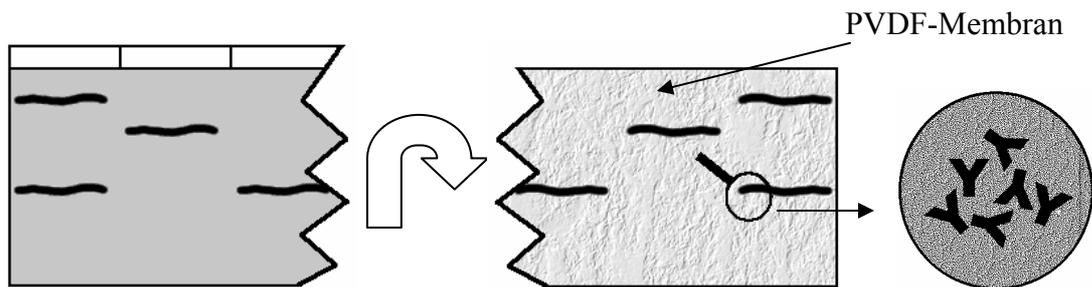
1. **Gelelektrophorese** (Dauer: bis zu 3,5 h)

Trennung der Proteine entsprechend ihrer Größe durch **Anlegen einer Gleichstromquelle**

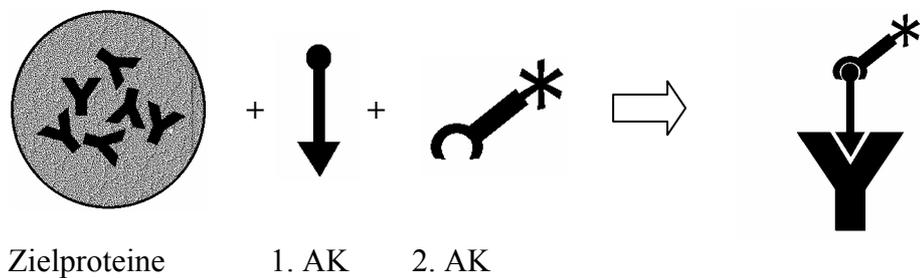


2. **Elektrotransfer** (Dauer: 120 min)

Transfer der Proben auf eine PVDF-Membran mit Hilfe von Strom



3. **Blockierung** (Dauer: 90 min) und **Inkubation mit 1. und 2. Antikörper**
(Dauer: 120 min bzw. 90 min)



4. Chemilumineszenz-abhängige **Detektion, Digitalisierung** und **Auswertung**

Abbildung 12 Schematische Darstellung der Hauptschritte der Western-Blot-Analyse

3.1.4.2.4 Digitale Auswertung

Mit der Software "Kodak 1 D Image Analysis" erfolgt die Auswertung. Zur Identifikation der jeweiligen Banden der untersuchten Apoptose-assoziierten Proteine vergleicht man sie mit den Banden des Rainbow-Markers. Mit einer Maske werden die entsprechenden Banden umrandet und die Intensität der Schwärzung bestimmt. Diesen Wert multipliziert man mit der ausgemessenen Fläche und erhält so indirekt den Wert der Intensität der Chemilumineszenz. Da auch hier - vergleichbar mit der Immunfluoreszenz - eine unspezifische Chemilumineszenz des Hintergrundes auftritt, wird diese gemessen und von derjenigen der markierten Proben subtrahiert. Zum Vergleich der Western-Blot-Analysen untereinander erfolgt zusätzlich die Auswertung der Standards. Durch Berechnung der prozentualen Abweichung von den Standards kann man so alle Ergebnisse der einzelnen Western-Blot-Analysen vergleichen. Grundsätzlich findet eine dreimalige Auswertung aller Western-Blot-Analysen (einschließlich Banden, Standards und Hintergrund) statt, um so Fehler bei der Umrandung der Banden zu vermeiden. Die daraus errechneten Mittelwerte gehen in die Statistik ein.

3.1.5 Geräte, Materialien, Chemikalien, Antikörper und Lösungen

Geräte

- **Elektrophorese** Power-supply, EPS-301, Fa. Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA
- **Elektrophoresekammer**, Fa. Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
- **Feuchte Kammer**, Eigenbau
- **Folienschweißgerät**, HM 3000 CD, Fa. Jencons Scientific, Bedfordshire, England
- **Image Station** mit zugehöriger Software Kodak 1D Image Analysis Software, Fa. Eastman Kodak Company, Rochester, USA
- **Konfokales Laserscan Mikroskop (CLSM 410)**, mit Stativ Axiovert 100M mit zugehöriger Software LSM 410, Version 2.85 Expert Mode, Fa. Carl Zeiss in Cooperation with Microsoft, Fa. Carl Zeiss, Jena und Zubehör Immunfluoreszenzfilter: FITC, Objektiv: Plan-Neo Fluor, 20x/0,5, Fa. Carl Zeiss, Jena
- **Kryotom** HM 500, Fa. Microm, Walldorf
- **Kühlzentrifuge**, Biofuge fresco, Fa. Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
- **Powermeter**, Model 35 PM Power Meter, Fa. Liconix, Mountain View, CA, USA
- **Schüttelinkubator**, Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf, Hamburg
- **Schüttler**, Rocky 3 D, Fa. Fröbel Labortechnik, Lindau
- **Kugelmühle**, MM 200, Fa. Retsch GmbH & Co. KG, Haan
- **Spektrometer**, DU[®] 640, Fa. Beckmann-Coulter, Oberschleißheim
- **Transfergeräte**, Fa. Roth, Karlsruhe

Materialien

- **Einmal-Küvetten** PS, Plastibrand[®], Fa. Brand, Wertheim
- **Eppendorf-Reaktionsgefäße**, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
- **Fettstift**, Liquid Blocker, Fa. Daido Sangyo Co., Tokyo, Japan
- **Filterpapier**, Whatman[®] Chromatographiepapier, Fa. Whatman, Meldstone, England
- **PVDF-Membran**, Millipore IPVH 000 10, Bedford, USA
- **Objektträger** SuperFrost[®] Plus, Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig
- **Plastikschalen**, Fa. Kriba, Neuss
- **Plastiktüten**, Plastibrand[®] Entsorgungsbeutel, Fa. Brand, Wertheim
- **TPP-Röhrchen** (15, 50 ml), Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz
- **Zirkonia beads** 2,5 mm, Biospec Products Inc., Fa. Roth, Heidelberg

Chemikalien

- **Ammonium Persulfat**, Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- **Bio-Rad Protein Assay**, Fa. Bio-Rad Laboratories, München
- **Bromphenolblau**, Fa. Serva, Heidelberg
- **BSA, Bovines Serum Albumin**, BSA FractionV, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- **Butylalkohol**, Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- **Capronsäure** (ϵ -Amion-n-Capronic Acid), Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- **Complete Mini**, TM EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Fa. Roche, Mannheim
- **Coomassie[®] Brilliant Blue**, R 250, Fa. Fluka, Neu-Ulm
- **DTT** (Dithiothreitol), Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- **Eisessig 100 %**, Fa. Merck, Darmstadt
- **Ethanol 100 % pro analysi**, Fa. Merck, Darmstadt
- **FKS**, Fa. Biochrom AG, Berlin
- **Glycerol anhydrous**, Fa. Fluka, Neu-Ulm
- **Milchpulver** (0,1 % Fett), Naturaflo, Fa. Töpfer, Dietmannsried
- **Mounting Medium**, Vectashield[®] H-1000, Fa. Vectorlabs, Burlingame, USA
- **PBS-Dulbecco** w/o Ca²⁺· Mg²⁺, Fa. Biochrom AG, Berlin
- **Rainbow[®]-Marker**, RPN 756 protein molecular weight marker, Fa. Amersham Life Science Inc., Piscataway, USA
- **Rotiporese Gel[®]**, Gel 40 Acrylamid/Bisacrylamid, Fa. Roth, Karlsruhe
- **SDS**, Fa. Bio-Rad Laboratories, München
- **TEMED**, Tetramethylenetylendiamid, Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- **Tissue Freezing Medium[®]**, Fa. Jung, Leica Instruments, Nussloch
- **Tris**, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3 propanediol, Fa. Roche, Mannheim
- **Triton[®] X-100**, Fa. Fluka, Steinheim
- **Tween[®] 20** (Polyoxyethylensorbitolmonolaurat), Fa. Fluka Chemica, Buchs, Schweiz
- **Western LighteningTM**, Chemiluminescence Reagent Plus, NEN, Enhanced Luminol Reagent and Oxidizing Reagent, Fa. Perkin Elmer Life Science, Boston, USA

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 (Δ C21) cat # sc-783, rabbit polyclonal IgG, 200 µl/ml

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

Sämtliche Antikörper von Fa. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

2. Antikörper

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

Western-Blot-Analyse

1. Antikörper

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

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

p53 (DO-1) cat # sc-126, mouse monoclonal IgG, 200 µl/ml

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

Sämtliche Antikörper von Fa. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

2. Antikörper

Anti-mouse IgG, horseradish peroxidase, linked whole antibody (from sheep), 1 ml, NA 931

Anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase, linked whole antibody (from donkey) 1 ml, NA 934

Sämtliche Antikörper von Fa. Amersham Life Science, Piscataway, USA

Lösungen

<p>Anodenpuffer I 300 mM Tris 20 % Ethanol pro analysi</p>	<p>für Western-Blot-Analyse Elektrotransfer</p>
<p>Anodenpuffer II 25 mM Tris 20 % Ethanol pro analysi</p>	<p>für Western-Blot-Analyse Elektrotransfer</p>
<p>Coomassie-Färbelösung 0,8 g Coomassie Brilliant Blue R 250 200 ml Ethanol pro analysi 40 ml Eisessig ad 500 ml mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) auffüllen</p>	<p>für Western-Blot-Analyse zur Färbung der Polyacrylamidgele</p>
<p>Destain 25 % Methanol 10 % Eisessig 56 % ddH₂O</p>	<p>für Western-Blot-Analyse zur Entfärbung der mit Coomassie-Blue gefärbten Membranen</p>
<p>Kathodenpuffer 40 mM Capronsäure 20 % Ethanol pro analysi</p>	<p>für die Western-Blot-Analyse Elektrotransfer</p>
<p>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 Complete[®]</p>	<p>für die Western-Blot-Analyse Probenaufbereitung</p>

EIGENE UNTERSUCHUNGEN – MATERIAL UND METHODEN

<p>PBS (20 fach) 320 g NaCl 57,6 g NaHPO₄ 9,6 g KH₂PO₄ 8 g KCl auf pH 7,4 einstellen</p>	<p>als Ausgangslösung zum Anmischen von PBST</p>
<p>PBST (einfach) 500 ml PBS (20 fach) 1000 µl Tween 20 ad 2000 ml mit ddH₂O</p>	<p>für Immunfluoreszenz-Färbung und Western-Blot-Analyse Waschvorgänge</p>
<p>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 °C lagern</p>	<p>für Western-Blot-Analyse Elektrophorese und Probenaufbereitung</p>
<p>Sammelgel 5 % 10 ml Rotiphorese Gel 20 ml Sammelgelpuffer 50 ml ddH₂O 640 µl Ammonium-Persulfat 60 µl ml TEMED</p>	<p>für Western-Blot-Analyse Herstellung der Gele</p>
<p>Sammelgelpuffer (4 fach) 0,5 M Tris-HCL pH 6,8 0,4 % SDS 0,1 % NaN₃</p>	<p>für Western-Blot-Analyse Elektrophorese</p>

EIGENE UNTERSUCHUNGEN – MATERIAL UND METHODEN

Trenngel 7 % (Mdm-2) 7 ml Rotiphorese Gel [®] 10 ml Trenngelpuffer 23 ml ddH ₂ O 240 µl Ammonium-Persulfat 30 µl TEMED	für Western-Blot-Analyse Herstellung der Gele
Trenngel 10 % (p53) 10 ml Rotiphorese Gel [®] 10 ml Trenngelpuffer 20 ml ddH ₂ O 240 µl Ammonium-Persulfat 30 µl TEMED	für Western-Blot-Analyse Herstellung der Gele
Trenngel 15 % (Bax und Bcl-2) 15 ml Rotiphorese Gel [®] 10 ml Trenngelpuffer 15 ml ddH ₂ O 240 µl Ammonium-Persulfat 30 µl TEMED	für Western-Blot-Analyse Herstellung der Gele
Trenngelpuffer (4 fach) 1,5 M Tris-HCL pH 8,8 0,4 % SDS 0,01 % NaN ₃	für Western-Blot-Analyse Elektrophorese

Statistische Bewertung

Die statistische, faktorielle Bewertung erfolgt durch eine 2-Wege ANOVA im linearen Modell und posthoc t-Test mit Bonferroni-Anpassung. Bei Nichtzutreffen der Hypothese wird die Greenhouse-Geisser-Korrektur angewendet.

Die intraoperativ gemessenen physiologischen Parameter, die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Intensitäten und die Schwärzungsintensitäten der Western-Blot-Analyse werden in die statistische Berechnung einbezogen.

In der statistischen Bewertung der physiologischen Parameter werden insgesamt Werte von 3 Messzeitpunkten analysiert und mit dem Ausgangswert verglichen. Des Weiteren findet eine statistische Bewertung nach folgenden Kriterien statt:

- Vergleich der physiologischen Parameter innerhalb der verschiedenen Untersuchungszeitpunkte (Ausgangswert, 45 Isch [Isch=Ischämie], 15 Rep [Rep=Reperfusion, Messung nach 15 min in der Reperfusion-Phase] und 45 Rec [Rec=englisch: recovery, Messung nach 45 min in der Erholungs-Phase])
- Vergleich zwischen den unterschiedlichen Überlebenszeiten (1, 3, 7 oder 28 Tage)
- Vergleich nach der intraoperativen Vorgehensweise (Normo- oder Hypothermie-Gruppe)
- Vergleich der jeweiligen gesamten Menge der untersuchten Apoptose-assoziierten Proteine zwischen ischämischer und nicht-ischämischer Hemisphäre

Für die Analyse der Immunfluoreszenz-Färbung und des Western-Blots wird das sog. "full factorial repeated measures model" auf den Zwischen-Gruppen-Faktor Hemisphäre und den Zwischen-Gruppen-Faktor Gruppe und Tage getrennt angewendet.

Die gesamte statistische Analyse erfolgt mit dem Statistikprogramm SPSS 11.5. Alle Tests erfolgen zweiseitig mit einem Signifikanzniveau von 5 %. P-Werte unter 0,001 werden als $p < 0,001$ bezeichnet. Aus den Einzelwerten der einzelnen Gruppen wird das arithmetische Mittel (MW) mit der dazugehörigen Standardabweichung (\pm SD) errechnet.

Ergebnisse

In dem vorliegenden Versuch werden 72 Tiere eingesetzt. Grundsätzlich ergibt sich eine Unterteilung in die 3 Hauptgruppen: Normothermie, Hypothermie und Nativtiere. Eine weitere Unterteilung erfolgt, da den Tieren der Normothermie- und Hypothermie-Gruppe randomisiert eine Überlebenszeit von 1, 3, 7 oder 28 Tagen zugewiesen wird (vgl. Tabelle 1).

3.1.6 Erhobene Parameter während des operativen Abschnitts

An dieser Stelle erfolgt eine Darstellung sämtlicher Daten, die während der operativen Phase erhoben werden.

Körpergewicht (g)

Das Körpergewicht des gesamten Kollektivs von 72 Tieren, das am Tag des operativen Eingriffs bestimmt wird, beträgt 406 ± 65 g.

Messung der physiologischen Parameter während des operativen Abschnitts

Die Daten der Tiere der Normothermie- und Hypothermie-Gruppe werden zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten, den unterschiedlichen Überlebensraten und der Behandlungsart untereinander verglichen. Aus diesen Daten errechnet man den Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (\pm SD). Diese Werte sind der folgenden Seite (siehe Tabelle 3) zu entnehmen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN – ERGEBNISSE

Tabelle 3 Physiologische Parameter während des operativen Abschnitts der Normothermie- und Hypothermie-Gruppe

Parameter	Gruppe	Ausgangswert	45 Isch	15 Rep	45 Rec
Tpkran [°C]	Normothermie	37,5 ± 0	37,5 ± 0	37,8 ± 0,3	37,6 ± 0,1
	Hypothermie	37,5 ± 0,2	37,5 ± 0,2	35,9 ± 0,6 c	34,0 ± 0,1 c
HF [Schläge/min]	Normothermie	406 ± 37	447 ± 32	386 ± 40	414 ± 40
	Hypothermie	393 ± 33	445 ± 43	376 ± 49	387 ± 37
MAP [mmHg]	Normothermie	130 ± 12	40 ± 1 *c	126 ± 10	119 ± 12
	Hypothermie	127 ± 9	40 ± 0 *c	129 ± 11	121 ± 9
paCO₂ [mmHg]	Normothermie	37,4 ± 3,6	40,1 ± 5,1	39,7 ± 3,8	40,2 ± 8,7
	Hypothermie	37,1 ± 3,1	39,3 ± 5,6	42,5 ± 4,4 #	45,2 ± 4,9 §
paO₂ [mmHg]	Normothermie	139 ± 19	143 ± 20	142 ± 21	125 ± 30
	Hypothermie	146 ± 18	144 ± 18	148 ± 28	133 ± 24
pH	Normothermie	7,42 ± 0,03	7,39 ± 0,06	7,40 ± 0,05	7,43 ± 0,05
	Hypothermie	7,42 ± 0,04	7,39 ± 0,06	7,38 ± 0,04	7,38 ± 0,03
Hb [g/dl]	Normothermie	13,3 ± 1,1	9,5 ± 0,9 *	12,8 ± 1,0	12,7 ± 1,0
	Hypothermie	12,9 ± 0,8	9,2 ± 0,7 *	12,7 ± 0,7	12,3 ± 1,0
Glc [mg/dl]	Normothermie	64 ± 9	55 ± 9	67 ± 9	85 ± 19
	Hypothermie	65 ± 10	55 ± 13	68 ± 12	89 ± 15

Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (\pm SD) der perikraniellen Temperatur (Tpkran), der Herzfrequenz (HF), des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP), des arteriellen Kohlendioxidpartialdrucks (paCO₂), des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (paO₂), des pH-Wertes (pH), des Hämoglobins (Hb) und der Glucose (Glc) an den vier definierten intraoperativen Messzeitpunkten (Ausgangswert, 45 Isch, 15 Rep und 45 Rec) der Normothermie- und Hypothermie-Gruppe.

Signifikanzen: *= $p < 0,001$ Ischämie vs. Ausgangswert; #= $p < 0,001$ Reperfusion vs. Ausgangswert; §= $p < 0,001$ Erholung vs. Ausgangswert; c=kontrollierter Parameter

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

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

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

Temperatur (°C)

Über den gesamten Versuchsablauf wird die perikranielle Temperatur konstant gehalten. Versuchsbedingt kommt es bei den Tieren der Hypothermie-Gruppe in der Phase der Reperfusion zu einer Absenkung (auf 34° C) durch Kühlung.

Eine Dokumentation der rektalen Temperatur findet während des gesamten Versuchsablaufs statt.

Herzfrequenz (Schläge/min)

Es finden sich keinerlei signifikanten Unterschiede. Die Herzfrequenz zeigt jedoch in den beiden Versuchsgruppen eine tendenzielle Erhöhung in der ischämischen Phase und eine tendenzielle Erniedrigung in der Phase der Reperfusion im Vergleich zum Ausgangswert.

Mittlerer arterieller Druck (mmHg)

Die MAP-Werte zeigen in der ischämischen Phase der Normothermie- und Hypothermie-Gruppe, versuchsbedingt und kontrolliert, eine signifikante Erniedrigung gegenüber dem Ausgangswert. Ansonsten sind keine signifikanten Veränderungen festzustellen.

Blutgase

Zu keinem der drei festgelegten Untersuchungszeitpunkte treten signifikante Unterschiede des paO_2 beider Versuchsgruppen im Vergleich zum Ausgangswert oder im Vergleich untereinander auf. Bezüglich des paCO_2 zeigen sich in der Normothermie-Gruppe signifikante Erhöhungen sowohl in der Phase der Reperfusion, als auch der Erholung im Vergleich zum Ausgangswert.

Der pH-Wert wird zu den festgelegten Untersuchungszeiträumen (Ausgangswert, 45 Isch, 15 Rep und 45 Rec) überwacht und eventuelle Abweichungen in den sauren Bereich durch intravenöse Applikation von Puffersubstanzen korrigiert. Dadurch wird der pH-Wert innerhalb eines relativ engen Bereiches streng reguliert, so dass keine Abweichungen der Mittelwerte auftauchen.

Hämoglobin (g/dl)

Der Mittelwert des Hämoglobins sinkt in beiden Versuchsgruppen signifikant in der Ischämie-Phase ab. Dieser Abfall tritt erwartungsgemäß durch den manuellen Blutentzug auf und erholt sich in der anschließenden Phase der Reperfusion und Erholung in beiden Versuchsgruppen.

Glucose (Glc)

Die Werte der Blutglucose zeigen in der Phase der Ischämie der Normothermie- und Hypothermie-Gruppe eine tendenzielle Erniedrigung. In der Phase der Reperfusion gleichen sie sich wieder dem Ausgangswert an und steigen anschließend in der Erholungs-Phase tendenziell. Es zeigen sich jedoch keine signifikanten Veränderungen.

Ermittlung der Hirndurchblutung durch Laser-Doppler-Flussmessung (PU)

Mit Hilfe eines Laser-Dopplers wird kontinuierlich die Hirndurchblutung beider Hemisphären ermittelt und zu den festgelegten Zeitpunkten (Ausgangswert, 45 Isch, 15 Rep und 45 Rec) dokumentiert. Die absoluten Werte werden in sogenannten Perfusionseinheiten (PU) aufgezeichnet (siehe Tabelle 4) und mit dem Ausgangswert verglichen.

Da hier insbesondere die prozentuale Abweichung zu den Messzeitpunkten berechnet werden soll, wird der Ausgangswert mit 100 % gleichgesetzt.

Zur Verdeutlichung der Zu- bzw. Abnahme der Hirndurchblutung, wird diese in einer zusätzlichen Grafik veranschaulicht (siehe Abb. 12).

Tabelle 4 Ergebnisse der mit LDF-Messung ermittelten Hirndurchblutung

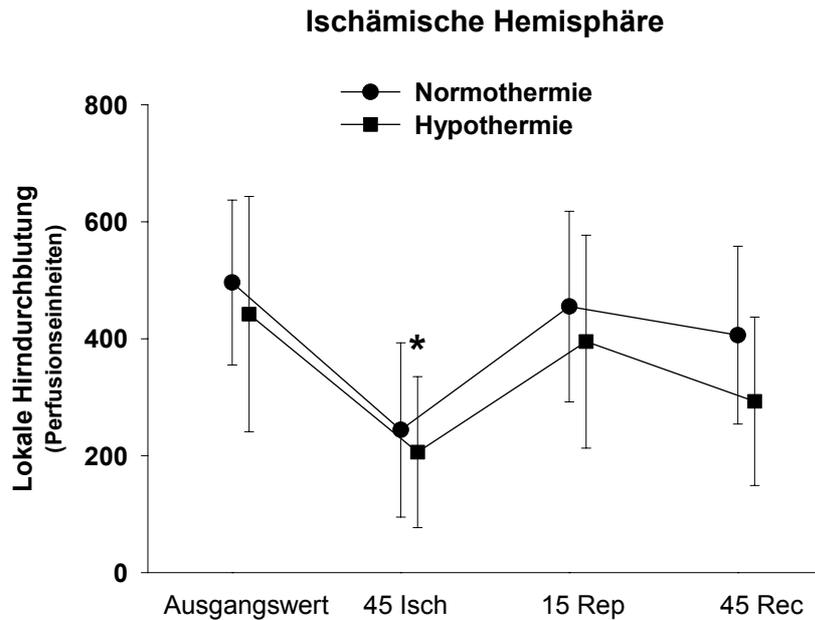
Parameter	Gruppe	Ausgangs- wert	45 Isch	15 Rep	45 Rec
Gehirndurchblutung rechts	Normothermie	496 ± 141	244 ± 149	455 ± 163	406 ± 152
	Hypothermie	442 ± 201	206 ± 129	395 ± 182	293 ± 144
Gehirndurchblutung links	Normothermie	492 ± 168	344 ± 111 *	449 ± 154	492 ± 189
	Hypothermie	454 ± 176	347 ± 191 *	494 ± 231	436 ± 211

Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (±SD) der mit der Laser-Doppler-Flussmessung (LDF) ermittelten Hirndurchblutung in Perfusionseinheiten (PU) der ischämischen (rechten) und der nicht-ischämischen (linken) Hemisphäre der beiden Versuchsgruppen.

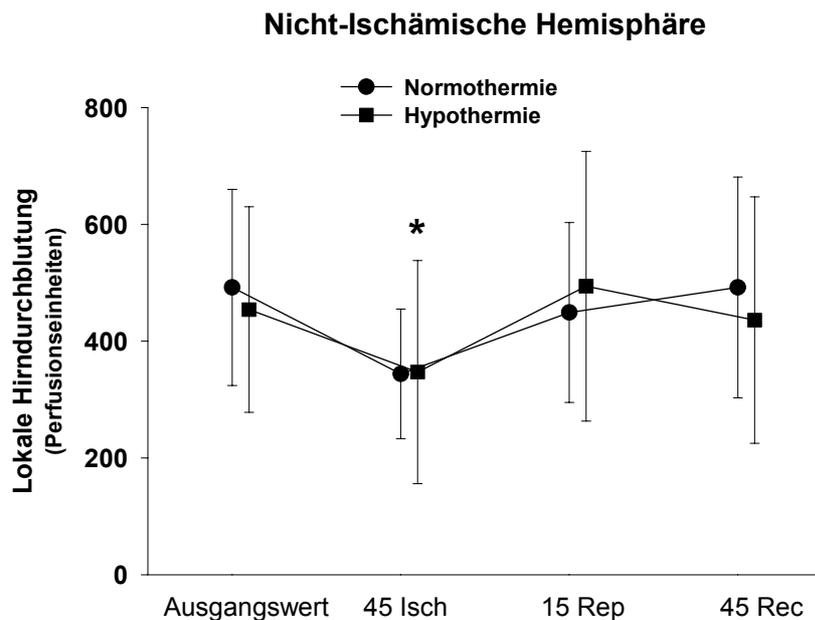
*Signifikanzen: ohne Sonderzeichen=nicht signifikant; *=p<0,001 im Vgl. zum Ausgangswert
45 Isch=Messung nach 45 min in der Ischämie-Phase, 15 Rep=Messung nach 15 min in der Reperfusion-Phase, 45 Rec=Messung nach 45 min in der Erholungs-Phase*

Die Hirndurchblutung sinkt versuchsbedingt in beiden Hemisphären während der Phase der Ischämie signifikant ab (vgl. Abbildung 13) und nähert sich zu den übrigen Untersuchungszeitpunkten (15 Rep und 45 Rec) wieder dem physiologischen Ausgangswert an.

Vergleicht man die Hirndurchblutung beider Hemisphären, erkennt man, dass die ischämische Hemisphäre auf 50 %, die nicht-ischämische Hemisphäre auf 70 % des Ausgangswertes absinkt und nach der Reperfusion bzw. in der Erholungsphase wieder Ausgangswerte aufweist.



A



B

Abbildung 13 Vergleichende grafische Darstellung der Hirndurchblutung

Darstellung der Hirndurchblutung in Perfusionseinheiten der Normothermie- und Hypothermie-Gruppe der ischämischen (rechten) (A) und nicht-ischämischen (linken) (B) Hemisphäre zu den vier Untersuchungszeitpunkten.

*Signifikanzen: ohne Sonderzeichen=nicht signifikant; *= $p < 0,001$ im Vgl. zum Ausgangswert 45 Isch=Messung nach 45 min in der Ischämie-Phase, 15 Rep=Messung nach 15 min in der Reperfusion-Phase, 45 Rec=Messung nach 45 min in der Erholungs-Phase*

3.1.7 Immunfluoreszenz-Färbung

In der vorliegenden Arbeit findet die Detektion der gesuchten Apoptose-assoziierten Proteine durch eine Immunfluoreszenz-Färbung statt.

Als Vertreter der pro-apoptotischen Proteine, die letztlich den Zelltod induzieren, werden das Bax- und p53-Protein untersucht. Als anti-apoptotische Proteine, die Indikatoren für das Überleben der Zelle darstellen, dient die Untersuchung der Konzentrationen des Bcl-2- und Mdm-2-Proteins. Durch spezifische Antikörper markiert man die gesuchten Proteine für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung am CLSM und ermittelt anschließend ihre räumliche Verteilung und Quantität. Hierzu werden Zellverbände an definierten Stellen (CA1- und CA3-Region des Hippocampus und unterer Ast des Gyrus dentatus) gescannt, gespeichert und analysiert (siehe Kapitel 3.1.4.1). Auf den folgenden Seiten werden die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung der vier Apoptose-assoziierten Proteine abgehandelt.

Immunfluoreszenz-Färbung: Nachweis des Bax-Proteins

In den zwei Versuchsgruppen (Normothermie und Hypothermie) treten über den zeitlichen Verlauf (1, 3, 7 und 28 Tage) keine signifikanten Veränderungen der Menge des pro-apoptotischen Bax-Proteins bezüglich der einzelnen Regionen (CA1, CA3 und GD rechts und links) auf (siehe Tabelle 5).

Beurteilt man die Expression des Bax-Proteins insgesamt, also ohne Unterscheidung innerhalb der einzelnen Regionen (siehe Abbildung 14) an den einzelnen Untersuchungstagen, ergeben sich folgende Zusammenhänge: Sowohl auf der ischämischen als auch auf der nicht-ischämischen Hemisphäre ist die Menge des Bax-Proteins der Hypothermie-Gruppe zu den Untersuchungszeitpunkten 1, 3 und 7 Tage signifikant erniedrigt im Vergleich zur Normothermie-Gruppe (siehe Abbildung 14).

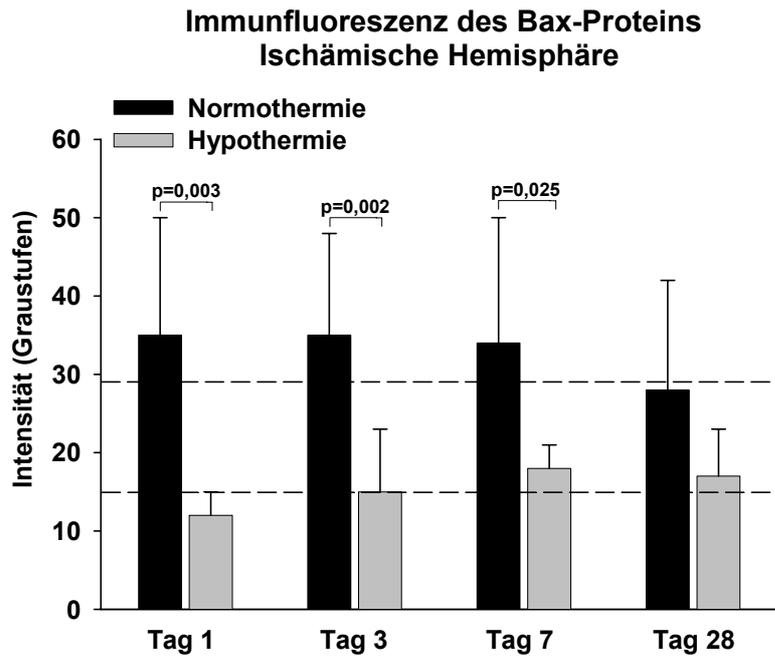
Im Vergleich beider Hemisphären einer Gruppe, weist die ischämische Hemisphäre jeweils eine signifikant höhere Bax-Protein-Konzentration auf ($p < 0,001$) als die nicht-ischämische Hemisphäre.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN – ERGEBNISSE

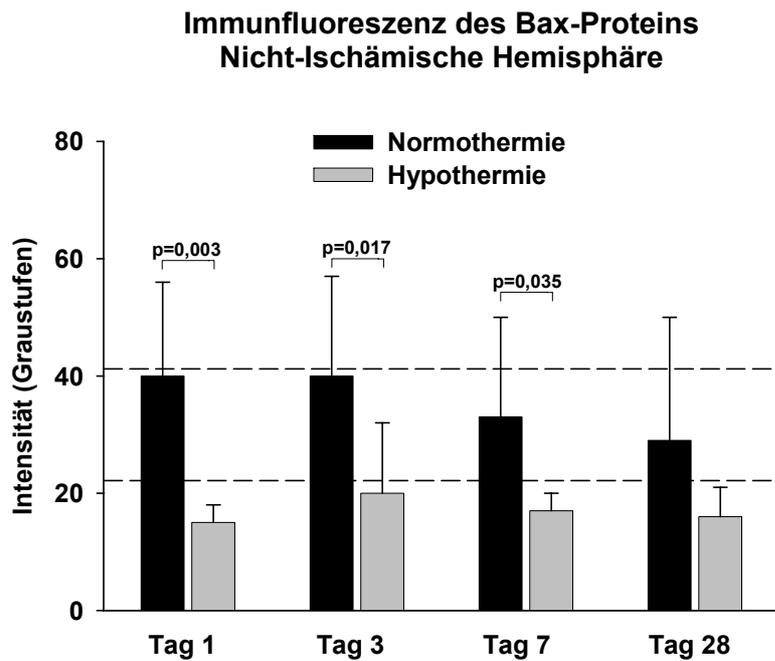
Tabelle 5 Darstellung der Immunfluoreszenz-Intensität des Bax-Proteins

Bax	Tag	rechte Hemisphäre			linke Hemisphäre					
		CA1	CA3	GD	CA1		CA3		GD	
Normo- thermie n=32	1	33 ± 17	35 ± 13	36 ± 15	39 ± 16	39 ± 15	41 ± 18	16 ± 15	40 ± 18	40 ± 16
	3	34 ± 15	36 ± 15	34 ± 11	38 ± 17	40 ± 18	40 ± 16	17 ± 18	40 ± 16	40 ± 16
	7	35 ± 16	34 ± 15	33 ± 18	34 ± 17	31 ± 16	33 ± 19	17 ± 16	33 ± 19	33 ± 19
	28	30 ± 15	28 ± 15	27 ± 13	30 ± 20	29 ± 22	27 ± 22	20 ± 22	29 ± 22	27 ± 22
Hypo- thermie n=32	1	11 ± 3	13 ± 3	13 ± 3	15 ± 4	16 ± 3	15 ± 2	4 ± 16	3 ± 15	2 ± 2
	3	13 ± 7	15 ± 7	16 ± 9	18 ± 12	21 ± 12	20 ± 12	12 ± 21	12 ± 20	12 ± 12
	7	18 ± 4	18 ± 3	18 ± 3	16 ± 3	18 ± 3	18 ± 4	3 ± 18	3 ± 18	4 ± 4
	28	18 ± 6	16 ± 6	16 ± 7	15 ± 6	16 ± 5	16 ± 6	6 ± 16	5 ± 16	6 ± 6
Nativ- tiere n=8		23 ± 9	21 ± 8	22 ± 8	22 ± 8	22 ± 7	21 ± 6	8 ± 22	7 ± 21	6 ± 6

Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (\pm SD) der Immunfluoreszenz-Intensität (Graustufen) des Bax-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus und des unteren Asts des Gyrus dentatus (GD) beider Hemisphären der zwei Versuchsgruppen zu den vier Untersuchungszeitpunkten und des physiologischen Vergleichswertes (Nativtiere).



A



B

Abbildung 14 Grafische Darstellung der Immunfluoreszenz des Bax-Proteins

Vergleichende grafische Darstellung der Mittelwerte(MW) und der Standardabweichungen (\pm SD) der Immunfluoreszenz-Intensität (Graustufen) des Bax-Proteins am Tag 1, 3, 7 und 28 der ischämischen (rechten) (A) und nicht-ischämischen (linken)(B) Gehirnhälfte der Normothermie- und Hypothermie-Gruppe, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativtiere).

Signifikanzen: nicht signifikant=keine Kennzeichnung; signifikant=Kennzeichnung und Angabe des p-Wertes

Immunfluoreszenz-Färbung: Nachweis des p53-Proteins

Im Bezug auf den zeitlichen Verlauf (1, 3, 7 oder 28 Tage) können innerhalb der zwei Versuchsgruppen keine signifikanten Mengenunterschiede des pro-apoptotischen p53-Proteins festgestellt werden (siehe Abbildung 15). Auch zeigt sich kein signifikanter Effekt bezüglich der unterschiedlichen untersuchten Regionen (CA1, CA3 und GD) zwischen der ischämischen und nicht-ischämischen Gehirnhälfte (siehe Tabelle 6).

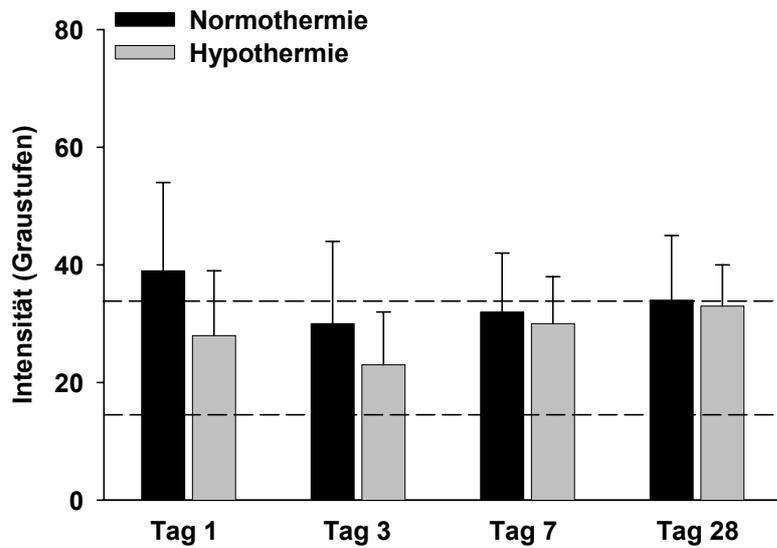
Betrachtet man die jeweilige Menge des p53-Proteins der einzelnen Hemisphären und setzt sie zueinander in Relation, weist die rechte Hemisphäre eine signifikant erhöhte Konzentration des p53-Proteins auf ($p < 0,001$).

Tabelle 6 Darstellung der Immunfluoreszenz-Intensität des p53-Proteins

p53	Tag	rechte Hemisphäre			linke Hemisphäre		
		CA1	CA3	GD	CA1	CA3	GD
Normo- thermie n=32	1	38 ± 14	43 ± 16	35 ± 18	46 ± 16	47 ± 20	35 ± 14
	3	30 ± 14	33 ± 16	26 ± 13	38 ± 16	38 ± 17	28 ± 14
	7	33 ± 11	35 ± 12	30 ± 9	40 ± 10	41 ± 11	26 ± 6
	28	36 ± 15	34 ± 11	32 ± 9	51 ± 25	48 ± 19	38 ± 21
Hypo- thermie n=32	1	28 ± 15	33 ± 17	22 ± 7	38 ± 19	33 ± 13	27 ± 12
	3	23 ± 10	27 ± 11	20 ± 8	27 ± 11	29 ± 11	21 ± 8
	7	32 ± 9	33 ± 10	26 ± 8	38 ± 10	36 ± 9	24 ± 5
	28	33 ± 7	36 ± 9	30 ± 12	40 ± 15	37 ± 11	28 ± 9
Nativ- tiere n=8		27 ± 10	26 ± 11	19 ± 8	17 ± 10	26 ± 10	20 ± 8

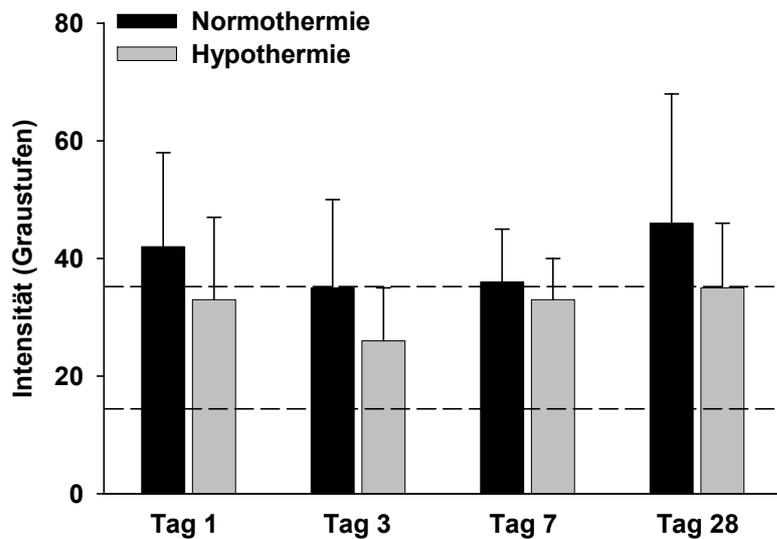
Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen ($\pm SD$) der Immunfluoreszenz-Intensität (Graustufen) des p53-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus und des unteren Asts des Gyrus dentatus (GD) beider Hemisphären der zwei Versuchsgruppen zu den vier Untersuchungszeitpunkten und des physiologischen Vergleichswertes (Nativtiere).

**Immunfluoreszenz des p53-Proteins
Ischämische Hemisphäre**



A

**Immunfluoreszenz des p53-Proteins
Nicht-Ischämische Hemisphäre**



B

Abbildung 15 Grafische Darstellung der Immunfluoreszenz des p53-Proteins

Vergleichende grafische Darstellung der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichungen ($\pm SD$) der Immunfluoreszenz-Intensität (Graustufen) des p53-Proteins am Tag 1, 3, 7 und 28 der ischämischen (rechten) (A) und nicht-ischämischen (linken) (B) Gehirnhälfte der Normothermie- und Hypothermie-Gruppe, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativtiere).

Signifikanzen: nicht signifikant=keine Kennzeichnung

Immunfluoreszenz-Färbung: Nachweis des Bcl-2-Proteins

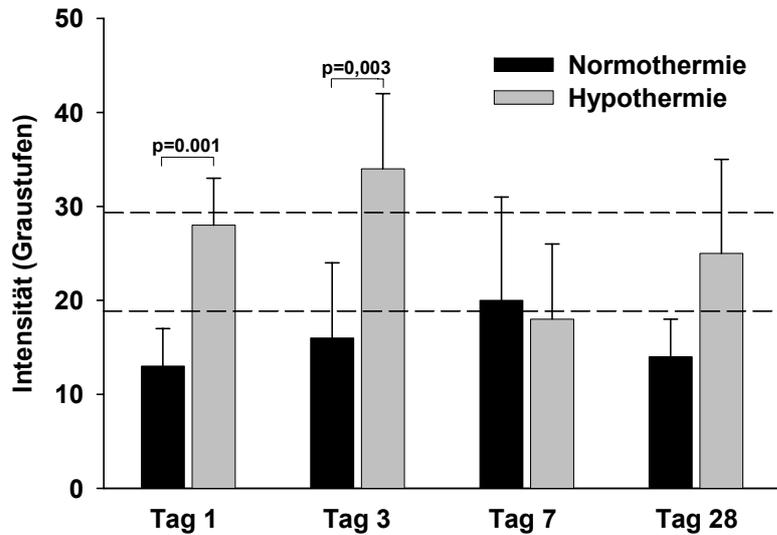
Sowohl im Gesamtzeitverlauf (1, 3, 7 und 28 Tage), als auch im Vergleich der einzelnen untersuchten Regionen (CA1, CA3 und GD rechts und links) werden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Menge des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins in beiden Versuchsgruppen festgestellt (siehe Tabelle 7). Die ischämische Hemisphäre der Hypothermie-Gruppe weist am Tag 1 und 3 signifikant erhöhte Mengen des Bcl-2-Proteins auf. Am Tag 7 und 28 zeigen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Ebenso verhält es sich in der nicht-ischämischen Hemisphäre: Am Tag 1 und 3 zeigen sich signifikant und am Tag 28 tendenziell erhöhte Werte des untersuchten Apoptose-assoziierten Bcl-2-Proteins in der Hypothermie-Gruppe im Vergleich zu den normothermen Tieren (siehe Abbildung 16). Bei Vergleich der beiden Hemisphären ergeben sich tendenziell höhere Bcl-2-Protein-Mengen in der ischämischen Hemisphäre ($p=0,020$).

Tabelle 7 Darstellung der Immunfluoreszenz-Intensität des Bcl-2-Proteins

Bcl-2	Tag	rechte Hemisphäre			linke Hemisphäre		
		CA1	CA3	GD	CA1	CA3	GD
Normo- thermie n=32	1	13 ± 3	14 ± 6	11 ± 4	13 ± 5	13 ± 6	11 ± 5
	3	16 ± 7	17 ± 8	15 ± 9	17 ± 12	17 ± 11	13 ± 8
	7	21 ± 10	21 ± 12	17 ± 11	19 ± 13	19 ± 13	17 ± 10
	28	15 ± 5	16 ± 5	12 ± 5	12 ± 4	12 ± 3	9 ± 3
Hypo- thermie n=32	1	27 ± 4	31 ± 6	27 ± 5	28 ± 4	31 ± 5	25 ± 4
	3	35 ± 9	36 ± 9	30 ± 8	30 ± 10	35 ± 12	26 ± 8
	7	20 ± 10	19 ± 9	16 ± 5	19 ± 9	19 ± 11	16 ± 7
	28	29 ± 11	26 ± 10	19 ± 10	24 ± 14	24 ± 14	19 ± 9
Nativ- tiere n=8		24 ± 6	25 ± 5	21 ± 4	25 ± 6	26 ± 5	22 ± 6

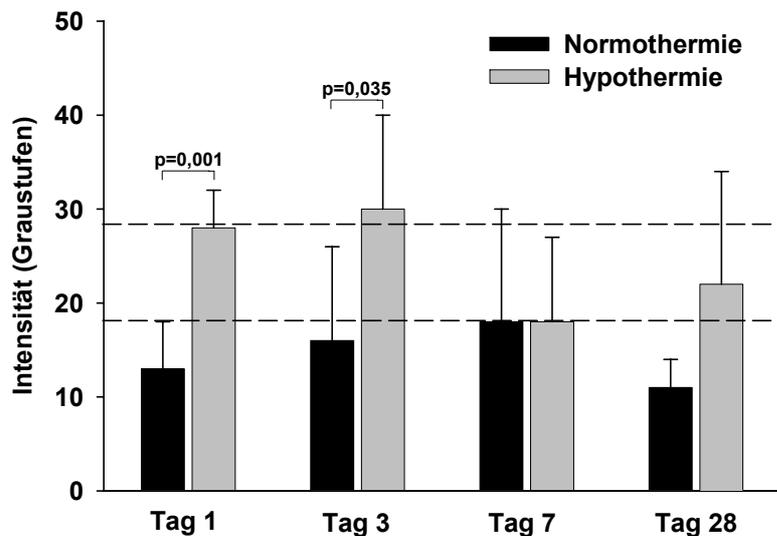
Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (\pm SD) der Immunfluoreszenz-Intensität (Graustufen) des Bax-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus und des unteren Asts des Gyrus dentatus (GD) beider Hemisphären der zwei Versuchsgruppen zu den vier Untersuchungszeitpunkten und des physiologischen Vergleichswertes (Nativtiere).

**Immunfluoreszenz des Bcl-2-Proteins
Ischämische Hemisphäre**



A

**Immunfluoreszenz des Bcl-2-Proteins
Nicht-Ischämische Hemisphäre**



B

Abbildung 16 Grafische Darstellung der Immunfluoreszenz des Bcl-2-Proteins

Vergleichende grafische Darstellung der Mittelwerte(MW) und der Standardabweichungen (\pm SD) der Immunfluoreszenz-Intensität (Graustufen) des Bcl-2-Proteins am Tag 1, 3, 7 und 28 der ischämischen (rechten) (A) und nicht-ischämischen (linken)(B) Gehirnhälfte der Normo-thermie- und Hypothermie-Gruppe, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativtiere).

Signifikanzen: nicht signifikant=keine Kennzeichnung; signifikant=Kennzeichnung und Angabe des p-Wertes

Immunfluoreszenz-Färbung: Nachweis des Mdm-2-Proteins

Über den Gesamtverlauf gesehen (1, 3, 7 und 28 Tage) zeigen sich innerhalb der zwei Versuchsgruppen keine signifikanten Veränderungen der Mengenverteilung des anti-apoptotischen Mdm-2-Proteins. Auch bezüglich der einzelnen untersuchten Regionen (CA1, CA3 und GD rechts und links) ergeben sich keine Unterschiede (siehe Tabelle 8).

Bei Vergleich der ischämischen Hemisphäre der Normothermie- und Hypothermie-Gruppe treten nur am Tag 1 signifikant erhöhte Werte des Mdm-2-Proteins der Hypothermie-Gruppe im Vergleich zur Normothermie-Gruppe auf. Ein identisches Bild zeigt die Konzentration des untersuchten Proteins in der nicht-ischämischen Gehirnhälfte (siehe Abbildung 17). Am Tag 3, 7 und 28 zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen in beiden Hemisphären.

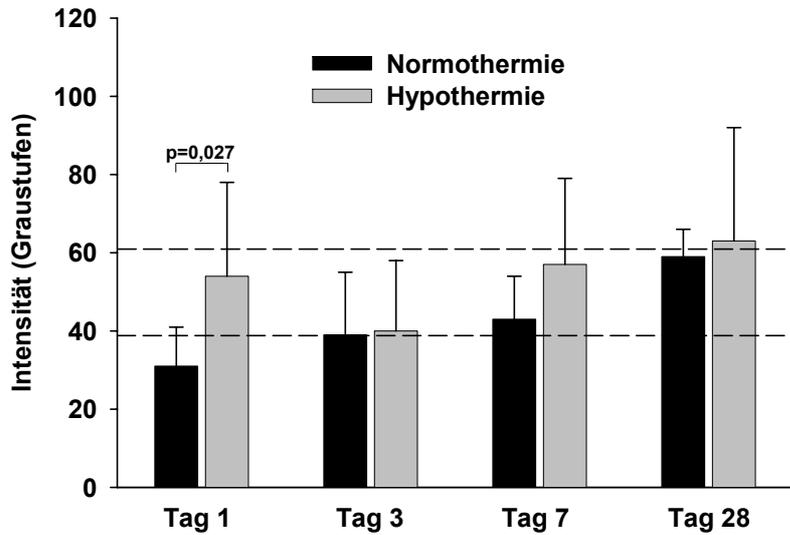
Im direkten Vergleich der Gesamtmenge des Mdm-2-Proteins der einzelnen Hemisphären ergibt sich auf der ischämischen Hemisphäre eine signifikant erhöhte Menge des Mdm-2-Protein-Spiegels im Vergleich zur nicht-ischämischen Hemisphäre ($p < 0,001$).

Tabelle 8 Darstellung der Immunfluoreszenz-Intensität des Mdm-2-Proteins

Mdm-2	Tag	rechte Hemisphäre			linke Hemisphäre		
		CA1	CA3	GD	CA1	CA3	GD
Normo- thermie n=32	1	30 ± 12	32 ± 11	32 ± 10	33 ± 10	34 ± 10	40 ± 17
	3	35 ± 18	40 ± 19	43 ± 15	47 ± 16	49 ± 16	49 ± 15
	7	44 ± 16	41 ± 10	46 ± 14	48 ± 15	52 ± 13	42 ± 9
	28	62 ± 10	63 ± 13	52 ± 5	51 ± 18	56 ± 16	50 ± 15
Hypo- thermie n=32	1	47 ± 18	49 ± 21	66 ± 35	57 ± 29	59 ± 26	57 ± 21
	3	41 ± 22	38 ± 18	42 ± 21	53 ± 16	58 ± 19	53 ± 18
	7	57 ± 29	61 ± 22	53 ± 22	65 ± 30	67 ± 35	55 ± 18
	28	64 ± 29	67 ± 31	59 ± 31	71 ± 34	75 ± 42	69 ± 35
Nativ- tiere n=8		49 ± 10	49 ± 13	46 ± 15	53 ± 12	53 ± 12	51 ± 14

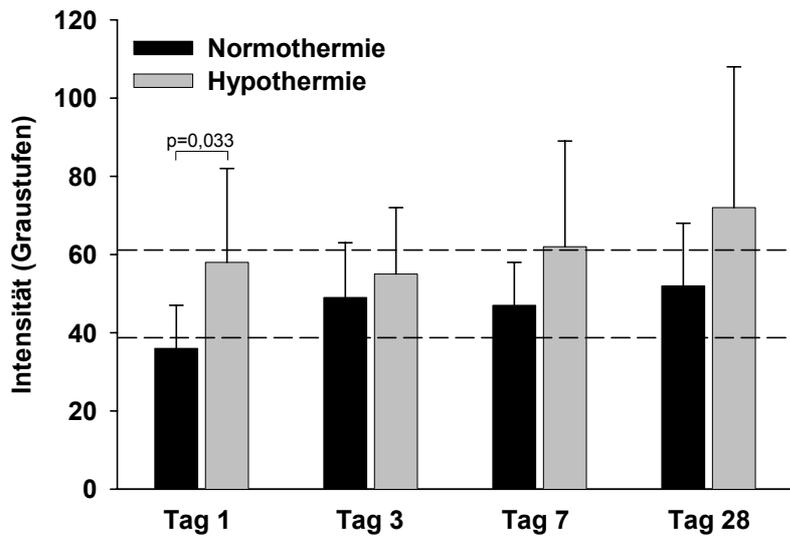
Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (\pm SD) der Immunfluoreszenz-Intensität (Graustufen) des Mdm-2-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus und des unteren Asts des Gyrus dentatus (GD) beider Hemisphären der zwei Versuchsgruppen zu den vier Untersuchungszeitpunkten und des physiologischen Vergleichswertes (Nativtiere).

**Immunfluoreszenz des Mdm-2-Proteins
Ischämische Hemisphäre**



A

**Immunfluoreszenz des Mdm-2-Proteins
Nicht-Ischämische Hemisphäre**



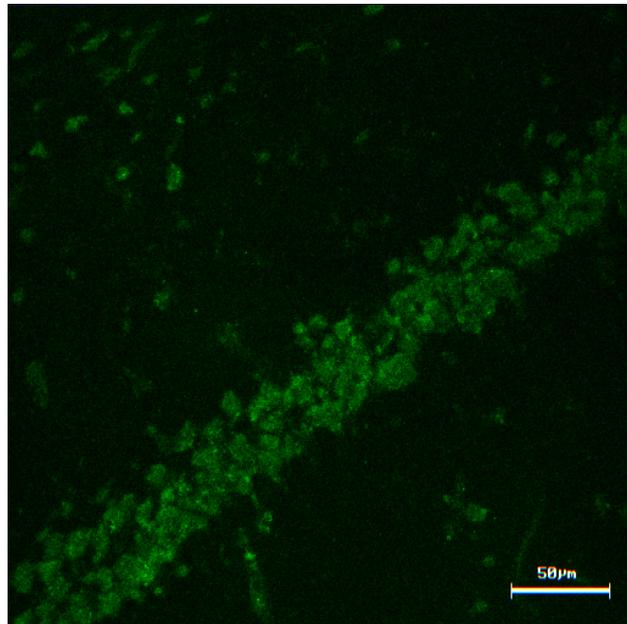
B

Abbildung 17 Grafische Darstellung der Immunfluoreszenz des Mdm-2-Proteins

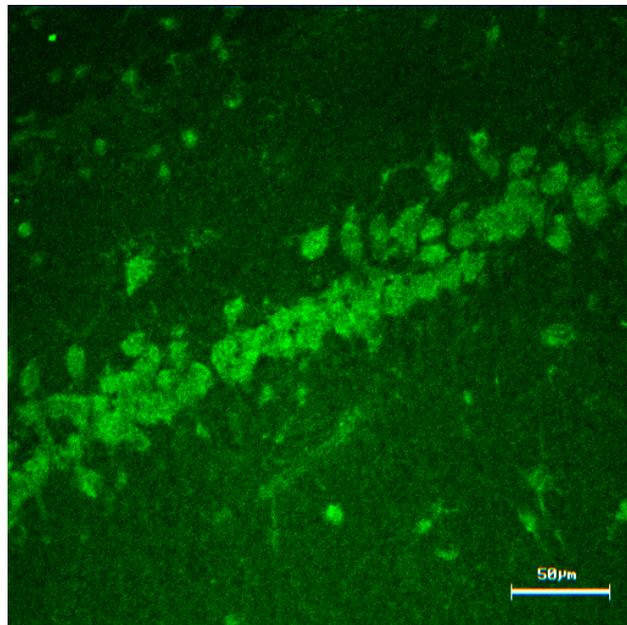
Vergleichende grafische Darstellung der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichungen (\pm SD) der Immunfluoreszenz-Intensität (Graustufen) des Mdm-2-Proteins am Tag 1, 3, 7 und 28 der ischämischen (rechten) (A) und nicht-ischämischen (linken) (B) Gehirnhälfte der Normo-thermie- und Hypothermie-Gruppe, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativtiere).

Signifikanzen: nicht signifikant=keine Kennzeichnung; signifikant=Kennzeichnung und Angabe des p-Wertes

Beispielhaft dienen folgende Abbildungen der Veranschaulichung des Verteilungsmusters des Mdm-2-Proteins innerhalb des Zellverbandes der CA1-Region des Hippocampus jeweils eines Tieres der Normothermie- (siehe Abbildung 18A) und der Hypothermie-Gruppe (siehe Abbildung 18B) zum gleichen Untersuchungszeitpunkt.



A



B

Abbildung 18 Immunfluoreszenzfärbungen des Mdm-2-Proteins

Darstellung der immunfluoreszenzgefärbten CA1-Region des Hippocampus eines Tieres der Normothermie-Gruppe (A) und der Hypothermie-Gruppe (B) zum gleichen Untersuchungszeitpunkt; Vergrößerung siehe Maßstab

Die Zellen der CA1-Region des Hippocampus des Tieres der Normothermie-Gruppe zeigen eine relativ schwache Grünfärbung bzw. Immunfluoreszenzintensität der Zellen und des Hintergrundes. Im Gegensatz dazu zeigt das Bild des Tieres der Hypothermie-Gruppe eine wesentlich stärkere Färbung. Diese hellere Färbung kommt durch den signifikanten Anstieg der Menge des Mdm-2-Proteins der Hypothermie-Gruppe zustande.

3.1.8 Western-Blot-Analyse

Durch die Western-Blot-Analyse werden Konzentrationsänderungen der vier Apoptose-assoziierten Proteine im Hippocampus semiquantitativ bestimmt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung im Gel und anschließender Transferierung auf eine Membran, werden die gleichen Apoptose-assoziierten-Proteine wie in der Immunfluoreszenz-Färbung nachgewiesen. Nach Bindung spezifischer und markierter Antikörper an die gesuchten Proteine wird durch eine chemische Reaktion eine Chemilumineszenz-Reaktion bewirkt unter Lichtemission. Diese Lichtemission zeichnet eine Spezialkamera auf und transformiert sie in ein Graustufen-Bild. Die unterschiedlichen Schwärzungsintensitäten der Hippocampusproben und der Standards können mit einer speziellen Software verglichen werden (siehe Kapitel 3.1.4.2). Die Messung erfolgt prozentual zum Standard (100 %).

Western-Blot-Analyse: Nachweis des Bax-Proteins

Im Vergleich der zwei Versuchsgruppen zeigen die Mittelwerte der Schwärzungsintensitäten des Bax-Proteins zwischen den untersuchten Tagen (1, 3, 7 und 28 Tage) keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 9). Beim Vergleich der ischämischen Hemisphäre der Hypothermie- und Normothermie-Gruppe ergeben sich zu jedem Untersuchungszeitpunkt signifikant niedrigere Schwärzungsintensitäten des Bax-Proteins der Hypothermie-Gruppe im Vergleich zur Normothermie-Gruppe. Auch in der nicht-ischämischen Hemisphäre sind die Werte der Hypothermie-Gruppe am Tag 7 signifikant vermindert im Vergleich zu den Werten der Normothermie-Gruppe. An den Tagen 1, 3 und 28 zeigt sich eine tendenzielle Verminderung des Bax-Proteins der hypothermen Tiere im Vergleich zu Tieren der Normothermie-Gruppe (vgl. Abbildung 19).

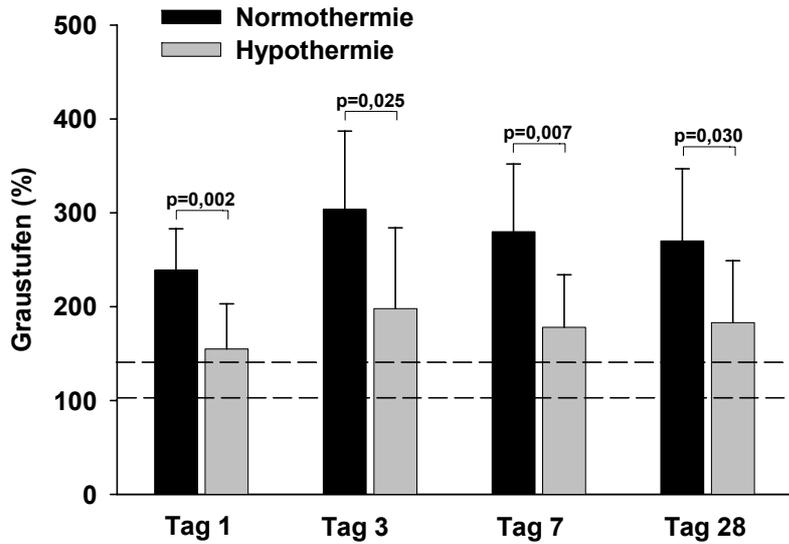
Vergleicht man insgesamt die Menge des Bax-Proteins innerhalb der beiden Hemisphären, ergibt sich in der ischämischen Hemisphäre eine tendenzielle Erhöhung des untersuchten Proteins ($p=0,065$).

Tabelle 9 Darstellung der Schwärzungsintensität des Bax-Proteins in der Western-Blot-Analyse

Bax	Tag	rechte Hemisphäre	linke Hemisphäre
Normo- thermie n=32	1	239 ± 44	210 ± 99
	3	304 ± 83	247 ± 88
	7	280 ± 72	243 ± 65
	28	270 ± 77	226 ± 52
Hypo- thermie n=32	1	155 ± 48	169 ± 88
	3	198 ± 86	169 ± 83
	7	178 ± 56	174 ± 43
	28	183 ± 66	190 ± 96
Nativtiere n=8		130 ± 11	114 ± 25

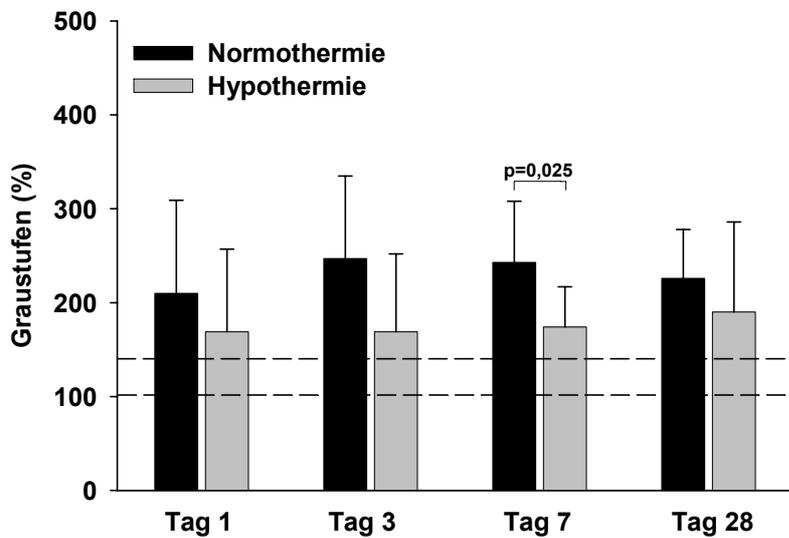
Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen ($\pm SD$) der Schwärzungsintensität (%) des Bax-Proteins der ischämischen (rechten) und nicht-ischämischen (linken) Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen im prozentualen Vergleich zum Standard (100 %) zu den vier Untersuchungszeitpunkten und des physiologischen Vergleichswertes der Nativtiere.

**Western-Blot des Bax-Proteins
Ischämische Hemisphäre**



A

**Western-Blot des Bax-Proteins
Nicht-Ischämische Hemisphäre**



B

Abbildung 19 Grafische Darstellung der Schwärzungsintensitäten des Bax-Proteins

Vergleichende grafische Darstellung der Mittelwerte(MW) und der Standardabweichungen (\pm SD) der Schwärzungsintensität (%) des Bax-Proteins der ischämischen (rechten) (A) und nicht-ischämischen (linken)(B) Gehirnhälfte der Normothermie- und Hypothermie-Gruppe im prozentualen Vergleich zum Standard (100 %) zu den vier Untersuchungszeitpunkten und der physiologischen Vergleichswerte der Nativtiere zwischen den gestrichelten Linien.

Signifikanzen: nicht signifikant=keine Kennzeichnung; signifikant=Kennzeichnung und Angabe des p-Wertes

Abbildung 20 zeigt die Bax-Protein-Banden eines repräsentativen Normothermie- (A) und Hypothermie-Tieres (B) zum gleichen Untersuchungszeitpunkt. Man kann deutlich einen Unterschied der Schwärzungsintensitäten der Proben 1 bis 4 im Vergleich zum Standard erkennen. Je stärker die Schwärzung ausgeprägt ist, desto höher ist der Gehalt des proapoptischen Bax-Proteins und damit die Zellschädigung.

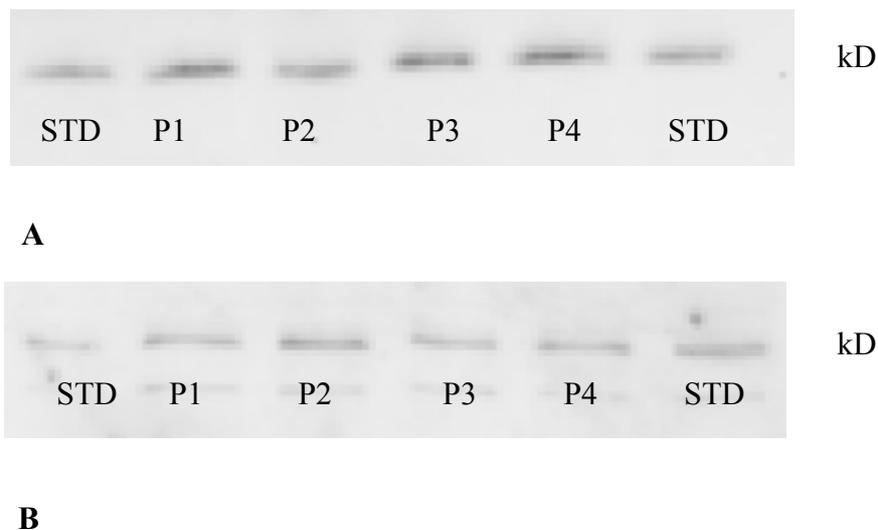


Abbildung 20 Darstellung eines Ausschnittes des Bax-Proteins (Western-Blot-Analyse)

Ausschnitt des nach Chemilumineszenz-Reaktion digitalisierten Bildes der Intensität des Bax-Proteins eines Tieres aus der Normothermie-Gruppe (A) und der Hypothermie-Gruppe mit Standard (STD) und Proben 1 bis 4.

Western-Blot-Analyse: Nachweis des p53-Proteins

In der ischämischen Hemisphäre zeigen sich weder zwischen den Gruppen noch zu den vier unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten signifikante Unterschiede. In der nicht-ischämischen Hemisphäre ist die Konzentration des p53-Proteins in der Hypothermie-Gruppe signifikant am Tag 1 erhöht im Vergleich zu den normothermen Tieren. Alle übrigen Untersuchungszeitpunkte zeigen keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 21).

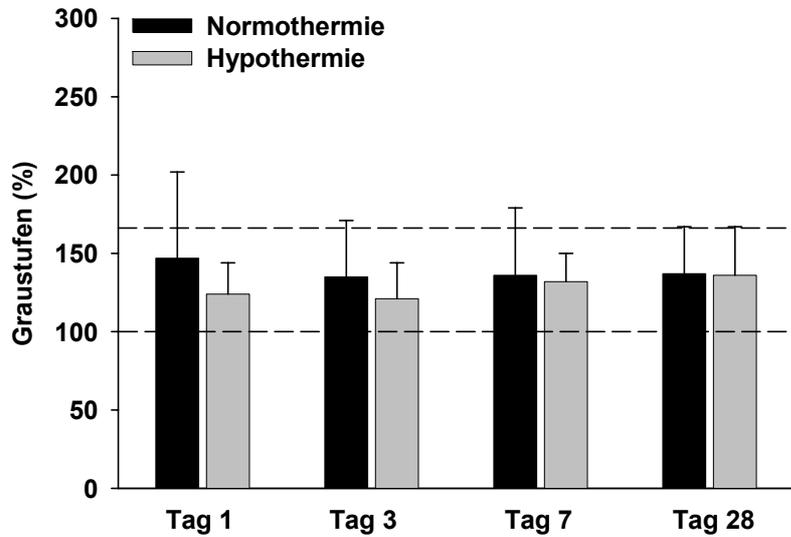
Vergleicht man insgesamt die Menge des p53-Proteins innerhalb der beiden Hemisphären, können zwischen den beiden Hemisphären keine Unterschiede bezüglich der Menge des p53-Proteins festgestellt werden.

Tabelle 10 Darstellung der Schwärzungsintensität des p53-Proteins in der Western-Blot-Analyse

p53	Tag	rechte Hemisphäre	linke Hemisphäre
Normo- thermie n=32	1	147 ± 55	125 ± 23
	3	135 ± 36	126 ± 25
	7	136 ± 43	121 ± 33
	28	137 ± 30	130 ± 24
Hypo- thermie n=32	1	124 ± 20	167 ± 44
	3	121 ± 23	135 ± 20
	7	132 ± 18	138 ± 27
	28	136 ± 31	110 ± 22
Nativ-tiere n=8		127 ± 28	140 ± 33

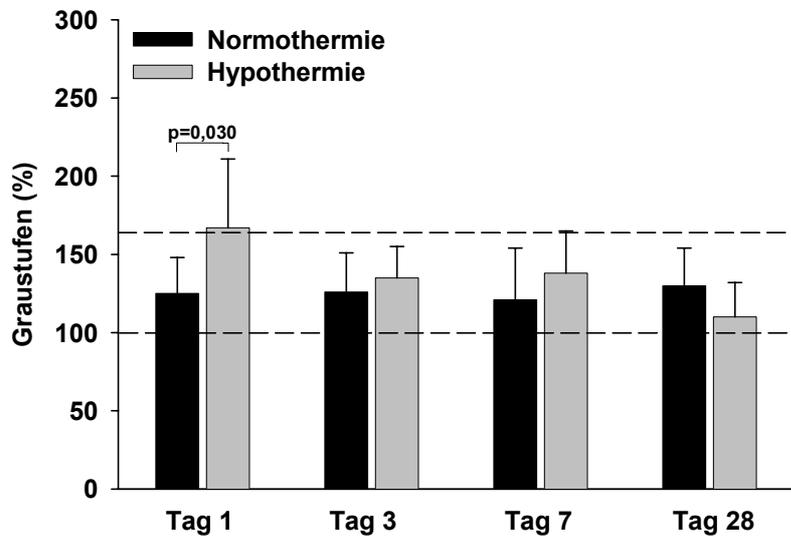
Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (±SD) der Schwärzungsintensität (%) des p53-Proteins der ischämischen (rechten) und nicht-ischämischen (linken) Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen im prozentualen Vergleich zum Standard (100 %) zu den vier Untersuchungszeitpunkten und des physiologischen Vergleichwertes der Nativtiere.

**Western-Blot des p53-Proteins
Ischämische Hemisphäre**



A

**Western-Blot des p53-Proteins
Nicht-Ischämische Hemisphäre**



B

Abbildung 21 Grafische Darstellung der Schwärzungsintensitäten des p53-Proteins

Vergleichende grafische Darstellung der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichungen (\pm SD) der Schwärzungsintensität (%) des p53-Proteins der ischämischen (rechten) (A) und nicht-ischämischen (linken) (B) Gehirnhälfte der Normothermie- und Hypothermie-Gruppe im prozentualen Vergleich zum Standard (100 %) zu den vier Untersuchungszeitpunkten und der physiologischen Vergleichswerte der Nativtiere zwischen den gestrichelten Linien.

Signifikanzen: nicht signifikant=keine Kennzeichnung; signifikant=Kennzeichnung und Angabe des p-Wertes

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

Die Konzentration des anti-apoptischen Bcl-2-Proteins zeigt in der ischämischen Hemisphäre am Tag 1 und 28 eine signifikante Erhöhung in der Hypothermie-Gruppe im Vergleich zu normothermen Tieren. Tendenziell ist diese Erhöhung auch am Tag 3 und 7 zu erkennen.

In der nicht-ischämischen Hemisphäre sind weder zwischen den Gruppen noch zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten signifikante Unterschiede zu erkennen (siehe Abbildung 22).

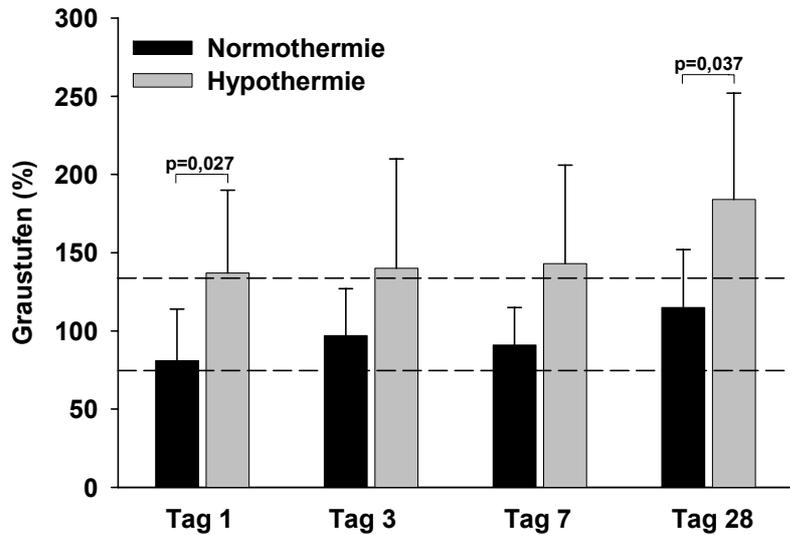
Vergleicht man insgesamt die Menge des Bcl-2-Proteins innerhalb der beiden Hemisphären, zeigt sich eine signifikante Erhöhung auf der ischämischen (rechten) Hemisphäre ($p=0,005$).

Tabelle 11 Darstellung der Schwärzungsintensität des Bcl-2-Proteins in der Western-Blot-Analyse

Bcl-2	Tag	rechte Hemisphäre	linke Hemisphäre
Normo- thermie n=32	1	81 ± 33	101 ± 34
	3	97 ± 30	90 ± 36
	7	91 ± 24	88 ± 26
	28	115 ± 37	88 ± 32
Hypo- thermie n=32	1	137 ± 53	123 ± 28
	3	140 ± 70	112 ± 34
	7	143 ± 63	100 ± 42
	28	184 ± 68	101 ± 35
Nativ-tiere n=8		112 ± 29	91 ± 27

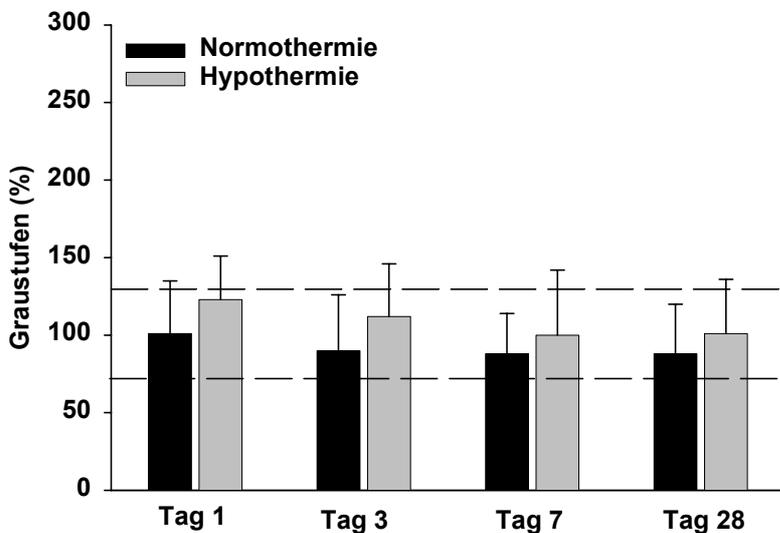
Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (\pm SD) der Schwärzungsintensität (%) des Bax-Proteins der ischämischen (rechten) und nicht-ischämischen (linken) Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen im prozentualen Vergleich zum Standard (100 %) zu den vier Untersuchungszeitpunkten und des physiologischen Vergleichwertes der Nativtiere.

Western-Blot des Bcl-2-Proteins
Ischämische Hemisphäre



A

Bcl-2 Western-Blot
Nicht-Ischämische Hemisphäre



B

Abbildung 22 Grafische Darstellung der Schwärzungsintensitäten des Bcl-2-Proteins

Vergleichende grafische Darstellung der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichungen (\pm SD) der Schwärzungsintensität (%) des Bcl-2-Proteins der ischämischen (rechten) (A) und nicht-ischämischen (linken) (B) Gehirnhälfte der Normothermie- und Hypothermie-Gruppe im prozentualen Vergleich zum Standard (100 %) zu den vier Untersuchungszeitpunkten und der physiologischen Vergleichswerte der Nativtiere zwischen den gestrichelten Linien.

Signifikanzen: nicht signifikant=keine Kennzeichnung; signifikant=Kennzeichnung und Angabe des p-Wertes

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

Bezüglich der Konzentration des anti-apoptotischen Mdm-2-Proteins treten in der ischämischen Hemisphäre keine signifikanten Unterschiede weder zwischen den Gruppen noch zu den vier Untersuchungszeitpunkten auf. In der nicht-ischämischen Hemisphäre dagegen zeigt sich in der Hypothermie-Gruppe am Tag 1 eine signifikante Erhöhung des Mdm-2-Proteins; am Tag 3, 7 und 28 sind dahingehend Tendenzen zu erkennen (siehe Abbildung 23).

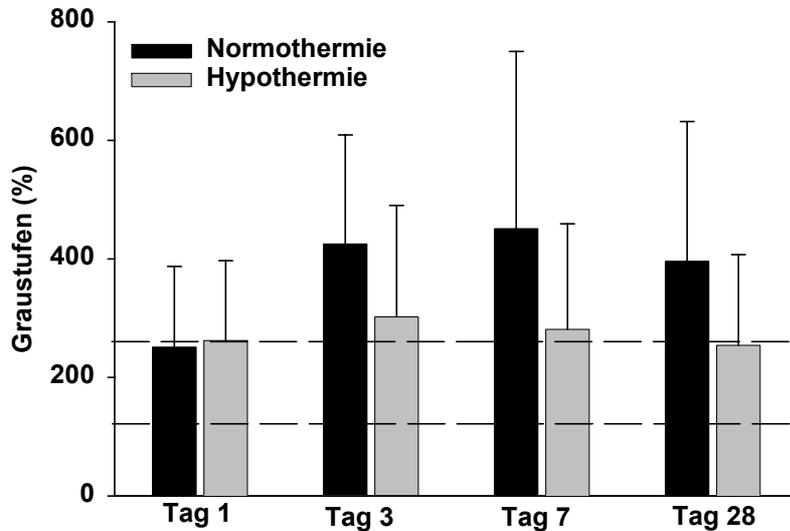
Vergleicht man die Gesamtmenge des Mdm-2-Proteins innerhalb der beiden Hemisphären, ergibt sich auf der ischämischen Hemisphäre eine signifikante Steigerung ($p < 0,001$) im Vergleich zur nicht-ischämischen Hemisphäre.

Tabelle 12 Darstellung der Schwärzungsintensität des Mdm-2-Proteins in der Western-Blot-Analyse

Mdm-2	Tag	rechte Hemisphäre	linke Hemisphäre
Normo-thermie n=32	1	251 ± 136	192 ± 98
	3	425 ± 184	188 ± 91
	7	451 ± 299	195 ± 97
	28	396 ± 236	175 ± 60
Hypo-thermie n=32	1	262 ± 135	305 ± 108
	3	302 ± 188	268 ± 124
	7	281 ± 178	261 ± 125
	28	254 ± 153	234 ± 133
Nativ-tiere n=8		263 ± 41	185 ± 46

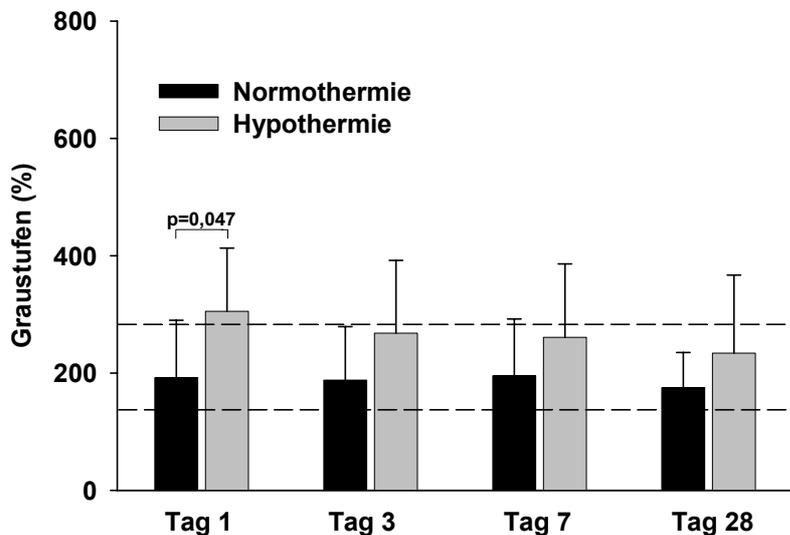
Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (\pm SD) der Schwärzungsintensität (%) des Bax-Proteins der ischämischen (rechten) und nicht-ischämischen (linken) Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen im prozentualen Vergleich zum Standard (100 %) zu den vier Untersuchungszeitpunkten und des physiologischen Vergleichwertes der Nativtiere.

Western-Blot des Mdm-2-Proteins
Ischämische Hemisphäre



A

Mdm-2 Western-Blot
Nicht-Ischämische Hemisphäre



B

Abbildung 23 Grafische Darstellung der Schwärzungsintensitäten des Mdm-2-Proteins

Vergleichende grafische Darstellung der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichungen (\pm SD) der Schwärzungsintensität (%) des Mdm-2-Proteins der ischämischen (rechten) (A) und nicht-ischämischen (linken) (B) Gehirnhälfte der Normothermie- und Hypothermie-Gruppe im prozentualen Vergleich zum Standard (100 %) und der physiologischen Vergleichswerte der Nativtiere zwischen den gestrichelten Linien.

Signifikanzen: nicht signifikant=keine Kennzeichnung; signifikant=Kennzeichnung und Angabe des p-Wertes

EIGENE UNTERSUCHUNGEN – ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung und Western-Blot-Analyse hinsichtlich der Expression der Apoptose-assoziierten Proteine der Hypothermie-Gruppe im Vergleich zur Normothermie-Gruppe sind als Übersicht der folgenden Tabelle zu entnehmen. Ebenso erfolgt ein Vergleich der ischämischen Hemisphäre zur nicht-ischämischen bezüglich der gesamten Menge der untersuchten Proteine in beiden Analyseverfahren (siehe Tabelle 14).

Tabelle 13 Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von Immunfluoreszenz-Färbung und Western-Blot-Analyse der Hypothermie-Gruppe im Vergleich zur Normothermie-Gruppe

			Ischämische Hemisphäre				Nicht-ischämische Hemisphäre			
			1d	3d	7d	28d	1d	3d	7d	28d
Immunfluoreszenz-Färbung	Pro-Apoptose	Bax	↓*	↓*	↓*	↓t	↓*	↓*	↓*	↓t
		p53	-	-	-	-	-	-	-	-
	Anti-Apoptose	Bcl-2	↑*	↑*	-	-	↑*	↑*	-	↑t
		Mdm-2	↑*	-	-	-	↑*	-	-	-
Western-Blot-Analyse	Pro-Apoptose	Bax	↓*	↓*	↓*	↓*	↓t	↓t	↓*	↓t
		p53	-	-	-	-	↑*	-	-	-
	Anti-Apoptose	Bcl-2	↑*	↑t	↑t	↑*	-	-	-	-
		Mdm-2	-	-	-	-	↑*	↑t	↑t	↑t

Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung und Western-Blot-Analyse hinsichtlich der vier Apoptose-assoziierten Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 zu den vier Untersuchungszeitpunkten (1, 3, 7 und 28 Tage)

- *kein signifikanter Unterschied zwischen Hypothermie- und Normothermie-Gruppe*
- ↑ *erhöht in der Hypothermie-Gruppe im Vergleich zur Normothermie-Gruppe*
- ↓ *erniedrigt in der Hypothermie-Gruppe im Vergleich zur Normothermie-Gruppe*
- * *signifikanter Unterschied zwischen Hypothermie- und Normothermie-Gruppe*
- t *tendenzieller Unterschied zwischen Hypothermie- und Normothermie-Gruppe*

Tabelle 14 Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von Immunfluoreszenz-Färbung und Western-Blot-Analyse der ischämischen Hemisphäre im Vergleich zur nicht-ischämischen Hemisphäre

			Gesamtmenge	p-Wert
Immunfluoreszenz-Färbung	Pro-apoptotisch	Bax	↑*	p<0,001
		p53	↑*	p<0,001
	Anti-apoptotisch	Bcl-2	↑t	p=0,020
		Mdm-2	↑*	p<0,001
Western-Blot-Analyse	Pro-apoptotisch	Bax	↑t	p=0,065
		p53	-	-
	Anti-apoptotisch	Bcl-2	↑*	p=0,005
		Mdm-2	↑*	p<0,001

Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung und Western-Blot-Analyse der ischämischen Hemisphäre hinsichtlich der jeweiligen gesamten Proteinmenge der vier Apoptose-assoziierten Proteine (Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2) mit Angabe des p-Wertes

- *kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Hemisphären*

↑ *erhöht in der ischämischen Hemisphäre im Vergleich zur nicht-ischämischen Hemisphäre*

* *signifikanter Unterschied zwischen beiden Hemisphären*

t *tendenzieller Unterschied zwischen beiden Hemisphären*

4 DISKUSSION

Diskussion der Ergebnisse

4.1.1 Versuchsparameter

Während des gesamten operativen Abschnitts werden kontinuierlich eine Reihe von physiologischen Parametern gemessen. Dadurch ermöglicht man weitestgehend standardisierte Bedingungen, sowohl vor Beginn der eigentlichen Operation, als auch während des gesamten Versuchsablaufs. Durch diese Standardisierung wird die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Daten der verschiedenen Versuchsgruppen gewährleistet.

Als Versuchsparameter werden, repräsentativ für die Kreislauf- und Stoffwechselfunktion, der MAP, die Herz- und Atemfrequenz und die Blutglucosekonzentration bestimmt. Durch eine arterielle Blutgasanalyse misst man den arteriellen paCO_2 und paO_2 , die Hämoglobinkonzentration und den pH-Wert. Zusätzlich werden die Hirndurchblutung und Temperatur (perikraniell und rektal) bestimmt.

Durch diese umfangreichen Messungen werden physiologische und pathophysiologische Schwankungen ermittelt und können dann korrigiert werden. So wird eine geringstmögliche Beeinflussung des cerebralen Schadens ermöglicht und dieser kann somit beurteilt werden.

Körpergewicht (g)

Die Tiere der zwei Versuchsgruppen (Normothermie-Gruppe und Hypothermie-Gruppe), sowie die Nativtiere weisen hinsichtlich des Körpergewichts und Alters keine signifikanten Unterschiede auf. Man kann deshalb davon ausgehen, dass in dieser Hinsicht die Ergebnisse der Tiere untereinander vergleichbar sind.

Temperatur (°C)

Da in der vorliegenden Studie die neuroprotektive Wirkung der Hypothermie bis zu 28 Tagen nach Induktion der cerebralen Ischämie untersucht werden soll, wird die Temperatur rektal und perikraniell während des gesamten Versuchsablaufs kontinuierlich gemessen.

Die perikranielle Temperatur wird konstant bei 37,5 °C gehalten. Bei den Tieren der Hypothermie-Gruppe senkt man im Anschluss an die Phase der Ischämie die perikranielle Temperatur auf 34 °C durch entsprechende Maßnahmen (Wärmelampe ausschalten oder Eisbeutel auflegen) auf den gewünschten, nach dem Protokoll vorgeschriebenen Bereich ab. Die rektale Temperatur wird dazu nicht herangezogen, sondern wird lediglich als Kontrolle weiter dokumentiert, da bereits 1987 BUSTO et al. nachwiesen, dass starke Differenzen

zwischen der Körper- und Gehirntemperatur während eines ischämischen Insults auftreten können.

Herzfrequenz (Schläge/min)

Die Herzfrequenz bewegt sich während des gesamten Versuchs innerhalb der physiologischen Grenzwerte und weist keine signifikanten pathologischen Schwankungen auf. Sie dürfte somit keinen Einfluss auf das Ausmaß des induzierten ischämischen Schadens nehmen. Die tendenzielle Erhöhung zum Untersuchungszeitpunkt 45 Isch hängt mit der Ischämie zusammen, die tendenzielle Erniedrigung während 15 Rep mit der Reperfusion.

Mittlerer arterieller Druck (mmHg)

Entsprechend dem durchgeführten Versuchsprotokoll wird der MAP in den Versuchsgruppen Hypothermie und Normothermie während der 45-minütigen Ischämie-Phase durch Blutentzug auf 40 mmHg gesenkt. So zeigt sich in der Phase der Ischämie in beiden Gruppen eine signifikante Erniedrigung im Vergleich zum Ausgangswert. Die Werte zum Zeitpunkt der Erholungs-Phase liegen wieder innerhalb der physiologischen Grenzen und scheinen die Ergebnisse dieses Versuchs nicht zu beeinflussen.

Blutgase

Der paO_2 zeigt zu allen Untersuchungszeitpunkten sowohl innerhalb der Versuchsgruppe als auch im Vergleich der beiden Gruppen keine signifikanten Veränderungen. Daher kann man davon ausgehen, dass der paO_2 die Ergebnisse nicht beeinflusst.

Da im Gegensatz dazu eine Reduktion des $paCO_2$ neuroprotektive Wirkungen hat (VANICKY et al. 1992; FERCAKOVA et al. 1995), muss dieser kontinuierlich gemessen und durch manuelle Regulation der Atemfrequenz und des Atemvolumens innerhalb des physiologischen Bereichs gehalten werden.

Ähnlich verhält es sich mit dem pH-Wert, da dieser das Ausmaß des späteren ischämischen Schadens verändern kann. Erwiesenermaßen wirkt sich eine Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich negativ auf das ZNS, in den alkalischen Bereich dagegen potentiell neuroprotektiv aus (ANDERSON und MEYER 2002). Aus diesem Grunde muss der pH-Wert unbedingt während des gesamten Versuchsablaufs konstant gehalten werden. Dies wird erreicht durch Applikation von Puffersubstanzen (Natriumhydrogencarbonat), insbesondere in der kritischen Phase der Ischämie und der Erholung. So kann ein Einfluss auf den ischämischen Schaden durch Veränderungen des pH-Wertes eingeschränkt werden.

Hämoglobin (g/dl)

Die Hämoglobinkonzentrationen der Tiere der Normothermie- und Hypothermie-Gruppe weisen bis zum manuellen Blutentzug keine signifikanten Unterschiede auf. Der versuchsbedingte Hämoglobin-Abfall während der Ischämie-Phase normalisiert sich wieder, wenn in der anschließenden Phase der Reperfusion das zuvor entnommene Blut reinfundiert wird. Da diese Veränderung in beiden Versuchsgruppen mit gleicher Intensität auftritt, ist anzunehmen, dass die Schwankungen der Hämoglobinkonzentration die durch diese Studie gewonnenen Ergebnisse nicht beeinflussen.

Glucose (mg/dl)

Schon seit langer Zeit ist bekannt, dass sich ein erhöhter Glucosegehalt des Blutes während cerebraler Ischämie negativ auf das Ausmaß des neurologischen Schadens auswirkt. So zeigten HOFFMAN et al. 1991, dass nüchterne Ratten im Vergleich zu nicht-nüchternen und hyperglycämischen Tieren nach Induktion einer cerebralen Ischämie ein besseres neurologisches Endergebnis aufwiesen. Den verschlechternden Einfluss unter hyperglycämischen Bedingungen wiesen auch WANG et al. 2001 nach. Bei ihren Studien trat eine signifikante Ausweitung des ischämischen Schadens bei Tieren mit Diabetes mellitus auf. Es ist also erforderlich, im gesamten Versuchsablauf ein konstant normoglycämisches Niveau durch einen genormten präoperativen 16-stündigen Futterentzug zu erreichen.

Trotz dieser standardisierten Vorgehensweise treten aufgrund individueller Stoffwechsellagen Schwankungen der Blutglucosewerte auf, jedoch befinden sich alle Werte im niedrigen normoglycämen Bereich.

Ermittlung der Hirndurchblutung durch Laser-Doppler-Flussmessung (PU)

Durch die induzierte Hypotension während der Ischämie-Phase kommt es in beiden Versuchsgruppen zu einer signifikanten Reduktion der Hirndurchblutung. Das stärkere Absinken in der ischämischen Hemisphäre wird versuchsbedingt durch die transiente Okklusion der rechten A. carotis communis ausgelöst. Das gewählte Ischämiemodell (modifiziert nach HOFFMAN et al. 1991) entspricht damit weitgehend dem pathophysiologischen Ablauf eines Schlaganfalls.

4.1.2 Immunfluoreszenz-Färbung

In der vorliegenden Studie können bei Vergleich der einzelnen Gehirnregionen innerhalb der beiden Versuchsgruppen keinerlei Veränderungen festgestellt werden. Bekanntermaßen zeichnen sich die hier untersuchten Regionen (CA1-, CA2- und CA3-Region des Hippocampus und unterer Ast des Gyrus dentatus) durch eine unterschiedliche Vulnerabilität gegenüber einem ischämischen Insult aus (vgl. 2.1.4). Die vorliegenden Ergebnisse sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass der schädigende Insult durch das gewählte Ischämie-modell so stark ist, dass unterschiedliche Sensitivitätsschwellen der einzelnen Regionen überschritten und damit nicht mehr unterschieden werden können.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Studie zeigen im Vergleich zwischen der Normthermie- und der Hypothermie-Gruppe, dass die postischämische Behandlung mit Hypothermie sowohl die Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax senkt, als auch die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Mdm-2 steigert. Somit scheint der neuroprotektive Langzeiteffekt der Hypothermie als erwiesen.

Summiert man die Konzentrationen der Apoptose-assoziierten Proteine der einzelnen Untersuchungszeitpunkte und vergleicht diese zwischen ischämischer und nicht-ischämischer Gehirnhälfte, weist die ischämische Hemisphäre immer eine höhere Expression der Proteine auf (siehe Tabelle 14). Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass durch den größeren Schaden (Abklemmen der A. carotis communis dexter) auch eine verstärkte Antwort der Apoptose-assoziierten Proteine auf der entsprechenden Hemisphäre erfolgt.

4.1.2.1 Bax-Protein

Grundsätzlich kann ein Anstieg der Konzentration des pro-apoptotischen Bax-Proteins mit einem stärkeren Ausmaß des neurologischen Schadens auf einen ischämischen Insult gleichgesetzt werden. Dieser Zusammenhang wurde in mehreren unterschiedlichen Studien gezeigt: So wiesen GILLARDON et al. (1996) an Ratten nach, dass bei einer fokalen Ischämie 6 h nach Induktion der Ischämie ein signifikanter Anstieg des Bax-Protein-Spiegels im Gehirn auftritt. Auch nach einer 1-stündigen fokalen Ischämie zeigte sich eine vermehrte Expression des Bax-Proteins im Hippocampus im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe (CHARRIAUT-MARLANGUE et al. 1998). Mit diesen Studien übereinstimmende Ergebnisse fanden KRAJEWSKI et al. (1994), indem sie durch einen 10-minütigen transienten Herzstillstand eine globale cerebrale Ischämie induzierten.

In der vorliegenden Studie zeigt sich bei Vergleich der Expression des Bax-Proteins in der ischämischen Hemisphäre zwischen der Normothermie- und der Hypothermie-Gruppe in der Hypothermie-Gruppe am Tag 1, 3 und 7 eine signifikante Erniedrigung der Bax-Protein-Konzentration. Am Tag 28 tritt eine dahingehende Tendenz auf. Ein identisches Bild ergibt sich bei Betrachtung der nicht-ischämischen Gehirnhälfte, was beweist, dass die Konzentration des Bax-Proteins unter dem Einfluss der Hypothermie zumindest über 7 Tage gesenkt wird.

Mit der vorliegenden Studie übereinstimmende Ergebnisse erhielten auch PRAKSA et al. (2000), die eine fokale cerebrale Ischämie durch MCAO auslösten und durch immunhistochemische Analysen einen signifikanten Abfall der Bax-Protein-Konzentration der Hypothermie-Gruppe (33 °C) im Gegensatz zur Normothermie-Gruppe (37 °C) nachwiesen.

Auch EBERSPÄCHER et al. (2003) zeigten den supprimierenden Effekt der Hypothermie auf das Bax-Protein 4 h nach cerebraler Ischämie. Da die vorliegende Studie als Folgestudie dazu dienen soll, den Langzeiteffekt der Hypothermie bis zu 28 Tage nach Ischämie nachzuweisen, wurde der Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit nahezu identisch zu dem in den Studien von EBERSPÄCHER et al. verwendeten gewählt. Das in der vorliegenden Studie erwiesene tendenzielle Absinken zum Untersuchungszeitpunkt 28 Tage könnte dadurch erklärt werden, dass zu diesem Zeitpunkt die Apoptose-Vorgänge noch im Gange sind (LI et al. 1998) und das anhaltende apoptotische Absterben von einzelnen Zellen zum Ansteigen der Bax-Protein-Konzentration führt.

Vergleicht man die Gesamtmenge des Bax-Proteins zwischen den beiden Gehirnhälften, weist die ischämische Hemisphäre eine signifikant höhere Konzentration an Bax-Protein auf.

Dieser Anstieg kann, wie einleitend bereits erwähnt, auf den stärkeren rechtsseitigen Schaden in Kombination mit einer verstärkten Reaktion des Apoptose-assoziierten Bax-Proteins erklärt werden.

4.1.2.2 p53-Protein

Ein Anstieg des pro-apoptotischen p53-Proteins kann wiederum mit Apoptose und damit einer starken Zellschädigung gleichgesetzt werden. Bereits CHOPP et al. (1992) wiesen diesen Zusammenhang in ihren Studien nach. Als Ischämiemodell führten sie eine 120-minütige MCAO durch und untersuchten 12 h postischämisch die Konzentration des p53-Proteins.

Zwei Jahre später wurden diese Erkenntnisse von LI et al. bestätigt: Mit einem identischen Ischämiemodell wiesen sie die direkte Hochregulierung der p53 mRNA durch Northern-Blot-Analyse in Kombination mit der Immunhistochemie nach. MCGAHAN et al. konnten 1998 diese Hochregulation der Expression des p53-Proteins noch weiter klassifizieren. Durch 4-VO lösten sie eine transiente Ischämie des Vorderhirns aus und bestimmten immunhistochemisch 2, 12, 24, 48 und 72 h postischämisch die Konzentration des untersuchten Apoptose-assoziierten Proteins. Dadurch bewiesen sie, dass in Gebieten mit stärkerer Vulnerabilität, wie beispielsweise der CA1-Region des Hippocampus, die Expression des p53-Gens wesentlich stärker ausgeprägt ist als in den anderen untersuchten Regionen, sowie, dass dies auch über einen längeren Zeitraum andauert. In der vorliegenden Studie unterscheiden sich die zwei Versuchsgruppen weder zu den untersuchten Tagen noch zwischen den untersuchten Regionen (CA1- und CA3-Region des Hippocampus und Gyrus dentatus) in der Menge des p53-Proteins.

Die Tatsache, dass in der vorliegenden Studie zwischen den einzelnen Regionen keine Unterschiede innerhalb der Expression des p53-Proteins festzustellen sind, ist wiederum vermutlich durch die Stärke des ischämischen Insultes zu erklären.

Passend zu den vorliegenden Ergebnissen des pro-apoptotischen Bax-Proteins wäre ein signifikantes Absinken der p53-Protein-Konzentration in der Hypothermie-Gruppe zu erwarten gewesen. Dies konnte jedoch nur tendenziell bestätigt werden. Allerdings können gewisse "analytische" Fehler nicht ausgeschlossen werden. Ein möglicher Erklärungsversuch besteht in der Wahl des Immunfluoreszenz-Antikörpers. Der in dieser Studie verwendete p53-Immunfluoreszenz-Antikörper detektiert humanes p53, spezifischere Antikörper (z.B.: speziell für Ratten) sind momentan käuflich nicht zu erwerben. Unter Umständen könnten deshalb die gesuchten Zellen nicht genau angefärbt worden sein; dadurch könnte sich das Absinken möglicherweise nicht signifikant ausprägen.

Eine weitere Möglichkeit besteht in dem bereits in Kapitel 2.1.9.4.2 erwähnten negativen Rückkopplungsmechanismus zwischen dem p53- und Mdm-2-Protein. Vielleicht wird dieser Komplex nicht mehr durch den p53-Immunfluoreszenz-Antikörper detektiert und dadurch könnten die Ergebnisse verfälscht werden.

Summiert man wiederum die Gesamtmenge des p53-Proteins zu allen Untersuchungszeitpunkten und vergleicht diese zwischen ischämischer und nicht-ischämischer Gehirnhälfte, so weist die rechte (ischämische) Hemisphäre signifikant mehr p53-Protein auf. Dies ist wiederum durch den stärkeren rechtsseitigen ischämischen Insult zu erklären.

4.1.2.3 Bcl-2-Protein

Das Bcl-2-Protein stellt ein anti-apoptotisches Mitglied der Apoptose-assoziierten Proteine dar, wobei eine verstärkte Expression von Bcl-2 neuroprotektiv wirkt. Dies bewiesen ZHAO et al. 2003 mit viralem Gentransfer.

In den eigenen Untersuchungen weist die ischämische Hemisphäre der Hypothermie-Gruppe signifikant erhöhte Werte am Tag 1 und Tag 3 auf, was sich tendenziell auch noch am Tag 28 zeigt.

Identische Ergebnisse ergeben sich bei Analyse des Bcl-2-Proteins der nicht-ischämischen Hemisphäre. Auch in den immunhistochemischen Studien von ZHANG et al. (2001), bei denen eine 10-minütige Ischämie des Vorderhirns durch temporäre Okklusion beider Aa. carotides communes in Kombination mit Blutentzug (Senkung des MAP auf 30 mmHg) unter Hypothermie (3 h auf 33 °C) ausgelöst wurde, ergaben sich vergleichbare Ergebnisse.

Nach den Ergebnissen der eigenen Studie kann man den Schluss ziehen, dass die in der Hypothermie-Gruppe (Ausnahme Tag 7) vorliegende signifikante bzw. tendenzielle Erhöhung des Bcl-2-Proteins auf den neuroprotektiven Effekt der Hypothermie zurückzuführen ist. Die vorliegenden Ergebnisse werden von YENARI et al. (2003) bestätigt, die Wirkung des Bcl-2-Proteins und den Einfluss der Hypothermie untersuchten. Durch Einschleusen von Promotor-Vektoren mit Hilfe von Herpes simplex-Viren griffen sie in die Expression von potentiell neuroprotektiven Genen ein und bewiesen durch die verstärkte Produktion von Bcl-2-Protein einen neuroprotektiven Effekt nach einem ischämischen Insult. Dabei spielt es keine Rolle, ob dieser Anstieg des Bcl-2-Protein-Spiegels exogen durch vektorialen Gentransfer oder endogen durch Überwiegen der pro-apoptotischen Komponente der konkurrierenden Apoptose-assoziierten Proteine bewirkt wird.

Die Erhöhung der Gesamtproteinmenge in der ischämischen (rechten) Hemisphäre im Vergleich zur nicht-ischämischen (linken) könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch den

dort ausgelösten größeren Schaden (Okklusion der A. carotis communis) eine stärkere Induktion der Apoptose-Kaskade und somit auch der Expression des Bcl-2-Proteins erfolgt.

4.1.2.4 Mdm-2-Protein

Sowohl in der ischämischen wie auch in der nicht-ischämischen Hemisphäre weist die Hypothermie-Gruppe nur am Tag 1 einen signifikanten Anstieg des Mdm-2-Proteins im Vergleich zur Normothermie-Gruppe auf, nicht aber an den Tagen 3, 7 und 28.

Der Effekt der Erhöhung der Konzentration des pro-apoptischen Mdm-2-Proteins kann also nur in einem relativ engen Zeitfenster postischämisch nachgewiesen werden. Ein mit dieser Studie übereinstimmendes Ergebnis fanden TU et al. 1998: Sie untersuchten immun-histochemisch die Expression des Mdm-2-Proteins nach 90-minütiger Okklusion der A. cerebri media zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1, 8, 24 und 48 h postischämisch). Dabei stellte sich heraus, dass eine maximale Expression nach 24 h erreicht wird und diese zur 48sten h wieder abnimmt. Ein potentiell neuroprotektiver Effekt ist also nur kurzzeitig zu erwarten.

Eine Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass die Apoptose, wie schon erwähnt, erst langsam in Gang kommt und über einen längeren Zeitraum (bis zu 28 Tage) andauert. Somit könnte es im weiteren Verlauf zum Überwiegen der pro-apoptischen Komponenten der Apoptose-Kaskade kommen. Für diese Hypothese spricht die Tatsache, dass das Mdm-2-Protein je nach Konformation pro- oder anti-apoptisch wirken kann, da es mit dem p53-Protein in Wechselwirkung tritt und zwischen beiden ein negativer Rückkopplungsmechanismus besteht. Einerseits kann es als Ligase fungieren und durch Addition von Ubiquitin sich selbst und p53 für den zellulären Proteindegradationsmechanismus markieren (OREN et al. 1987; ASHCROFT und VOUSDEN 1999; ALMOG et al. 2001). Andererseits kann es auch die Wirkung des p53-Proteins inhibieren und damit den apoptotischen Zelluntergang verhindern. So wiesen MAYO et al. (1997) nach, dass "neues", also nicht phosphoryliertes Mdm-2-Protein das p53-Protein aktiviert. Nach einem Zellschaden mit umfangreichen DNS-Reparationsvorgängen kommt es zum Verlust dieser DNS-abhängigen Proteinkinase. Dadurch kann das vorhandene Mdm-2-Protein nicht phosphoryliert werden, es bildet mit dem p53-Protein einen Komplex und inhibiert so dessen pro-apoptische Wirkung (CHEN et al. 1995; MAYO et al. 1997).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass möglicherweise kurz nach dem Insult das Mdm-2-Gen hochreguliert und im weiteren Verlauf in seiner Kapazität erschöpft wird.

DISKUSSION – DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Im direkten Vergleich der beiden Hemisphären weist die ischämische eine signifikant erhöhte Menge des Mdm-2-Gesamtproteins auf.

Im Vergleich der Gesamtmenge des Mdm-2-Proteins der beiden Hemisphären zeigt die ischämische Gehirnhälfte eine signifikant erhöhte Menge des Mdm-2-Proteins. Diese Beobachtung ist wie bei den drei anderen untersuchten Apoptose-assoziierten Proteinen höchstwahrscheinlich auf den stärkeren rechtsseitigen Insult und damit auf eine verstärkte Antwort der gesamten Apoptose-Kaskade zurückzuführen.

4.1.3 Western-Blot-Analyse

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse zeigen, dass unter Hypothermie-Behandlung die Menge der pro-apoptotischen Proteine teilweise erniedrigt ist. Das Bax-Protein ist in der ischämischen Hemisphäre zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant erniedrigt. Auf der nicht-ischämischen Hemisphäre zeigt sich am Tag 7 eine signifikante Erniedrigung, zu den übrigen Untersuchungszeitpunkten eine Tendenz. Die Menge des p53-Proteins ist dagegen nur auf der nicht-ischämischen Hemisphäre am Tag 1 signifikant erhöht.

Die anti-apoptotischen Proteine weisen teilweise eine Erhöhung in der Hypothermie-Gruppe auf. Die Konzentration des Bcl-2-Proteins steigt auf der ischämischen Hemisphäre signifikant am Tag 1 und 28 und am 3. und 7. Tag tendenziell an. Das Mdm-2-Protein ist auf der nicht-ischämischen Hemisphäre am Tag 1 signifikant und am Tag 3, 7 und 28 tendenziell erhöht.

Bei Vergleich der Ergebnisse der Western-Blot-Analyse mit denen der Immunfluoreszenz-Färbung ergeben sich überwiegend Übereinstimmungen, jedoch auch teilweise Unstimmigkeiten. Dabei zeigt sich, dass die Western-Blot-Analyse etwas ungenauer ist im Vergleich zur Immunfluoreszenz-Färbung. Hier kann man nämlich nur Teile des rechten und linken Hippocampus in toto untersuchen, während es im Rahmen der Immunfluoreszenz-Färbung möglich ist, einzelne Zellverbände des Hippocampus zu analysieren. Somit sollte den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse tendenziell weniger Bedeutung beigemessen und statt dessen die Ergebnisse der wesentlich präziseren Immunfluoreszenz-Färbung stärker gewichtet werden.

Addiert man die Konzentrationen der Apoptose-assoziierten Proteine der einzelnen Untersuchungszeitpunkte und vergleicht zwischen ischämischer und nicht-ischämischer Hemisphäre, ergeben sich folgende Zusammenhänge:

Bezüglich des p53-Proteins kann kein Unterschied zwischen den beiden Hemisphären festgestellt werden. Ansonsten sind die Mengen der untersuchten Proteine immer in der ischämischen Hemisphäre erhöht. So ergibt sich eine signifikante (Bcl-2- und Mdm-2-Protein) bzw. tendenzielle (Bax-Protein) Erhöhung (siehe Tabelle 14).

Diese Erhöhung in der ischämischen Hemisphäre könnte darauf zurückgeführt werden, dass durch den größeren Schaden (Abklemmen der A. carotis communis dexter) auch eine verstärkte Antwort der Apoptose-assoziierten Proteine auf der entsprechenden Hemisphäre stattfindet.

4.1.3.1 Bax-Protein

Die Untersuchung der Schwärzungsintensitäten des Bax-Proteins ergibt in der Hypothermie-Gruppe der ischämischen Hemisphäre eine signifikante Erniedrigung der Expression des Bax-Proteins zu allen Untersuchungszeitpunkten (1, 3, 7 und 28 Tage).

Möglicherweise kommt es durch die Verstärkung des ischämischen Insults generell zu einer stärkeren Aktivierung der Apoptose-Kaskade. Dadurch könnten die anti-apoptotischen Komponenten überwiegen und insgesamt eine Supprimierung der Expression des Bax-Proteins induzieren.

In der nicht-ischämischen Hemisphäre ist die Expression des untersuchten Proteins am Tag 7 signifikant und am Tag 1, 3 und 28 tendenziell erniedrigt.

Somit scheint dieser Zeitpunkt (Tag 7) eine besondere Rolle zu spielen. Die in der Western-Blot-Analyse gewonnenen Ergebnisse stimmen mit den Daten der Immunfluoreszenz-Färbung überein (siehe Kapitel 4.1.2.1) und ergänzen diese insbesondere mit der signifikanten Erniedrigung des Bax-Proteins in der ischämischen Hemisphäre am Tag 28. Die ansonsten tendenziellen Veränderungen, die hingegen bei der Immunfluoreszenz-Färbung signifikant ausgeprägt sind, können höchstwahrscheinlich durch die Methode der Western-Blot-Analyse erklärt werden. Generell stellt, wie schon in Kapitel 4.1.3 erwähnt, die Western-Blot-Analyse im Vergleich zur Immunfluoreszenz-Färbung das ungenauere Verfahren dar. Während bei der Immunfluoreszenz-Färbung einzelne Zellverbände untersucht werden, erfolgt bei der Western-Blot-Analyse die Bestimmung des Proteingehaltes des Hippocampus in toto. So kann eine gewisse Beimengung von Fremdmaterial nicht verhindert werden und dadurch könnte man die geringere Proteinmenge erklären. Summiert man die gesamte Menge des Bax-Proteins auf beiden Hemisphären und vergleicht sie untereinander, kann nämlich kein Unterschied festgestellt werden.

4.1.3.2 p53-Protein

Das p53-Protein spielt eine herausragende Rolle in der Tumorsuppression und kann direkt als Apoptose-Auslöser fungieren. Erwiesenermaßen kommt es nach einem ischämischen Insult zu einem Anstieg des p53-Proteins (MINAMI et al. 2000; CHUNG et al. 2002).

Zwischen den zwei Versuchsgruppen gibt es in der ischämischen Hemisphäre zu keinem der untersuchten Zeitpunkte (1, 3, 7 und 28 Tage) signifikante Konzentrationsunterschiede der Mittelwerte der Schwärzungsintensitäten des p53-Proteins. Die Hypothermie-Gruppe weist

jedoch im Vergleich zur Normothermie-Gruppe in der nicht-ischämischen Hemisphäre eine signifikante Erhöhung des p53-Proteins am Tag 1 auf.

Bis auf die signifikante Erhöhung am Tag 1 sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung (vgl. Kapitel 3.1.7) und der Western-Blot-Analyse identisch. Im Hinblick auf die Hypothese einer potentiellen Neuroprotektion ist dieses Ergebnis widersprüchlich. Dafür spräche eine Erniedrigung des p53-Proteins. Aufgrund der schon mehrfach erwähnten Methodenkritik der Western-Blot-Analyse sollte dem hier vorliegenden Ergebnis kritisch begegnet werden.

Möglicherweise könnte man den signifikanten Anstieg auch durch eine starke Interaktion zwischen dem p53- und Mdm-2-Protein erklären. Der bestehende negative Feedback-Mechanismus wurde schon im Kapitel 2.1.9.4.2 erwähnt. Eventuell kann im Verlauf der Western-Blot-Analyse dieses gebundene p53 detektiert werden. Im Gegensatz dazu könnte es sein, dass der p53-Mdm-2-Komplex in der Immunfluoreszenz-Färbung nicht erkannt wird.

Bei Vergleich der beiden Hemisphären bezüglich der Gesamtmenge des p53-Proteins zeigt die ischämische Hemisphäre eine signifikante Erhöhung der p53-Protein-Menge.

4.1.3.3 Bcl-2-Protein

Die ischämische Gehirnhälfte der Hypothermie-Gruppe zeigt tendenziell (Tag 3 und Tag 7) bzw. signifikant (Tag 1 und Tag 28) erhöhte Werte der Schwärzungsintensitäten des Bcl-2-Proteins. Auf der nicht-ischämischen Hemisphäre sind dagegen keine Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsgruppen feststellbar.

Bei Vergleich der Gesamtmenge an Bcl-2-Protein ergibt sich eine signifikante Erhöhung in der ischämischen (rechten) Hemisphäre ($p=0,005$).

ZHANG et al. (2001) wiesen nach, dass die Menge des Bcl-2-Proteins durchaus als Indikator für einen schützenden Effekt angesehen werden kann.

Somit kann man die vermehrte Expression des Bcl-2-Proteins als neuroprotektiven Effekt der Hypothermie-Behandlung interpretieren.

Da kaum Studien mit Western-Blot-Analyse zur Klärung der vorliegenden Fragestellung durchgeführt wurden, soll an dieser Stelle auf das Kapitel 4.1.2 verwiesen werden.

4.1.3.4 Mdm-2-Protein

Bei Vergleich der Hypothermie-Gruppe der ischämischen Hemisphäre zeigen sich in beiden Versuchsgruppen zu keinem der Untersuchungszeitpunkte Konzentrationsunterschiede des Mdm-2-Proteins. In der nicht-ischämischen Hemisphäre ist die Mdm-2-Konzentration der Hypothermie-Gruppe im Vergleich zur Normothermie-Gruppe am Tag 1 signifikant, an den übrigen Untersuchungstagen tendenziell erhöht. Dieses Ergebnis der Western-Blot-Analyse ist identisch zu dem der Immunfluoreszenz-Färbung. Aus den schon erwähnten Gründen der Methodenkritik (siehe Kapitel 4.1.7) sollte dem widersprüchlichen Ergebnis der ischämischen Hemisphäre nicht allzu viel Bedeutung beigemessen werden. Ein weiterer Grund für die geringe Expression des Mdm-2-Proteins könnte darin gesehen werden, dass möglicherweise durch den Schaden p53 hochreguliert wird, das wiederum durch den schon erwähnten negativen Rückkopplungsmechanismus (vgl. Kapitel 2.1.9.4) die Expression von Mdm-2 hemmt.

Die tendenzielle Erniedrigung des Mdm-2-Proteins der ischämischen Hemisphäre spricht jedoch dagegen. Da alle Werte in der Hypothermie-Gruppe in der nicht-ischämischen Hemisphäre erhöht sind, könnte man durch Anstieg der Menge des anti-apoptotischen Mdm-2-Proteins die neuroprotektive Wirkung der Hypothermie als erwiesen ansehen.

Unter dem Einfluss von Hypothermie kommt es zum Absinken des pro-apoptotischen Bax-Proteins und zum Ansteigen des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins bis zu einem Untersuchungszeitraum von 28 Tagen. Daher könnte die Behandlung der Hypothermie über eine Beeinflussung der konkurrierenden Apoptose-assoziierten Proteine möglicherweise eine neuroprotektive Wirkung erzielen.

Addiert man wiederum die Menge des Mdm-2-Proteins auf der jeweiligen Gehirnhälfte und vergleicht sie untereinander, weist die ischämische Hemisphäre eine signifikante Erhöhung auf ($p < 0,001$).

Diskussion der Methoden

4.1.4 Ischämiemodell

Grundsätzlich lassen sich viele Teilaspekte der cerebralen Ischämie durch Versuche mit Organ- und Zellkulturen klären. Beispielsweise kann die erhöhte Vulnerabilität der CA1-Region des Hippocampus oder die Vergrößerung des Infarktgebietes unter hyperglycämischen Bedingungen in derartigen Studien nachgewiesen werden. Der Nachteil liegt darin, dass immer nur isoliert ein bestimmter Mechanismus geklärt werden kann, und, dass die daraus gewonnenen Ergebnisse unmöglich auf den Gesamtorganismus übertragen werden können. In der vorliegenden Studie mit dem Ziel der Untersuchung der Apoptose-assoziierten Proteine im Hippocampus nach einem ischämischen Insult zeigt sich, dass die Komplexität der cerebralen Ischämie unmöglich durch In-vitro-Experimente allein erforschbar ist.

Da cerebrovaskuläre Erkrankungen beim Menschen äußerst variabel in ihrer Ausprägung auftreten, können ab einem gewissen Stadium deren komplexe biochemische und molekulare Zusammenhänge nur im Tierversuch aufgeklärt werden. Der Vorteil der Simulation mit Tiermodellen liegt in der Reproduzierbarkeit und der Möglichkeit, verschiedenste Ausgangs- und Endsituationen durchzuspielen und somit die ganze Bandbreite an Variationen auszuschöpfen (GINSBERG 2003). Außerdem kann der gesamte Versuchsablauf minutiös kontrolliert, gesteuert und so vor allem im Stadium der Ischämie genau untersucht werden. Dabei sind die ersten Minuten nach Auftreten des ischämischen Insults oft entscheidend (GINSBERG und BUSTO 1989). Des Weiteren sind meist invasive operative Eingriffe notwendig, um umfangreiche histopathologische, biochemische und physiologische Untersuchungen durchführen zu können; teilweise können diese Messungen nur durch einen direkten Zugang zum Gehirn bewerkstelligt werden (GINSBERG und BUSTO 1989).

Neben den aufgeführten Gründen spricht der ethische Aspekt für den Tierversuch. Die Klärung bestimmter physiologischer Fragestellungen und Erforschung neuer therapeutischer Ansätze darf unter keinen Umständen durch Versuche am Menschen erfolgen. Die klinische Erprobung von Medikamenten schließt sich gemäß den allgemeinen Bestimmungen zur Durchführung von Tierversuchen erst nach einer umfangreichen Anzahl von Vorstudien, wie Testung an zwei verschiedenen Tierspezies, toxikologischen und pharmakologischen Studien an.

Wegen all dieser aufgeführten Punkte kann die vorliegende Studie nur im Tiermodell durchgeführt werden.

Während in früheren Studien größere Säugetiere wie Katzen, Hunde, Kaninchen und Primaten eingesetzt wurden, bevorzugt man heute vorwiegend Nagetiere als Versuchstiere. Aus folgenden Gründen sind diese besser geeignet und werden auch in der vorliegenden Studie verwendet:

Grundsätzlich sind die Anschaffungskosten geringer, die Unterbringung und Zucht (kürzere Tragezeiten, höhere Wurfgrößen) ist wesentlich einfacher und dadurch sind Nagetiere besser verfügbar. Durch ihr geringeres Gewicht ergibt sich ein geringerer Bedarf an Medikamenten und weiteren Materialien. Aufgrund der geringeren Größe der Nagetiere vereinfacht sich das Handling, die Probengewinnung (hier: Gehirnentnahme) und die laboranalytische Weiterverarbeitung, was wiederum zu finanziellen Einsparungen gegenüber größeren Tierspezies führt. Außerdem kann durch Inzucht eine sehr hohe genetische Homogenität der einzelnen Stämme erreicht werden. Aus ökologischer und ethischer Sicht besteht eine bessere Akzeptanz der Bevölkerung bei der Verwendung von Nagetieren als Versuchstieren im Gegensatz zu Primaten (GINSBERG und BUSTO 1989; TRAYSTMAN 2003). Auch weisen sie eine zu den größeren Säugetieren und dem Menschen vergleichbare Anatomie und Physiologie des cerebrovaskulären Systems auf. Aufgrund der erwiesenen Ähnlichkeit zwischen menschlichem und rodentem Genom werden heutzutage fast ausschließlich Ratten und Mäuse herangezogen (JACOB und KWITEK 2002). Während bei anderen das ZNS betreffenden Fragestellungen häufig Gerbils als Versuchstiere dienen, erscheinen sie für Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der cerebralen Ischämie ungeeignet, da keine Kollateralverbindungen zwischen dem Vertebralis- und Carotissystem bestehen (LEVINE und SOHN 1969). Außerdem neigen Gerbils aufgrund einer genetischen Anfälligkeit zur Ausbildung von Krampfanfällen, teilweise sogar in der Abwesenheit einer Ischämie (KAPLAN und MIEZEJESKI 1972).

Wegen der oben genannten Vorteile und der erwiesenen anatomischen Ähnlichkeiten in der Blutversorgung zum Gehirn des Menschen (HAFFERL 1957; FIRBAS et al. 1973) werden in dieser Studie Ratten als Versuchstiere verwendet.

Grundsätzlich gibt es viele Möglichkeiten experimentell eine cerebrale Ischämie bei Ratten zu induzieren, wie bereits in Kapitel 2.1.7 ausführlich besprochen. Je nach gewünschter Lokalisation, Ausbreitung und Intensität des zu verursachenden Schadens kann das entsprechende Ischämiemodell ausgewählt werden.

Durch kontinuierliches Monitoring werden alle Faktoren, die das Ausmaß des ischämischen Schadens beeinflussen könnten, konstant gehalten, bzw. so geregelt, dass durch sie keine zusätzliche neuroprotektive oder schädigende Wirkung erfolgt.

Durch 16-stündige Nahrungskarenz wird bei allen Versuchstieren ein niedriger normoglycämischer, konstanter Blutglucosespiegel erreicht. Eine durch Futteraufnahme induzierte Hyperglycämie würde den ischämischen Schaden potenzieren (HOFFMAN et al. 1991; WANG et al. 2001). Zudem werden die Blutgase genau analysiert und gegebenenfalls korrigiert, um eine Verschiebung des pH-Wertes zu verhindern. Wie bereits erwähnt, führt eine Azidose zur Verschlechterung des Zellschadens, während eine Alkalose eine potentielle Neuroprotektion (ANDERSON und MEYER 2002) bewirkt.

Da in dieser Studie die neuroprotektive Wirkung der Hypothermie im Vordergrund steht, muss die Temperatur äußerst exakt gemessen und kontrolliert werden. Dabei ist es erforderlich, perikraniell die Gehirnkörpertemperatur zu bestimmen. Um während der Phase der Hypothermie exakt eine perikranielle Temperatur von 34 °C zu erreichen, ist an das Messgerät eine Infrarot-Wärmelampe angeschlossen, die sich bei Abweichungen um $\pm 0,3$ °C automatisch an- bzw. abschaltet.

Die Wahl des für diese Zielsetzung bestmöglich geeigneten Ischämie-modells, das kontinuierliche Monitoring und gegebenenfalls die Korrektur der Messparameter ermöglichen es, reproduzierbare, valide und vergleichbare Messdaten und Erkenntnisse zu gewinnen. Um die Fragestellung dieser Studie, also den Langzeiteffekt der neuroprotektiven Wirkung unter Hypothermiebehandlung, zu klären, wird ein Ischämie-modell verwendet, das durch HOFFMAN et al. 1991 eingeführt wurde. Die inkomplette cerebrale Hemisphären-Ischämie wird durch einen 45-minütigen Verschluss der A. carotis communis dexter unter gleichzeitiger Hypotension induziert. Durch kontinuierlichen Blutentzug wird der MAP auf einen Wert von 40 mmHg gesenkt. Dieses Ischämie-modell verursacht nachweislich einen ausgeprägten Schaden der besonders vulnerablen Neuronen der Hippocampusformation.

4.1.5 Hypothermie-Induktion

Zur Hypothermie wird in der vorliegenden Studie bei den Tieren die perikranielle Temperatur auf 34 °C abgesenkt und für 1 h auf diesem Niveau gehalten.

Anschließend wird durch umfangreiche laboranalytische Untersuchungen festgestellt, ob diese Hypothermiebehandlung einen neuroprotektiven Effekt aufweist oder nicht.

Da das Forschungsgebiet der Apoptose noch relativ jung ist, sind umfangreiche experimentelle Untersuchungen, wie die vorliegende Studie, notwendig, um die Komplexität der Apoptose-Kaskade in all ihren Einzelheiten zu verstehen und die Hypothermie als neuen Therapieansatz nach apoptotischer Schädigung zu entwickeln.

Zur Klärung der potentiell neuroprotektiven Wirkung unter Hypothermie wurden schon zahlreiche Studien durchgeführt: MIYAZAWA et al. (2003) analysieren 26 bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführte Hypothermie-Studien. Um besser vergleichen zu können, teilen sie diese Studien in 4 Gruppen auf: Gruppe A (transiente MCAO, Hypothermie: 30-35 °C), Gruppe B (permanente MCAO, Hypothermie: 30-35 °C), Gruppe C (permanente MCAO, Hypothermie: 24 °C) und Gruppe D (transiente oder permanente MCAO, Hyperthermie: 39-40 °C). Innerhalb aller Gruppen wurde das Infarktvolumen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Normothermie) 6 h und 7 Tage postischämisch bestimmt. Als Ergebnis zeigten sich folgende prozentuale Veränderungen der Infarkt-Größe: $55,3 \pm 27,1$ % (Gruppe A), $57,6 \pm 24,7$ % (Gruppe B), $60,8 \pm 45,5$ % (Gruppe C) und $189,7 \pm 89,4$ % (Gruppe D). Somit wurde bewiesen, dass milde bzw. moderate Hypothermie das Infarktvolumen signifikant reduziert und außerdem konnte bei Vergleich dieser 26 Studien der direkte Zusammenhang zwischen der prozentualen Verringerung des Infarktvolumens und Absenkung der Temperatur nachgewiesen werden. Betrachtet man jedoch die einzelnen Ergebnisse dieser Studien, treten teilweise widersprüchliche Ergebnisse auf. So wiesen YANAMOTO et al. 1999 nach, dass nur durch Kombination von intra- und postischämischer Hypothermie eine deutliche Reduktion des Infarktvolumens erreicht werden kann und diese nur dann auftritt, wenn die Phase der Hypothermie über mehrere Stunden in der Reperfusion-Phase ausgedehnt wird. Im Gegensatz dazu zeigten MAIER et al.(2001) in ihrem Modell einen ähnlichen Effekt auch mit bis zu 3- stündiger Verzögerung des Beginns der Hypothermie-Phase nach dem ischämischen Insult.

Gründe für derartige Widersprüche liegen möglicherweise in den unterschiedlichen Ischämie-Modellen und der großen Varianz der Hypothermie-Induktion, wie beispielsweise Dauer, Tiefe und Zeitpunkt. Eine Absenkung der Körpertemperatur auf 34 °C, wie in der vorliegenden Studie, erscheint sinnvoll, da sich die potentiell neuroprotektive Wirkung der

Hypothermie unter gleichzeitigem Auftreten von nicht allzu starken Nebenwirkungen entfallen kann. In tierexperimentellen Studien an verschiedenen Säugetieren wurde, wie schon erwähnt, eine Temperatur von 30 °C als kritischer Schwellenwert etabliert (STEEN et al. 1979; STEEN et al. 1980; WEINRAUCH et al. 1992).

Neben der Tiefe der Temperaturabsenkung ist der Zeitpunkt der Hypothermie-Induktion entscheidend. Im Hinblick auf eine mögliche Anwendung im klinischen Bereich der Schlaganfall-Therapie erscheint nur die postischämische Induktion sinnvoll. In vielen Studien wurde die Hypothermie postischämisch induziert und dabei ein Zeitfenster von 1-2 h etabliert. (BUSTO et al. 1989; ZHANG et al. 1993; MAIER et al. 2001). YANAMOTO et al. führten 1999 Studien durch, in denen die intra- und postischämische Hypothermie (33 °C) kombiniert wurden. Allerdings konnten sie nur bei permanenter Hypothermie über mehrere Stunden der Reperfusion-Phase eine deutliche Verbesserung über einen Beobachtungszeitraum von 30 Tagen erzielen. Diese Kombination ist zwar im Hinblick auf die besseren Ergebnisse vielversprechend, allerdings kommt es bei einer so langen Phase der Hypothermie zu einem stärkeren Auftreten der Nebenwirkungen. Als Beispiele sind unter anderem (vgl. Kapitel 2.1.12) die Depression des Immunsystems mit einem möglicherweise verstärkten Auftreten von Sepsis und Pneumonie und die Einschränkung der Thrombozyten-Aggregationsfähigkeit mit der Gefahr von stärkeren Blutungen zu nennen. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Studie eine Hypothermie-Dauer von 1 h gewählt.

Des Weiteren ist der Modus des Wiedererwärmens von besonderer Wichtigkeit: Diese Phase ist besonders kritisch, da ein zu schnelles Wiedererwärmen die Gefahr des hypovolämischen Schocks in sich birgt. Die Angaben variieren in klinischen Studien mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma bzw. Infarkt der A. cerebri media von 1 °C / 4 h (CLIFTON et al. 1993) bis 0,1 bis 0,2 °C pro 4 bis 6 h (STEINER et al. 2001). Im vorliegenden Tiermodell wird die Ratte innerhalb einer halben Stunde wiedererwärmt. Eventuell könnten die vorliegenden, zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse mit diesem schnellen Erwärmungsmodus erklärt werden. Aufgrund der geringen Körperoberfläche und der sehr hohen Stoffwechselrate (im Vergleich zum Menschen) wird in der vorliegenden Studie der schnelle Aufwärmmodus bevorzugt. Bei einer längeren Phase der Hypothermie steigt die Inzidenz von o.g. Nebenwirkungen potentiell an.

Zusammenfassend zeigt sich im gewählten Ischämie-Modell ein Absinken des pro-apoptischen Bax-Proteins und ein Ansteigen des anti-apoptischen Bcl-2-Proteins über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen. Daher scheint der neuroprotektive Effekt der Hypothermie auch im Langzeiteffekt bewiesen.

4.1.6 Immunfluoreszenz-Färbung

Grundsätzlich handelt es sich bei der Immunfluoreszenz-Färbung um eine gut etablierte Bestimmungsmethode. Der Vorteil liegt darin, dass man die gewünschten 1. Antikörper für eine sehr große Anzahl von Zielproteinen käuflich erwerben kann und diese mittlerweile in hervorragender Qualität hergestellt werden. Der 2. Antikörper, an den der Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt ist, weist ebenfalls eine sehr hohe Spezifität auf. Durch diese "Doppelbindung" von Antikörpern ergibt sich eine besonders spezifische Bindung an das gewünschte Zielprotein bei gleichzeitiger nur schwacher Hintergrund-Fluoreszenz.

Allerdings muss dabei beachtet werden, dass die verwendeten Antikörper eine wichtige Rolle spielen. Für das p53-Protein beispielsweise (vgl. Kapitel 4.1.2.2) wurde ein humaner p53-Antikörper verwendet, so dass möglicherweise nicht alle Proteine detektiert wurden.

Ein weiterer Nachteil besteht in der äußerst aufwendigen Färbetechnik (vgl. Kapitel 3.1.4.1).

Um mögliche Fehler innerhalb des Färbedurchgangs zu vermeiden, wird die Immunfluoreszenz-Färbung immer streng nach Protokoll und von den selben routinierten Personen durchgeführt.

Ein weiteres Problem birgt der an den 2. Antikörper gekoppelte Immunfluoreszenz-Farbstoff, dessen Intensität durch Lichtexposition massiv nachlässt. Um dieses Verblässen zu verhindern, wird der lichtempfindliche 2. Antikörper zu Beginn der Studie aliquotiert und gekühlt in absoluter Dunkelheit aufbewahrt. Nur die jeweils benötigte Menge setzt man kurz dem Licht aus. Außerdem deckt man die Gehirnschnitte nach dem Färbedurchgang mit einer besonderen Substanz (Mounting Medium) ein, die ein Verblässen des Immunfluoreszenz-Farbstoffs verhindert. Da trotz dieser Maßnahmen in Kombination mit einer Minimierung der Lichtexposition des 2. Antikörpers die Fluoreszenz des Farbstoffes mit der Zeit nachlässt, werden die Präparate immer innerhalb der auf den Färbedurchgang folgenden 24 h am CLSM gescannt und abgespeichert. Da es im Verlauf des Versuchs zu Energieschwankungen der Laserleistung und damit zu falschen Ergebnissen kommen könnte, wird zwischen den einzelnen Messungen die Laserleistung durch ein Powermeter bestimmt. Anhand dieser Powermeter-Daten können auftretende Schwankung durch Einrechnung der momentanen Laserleistung umgerechnet werden. So ist es möglich, über den gesamten Untersuchungszeitraum standardisierte und damit vergleichbare Bilder aufzuzeichnen.

4.1.7 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse stellt ein anerkanntes und schon lange etabliertes Verfahren zur qualitativen und semi-quantitativen Bestimmung von Proteinen dar. Da es sich hier um ein äußerst aufwendiges Verfahren handelt, gibt es in den einzelnen Schritten (vgl. Kapitel 3.1.4.2) Fehlermöglichkeiten.

Um diese auf ein absolutes Minimum zu reduzieren, werden alle Verfahren und Zubereitungen von Lösungen streng nach Protokoll ohne jegliche Variationen durchgeführt. Außerdem werden alle Arbeitsschritte immer von den gleichen Personen ausgeführt.

Grundsätzlich muss beachtet werden, dass bei der Gewinnung des Probenmaterials ein Fehler dadurch entsteht, dass das Verhältnis der gewünschten Zellverbände zu dem Umgebungsgewebe nicht konstant gehalten werden kann. Dadurch bestimmt man bei jeder Analyse einen variierenden Anteil von nicht gewünschtem Fremdmaterial. Um zu gewährleisten, dass aliquote und damit vergleichbare Proteinmengen in den einzelnen Proben vorliegen, ist das exakte Pipettieren äußerst wichtig.

Damit sämtliche Ergebnisse untereinander verglichen werden können, werden in jeder Analyse Standards mitbestimmt. Um zu gewährleisten, dass diese Standards absolut identisch sind, wurden sie vor Beginn dieser Studie in für den gesamten Versuch ausreichender Menge nach dem exakt gleichen Herstellungsverfahren gewonnen.

Eine weitere Fehlerquelle liegt in einer unvollständigen Blockierung oder Antikörper-Bindung auf der PVDF-Membran. Dazu wurde das Verfahren durch maximale Benetzung (luftblasenfreies Einschweißen in Plastiktüten und Inkubation auf der Schüttelmaschine) optimiert. Die anschließende chemilumineszenz-abhängige Detektion wird auch immer exakt gleich ausgeführt. Durch ein falsches Mischungsverhältnis der beiden Reagenzien könnte es ebenfalls zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen.

Um den Gesamtfehler möglichst gering zu halten, wird in der abschließenden Auswertung jede Probe dreimal immer von der gleichen Person ausgewertet und aus den Einzelwerten der Mittelwert gebildet.

4.1.8 Übertragungsmöglichkeiten auf den humanmedizinischen Bereich

Die cerebrale Durchblutung, insbesondere der Circulus arteriosus, ist bei der Ratte nahezu identisch wie beim Menschen ausgebildet; beide zeigen zudem mannigfache individuelle Variationen. So können die im Rattenmodell simulierten Bedingungen einer inkompletten cerebralen Ischämie weitgehend auf den Menschen übertragen werden.

Der neuroprotektive Effekt einer milden, über einen längeren Zeitraum durchgeführten Hypothermie ist schon lange bekannt. Jedoch wurden diese Untersuchungen noch nicht in einem langen Beobachtungszeitraum von bis zu 28 Tagen durchgeführt. Ziel ist es, ein Hypothermiemanagement zu finden, bei dem bei gleichzeitigem neuroprotektiven Effekt die zu erwartenden Nebenwirkungen auf ein Minimum reduziert werden. Diesbezüglich gibt es noch keine einheitlichen Standards über Dauer, Tiefe und Startpunkt der Hypothermie in Kombination mit dem Modus des Wiedererwärmens. Möglicherweise kann die vorliegende Studie zur Klärung dieser Fragen beitragen.

Die gewonnenen Ergebnisse dieser Studie müssen bezüglich ihrer Übertragbarkeit auf die humanmedizinische klinische Anwendung hinterfragt werden:

Bekanntermaßen gibt es bei den einzelnen unterschiedlichen Rattenstämmen große Variationen aufgrund der ischämischen Toleranz. Die verwendeten Versuchstiere sind jung und klinisch gesund. Im Gegensatz dazu erleidet ein Mensch einen Schlaganfall meist in höherem Alter, schlechterem Gesundheitszustand und mit komplizierenden Begleiterkrankungen, wie beispielsweise Diabetes oder Bluthochdruck. Ein weiterer wichtiger Punkt für die Schwierigkeit, die gewonnenen Ergebnisse für die klinische Anwendung zu übertragen, besteht darin, dass die Therapiemanagements möglicherweise im klinischen Alltag nicht präzise auf Basis der präklinischen erhobenen Daten durchgeführt werden (TRAYSTMAN 2003).

Im Gegensatz zum plötzlich auftretenden Schlaganfall, ist der Versuchsablauf in der vorliegenden Studie minutiös kontrolliert, so dass keine unkontrollierbaren Komplikationen auftreten können.

Deshalb müssen die gewonnenen Ergebnisse noch erweitert werden und weitere Fragestellungen in Folgestudien abgeklärt werden.

Abschlussbetrachtung und Ausblick

Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass durch die Hypothermiebehandlung ein neuroprotektiver Effekt im Modell der inkompletten cerebralen Hemisphären-Ischämie erzielt werden kann. Bei den Tieren dient ein künstlich ausgelöster transienter rechtsseitiger Gefäßverschluss unter gleichzeitiger Hypotension als Möglichkeit, die Auswirkungen des cerebralen Insults zu analysieren. Um etwaige Verfälschungen der Ergebnisse zu verhindern, werden alle Parameter während des kompletten Versuchsablauf streng kontrolliert und gegebenenfalls reguliert.

Als Möglichkeit, den apoptotischen cerebralen Schaden genau zu klassifizieren, wird die Menge der Apoptose-assoziierten Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 ermittelt und so auf das Schicksal der Zellen im ischämischen Bereich rückgeschlossen. Ein Nachweisverfahren stellt die Immunfluoreszenz-Färbung dar, mit deren Hilfe die exakte räumliche Verteilung und der Gehalt der einzelnen Zellen an diesen Proteinen ermittelt werden kann. Als zweites Nachweisverfahren wird eine Western-Blot-Analyse zur semiquantitativen Bestimmung der einzelnen Proteine durchgeführt. Als Probenmaterial dienen bestimmte Hirnregionen (CA1- und CA3-Region des Hippocampus und Gyrus dentatus), die sich zum Teil durch eine besonders hohe Vulnerabilität gegenüber einem ischämischen Insult auszeichnen, so dass schon kleinste Veränderungen erkannt werden können.

Als Arbeitshypothese wurde der Einfluss der Hypothermie auf die Expression der Apoptose-assoziierten Proteine nach inkompletter cerebraler Hemisphären-Ischämie bei der Ratte über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen angenommen.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, scheint sich der neuroprotektive Effekt der Hypothermie im Langzeiteffekt zu bestätigen. Sowohl in der Immunfluoreszenz-Färbung, als auch in der Western-Blot-Analyse kommt es zu einem Absinken des pro-apoptotischen Bax-Proteins und zu einem Ansteigen des anti-apoptotischen Bcl-2- und Mdm-2-Proteins über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen. Das pro-apoptotische p53-Protein hingegen steigt an.

In Folgestudien müssten noch weitere Aspekte, wie beispielsweise weniger vulnerable Hirnregionen, Simulation von multifaktoriellen Geschehen, beispielsweise Schädel-Hirn-Traumen an älteren, u.U. vorgeschädigten, Versuchstieren abgeklärt werden, um die Hypothermie als weitere Therapiemöglichkeit zu etablieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

"Einfluss der Hypothermie auf die Expression der Apoptose-assoziierten Proteine nach inkompletter cerebraler Hemisphären-Ischämie bei der Ratte über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen"

Die vorliegende Studie untersucht den Einfluss der Hypothermie auf die Expression der Apoptose-assoziierten Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 nach Induktion einer inkompletten cerebralen Hemisphären-Ischämie mit anschließender Reperfusion bei der Ratte über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen.

Als Versuchstiere dienen 72 männliche Sprague-Dawley Ratten, die unter Halothan anästhesiert, intubiert und mit 2 Vol % Isofluran und N₂O/O₂ (FiO₂=0,33) beatmet werden. Um eine arterielle Blutdruckmessung durchführen zu können und zur Blutentnahme und Applikation von Medikamenten katheterisiert man die rechte A. und V. femoralis und die rechte V. jugularis. Des Weiteren bringt man verschiedene Messsonden an, um einzelne physiologische Parameter genau zu dokumentieren (perikranielle Temperatur-messung, EKG, EEG, Messung der Hirndurchblutung). Nach Abschluss der Präparation werden die einzelnen Tiere randomisiert der Normothermie- (n=32), der Hypothermie-Gruppe (n=32) oder einer unbehandelten Nativ-Gruppe (n=8) zugewiesen. Als Ischämiemodell dient der rechtsseitige 45-minütige Verschluss der A. carotis communis unter gleichzeitiger Hypotension durch Blutentzug bis zur Absenkung des MAP auf 40 mmHg. Bei den Tieren der Hypothermie-Gruppe wird die perikranielle Temperatur durch Auflegen von Eisbeuteln innerhalb von 30 min auf 34 °C abgesenkt, hält für 1h die Tiere bei 34 °C und erwärmt sie anschließend innerhalb von 30 min wieder. Nach Ablauf des jeweiligen Beobachtungszeitraumes (1, 3, 7 oder 28 Tage) werden die Tiere getötet, das Gehirn entnommen, tiefgefroren und anschließend in Serie geschnitten oder für die Western-Blot-Analyse aufbereitet. Die Nativtiere tötet man ohne jegliche Manipulation unter Narkose, um für die anschließenden Analyseverfahren einen physiologischen Ausgangswert zu etablieren. Die Expression der Apoptose-assoziierten Proteine Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 wird durch die Immunfluoreszenz-Färbung (konfokale Lasermikroskopie) und Western-Blot-Analyse untersucht. Für das pro-apoptotische Bax-Protein konnte in der Hypothermie-Gruppe eine signifikante Verminderung bis zu Tag 7 (Immunfluoreszenz-Färbung) bzw. 28 (Western-Blot-Analyse, ischämische Hemisphäre) nachgewiesen werden. Für das p53-Protein zeigt sich nur in der Western-Blot-Analyse eine signifikante Erhöhung in der Hypothermie-Gruppe am Tag 1 auf der nicht-ischämischen Hemisphäre.

ZUSAMMENFASSUNG

Das anti-apoptotische Bcl-2-Protein der Hypothermie-Gruppe (Immunfluoreszenz-Färbung) steigt signifikant in beiden Hemisphären am Tag 1 und 3 an. In der Western-Blot-Analyse zeigt sich nur auf der ischämischen Hemisphäre ein Effekt in der Hypothermie-Gruppe: Hier steigt die Menge des Bcl-2-Protein am Tag 1 und Tag 28. Die Expression des anti-apoptotischen Mdm-2-Proteins steigt signifikant in der Immunfluoreszenz-Färbung in beiden Hemisphären am Tag 1 an. In der Western-Blot-Analyse kann nur in der nicht-ischämischen Hemisphäre am Tag 1 ein signifikanter Anstieg in der Hypothermie- im Vergleich zur Normothermie-Gruppe nachgewiesen werden. Zu den übrigen Untersuchungszeitpunkten zeigen sich dahingehend Tendenzen.

Die teilweise unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Analyseverfahren kann man durch die in der Probenaufbereitung begründeten unspezifischere Detektion der Western-Blot-Analyse im Vergleich zur Immunfluoreszenz-Färbung erklären.

Zusammenfassend kann diese Studie zeigen, dass auch im Langzeiteffekt das Ausmaß des neurologischen Schadens nach einer induzierten cerebralen Ischämie durch Absenkung der perikraniellen Temperatur reduziert werden kann. Um die genauen Wirkmechanismen der Hypothermie näher zu erforschen und so neue Ansätze im klinischen Alltag zur Therapie ischämischer Insulte zu etablieren, müssen noch weitere umfassende Untersuchungen durchgeführt werden.

6 SUMMARY

"The effect of hypothermia on the expression of the apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia in rats for a time period of 28 days "

This study investigates the effect of hypothermia on the expression of the apoptosis-regulating proteins Bax, p53, Bcl-2 and Mdm-2 after induction of incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats for a time period of 28 days. Seventy-two male Sprague-Dawley rats were anesthetized with halothane, intubated and ventilated with isoflurane and N₂O/O₂ (FiO₂=0,33). For measurement of mean arterial blood pressure, blood sampling and drug administration catheters were inserted into the right femoral artery and vein and into the right jugular vein. Sensors were inserted to control physiologic parameters (measurement of the pericranial temperature, EKG, EEG, cerebral blood flow). At the end of preparation animals were randomly assigned to the normothermic group (n=32), the hypothermic group (n=32) or a naïve animal group (n=8). Cerebral ischemia was induced by occlusion (45 min) of the right common carotid artery in combination with hemorrhagic hypotension to a mean arterial blood pressure of 40 mm Hg. In the hypothermic group pericranial temperature was decreased within 30 min to 34 °C by placing an ice bag on the rat. Hypothermia was maintained during a time period of 1 h followed by 30 min of rewarming.

After an observation period of 1, 3, 7 or 28 days the animals were killed and the brains were removed, frozen and cut into slices or prepared for Western-blot-analysis.

Native animals were killed without any manipulation in order to establish a physiological baseline. The expression of the apoptosis-regulating proteins Bax, p53, Bcl-2 and Mdm-2 was investigated with immunofluorescence staining (confocal laser scanning microscope) and Western-blot-analysis.

The concentration of the pro-apoptotic protein Bax was significantly reduced in the hypothermic group at day 7 (immunofluorescence staining) and day 28 (Western-blot-analysis, ischemic hemisphere). The amount of p53 showed a statistically significant increase in the hypothermic group at day 1 (non-ischemic hemisphere) in the Western-blot-analysis. The anti-apoptotic protein Bcl-2 increased statistically significant in the hypothermic group (immunofluorescence staining) in both hemispheres at day 1 and day 3. In the Western blot analysis only the ischemic hemisphere presented an effect in the hypothermic group: the amount of Bcl-2 increased significantly at day 1 and day 28.

The expression of the anti-apoptotic Mdm-2 increased significantly in both hemispheres (immunofluorescence staining) at day 1. The Western-blot-analysis showed only in the non-

SUMMARY

ischemic hemisphere on day 1 a significant increase of the hypothermic group versus the normothermic group. The other timepoints (day 3, 7 and 28) showed correlative tendencies. The partially non corresponding results of the analysis methods may be explained by the more unspecific detection of the Western-blot-analysis compared to the immunfluorescence staining. In conclusion this study shows, that hypothermia modulates apoptosis-related proteins towards neuroprotection after induced cerebral ischemia over a time period of 28 days. To investigate the exact mechanisms of hypothermia and to establish new clinical therapies of ischemic insults further investigations are required.

7 LITERATURVERZEICHNIS

ALMOG N, MILYAVSKY M, STAMBOLSKY P, FALCOVITZ A, GOLDFINGER N, ROTTER V (2001)

"The role of the C' terminus of murine p53 in the p53/mdm-2 regulatory loop".
Carcinogenesis 22: 779-785

ANDERSON RE, MEYER FB (2002)

"Protection of focal cerebral ischemia by alkalinization of systemic pH".
Neurosurgery 51: 1256-1266

ANDO S WAKI H, KON K (1993)

"Differential fatty acid release from CA1 and CA3 regions of rat hippocampal slices under hypoxia and hypoglycemia".
Neurosci Lett 151: 48-50

ANTONSSON B, MARTINOU JC (2000)

"The Bcl-2 protein family".
Exp Cell Res 256: 50-57

ASHCROFT M, VOUSDEN KH (1999)

"Regulation of p53 stability".
Oncogene 18: 7637-7643

ASTRUP J, SIESJÖ BK, SYMON L (1981)

"Thresholds in cerebral ischemia-the ischemic penumbra".
Stroke 12: 723-725

BENNINGHOFF A (1993)

"Anatomie: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen"
Band 2: Niere, Reproduktionsorgane, endokrine Drüsen, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut
15. Auflage, Verlag Urban & Schwarzenberg, München
219-627

BERNABEI AF, LEVISON MA, BENDER JS (1992)

"The effects of hypothermia and injury severity on blood loss during trauma laparotomy".
J Trauma 33: 835-839

BOSSENMEYER-POURIE C, LIEVRE V, GROJEAN S, KOZIEL V, PILLOT T, DAVAL JL (2002)

"Sequential expression patterns of apoptosis- and cell-cycle-related proteins in neuronal response to severe or mild transient hypoxia".
Neuroscience 114: 869-882

BRADFORD MM (1976)

"A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding".
Analyt biochem 72: 248-254

BRANDT L (1997)

”Illustrierte Geschichte der Anästhesie”

1. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
199

BUSTO R, DIETRICH WD, GLOBUS MY, VALDES I, SCHEINBERG P, GINSBERG MD (1987)

”Small differences in intraschemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury”.

J Cereb Blood Flow Metab 7: 729-738

BUSTO R, DIETRICH WD, GLOBUS MY, GINSBERG MD (1989)

”Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic neuronal injury”.

Neurosci Lett 101: 299-304

CAHILLY-SNYDER L, YANG-FENG T, FRANCKE U, GEORGE DL (1987)

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

Somat Cell Mol Genet 13: 235-244

CAO G, MINAMI M, PEI W, YAN C, CHEN D, O’HORO C, GRAHAM SH, CHEN J (2001)

”Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death”.

J Cereb Blood Flow Metab 21: 321-333

CHARRIAUT-MARLANGUE C, REMOLLEAU S, AGGOUN-ZOUAOU D, BEN-ARI Y (1998)

”Apoptosis and programmed cell death: a role in cerebral ischemia”.

Biomed Pharmacother 52: 264-269

CHEN ST, HSU CY, HOGAN EL, MARICQ H, BALENTINE JD (1986)

”A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction”.

Stroke 17: 738-743

CHEN J, LIN J, LEVINE AJ (1995)

”Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene”.

Mol Med 1: 142-152

CHOPP M, LI Y, ZHANG ZG, FREYTAG SO (1992)

”P53 expression in brain after middle cerebral artery occlusion in the rat”.

Biochem Biophys Res Commun 182: 1201-1207

CHUNG YH, SHIN CM, KIM MJ, LEE EY, KIM G, CHA CI (2002)

”Enhanced expression of p53 in reactive astrocytes following transient focal ischemia”.

Neurol Res 24: 324-328

CLARKE PGH (1990)

”Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms”.

Anat Embryol 181: 195-213

COX LS, LANE DP (1995)

"Tumor suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage".

Bioessays 17: 501-508

DAHME E, WEISS E (1999)

"Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere"

5. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

200

DIRNAGL U, MEISEL A (1999)

Handbuch der molekularen Medizin

Band 5: Erkrankungen des Zentralnervensystems

Springer Verlag, Berlin

510-533

DRAKE CG, JORY TA (1962)

"Hypothermia in the treatment of critical head injury".

Canad Med Ass J 87: 887-891

EBERSPÄCHER E (2001)

"Die Auswirkung von Hypothermie auf die Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen nach inkompletter cerebraler Ischämie bei der Ratte"

Vet Med Diss München

EBERSPÄCHER E, WERNER C, ENGELHARD K, PAPE M, GELB A, HUTZLER P, HENKE J, KOCHS E (2003)

"The effect of hypothermia on the expression of the apoptosis-regulating protein Bax after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats".

J Neurosurg Anesthesiol 15: 200-208

EKLÖF B, SIEJÖ BK (1972)

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

Acta Physiol Scand 86:155-165

FERCAKOVA A, VANICKY I, MARSALA M, MARSALA J (1995)

"Effect of prolonged hyperventilation on ischemic injury of neurons after global brain ischemia in the dog".

J Hirnforsch 36: 297-304

FIRBAS W, SINZINGER H, SCHLEMMER M (1973)

"Über den Circulus arteriosus bei Ratte, Maus und Goldhamster".

Anat Histol Embryol 2: 243-251

FROESCH BA, AIME-SEMPE C, LEBER B, ANDREWS D, REED JC (1999)

"Inhibition of p53 transcriptional activity by Bcl-2 requires its membrane-anchoring domain".

J Biol Chem 274: 6469-6475

LITERATURVERZEICHNIS

MCGAHAN L, HAKIM AM, ROBERTSON GS (1998)

"Hippocampal Myc and p53 expression following transient global ischemia".

Brain Res Mol Brain Res 56: 133-145

GARCIA JH (1984)

"Experimental ischemic stroke: A review".

Stroke 15: 5-14

GILLARDON F, LENZ C, WASCHKE KF, KRAJEWSKI S, REED JC, ZIMMERMANN M, KUSCHINSKY W (1996)

"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".

Brain Res Mol Brain Res: 254-260

GINSBERG MD, BUSTO R (1989)

"Rodent models of cerebral ischemia".

Stroke 20: 1627-1642

GINSBERG MD (2003)

"Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection".

Stroke 34: 214-223

GLOBUS MY, ALONSO O, DIETRICH WD, BUSTO R, GINSBERG MD (1995)

"Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia".

J Neurochem 65: 1704-1711

GROSS A, MCDONNELL JM, KORSMEYER SJ (1999)

"BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis".

Genes Dev 13: 1899-911

HAFFERL A (1957)

"Lehrbuch der topographischen Anatomie"

2. Auflage, Springer Verlag, Berlin

1-207

HARADA K, IWATA M, KONO N, SHIMONISHI T, NAKANUMA Y (2000)

"Distribution of apoptotic cells and expression of apoptosis-related proteins along the intrahepatic biliary tree in normal and non-biliary diseased liver".

Histopathol 37: 347-354

HARTMANN A, HUNOT S, MICHEL PP, MURIEL MP, VYAS S, FAUCHEUX BA, MOUATT-PRIGENT A, TURMEL H, SRINIVASAN A, RUBERG M, EVANGELISTI AGID Y, HIRCH EC (2000)

"Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease".

Proc Natl Acad Sci USA 97: 2875-2880

LITERATURVERZEICHNIS

- HOFFMAN WE, WERNER C, BAUGHMAN VL, THOMAS C, MILETICH DJ, ALBRECHT RF (1991)
"Postischemic treatment with hypothermia improves outcome from incomplete cerebral ischemia in rats".
J Neurosurg Anesthesiol 3: 34-38
- HUH PW, BELAYEV L, ZHAO W, KOCH S, BUSTO R, GINSBERG MD (2000)
"Comparative neuroprotective efficacy of prolonged moderate intraischemic and postischemic hypothermia in focal cerebral ischemia".
J Neurosurg 92: 91-99
- ITO U, SPATZ M, WALKER JT, KLATZO I (1975)
"Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations".
Acta Neuropathol 32: 209-223
- ITOH K, SUZUKI K, BISE K, ITOH H, MEHRAEIN, WEIS S (2001)
"Apoptosis in the basal ganglia of the developing human nervous system".
Acta Neuropathol 101: 92-100
- JACOB HJ, KWITEK AE (2002)
"Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome".
Nat Rev Genet 3: 33-42
- JEAN WC, SPELLMAN SR, NUSSBAUM ES, LOW WC (1998)
"Reperfusion injury after focal cerebral ischemia: the role of inflammation and the therapeutic horizon".
Neurosurgery 43: 1382-1396
- JENKINS LW, DEWITT DS, JOHNSTON W, DAVIS KL, PROUGH DS (2001)
"Intraischemic mild hypothermia increases hippocampal CA1 blood flow during forebrain ischemia".
Brain Res 890: 1-10
- JÜRGENSMEIER JM, XIE Z, DEVERAUX Q, ELLERBY L, BREDESEN D, REED JC (1998)
"Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria".
Proc Natl Acad Sci USA 95: 4997-5002
- KANEKO D, NAKAMURA N, OGAWA T (1985)
"Cerebral infarction in rats using homologous blood emboli: Development of a new experimental model."
Stroke 16:76-84
- KAPLAN H, MIEZEJESKI C (1972)
"Development of seizures in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*)".
J Com Physiol Psychol 81: 267-273

LITERATURVERZEICHNIS

- KARIBE H, ZAROW GJ, GRAHAM SH, WEINSTEIN PR (1994)
"Mild intranschemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats".
J Cereb Blood Flow Metab 14: 620-627
- KEMPSKI OS (1994)
"Neuroprotektion Modelle und Grundprinzipien".
Anaesthesist 43: 25-33
- KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR (1972)
"Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics".
Br J Cancer 26: 239-257
- KLUCK RM, BOSSY-WETZEL E, GREEN DR, NEWMAYER DD (1997)
"The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis".
Science 275: 1132-1136
- KOIZUMI JI, YOSHIDA Y, NAKAZAWA T, OONEDA G (1986)
"Experimental studies of ischaemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischaemic area".
Jap J Stroke 8: 1-8
- KOLLMAR R, SCHABITZ WR, HEILAND S, GEORGIADIS D, SCHELLINGER PD, BARDUTZKY J, SCHWAB S (2002)
"Neuroprotective effect of delayed moderate hypothermia after focal cerebral ischemia: an MRI study".
Stroke 33: 1899-1904
- KRAJEWSKI S, KRAJEWSKA M, SHABAIK A, MIYASHITA T, WANG, HG, REED JC (1994)
"Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of bcl-2".
Am J Pathol 145: 1323-1336
- KUBOYAMA K, SAFAR P, RADOVSKY A, TISHERMAN SA, STEZOSKI SW, ALEXANDER H (1993)
"Delay in cooling negates the beneficial effect of mild resuscitative cerebral hypothermia after cardiac arrest in dogs: a prospective, randomized study".
Crit Care Med 21: 1348-1358
- KUDO M, AOYAMA A, ICHIMORI S, FUKUNAGA N (1982)
"An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats."
Stroke 13:505-508
- LAEMMLI UK (1970)
"Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4".
Nature 227: 680-685

LEVINE S, SOHN D (1969)

"Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. Relation to incomplete circle of Willis".
Arch Pathol 87: 315-317

LI Y, CHOPP M, ZHANG ZG, ZALOGA C, NIEWENHUIS L, GAUTAM S (1994)
"p53-immunoreactive protein and p53 mRNA expression after transient middle cerebral
artery occlusion in rats".

Stroke 25: 849-855

LI Y, POWERS C, JIANG N, CHOPP M (1998)

"Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat."

J Neurol Sci 156:119-132

LIEBMANN M, SCHÜNKE M, SCHÜNKE G (1993)

Blutversorgung des Gehirns, Basiswissen Neuroanatomie

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

113-117

LUTZ RJ (2000)

"Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related
proteins".

Biochem Soc Trans 28: 51-56

LYTHGOE M, SIBSON N, HARRIS NG (2003)

"Neuroimaging of animal models of brain disease".

Br Med Bull 65: 235-257

MACRAE MI (1992)

"New models of focal cerebral ischemia".

Br J Clin Pharmacol 34: 302-308

MAIER CM, SUN GH, KUNIS D, YENARI MA, STEINBERG GK (2001)

"Delayed induction and long-term effects of mild hypothermia in a focal model of transient
cerebral ischemia: neurological outcome and infarct size".

J Neurosurg 94: 90-96

MARION DW, OBRIST WD, CARLIER PM, PENROD LE, DARBY JM (1993)

"The use of moderate therapeutic hypothermia for patients with severe head injuries: a
preliminary report".

J Neurosurg 79: 354-362

MATSUMOTO K, LO EH, PIERCE AR, HALPERN EF, NEWCOMB R (1996)

"Secondary elevation of extracellular neurotransmitter amino acids in the reperfusion phase
following focal cerebral ischemia".

J Cereb Blood Flow Metab 16: 114-124

MAYO LD, TURCHI JJ, BERBERICH SJ (1997)

"Mdm-2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53".

Cancer Res 57: 5013-5016

LITERATURVERZEICHNIS

- MINAMI M, JIN KL, LI W, NAGAYAMA T, HENSHALL DC, SIMON RP (2000)
"Bcl-w expression is increased in brain regions affected by focal cerebral ischemia in the rat."
Neurosci Lett 279: 193-195
- MIYASHITA T, REED JC (1995)
"Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene".
Cell 80: 293-299
- MIYAZAWA T, TAMURA A, FUKUI S, HOSSMANN KA (2003)
"Effect of mild hypothermia on focal cerebral ischemia. Review of experimental studies".
Neurol Res 25: 457-464
- MONAGHAN P, ROBERTSON D, AMOS TA, DYER MJ, MASON DY, GREAVES MF (1992)
"Ultrastructural localization of bcl-2 protein".
J Histochem Cytochem 40: 1819-1825
- MORIKAWA E, GINSBERG MD, DIETRICH WD, DUNCAN RC, KRAYDIEH S, GLOBUS MY, BUSTO R (1992)
"The significance of brain temperature in focal cerebral ischemia: histopathological consequences of middle cerebral artery occlusion in the rat".
J Cereb Blood Flow Metab 12: 380-389
- NEMOTO EM, KLEMENTAVICIUS R, MELICK JA, YONAS H (1996)
"Suppression of cerebral metabolic rate for oxygen (CMRO₂) by mild hypothermia compared with thiopental".
J Neurosurg Anesth 8: 52-59
- NICKEL R, SCHUMMER A, SEIFERLE E (1991)
"Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Band 4, Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen"
3. Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg
74-199
- OKADA M (1984)
"The cardiac rhythm in accidental hypothermia".
J Electrocardiol 17: 123-128
- OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ (1993)
"Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death".
Cell 74: 609-619
- OPFERMAN JT, KORSMEYER SJ (2003)
"Apoptosis in the development and maintenance of the immune system".
Nat Immunol 4: 410-415
- OREN RE, RASOOL NA, RUBINSTEIN EH (1987)
"Effect of ketamine on cerebral cortical blood flow and metabolism in rabbits".
Stroke 18: 441-444

PADOSCH SA, VOGEL P, BÖTTIGER BW (2001)

"Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie - Grundlagen, Pathophysiologie und Interventionsmöglichkeiten".

Anaesthesist 50: 905-920

PAPAKYRIAKOU P, TZARDI M, VALATAS V, KANAVAROS P, KARYDI E, NOTAS G, XIDAKIS C, KOUROUMALIS E (2002)

"Apoptosis and apoptosis related proteins in chronic viral liver disease".

Apoptosis 7: 133-141

PAXINOS G, WATSON C (1998)

"The Rat Brain in stereotaxic coordinates".

San Diego, Academic Press, CA USA

4. Auflage, Paxinos, G.,

New York

PINTON P, FERRARI D, MAGALHAES P, SCHULZE-OSTHOFF K, DI VIRGILIO F, POZZAN T, RIZZUTO R (2000)

"Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells".

J Cell Biol 148: 857-862

PRAKASA BB, YOSHIDA Y, SU M, SEGURA M, KAWAMURA S, YASUI N (2000)

"Immunohistochemical expression of Bcl-2, Bax and cytochrome c following focal cerebral ischemia and effect of hypothermia in rat".

Neurosci Lett 291: 196-200

PULSINELLI WA, BRIERLEY JB (1979)

"A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat".

Stroke 10: 267-272

RIEDE UN, SCHAEFER HE (1995)

"Allgemeine und spezielle Pathologie, Letale Zellschädigung".

4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

135-144

ROSOMOFF HL (1959)

"Experimental brain injury during hypothermia".

J Neurosurg 16: 177-187

SAITO I, SEGAWA H, SHIOKAWA Y, TANIGUCHI M, TSUTSUMI K (1987)

"Middle cerebral artery occlusion: correlation of computed tomography and angiography with clinical outcome".

Stroke 18: 863-868

SCHUBERT A (1992)

"Should mild hypothermia be routinely used for human cerebral protection? The flip side".

J Neurosurg Anesth 4: 216-220

SCHUBERT A (1995)

"Side effects of mild hypothermia".

J Neurosurg Anesth 7: 139-147

SCHWEICHEL JU, MERKER HJ (1973)

"The morphology of various types of cell death in prenatal tissues".

Teratology 7: 253-266

SCORRANO L, KORSMEYER SJ (2003)

"Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic Bcl-2 family members".

Biochem Biophys Res Commun 304: 437-444

SEDZIMIR CB (1959)

"Therapeutic hypothermia in cases of head injury".

J Neurosurg 16: 407-414

SHARKEY J, RITCHIE IM, KELLY PA (1993)

"Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat".

J Cereb Blood Flow Metab 13: 865-871

SHARP PE, LAREGINA MC (1998)

"The laboratory rat"

Boca Raton, Boston, CRC Press LLC,
10-17

SHIOZAKI T, SUGIMOTO H, TANEDA M, YOSHIDA H, IWAI A, YOSHIOKA T,
SUGIMOTO T (1993)

"Effect of mild hypothermia on uncontrollable intracranial hypertension after severe head injury".

J Neurosurg 79: 363-368

SHIRANE R, SHIMIZU H, KAMEYAMA M, WEINSTEIN PR (1991)

"A new method for producing temporary complete cerebral ischemia in rats".

J Cereb Blood Flow Metab 11: 949-956

SIESJÖ BK (1992)

"Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia; Part I: Pathophysiology".

J Neurosurg 77: 169-184

SIONOV RV, HAUPT Y (1999)

"The cellular response to p53: the decision between life and death".

Oncogene 18: 6145-6157

STEEN PA, SOULE EH, MICHENFELDER JD (1979)

"Detrimental effect of prolonged hypothermia in cats and monkeys with and without regional cerebral ischemia".

Stroke 10: 522-529

LITERATURVERZEICHNIS

STEEN PA, MILDE JH, MICHENFELDER JD (1980)

"The detrimental effects of prolonged hypothermia and rewarming in the dog".
Anesthesiology 52: 224-230

STRASSER U, FISCHER G (1995)

"Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation".
J Neurosci Methods 57: 177-186

STRYER L (1996)

"Biochemie".
4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
507-533

TAMURA A, GRAHAM DI, MCCULLOCH J, TEASDALE GM (1981)

"Focal cerebral ischaemia in the rat: 1.: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion".
J. Cereb Blood Flow Metab 1: 53-60

TRAYSTMAN RJ (2003)

"Animal models of focal and global cerebral ischemia."
ILAR Journal 44:85-95

TSUJIMOTO Y, COSSMAN J, JAFFE E, CROCE CM (1985)

"Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma".
Science 228: 1440-1443

TSUJIMOTO Y (2003)

"Cell death regulation by the bcl-2 protein family in the mitochondria".
J cell physiol 195: 158-167

TU Y, HOU ST, HUANG Z, ROBERTSON GS, MACMANUS JP (1998)

"Increased mdm2 expression in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion".
J Cereb Blood Flow Metab 18: 658-669

VALERI CR, FEINGOLD H, CASSIDY G, RAGNO G, KHURI S, ALTSCHULE MD (1987)

"Hypothermia-induced reversible platelet dysfunction".
Ann Surg 205: 175-181

VANICKY I, MARSALA M, MURAR J, MARSALA J (1992)

"Prolonged postischemic hyperventilation reduces acute neuronal damage after 15 min of cardiac arrest in the dog".
Neurosci Lett 135: 167-170

VOGELSTEIN B, LANE D, LEVINE AJ (2000)

"Surfing the p53 network".
Nature 408: 307-310

LITERATURVERZEICHNIS

- WANG GX, LI GR, WANG YD, YANG TS, OUYANG YB (2001)
"Characterization of neuronal cell death in normal and diabetic rats following experimental focal cerebral ischemia".
Life Sci 69: 2801-2810
- WATSON BD, DIETRICH WD, BUSTO R, WACHTEL MS, GINSBERG MD (1985)
"Induction of reproducible brain infarction by phytochemically initiated thrombosis".
Ann Neurol 17: 497-504
- WEINRAUCH V, SAFAR P, TISHERMAN S, KUBOYAMA K, RADOVSKY A (1992)
"Beneficial effect of mild hypothermia and detrimental effect of deep hypothermia after cardiac arrest in dogs."
Stroke 23: 1454-1462
- WERNER C (1997)
"Milde und moderate Hypothermie in der Anästhesie und Intensivmedizin - Neuroprotektive Ansätze".
Refresher Course; Aktuelles Wissen für den Anästhesisten, Springer-Verlag, Hamburg
189-197
- WERNER C (2000)
" Neuroanaesthesie - Neuroprotektion".
Thieme Verlag, Stuttgart
121-142
- WESTERMEIER R (1997)
"Electrophoresis in practice; a guide to methods and applications of DNA and protein separations"
2. Auflage, VCH, Weinheim
175ff
- WIDMANN R, MIYAZAWA T, HOSSMANN KA (1993)
"Protective effect of hypothermia on hippocampal injury after 30 minutes of forebrain ischemia in rats is mediated by postischemic recovery of protein synthesis".
J Neurochem 61: 200-209
- WILDE GJ, PRINGLE AK, WRIGHT P, IANNOTTI F (1997)
"Differential vulnerability of the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus to superoxide and hydroxyl radicals in vitro".
J Neurochem 69: 883-886
- WYLLIE AH, KERR JFR, CURRIE AR (1972)
"Cell death: the significance of apoptosis".
International Review of Cytology 68: 251-306
- YANAMOTO H, NAGATA I, NAKAHARA I, TOHNAI N, ZHANG Z, KIKUCHI H (1999)
"Combination of intransischemic and postischemic hypothermia provides potent and persistent neuroprotection against temporary focal ischemia in rats".
Stroke 30: 2720-2726

LITERATURVERZEICHNIS

YANG E, KORSMEYER SJ (1996)

"Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death".

Blood 88: 386-401

YENARI MA, ZHAO H, GIFFARD RG, SOBEL RA, SAPOLSKY RM, STEINBERG GK (2003)

"Gene therapy and hypothermia for stroke treatment".

Ann N Y Acad Sci 993: 54-68

YUAN J (1996)

"Evolutionary conservation of a genetic pathway of programmed cell death".

J Cell Biochem 60: 4-11

ZHANG RL, CHOPP M, CHEN H, GARCIA JH, ZHANG ZG (1993)

"Postischemic (1 hour) hypothermia significantly reduces ischemic cell damage in rats subjected to 2 hours of middle cerebral artery occlusion".

Stroke 24: 1235-1240

ZHANG Y, WONG KC, ZHANG Z (2001)

"The effect of intraischemic mild hypothermia on focal cerebral ischemia/reperfusion injury".

Acta Anaesthesiol Sin 39: 65-69

ZHAO H, YENARI MA, CHENG D, SAPOLSKY RM, STEINBERG GK (2003)

"Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity".

J Neurochem 85: 1026-1036

ZHI D, ZHANG S, LIN X (2003)

"Study on therapeutic mechanism and clinical effect of mild hypothermia in patients with severe head injury".

Surg Neurol 59: 381-385

8 TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1</i>	<i>Darstellung der Versuchstiergruppen mit Intervention und Überlebenszeit</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 2</i>	<i>Übersicht über die während des operativen Abschnitts erhobenen Parameter mit Darstellung des Referenzbereiches (SHARP und LA REGINA 1998)</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 3</i>	<i>Physiologische Parameter während des operativen Abschnitts der Normothermie- und Hypothermie-Gruppe.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabelle 4</i>	<i>Ergebnisse der mit LDF-Messung ermittelten Hirndurchblutung.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabelle 5</i>	<i>Darstellung der Immunfluoreszenz-Intensität des Bax-Proteins</i>	<i>73</i>
<i>Tabelle 6</i>	<i>Darstellung der Immunfluoreszenz-Intensität des p53-Proteins.....</i>	<i>75</i>
<i>Tabelle 7</i>	<i>Darstellung der Immunfluoreszenz-Intensität des Bcl-2-Proteins.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabelle 8</i>	<i>Darstellung der Immunfluoreszenz-Intensität des Mdm-2-Proteins</i>	<i>79</i>
<i>Tabelle 9</i>	<i>Darstellung der Schwärzungsintensität des Bax-Proteins in der Western-Blot-Analyse</i>	<i>83</i>
<i>Tabelle 10</i>	<i>Darstellung der Schwärzungsintensität des p53-Proteins in der Western-Blot-Analyse</i>	<i>86</i>
<i>Tabelle 11</i>	<i>Darstellung der Schwärzungsintensität des Bcl-2-Proteins in der Western-Blot-Analyse</i>	<i>88</i>
<i>Tabelle 12</i>	<i>Darstellung der Schwärzungsintensität des Mdm-2-Proteins in der Western-Blot-Analyse.....</i>	<i>90</i>
<i>Tabelle 13</i>	<i>Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von Immunfluoreszenz-Färbung und Western-Blot-Analyse der Hypothermie-Gruppe im Vergleich zur Normothermie-Gruppe.....</i>	<i>92</i>
<i>Tabelle 14</i>	<i>Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von Immunfluoreszenz-Färbung und Western-Blot-Analyse der ischämischen Hemisphäre im Vergleich zur nicht-ischämischen Hemisphäre</i>	<i>93</i>

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Schematische Darstellung des Circulus arteriosus von Ratten (A-G) und des Menschen (H) (modifiziert nach (HAFFERL 1957) und (FIRBAS et al. 1973)) 6

Abbildung 2 Hirnschnitt einer Ratte mit Hippocampusformation und Gyrus dentatus..... 8

Abbildung 3 Übersicht über ausgewählte Tiermodelle der cerebralen Ischämie 15

Abbildung 4 Schematische Darstellung der anti- und pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie (modifiziert nach GROSS et al. 1999) 22

Abbildung 5 Darstellung der mit einem Gummiband locker fixierten A. carotis communis dextra und eines Katheters in der V. jugularis einer intubierten Ratte in Rückenlage..... 36

Abbildung 6 Versuchsaufbau während der Ischämie-Phase 38

Abbildung 9 Darstellung des Prinzips der indirekten Immunfluoreszenz-Technik 44

Abbildung 10 Übersichtsbild über die auszuwertenden Regionen mit den eingezeichneten sechs Scan-Positionen..... 48

Abbildung 11 Schematische Darstellung des prinzipiellen Strahlengangs eines konfokalen Laserscan Mikroskops..... 50

Abbildung 12 Schematische Darstellung der Hauptschritte der Western-Blot-Analyse 57

Abbildung 13 Vergleichende grafische Darstellung der Hirndurchblutung 71

Abbildung 14 Grafische Darstellung der Immunfluoreszenz des Bax-Proteins 74

Abbildung 15 Grafische Darstellung der Immunfluoreszenz des p53-Proteins 76

Abbildung 16 Grafische Darstellung der Immunfluoreszenz des Bcl-2-Proteins..... 78

Abbildung 17 Grafische Darstellung der Immunfluoreszenz des Mdm-2-Proteins..... 80

Abbildung 18 Immunfluoreszenzfärbungen des Mdm-2-Proteins..... 81

Abbildung 19 Grafische Darstellung der Schwärzungsintensitäten des Bax-Proteins 84

Abbildung 20 Darstellung eines Ausschnittes des Bax-Proteins (Western-Blot-Analyse) 85

Abbildung 21 Grafische Darstellung der Schwärzungsintensitäten des p53-Proteins..... 87

Abbildung 22 Grafische Darstellung der Schwärzungsintensitäten des Bcl-2-Proteins 89

Abbildung 23 Grafische Darstellung der Schwärzungsintensitäten des Mdm-2-Proteins 91

10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS
45 Isch	Messung nach 45 min in der Ischämie -Phase
15 Rep	Messung nach 15 min in der Reperfusion s-Phase
45 Rec	Messung nach 45 min in der Erholungs-Phase (englisch: recovery)
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
2-VO	englisch: two vessel occlusion
4-VO	englisch: four vessel occlusion
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BE	englisch: base excess , Bassenüberschuss
BH3-Domäne	Bcl-2 Homologe 3-Domäne
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
CCD-Kamera	englisch: Charged-Coupled Device
CLSM	englisch: Confocal Laser Scanning Microscope , konfokales Laserscan Mikroskop)
CO ₂	Kohlendioxid
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
d	englisch: day , Tag
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	lat: et alii ; und Mitarbeiter
Fa.	Firma
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälber-Serum
g	Gramm
GD	Gyrus dentatus

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Glc	G lucose
h	Stunde
Hb	H ämoglobin
HCL	Salzsäure
HF	H erzfrequenz
Isch	I schämie
i.v.	intravenös
KGW	K örpergewicht
kD	K ilo D alton
kg	K ilogramm
l	L iter
LDF	L aser- D oppler- F luss
MAP	englisch: m ean a rterial p ressure, mittlerer arterieller Blutdruck
MCA	englisch: m iddle c erebral a rtery, A. cerebri media
MCAO	englisch: m iddle c erebral a rtery o ccclusion, Okklusion der A. cerebri media
mA	M illi A mpere
mg	M illigramm
min	M inute
mM	m illimolar
ml	M illiliter
mmHg	M illimeter Quecksilbersäule
mW	M illi W att
M.	M usculus
MW	M ittelwert
n	Anzahl
NaCl	N atriumchlorid
N-Terminus	Amino-Terminus
N ₂ O	Lachgas
Na	N atrium
O ₂	Sauerstoff
o.g.	o ben g enannt
OT	O bjektträger
p	Irrtumswahrscheinlichkeit

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

paCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
paO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	englisch: phosphored buffered sodium , gepuffertes Natriumphosphat
PBST	gepuffertes Natriumphosphat mit Tween
PU	englisch: perfusion units , Perfusionseinheiten
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rep	Reperfusion
Rec	englisch: recovery , Erholungs-Phase
SD	Standardabweichung
SDS	englisch: Sodium dodecyl sulfate , Natriumlaurylsuflat
STD	Standard
sog.	sogenannte
Tab.	Tabelle
Tpkran	perikranielle Temperatur
u.U.	unter Umständen
V.	Vena
Vgl.	Vergleich
Vol %	Volumen %
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 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.

Des Weiteren bedanke ich mich sehr herzlich 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.

Vielen Dank an Herrn Dr. rer. nat Peter Hutzler, Herrn Ernst Mannweiler und Herrn Andreas Voss vom Institut für Pathologie der GSF München für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die freundliche und geduldige Hilfe im Umgang mit dem konfokalen Laserscan Mikroskop und bei der anschließenden Auswertung.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Doris Droese, Herrn Sepp Straßmair und Frau Anne Frye für ihre große Hilfe bedanken. Mein Dank gilt zugleich den Kolleginnen und Kollegen des Labors Gebäude 522.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Herbert Singer, Frau Inge Widmann und Herrn Prof. Essler für die Korrekturen und aufschlussreichen Diskussionen.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinem Freund Markus Singer für seine unermüdliche Unterstützung, Geduld und Hilfe bei allen auftauchenden Problemen.

Meiner Familie gilt ein besonderer Dank für die hervorragende Unterstützung und Begleitung auf meinem Lebensweg.

9 LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Lién-Yvonne Laacke
Geburtsdatum und -ort: 20.06.1975 in Erlangen
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Konfession: Evangelisch
Vater: Dr. med Robert Laacke
Mutter: Dr. med Hai Len Yvonne Laacke, geb. Ulbrich
verstorben 1995
Geschwister: Sung Laacke
Alexander Laacke, verstorben 1989

Schulbildung:

1981-1995
Grundschule und Gymnasium
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Endnote: 1,7

Studium:

Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München von November 1995 bis Dezember 2001 mit der Abschlussnote: 2,16

mit folgenden Praktika:

02.08.1999-16.09. 1999	Praktikum in der Kleintierpraxis Dr. Ulf Pauling, Ingolstadt
01.05. 1999-01.12.2000	Famulatur in der 1. Medizinischen Tierklinik (Kleintiere), München
15.05.2000-07.07.2000	Praktikum in der Klinik Penmellyn Veterinary Group, Cornwall, England
14.07.2000-27.08.2000	Praktikum am Institut für Geflügelkrankheiten, Oberschleißheim
01.09.2000-15.10.2000	Praktikum am Schlachthof, Ingolstadt
31.03.2001-01.05.2001	Praktikum in der 1. Medizinischen Tierklinik (Kleintiere), München

Beruflicher Werdegang

Wissenschaftliche Mitarbeit: Bereich Dokumentationstätigkeiten Januar-Oktober 2002

Teilnahme am 10. TIZ-Bifo-Kurs vom 16.09.2002-27.09.2002

Seit Oktober 2002 Anstellung im operativ-experimentellen Bereich bei dem Biotechnologie-Unternehmen ProCorde in Martinsried (bei München)