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

Angefertigt 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)

Die Auswirkung von Propofol auf die Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen nach inkompletter cerebraler Hemisphärenischämie im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen bei der Ratte

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

von
Uta Stegemann
aus
Recklinghausen

München, 2004

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

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

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

In memoriam
meinem Vater
Dr. med. Stegemann

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1

2 Schrifttum ... 2
2.1 Gehirn ... 2
2.1.1 Anatomie ... 2
2.1.2 Hippocampus ... 2
2.1.3 Stoffwechsel ... 3
2.1.4 Blutversorgung ... 4
2.2 Ischämie ... 6
2.2.1 Cerebrale Ischämie ... 6
2.2.2 Ischämie-Formen ... 6
2.2.3 Modelle der cerebralen Ischämie ... 6
2.3 Zelltod ... 9
2.3.1 Nekrose ... 10
2.3.2 Apoptose ... 11
2.3.3 Apoptose-assoziierte Proteine ... 13
2.3.3.1 Bcl-2-Protein ... 13
2.3.3.2 Mdm-2-Protein ... 15
2.3.3.3 Bax-Protein ... 16
2.3.3.4 p53-Protein ... 16
2.4 Propofol ... 18
2.4.1 Allgemeine Information ... 18
2.4.2 Pharmakodynamik ... 18
2.4.3 Pharmakokinetik ... 19
2.4.4 Nebenwirkungen ... 19
2.4.5 Neuroprotektive Wirkung ... 19

3 Eigene Untersuchungen ... 21
3.1 Zielvorstellungen ... 21
3.2 Material und Methoden ... 22
3.2.1 Versuchstiere ... 22
3.2.2 Versuchsplan ... 22
3.2.3 Narkoseeinleitung ... 25
3.2.4 Präparation der Gefäße ... 25
3.2.5 Aufrechterhalten der Anästhesie während der Ischämie ... 26
3.2.6 Parameter der Narkoseüberwachung ... 27
3.2.6.1 Temperaturmessung ... 27
3.2.6.2 Blutdruckmessung ... 27
3.2.6.3 Elektrokardiogramm ... 27
3.2.6.4 Elektroenzephalogramm ... 27
3.2.6.5 Atemgasmessung ... 28
3.2.6.6 Blutgasanalyse ... 28
3.2.6.7 Blutglucosemessung ... 28
3.2.7 Versuchsdurchführung ... 28
3.2.7.1 Äquilibrierung ... 28
3.2.7.2 Hypoperfusion ... 28
3.2.7.3 Ischämie ... 28

3.2.7.4 Reinfusion/Reperfusion ... 29
3.2.7.5 Erholungsphase ... 29
3.2.8 Vorbereitung der Analyseverfahren ... 30
3.2.8.1 Hirnentnahme ... 30
3.2.8.2 Anfertigung der Hirnschnitte ... 30
3.2.8.3 Western-Blot Probenaufbereitung ... 31
3.2.9 Immunfluoreszenz-Färbung ... 33
3.2.9.1 Dokumentation am konfokalen Laserscan-Mikroskop ... 36
3.2.9.2 Auswertung ... 38
3.2.10 Western-Blot-Analyse ... 39
3.2.10.1 Gel-Herstellung ... 39
3.2.10.2 Bestückung der Gele und Elektrophorese ... 39
3.2.10.3 Proteintransfer ... 40
3.2.10.4 Immunoblot ... 42
3.2.10.5 Entwicklung und Dokumentation mit Hilfe der Image Station ... 43
3.2.10.6 Auswertung ... 43
3.2.11 Antikörper, Chemikalien, Lösungen , Geräte und Verbrauchsmaterial ... 44
3.2.12 Statistische Bewertung ... 52
3.3 Ergebnisse ... 53
3.3.1 Gemessene Versuchsparameter ... 53
3.3.2 Detektierte Apoptose Proteine Bcl-2, Mdm-2, Bax und p53 ... 56
3.3.2.1 Immunfluoreszenz-Färbung ... 56
3.3.2.2 Western-Blot-Analyse ... 69

4 Diskussion ... 79
4.1 Diskussion der Methoden ... 79
4.1.1 Ischämiemodell ... 79
4.1.2 Räumliche und semiquantitative Darstellung der Proteine mit Immunfluoreszenz-Färbung ... 80
4.1.3 Semiquantitative Analyse der Proteine mit Western-Blot-Analyse ... 81
4.2 Diskussion der Ergebnisse ... 83
4.2.1 Gemessene Parameter ... 83
4.2.2 Immunfluoreszenz-Färbung ... 86
4.2.3 Western-Blot-Analyse ... 91
4.3 Abschlussbetrachtung ... 93

5 Zusammenfassung ... 94

6 Summary ... 96

7 Literaturverzeichnis ... 98

8 Tabellenverzeichnis ... 108

9 Abbildungsverzeichnis ... 109

10 Abkürzungsverzeichnis ... 110

11 Danksagung ... 113

12 Lebenslauf ... 114

1 EINLEITUNG

Die cerebrale Ischämie stellt in den westlichen Ländern die häufigste neurologische Ursache einer Invalidität dar. Pro Jahr sterben daran laut Schätzungen des Statistischen Bundesamtes ca. 150.000 bis 200.000 Menschen in Deutschland. Die cerebrale Ischämie hat eine Inzidenz von 250 Personen pro 100.000 Einwohner. Bezogen auf das Lebensalter leiden mindestens 5% der 65-Jährigen an Durchblutungsstörungen des Gehirns. Bei den 75-Jährigen sind mehr als 10 % und bei den über 85-Jährigen mehr als 20 % betroffen. Als Folge kann eine lebenslange Pflegebedürftigkeit auftreten. Die Behandlung der Patienten verursacht enorme wirtschaftliche Kosten. Laut Schätzungen des Statistischen Bundesamtes Deutschland lagen die direkten Kosten zur Behandlung cerebrovaskulärer Erkrankungen 1994 bei knapp 12,2 Milliarden DM. Davon entfielen 8,9 Milliarden DM auf die stationäre Versorgung. Cerebrovaskuläre Erkrankungen sind somit nach Krebs und ischämischen Herzkrankheiten die dritthäufigste Todesursache. Die Sterblichkeit nach einer cerebralen Ischämie ist, nicht wie bei den akuten Herzinfarkten, in den ersten Tagen niedrig. Allerdings sterben innerhalb des ersten Monats je nach Alter und Schwere des Infarktes 5 bis 25 % der Patienten. Eine schnellstmögliche adäquate Versorgung ist deshalb für das Überleben und auch für die Lebensqualität von entscheidender Bedeutung.

Verschiedenste Therapieansätze zur Behandlung der Folgen einer cerebralen Ischämie, beruhend auf physikalischen und pharmakologischen Maßnahmen, werden derzeit erforscht. Der programmierte (apoptotische) Zelltod bietet ein breites Fenster für therapeutische Ansätze. So zeigten EBERSPÄCHER et al. (2003) in ihrer Studie den neuroprotektiven Einfluss einer moderaten Hypothermie auf das Apoptose-assoziierte Protein Bax nach inkompletter cerebraler Ischämie bei der Ratte. Aber auch Anästhetika, wie z.B. Sevofluran und Propofol, sind in der Lage, das neurologische Endergebnis nach einer cerebralen Ischämie und Reperfusion zu verbessern (KOCHS et al. 1992; ENGELHARD et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit wird im Tiermodell der Einfluss von Propofol auf die Expression Apoptose-assoziierter Proteine Bcl-2, Mdm-2, Bax und p53 nach einer inkompletten cerebralen Ischämie mit Reperfusion bei der Ratte qualitativ und quantitativ über einen Zeitraum von 28 Tagen untersucht.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Gehirn

In den folgenden Kapiteln werden die Anatomie, die Blutversorgung und der Stoffwechsel des Gehirns beschrieben. Das Rattengehirn gleicht im Aufbau und in der Funktion (siehe Kapitel 2.1.1 bis 2.1.4) weitgehend dem menschlichen Gehirn (NICKEL et al. 1991; LEE 1995).

2.1.1 Anatomie

Als Bestandteil des Zentralnervensystems gliedert sich das Gehirn in das Rautenhirn (Rhombencephalon), das sich aufteilt in das Nachhirn (Myelencephalon) und das Hinterhirn (Metencephalon), das Mittelhirn (Mesencephalon), das Zwischenhirn (Diencephalon) und das Endhirn (Telencephalon). Es ist umschlossen von drei Hirnhäuten (Meninges), der äußeren harten Hirnhaut (Dura Mater) und den inneren weichen Häuten (Arachnoidea und Pia Mater). Geschützt wird das Gehirn durch die solide Knochenkapsel des Hirnschädels (NICKEL et al. 1991).

2.1.2 Hippocampus

Die Hippocampusformation ist Bestandteil des Endhirns und teilt sich auf in den Hippocampus oder das Ammonshorn, den Gyrus parahippocampalis, den Gyrus dentatus, die Fimbria hippocampi und den Fornix (NICKEL et al. 1991). Der Hippocampus wird dem limbischen System zugerechnet und hat Verbindungen mit dem Riechhirn. Er bildet sich in seiner embryologischen Entwicklung aus dem Archicortex, der mit dem Palaeocortex den Allocortex darstellt. Der Archicortex bildet sich auf der dorsomedialen Seite der Hemisphärenwand, verdickt sich und rollt sich als Hippocampusformation ein. Dabei entsteht eine Rinne (Sulcus hippocampi), die den Gyrus parahippocampalis vom Gyrus dentatus trennt. Mit der Ausweitung des Endhirns wird der Hippocampus in den Temporallappen verlagert (RÜSSE und SINOWATZ 1991). Die äußere glatte Oberfläche wird nach Eröffnen des Seitenventrikels sichtbar. Die Innenseite wird von einer dünnen Markschicht, dem Muldenblatt (Alveus), überzogen. Der mediale Rand der Marklamelle geht in feine Fransen, die Fimbria hippocampi, über. Zwischen dem Sulcus hippocampi und den Fimbria liegt der Gyrus dentatus dem Hippocampus kappenartig auf und dient insbesondere der Ausbreitung der ihm zuströmenden Erregung in der Hippocampusformation (NICKEL et al. 1991). Die Formation lässt sich in die CA1-, CA2-, CA3- und die CA4-Region einteilen, die sich zwischen den oberen und unteren Ast des Gyrus dentatus schiebt (siehe Abb. 1).

Die CA1-Region spielt in der Erforschung der cerebralen Ischämie eine zentrale Rolle, da die Zellen dieser Region sehr sensibel auf schädliche Einflüsse wie z.B. Sauerstoff- oder Energiemangel reagieren. Diese Region weist als eine der ersten schon nach geringen ischämischen Schäden Veränderungen auf (PULSINELLI 1985).

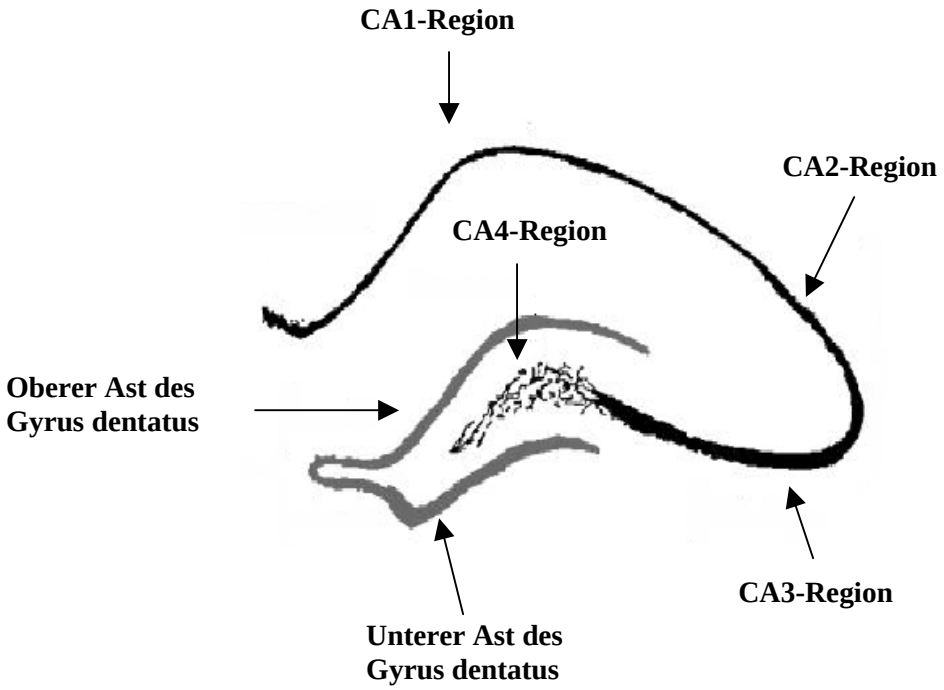


Abb. 1 Hippocampusformation mit den Ästen des Gyrus dentatus

2.1.3 Stoffwechsel

Das Gewicht des Gehirns macht beim Menschen nur 2% des Körpergewichtes aus, es braucht im Gegensatz dazu aber 20% des Herz-Minuten-Volumens um den Energie- und Sauerstoffbedarf zu decken. Die Hirndurchblutung beträgt 50 ml Blut/100 g Gehirngewebe/min. Um eine ausreichende Durchblutung gewährleisten zu können, muss der cerebrale Perfusionsdruck konstant gehalten werden. Der Perfusionsdruck wird als Differenz von arteriellem und intrakraniellem Druck beschrieben und über autoregulatorische Mechanismen konstant gehalten (KEMPSKI 2000). Sinkt der Perfusionsdruck unter einen kritischen Wert, versagt die Autoregulation, die Gehirndurchblutung sinkt und der Funktions- wie der Strukturstoffwechsel kommen zum Erliegen. Der Funktionsstoffwechsel repräsentiert den Energiebedarf, der zur Generierung der elektrischen Signale der Neuronen benötigt wird und trägt mit ca. 60 % zum Gesamtstoffwechsel bei. Der Strukturstoffwechsel ist für die Aufrechterhaltung von transmembranösen Ionengradienten, der Stabilisierung intrazellulärer Milieugradienten und zur Produktion von Strukturproteinen und Molekülen verantwortlich. Er

ist mit 40 % am Gesamtstoffwechsel beteiligt (WERNER 1997). Bei Unterschreiten des Blutflusses von 20 bis 18 ml/100 g/min kommt es zum Erliegen des Funktionsstoffwechsels, erkennbar am isoelektrischen Elektroenzephalogramm (EEG). Morphologische Veränderungen und Zelluntergänge treten aber noch nicht auf. Diese entstehen erst, wenn der Blutfluss unter 12 bis 10 ml/100 g/min absinkt. Der Strukturstoffwechsel allerdings bleibt bei Werten zwischen 12 und 18 ml/100 g/min erhalten (SIESJÖ 1992). Dadurch entsteht eine Grenzzone um den Infarkt, auch Penumbra genannt. Diese entsteht zwischen dem Infarktgebiet und dem intakten Gewebe und ist gekennzeichnet durch einen temporären Funktionsverlust. Die synaptische Übertragung ist eingestellt, aber das Ionengleichgewicht ist vorerst noch erhalten. Der Ausfall der synaptischen Übertragung ist voll reversibel, falls rechtzeitig eine ausreichende Reperfusion wiederhergestellt werden kann (PLUTA et al. 1991).

2.1.4 Blutversorgung

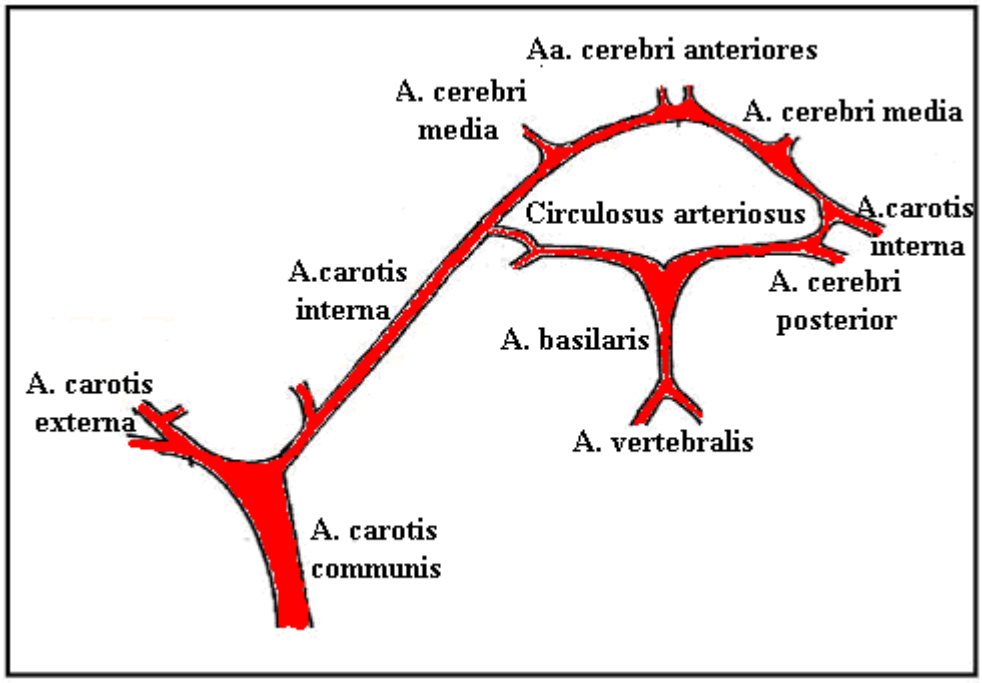


Abb. 2 Arterielle Gefäßversorgung des Gehirns - modifizierte Darstellung nach HUNGERHUBER (2003)

Das Gehirn wird arteriell über die paarigen Arteriae (Aa.) carotides internae und Aa. vertebrales versorgt. Die Aa. carotides internae entspringen den Aa. carotides communes und stehen über eine Anastomose, die Arteria (A.) intercarotica caudalis, in Verbindung. Beidseits

teilt sich die A. carotis interna in die A. cerebri anterior und die A. cerebri media. Die Aa. cerebres anteriores beider Hemisphären können sich verbinden. Sie versorgen den kranialen und medialen Teil der Hemisphären, die A. cerebri media den lateralen Teil. Der posteriale Anteil des Gehirns wird aus der A. cerbri posterior versorgt, die ihrerseits der A. basilaris entspringt. Die A. basilaris bildet sich aus dem Zusammenschluss der A. vertebralis beider Hemisphären und steht über Aa. communicantes caudales mit den Aa. carotides communes in Verbindung. Durch Verknüpfungen zwischen der A. cerebri posterior und der A. cerebri media entsteht ein länglicher Arterienring, der sogenannte Circulus arteriosus cerebri (siehe Abb. 2) (NICKEL et al. 1991; LIEBMANN et al. 1993).

2.2 Ischämie

2.2.1 Cerebrale Ischämie

Die Ischämie stellt eine Unterversorgung oder eine vollständige Unterbrechung der Gehirndurchblutung dar (KEMPSKI 2000). Durch die Blutunterversorgung entstehen eine Disbalance zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot und eine Akkumulation von metabolischen Abfallprodukten (WERNER 2000). Eine Ischämie kann die Folge von Traumen, Tumoren, Embolien, chirurgischen Eingriffen, Vasospasmen und pathologischen Prozessen sein.

2.2.2 Ischämie-Formen

Es werden zwei Formen der cerebralen Ischämie unterschieden, die globale und fokale, auch regional genannte, Ischämie. Ist die Blutzufuhr zum Gehirn komplett unterbrochen, liegt eine globale Ischämie vor; bei Unterbrechung des Versorgungsgebietes nur einer Arterie entsteht eine fokale Ischämie (KEMPSKI 2000). Beide Formen können in ihrer Auswirkung permanent oder temporär sein, je nachdem ob die Blutversorgung dauerhaft oder nur zeitweise unterbrochen ist. Die Stärke der Läsion kann aber auch zusätzlich über die Senkung des Blutdruckes durch Blutentzug und/oder der Dauer der Ischämie beeinflusst werden. Die fokale Ischämie kann in einer oder beiden Hirnhemisphären auftreten.

Die globale Ischämie wird in eine komplette (residuale Durchblutung ist nicht mehr vorhanden) oder in eine inkomplette Form (residuale Durchblutung vorhanden) unterteilt. Mögliche Ursache einer kompletten globalen Ischämie ist ein Herzstillstand, z.B. beim kardiogenen Schock, bei dem die Durchblutung des Gehirns abrupt abbricht. Perfusionsstörungen des Gehirns, wie sie bei einem diffusen Hirnödem mit Erhöhung des Hirninnendrucks entstehen, verursachen die inkomplette Form der globalen Ischämie (WERNER 2000).

Fokale Ischämien können durch traumatische Einwirkungen, Verschluss einzelner cerebraler Gefäße durch Thromben, arteriosklerotische Plaques oder Luft hervorgerufen werden. Als Folge treten Perfusionsstörungen auf, die permanent oder reversibel sein können (WERNER 2000).

2.2.3 Modelle der cerebralen Ischämie

Die Auswirkungen der cerebralen Ischämie auf das Gehirn sind sehr komplex. Um diese Vorgänge untersuchen zu können, sind histologische, biologische und pathologische Untersuchungen notwendig. Dafür ist es teilweise unerlässlich, das Gehirn zu entnehmen und zu

untersuchen. Diese Möglichkeit besteht nur, wenn reproduzierbare tierexperimentelle Studien angewendet werden. Dazu muss die Induktion der cerebralen Ischämie standardisiert und unter strenger Kontrolle der physiologischen Daten durchgeführt werden (GINSBERG und BUSTO 1989).
Es wird mit einer Vielzahl verschiedener Tierspezies geforscht (Katzen, Hunde, Schweine etc.), aber aus verschiedenen Gründen werden heute für Studien der cerebralen Ischämie bevorzugt Laborratten verwendet (GINSBERG und BUSTO 1989). Im Kapitel 4.1.1 wird genauer auf die Auswahlkriterien der Tierarten eingegangen.

Verschiedene Studien beschäftigen sich mit den Ausprägungen und Auswirkungen der verschiedenen Ischämie-Formen.
Modelle der globalen Ischämie sind zum größten Teil vorübergehend, beeinflussen weite Teile des Gehirns und können je nach Dauer und Intensität in selektiv vulnerabelen Arealen zu neuronalen Schäden führen. Eine Möglichkeit, um eine komplette globale Ischämie zu simulieren, besteht in der Induktion eines Herz-Kreislaufstillstandes mit anschließender Reanimation. In der Studie von BÖTTIGER et al. (1999) wurde der Herzstillstand bei NMRI Mäusen durch eine elektrische Stimulation (12 V, 50 Hz) über eine ösophageale Sonde und einer Unterbrechung der mechanischen Ventilation induziert. Nach 5 min wurde die Herzaktivität über externe Defibrilatation initiiert. Eine weitere Methode stellt das Tourniquet, eine Druckmanschette um den Hals, dar. Bei endotracheal intubierten und narkotisierten Tieren wird eine Halsmanschette bis zu einem Druck von ca. 1,1 bar aufgepumpt. Über die Druckausübung wird so die komplette Ischämie erreicht (VANICKY et al. 1997). Diese Methode findet in der Gesellschaft wenig Akzeptanz und wird deshalb nur noch selten angewandt.
FURLOW (1982) produzierte in Anlehnung an PULSINELLI et al. (1997) über die sogenannte „four-vessel occlusion“ eine inkomplette globale Ischämie. Hierfür werden die Aa. vertebrales mit einem Elektrokauter verschlossen. Die Aa. carotides communes unterlegt man mit Plastikschläuchen, so dass sie zu jedem beliebigen Zeitpunkt durch Zusammenziehen der Bänder verschlossen werden können. PULSINELLI (1985) zeigte auch, dass die CA1-Region des Hippocampus sehr sensibel auf die ischämische Provokation reagiert, während andere Regionen erst zu einem späteren Zeitpunkt reagieren.
Eine Alternative stellt die „two-vessel occlusion“ dar. Hier wird ein Verschluss der Aa. carotides communes und eine gleichzeitige Senkung des Blutdrucks auf ~30 bis 50 mmHg durchgeführt (LIPTON 1999).

Es kommen unterschiedlichste Verfahren zur Induktion fokaler Ischämien zum Einsatz. Diese variieren in der Wahl des Gefäßes, welches verschlossen wird, sowie in der Art und Weise des Gefäßverschlusses. Der Verschluss der A. cerebri media (middel cerebral artery (MCA)-occlusion) ist ein oft verwendetes Modell, da dieses Gefäß beim Menschen bei einem Schlaganfall häufig betroffen ist. PETULLO et al. (1999) haben die verschiedenen Auswirkungen einer Ischämie über die Okklusionszeit und über den Verschluss der MCA allein oder in der Kombination mit der A. carotis communis (common caroid artery (CCA)) untersucht. Die zeitweilige Unterbrechung des Blutflusses der MCA wurde über einen Micro-Aneurisma Clip erreicht.

Es gibt noch viele verschiedene Möglichkeiten, die Gefäße zu verschließen. LAUER et al. (2002) simulierten durch Bolus-Injektionen von viskosem Silikon einen reproduzierbaren permanenten ischämischen Schaden. Im Gegensatz zu anderen embolischen Modellen kann hier auf eine Kraniotomie verzichtet werden und so der cerebrale Blutfluss über ein Laser-Doppler-Verfahren gemessen werden. Als erstes Modell erlaubt die Injektion von Endothelin-1 eine selektive Platzierung in fast jeder Hirnregion und ermöglicht so eine detaillierte Analyse der regionalen Verletzlichkeit nach einem ischämischen Schaden (AGNATI et al. 1991). Intraarterielle Embolisationen mit Makrosphären wie TiO(2) (GERRIETS et al. 2003) erlauben keine genauen Aussagen über Größe und Lokalisation des Schadens, da sich die Verteilung der Mikrosphären nicht kontrollieren lässt (MCAULEY 1995).

In der vorliegenden Studie wird der temporäre Verschluss der rechten A. carotis communis in Kombination mit einer hämorrhagischen Hypotension auf einen MAP von 40 mmHg für 45 min mit anschließender Reperfusion als Modell für eine inkomplette temporäre cerebrale Hemisphärenischämie verwendet

.

2.3 Zelltod

Das Gehirn benötigt wegen seines sehr hohen Energie- und Sauerstoffverbrauchs eine starke Durchblutung. Dabei ist es auf die externe Zufuhr von Glucose und Sauerstoff angewiesen. Durch die Verminderung der Blutversorgung während einer Ischämie entsteht eine Unterversorgung mit diesen Stoffen. Das hat eine Kaskade verschiedener Stoffwechselvorgänge zur Folge, die im Zelluntergang enden, wenn die Ischämie unbehandelt bleibt. Zwei verschiedene Formen des Zelluntergangs sind bisher bekannt: Die Nekrose und die Apoptose (KERR et al. 1972). Die folgende Abbildung zeigt den schematischen Verlauf der zwei Zelluntergangsformen, die in dem Kapitel 2.3.1 und dem Kapitel 2.3.2 näher beschrieben werden.

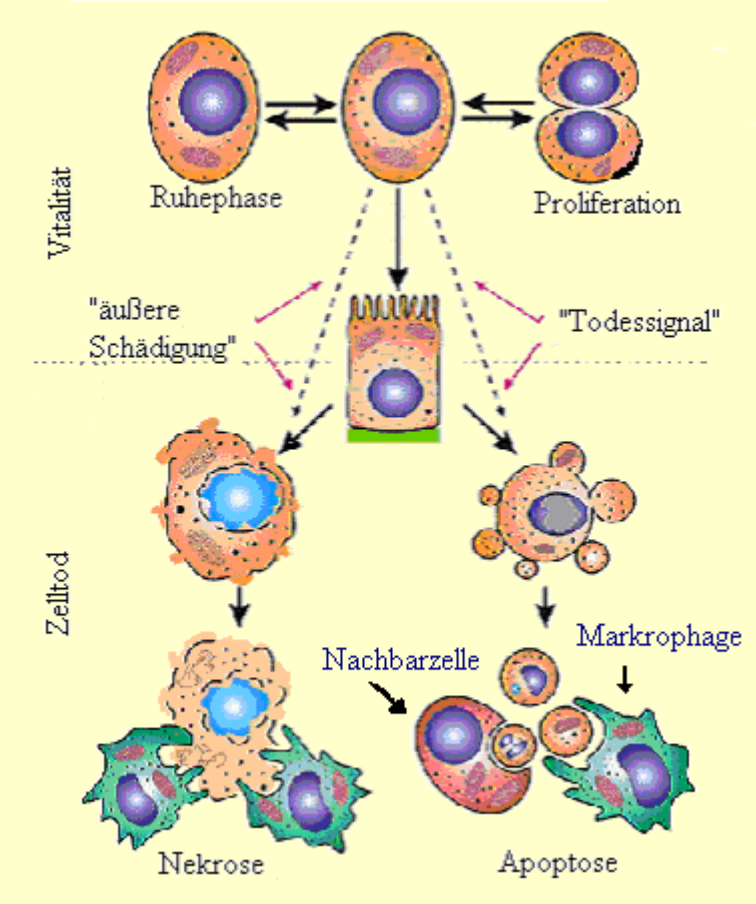


Abb. 3 Modifizierte schematische Darstellung der Nekrose und der Apoptose (nach www.ukammann.de/apoptose/; 2001)

2.3.1 Nekrose

Nekrose wird unter anderem durch extreme Abweichungen physiologischer Bedingungen ausgelöst. So kann es bei mangelnder Blutversorgung, z.B. nach einem Schlaganfall, zu einer Schädigung der Zytoplasmamembran einer Zelle und zum nekrotischen Zelltod kommen (RIEDE und SCHAEFER 1995).

Unter physiologischen Bedingungen gewinnt das Gehirn die benötigte Energie durch die aerobe Glycolyse. Dabei werden aus einem Mol Glucose 36 Moleküle Adenosintriphosphat (ATP) gebildet. Bei einem geringen Sauerstoffangebot wird zur Energiegewinnung auf die anaerobe Glykolyse umgeschaltet. Es entstehen aus einem Mol Glucose nur noch zwei Moleküle ATP und Laktat. Da der Abtransport nicht mehr gewährleistet ist, akkumuliert das Laktat und es kommt zu einem intrazellulären und interstitiellen Abfall des pH-Wertes. Die so resultierende Ansäuerung und der Verlust an energiereichen Phosphaten, durch den Zusammenbruch der oxidativen Phosphorilierung, führen dazu, dass intra- und transzelluläre Transportprozesse zum Erliegen kommen. Ein unkontrollierter Natriumeinstrom und eine daraus folgende Depolarisation der Zellmembran mit konsekutivem Kalziumeinstrom sind die Folge (SIESJÖ 1992). Durch die Laktatazidose und den Verlust der Pufferungskapazität des Zytoplasmas durch den Elektrolyteinstrom kommt es zur Zellmembranschädigung. Die Folgen sind ein Ödem des Gefäßendothels, der Astrocyten und neuronaler Strukturen und damit eine weitere Durchblutungsstörung in der Umgebung. Der Kaliumeinstrom bewirkt eine Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern wie Glutamat und Aspartat aus den präsynaptischen Vesikeln. Dies führt zu einer Anreicherung von Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure (AMPA) und N-Methyl-D-Asparaginsäure (NMDA), die einen weiteren Einstrom von Kalzium zur Folge hat (WERNER 1997; KEMPSKI 2000). Es kommt zur Freisetzung von Fettsäuren und Proteolysaten und zur Bildung von Arachnidonsäureabkömmlingen, was zu einer lokalen Entzündung und über Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene und freie Radikale zu einem endgültigen Zelluntergang führt (WERNER 2000).

Morphologisch werden zwei Formen der Nekrose unterschieden: die Koagulationsnekrose und die Kolliquationsnekrose (RIEDE und SCHAEFER 1995).

Die Koagulationsnekrose ist die makroskopische Gewebeumwandlung in eine trockene, gelbliche und mürbe Masse. Die Besonderheit dieser Nekroseform ist der verminderte Feuchtigkeitsgehalt und die über einen längeren Zeitraum erhaltenen grobarchitektonischen Strukturen. Diese Form der Nekrose kommt in Zellen und Geweben mit hohem Protein- und niedrigem Fettgehalt vor.

Die Kolliquationsnekrose ist gekennzeichnet durch eine anfängliche Gewebeschwellung und eine rasche enzymatische Auflösung des nekrotischen Materials. Das Gewebe hat eine matschig-schmierige Konsistenz. Sie findet in Zellen und Geweben mit geringen Kollagen- und hohem Fettanteil statt, wie z.B. dem Gehirn oder dem Rückenmark (RIEDE und SCHAEFER 1995).

2.3.2 Apoptose

Die Apoptose als Form eines Zellunterganges spielt für das Überleben eines Organismus eine wichtige physiologische Rolle. Der menschliche Körper bildet mehrere Milliarden Zellen täglich neu, um verbrauchte, funktionsunfähige oder infizierte, transformierte und verletzte Zellen zu ersetzen. Um eine Gewebshomöostase zu erhalten, wird über definierte Signalwege die Apoptose eingeleitet und Zellen eliminiert. Dabei sterben immer nur einzelne Zellen, im Gegensatz zur Nekrose, bei der viele Zellen gleichzeitig untergehen. So ist die Apoptose vergleichbar mit dem Herabfallen einzelner Blätter von einem Baum im Herbst. Dies kann auch aus dem Wort Apoptose hergeleitet werden. Es besteht aus zwei griechischen Wörtern: apo (der Weg) und ptosis (der Fall). Der Begriff wurde 1972 durch KERR et al. geprägt. Sie untersuchten die morphologischen Veränderungen des „physiologischen Zelltodes“ und grenzten ihn von dem nekrotischen Zelltod ab. Die Apoptose spielt aber nicht nur bei physiologischen Vorgängen eine Rolle, wie z. B. bei der Embryonalentwicklung oder der Bildung des Nervensystems. Sie ist auch bei pathologischen Prozessen wie Parkinson, Alzheimer oder der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung beteiligt (GRAEBER und MORAN 2002). Auch nach einer cerebralen Ischämie kann es zum Zelluntergang durch Apoptose kommen (LOVE 2003).

Die Apoptose und die Nekrose werden durch ähnliche Reize initiiert, unter anderem durch Ischämie, Hypoxie, freie Radikale sowie Mangel oder Entzug von zellulären Wachstumshormonen. Des Weiteren unterscheiden sie sich häufig durch ihre verschiedenen Zeitabläufe. Dabei ist die Nekrose ein unmittelbarer passiver Prozess und die Apoptose ein verzögerter aktiver Prozess. Ein wichtiges Kriterium, das zur Initiation der Apoptose führt, ist neben den Faktoren wie Reizstärke und Reizdauer, der Gehalt des Gewebes an ATP. Die Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose ein energieverbrauchender Prozess und benötigt eine bestimmte intrazelluläre ATP-Konzentration (EGUCHI et al. 1997).

Ist die Apoptose eingeleitet, kommt es zu einer Verschiebung intrazellulärer apoptotischer Proteine zu Gunsten pro-apoptotischer Mediatoren, welche den Zelluntergang einleitet. Als erstes morphologisches Zeichen der Apoptose gilt eine Verringerung des Zellvolumens, wobei die Organellen (im Gegensatz zur Nekrose) und somit der Stoffwechsel über einen

langen Zeitraum intakt bleiben. Der Zellkern schrumpft und das Chromatin verdichtet sich, was sich im Elektronenmikroskop charakteristisch als Halbmondform darstellt. Gut sichtbar ist auch ein intensives „membran blebbing“. Es bezeichnet Ausstülpungen und Bläschen an der Zytoplasmamembran. Diese schnüren sich ab und bilden „Apoptotic bodies“, Apoptose-Körperchen, die von phagozytierenden Zellen und von benachbarten Zellen aufgenommen werden. Um die Phagozytose zu erleichtern, reduzieren die Zellen ihr Volumen, indem sie Ionen, vor allem K^+-Ionen, nach außen pumpen und ihr Zytoskelett kontrahieren. So entsteht, im Gegensatz zur Nekrose, keine lokale Entzündungsreaktion. Bis zur Bildung der Apoptose-Körperchen bleibt das Zytoplasma funktionell intakt. Es zeigen sich aber biochemische Änderungen. Phosphatidylserin wird von der Innen- auf die Außenseite der Plasmamembran transferiert. Die so markierten Zellen können nun erkannt und beseitigt werden. Als spätes Zeichen für Apoptose entsteht das „DNA-Laddering“, der Zerfall der DNS in gleichgroßen DNS-Abschnitte. Dabei werden im Zellkern Magnesium- und Calcium- abhängige Endonukleasen (Effektorcaspasen) aktiviert, die das Chromatin auf diese charakteristische Weise abbauen und somit die genetische Information zerstören. Da sich die DNS um einen Proteinkern aus Histonen windet, können die Endonukleasen immer nur zwischen diesen Komplexen die DNS zerschneiden. Zuerst entstehen große Fragmente aus 50 bis 300 Kilobasenpaaren, dann kleine, bestehend aus 180 Basenpaaren. Nach Extraktion und Auftrennung in einem elektrischen Feld stellen sich die Fragmente in der Western-Blot-Analyse als „DNS-Leitern“ dar. Nekrotische Zellen weisen solche Leitern nicht vor. Die Zerstörung der genetischen Information ist eines der wichtigsten Merkmale der Apoptose, da mutierte oder gefährliche Information endgültig gelöscht wird (WYLLIE 1980).

2.3.3 Apoptose-assoziierte Proteine

Der Ablauf der Apoptose erfolgt über mehrstufige Kaskaden, angefangen vom initialen Reiz bis hin zur Spaltung der genetischen Information. Innerhalb dieser Kaskaden konkurrieren Apoptose-assoziierte Proteine miteinander um den Tod oder das Überleben der Zelle. Zu den relevanten anti-apoptotischen Proteinen gehören Bcl-2 und Mdm-2 und zu den pro-apoptotischen Proteinen Bax und p53. Die Balance bzw. das Zusammenspiel dieser Proteine bestimmt das Schicksal der Zelle. Als gemeinsame Endstufe der Kaskaden steht die Aktivierung der Effektorcaspasen, die das Chromatin abbauen (ALNEMRI 1997).

2.3.3.1 Bcl-2-Protein

Das Bcl-2-Protein ist eines der 19 bis jetzt entdeckten Mitglieder der Bcl-Familie (GROSS et al. 1999). Das namensgebende Apoptose-hemmende Bcl-2 Gen wurde bei B-Zell-Lymphomen als Proto-Onkogen am chromosomalen Translokationspunkt t(14;18) entdeckt. Die Proteine der Bcl-Familie sind sowohl für das Überleben als auch für das Absterben von Zellen verantwortlich. Sie werden deshalb in pro- und anti-apoptotische Proteine eingeteilt (siehe Abb. 4).

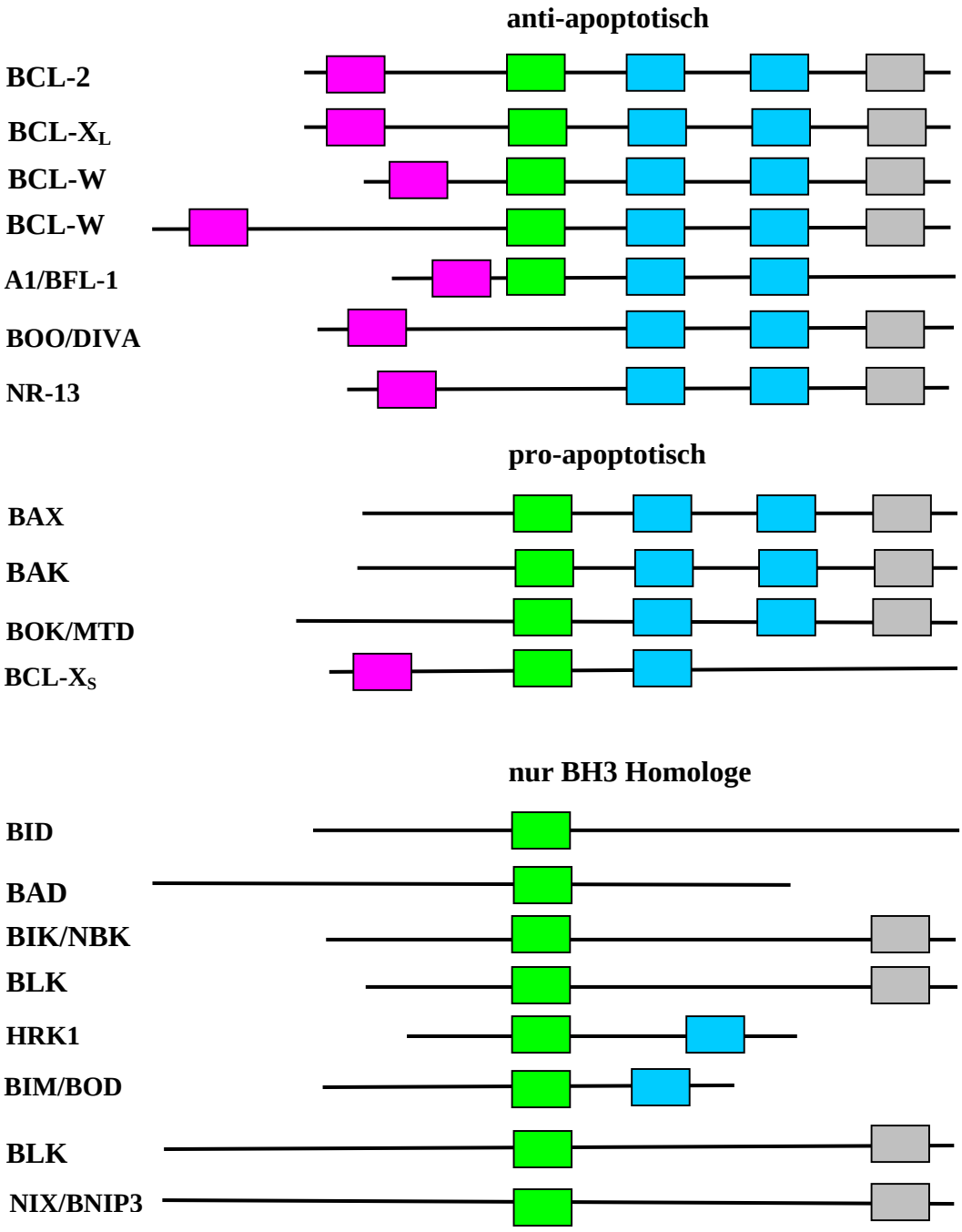


Abb. 4 Modifizierte schematische Darstellung der Bcl-2-Familie nach SCORRANO und KORSMEYER (2003)

Die Mitglieder der Familie besitzen bis zu 4 homologe Bereiche (Bcl-2 Homologe BH), BH1 bis 4, die aus helicelen Abschnitten bestehen (KELEKAR und THOMPSON 1998). Viele anti-apoptotische Proteine weisen alle 4 Domänen auf. Den pro-apoptotischen Proteinen fehlt meistens das erste α-helicale BH4 Segment. Neben den Domänen BH1 und BH2, die unter anderem für die Dimerisierung gebraucht werden, soll das BH4 Segment essentiell für die anti-apoptotische Wirkung sein (HUNTER et al. 1996). Das BH3 Segment scheint für das

Absterben verantwortlich zu sein. Es trägt deshalb auch den Namen „death domain“ (KELEKAR und THOMPSON 1998).

Das Bcl-2-Protein hat eine relative Molmasse von ca. 26 kD und ist assoziiert mit Membranen verschiedener Organellen, wie der des endoplasmatischen Retikulums, der Kernmembran und der äußeren Mitochondrienmembran (KRAJEWSKI et al. 1994). Die Lokalisation des Proteins lässt auf verschiedene Mechanismen schließen, die Apoptose verhindern. So inhibiert eine hohe Konzentration an Bcl-2 die Ausschüttung von Procaspasen wie Zytochrom C aus dem Intermembranären Spalt der Mitochondrien ins Zytoplasma. Eine Aktivierung der Caspasen wird so verhindert (KLUCK et al. 1997). Außerdem spielt die spezifische Lage in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER) eine wichtige Rolle im Ca^{2+} Haushalt, da Bcl-2 für seine Aktivierung notwendig ist. Eine Studie von ZHU et al. (1996) zeigt, dass Bcl-2 des ER Apoptose verhindern kann.

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass Bcl-2 sich mit unterschiedlichen pro- und anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-X_L, Bax und Procaspase-8 verbinden kann. Wobei Bcl-2-Bax-Dimere Apoptose verhindern, Bax-Monomere Apoptose einleiten und Bcl-2 Monomere den Zelltod unterdrücken (OLTVAI et al. 1993; WERNER 2000). Es wird ebenso vermutet, dass Bcl-2 vor Apoptose schützt, indem es das Einschleusen von p53 in den Nukleus verhindert (FROESCH et al. 1999). Interessanterweise kann p53 auch die Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 blockieren (MIYASHITA et al. 1994; MIYASHITA und REED 1995).

2.3.3.2 Mdm-2-Protein

Das Mdm-2-Gen wurde erstmals als amplifizierte Sequenz in einer spontan transformierten Mauszellinie (BALB/c 3T3) entdeckt und lag hier in Form von 25 bis 30 Kopien gepaarter, azentrischer Chromatinkörperchen, sogenannter „double minutes“, vor (CAHILLY-SNYDER et al. 1987). Es kodiert ein 90 kD schweres Phosphorprotein aus 491 Aminosäuren und ist im Zellkern lokalisiert. Das Mdm-2-Protein wird in verschiedene Domänen eingeteilt. In der Ring-Finger-Domäne des C-Terminus sitzt die Ubiquitin-Ligase-Aktivität (GEYER et al. 2000). Dort befinden sich auch die Kernlokalisationssequenz und zwei Zink-Finger-Motive. Außerdem hat Mdm-2 noch eine saure Domäne und ein Zink-Finger-Motiv. An der N-terminalen Domäne befindet sich die p53-Protein bindende Domäne (KUSSIE et al. 1996).

Mdm-2 ist eine E3-Ligase, die durch Übertragung von Ubiquitinresten sich selbst und p53-Protein für den Abbau in Proteosomen markieren kann (KUBBUTAT et al. 1997).

Mdm-2 beeinflusst so die Aktivität des p53-Proteins, während p53 allerdings in der Lage ist, die Expression von Mdm-2 zu aktivieren. Eine Überexpression des Mdm-2 hemmt sowohl die

Transkriptionsaktivität als auch die repressiven Aktivitäten des p53. So entsteht ein auto-regulatorischer Rückkopplungsmechanismus, der den p53-Protein-Spiegel in ungeschädigten Zellen gering hält (KUBBUTAT et al. 1997). Nach einem Zellschaden wird ein nicht phosphoriliertes Mdm-2-Protein exprimiert, da die Zelle eine DNS-abhängige Proteinkinase verliert. Das nicht phosphorilierte Mdm-2-Protein bildet mit dem p53-Protein einen Komplex und inhibiert so seine Wirkung (MAYO et al. 1997). Das enge Zusammenspiel von Mdm-2 und p53 nimmt bei apoptotischen Zelluntergängen eine wichtige Rolle ein, wobei Mdm-2 dabei anti-apoptotisch wirkt (JONES et al. 1995).

2.3.3.3 Bax-Protein

Das Bax-Protein ist ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-Familie (siehe Kapitel 2.3.3.1) und für den Zelltod verantwortlich (GROSS et al. 1999). Bax teilt mit den anderen Familien-mitgliedern 3 homologe Bereiche BH1 bis 3. Physiologisch spielt Bax eine Rolle bei der neuronalen Entwicklung und der Spermatogenese (KNUDSON et al. 1995). Das Bax-Gen kodiert nach KRAJEWSKI et al. (1994) drei verschiedene Bax-Proteine, ein 21 kD schweres Bax-α-Protein, ein 24 kD schweres Bax-β- und das 5 kD schwere Bax-γ-Protein. Die Expression des Bax-Gens kann auch über die Aktivierung von p53-Protein erfolgen (VOGELSTEIN et al. 2000). Bax liegt als lösliches Protein im Zytosol der Zelle vor und wird während der Apoptose in die Membran von Mitochondrien geschleust (HSU et al. 1997). Der Mechanismus ist bis heute unklar. Nachdem Bax die Membran erreicht hat, bildet es große Oligomere. Diese sind assoziiert mit einer zytotoxischen Aktivität (NECHUSHTAN et al. 2001). Zudem setzt es Zytochrom C frei, das eine pro-apoptotische Kaskade in Gang bringt (JÜRGENSMEIER et al. 1998). Bax-Proteine können sich untereinander zu Dimeren zusammenlegen und wirken so pro-apoptotisch. Der Zusammenschluss von Bax- und Bcl-2-Proteinen zu Dimeren unterdrückt jedoch die Apoptose (OLTVAI et al. 1993; WERNER 2000).

2.3.3.4 p53-Protein

Das Tumorsuppressor Gen p53 besitzt eine entscheidende Schlüsselposition bei der Zell-teilung und Apoptose. Die Aktivierung des Proteins führt im einfachsten Fall zur Unter-brechung des Zellzyklus (von GI nach S oder von G2 nach M) oder zur Induktion des p53-vermittelten apoptotischen Zelltodes (VOGELSTEIN et al. 2000). P53 ist ein 53 kD schweres Phosphorprotein und besteht aus 393 (humanes p53) bzw. 387 (murines p53) Aminosäuren (LEVINE 1997). Es kann in verschiedene Domänen eingeteilt werden: der N-terminale Bereich mit der Transaktivierungs-Domäne und dem Bcl-2-bindenden

Bereich; der mittlere Bereich mit der DNS-bindenden Domäne; und der C-terminale Bereich mit der Oligomerisierungs-Domäne sowie den regulatorischen Sequenzen für die DNS-Bindung und die zelluläre Lokalisation (LEVINE 1997) (siehe Abb. 5).

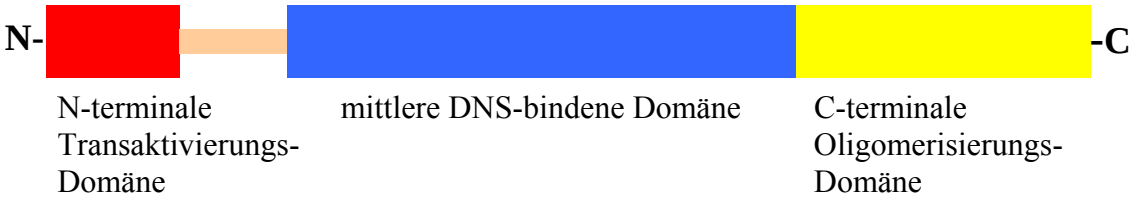


Abb. 5 Modifizierte schematische Darstellung eines p53-Proteins nach LEVINE 1997

Wegen der kurzen Halbwertzeit (5 bis 30 min) ist p53 nur latent im Zytoplasma vorhanden. Dort hält es sich zu bestimmten Zeiten des Zellzyklus auf. Nach Aktivierung durch z.B. direkte Schädigung der DNS (KASTAN et al. 1991) oder nach transienter globaler Ischämie (MCGAHAN et al. 1998) kommt es zur nuklearen Akkumulation von p53 (SHAULSKY et al. 1990). Aber auch eine Phosphorylierung von p53 führt zur Akkumulation im Nukleus. Dies verhindert eine Interaktion von p53 mit Mdm-2 (SILICIANO et al. 1997). P53 und Mdm-2 regulieren ihre Funktion über einen der p53-Mdm-2 Rückkopplungsmechanismus (siehe Kapitel 2.3.3.2). Die Funktion von p53-Protein liegt in der Transkription verschiedener Gene. Eine große Gruppe dieser Gene, wie z.B. p21, greift in den Zellzyklus ein. Eine andere Gruppe induziert bei einem großen Schaden Apoptose. Zu dieser Gruppe der pro-apoptotisch exprimierten Proteine gehört Bax, ein Mitglied der Bcl-Familie (VOGELSTEIN et al. 2000). P53 kann ebenso die Expression von *death receptors* Fas/Apo1 induzieren und damit die Aktivierung von Caspasen einleiten (POLYAK et al. 1997). Aber es blockt auch die Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 (MIYASHITA und REED 1995).

2.4 Propofol

2.4.1 Allgemeine Information

Propofol, bekannt unter dem Namen Disoprivan® (AstraZeneca GmbH, Wedel) oder Rapinovet® (Mallinckrodt Veterinary, HareÆeld, UK), ist ein einfach gebauter barbiturat-freier Phenolabkömmling (siehe Abb. 6)

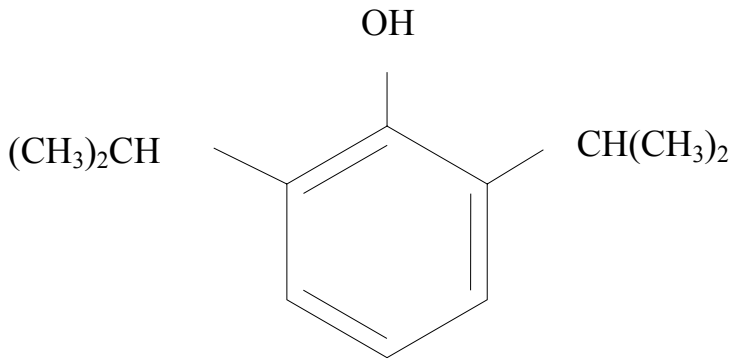


Abb. 6 Molekülstruktur von Propofol (FREY und LÖSCHER 1996)

Propofol wird seit den 1980er Jahren als allgemeines Anästhetikum und Hypnotikum eingesetzt und ist besonders geschätzt wegen seiner guten pharmakologischen Eigenschaften (JAMES und GLEN 1980). Angeboten wird es als 1%iges oder 2%iges 2,6-Diisopropyl-Phenol in Form einer Öl in Wasser Emulsion mit 10 % Sojabohnenöl, 2,5 % Glyzerol und 1,2 % Eiphosphatiden mit einem pH-Wert zwischen 6 und 8,5.

2.4.2 Pharmakodynamik

Propofol hat sich durch ein sehr schnelles Erreichen des Toleranzstadiums (ca. eine Minute), ohne Exzitationserscheinungen zu zeigen, und aufgrund seiner kurzen Wirkungsdauer von ca. fünf bis zehn Minuten als ultrakurzes Anästhetikum bewährt. Das schnelle An- und Abfluten des Anästhetikums wird durch eine schnelle Umverteilung im Körper gewährleistet. Eine Rückstandsbildung im Fettgewebe oder in der Muskulatur ist dabei nicht zu erwarten (FREY und LÖSCHER 1996). Propofol findet Verwendung sowohl als Injektions- als auch als Infusions-Narkose und ist kombinierbar mit Inhalationsnarkotika, Analgetika und Sedativa (WEAVER und RAPTOPOULOS 1990). Zur Narkoseeinleitung benötigt man in der Humanmedizin ca. 1,5 bis 2,5 mg/kg intravenös (i.v.) und für die Narkoseaufrechterhaltung ca. zwischen 6 und 12 mg/kg/h i.v. Propofol (STRIEBRL 2003), in der Veterinärmedizin

2 bis 7 mg/kg i.v. (Hund und Katze) für die Narkoseeinleitung und 0,5 bis 0,9 mg/kg/min i.v. für die Narkoseaufrechterhaltung (MUIR et al.2000).

2.4.3 Pharmakokinetik

Im Rahmen eines offenen drei-Kompartimentsystems wird Propofol schnell umverteilt und auch metabolisiert. Die Biotransformation findet hauptsächlich in der Leber statt. Beim Menschen werden 88 % der Metaboliten über den Harn und nur ca. 2 % über den Kot ausgeschieden (SIMONS et al. 1988). Die Hauptmetaboliten sind das Glucuronsäure-konjugierte Propofol und das Glucuronsäure- und Sulphat-konjugierte hydroxylierte Derivat, 2,6-Diisopropyl-1,4-quinol (SIMONS et al. 1988). Neuere Studien haben gezeigt, dass auch die Lunge des Menschen an der Biotransformation teilnimmt (DAWIDOWICZ et al. 2000).

2.4.4 Nebenwirkungen

Die vasodilatatorische sowie die negativ inotrope Herzwirksamkeit des Propofols verursachen in Abhängigkeit zur i.v. Applikationsgeschwindigkeit eine Blutdrucksenkung (SEBEL und LOWDON 1989). Bei hoher Dosierung oder zu schneller i.v. Gabe des Anästhetikums kommt es zum Atemstillstand (FREY und LÖSCHER 1996), allerdings fängt die Atmung meistens nach einigen Minuten spontan wieder an. In der Aufwachphase kann es zu Erregungs-erscheinung und Erbrechen beim Menschen wie auch beim Hund und der Katze kommen (MUIR et al. 2000). Bei Menschen, insbesondere bei Kindern, kann bei Langzeitgaben im Rahmen der Intensivpflege zu ein toxisches Syndrom, das so genannte „Propofol-Infusions-Syndrom“ (BRAY 1998; CRAY et al. 1998), auftreten. Dabei kann es zu Arrhythmien bis hin zum Herzversagen, Hypoxämie, metabolischer Azidose, Rhabdomyolyse der Skelett- und Herzmuskulatur und Nierenversagen kommen.

2.4.5 Neuroprotektive Wirkung

In verschiedenen Studien ist gezeigt worden, dass Propofol eine neuroprotektive Wirkung sowohl bei der inkompletten globalen (ITO et al. 1999) als auch der fokalen cerebralen Ischämie hat (KOCHS et al. 1992; YOUNG et al. 1997; ENGELHARD et al. 2003). Propofol entfaltet über verschiedene Mechanismen seine neuroprotektive Wirkung. In einer Studie von STEPHAN et al. 1987 zeigte sich, dass Propofol den arteriellen Mitteldruck und den intra-kraniellen Druck senkt, der Perfusionsdruck aber nahezu konstant bleibt. Die cerebrovasculäre Autoregulation wird durch Propofol nicht verändert. Da sich im Verhältnis zur Elektroenzephalogramm (EEG)-Suppression der Sauerstoffverbrauch vermindert, übt Propofol wahrscheinlich über diesen Mechanismus eine protektive Wirkung aus. Die

metabolische Stoffwechselrate des Sauerstoffs korreliert eng mit dem cerebralen Blutfluss (CBF). Propofol senkt beide proportional bei Menschen (OSHIMA T. et al. 2002), wie bei Tieren (WERNER 1997). Bei Propofol-Dosen, die zu einem Burst-suppression-Muster im EEG führen, kommt es nach inkompletter cerebraler Ischämie zu einem verbesserten neurologischem Endergebnis und Bild der histologischen Pathologie des Gehirns verglichen mit einer Fentanyl/Lachgas-Anästhesie (KOCHS et al. 1992). Diese Studie zeigt auch, dass der protektive Effekt des Propofols nicht auf der Veränderung des Glucose-Plasmaspiegels beruht. Auch im Vergleich verschiedener Propofol-Dosen (niedrig, moderat und hoch dosiert) hat sich gezeigt, dass die Menge, die ein Burst-suppression-Muster induziert, neuroprotektiv ist (YAMASAKI et al. 1999). Propofol verstärkt durch die γ-Aminobuttersäure-Rezeptor-vermittelte ($GABA_A$ Rezeptoren) synaptische Inhibition die Aktivität der Neurone (ANTKOWIAK und KIRSCHFELD 2000). Als Folge der reduzierten elektrischen Aktivität wird die Ausschüttung von Glutamat reduziert oder der Glutamat-Rezeptor blockiert (AMORIM et al. 1995). Eine neuere Studie von VELLY et al. (2003) zeigt, dass Propofol die extrazelluläre Konzentration von Glutamat ansteigen lässt, während die Aufnahme von Glutamat gesenkt wird. Glutamat aktiviert den NMDA-Rezeptor und führt so zu einem neurologischen Schaden. Propofol ist in der Lage die Glutamat induzierte NMDA-Rezeptor-Toxizität zu reduzieren (HANS et al. 1994). Dagegen finden WEIGHT et al. (2002) heraus, dass Lipidemulsionen, wie sie auch für Propofol angewendet werden, NMDA-Rezeptoren aktivieren. Die Lipide, aber auch die durch Propofol bedingte Senkung der elektrischen Aktivität, erniedrigen den Verbrauch von ATP (AMORIM et al. 1995). Während einer akuten cerebralen Ischämie kommt es zur Akkumulation von Dopamin im Extrazellulärraum. WANG et al. (2002) stellen fest, dass Propofol bei einem Verschluss der A. cerebri media die Akkumulation von Dopamin reduziert, wird es während der Ischämie und der Reperfusion verabreicht. Der neurologische Schaden war in der Propofol-Gruppe niedriger als in der Kontroll-Gruppe. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Reduzierung der Dopamin-Akkumulation ein Faktor der neuroprotektiven Wirkung von Propofol ist. Studien zum neuroprotektiven Potential von der Propofol zeigen weiterhin, dass Propofol die neuronale Apoptose nach cerebraler Ischämie und den verzögerten Zelltod in der CA1-Region reduziert (YAMAGUCHI et al. 2000). Über den Einfluss von Propofol auf die Apoptose-assoziierten Proteine Bcl-2, Mdm-2, Bax und p53 weiß man bis heute noch nicht viel. Eine Studie von ENGELHARD et al. (2004) zeigt, dass die Expression von Bax unter einer Propofol-Narkose 4 h nach einer 30 minütigen cerebralen Ischämie durch einen Clip auf die A. carotis communis bei einem MAP von 35 mmHg und anschließender Reperfusion erniedrigt ist.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielvorstellungen

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Expression Apoptose-assoziierter Proteine nach inkompletter cerebraler Hemisphärenischämie mit Reperfusion unter Propofol-Narkose im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen zu untersuchen.

Bisher durchgeführte Studien belegen, dass Propofol und auch andere Anästhetika wie Sevofluran das neurologische Endergebnis nach einer inkompletten cerebralen Ischämie verbessern (ENGELHARD et al. 2004). Schäden, die durch eine cerebrale Ischämie ausgelöst werden, führen zum nekrotischen oder programmierten (apoptotischen) Zelltod (KEMPSKI 1994). Wichtige regulierende Proteine der Apoptose sind die pro-apoptototischen Proteine Bax und p53 und die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Mdm-2. In der Studie von ENGELHARD et al. (2004) ist das pro-apoptotische Protein Bax nach einem cerebralen Schaden bereits nach vier Stunden in der Propofol-freien Kontroll-Gruppe erhöht, während die mit Propofol-behandelten Gruppe diesen Ischämie-bedingten Anstieg supprimieren konnte. Dieses Ergebnis zeigte den kurzfristigen neuroprotektiven Effekt des Anästhetikums Propofol.

In der vorliegenden Studie wird die quantitative Veränderung der Apoptose-assoziierten Proteine Bcl-2, Mdm-2, Bax und p53 unter Einfluss des Hypnotikums Propofol untersucht. An den vier definierten Untersuchungszeitpunkten (Tag 1, 3, 7 und 28) werden die ischämischen Gehirne mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Färbung und einer Western-Blot-Analyse auf die Expression von Bcl-2, Mdm-2, Bax und p53 qualitativ und semiquatitativ analysiert.

Im Rahmen dieser Studie sollen Forschungsergebnisse zur neuroprotektiven Wirkung des Propofols ergänzt und erweitert werden. Insbesondere wird in dieser Arbeit ein möglicher positiver und längerfristiger Effekt des Hypnotikums auf die Konzentration der Apoptose-assoziierten Proteine untersucht. Parallel zur vorliegenden Arbeit werden in einer Studie mit ähnlichem Design (Co-Doktorandin Lién Laacke) die Auswirkungen der Hypothermie-behandlung im zeitlichen Verlauf auf die Expression von oben genannten Apoptose-Proteine untersucht. Im günstigsten Fall erweitern beide Ansätze die therapeutischen Möglichkeiten für die klinische Anwendung im Falle einer cerebralen Ischämie.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Versuchstiere

In diese Studie gehen 72 männliche Sprague-Dawley Ratten des CD8 Auszuchtstammes (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) ein. Sie wiegen durchschnittlich 403 ± 59 g. Je fünf Tiere werden zur Eingewöhnung eine Woche vor Versuchsbeginn in Makrolon Typ 4 Käfigen gehalten. Die Ställe unterliegen einem hell/dunkel Rhythmus in einem 12 Stunden Intervall. In der Lichtperiode liegt der Helligkeitswert zwischen 50 und 100 Lux. Die Temperatur wird zwischen 20 °C und 23 °C konstant gehalten. Die Luftfeuchtigkeit liegt zwischen 50 und 60 %. Die Einstreu in den Käfigen besteht aus entkeimtem und entstaubtem Weichholzgranulat (Fa. Altromin, Lage/Lippe). Futter (Alleinfutterpellets für Ratten und Mäuse „ssniff R/M-Haltung, 10 mm, nitrosaminarm“, Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser werden ad libitum angeboten. Sechzehn Stunden vor Versuchsbeginn werden die Ratten nüchtern gesetzt. Wasser wird weiterhin ad libitum zur Verfügung gestellt. So erreichen die Tiere einen niedrigen normoglycämen Zustand.

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

3.2.2 Versuchsplan

Die Ratten werden randomisiert in zwei verschiedene Versuchsgruppen, eine Propofol- und eine Kontroll-Gruppe sowie eine Nativ-Gruppe, die der Ermittlung physiologischen Vergleichswerte dient, eingeteilt. Die Versuchsgruppen unterscheiden sich im Verlauf der einzelnen Operationsphasen nur durch die verwendeten Narkotika.

Die Propofol- und die Kontroll-Gruppe durchlaufen mehrere Stadien während des Versuchs. Diese werden in der folgenden Abbildung (Abb. 7) dargestellt.

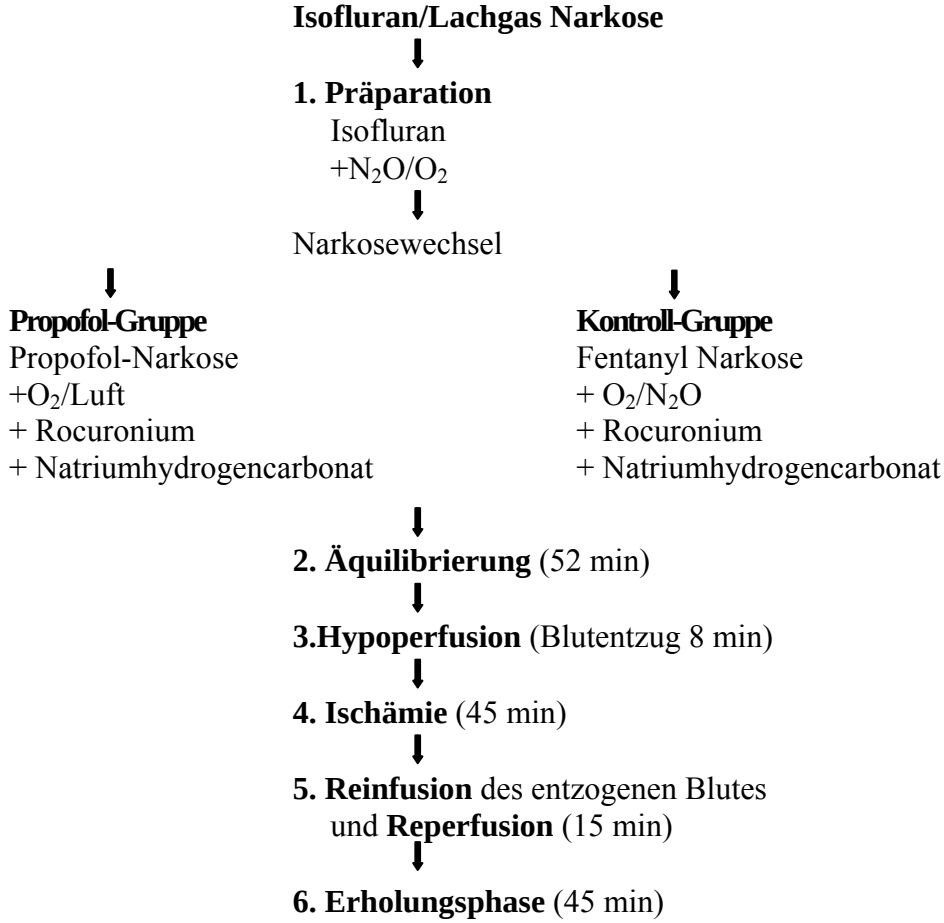


Abb. 7 Darstellung des operativen Abschnitts einschließlich des Narkoseregimes

Die Tiere der **Propofol-Gruppe** (0,8 bis 1,2 mg/kg/min Disoprivan® 2 % und O_2/Luft; (Fraction of inspriratory oxygen [FiO_2] = 0,33) (n = 32) durchlaufen alle sechs Stadien der Operationsphase. Nach der Präparation wird die Isofluran/Lachgas Narkose auf eine Propofol-Narkose umgestellt.

Auch die Tiere der **Kontroll-Gruppe** (25 µg/kg/h Fentanyl-Janssen und O_2/N_2O; [FiO_2 = 0,33]) (n = 32) durchlaufen alle sechs Stadien der Operationsphase. Diese Gruppe erhält nach der Präparation eine Fentanyl/N_2O Narkose.

Die Tiere der **Nativ-Gruppe** (n = 8) sind unbehandelte Tiere, sie gehen ohne Manipulationen in den Versuch ein. Diese Gruppe dient der Erhebung normaler, physiologischer Vergleichswerte.

Während des Versuches werden folgende Parameter gemessen (siehe Tab. 1):

Tab. 1. Messparameter

Messzeitpunkte	Messparameter	Referenzbereich
Anfangswert 45 min Ischämie 15 min Reperfusion 45 min Erholung	Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)	75-120 mmHg
	Herzfrequenz (HF)	250-450 Schläge/min
	Arterieller pH-Wert (pH)	7,35-7,45
	Arterieller Sauerstoffpartialdruck (PaO_2)	> 80 mmHg
	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck ($PaCO_2$)	37-42 mmHg
	Gesamthämoglobin (Hb)	11-19 g/dl
	Glucose (Gluc)	65 mg/dl

Messzeitpunkte, Messparameter und Referenzbereiche während der operativen Phase
Referenzbereiche nach HAVENAAR et al. (1995)
Der MAP errechnet sich nach der Formel: MAP = Diastolischer Druck + [(Systolischer Druck – Diastolischer Druck) / 3]

Nach einer vorher festgelegten Überlebenszeit von einem, drei, sieben oder 28 Tagen (siehe Tab. 2) werden die Tiere in tiefer Narkose getötet und das Gehirn entnommen.

Tab. 2. Gruppenplan

Gruppenname	Nachuntersuchungszeitpunkt			
	1d	**3d**	**7d**	**28d**
Propofol-Gruppe (n = 32)	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Kontroll-Gruppe (n = 32)	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Nativ-Gruppe (n = 8)				

Gruppeneinteilung und Nachuntersuchungszeitpunkte; Gesamtversuchstieranzahl: 72

Das Gehirn wird nach der Dekapitierung des Tieres entnommen und bei -70 °C eingefroren. Der vordere Teil des Hippocampus wird in 7 µm dicke Scheiben für die Immunfluoreszenz-Färbung geschnitten, der hintere Teil für die Western-Blot-Analyse aufbereitet. Durch die Immunfluoreszenz-Färbung und die Western-Blot-Analyse wird das Gehirn qualitativ und semi-quatitativ auf die Apoptose-assoziierten Proteine Bcl-2, Mdm-2, Bax und p53 untersucht.

3.2.3 Narkoseeinleitung

Die Ratte wird in ein Glasgefäß gesetzt, in dem sich eine mit Halothan getränkte Zellstofflage befindet. Nach Eintritt der Bewusstlosigkeit wird das Tier entnommen und mit einem speziell angefertigten Laryngoskop (nach Steigenberger) intubiert und an ein halboffenes Narkosesystem ohne Rückatmung mit konstanter Frischgaszufuhr von mindestens 2 l/min und einer Gasabsaugung angeschlossen. Das Maul der Ratte wird mit feuchten Mullstücken ausgestopft, um zu verhindern, dass das Tier am Tubus vorbeiatmen kann (Cuff-Wirkung), und um das Maul feucht zu halten. Die Augen schützt man mit Dexpanthenol-Creme (Bepanthen® Augen und Nasensalbe, Fa. Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) und Mullstückchen vor einer Austrocknung. Über eine Beatmungspumpe (Harvard Rodent Ventilator, Modell 683, Harvard Apparatus Inc., South Natick, Massachusetts, USA) wird die Ratte mit einem Lachgas/Sauerstoff (N_2O/O_2)-Gemisch im Verhältnis 2:1 ($FiO_2 = 0,33$) und mit Isofluran (Forene®, Abbot GmbH, Wiesbaden) (in der Dosierung 1,0-1,5 Vol %, je nach Wirkung) kontrolliert beatmet. Diese Narkoseform wird während der gesamten Präparation beibehalten.

3.2.4 Präparation der Gefäße

Zur Präparation der Gefäße wird die Ratte in Rückenlage verbracht. Die rechte Halsseite sowie die rechte mediale Fläche des Oberschenkels besprüht man mit einem Desinfektionsmittel (Cutasept®F, Fa. Bode, Hamburg) und rasiert diese Stellen. Vor dem Eröffnen der Haut wird die Schnittstelle mit Bupivacain 0,5 % (Bucain 0,5 %, curasan®, Fa. Pharma AG, Kleinostheim) unterspritzt. Nach Eröffnen der Haut mit einem Skalpell in der rechten Inguinalgegend werden durch stumpfe Präparation die A. femoralis, die V. femoralis und der Nervus femoralis freigelegt und vorsichtig isoliert. Die Gefäße katheterisiert man mit Polyethylenkathetern (Außendurchmesser: 0,97 mm, Innendurchmesser: 0,58 mm, Länge: 33,5 mm, LL-Aufsatz, eigene Herstellung). Die Katheter werden vorher über Nacht in Heparin (Liquemin®F, Fa. Bode, Grenzach-Wyhlen, Hamburg) eingelegt und kurz vor der Präparation nochmals mit einer Heparin versetzten Vollelektrolytlösung (1000 I.E. Heparin

auf 500 ml Lösung) (Thomæjonin®, Fa. Braun AG, Melsungen) gespült, um einer Thrombosierung vorzubeugen. In die angeschlungene und eröffnete A. femoralis legt man einen angespitzten Katheter und befestigt ihn anschließend. Dieser Katheter dient zur arteriellen Blutdruckmessung (siehe Kapitel 3.2.6.2) und zur Entnahme von arteriellen Blutproben. Ein stumpfer Katheter wird in die angeschlungene und eröffnete V. femoralis eingeführt und anschließend fixiert. Dieser Katheter dient dem Blutentzug, um während der Ischämie die Hypotension zu induzieren. Nach Ablauf der ischämischen Phase reinfundiert man das entnommene Blut. Auf der rechten Halsseite wird die Haut paramedian caudoventral eröffnet. Durch stumpfes Präparieren im Fettgewebe erreicht man die V. jugularis zwischen dem Muskulus (M.) brachiocephalicus und M. sternooccipitalis im Sulcus jugularis. In die V. jugularis werden zwei Katheter, für die Gabe von Propofol (Disoprivan 2 %), von Muskelrelaxans (Rocuroniumbromid, Esmeron®, Fa. Organon, Oss, Niederlande) und 8,4 % Natriumhydrogencarbonatlösung (Fa. Delta Pharma, Puffingen) eingeführt. Ein um diese Katheter gewickeltes Hämostyptikum (Tabotamp®, Ethicon, Norderstedt) stoppt kleine Blutungen. Tiefer gelegen, ventrolateral der Trachea, findet man die A. carotis communis. Diese wird vorsichtig vom Nervus vagus getrennt und mit einem 1 mm dicken Gummiband unterlegt. Dies erleichtert das schnelle Wiederauffinden des Gefäßes, um die Blutzufuhr zu Beginn der Ischämiephase mit Hilfe eines Clips für 45 min zu unterbrechen.

3.2.5 Aufrechterhalten der Anästhesie während der Ischämie

Während der Präparation wird eine Narkose mit Isofluran (in der Dosierungsform je 1,0-1,5 Vol %, nach Wirkung) und einem Lachgas/Sauerstoff (N_2O/O_2)-Gemisch im Verhältnis 2:1 (FiO_2 = 0,33) durchgeführt. Gegen Ende der Präparation wird die Narkose auf die gruppenspezifische Anästhesie umgestellt und bis zum Ende des Versuchs nicht mehr geändert. Nach der Umstellung beginnt die Äquilibrierungsphase.

Die Propofol-Gruppe bekommt 1,0 mg/kg/min Propofol (Disoprivan® 2 %, AstraZeneca GmbH, Wedel) und O_2/Luft im Verhältnis 1:2 (FiO_2 = 0,33). Gleichzeitig wird dem Tier ein Muskelrelaxans Rocuronium (Esmeron® 10 mg/ml, Fa. Oraganon, Oss, Niederlande) in der Dosierung von 17,3-23,3 mg/kg/h verabreicht. Die Kontroll-Gruppe erhält eine Narkose aus 25 µg/kg/h Fentanyl (Fentanyl-Janssen, JANSSEN-CILAG GmbH, Neuss) und N_2O/O_2 im Verhältnis 2:1 (FiO_2 = 0,33). Auch hier wird Rocuronium in der Dosierung von 17,3-23,3 mg/kg/h verabreicht. Rocuronium ermöglicht eine konstante Beatmung der Tiere. Ebenso wird ein Rigor der Muskulatur verhindert, welche bei Gabe von Fentanyl auftreten kann. Gegen Ende des Versuches wird die Konzentration von Propofol langsam verringert, da eigene Beobachtungen zeigen, dass die Ratten, die eine höher dosierte Propofol-Narkose

erhalten, sonst oft einen zähen Speichel produzieren und dadurch die Atmung nach der Extubation erschwert wird.

3.2.6 Parameter der Narkoseüberwachung

3.2.6.1 Temperaturmessung

Gemessen wird die perikranielle (T. peri) und die rektale Temperatur (T. rec). Der Parameter T. peri wird anstatt der eigentlichen Hirntemperatur ermittelt, da dies aufgrund des Versuchsaufbaus nicht möglich ist. Dahzu befestigt man eine Sonde (0,2 mm dick und 1,5 cm lang/Hypodermic needle probe Typ T thermocouple, Fa. Omega, Stanford, CT, USA) im M. temporalis. Sie steht über einen Rückkopplungsmechanismus mit einem Temperatur-Kontrollgerät (Fa. Omega, Stanford, CT, USA) und einer Wärmelampe in Verbindung. So wird die T. peri konstant auf 37,5 °C gehalten. Die T. rec wird mit einem Fieberthermometer gemessen.

3.2.6.2 Blutdruckmessung

Gemessen werden der systolische (SAP), diastolische (DAP) und der mittlere arterielle (MAP) Druck. Dies erfolgt über eine mit dem Druckdom verbundene Messapparatur (Cardiocap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland). Vor jedem Versuch wird der Druck gegen den atmosphärischen Druck kalibriert. Als Gegendruck zum arteriellen Blutdruck dient ein Beutel mit NaCl-Lösung 0,9% in einer aufgeblasenen Druckmanschette.

3.2.6.3 Elektrokardiogramm

In Rückenlage werden zur Messung des Elektrokardiogramms zwei Elektroden subcutan in Höhe der Achselhöhlen ca. 1 cm vom Brustbein entfernt angebracht. Diese stehen mit einer Messapparatur (Cardiocap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) in Verbindung. Auf einem Monitor wird die Herzfrequenz dargestellt.

3.2.6.4 Elektroenzephalogramm

Für die Ableitung des Elektroenzephalogramms (Oscilloscope, Hameg 20 MHz, HM205-3, Frankfurt) werden fünf Sonden platziert: zwei Sonden lateral der Augenwinkel und zwei weitere über den Ohransätzen. Die fünfte ist an der Schwanzwurzel eingestochen. Die Daten werden auf einem Bildschirm dargestellt und auf einem Computer gespeichert. Sie stehen so für spätere Analysen zu Verfügung.

3.2.6.5 Atemgasmessung

Über einen Atemgasmonitor (Capnomac, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) wird die Atemfrequenz sowie die inspiratorischen O_2-, entidalen CO_2- und die inspiratorischen und exspiratorischen N_2O- und Isofluran-Werte dargestellt.

3.2.6.6 Blutgasanalyse

Zu festgelegten Zeitpunkten werden PaO_2, $PaCO_2$, pH-Wert und Gesamthämoglobin gemessen. Dazu gibt man aus der A. femoralis entnommendes Blut über eine heparanisierte Kapillare in ein Blutgasanalysegerät (BGA, pH/Blutgasanalyzer 865, Fa. Bayer Diagnostics, Fernwald). Dieses bestimmt zusätzlich zu den genannten Parametern auch den Basenexzess, Standardbikarbonat und Hämaktrokrit.

3.2.6.7 Blutglucosemessung

Der Blutglucosegehalt wird mit einem Schnelltestgerät (Glucometer Elite®, Fa. Bayer Diagnostics, München) gemessen.

3.2.7 Versuchsdurchführung

Am Ende der Präparation erfolgt die Narkoseumstellung entsprechend der Gruppeneinteilung (Propofol-O_2/Luft oder Fentanyl-N_2O/O_2). Damit beginnt die Äquilibrierungsphase.

3.2.7.1 Äquilibrierung

Um gleiche Ausgangswerte nach der Narkoseumstellung für die Phase der Ischämie zu gewährleisten, beginnt man mit der Einleitung der Ischämie erst nach einer Äquilibrierungsphase von 52 min. In dieser Zeit kommt es zu einer Stabilisierung des Kreislaufes (steady state). Gegen Ende dieser Phase werden die Basiswerte ermittelt.

3.2.7.2 Hypoperfusion

Nach der Äquilibrierung entzieht man über den in der V. femoralis liegenden Katheter in einem Zeitraum von 8 min so viel Blut, bis ein MAP von 40 mmHg erreicht ist (ca. 6 bis 10 ml Blut). Mit einem Clip verschließt man dann die A. carotis communis. Das Blut wird bis zur Reperfusion in heparinisierten 5 ml Spritzen in der Hand geschwenkt und gewärmt.

3.2.7.3 Ischämie

Die Ischämiephase dauert 45 min. In dieser Zeit ist die rechte A. carotis communis mit einem Clip verschlossen und der MAP wird konstant auf 40 mmHg durch Entnahme und Rückgabe von Blut gehalten. Gegen Ende der Ischämie werden erneut eine Blutgasanalyse und weitere

Messparameter erhoben (siehe Kapitel 3.2.6) und dokumentiert. Während der gesamten Ischämie-Phase bekommt das Tier zur Vorbeugung einer Azidose Baseexcess-abhängig 8,4% Natriumhydrogencarbonat i.v.. Die Gabe von Rocuronium wird während dessen unterbrochen. Die Abb. 8 zeigt eine Ratte während der Ischämie-Phase.

3.2.7.4 Reinfusion/Reperfusion

Zu Beginn der 15 min dauernden Reinfusion/Reperfusionsphase wird der Clip der A. carotis communis geöffnet und das Blut langsam reinfundiert. Die Tiere werden in dieser Zeit vermehrt beatmet, um über eine gesteigerte Atemfrequenz das CO_2 des zurückgeführten venösen Blutes abzuatmen. Am Ende dieser Phase werden erneut die Messwerte bestimmt.

3.2.7.5 Erholungsphase

Gegen Ende der 45 min dauernden Erholungsphase wird die Narkosetiefe reduziert. Dies ist besonders bei der Propofol-Gruppe wichtig, da ansonsten aus eigener Erfahrung der Speichel der Ratten nach dieser Narkose sehr zäh ist und die Tiere am Atmen hindern kann. Gegen Ende der 45 min werden nochmals die Messparameter erhoben und dokumentiert.

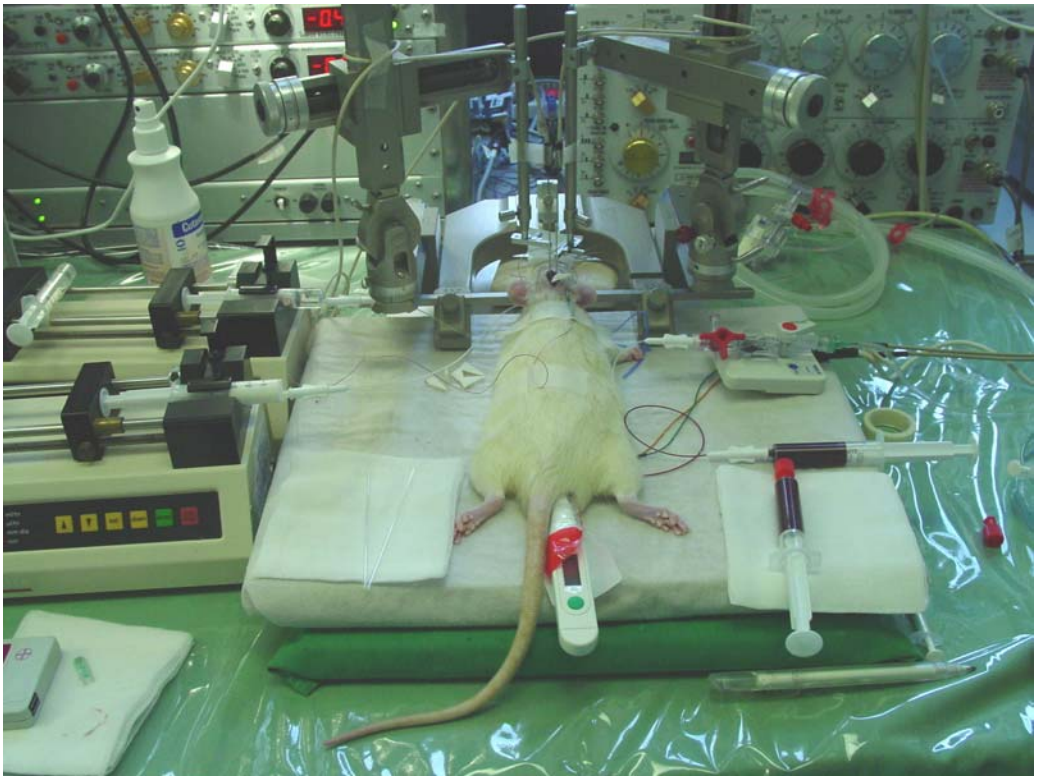


Abb. 8 Übersicht über den Operationsplatz während der Ischämie-Phase

3.2.8 Vorbereitung der Analyseverfahren

(Die genaue Bezeichnung sowie Herstellerfirma, Ort und Land aller verwendeten Antikörper, Chemikalien, Lösungen, Geräte und Verbrauchsmaterialien finden sich zusammengefasst im Kapitel 3.2.11.)

3.2.8.1 Hirnentnahme

Nach Ablauf der dem Versuchstier randomisiert zugeteilten Überlebensspanne von eins, drei sieben oder 28 Tagen wird es in tiefer Narkose durch einen Genickbruch getötet. Die Schädeldecke wird freipräpariert und das Os occipitale und Os parietale werden vorsichtig entfernt. Das Gehirn wird in eine mit Kryoprotektionsmedium (Tissue Freezing Medium®, Fa. Jung, Leica Instruments, Nussloch) gefüllte Aluminiumschale verbracht, ganz mit dem Medium bedeckt und in ein Gefäß mit Methylbutan auf Trockeneis gestellt. Nachdem das Gewebe vollständig durchgefroren ist, kann man es bei -70 °C aufbewahren.

3.2.8.2 Anfertigung der Hirnschnitte

Mit einem Präzisions-Gefrier-Mircrotom werden von den Gehirnen 7 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Kammer, in der sich das Schneidegerät befindet, hat eine Raumtemperatur von -23 °C. Das Messer, der Kühltisch und die Objektträger (OT) werden auf -20 °C gekühlt. Das Gehirn wird mit Tissue Freezing Medium® auf dem Objekttisch befestigt. Das überflüssige Kryoprotektionsmedium wird vorsichtig entfernt. Mit Hilfe von Trimmschnitten (15 µm Dicke) wird die Schnittebene 33 nach PAXINOS und WATSON (1998) (Bregma -2,3 mm) eingestellt. Danach werden ca. 100 7 µm dicke Schnitte angefertigt. Es werden immer zwei Gehirnschnitte mit der nicht-ischämischen Gehirnhälfte zum Beschriftungsrand einheitlich aufgezogen und bis zur Färbung und Auswertung am Laserscan-Mikroskop bei -70 °C gelagert.

3.2.8.3 Western-Blot Probenaufbereitung

Für die Western-Blot-Analyse wird aus dem nach dem Schneiden verbleibenden Hippocampusgewebe der ischämischen und nicht-ischämischen Hemisphäre jeweils ein 1 x 2 x 3 mm großes Stück isoliert und der Proteingehalt mittels photometrischer Messung ermittelt. Dabei ist darauf zu achten, dass sich das Gehirngewebe niemals auf > 4 °C erwärmt. Ein Stück aus der ischämischen und nicht-ischämischen Hemisphäre des Hippocampus kommen jeweils zusammen mit 12 Kugeln (2,5 mm Zirconia beads) zur mechanischen Lyse und 300 µl Lysispuffer und eine Protease Inhibitor Tablette zur chemischen Lyse in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß. Diese zwei Gefäße kommen für 12 min bei 4 °C und 30 Schüttelbewegungen/sec in eine Schwingmühle. Danach werden die Proben 10 min bei 4 °C und 13000 U/min zentrifugiert. Aus dem Überstand entnimmt man jeweils 220 µl und gibt dies in ein neues gekühltes Eppendorfgefäß und versetzt es mit 440 µl gepuffertem Natriumphosphat (engl.: phospored buffered sodium [PBS])-Dulbecco-Lösung.

Um den Proteingehalt der Apoptose-assoziierten Proteine (Bcl-2, Mdm-2, Bax und p53) mit Hilfe der photometrischen Messung ermitteln zu können, stellt man eine Protein-Standardreihe her. Bovines Serum-Albumin (BSA) wird als Standard-Protein verwendet. Die Protein-Standardreihe wird aus einer Stammlösung von 0,1 g BSA auf 10 ml PBS-Dulbecco in den Konzentrationen 2,0; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05; 0,02 mg/ml hergestellt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet man ein modifiziertes Verfahren nach BRADFORD (1976). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue R-250 von 465 nm auf 595 nm Wellenlänge bei Bindung an ein Protein verschiebt. Es werden 10 ml Bio-Rad ProteinAssay mit 40 ml doppelt destilliertem Wasser (ddH_2O) gemischt. Davon kommen jeweils 1000 µl in 1,5 ml Einmalküvetten, in der man weiter 5 µl der Standardreihe oder 5 µl Probe gibt. Innerhalb einer Stunde wird mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm das Absorptionsmaximum der Standardreihe gemessen und aus den Werten eine Standardkurve erstellt. Im Vergleich dazu werden die Proben gemessen. Eine Doppelmessung erkennt Pipettierfehler. Abweichungen bis 20 % liegen im tolerablen Bereich. Bei Abweichung über 20% muss die Messung wiederholt werden.

Für die Western-Blot-Analyse müssen die Proteinmengen in den Proben mit Hilfe des Dreisatzes auf den kleinsten gemessenen Proteingehalt mit einem Endvolumen von 600 µl angeglichen werden. Anschließend werden den angeglichenen Proben jeweils 600 µl PBS und 400 µl reduzierendem Natriumlaurylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfat [SDS])-Probenpuffer hinzugefügt. Dieses Gemisch wird bei 95 °C für 5 min aufgekocht, um eine lange

Lagerfähigkeit zu gewährleisten. Von der so hergestellten Lösung stehen 600 µl für die Western-Blot-Analyse zur Verfügung. Der Rest wird als Reserve bei einer Temperatur von mindestens -70 °C eingefroren.

3.2.9 Immunfluoreszenz-Färbung

Mit der Immunfluoreszenz-Färbung werden die Apoptose-assoziierten Proteine Bcl-2, Mdm-2, Bax und p53 qualitativ, semi-quantitativ und räumlich identifiziert. Es werden für jedes Tier pro Antikörper 10 Schnitte gefärbt. Auf einem Objektträger (OT) sind jeweils zwei Gehirnschnitte befestigt. Pro Antikörper werden zwei OT gefärbt, jeweils einer aus dem rostralen und dem kaudalen Bereich der Schnittebene 33 (PAXINOS und WATSON 1998). Jeweils ein OT mit zwei Leberschnitten eines Nativ-Tieres wird für die vier Apoptose-assoziierten Proteine als Positivkontrolle gefärbt, da in der Leber die gesuchten Proteine in großer Zahl vorkommen (HARADA et al. 2000; PAPAKYRIAKOU et al. 2002). Zusätzlich wird ein OT mit zwei Hirnschnitten und ein OT mit zwei Leberschnitten eines Nativ-Tieres als Negativkontrolle gefärbt. Die Schnitte des Nativ-Tieres werden als Erfolgs- und Qualitätskontrolle der Färbung angefertigt. Insgesamt werden 14 OT pro Tier gefärbt.

Genauer Färbevorgang:
Die bei -70 °C gelagerten OT werden aus der Tiefkühltruhe entnommen, beschriftet, in einem Objektträgerhalter aufgereiht und in einer mit 100 % Ethanol gefüllten Standküvette bei Raumtemperatur für 10 min fixiert. Die Fixierung erfolgt durch Wasserentzug. Die OT werden nun in eine Standküvette, gefüllt mit gepufferten Natriumphosphat mit Tween (PBST; engl.: phosphored buffered sodium and tween), verbracht und für 30 min auf eine Schüttel-maschine gestellt. Während dieses Waschvorganges erfolgt die Herstellung des Blockierungs-mediums. Dazu wird mit den Reagenzien fetales Kälberserum (FKS) und PBST eine 10 % FKS-Lösung angemischt. Sie dient zur Absättigung von elektrostatischen Ladungen der Proteine im Untersuchungsgut und verhindert so eine unspezifische Anfärbung. Die Lösung wird auf Eis gelagert. Eine feuchte Kammer wird mit etwas Wasser gefüllt. Nach dem Waschvorgang entfernt man durch Schütteln der einzelnen OT die Flüssigkeit, die Rückseite wird mit einem Papiertuch abgetrocknet und der Rand um die Gehirnschnitte wird vorsichtig mit einem Papiertuch abgewischt. Mit einem Fettstift umrandet man die Gehirnschnitte und pipettiert darauf 500 µl 10 % FKS-Lösung als Blockierungsmedium. Die OT werden bei Zimmertemperatur in die feuchte Kammer verbracht (siehe Abb. 9), die dann verschlossen wird. Die Blockierungszeit beträgt 60 min.

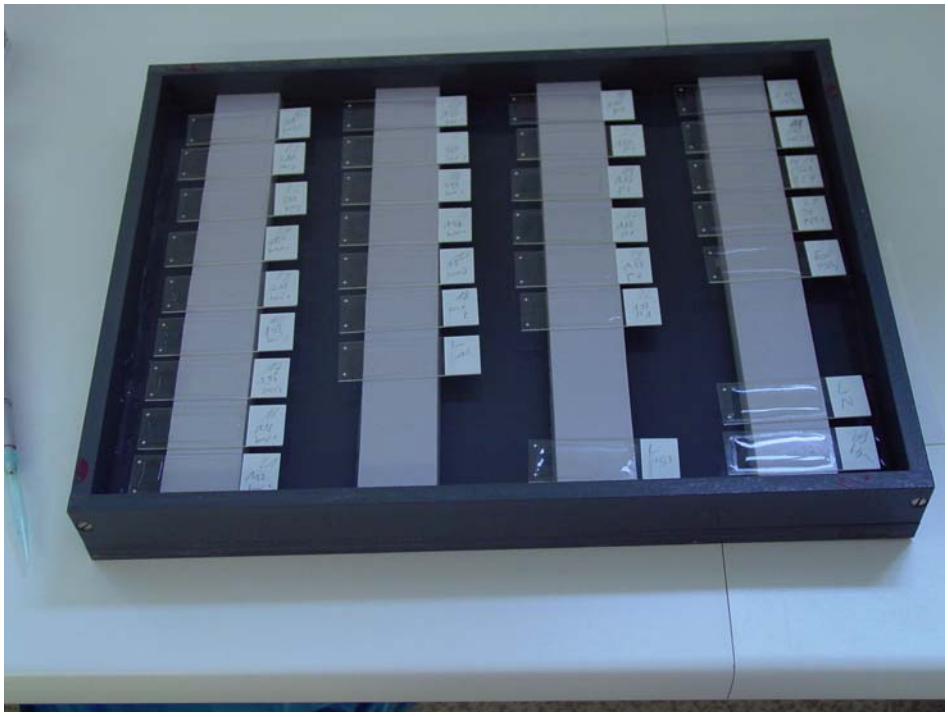


Abb. 9 Mit Objektträgern bestückte feuchte Kammer

Für den nächsten Färbeschritt wird in dieser Zeit die 1. Antikörper-Lösung hergestellt. Es werden für die vier verschiedenen Antikörper jeweils 1500 µl einer 10%igen FKS-Lösung angefertigt. Dazu kommen jeweils entweder 18,75 µl Bax P-19 und Bax I-19 Antikörper, 25 µl Bcl-2 Antikörper, 18,75 µl p53 Antikörper oder 25 µl Mdm-2 Antikörper. Das ergibt eine Verdünnung für p53 und Bax von 1:80 und für Bcl-2 und Mdm-2 von jeweils 1:60.

Es werden folgende Antikörper verwendet:

Bax (P-19) cat # sc-526 rabbit polyclonal IgG
Bax (I-19) cat # sc-930 rabbit polyclonal IgG
Bcl-2 (C 21) cat # sc-783 rabbit polyclonal IgG
p53 (FL-393) cat # sc-6243 rabbit polyclonal IgG
Mdm-2 (C-18) cat # sc-812 rabbit polyclonal IgG

Die mit dem Antikörpergemisch gefüllten TPP-Röhrchen werden auf Eis gelagert. Im Anschluss an die Blockierung wird die Blockierungslösung von den OT durch Schütteln entfernt und 500 µl des ersten Antikörpergemischs darauf pipettiert. Die Negativkontrollen bleiben mit der Blockierungslösung benetzt in der feuchten Kammer. Die Inkubationszeit beträgt 60 min. Im nächsten Schritt entfernt man durch Schütteln der einzelnen OT das Antikörpergemisch, sortiert sie in einen Objektträgerhalter ein und verbringt diesen in eine

Standküvette. Dort werden sie in PBST 40 min auf einer Schüttelmaschine gewaschen. Das PBST wird mehrmals gewechselt. Die Negativkontrollen verbleiben in der feuchten Kammer. Kurz vor Ende des Waschvorganges wird ein TPP-Röhrchen mit 7000 µl 10 % FKS-Lösung gefüllt. Nach Abdunklung des Arbeitsraumes füllt man zusätzlich zu der Lösung 8,75 µl des 2. enzymkonjugierten Antikörpers: 488 goat anti-rabbit IgG (H+L).

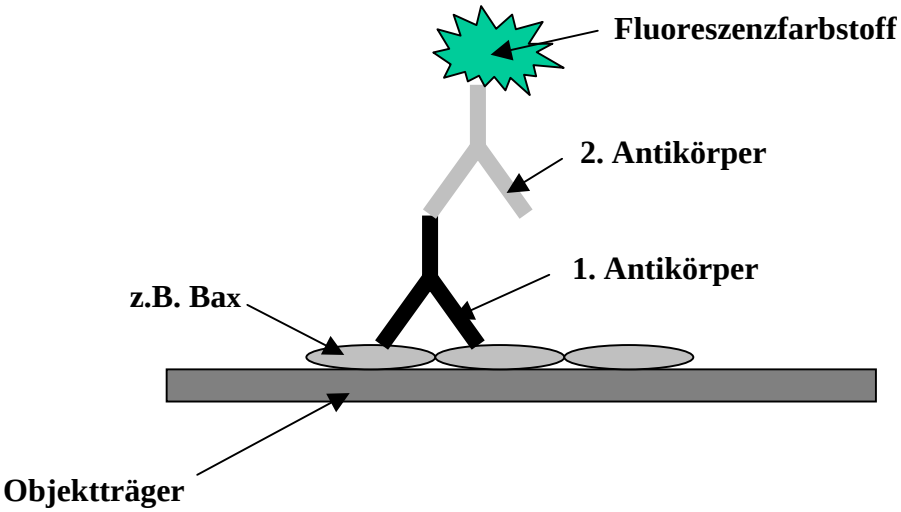


Abb. 10 Schematische Darstellung der Antikörperbindung an das Zielprotein

Der 2. Antikörper ist durch seinen Immunfluoreszenzfarbstoff sehr lichtempfindlich. Um eine Lichtexposition auf ein Minimum zu beschränken, erfolgen alle weiteren Arbeitsschritte im abgedunkelten Raum. Nicht gebundene bzw. unspezifisch gebundene Antikörper werden von den Schnitten heruntergewaschen. Im Anschluss an den Waschvorgang wird die Flüssigkeit von den OT entfernt, die Rückseite mit einem Papiertuch getrocknet und diese wieder in die feuchte Kammer verbracht. Auf die Schnitte pipettiert man 500 µl der zweiten Antikörper-suspension und schließt die Kammer. Die Inkubationszeit beträgt 60 min. Die OT werden nochmals für 10 min im Dunkeln mit PBST gewaschen. Anschließend bedeckt man im abgedunkelten Raum die Hirnschnitte mit Deckgläsern. Dazu entfernt man die Waschlösung und trocknet die Rückseite des OT. An den Rand des OT wird ein Tropfen Mounting Medium gegeben und das Deckglas blasenfrei aufgelegt. Das Mounting Medium verhindert einen Intensitätsverlust des Fluoreszenzfarbstoffes des 2. Antikörpers. Mit klarem Nagellack wird das Deckglas umrandet, um ein Austrocknen zu verhindern. Die OT lagert man in einer

lichtundurchlässigen Objektträgerbox im Kühlschrank bei 4 °C, um sie nach maximal 24 Stunden mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop zu beurteilen.

Schema der Immunfluoreszenz-Färbung:

10-minütige Fixierung in 100 % Ethanol
30-minütiger Waschgang in PBST; 2x PBST wechseln
90-minütige Blockierung mit 10 % FKS-Lösung
60-minütige Inkubation mit dem 1. Antikörper
40-minütiger Waschgang in PBST; 4x PBST wechseln
60-minütige Inkubation mit dem 2. Antikörper im Dunkeln
10-minütige Waschgang in PBST im Dunkeln, 1x PBST
Eindecken der Schnitte mit Mounting Medium im Dunkeln
Lagerung bei 4 °C

3.2.9.1 Dokumentation am konfokalen Laserscan-Mikroskop

Innerhalb 24 h nach der Immunfluoreszenz-Färbung werden die Gehirnschnitte mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop (CLSM) betrachtet und die Bilder dieser Schnitte mit einer speziellen Software (LSM 410) auf einem Computer gespeichert. Dokumentiert werden die CA1- und die CA3-Region des Hippocampus. Mit dem Mikroskop wird die Qualität der Gehirnschnitte beurteilt. Eingestellt werden der benötigte Immunfluoreszenzfilter Fluoresceinisothiocyanat und das Objektiv. Auf jedem OT sind zwei Schnitte. Der qualitativ hochwertigere Schnitt geht in die Analyse ein. Die gesuchten Regionen werden eingestellt und jeweils zwei unterschiedliche Stellen der CA1- und CA3-Region des Hippocampus werden mit dem Laser abgetastet und gespeichert.
Für die semiquatitative Analyse werden standardisierte Einstellungen verwendet wie sie 0 zu entnehmen sind.

Einstellung des konfokalen Laserscan-Mikroskops

Lochblende (Pinhole)	14
Emissionsfilter	Bandpass 512-565 nm
Anzahl der gemittelten Bilder (Average Mode Number)	8

Einstellungen des konfokalen Laserscan-Mikroskops

Gearbeitet wird mit einem blauen Argon-Laser bei der Wellenlänge von 488 nm und einer maximalen Leistung von 25,0 mW. Durch dieses Laserlicht wird der Immunfluoreszenzfarbstoff angeregt und das emittierte Licht gemäß der Einstellung des Emissionsfilters detektiert.
Der Laser braucht eine Warmlaufphase von einer halben Stunde. Mit einem „Powermeter" wird die konstante Laserintensität in regelmäßigen Abständen geprüft.

Besonderheiten des konfokalen Laserscan-Mikroskops:

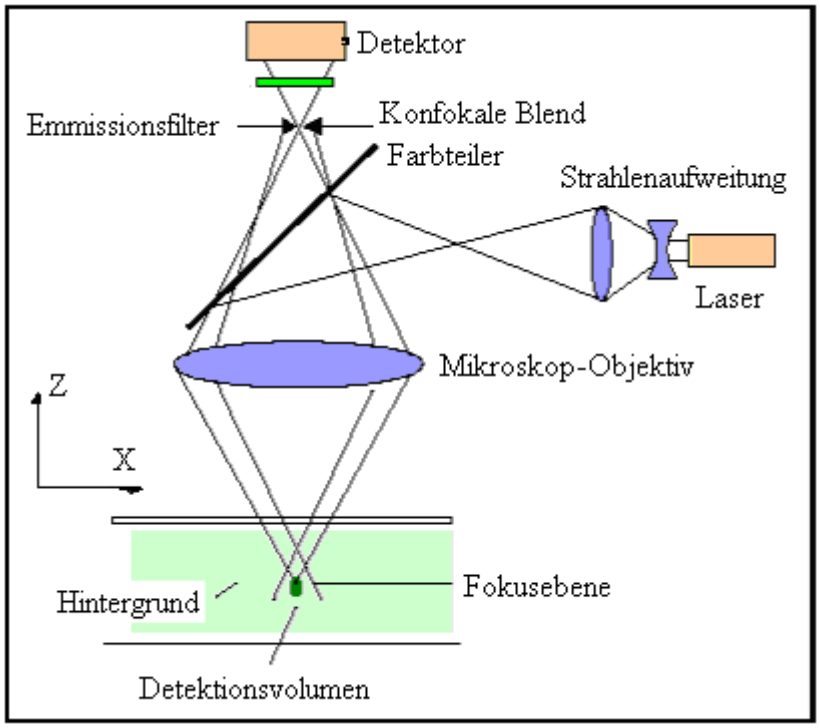


Abb. 11 Modifizierte Darstellung des prinzipiellen Strahlenganges eines Laserscan-Mikroskops nach WILHELM et al. (2000)

Mikroskopische Bilder entstehen in einem konfokalen Laserscan nur rein rechnerisch, da im Gegensatz zum herkömmlichen Mikroskop, bei dem die gesamte Fläche eines Präparates beleuchtet wird, der Laser nur einzelne Punkte des Objekts abtastet und diese dann rechnerisch zu einem Bild zusammensetzt. Der entscheidende Unterschied ist aber eine konfokale Lochblende (Pinhole). Durch diese wird beim CLSM nur Licht detektiert, welches das Pinhole passieren kann. Die Öffnung ist variabel und sollte möglichst klein (Pinhole 14 [1,03 Airy]) gewählt werden. Eine Fokussierung des emittierenden Lichtes auf die konfokale Lochblende ermöglicht eine Abbildung eines Präparationsbildes aus der Tiefe eines „dicken" Schnittes. Es ist also möglich, verschiedene Ebenen eines Schnittes zu fokussieren.
Die Abb. 11 verdeutlicht den prinzipiellen Strahlengang eines Laserscan-Mikroskops.

3.2.9.2 Auswertung

Die Auswertung der vom Laser abgetasteten und gespeicherten Bilder erfolgt mit Hilfe des Computerprogramms KS400. Mit Hilfe des Programms erstellt man eine Maske, die der Fläche der markierten Zellen der CA1- und CA3-Regionen des Hippocampus entspricht. Das Programm errechnet die Lichtintensität der markierten Fläche und subtrahiert die Lichtintensität der unspezifischen Anfärbung des Hintergrundes. Gemessen wird der Mittelwert der Intensität der Fluoreszenz pro Fläche der Regionen. Dieser Wert geht in die Auswertung ein.

3.2.10 Western-Blot-Analyse

3.2.10.1 Gel-Herstellung

Für die semiquantitative Analyse der Proben mit Hilfe der Western-Blot-Analyse müssen zuerst Gele gegossen werden. Für Bax und Bcl-2 benötigt man jeweils ein 15%iges, für p53 ein 10%iges und für Mdm-2 ein 7%iges Trenngel.

Daraus ergibt sich die Zusammensetzung der Gele wie in Kapitel 3.2.11 beschrieben.

Je höher der Polyacrylamid-Anteil ist, umso kleinmaschiger ist das Gel. Nach diesem Kriterium werden die Gele für die Antikörper ausgewählt, da die Proteine der Probe sich so je nach ihrer Größe im Gel auftrennen. Für kleine Proteine (z.B. Bax: 21 kD) verwendet man Gele mit hohem Polyacrylamid-Anteil, für große Proteine (z.B. Mdm-2: 90 kD) Gele mit niedrigem Polyacrylamid-Anteil. Die Gele werden zwischen zwei horizontale Glasplatten mit einem Abstand von 1,5 mm gegossen. Nach ihrer vollständigen Polymerisation gießt man oben auf das Trenngel ein 5%iges Sammelgel (siehe Kapitel 3.2.11). In das Sammelgel werden Kämme gesteckt. So entstehen 15 Taschen, in die man später die Proben pipettieren kann. Die Gele sollten vor dem Gebrauch für 24 Stunden feucht bei einer Temperatur von 4 °C gelagert werden, damit sie vollständig polymerisieren können (WESTERMEIER 1997).

3.2.10.2 Bestückung der Gele und Elektrophorese

Bevor man die Geltaschen mit Proben füllen kann, müssen die Gele wieder Raumtemperatur erreichen und verschiedene Lösungen hergestellt werden. Zusätzlich mit den Proben läuft ein Standard (STD) dreimal pro Gel mit. Das Herstellungsverfahren des Standards entspricht dem der Proben (siehe Kapitel 3.2.8.3). Der STD wird nach der Anfertigung sofort aliquotiert, bei -20 °C eingefroren und für jede Western-Blot-Analyse frisch aufgetaut und im Thermomixer bei 95 °C bei 500 U/min für 5 min gekocht. Ein Rainbow-Marker wird ebenso pipettiert. Er trennt sich in verschiedene Farben je nach Proteingröße auf. Da die Kilodaltonzahl der gesuchten Proteine bekannt ist, kann man im Vergleich zum Rainbow-Marker die gesuchte Bande finden. Rainbow-Marker werden von Firmen kommerziell hergestellt und verkauft. In den beiden äußeren Taschen läuft ein „Platzhalter“ (X) aus reinem PBS und SDS im Verhältnis 3:1 mit. Dies verhindert, dass sich die Probenbanden durch die elektrostatische Anziehung der Glasplattenränder verformen. Es werden 20 µg Protein pro Tasche pipettiert, was einer Menge von ca. 30-40 µl entspricht.

Die Taschen werden nach folgendem Schema befüllt (siehe Abb. 12):
Platzhalter (X), X, Standard (STD), 4x Probe (P), STD, 4x P, STD, X, Rainbow-Marker (RM).

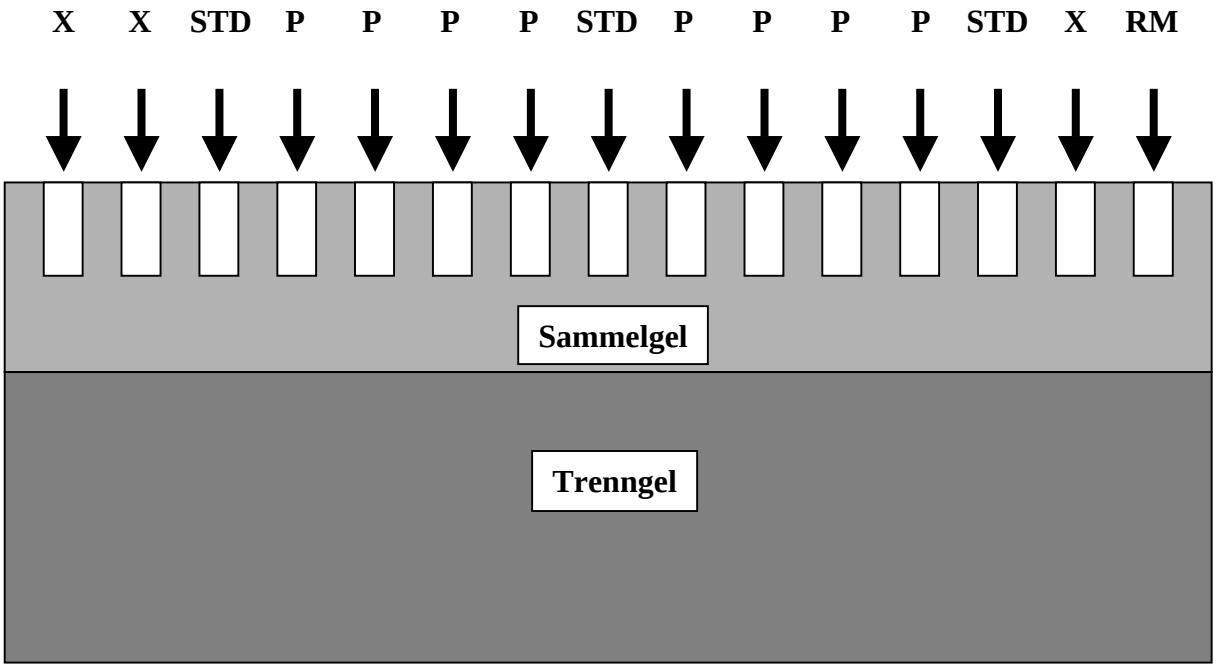


Abb. 12 Pipettierschema des Western-Blot Gels

Das Gel wird senkrecht in die Elektrophoresekammer eingespannt. Oben und unten steht es mit Laufpuffer (1x SDS) in Kontakt, was den Stromfluss ermöglicht. In der Zeitspanne von 3,5 h werden bei einer Gleichspannung von 200 V die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Bei dem hier beschriebenen Verfahren handelt es sich es um ein diskontinuierliches Gelelektrophoresesystem nach Laemmli (LAEMMLI 1970).

3.2.10.3 Proteintransfer

Zum semiquatitativen Nachweis der Proteine müssen diese erst von dem Gel auf eine spezielle Blot-Membran aus Polyvinylidendifluorid transferiert werden. Bei der gewählten Porengröße von 0,45 µm ist sichergestellt, dass die gesuchten Proteine auf der Membran haften bleiben.
Die Graphitplatten der Transfergeräte werden mit ddH_2O abgerieben, um sie zu neutralisieren. Es werden je vier Whatmanpapiere mit Anodenpuffer I und je zwei Whatmanpapiere mit Anodenpuffer II getränkt. Sechs weitere Whatmanpapiere legt man in Kathodenpuffer ein.

Die Membran legt man in 100 % Ethanol. In die Kammer kommen diese getränkten Whatmanpapiere, die Membran und das Gel nach folgendem Schema:

Oben (Kathode -)

6 Whatmanpapiere mit Kathodenpuffer

Polyacrylamidgel

Polyvinylidendifluorid Membran (PVDF-Membran)

2 Whatmanpapiere mit Anodenpuffer II

4 Whatmanpapiere mit Anodenpuffer I

Unten (Anode +)

Die folgende Abbildung zeigt schematisch eine gefüllte Transferkammer:

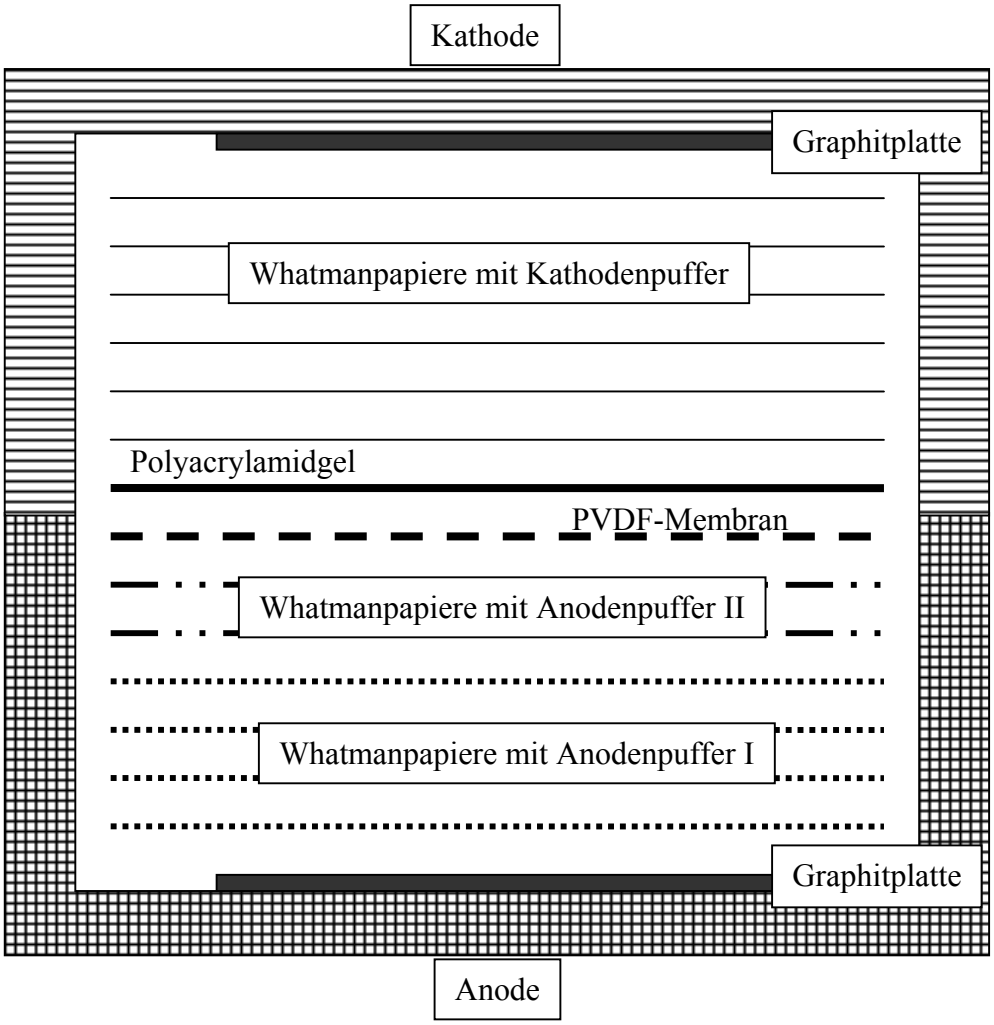


Abb. 13 Schematische Darstellung der Transferkammer

Wichtig ist, dass alle Schichten blasenfrei aufeinander liegen. Ebenso müssen vorher das Whatmanpapier und die Membran auf die Größe des Gels geschnitten werden. Der Transfervorgang dauert 2 h bei 200 mA. Im Anschluss daran wird die Membran für 30 min in einer Plastikschale in PBST gewaschen.

3.2.10.4 Immunoblot

Eine unspezifische Bindung wird durch das Blockieren der Membran mit einer 10 % FKS-Lösung oder mit einer Lösung aus trockenem Milchpulver und PBST (10 % Milchlösung) erreicht. Es kommt zu einer Absättigung der elektrostatischen Ladungen der Membranproteine. Dazu gibt man die Membranen, auf denen p53 und Bax detektiert werden sollen, in eine mit 10 ml 10 % FKS-Lösung gefüllte Plastiktüte und die Membranen, mit denen Mdm-2 und Bcl-2 detektiert werden sollen, in Tüten mit 10 ml 10%iger Milchlösung und schweißt diese blasenfrei ein. Diese kommen für 90 min auf den Schüttler. Währendessen werden die 1. Antikörper in einer Zentrifuge bei 4 °C und 13000 U/min für 3 min zentrifugiert.

Folgende Antikörper werden benützt:

Bax (I-19) cat # sc-526 rabbit polyclonal IgG
p53 (DO-1) cat # sc-126 mouse monoclonal IgG
Bcl-2 (C-2) cat # sc-7382 mouse monoclonal IgG
Mdm-2 (C-18) cat # sc-812 rabbit polyclonal IgG

Bei einer Verdünnung von 1:200 werden jeweils 50 µl der Antikörper Mdm-2 und Bcl-2 in je 10 ml 10 % Milchlösung gemixt und zusammen mit den Membranen blasenfrei in einer Plastiktüte eingeschweißt. Von den Antikörpern Bax und p53 nimmt man ebenso jeweils 50 µl in je 10 ml 10 % FKS-Lösung und verfährt wie oben beschrieben. Die Membranen werden über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag werden sie 45 min in einer Plastikschale in PBST bei Raumtemperatur gewaschen. Mit einer Verdünnung von 1:2000 werden jeweils 5 µl von dem 2. Antikörper (cheep anti-mouse Ig) für die Proteine Bcl-2 und p53 jeweils 5 µl von dem 2. Antikörper (donkey anti-rabbit Ig) für die Proteine Bax und Mdm-2 in 10 ml der Trägerlösung verwendet. Für die Detektion der Proteine Bax und p53 wird der Antikörper in 10 ml 10 % FKS-Lösung und für die Proteine Mdm-2 und Bcl-2 in 10 ml 10 % Milchlösung gemischt und blasenfrei in eine Tüte eingeschweißt. Nach der Inkubationszeit von 1,5 h auf dem Schüttler werden die Membranen nochmals 45 min in PBST gewaschen.

3.2.10.5 Entwicklung und Dokumentation mit Hilfe der Image Station

Mit Hilfe der Image Station und einer speziellen Software (Kodak 1D 3.5) werden die gesuchten Proteine dargestellt. Dazu werden je 6 ml zweier Entwicklungslösungen (Oxidizing Reagent und Enhanced Luminol Reagent) in eine Plastikschale gegeben und gemischt. Die Membran wird in dieser Lösung für 1 min inkubiert und dann blasenfrei auf die Image Station gelegt. Die Bilder, welche die in der Image Station eingebaute Digitalkamera in periodischen Zeitabständen aufnimmt, werden an einen Computer weitergeleitet. Die Software verarbeitet die Informationen und stellt sie als endgültiges Bild dar. Zum Nachweis des vollständigen Proteintransfers vom Gel auf die Membranman färbt man das Gel eine halbe Stunde in einer Coomasie-Färbelösung und entfärbt sie in Destain-Lösung. Coomassie brillant blue bindet unspezifisch an Proteine. So ist eine Kontrolle des Proteintransfers vom Gel auf die Membran möglich. In die Auswertung gehen nur solche Western-Blots ein, bei denen der Proteintransfer vollständig ist.

3.2.10.6 Auswertung

Die Auswertung der Western-Blots erfolgt mit der Software Kodak 1D 3.5. Dazu werden die gesuchten Proteine, die sich als schwarze Bande darstellen, mit dem Cursor auf dem Computerbildschirm umfahren und die Intensität gemessen. Dieser Wert wird mit der umrandeten Fläche multipliziert. So errechnet sich indirekt der absolute Wert der Intensität der Chemilumineszenz der Proteine. Durch geringe unspezifische Anfärbungen mit dem zweiten Antikörper ergeben sich im Hintergrund schwache Chemilumineszenzen. Diese werden gemessen und von den markierten Banden abgezogen. Die drei Standards werden nach dem gleichen Verfahren ausgewertet. Durch Berechnung der prozentualen Abweichung der Probenanalysen zu den Standards ist ein Vergleich der Western-Blot-Analysen möglich. Um Fehler bei der Auswertung zu vermeiden, führt man die Analyse dreimal durch und errechnet den Mittelwert. Dieser geht in die Statistik ein.

3.2.11 Antikörper, Chemikalien, Lösungen , Geräte und Verbrauchsmaterial

Proteine

Immunfluoreszenz: 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

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

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

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

Alle Antikörper von Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Immunfluoreszenz: 2. Antikörper

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

Von Molecular Probes, Leiden, Niederlande

Western-Blot: 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

Alle Antikörper von Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Western-Blot: 2. Antikörper

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

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

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

Chemikalien

Ammonium Persulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Bio-Rad Protein Assey	Bio-Rad Laboratories, München
Bromphenolblau	Fa. Serva, Heidelberg
BSA, Bovines Serum Albumin, Fraction V	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Butylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Capronsäure (ε-Amino-n-Capronic Acid)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Complete Mini™ EDTA-free Protese Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
Coomassie® Brilliant Blue R250	Fluka, Neu-Ulm
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Eisessig 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol 100% pro analysi	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Fa. Biochrom AG, Berlin
Glycerol anhydrous	Fluka, Neu-Ulm
Milchpulver 0,1% Fett Naturaflor©	Fa. Töpfer, Dietmannsried
Mounting-Medium Vectashield® H-1000	Vectorlabs, Burlingame, USA
PBS-Dulbecco w/o Ca^{2+}, Mg^{2+}	Fa. Biochrom AG, Berlin
Rainbow® RPN 756 protein molekular weight marker	Amersham Life Science Inc, Piscataway, USA
Rotiphorese® Gel 40 Acrylamid/Bisacrylamid	Fa. Roth, Karlsruhe
SDS (Na-DoDecylsulfat)	Bio-Rad Laboratories, München
TEMED (N;N;N`,N`) Tetramethylenethylendiamid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tissue Freezing Medium®	Fa. Jung, Leica Instruments, Nussloch

Tris 2-Amino-2-(hydroxy-methyl)-1,3 propanediol	Roche, Mannheim
Triton®X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tween®20 (Polyoxyethylensorbitolmonolaurat)	Fa. Fluka Chemica, Buchs, Schweiz
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus, NEN, Enhanced Luminol Reagent	PerkinElmer Life Science, Inc., Boston, USA
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus, NEN, Oxidizing Reagent	PerkinElmer Life Science, Inc., Boston, USA

Lösungen

10% FKS-Lösung	für Imunfluoreszenz & Western-Blot	1 ml FKS 9 ml PBST
10% Milchlösung	für Imunfloreszenz	1 g Milchpulver ad 10 ml mit PBST (1x)
Ammonium Persulfat 10%	für Western-Blot	10 g Ammonium Persulfat 1000 ml ddH_2O
Anodenpuffer I	für Western-Blot	300 mM Tris 20% Ethanol pro analysi
Anodenpuffer II	für Western-Blot	25 mM Tris 20% Ethanol pro analysi
Coomassie-Färbelösung	für Western-Blot	0,8 g Coomassie Brilliant Blue R250 200 ml Ethanol pro analysi (100 %) 40 ml Eisessig ad 500 ml mit ddH_2O sterilisieren
Destain-Lösung	für Western-Blot	25% Methanol 10% Eisessig 65% ddH_2O
Kathodenpuffer	für Western-Blot	40 mM Capronsäure 20% Ethanol pro analysi
Lysispuffer	für Western-Blot	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®, Mini EDTA-free

PBS (20x)		320 g NaCl 57,6 g $NaHPO_4$ 9,6 g KH_2PO_4 8 g KCL ad 2000 ml mit ddH_2O auf pH 7,4 einstellen
PBST (1x)	für Imunfloreszenz & Western-Blot	500 ml PBS (20x) 1000 µl Tween 20 ad 2000 ml mit ddH_2O
Reduzierender SDS-Probenpuffer	für Western-Blot & Probenaufbereitung	0,2 M Tris-HCl pH 6,8 6% SDS 20% Glycerol 10% DTT 0,1 mg/ml Bromphenolblau
Sammelgel 5%	für Western-Blot	10 ml Rotiphorese® Gel 40 20 ml Sammelgelpuffer 50 ml mit ddH_2O 640 µl Ammonium Persulfat (10%) 60 µl TEMED
Sammelgelpuffer (4x)	für Western-Blot	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% SDS 0,1% NaN_3 ad 250 ml mit ddH_2O auf pH 6,8 einstellen
SDS-Laufpuffer (10x)		30,28 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS 0,1 g NaN_3 ad 1000 ml mit ddH_2O
SDS-Laufpuffer (1x)	für Western-Blot	100 ml SDS-Laufpuffer (10x) 900 ml ddH_2O

Trenngel 10%	für Western-Blot	10 ml Rotiphorese® Gel 40 10 ml Trenngelpuffer 20 ml ddH_2O 240 µl Ammonium Persulfat (10%) 30 µl TEMED
Trenngel 15%	für Western-Blot	15 ml Rotiphorese® Gel 40 10 ml Trenngelpuffer 15 ml ddH_2O 240 µl Ammonium Persulfat (10%) 30 µl TEMED
Trenngel 7%	für Western-Blot	7 ml Rotiphorese® Gel 40 10 ml Trenngelpuffer 23 ml ddH_2O 240 µl Ammonium Persulfat (10%) 30 µl TEMED
Trenngelpuffer (4x)	für Western-Blot	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4% SDS 0,01% NaN_3 ad 500 ml mit ddH_2O auf pH 8,8 einstellen

Geräte und Verbrauchsmaterial

Einmal-Küvetten PS	Plastibrand®, Fa. Brand, Wertheim
Elektrophorese Power-supply, EPS-301	Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, USA
Elektrophoresekammer	Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Fettstift	Liquid Blocker, Daido Sangyo Co., Ltd. Tokyo, Japan
feuchte Kammer	Eigenbau
Folienschweißgerät	HM 3000 CD, Jencons Scientific, Befordshire, England
Image Station	Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA
Immobilon-P (PVDF-) Transfermembran	Millipore, Bedford, USA
Konfokales Laserscan-Mikroskop 410 (CLSM)	Stativ Axiovert 100M; Fa. Carl Zeiss, Jena
Kryotom HM 500	Fa. Microm, Walldorf
Objektträger SuperFrost®Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Plastikschalen	Fa. Kriba, Neuss
Plastiktüten	Plastibrand®, Fa. Brand, Wertheim
Powermeter	Liconix Model 35 PM Power Meter, Mountain View, CA, USA
Schüttelinkubator	Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf, Hamburg
Schüttler Rocky 3D	Fröbel Labortechnik, Lindau
Schwingmühle MM 200	Retsch GmbH & Co. KG, Haan
Software Kodak 1D 3.5	Image Analysis Software, Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA
Software LSM 410	Microsoft, Zeiss in cooperation with Microsoft, Fa. Carl Zeiss, Jena

Spektrometer, DU® 640	Fa. Beckmann-Coulter, Oberschleißheim
TPP-Röhrchen (15 ml/50 ml)	Fa.TPP, Trasadingen, Schweiz
Transfergeräte	Fa Roth, Karlsruhe
Whatman® Chromatographiepapier	Whatman, Meldstone, England
Zirkonia beads 2,5 mm	Bio Spec Products Inc., Fa. Roth, Heidelberg
Biofuge fresco	Fa. Heraeus, Osterode

3.2.12 Statistische Bewertung

Die der statistischen Bewertung zu Grunde liegenden Daten werden mit einem linearen ANOVA Modell bewertet. Ein anschließender post hoc-t-Test mit einer Bonferroni Anpassung findet Anwendung für einen paarweisen Vergleich. Eine Greenhouse-Geisser Korrektur wird durchgeführt, wenn die sphärischen Annahmen nicht gelten.

Die physiologischen Variablen analysiert man durch eine Varianzanalyse für wiederholte Messung mit 4 Wiederholungen (Anfangswert, Ischämie, Reperfusion und Erholung) als intra-individuelle Faktoren und Tag und Behandlung (Propofol- und Kontroll-Gruppe) als inter-individuelle Faktoren. Alle Wechselwirkungen werden mit in das Modell aufgenommen. Die Konzentration von Apoptose-assoziierten Proteinen (Bcl-2, Mdm-2, Bax und p53) werden ermittelt für die ischämischen und nicht-ischämischen Hemisphäre. ANOVA für wiederholte Messungen wendet man separat auf die intra-individuellen Faktoren Hemisphäre und die inter-individuellen Faktoren Gruppe und Tage für die Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Daten an. Der Faktor Gruppe wird auf Ratten einer Nativ-Gruppe ($n = 8$, unbehandelt, nur ein Zeitpunkt) ausgedehnt, um die durch die cerebrale Ischämie induzierten apoptotischen Zellen zu bestimmen.

Die gesamte statistische Analyse wird ausgeführt mit dem Statistikprogramm SPSS 11.5. Alle Tests hat man zweiseitig mit einem Signifikanzbereich von $p \leq 0{,}05$ ausgewertet. Für p-Werte kleiner als 0,001 kommt die Bezeichnung $< 0{,}001$ zur Anwendung. Aus den Einzelwerten der einzelnen Gruppen wurde das arithmetische Mittel (MW) mit der Standardabweichung (SD) errechnet.

3.3 Ergebnisse

In die Ergebnisse gehen die intraoperativ erhobenen Werte von 64 männlichen Sprague-Dawley Ratten ein. Die Tiere werden nach der Präparation randomisiert in zwei Versuchsgruppen eingeteilt (siehe Tab. 3), die Propofol- und Kontroll-Gruppe. Zusätzlich dienen acht völlig unbehandelte Tiere (Nativ-Gruppe) der Ermittlung physiologischer Parameter.

Tab. 3. Gruppeneinteilung und Behandlung

Gruppenname	**Behandlung**	**Untersuchungszeitpunkt (Tage) Tieranzahl (n)**			
Kontroll-Gruppe	Fentanyl + O_2/N_2O	1 n = 8	3 n = 8	7 n = 8	28 n = 8
Propofol-Gruppe	Propofol + O_2/Luft	1 n = 8	3 n = 8	7 n = 8	28 n = 8
Nativ-Gruppe	Keine Narkose Keine Behandlung	n = 8			

Gruppeneinteilung und Behandlung der verschiedenen Gruppen

3.3.1 Gemessene Versuchsparameter

Körpergewicht

Die Versuchstiere werden nach ihrer randomisierten Zuteilung zu einer Gruppe morgens vor der Operation gewogen. Der MW und die SD des Körpergewichts aller gewogenen Tiere beträgt 403 ± 59 g.

Temperatur

Um die Gehirntemperatur konstant auf 37,5 °C zu halten, wird die perikranielle Temperatur kontinuierlich gemessen und zu vier festgelegten Zeitpunkten dokumentiert. Die Sonde ist an einem Zweipunkttemperaturregler angeschlossen, der dafür sorgt, dass bei Unterschreiten einer unteren Temperaturgrenze (37,3 °C) die Wärmelampe eingeschaltet und bei Übersteigen einer oberen Temperaturgrenze (37,9 °C) die Lampe ausgeschaltet wird. Die Gehirn-

temperatur wird so auf dem gewünschten Wert gehalten. Der empirische MW und die SD der T. peri beträgt über die gesamte Operationsdauer 37,5 ± 0,1 °C.

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz (HF) und Glucose (Gluc)

Die zu den definierten Zeitpunkten erhobenen Parameter MAP, HF und Gluc sind als Mittelwert und Standardabweichung in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tab. 4. Mittlerer arterieller Blutdruck, Herzfrequenz und Blutglucose

Gruppen	Messzeitpunkte	MAP (mmHg)	HF (Schläge/min)	Glucose (mg/dl)
Kontroll-Gruppe	Ausgangswert	130 ± 12	406 ± 37	64 ± 9
	45 min Isch	40 ± 1 ^{C}	447 ± 32	55 ± 9
	15 min Rep	126 ± 10	386 ± 40	67 ± 9
	45 min Erh	119 ± 12	414 ± 40	85 ± 19 *
Propofol-Gruppe	Ausgangswert	100 ± 13	362 ± 34	66 ± 9
	45 min Isch	40 ± 1 ^{C}	374 ± 30	59 ± 11
	15 min Rep	111 ± 16	330 ± 33	56 ± 8
	45 min Erh	100 ± 20	353 ± 25	56 ± 9

*MW und SD des mittleren arteriellen Blutdrucks, der Herzfrequenz und der Blutglucose an den vier definierten intraoperativen Zeitpunkten der zwei Versuchsgruppen (je n = 32). Signifikanzen: * ≤ 0,05 Kontroll-Gruppe vs. Propofol-Gruppe; c = kontrollierter Parameter*

Der mittlere arterielle Blutdruck ist während der ischämischen Phase in beiden Gruppen im Vergleich zu den anderen Messzeitpunkten versuchsbedingt signifikant erniedrigt. Der mittlere arterielle Blutdruck der Propofol-Gruppe zeigt tendenziell niedrigere Werte als die Kontroll-Gruppe.

Die Herzfrequenz zeigt in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede, jedoch sind in der Propofol-Gruppe zu allen untersuchten Zeitpunkten tendenziell niedrigere Werte zu finden als bei der Kontroll-Gruppe.

Die Werte der Blutglucose zeigen eine signifikante Erhöhung am Ende der Erholung in der Kontroll-Gruppe im Vergleich zur Propofol-Gruppe. Ansonsten verlaufen in beiden Gruppen die Mittelwerte der Blutglucose über die Messzeitpunkte überwiegend gleichmäßig.

Blutgasanalyse

Während des Versuchs sind zu festgelegten Messzeitpunkten Blutgasanalysen erstellt worden. Gemessen werden der Hämoglobingehalt des Blutes (Hb), der arterielle pH-Wert (pH), der arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) und der arterielle Kohlendioxidpartialdruck ($PaCO_2$). Folgende Tabelle stellt die Mittelwerte und die Standardabweichung der Ergebnisse der Blutgasanalyse dar:

Tab. 5. Ergebnisse der Blutgasanalyse

Gruppen-Einteilung	Messzeitpunkte	Hb (g/dl)	pH-Wert	PaO_2 (mmHg)	$PaCO_2$ (mmHg)
Kontroll-Gruppe	Ausgangswert	13,3 ± 1,1	7,42 ± 0,03	139 ± 19	37,4 ± 3,6
	45 min Isch	9,5 ± 0,9 *	7,39 ± 0,06	143 ± 20	40,1 ± 5,1
	15 min Rep	12,8 ± 1,0	7,40 ± 0,05	142 ± 21	39,7 ± 3,8
	45 min Erh	12,7 ± 1,0	7,43 ± 0,05	125 ± 30	40,2 ± 8,7
Propofol-Gruppe	Ausgangswert	12,2 ± 1,0	7,41 ± 0,03	153 ± 23	37,5 ± 4,0
	45 min Isch	9,1 ± 2,4 *	7,46 ± 0,04	143 ± 36	39,5 ± 4,4
	15 min Rep	11,3 ± 0,9	7,46 ± 0,04	136 ± 30	41,4 ± 4,8
	45 min Erh	12,2 ± 6,2	7,44 ± 0,04	124 ± 33	41,7 ± 4,5

*MW und SD des Hämoglobingehalts des Blutes, des pH-Wertes, des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes und des arteriellen Kohlendioxidpartialdruckes zu den vier definierten intraoperativen Zeitpunkten der zwei Versuchsgruppen (je n = 32). Signifikanzen gegenüber dem Ausgangswert: * = p≤ 0,05; ohne Sonderzeichen = nicht signifikant*

Die Hämoglobinkonzentration der Tiere beider Gruppen zeigt eine, durch den im Versuchsprotokoll festgelegten Blutentzug, signifikante Erniedrigung während der Ischämie im Vergleich zu den anderen Messzeitpunkten auf. Ansonsten weist die Hämoglobinkonzentration einen gleichen Verlauf auf.

Innerhalb der Ergebnisse der pH-Wert-Messungen sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Der über die Atemfrequenz regulierte Sauerstoffpartialdruck und ebenso der Kohlendioxidpartialdruck zeigt zwischen der Propofol- und Kontroll-Gruppe keine signifikanten Unterschiede auf.

3.3.2 Detektierte Apoptose Proteine Bcl-2, Mdm-2, Bax und p53

3.3.2.1 Immunfluoreszenz-Färbung

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Färbung werden auf den Gehirnschnitten die Apoptose-assoziierten Proteine Bcl-2, Mdm-2, Bax und p53 mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Innerhalb 24 h nach der Färbung werden die CA1- und die CA3-Region des Hippocampus mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop betrachtet und mit dem Computerprogramm KS400 ausgewertet.

In die interferenz-statistische Auswertung gehen die Summen der Werte der CA1- und CA3-Region der ischämischen bzw. nicht-ischämischen Hemisphäre als „Gesamt ischämisch“ und „Gesamt nicht-ischämisch“ ein.

Die folgenden Tabellen und Grafiken stellen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen der gemessenen Werte dar.

Bcl-2-Protein

Tab. 6. Immunfluoreszenzintensität des Bcl-2-Proteins der ischämischen Gehirnhälfte

Gruppen	Untersuchungs-Zeitpunkt (Tage)	CA1 ischämisch	CA3 ischämisch	Gesamt ischämisch
Kontroll-Gruppe	1	13 ± 3	14 ± 6	13 ± 5
	3	16 ± 7	17 ± 8	16 ± 8
	7	21 ± 10	21 ± 12	21 ± 11
	28	15 ± 5	16 ± 5	11 ± 8
Propofol-Gruppe	1	23 ± 4	25 ± 4	24 ± 4*
	3	28 ± 8	31 ± 10	30 ±9*
	7	16 ± 6	15 ± 5	16 ± 5
	28	18 ± 3	18 ± 4	18 ± 2
Nativ-Gruppe		24 ± 6	25 ± 5	24 ± 5

*Immunfluoreszenzintensität (MW ± SD) des Bcl-2-Proteins (Graustufen) im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen zu den vier Untersuchungspunkten und der Nativ-Gruppe als physiologischer Vergleichswert. Signifikanzen: * = signifikant im Vergleich Propofol-Gruppe zur Kontroll-Gruppe = p < 0,05*

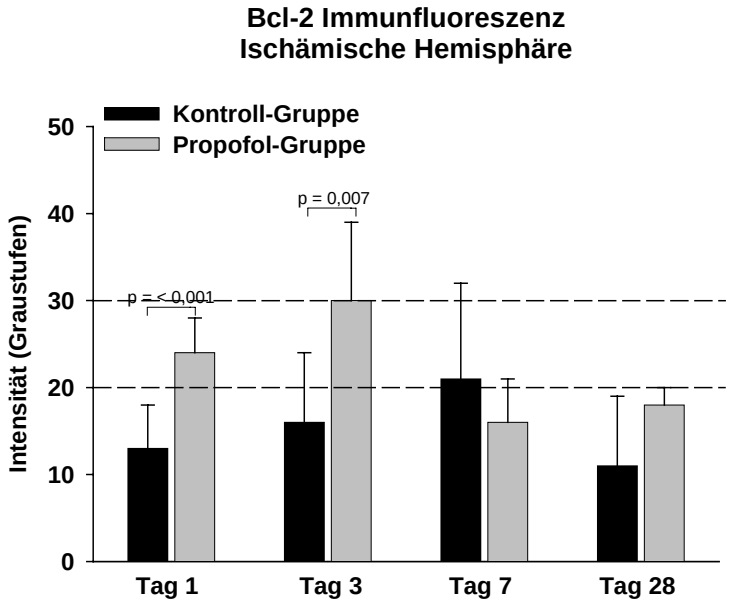


Abb. 14 Immunfluoreszenz: Bcl-2-Protein ischämische Hemisphäre

Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenzintensitäten (Graustufen) des Bcl-2-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen (je n = 32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativ-Tiere).
Signifikanzen: nicht signifikant = keine Kennzeichnung; signifikant = p-Wertangabe

Tab. 7. Immunfluoreszenzintensität des Bcl-2-Proteins der nicht-ischämischen Gehirnhälfte

Gruppen	Untersuchungs-Zeitpunkt (Tage)	CA1 nicht-ischämisch	CA3 nicht-ischämisch	Gesamt nicht-ischämisch
Kontroll-Gruppe	1	13 ± 5	13 ± 6	13 ± 5
	3	17 ± 12	17 ± 11	17 ± 12
	7	19 ± 13	19 ± 13	19 ± 13
	28	12 ± 4	12 ± 3	10 ± 5
Propofol-Gruppe	1	23 ± 5	23 ± 4	22 ± 4*
	3	29 ± 10	28 ± 11	29 ± 11
	7	16 ± 6	17 ± 7	16 ± 6
	28	18 ± 3	17 ±3	17 ± 2*
Nativ-Gruppe		225 ±6	26 ± 5	25 ±5

Immunfluoreszenzintensität (MW ± SD) des Bcl.2-Proteins (Graustufen) im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der nicht-ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen zu den vier Untersuchungspunkten und der Nativ-Gruppe als physiologischer Vergleichswert.
*Signifikanzen: * = signifikant im Vergleich Propofol-Gruppe zur Kontroll-Gruppe = p < 0,05*

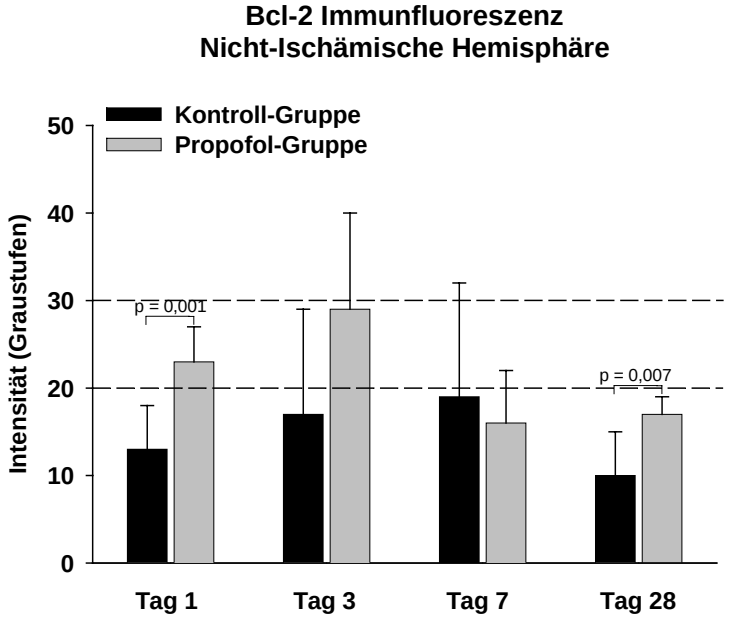


Abb. 15 Immunfluoreszenz: Bcl-2-Protein nicht-ischämische Hemisphäre

Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenzintensitäten (Graustufen) des Bcl-2-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der nicht-ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen (je n = 32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativ-Tiere).
Signifikanzen: nicht signifikant = keine Kennzeichnung; signifikant = p-Wertangabe

In dem Test auf globale Effekte der Behandlung, der Untersuchungszeitpunkte und der Hemisphären stellt man signifikante Behandlungseffekte im Bezug auf Bcl-2 fest. Diese sind durch eine Erniedrigung der Werte der Kontroll-Gruppe im Vergleich zur Propofol-Gruppe sowie zur Nativ-Gruppe begründet.

Betrachtet man die Behandlungsunterschiede separat für jeden Tag so stellt man fest, dass am Tag eins die Expression des Bcl-2-Proteins in der Propofol-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe für beide Hemisphären signifikant erhöht ist.

Am Tag drei ist für die ischämische Hemisphäre eine signifikante und für die nicht-ischämische Hemisphäre eine tendenzielle und am Tag 28 für die nicht-ischämische Hemisphäre eine signifikante Erhöhung festzustellen. Am Tag sieben zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Zwischen den Hemisphären konnten sowohl bei der Propofol- als auch bei der Kontroll-Gruppe keine Effekte nachgewiesen werden (siehe Abb. 14 und Tab. 12).

Mdm-2-Protein

Tab. 8. Immunfluoreszenzintensität des Mdm-2-Proteins der ischämischen Gehirnhälfte

Gruppen	Untersuchungs-Zeitpunkt (Tage)	CA1 ischämisch	CA3 ischämisch	Gesamt ischämisch
Kontroll-Gruppe	1	30 ± 12	32 ± 11	31 ± 11
	3	35 ± 18	40 ± 19	37 ± 18
	7	44 ± 16	41 ± 10	37 ± 18
	28	62 ± 10	63 ± 13	55 ± 23
Propofol-Gruppe	1	65 ± 39	70 ± 44	68 ± 41*
	3	52 ± 19	53 ± 15	53 ± 16
	7	47 ± 12	54 ± 17	51 ± 14
	28	38 ± 18	44 ± 13	36 ± 20*
Nativ-Gruppe		49 ± 10	49 ± 13	49 ± 11

Immunfluoreszenzintensität (MW ± SD) des Mdm-2-Proteins (Graustufen) im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen zu den vier Untersuchungspunkten und der Nativ-Gruppe als physiologischer Vergleichswert.
*Signifikanzen: * = signifikant im Vergleich Propofol-Gruppe zur Kontroll-Gruppe = p < 0,05*

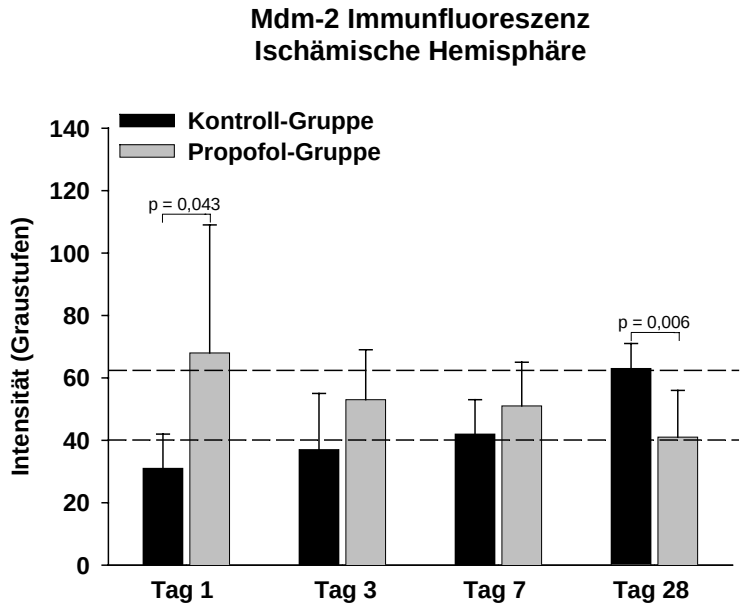


Abb. 16 Immunfluoreszenz: Mdm-2-ischämische Hemisphäre

Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenzintensitäten (Graustufen) des Mdm-2-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen (je n = 32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativ-Tiere).
Signifikanzen: nicht signifikant = keine Kennzeichnung; signifikant = p-Wertangabe

Tab. 9. Immunfluoreszenzintensität des Mdm-2-Proteins der nicht-ischämischen Gehirnhälfte

Gruppen	Untersuchungs-Zeitpunkt (Tage)	CA1 nicht-ischämisch	CA3 nicht-ischämisch	Gesamt nicht-ischämisch
Kontroll-Gruppe	1	33 ± 10	34 ± 10	34 ± 10
	3	47 ± 16	49 ± 16	48 ± 15
	7	48 ± 15	52 ± 13	44 ± 21
	28	51 ± 18	56 ± 16	54 ± 16
Propofol-Gruppe	1	64 ± 41	70 ± 36	67 ± 38 *
	3	52 ± 22	55 ± 21	54 ± 21
	7	49 ± 11	55 ± 20	52 ± 15
	28	36 ± 24	43 ± 17	34 ± 23
Nativ-Gruppe		53 ± 12	53 ± 12	53 ± 11

Immunfluoreszenzintensität (MW ± SD) des Mdm-2-Proteins (Graustufen) im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der nicht-ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen zu den vier Untersuchungspunkten und der Nativ-Gruppe als physiologischer Vergleichswert.
*Signifikanzen: * = signifikant im Vergleich Propofol-Gruppe zur Kontroll-Gruppe = p < 0,05*

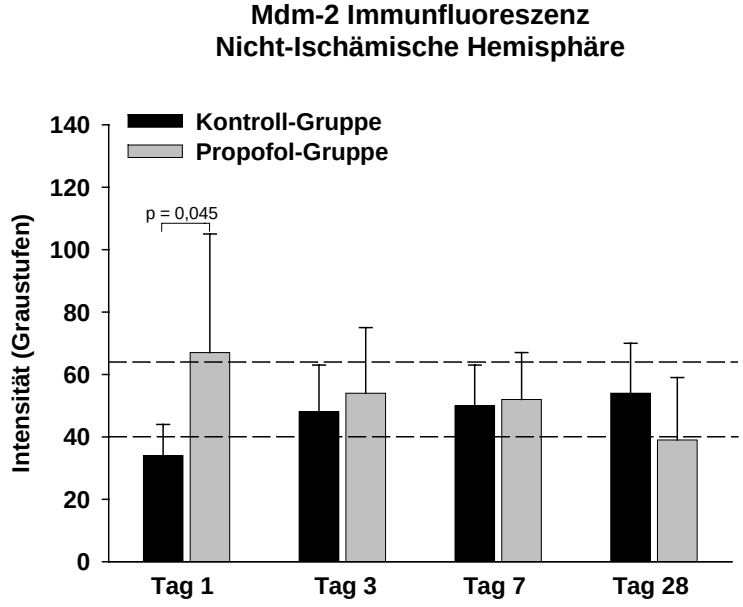


Abb. 17 Immunfluoreszenz: Mdm-2-nicht-ischämische Hemisphäre

Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenzintensitäten (Graustufen) des Mdm-2-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der nicht-ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen (je n = 32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativ-Tiere).
Signifikanzen: nicht signifikant = keine Kennzeichnung; signifikant = p-Wertangabe

Ein globaler Effekt konnte für Mdm-2 weder für die Hemisphäre noch für die Behandlungsgruppe oder für die Untersuchungszeitpunkte nachgewiesen werden.
Vergleicht man allerdings die beiden Gruppen separat für die Subgruppen der am Tag eins, drei, sieben und 28 ausgewerteten Hirnschnitte, so erkennt man, dass am Tag eins der Propofol-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe beide Hemisphären eine Erhöhung der Expression der Konzentration des Mdm-2-Proteins. Am Tag 28 ist die Expression von Mdm-2 für die ischämische Hemisphäre der Propofol-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant und für die nicht-ischämische Hemisphäre tendenziell erniedrigt.
Effekte zwischen den Hemisphären sind nicht festgestellt worden (siehe Abb. 16 und Abb. 17).

Bax-Protein

Tab. 10. Immunfluoreszenzintensität des Bax-Proteins der ischämischen Gehirnhälfte

Gruppen	Untersuchungs-Zeitpunkt (Tage)	CA1 ischämisch	CA3 ischämisch	Gesamt ischämisch
Kontroll-Gruppe	1	32 ± 14	36 ± 15	34 ± 14
	3	34 ±15	36 ± 15	35 ± 15
	7	35 ± 16	34 ± 15	34 ± 16
	28	30 ± 15	28 ± 15	25 ± 17
Propofol-Gruppe	1	19 ± 6	19 ± 7	19 ± 7*
	3	15 ± 3	15 ± 3	13 ± 6*
	7	16 ± 7	16 ± 7	16 ±7*
	28	15 ± 4	16 ± 3	16 ± 3
Nativ-Gruppe		23 ± 9	21 ± 8	22 ± 8

*Immunfluoreszenzintensität (MW ± SD) des Bax-Proteins (Graustufen) im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen zu den vier Untersuchungspunkten und der Nativ-Gruppe als physiologischer Vergleichswert. Signifikanzen: * = signifikant im Vergleich Propofol-Gruppe zur Kontroll-Gruppe = p < 0,05*

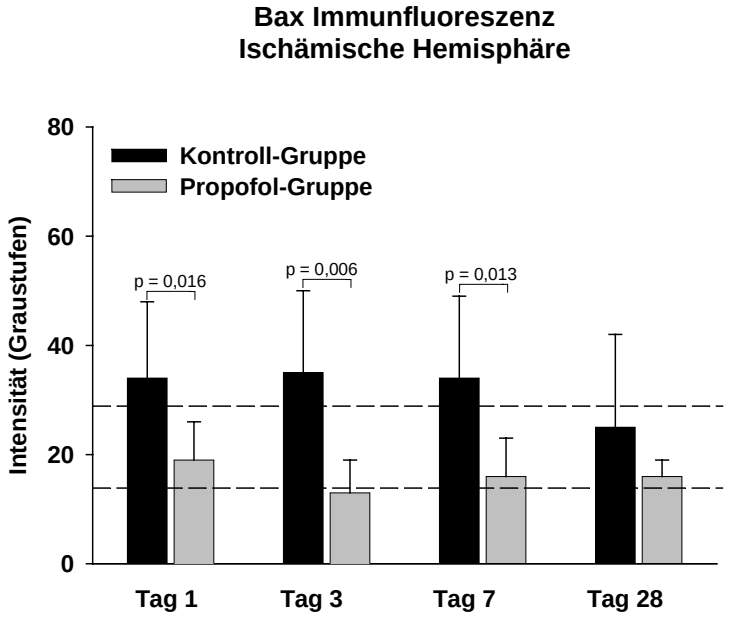


Abb. 18 Immunfluoreszenz: Bax-ischämische Hemisphäre

Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenzintensitäten (Graustufen) des Bax-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen (je n = 32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativ-Tiere).
Signifikanzen: nicht signifikant = keine Kennzeichnung; signifikant = p-Wertangabe

Tab. 11. Immunfluoreszenzintensität des Bax-Proteins der nicht-ischämischen Gehirnhälfte

Gruppen	Untersuchungs-Zeitpunkt (Tage)	CA1 nicht-ischämisch	CA3 nicht-ischämisch	Gesamt nicht-ischämisch
Kontroll-Gruppe	1	39 ± 16	41± 18	40 ± 17
	3	38 ± 17	40 ± 18	39 ± 17
	7	34 ± 17	31 ± 16	33 ± 16
	28	30 ± 20	29 ± 22	26 ± 22
Propofol-Gruppe	1	20 ± 7	20 ± 8	20 ± 7*
	3	15 ± 5	15 ± 4	13 ± 6*
	7	17 ± 8	17 ± 7	17 ± 7*
	28	17 ± 3	17 ± 5	17 ± 4
Nativ-Gruppe		22 ± 8	22 ±7	22 ±7

Immunfluoreszenzintensität (MW ± SD) des Bax-Proteins (Graustufen) im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der nicht-ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen zu den vier Untersuchungspunkten und der Nativ-Gruppe als physiologischer Vergleichswert.
*Signifikanzen: * = signifikant im Vergleich Propofol-Gruppe zur Kontroll-Gruppe = $p < 0,05$*

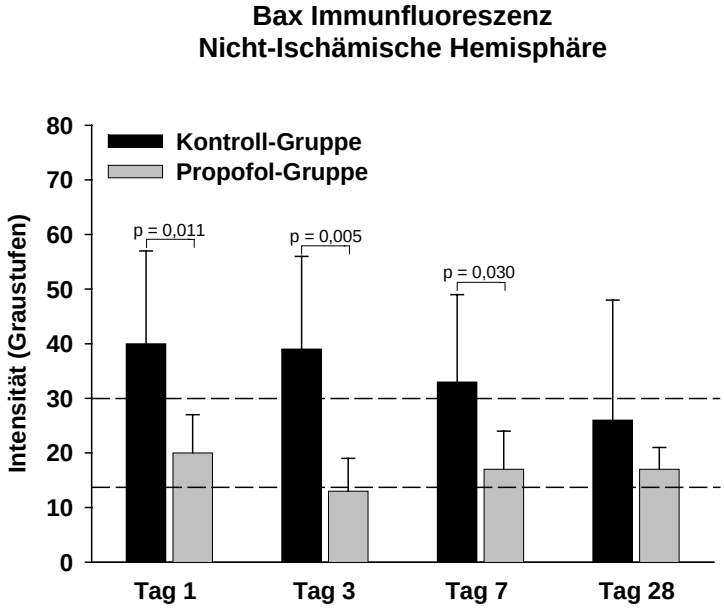
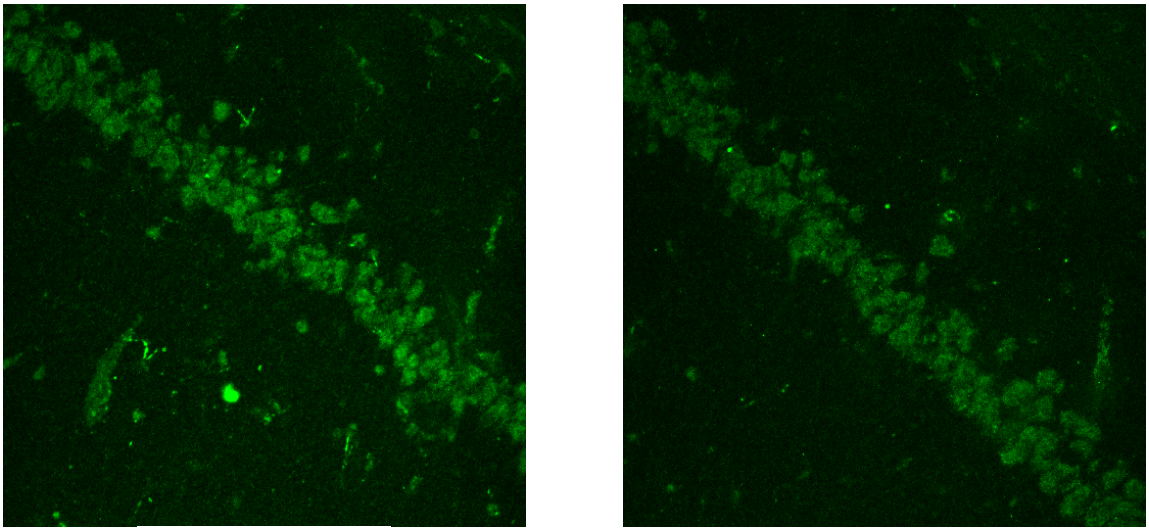


Abb. 19 Immunfluoreszenz: Bax-nicht-ischämische Hemisphäre

Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenzintensitäten (Graustufen) des Bax-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der nicht-ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen (je n = 32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativ-Tiere).
Signifikanzen: nicht signifikant = keine Kennzeichnung; signifikant = p-Wertangabe

Testet man auf einen globalen Effekt der Behandlung, der Untersuchungszeitpunkte und der Hemisphären, so stellt man signifikante Behandlungseffekte fest. Dieses ist durch eine Erhöhung der Werte zwischen der Kontroll- und der Propofol-Gruppe sowie der Kontroll-Gruppe im Vergleich zur Nativ-Gruppe begründet.
Betrachtet man die Behandlungsunterschiede separat für die Tage, weist die Propofol-Gruppe im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe für beide Hemisphären eine signifikant niedrigere Expression des pro-apoptotischen Bax-Proteins nach einem, drei und sieben Tagen auf. Am Tag 28 ist sie tendenziell.
Ein Vergleich der ischämischen mit der nicht-ischämischen Hemisphäre zeigt innerhalb einer Gruppe keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 18 und Abb. 19).



Kontroll-Gruppe Propofol-Gruppe

Abb. 20 Immunfluoreszenzaufnahmen des Bax-Proteins

Die Abbildungen zeigen die unterschiedlichen Immunfluoreszenzintensitäten der markierten Bax-Proteine in der CA1-Region des Hippocampus der ischämischen Hemisphäre eines Tieres der Kontroll- (höhere Intensität) und der Propofol-Gruppe (niedrigere Intensität).

p53-Protein

Tab. 12. Immunfluoreszenzintensität des p53-Proteins der ischämischen Gehirnhälfte

Gruppen	Untersuchungs-Zeitpunkt (Tage)	CA1 ischämisch	CA3 ischämisch	Gesamt ischämisch
Kontroll-Gruppe	1	38 ± 14	43 ± 16	40 ± 15
	3	30 ± 14	33 ± 16	32 ± 15
	7	33 ± 11	35 ± 12	34 ± 11
	28	36 ± 15	34 ± 11	31 ± 17
Propofol-Gruppe	1	37 ± 9	36 ± 8	37 ± 8
	3	34 ± 13	33 ± 15	33 ± 14
	7	32 ± 33	32 ± 30	32 ± 10
	28	30 ± 12	32 ± 14	31 ± 13
Nativ-Gruppe		27 ± 10	26 ± 11	27 ± 11

Immunfluoreszenzintensität (MW ± SD) des p53-Proteins (Graustufen) im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen zu den vier Untersuchungspunkten und der Nativ-Gruppe als physiologischer Vergleichswert. Signifikanzen: keine Signifikanzen

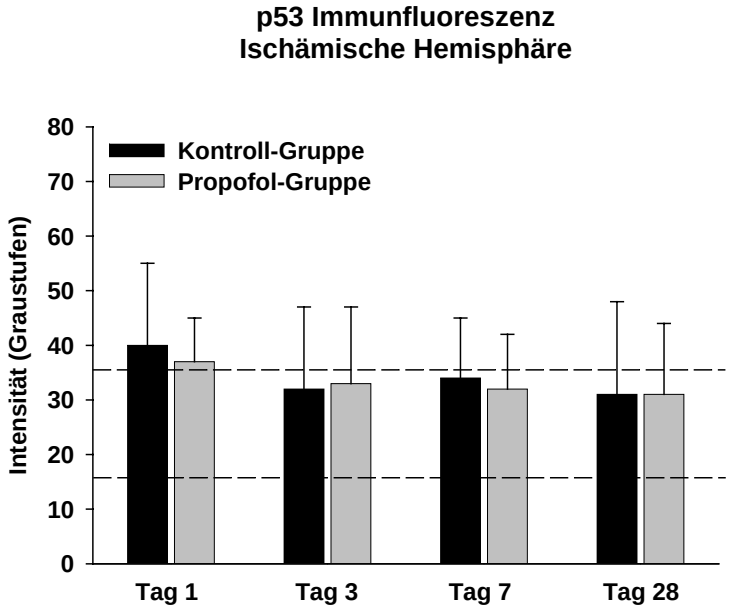


Abb. 21 Immunfluoreszenz: p53- ischämische Hemisphäre

Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenzintensitäten (Graustufen) des p53-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen (je n = 32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativ-Tiere).
Signifikanzen: keine Signifikanzen

Tab. 13. Immunfluoreszenzintensität des p53-Proteins der nicht-ischämischen Gehirnhälfte

Gruppen	Untersuchungs-Zeitpunkt (Tage)	CA1 nicht-ischämisch	CA3 nicht-ischämisch	Gesamt nicht-ischämisch
Kontroll-Gruppe	1	46 ± 16	47 ± 20	46 ± 17
	3	38 ± 16	38 ± 17	38 ± 16
	7	40 ± 10	41 ± 11	41 ± 11
	28	51 ±25	48 ± 19	55 ± 22
Propofol-Gruppe	1	36 ± 11	37 ± 10	37 ± 10
	3	34 ± 12	32 ± 12	33 ± 12
	7	31 ± 10	31 ± 11	31 ± 9
	28	30 ± 13	31 ± 16	31 ± 15
Nativ-Gruppe		27 ± 11	26 ± 10	27 ± 11

Immunfluoreszenzintensität (MW ± SD) des p53-Proteins (Graustufen) im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der nicht-ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen zu den vier Untersuchungspunkten und der Nativ-Gruppe als physiologischer Vergleichswert.
Signifikanzen: keine Signifikanzen

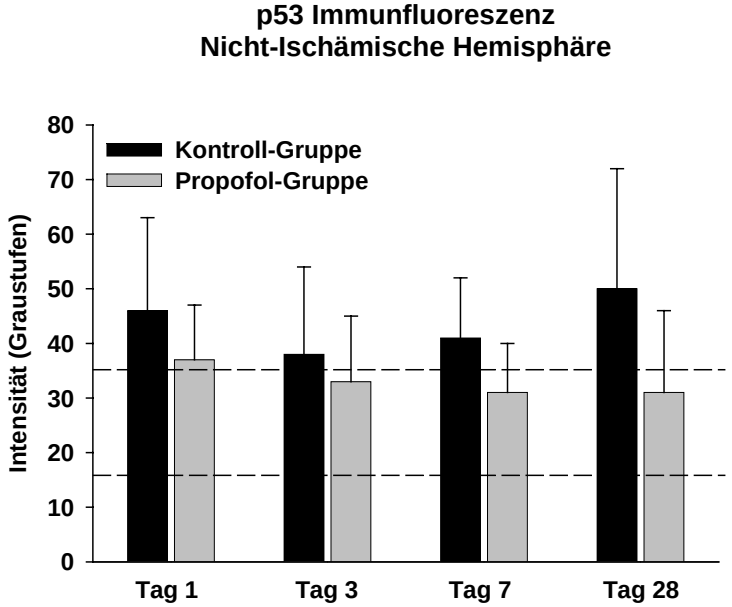


Abb. 22 Immunfluoreszenz: p53-nicht-ischämische Hemisphäre

Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenzintensitäten (Graustufen) des p53-Proteins im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der nicht-ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen (je n = 32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativ-Tiere).
Signifikanzen: keine Signifikanzen

Betrachtet man den Einfluss der Effekte der Behandlungsgruppe, der Untersuchungszeitpunkte und der Hemisphäre, so ist für p53 ein signifikanter Effekt der Behandlung nachweisbar. Dieser beruht maßgebend auf der Erhöhung der p53 in der Kontroll-Gruppe. Bei der separaten Betrachtung der Untersuchungszeitpunkte zeigt sich allerdings, dass der Mittelwert der Immunfluoreszenzintensität des p53-Proteins im Gruppenvergleich für beide Hemisphären keine Signifikanz mehr aufweist.

Der Effekt der Hemisphären ist signifikant. Es konnten in der ischämischen Hemisphäre weniger p53-Proteine nachgewiesen werden als in der nicht-ischämischen Hemisphäre (siehe Abb. 21 und Abb. 22).

3.3.2.2 Western-Blot-Analyse

In der Western-Blot-Analyse werden die gesuchten Apoptose-assoziierten Proteine, Bcl-2, Mdm-2, Bax und p53 in einem Gel durch eine Elektrophorese aufgetrennt, im weiteren Verlauf auf eine Membran übertragen und mit einem Chemilumineszenzfarbstoff angefärbt. Die Auswertung der Western-Blots erfolgt mit der Software Kodak 1D 3.5. Die folgenden Tabellen stellen die Mittelwerte und die Standardabweichungen der ermittelten Ergebnisse dar.

Bcl-2-Protein

Tab. 14. Relative Intensität der Chemilumineszenz des Bcl-2-Proteins

Gruppen	Untersuchungs-Zeitpunkt (Tage)	ischämische Hemisphäre	nicht-ischämische Hemisphäre
Kontroll-Gruppe	1	81 ± 33	101 ± 34
	3	97 ± 30	90 ± 36
	7	91 ± 24	88 ± 26
	28	115 ± 37	88 ± 32
Propofol-Gruppe	1	133 ± 52*	116 ± 51
	3	123 ± 34	102 ± 56
	7	120 ± 46	99 ± 33
	28	151 ± 34	95 ± 32
Nativ-Gruppe		112 ± 29	91 ± 27

*Relative Intensität der Chemilumineszenz (MW ± SD) des Bcl-2-Proteins im Bereich des Hippocampus der beiden Gehirnhälften der zwei Versuchsgruppen zu den vier Untersuchungspunkten und der Nativ-Gruppe als physiologischer Vergleichswert. Signifikanzen: * = signifikant im Vergleich Propofol-Gruppe zur Kontroll-Gruppe = $p < 0,05$*

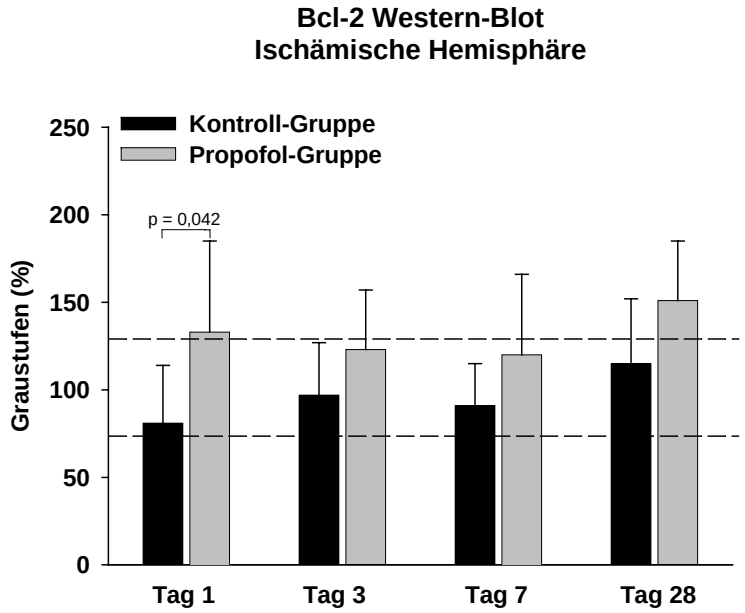


Abb. 23 Western-Blot: Bcl-2-Protein ischämische Hemisphäre

Vergleichende Darstellung der Western-Blot-Analyse (Graustufen in Prozent) des Bcl-2-Proteins im Bereich des Hippocampus der ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen (je n = 32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativ-Tiere).
Signifikanzen: nicht signifikant = keine Kennzeichnung; signifikant = p-Wertangabe

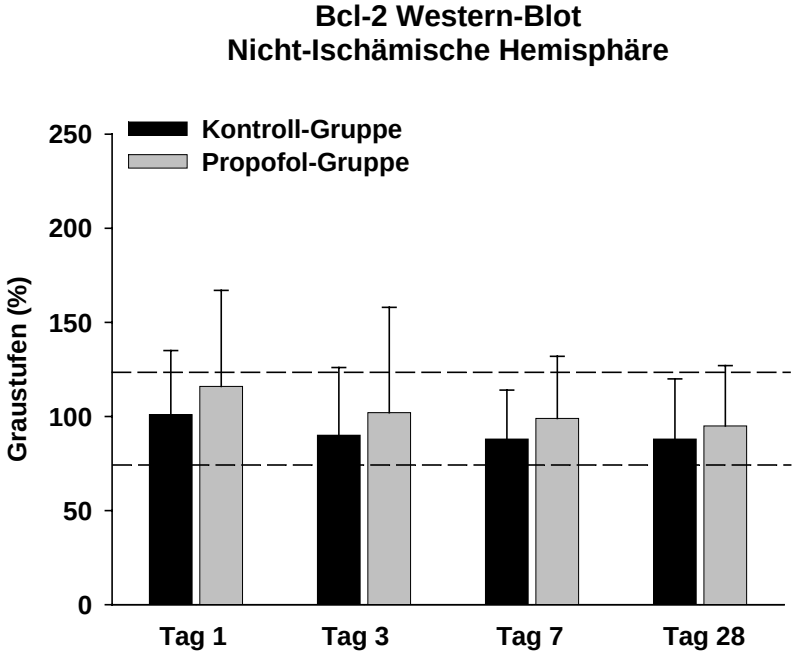


Abb. 24 Western-Blot: Bcl-2-Protein nicht-ischämische Hemisphäre

Vergleichende Darstellung der Western-Blot-Analyse (Graustufen in Prozent) des Bcl-2-Proteins im Bereich des Hippocampus der nicht-ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen (je n = 32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativ-Tiere).
Signifikanzen: keine Signifikanzen

Testet man die Ergebnisse der Analyse des Bcl-2 Proteins auf einen globalen Effekt der Behandlung, der Untersuchungszeitpunkte und der Hemisphären, so stellt man signifikante Behandlungseffekte fest. Dies ist in einer Erhöhung der Werte der Propofol-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe begründet.

Für die rechte ischämische Hemisphäre kann man eine Signifikanz ($p = 0,042$) feststellen, wenn man die Subgruppen separat zu den Untersuchungszeitpunkten vergleicht. Die Expression des Bcl-2-Proteins ist dort in der Propofol-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe am Tag eins erhöht. Für die nicht-ischämische Hemisphäre ist die Konzentration des Bcl-2-Proteins tendenziell erhöht, vergleicht man die beiden Gruppen.

Der Effekt der Hemisphären ist signifikant. Es konnten für die ischämische Hemisphäre mehr Bcl-2-Proteine nachgewiesen werden als für die nicht-ischämischen Hemisphäre.

Mdm-2-Protein

Tab. 15. Relative Intensität der Chemilumineszenz des Mdm-2-Proteins

Gruppen	Untersuchungs-Zeitpunkt (Tage)	ischämische Hemisphäre	nicht-ischämische Hemisphäre
Kontroll-Gruppe	1	251 ± 136	192 ± 98
	3	425 ± 184	188 ± 91
	7	451 ± 299	195 ± 97
	28	396 ± 236	175 ± 60
Propofol-Gruppe	1	249 ± 101	192 ± 143
	3	268 ± 132	188 ± 132
	7	271 ± 111	207 ± 176
	28	231 ± 124	191 ± 156
Nativ-Gruppe		263 ± 41	185 ± 46

Relative Intensität der Chemilumineszenz (MW ± SD) des Mdm-2-Proteins im Bereich des Hippocampus der beiden Gehirnhälften der zwei Versuchsgruppen zu den vier Untersuchungspunkten und der Nativ-Gruppe als physiologischer Vergleichswert. Signifikanzen: keine Signifikanzen

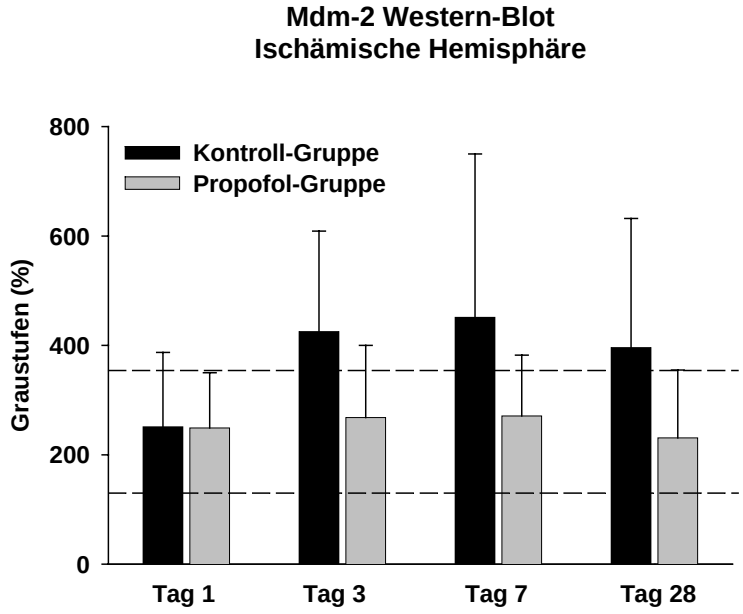


Abb. 25 Western-Blot: Mdm-2-Protein ischämische Hemisphäre

Vergleichende Darstellung der Western-Blot-Analyse (Graustufen in Prozent) des Mdm-2-Proteins im Bereich des Hippocampus der ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen (je n = 32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativ-Tiere). Signifikanzen: keine Signifikanzen

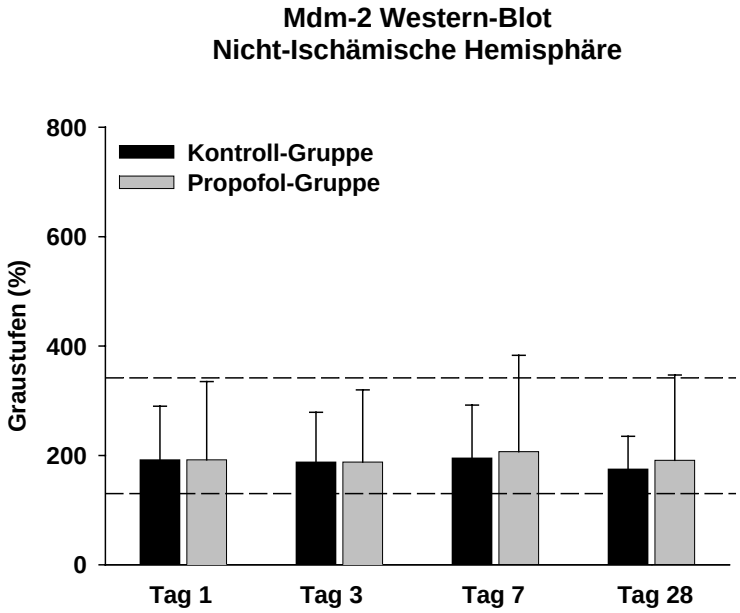


Abb. 26 Western-Blot: Mdm-2-Protein nicht-ischämische Hemisphäre

Vergleichende Darstellung der Western-Blot-Analyse (Graustufen in Prozent) des Mdm-2-Proteins im Bereich des Hippocampus der nicht-ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen (je n = 32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativ-Tiere). Signifikanzen: keine Signifikanzen

Testet man auf einen globalen Effekt der Behandlung, der Untersuchungszeitpunkte und der Hemisphären, so stellt man signifikante Behandlungseffekte fest. Dieses ist in einer Erhöhung der Werte des Mdm-2-Proteins der Kontroll-Gruppe im Vergleich zur Propofol-Gruppe begründet.

Subgruppenanalysen separat für die Tage eins, drei, sieben und 28 zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Der Effekt der Hemisphären ist signifikant. Es konnte für die ischämische Hemisphäre mehr Mdm-2-Protein nachgewiesen werden als in der nicht-ischämischen Hemisphäre (siehe Abb. 25 und Abb. 26).

Bax-Protein

Tab. 16. Relative Intensität der Chemilumineszenz des Bax-Proteins

Gruppen	Untersuchungs-Zeitpunkt (Tage)	ischämische Hemisphäre	nicht-ischämische Hemisphäre
Kontroll-Gruppe	1	239 ± 44	210 ± 99
	3	304 ± 83	247 ± 88
	7	280 ± 72	243 ± 65
	28	270 ± 77	226 ± 52
Propofol-Gruppe	1	195 ± 48	197 ± 72
	3	204 ± 78*	165 ± 56
	7	165 ± 64*	175 ± 73
	28	152 ± 35*	155 ± 71*
Nativ-Gruppe		130 ± 11	114 ± 25

*Relative Intensität der Chemilumineszenz (MW ± SD) des Bax-Proteins im Bereich des Hippocampus der beiden Gehirnhälften der zwei Versuchsgruppen zu den vier Untersuchungspunkten und der Nativ-Gruppe als physiologischer Vergleichswert. Signifikanzen: * = signifikant im Vergleich Propofol-Gruppe zur Kontroll-Gruppe = p < 0,05*

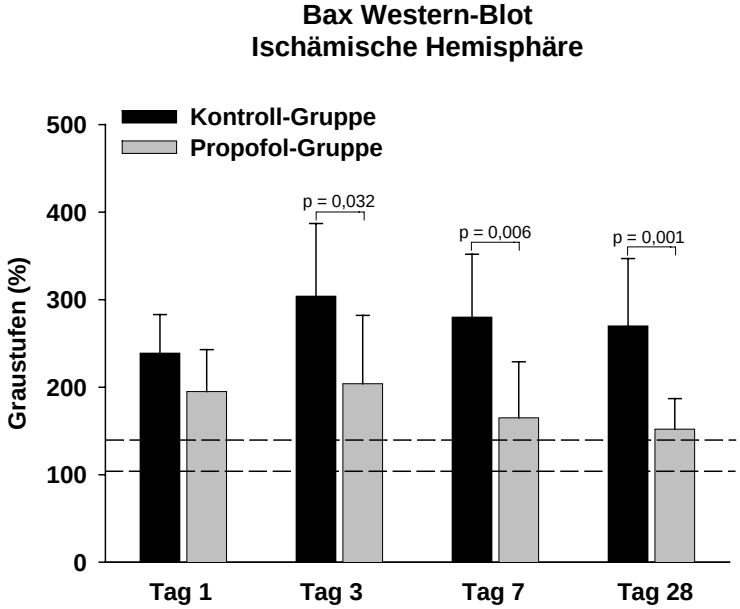


Abb. 27 Western-Blot: Bax-Protein ischämische Hemisphäre

Vergleichende Darstellung der Western-Blot-Analyse (Graustufen in Prozent) des Bax-Proteins im Bereich des Hippocampus der ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen (je n = 32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativ-Tiere). Signifikanzen: nicht signifikant = keine Kennzeichnung; signifikant = p-Wertangabe

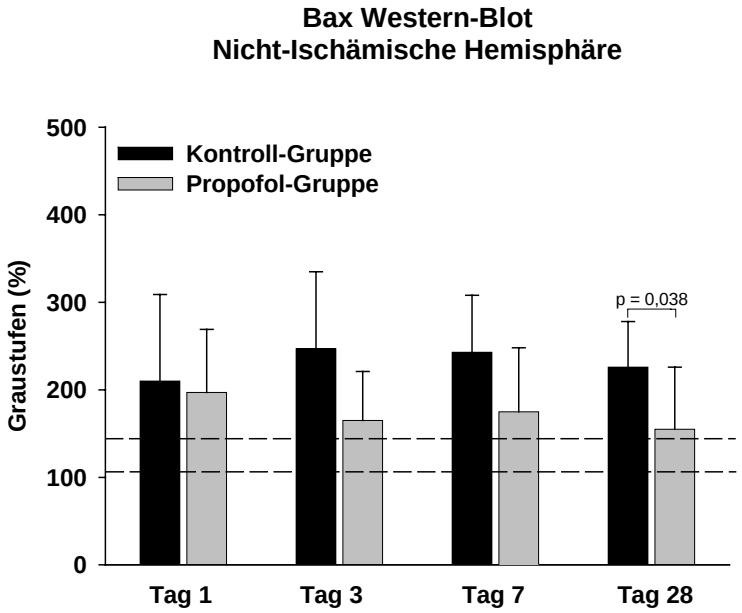


Abb. 28 Western-Blot: Bax-Protein nicht-ischämische Hemisphäre

Vergleichende Darstellung der Western-Blot-Analyse (Graustufen in Prozent) des Bax-Proteins im Bereich des Hippocampus der nicht-ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen (je n = 32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativ-Tiere). Signifikanzen: nicht signifikant = keine Kennzeichnung; signifikant = p-Wertangabe

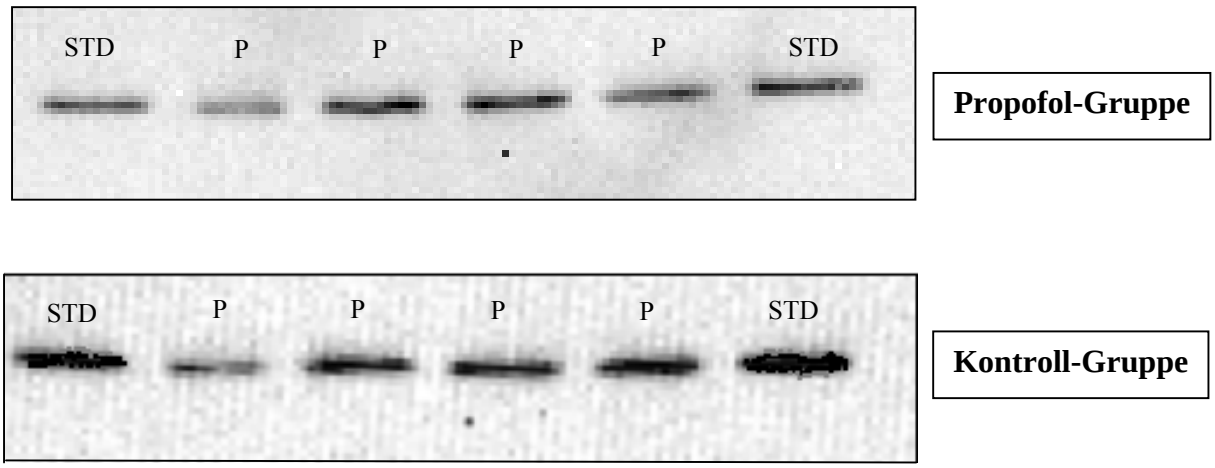


Abb. 29 Ausschnitte der Western-Blot Entwicklung

Darstellung der mit dem Chemilumineszensfarbstoff markierten Bax-Proteine (P) und des Standards (STD) eines Tieres der Propofol-Gruppe und eines der Kontroll-Gruppe

Bei einem generalisierten Test stellt man signifikante Effekte der Behandlung fest. Nachträgliche paarweise Vergleiche weisen dabei eine signifikante Erhöhung der Bax-Protein Werte der Kontroll-Gruppe im Vergleich zur Propofol- und Nativ-Gruppe auf.

Die separate Auswertung für jeden Tag entdeckt signifikante Unterschiede an den Tagen drei, sieben und 28. Für die ischämische Hemisphäre ist die Konzentration des Bax-Proteins in der Propofol-Gruppe an den Tagen drei, sieben und 28 signifikant erniedrigt, verglichen mit der Kontroll-Gruppe. Am Tag drei und sieben ist für die nicht-ischämische Hemisphäre das Bax-Protein in der Propofol-Gruppe tendenziell und am Tag 28 signifikant erniedrigt.

Ein Vergleich der ischämischen mit der nicht-ischämischen Hemisphäre zeigt keine signifikanten Effekte auf.

p53-Protein

Tab. 17. Relative Intensität der Chemilumineszenz des p53-Proteins

Gruppen	Untersuchungs-Zeitpunkt (Tage)	ischämische Hemisphäre	nicht-ischämische Hemisphäre
Kontroll-Gruppe	1	147 ± 55	125 ± 23
	3	135 ± 36	126 ± 25
	7	136 ± 43	121 ± 33
	28	137 ± 30	130 ± 24
Propofol-Gruppe	1	117 ± 35	114 ± 31
	3	104 ± 31	100 ± 28
	7	119 ± 50	107 ± 31
	28	124 ± 55	113 ± 66
Nativ-Gruppe		127 ± 28	140 ± 33

Relative Intensität der Chemilumineszenz (MW ± SD) des p53-Proteins im Bereich des Hippocampus der beiden Gehirnhälften der zwei Versuchsgruppen zu den vier Untersuchungspunkten und der Nativ-Gruppe als physiologischer Vergleichswert. Signifikanzen: keine Signifikanzen

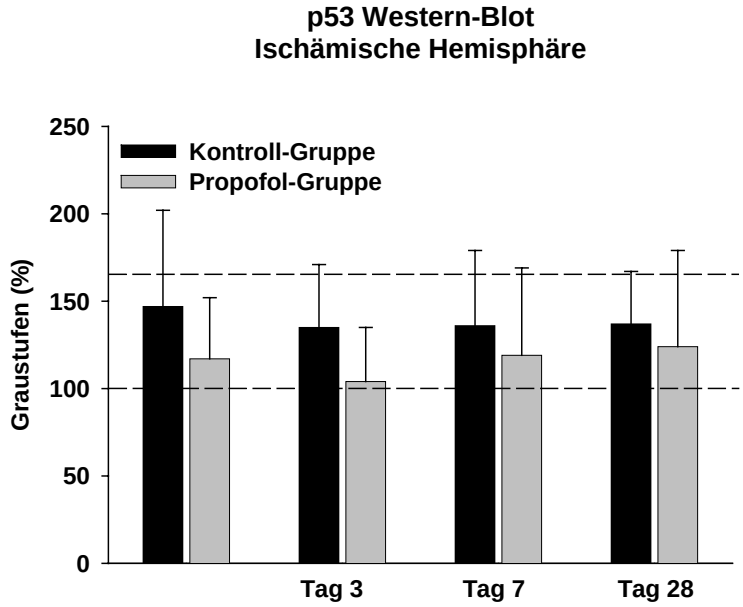


Abb. 30 Western-Blot: p53-Protein ischämische Hemisphäre

Vergleichende Darstellung der Western-Blot-Analyse (Graustufen in Prozent) des p53-Proteins im Bereich des Hippocampus der ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen (je n = 32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativ-Tiere). Signifikanzen: keine Signifikanzen

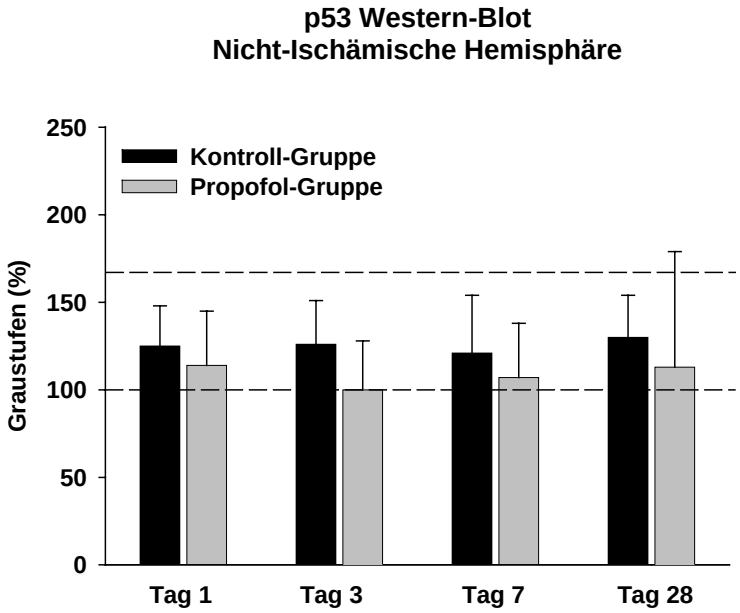


Abb. 31 Western-Blot: p53-Protein nicht-ischämische Hemisphäre

Vergleichende Darstellung der Western-Blot-Analyse (Graustufen in Prozent) des p53-Proteins im Bereich des Hippocampus der nicht-ischämischen Gehirnhälfte der zwei Versuchsgruppen (je n = 32) zu den vier Untersuchungszeitpunkten, sowie des physiologischen Vergleichswertes zwischen den gestrichelten Linien (Nativ-Tiere). Signifikanzen: keine Signifikanzen

Bei einem generalisierten Test stellt man signifikante Effekte der Behandlung fest.

Nachträgliche paarweise Vergleiche weisen dabei eine signifikante Erhöhung der p53-Konzentration der Kontroll-Gruppe im Vergleich zur Propofol-Gruppe auf.

Bei einer weiteren separaten Analyse der Subgruppen auf die Untersuchungszeitpunkte ergeben sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Propofol-Gruppe.

Auch Effekte für die Hemisphären sind nicht festzustellen.

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Ischämiemodell

Tierversuche bereiten in der Öffentlichkeit ethische und moralische Schwierigkeiten. Es wird immer öfter gefordert, auf in-vitro-Modelle zurückzugreifen. Da die Ursachen und Folgen eines ischämischen Infarkts beim Menschen allerdings sehr vielfältig sind und Untersuchungen an einzelnen Zellen oder ischämischen Gewebeschnitten die Komplexität eines ischämischen Geschehens nicht widerspiegeln können, ist es unerlässlich, in Studien der cerebralen Ischämie auf Tierversuche zurückzugreifen. Sie erfüllen die geforderte Reproduzierbarkeit ablaufender pathophysiologischer Prozesse über die Möglichkeit einer Überwachung und Kontrolle verschiedener Parameter vor und während eines Versuches. Ein weiterer Vorteil eines Tierversuches liegt in der Möglichkeit, umfassende histologische, biologische und pathologische Untersuchungen intra- und postoperativ am Gehirn durchzuführen (GINSBERG und BUSTO 1989).

In Tierversuchen kommen die verschiedensten Tierarten zum Einsatz (Katzen, Hunde, Schweine, Pferde etc.). In der heutigen Zeit werden hauptsächlich Nagetiere verwendet, da sie besser verfügbar, leicht zu halten sind und geringere Kosten verursachen. Die Kosten ergeben sich zum einen aus einem geringen Verbrauch an teuren Medikamenten, zum anderen ist wegen der geringen Größe eine Probengewinnung und Lagerung einfacher und kostengünstiger als bei größeren Säugetieren. Zudem erleichtert eine rasche Generationsfolge die Inzucht relativ homogener Tiere. Ein wichtiges Kriterium ist eine vergleichbare Anatomie und Physiologie zu höheren Säugetieren (GINSBERG und BUSTO 1989). An Rattenmodellen sind verschiedenste cerebrale Ischämiemodelle erprobt worden, wobei je nach Zielsetzung der Studie eine Methode zur Induktion einer cerebralen Ischämie ausgewählt wird (GINSBERG und BUSTO 1989).

Im vorliegenden Versuch ist ein Rattenmodell einer temporären inkompletten einseitigen Hemisphärenischämie mit anschließender Reperfusion gewählt worden. Hierzu wird die rechte A. carotis communis, nachdem der mittlere arterielle Blutdruck durch Blutentzug auf 40 mmHg gesenkt wurde, für 45 min verschlossen. Das verursacht in der selektiv vulnerablen Hippocampusformation besonders in der rechten ischämischen Hemisphäre neuronale Schäden. Trotz des Verschlusses der rechten A. carotis communis gibt es noch eine geringe Restdurchblutung der betroffenen Region. Diese wird durch die in Kapitel 2.1.4 beschriebene

Kollateralversorgung des Gehirns verursacht. Die Restdurchblutung ist erwünscht, da sie ein Anfluten des Anästhetikums Propofol ermöglicht und es so seine potentielle neuroprotektive Wirkung ausüben kann. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse zu verhindern, erhält die Kontroll-Gruppe mit Fentanyl/N_2O eine Form der Anästhesie, die nachgewiesener Maßen den neurologischen Schaden der Tiere nicht beeinflusst. Auch die cerebrale Autoregulation des Blutflusses und der cerebrale Sauerstoffverbrauch ändern sich unter dieser Narkoseform nicht. Zudem gleicht der spinale und cerebrale Blutfluss dem eines wachen Tieres (HOFFMANN et al. 1992). Diese Fentanyl/N_2O Narkose ist ausreichend in ihrer analgetischen und sedativen Wirkung bei nicht gestressten und nicht manipulierten Tieren. Die Hautschnitte werden aus diesem Grund zusätzlich mit einem Lokalanästhetikum (Bupivacain 0,5%) unterspritzt.
Das gewählte Tiermodell ermöglicht die von einem Tierversuch geforderten reproduzierbaren, validen Werte und Ergebnisse. Dieses wird über die intensive Überwachung aller Versuchsparameter und deren Korrekturmöglichkeit erreicht.

4.1.2 Räumliche und semiquantitative Darstellung der Proteine mit Immunfluoreszenz-Färbung

Die Immunfluoreszenz-Färbung wird oftmals zur Detektion der Apoptose-assoziierten Proteine Bcl-2, Mdm-2, Bax und p53 in der Forschung angewendet (HUGHES et al. 1996; EBERSPÄCHER et al. 2003). Ein großer Vorteil der Immunfluoreszenz-Färbung ist, dass man die Proteine sowohl in ihrer räumlichen Verteilung als auch semiquantitativ im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus darstellen kann.
Die in der vorliegenden Studie verwendeten Antikörper können in gereinigter und hochspezifischer Form erworben werden, so dass unspezifische Anfärbungen der Proteine im Hintergrund vermieden werden. Zudem werden bei jeder Färbung Positiv- und Negativkontrollen angefärbt. Sie dienen zur Erfolgs- und Qualitätskontrolle. Der zweite Antikörper enthält einen Fluoreszenzfarbstoff. Dieser ist lichtempfindlich und kann mit der Zeit verblassen. Um Auswirkungen auf die Ergebnisse zu vermeiden, wird eine Exposition mit Licht vermieden und die Färbungen der Gehirnschnitte werden innerhalb von 24 h mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop (CLSM) bewertet und mit Hilfe eines Computers dokumentiert.
Die Überwachung der direkten Leistung des CLSM wird mit einem Powermeter durchgeführt. Dieser misst die Leistung des Lasers im Strahlengang. Schwankungen in der Laserleistung werden so festgestellt und können mit Hilfe von Umrechnungstabellen korrigiert werden. Die Immunfluoreszenz-Färbung und die Auswertung am CLSM werden immer von denselben

zwei Untersuchern durchgeführt. So können Fehler in dem schwierigen Färbe- und Auswerteverfahren vermieden werden.

4.1.3 Semiquantitative Analyse der Proteine mit Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse ist ein Verfahren zur qualitativen und semiquantitativen Messung von Proteinen. Sie ist sehr aufwendig und erstreckt sich jeweils über zwei Tage. Um Fehler zu vermeiden, ist die Analyse immer von denselben zwei kompetenten Personen durchgeführt worden. Ein Vorteil ist, dass mehrere Proteine auf eine Membran als Trägermatrix aufgetragen, aufgetrennt und dann analysiert werden können. Ebenso kann durch einen Standard (konstante Proteinmenge und konstantes Volumen), der bei jeder Analyse mitläuft, die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden. Aus diesem Grund wird die Western-Blot-Analyse gerne in der Forschung zur Proteinanalyse angewendet (HUGHES et al. 1996; EBERSPÄCHER et al. 2003). Der Standard wurde vor der Studie hergestellt. Um die Proben untereinander vergleichen zu können, pipettiert man Einzelproben mit einer Proteinmenge von exakt 20 µg. Diese laufen im Gel nebeneinander her. Zum Probenangleich wurde das Verfahren nach BRADFORD (1976) angewandt. Ein Problem bei dem verwendetem Semi-Dry Verfahren ist die Erwärmung während des Blot-Vorgangs. Dabei kann es zur Überhitzung des Gels kommen. Die Temperatur wird über die relativ lange Transferzeit durch eine niedrige Ampere-Zahl so gering wie möglich gehalten. Eine regelmäßige Wartung der Grafitplatten der Transfergeräte gewährleistet einen guten und sicheren Proteintransfer. Ein großer Vorteil des Semi-Dry Verfahrens ist wiederum eine kürzere Transferzeit und ein geringerer Verbrauch an Transferpuffern im Vergleich zu anderen Verfahren. Zur Detektion der Proteine Bcl-2, Mdm-2, Bax und p53 werden jeweils ein erster und ein zweiter Antikörper verwendet. Um zu verhindern, dass während der Inkubation ein Verlust der Antikörpermischung und ein Austrocknen der Membranen auftreten, schweißt man diese blasenfrei in Plastiktüten ein. Der erste Antikörper richtet sich gegen das gesuchte Apoptose-assoziierte Protein. Der zweite Antikörper bindet am ersten und wird über ein ihm anhaftendes Enzym sichtbar gemacht. Die Auswertung der mit einer digitalen Kamera erfassten Chemilumineszenzen erfolgt mit einer speziellen Software (Kodak 1D 3.5). Mit dieser Software können Intensitätsunterschiede von über 5000 Graustufen exakt bestimmt werden. Zur Vermeidung von Fehlern bei der Auswertung führt man die Auswertung dreimal durch und errechnet den Mittelwert. Dieser geht in die Auswertung ein. Die Western-Blot-Analyse zeigt oft weniger spezifische Ergebnisse als die Immunfluoreszenz-Färbung. Bei der Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbung gehen nur die CA1- und CA3-Region des Hippocampus ein. In die Western-Blot-Analyse kommt zudem

noch der Gyrus dentatus und noch anhaftendes Cortexgewebe. Die Regionen des Hippocampus reagieren empfindlicher auf Apoptose-assoziierte Proteine als die für die Western-Blot-Analyse verwendeten Gewebe bei einem ischämischen Schaden. Dadurch erklären sich womöglich Unschärfen in der Western-Blot-Analyse im Vergleich zur Immunfluoreszenz-Färbung.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Gemessene Parameter

Um schädliche Einflüsse auf das Ausmaß des cerebralen Schadens so gering wie möglich zu halten und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und somit die Vergleichbarkeit von experimentellen Studien zu gewährleisten, werden während der operativen Phase des Versuches eine Reihe von Messungen vorgenommen und zu vier festgelegten Zeitpunkten dokumentiert. Aufgezeichnet werden vor Versuchsbeginn das Körpergewicht der Tiere und während dem operativem Abschnitt die perikranielle und rektale Temperatur, der mittlere arterielle Blutdruck, die Blutglucose, die Herzfrequenz, der pH-Wert und die arteriellen Blutgase (PaO_2, $PaCO_2$).

Körpergewicht (g)

Die Tiere der zwei Versuchsgruppen (Propofol- und Kontroll-Gruppe) sowie der Nativ-Gruppe zeigen keine signifikanten Unterschiede in ihrem Gewicht. Die in den Versuch eingegangenen Ratten haben ein Durchschnittsgewicht von 403 ± 59 g. Da das Gewicht mit dem Alter korreliert, weiß man, dass die Tiere ein ungefähres Alter von 12 Wochen haben. Aufgrund der Ähnlichkeit des Gewichts der Tiere kann man davon ausgehen, dass es keinen Einfluss auf den neurologischen Schaden ausübt.

Temperatur

Zu vier festgelegten Zeitpunkten (Ausgangswert, Ischämie, Reperfusion und Erholung) werden die perikranielle und rektale Temperatur gemessen. Die perikranielle Temperatur wird über einen Rückkopplungsmechanismus auf einem physiologischen Wert von 37,5 °C gehalten. Eine konstante Gehirntemperatur ist deshalb wichtig, weil eine Studie von WARNER et al. (1993) bei einer fokalen Ischämie der Ratte gezeigt hat, dass schon eine Erhöhung der Gehirntemperatur um 1,2 °C die Größe des ischämischen Infarkts um das Doppelte vergrößern kann. Da während einer Ischämie die Körpertemperatur von der cerebralen Temperatur abweichen kann, reicht eine rektale Messung zur Regulierung der Hirntemperatur nicht aus (BUSTO et al. 1987). Weder bei der rektalen noch bei der perikraniellen Temperatur zeigen sich signifikante Abweichungen. Deshalb kann man davon ausgehen, dass die aktuelle Temperatur keinen Einfluss auf den Versuch ausübt.

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP, mmHg)

Gemäß des Versuchsprotokolls wird während der Phase der Ischämie der MAP auf 40 mmHg gesenkt. Aus diesem Grund ist eine signifikante Erniedrigung der beiden Versuchsgruppen im Vergleich zu den anderen Messzeitpunkten während der 45-minütigen Ischämie festzustellen. Die Propofol-Gruppe zeigt vor und nach der Ischämie tendenziell niedrigere Werte als die Kontroll-Gruppe. Das stimmt mit den Ergebnissen einer Studie von KAISTI et al. (2003) überein, die zeigt, dass Propofol den peripheren Gefäßwiderstand senkt und über diesen Mechanismus auch der MAP erniedrigt wird. Allerdings sind die Ergebnisse nicht signifikant und die Werte liegen im physiologischen Bereich, so dass in der vorliegenden Studie davon ausgegangen wird, dass sie keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben.

Herzfrequenz (Schläge/min)

Die Herzfrequenz liegt in beiden Gruppen während des gesamten Versuches im physiologischen Bereich. Allerdings sind die Werte der Propofol-Gruppe tendenziell niedriger als die der Kontroll-Gruppe. Dies erklärt sich aus der negativ-chronotropen Wirkung des Propofols (SEBEL und LOWDON 1989). Da die Werte im Referenzbereich liegen, ist anzunehmen, dass sie keinen Einfluss auf den neurologischen Schaden haben.

Blutglucose (mg/dl)

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass ein erhöhter Gehalt an Blutglucose vor und während der Ischämie den neurologischen Schaden erhöht (SIEBER 1997; ISLAM et al. 1998). Den Ratten im eigenen Versuch wird 16 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen, um den Einfluss der Blutglucose zu minimieren, da Studien ergeben haben, dass es während einer Ischämie sonst zu einem Laktatanstieg durch den anaeroben Abbau der Glucose kommt. Dieser Laktatanstieg kann den ischämischen Schaden vergrößern. MARIE et al. (1990) zeigten, dass das Fasten vor einer transienten cerebralen Ischämie die verzögerte neuronale Nekrose reduziert. In einer Vergleichsstudie mit Fentanyl/N_2O-Anästhesie fanden KOCHS et al. (1992) heraus, dass Tiere mit Propofol-Dosen, die zu einem Burst Suppression im EEG führen, nach einer inkompletten cerebralen Ischämie ein verbessertes neurologisches Endergebnis und eine Verminderung des histologischen Schadens am Gehirn zeigen. Der

neuroprotektive Schutz konnte nicht negativ durch künstliche Erhöhung des Blutglucose-gehaltes beeinflusst werden. Dies legt nahe, dass der Schutzmechanismus des Propofols nicht mit der Glucosekonzentration im Zusammenhang steht. Trotz der 16-stündigen Futterkarenz kommt es in der Erholungs-Phase der Kontroll-Gruppe im Vergleich zur Propofol-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg des Glucosewertes. Dieses spiegelt die geringe Narkosetiefe der Ratten unter Fentanyl/N_2O Narkose in dieser Zeitspanne wieder. Die Fentanyl/N_2O Narkose ist bisher eine gebräuchliche Narkose bei klinischen und experimentellen Studien gewesen, da diese, ähnlich wie der Wachzustand einer Ratte, kein neuroprotektives Potential besitzt (HOFFMAN et al. 1992).

Blutgasanalyse

Hämoglobin (Hb, g/dl)

Die Hämoglobinwerte liegen in der Propofol- und Kontroll-Gruppe im physiologischen Bereich. Das Absinken bei beiden Gruppen in der ischämischen Phase ist versuchsbedingt durch den Blutentzug zu erklären. Während der Reinfusion des vorher entzogenen Blutes normalisieren sich die Werte in beiden Gruppen wieder.

pH

Der Blut pH-Wert wird an den vier festgelegten Zeitpunkten während des Versuchs gemessen und durch Applikationen von einer Puffersubstanz (Natriumhydrogencarbonatlösung) reguliert. So wird der pH-Wert auf einem physiologischen Niveau gehalten. Einer negativen Auswirkung, insbesondere während der Ischämie, wird so entgegengesteuert.

Blutgase (PaO_2 und $PaCO_2$)

Eine Studie von WIEBALCK und VAN AKEN (1995) zeigt die negativen Auswirkungen eines zu hohen $PaCO_2$-Wertes. Deshalb wird in dieser Studie der $PaCO_2$ über die Atem-frequenz und das Atemvolumen der Ratten in einem physiologischen Rahmen gehalten. Während des gesamten Versuches liegen die PaO_2- und $PaCO_2$-Werte beider Gruppen im physiologischen Bereich und üben deshalb keinen negativen Einfluss auf die Ergebnisse der Studie aus.

4.2.2 Immunfluoreszenz-Färbung

Bcl-2-Protein

Die Expression von Bcl-2 ist signifikant erhöht in der Propofol-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe am Tag eins für beide Hemisphären und am Tag drei in der ischämischen und tendenziell für die nicht-ischämische Hemisphäre. Für die nicht-ischämische Hemisphäre sind die Werte für Bcl-2 am Tag 28 signifikant erhöht.

Bcl-2 ist ein anti-apoptotisches Protein der Bcl-Familie (GROSS et al. 1999). Viele Studien haben sich mit den schützenden Eigenschaften des Proteins beschäftigt (ZHU et al. 1996; KLUCK et al. 1997). So ist in einer Studie von ZHAO et al. (2003) herausgefunden worden, dass eine Überexpression des Bcl-2-Proteins bei fokalen Ischämien mit oder ohne Reperfusion Neuronen vor dem Absterben schützt. Es hat sich gezeigt, dass eine milde Hypothermie während einer Ischämie bis zu 72 h danach zu einem Anstieg des Bcl-2-Proteins führt und so eine Neuroprotektion stattfindet (ZHANG et al. 2001). Aber auch Anästhetika können die Expression des Bcl-2-Proteins steigern. ENGELHARD et al. (2003) fanden hohe Werte des Bcl-2-Proteins vier Stunden nach einer cerebralen Ischämie unter den Narkosemitteln Dexmedetomidin und S(+)Ketamin im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. In einem Experiment von CHEN et al. (1997) konnte auch eine vermehrte Expression des Proteins bis zu 72 Stunden nach einer globalen Ischämie gefunden werden. In der vorliegenden Studie ist der Anstieg der Expression offensichtlich der Propofol-Narkose zuzusprechen. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis steht die Studie von ENGELHARD et al. (2004). In dieser Studie sind die Bcl-2 Konzentrationen in der Propofol-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe vier Stunden nach einer einseitigen cerebralen Hemisphären-Ischämie gleich geblieben. In der Literatur finden sich keine Studien zur Wirkung von Propofol auf die Konzentration von Bcl-2 Tage oder Wochen nach einer Ischämie. Da in der vorliegenden Studie die Expression des Bcl-2 Proteins sogar bis zum 28 Tag erhöht war, lässt dies die Vermutung zu, dass Propofol möglicherweise auch noch 4 Wochen nach dem gesetzten Schaden neuroprotektiv wirkt.

Mdm-2-Protein

Im generalisierten Test zeigt sich für Mdm-2 weder für die Behandlung noch für die Hemisphären ein signifikanter Effekt. Im Subgruppentest für die Tage stellt man allerdings eine signifikante Erhöhung der Expression der Mdm-2-Proteine der Propofol-Gruppe im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe am Tag eins für die beiden Hemisphären und für die ischämische Hemisphäre eine signifikante und für die nicht-ischämische Hemisphäre eine tendenzielle Erniedrigung am Tag 28 fest. In der oben genannten Studie von ENGELHARD et al. (2004) konnte keine vermehrte Expression von Mdm-2 vier Stunden nach Ischämie und anschließender Reperfusion nachgewiesen werden. TU et al. (1998) wiesen erstmals 8 h nach einer 90-minütigen Okklusion der A. cerebri media Mdm-2 nach. Eine maximale Expression des Proteins wurde nach 24 h detektiert. Nach 48 Stunden hat die Expression wieder abgenommen. Weitere Studien zu der Expression des Proteins bei einer cerebralen Ischämie sind zurzeit nicht verfügbar.

Mdm-2 ist eine E3-Ligase, die durch Übertragung von Ubiquitinresten in der Lage ist, p53 für den Abbau in Proteasomen zu markieren und wirkt so anti-apoptotisch (KUBBUTAT et al. 1997). Mdm-2 wird vermehrt nach einem Zellschaden exprimiert, aber auch p53 aktiviert die Expression von Mdm-2. Nach einem Zellschaden verliert die Zelle eine DNS-abhängige Proteinkinase, so dass der größte Teil des neu gebildeten Mdm-2-Proteins nicht phosphoreliert ist. Dieses nicht phosphorelierte Mdm-2 bildet mit p53 Komplexe und inaktiviert es (MAYO et al. 1997). Der Mdm-2-p53-Komplex kann wahrscheinlich nicht durch die Immunfluoreszenz-Antikörper markiert werden, was die niedrige Konzentration von Mdm-2 in der Immunfluoreszenz-Färbung erklären könnte. Da es unter einer Propofol-Narkose zu einer Hochregulierung des Proteins über mindestens einen Tag kommt, lässt dies auf seine neuroprotektive Wirkung in diesem Zeitraum schließen.

Bax-Protein

Ein zentrales Ergebnis stellt die verminderte Expression des Bax-Proteins in der Propofol-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe dar. Schon der generalisierte Test für die Behandlung zeigt, dass die Kontroll-Gruppe im Vergleich zur Propofol- und Nativ-Gruppe in der Erhöhung der Expression der Bax-Proteine signifikante Effekte aufweist. Im Subgruppentest für die einzelnen Untersuchungstage stellt man eine signifikant erniedrigte Expression des Bax-Proteins im Bereich des Hippocampus für die Propofol-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe am Tag eins, drei und sieben fest. Am Tag 28 ist für beide Hemisphären eine tendenzielle Erhöhung des Proteins festzustellen.

Bax gilt in der großen Bcl-Familie als pro-apoptotisches Protein und wird nach einem ischämischen Insult vermehrt exprimiert (GROSS et al. 1999). Da Tiere der Kontroll-Gruppe mit einer Fentanyl/N_2O Narkose eine erhöhte Expression des Bax-Proteins aufweisen, bestätigt dies, dass der identische ischämische Insult einen größeren Schaden verursacht, als bei Tieren unter einer Propofol-Narkose. Dieses Ergebnis lässt auf einen Schutzmechanismus des Hypnotikums Propofol schließen. Auch in einer Vorgänger-Studie von ENGELHARD et al. (2004) war die Expression von Bax unter einer Propofol-Narkose 4 h nach cerebraler Ischämie erniedrigt. In dem Versuch wurden 4 h nach einer 30minütigen Ischämie durch einen Clip auf die A. carotis communis bei einem MAP von 35 mmHg und anschließender Reperfusion die Apoptose-assoziierten Proteine Bcl-2, Mdm-2, Bax und p53 untersucht. KRAJEWSKI et al. (1995) fanden 0,5-3 h nach einer 10minütigen globalen Ischämie, induziert durch einen Herzstillstand, ohne eine Neuroprotektion eine erhöhte Expression des Bax-Proteins. In einer Studie ohne eine Neuroprotektion von NIWA et al. (1997) wurde die Expression der Proteine Bax und Bcl-2 im Hippocampus nach einer transienten Frontalhirnischämie im zeitlichem Verlauf untersucht. Die Bax Werte waren in der CA1-Region erhöht mit einem Maximum nach 72 h und verschwanden nach 96 h. In der vorliegenden Studie sind die Bax Werte auch nach 7 Tagen in der Kontroll-Gruppe signifikant und tendenziell nach 28 Tagen erhöht. Dies liegt wahrscheinlich an der Wahl eines anderen Ischämiemodells und daran, dass nicht nur die CA1-Region sondern auch die CA3- Region des Hippocampus untersucht wurde.

p53-Protein

Im generalisierten Test auf die Behandlung zeigt sich, dass die Expression des p53-Proteins in der Kontroll-Gruppe im Vergleich zur Propofol-Gruppe signifikant erhöht ist. Dieses entspricht dem zu erwartenden Bild. Vergleicht man jedoch die Konzentration des p53 zu den einzelnen Untersuchungspunkten, finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Das p53-Protein spielt eine zentrale Rolle bei der Apoptose. Unter anderem ist es für die Transkription pro-apoptotischer Proteine wie z.B. Bax verantwortlich (VOGELSTEIN et al. 2000). Wie oben (siehe Kapitel 4.1.1-Bax) besprochen, ist die Expression von Bax in der vorliegenden Studie in der Kontroll-Gruppe insgesamt hochreguliert, da die Gruppe nicht neuroprotektiv geschützt wird. 1992 zeigten CHOPP et al. erstmals, dass 12 h nach einem cerebralen Schaden, ausgelöst durch einen Verschluss der A. cerebri media, die Expression des Proteins p53 hochreguliert wird. Im Subgruppentest für die Tage sind wie erwähnt keine Signifikanzen festgestellt worden. Für dieses Ergebnis gibt es verschiedene Erklärungsansätze: LI et al. (1994) untersuchten zwei Formen des p53-Proteins, den Wildtyp (wt-p53) und seine mutierte Form (m-p53). In diesem Versuch wurde 12 h nach der Reperfusion m-p53 gemessen. Es erreichte sein Maximum nach 24 h. Nach 168 h konnte m-p53 nicht mehr nachgewiesen werden. Der Wildtyp konnte gar nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass p53 in der vorliegenden Studie zum größten Teil als wt-p53 vorliegt. Ebenso könnten die Zeiträume der Proteinuntersuchung zu groß sein. HUGHES et al. (1996) demonstrierten, dass es bei einer Erregung von NMDA-Rezeptoren durch Quinolinsäure bei Ratten zu einer erhöhten Expression von p53 mit konsekutiver Induktion von Bax kommt. Interessant ist, dass nur einer von sechs Antikörpern immunhistochemisch reagierte, nämlich der, der gegen wt-p53 und m-p53 gerichtet war. Die Antikörper, die nur gegen wt-53 ausgerichtet waren, zeigten keine Reaktion. Es wurde vermutet, dass dies an einer Konformationsänderung des p53-Antikörpers lag, ausgelöst durch Schäden der Ischämie. Außerdem kann eine übermäßige Menge des m-p53 wt-p53 inaktivieren. Der in der vorliegenden Studie verwendete Antikörper stammt aus mit rekombinantem wt-p53 hyperimmunisierten Mäusen und soll beide Typen des p53-Proteins nachweisen. Konformationsänderungen des p53-Proteins könnten die Ergebnisse der vorliegenden Studie erklären. Die ischämische Hemisphäre zeigt im globalen Test signifikante Effekte, die sich durch eine Erniedrigung der p53-Protein Konzentration darstellen. Es ist wahrscheinlich, dass es durch den Schaden verstärkt zu Konformations-

änderungen des p53-Proteins gekommen ist, so dass der verwendete Antikörper das Protein nicht mehr detektieren konnte.

Hemisphären-Vergleich

Zwischen der ischämischen und nicht-ischämischen Hemisphäre kommt es bei einer globalen Untersuchung der untersuchten Proteine bis auf p53 zu keinem signifikanten Unterschied. Dies liegt offensichtlich an dem verwendeten Ischämie-Modell. In dieser Studie wird der mittlere arterielle Blutdruck zeitweise neben dem Verschluss der rechten A. carotis communis auf 40 mmHg gesenkt. Der ischämische Schaden wird vermutlich größtenteils durch die Hypotension verursacht. Zudem besitzen Ratten, wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben, eine gute Versorgung durch Kollateralgefäße. Nach dem Verschluss eines Hauptgefäßes kommt es zur Versorgung des ischämischen Gebietes durch die kollateralen Gefäße.

4.2.3 Western-Blot-Analyse

Bcl-2-Protein

Im generalisierten Test der Behandlung zeigt sich ein Effekt in der verminderten Expression des Bcl-2-Proteins in der Kontroll-Gruppe im Vergleich zur Propofol-Gruppe. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Immunfluoreszenz-Färbung zeigt sich im Subgruppentest nur eine signifikante Erhöhung der Bcl-2 Werte für die ischämische Hemisphäre am Tag eins. Diese ist tendenziell auch am Tag eins in der nicht-ischämischen Hemisphäre vorhanden. Die Untersuchung der vier Zeitpunkte zeigt tendenziell über einen längeren Zeitraum erhöhte Werte in der Propofol-Gruppe. Das schwächere Ergebnis ist durch die wesentlich ungenauere Analysemöglichkeit des Western-Blots im Vergleich zur Analyse mit Immunfluoreszenz-Färbung zu erklären. Bei der Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbung gehen nur die CA1- und CA3-Region des Hippocampus ein. Im Kapitel 4.2.2 (Bcl-2) wird näher darauf eingegangen.

Mdm-2-Protein

Die Mittelwerte der relativen Intensität der Chemilumineszenz des Mdm-2-Proteins zeigen signifikante Effekte in der Behandlung in der Erhöhung der Werte der Kontroll-Gruppe im Vergleich zur Propofol-Gruppe. Signifikante Effekte zeigt auch der globale Test auf die Hemisphären. Die ischämische Hemisphäre zeigt vermehrte Werte der Expression des Mdm-2-Proteins. Die Resultate stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen der Immunfluoreszenz-Färbung, welche die anti-apoptotischen Eigenschaften des Proteins und die neuroprotektive Wirkung der Propofol-Narkose bestätigen. Die detektierte Erhöhung der Expression des Mdm-2-Proteins kann mit der Mdm-2-p53-Komplexbildung im Zusammenhang stehen (siehe Kapitel 2.3.3.2). Diese Komplexbildung ermöglicht wahrscheinlich eine vermehrte Bindung des Western-Blot Antikörpers. Eine andere Erklärung der Ergebnisse der Western-Blot-Analyse beruht auf den ungenaueren Analysemöglichkeiten des Western-Blots im Vergleich zur Analyse der Immunfluoreszenz-Färbung (siehe Kapitel 4.1.3).

Bax-Protein

Einen signifikanten Effekt ergibt die Analyse des generalisierten Tests der Behandlung für das Bax-Protein bei der Western-Blot-Analyse. Dieser beruht auf einer Erhöhung der Werte der Kontroll-Gruppe im Vergleich zur Propofol-Gruppe und Nativ-Gruppe. Im Subgruppentest auf die Tage zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Expression des Bax-Proteins noch am Tag 28 für beide Hemisphären. Am Tag drei und sieben ist er signifikant für die ischämische und tendenziell für die nicht-ischämische Hemisphäre. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse decken sich mit der Immunfluoreszenz-Färbung bis auf die verminderte Expression des pro-apoptotischen Bax-Proteins bis einschließlich Tag 28 der Propofol- im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe. KRAJEWSKI et al. (1995), NIWA et al. (1997) und ENGELHARD et al. (2004) zeigten in ihren Studien der cerebralen Ischämie, dass die Expression des Bax-Proteins mit einer neuroprotektiven Substanz vermindert und ohne Schutz erhöht ist. Diese Ergebnisse unterstützen die Aussage, dass das Narkosemittel Propofol 4 Wochen neuroprotektiv wirken kann. Weiteres ist im Kapitel 4.2.2-Bax beschrieben.

p53-Protein

Die Ergebnisse der Expression des p53-Proteins decken sich mit denen der Immunfluoreszenz-Färbung. Die Werte sind nur im generalisierten Test der Behandlung signifikant erhöht im Vergleich der Kontroll-Gruppe mit der Propofol-Gruppe. Im Subgruppentest für die Tage finden sich keine Signifikanzen. Im Kapitel 4.2.2-p53 werden mögliche Gründe erörtert.

4.3 Abschlussbetrachtung

Die Erforschung neuroprotektiver Mechanismen von Anästhetika und deren Einsatz zur Behandlung cerebraler Schäden steht schon lange im Interesse experimenteller Studien. Für Propofol ist in Experimenten bereits eine neuroprotektive Wirkung über Stunden oder wenige Tage durch Verbesserung des neurologischen Endergebnisses und eine Reduktion der Nekrose nachgewiesen worden (YOUNG Y. et al. 1997; YAMAGUCHI et al. 2000).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen auf einen neuroprotektiven Mechanismus des Anästhetikums Propofol im Bezug auf Apoptose bei Tieren nach einer temporären inkompletten cerebralen Ischämie bis zu 28 Tagen hin. Der apoptotische Zelltod zieht sich über einen längeren Zeitraum hin und bietet so die Möglichkeit eines erfolgreichen Einsatzes des Anästhetikums Propofol. Diese Schlussfolgerung beruht auf den Auswertunen der Immunfluoreszenz-Färbungen und der Western-Blot-Analyse. Die Verfahren zeigen eine verminderte Expression der pro-apoptotischen Proteine Bax und p53 und eine verstärkte Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Mdm-2 in der Propofol-Gruppe bis zum 28 Tag nach cerebraler Ischämie.

Trotz intensiver Bemühungen sind die neuroprotektiven Mechanismen des Narkotikums Propofol im Zusammenhang mit den Apoptose-assoziierten Proteinen nach einer cerebralen Ischämie weitgehend unbekannt. Um Propofol aber sinnvoll zur therapeutischen Behandlung cerebraler Ischämien einsetzen zu können, sind weitere experimentelle und klinische Studien nötig. Denkbare Ansätze sind die Erforschung des Einflusses von Propofol auf das neurologische Endergebnis nach einem Schädel-Hirn-Trauma oder des Einflusses auf die Entwicklung neuronaler Stammzellen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden 72 männliche Sprague-Dawley Ratten (403 ± 59g) mit Halothan anästhesiert, intubiert und mit Isofluran (1,5-2,5 Vol% in N_2O/O_2 mit $FiO_2 = 0,33$) beatmet. Zur Kontrolle des arteriellen Blutdrucks, zur Blutentnahme und zur Applikation der Medikamente legte man in die A. und V. femoralis sowie in die V. jugularis Katheter. Zur Kontrolle der perikraniellen und rektalen Temperatur und weiterer Parameter wurden Sonden angebracht.

Nach Beendigung der Präparation wurden die Tiere randomisiert in eine Kontroll-Gruppe (n = 32): 25 µg/kg/h Fentanyl und N_2O/O_2 ($FiO_2 = 0,33$) und eine Propofol-Gruppe (n = 32): 1,0 mg/kg/min Propofol i.v. eingeteilt und die Narkose gruppenspezifisch gewechselt. Beide Gruppen bekamen zusätzlich ein Muskelrelaxans (Rocuroniumbromid 25 mg/kg/h). Durch eine hämorrhagische Hypotension (MAP = 40 mmHg) und einen temporären Verschluss der rechten A. carotis communis wurde für 45 min eine cerebrale Ischämie mit anschließender Reperfusion induziert. Die Blutgase, die perikranielle Temperatur und den pH-Wert hielt man konstant. Nach Ablauf von 1, 3, 7 oder 28 Tagen wurden die Tiere in tiefer Narkose getötet und das Gehirn zur weiteren Analyse tiefgefroren, geschnitten (7µm) bzw. weiter aufbereitet. Als physiologische Referenz gingen zusätzlich die Gehirne der Tiere einer Nativ-Gruppe (n = 8) ein. Die Apoptose-assoziierten Proteine Bcl-2, Mdm-2, Bax und p53 wurden nach einer Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Laserscan-Mikroskop und dem Computerprogramm KS 400 (Zeiss & Microsoft) sowie der Western-Blot-Analyse qualitativ und semiquantitativ bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen in der Immunfluoreszenz-Färbung der Propofol-Gruppe im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe eine signifikant verminderte Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax am Tag 1, 3, 7 in beiden Hemisphären und beim Western-Blot signifikant am Tag 3, 7 und 28 für die ischämische Hemisphäre und signifikant für die nicht-ischämische Hemisphäre am Tag 28 und tendenziell am Tag 3 und 7. Das pro-apoptotische Protein p53 weist nur im globalen Vergleich signifikante Effekte in beiden Analyseverfahren auf. Die Expression ist in der Propofol-Gruppe niedriger. Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 zeigt signifikante Erhöhung der Propofol-Gruppe im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe am Tag 1 und 3 für die ischämische und am Tag 1 und 28 für die nicht-ischämische Hemisphäre in der Immunfluoreszenz. Beim Western-Blot zeigt sich für Bcl-2 eine signifikante Erhöhung am Tag 1 für die ischämische und tendenzielle für die nicht-ischämische Hemisphäre. Die Ergebnisse beider Analyseverfahren für das anti-apoptotische Protein Mdm-2 divergieren. Die Immunfluoreszenz zeigt eine signifikante Erhöhung des Proteins für beide Hemisphären am Tag 1 und eine verminderte Expression am Tag 28 für die ischämische Hemisphäre. Der

Western-Blot zeigt im Untergruppentest auf die Tage keine signifikanten Unterschiede. Im globalen Test auf die Behandlung zeigt die Kontroll-Gruppe im Vergleich zur Propofol-Gruppe signifikante Effekte in der Erhöhung der Expression des Mdm-2 Proteins. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Analyseverfahren können durch unterschiedliche Probenaufbereitungen erklärt werden. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass Propofol bis zu 28 Tage nach einem ischämischen Insult im Zusammenhang mit Apoptose-assoziierten Proteinen neuroprotektiv wirkt. Dem Effekt können anti-apoptotische Wirkungsmechanismen zu Grunde liegen. Es sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig, um einen genaueren Einblick in die Mechanismen zu gewinnen und so Behandlungsmöglichkeiten bei einer cerebralen Ischämie einzuführen.

6 SUMMARY

The effect of Propofol on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia within a period of 28 days in the rat

This study investigates the effect of the anesthetic agent propofol on the expression of the apoptosis-regulating proteins Bcl-2, Bax, Mdm-2 and p53 following transient incomplete cerebral ischemia and reperfusion in the rat within a period of 28 days from the insult.

72 fasted male Sprague-Dawley rats (403 ± 59 g) were anesthetized, intubated and ventilated with 2 Vol% isoflurane and N_2O/O_2 (FiO_2 = 0.33). Catheters were inserted into the right femoral artery and vein as well as in the right jugular vein for arterial blood pressure control, drug administration and blood withdrawal. For control of pericranial and rectal temperature as well as further parameters additional probes were applied.

At the end of surgery animals were randomly assigned to one of the following two groups: control-group: (n = 32): 25 µg/kg/h fentanyl i.v. and N_2O/O_2 (FiO_2 = 0.33) and propofol-group: (n = 32): 1.0 mg/kg/min propofol i.v. and O_2/air (FiO_2 = 0.33). Rocuronium (25 mg/kg/h) was applied also to both groups. Ischemia (45 min) was induced by unilateral common carotid artery occlusion plus hemorrhagic hypotension (MAP = 40 mmHg). Pericranial temperature (37.5 °C), arterial blood gases and pH were maintained constant. 1, 3, 7 and 28 days after incomplete cerebral ischemia the animals were deeply anesthetized and killed, the brains removed, frozen at -70 °C and cut into slices (7 µm) or prepared for Western-Blot-analysis. Brains from native animals (n = 8) were used as reference. The apoptosis-regulating proteins Bcl-2, Mdm-2, Bax and p53 were qualitatively and quantitatively evaluated after immunofluorescence-staining using a laserscan-microscope and KS 400 software and after Western-Blot-analysis.

The results in the immunofluorescence-staining for the propofol-group compared to the control-group show for both hemispheres the concentration of the pro-apoptotic Bax-protein significantly suppressed on day 1, 3 and 7. The Western-Blot-analysis shows a significant suppression for the ischemic hemisphere on day 3, 7 and 28. The non-ischemic hemisphere shows a significant suppression on day 28 and a tendential on day 3 and 7. In a global comparison the expression of p53 is significantly lower in the propofol-group in both analyses. The anti-apoptotic Bcl-2-protein shows a significant increase on day 1 and 3 in the immunofluorescence-staining in the propofol-group compared to the control-group for the ischemic and on day 1 and 28 for the non-ischemic hemisphere. In the Western-Blot-analysis Bcl-2 is significantly increased on day 1 for the ischemic and tendentially for the non-ischemic hemisphere. The data of the anti-apoptotic Mdm-2-protein differ in both analytical

methods. The immunofluorescence-staining shows a significant increase on day 1 for both hemispheres and suppression on day 28 for the non-ischemic hemisphere. There are no significant differences between the groups in the Western-Blot-analysis. A global comparison shows a significant increase in the expression of the Mdm-2-protein in the propofol-group compared to the control-group. The different results of the analytical methods may result from differences in the sample preparation. The present data suggest that neuroprotection in a period of 28 days after an ischemic insult as seen with propofol could involve anti-apoptotic mechanisms. Further investigations will be necessary in the future to investigate the detailed mechanisms of propofol to develop a successful treatment of ischemic insults and their consequences.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Agnati L.F., Zoli M., Kurosawa M., Benfenati F., Biagini G., Zini I., Hallstrom A., Ungerstedt U., Toffano G. und Fuxw K.
A new model of focal brain ischemia based on the intracerebral injection of endothelin-1
Ital Neurol Sci 1991; 12; S. 49-53

Alnemri E.
Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases
J Cell Biochem 1997; 64; S. 33-42

Amorim P., Chambers G., Cottrell J. und Kass I.S.
Propofol reduces neuronal transmission damage and attenuates the change on calcium, potassium and sodium during hyperthermic anoxia in the rat hippocampal slice
Anesthesiology 1995; 83; S. 1254-65

Antkowiak B. und Kirschfeld K.
Neural mechanisms of anesthesia
Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2000; 35; S. 731-43

Böttiger B.W., Teschendorf P., Krumnikl J.J., Vogel P., Galmbacher R., Schmitz B., Motsch J., Martin E. und Gass P.
Global cerebral ischemia due to cardiocirculatory arrest in mice causes neuronal degeneration and early induction of transcription factor genes in the hippocampus
Brain Res Mol Brain Res 1999; 65; S. 135-42

Bradford M.M.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the priciple of protein-dye binding
Analy Biochem 1976; 72; S. 248 - 54

Bray R.
Propofol infusion syndrome in children
Paediatr Anaesth. 1998; 8; S. 491-9

Busto R., Dietrich W.D., Globus M.Y., Valdes I., Scheinberg P. und Ginsberg M.D.
Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury
Cereb Blood Flow Metab 1987; 7; S. 729-38

Cahilly-Snyder L., Yang-Feng T., Francke U. und George D.L.
Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line
Somat Cell Mol Genet 1987; 13; S. 235-44

Chen J., Graham S.H., Nakayama M., Zhu R.L., Jin K., Stetler R.A. und Simon R.P.
Apoptosis repressor genes bcl-2 and bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia
J Cereb Blood Flow Metab 1997; 17; S. 2-10

Chopp M., Li Y., Zhang Z.G. und Freytag S.O.
p53 expression in brain after middle cerebral artery occlusion in the rat
Biochem Biophys Res Commun 1992; 182; S. 1201-7

Cray S., Robinson B. und Cox P.
Lactic acidemia and bradyarrhythmia in a child sedated with propofol
Crit Care Med 1998; 26; S. 2087-92

Dawidowicz A. L., Fornal E., Mardarowicz M. und Fijalkowska A.
The role of human lungs in the biotransformation of propofol
Anesthesiology 2000; 93; S. 992-7

Eberspächer E., Werner C., Engelhard K., Pape M., Gelb A., Hutzler P., Henke J. und Kochs E.
The effect of hypothermia in the expression of the apoptosis-regulating protein Bax after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats
Neurosurg Anesthesiol 2003; 15; S. 200-8

Eguchi Y., Shimizu S. und Tsujimoto Y.
Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis
Cancer Res 1997; 57; S. 1835-40

Engelhard K., Werner C., Eberspacher E., Bachl M., Blobner M., Hildt E., Hutzler P. und Kochs E.
The effect of the alpha 2-agonist dexmedetomidine and the N-methyl-D-asparate antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosisregulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats
Anesth Analg 2003; 96; S. 524-31

Engelhard K., Werner C., Eberspacher E., Pape M., Blobner M., Hutzler P. und Kochs E.
Sevovflurane and propofol influence the expression of apoptosis regulating proteins after cerebral ischemia and reperfsion in rats
Europ J Anaesth 2004; im Druck;

Frey H.H. und Löscher W.
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart; 1996; S. 159-60

Froesch B.A., Aime-Sempe C., Leber B., Andrews D. und Reed J.C.
Inhibition of p53 transcriptional activity by bcl-2 requires its membrane-anchoring domain
J Biol Chem 1999; 274; S. 6469-75
Furlow T.W.J.
Cerebral ischemia produced by four-vessel occlusion in the rat: a quantitative evaluation of cerebral blood flow
Stroke 1982; 13; S. 852-5

Gerriets T., Li F., Silva M.D., Meng X., Brevard M., Sotak C.H. und Fisher M.
The macrosphere model: evalutation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats
J Neurosci Meth 2003; 122; S. 201-11

Geyer R.K., Yu Z.K. und Maki C.G.
The mdm-2 ring-finger domain is required to promote p53 nuclear export
Nat Cell Biol 2000; 2; S. 569-73

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

Graeber M.B. und Moran L.B.
Mechanisms of cell death in neurodegenerative diseases: fashion, fiction, and facts
Brain Pathol 2002; 12; S. 385-90

Gross A., Mcdonald J.M. und Korsmeyer S.J.
Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis
Genes Dev 1999; 13; S. 1899-911

Hans P., Bonhomme V., Collette J., Albert A. und Moonen G.
Propofol protects cultured rat hippocampal neurons against N-methyl-D-asparate receptor-mediated glutamate toxicity
J Neurosurg Anesthesiol 1994; 6; S. 249-53

Harada K., Iwata M., Kono W., Shimonishi T. und Nakanuma Y.
Distribution of apoptotic cells and expression of apoptosis related proteins along the intrahepatic biliary tree in normal an non-biliary disease liver
Histopathology 2000; 37; S. 347-54

Havenaar R., Meijer J.C., Morton D.B., Ritskes-Hoitinga J. und Zwart P.
Biologie, Zucht und Haltung von Versuchstieren
Grundlagen der Versuchstierkunde; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart; 1995; S. 19-70

Hoffman W.E., Werner C., Kochs E., Segil L., Edelman G. und Albrecht R.F.
Cerebral and spinal cord blood flow in awake and fentanyl-N_2O anesthetized rats: evidence for preservation of blood flow autoregulation during anesthesia
Neurosurg Anesthesiol 1992; 4; S. 31-5

Hsu Y.T., Wolter K.G. und Youle R.J.
Cytosol-to-membrane redistribution of bax and bcl-X(L) during apoptosis
Proc Natl Acad U S A 1997; 94; S. 3668-72

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

Hungerhuber E.F.
Neuroprotektion bei fokaler zerebraler Ischämie
Med.Diss. LMU München 2003

Hunter J.J., Bond B.L. und Parslow T.G.
Functional dissiction of the human bcl-2 protein: Sequence requirements for inhibition of apoptosis
Molecul Cellul Biol 1996; 16; S. 877-83

Islam N., Aftabuddin M., Moriwaki A., Koiraka T.R. und Hori Y.
Blood glucose and ischemic brain damage
Indian J Pathol Microbiol 1998; 41; S. 15-22

Ito H., Watanabe Y., Isshiki A. und Uchino H.
Neuroprotective properties of propofol and midazolam, but not pentobarbital, on neuronal damage by forebrain ischemia, based on the GABA receptors
Acta Anaesthesiol Scand 1999; 43; S. 153-62

James R. und Glen J.B.
Synthesis, biological evaluation, and preliminary structure-activity considerations of a series of alkylphenols as intravenous anesthetic agents
Med Chem 1980; 23; S. 1350-7

Jones S., Roe A., Donehower L. und Bradley A.
Rescue of embryonic lethality in mdm-2-deficient mice by absence of p53
Nature 1995; 378; S. 206-8

Jürgensmeier J.M., Xie Z., Deveraux Q., Ellerby L., Bredesen D. und Reed J.C.
Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria
Proc Natl Acad U S A 1998; 95; S. 4997-5002

Kaisti K.K., Langsjo J.W., Aalto S., Oikonen V., Sipila H., Teras M., Hinkka S., Metsahonkala L. und Scheinin H.
Effects of sevoflurane, propofol, and adjunct nitrous oxide on regional cerebral blood flow, oxygen consumption, and blood volume in humans
Anesthesiology 2003; 99; S. 603-13

Kammann U.
Apoptose Info
www.ukammann.de/aopotose.de 2001

Kastan M.B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B. und Craig R.W.
Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage
Cancer Res 1991; 51; S. 6304-11

Kelekar A. und Thompson C.B.
Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis
Cell Biology 1998; 8; S. 324-30

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

Kempski O.S.
Pathologische Neurophysiologie
Grundlagen - Neuromonitoring - Intensivmedizin; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York; 2000; S. 92-4

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

Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., Green D.R. und Newmeyer D.D.
The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis
Science 1997; 275; S. 1132-6

Knudson C.M., Tung K.S., Tourtellotte W.G., Brown G.A. und Korsmeyer S.J.
Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death
Science 1995; 270; S. 96-9

Kochs E., Hoffmann W.E., Werner C., Thomas C., Albrecht R.F. und Schulte Am Esch J.
The effects of propofol on brain electrical activity, neurologic outcome, and neuronal damage following incomplete ischemia in rats
Anesthesiology 1992; 76; S. 245-52

Krajewski S., Krajewska M., Shabaik A., Miyashita T., Wang H.G. und Reed J.C.
Immunohistochemical determination of in vivo distribution of bax, a dominant inhibitor of bcl-2
Am J Pathol 1994; 145; S. 1323-36

Krajewski S., Mai J.K., Krajewska M., Sikorska M., Mossakowski M.J. und Reed J.C.
Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia
J Neurosci 1995; 15; S. 6364-76

Kubbutat M.H., Jones S.N. und Vousden K.H.
Regulation of p53 stability by mdm2
Nature 1997; 387; S. 299-303

Kussie P.H., Gorina S., Marechal V., Elenbaas B., Moreau J., Levine A.J. und Pavletich N.P.
Structure of the mdm-2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain
Science 1996; 274; S. 948-53

Laemmli U.K.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature 1970; 227; S. 680-5

Lauer K.K., Shen H., Stein E.A., Ho K.C., Kampine J.P. und Hudetz A.G.
Focal cerebral ischemia in rats produced by intracarotid embolization with viscous silicone
Neurol Res 2002; 24; S. 181-90

Lee R.M.K.W.
Morphology of cerebral arteries
Pharmac Ther 1995; 66; S. 149-73

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

Li Y., Chopp M., Zhang Z.G., Zaloga C., Niewenhuis L. und Gautam S.
p53-immunoreactive protein and p53 mRNA expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats
Stroke 1994; 25; S. 849-55

Liebmann M., Schünke M. und Schünke G.
Blutversorgung des Gehirns
Basiswissen Neuroanatomie; Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 1993; S. 113-7

Lipton P.
Ischemic cell death in brain neurons
Physiol Rev 1999; 79; S. 1431-568

Love S.
Apoptosis and brain ischaemia
Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psych 2003; 27; S. 267-82

Marie C., Bralet A.M., Gueldry S. und Bralet J.
Fasting prior to transient cerebral ischemia reduces delayed neuronal necrosis
Metab Brain Dis 1990; 5; S. 65-75

Mayo L., Turchi J. und Berberich S.
Mdm-2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53
Cancer Res 1997; 57; S. 5013-6

Mcauley M.A.
Rodent models of focal ischemia
Cerebrovasc Brain Metab Rev 1995; 7; S. 153-80

Mcgahan L., Hakim A.M. und Robertson G.S.
Hippocampal Myc and p53 expression following transient global ischemia
Brain Res Mol Brain Res 1998; 56; S. 133-45

Miyashita T., Harigai M., Hanada M. und Reed J.C.
Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene
Cancer Res 1994; 54; S. 3131-5

Miyashita T. und Reed J.C.
Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene
Cell 1995; 80; S. 293-9

Muir III W. W., Hubbell J. A. E., Skarda R.T., Bednarski R. M.
Veterinary Anesthesia, Mosby, New York, USA, 3. Edition 2000; S.145-7

Nechushtan A., Smith C.L., Lamensdorf I., Yoon S.H. und Youle R.J.
Bax and bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis
J Cell Biol 2001; 153; S. 1265-76

Nickel R., Schummer A. und Seiferle E.
Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere; Paul Parey Verlag, Berlin; 3. Auflage 1991; S. 74-199

Niwa M., Hara A., Iwai T., Sassa T., Mori H. und Uematsu T.
Expression of bax and bcl-2 protein in the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia and its modification by phencyclidine
Neuol Res 1997; 19; S. 629-33

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

Oshima T., Karasawa F. und Satoh T.
Effects of propofol on cerebral blood flow and the metabolic rate of oxygen in humans
Acta Anaesthesiol Scand 2002; 46; S. 831-5

Papakyriakou P., Tzardi M., Valatas V., Kanavaros P., Karydi E., Notas G., Xidakis C. und Kouroumalis E.
Apoptosis and apoptosis related proteins in chronic liver disease
Apoptosis 2002; 7; S. 133-41

Paxinos G. und Watson C.
The rat brain in stereotaxic coordinates
Academic Press, San Diego, CA, USA, 4.Edition; 1998; S. 128-44

Petullo D., Masconic K., Lincoln C., Wibberley L., Teliska M. und Yao D.L.
Model development and behavioral assessment of focal cerebral ischemia in rats
Life Sci 1999; 64; S. 1099-108

Pluta R., Lossinsky A.S., Mossakowski M.J., Faso L. und Wisniewski H.M.
Reassessment of a new model of complete cerebral ischemia in rats. Method of induction of clinical death, pathophysiology and cerebrovascular pathology
Acta Neuropathol 1991; 83; S. 1-11

Polyak K., Xia Y., Zweier J.L., Kinzler K.W. und Vogelstein B.
A model for p53-induced apoptosis
Nature 1997; 389; S. 300-5

Pulsinelli W.A.
Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics
Prog Brain Res 1985; 63; S. 29-37

Pulsinelli W.A., Jacewicz M., Levy D.E., Petito C.K. und Plum F.
Ischemic brain injury and the therapeutic window
Ann N Y Acad Sci 1997; 19; S. 187-93

Riede U.N. und Schaefer H.E.
Letale Zellschädigung
Allgemeine und spezielle Pathologie; Georg Thieme Verlag, 4. Auflage; 1995; S. 135-44

Rüsse I. und Sinowatz F.
Lehrbuch der Embryologie der Haustiere
Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, 1. Auflage; 1991; S. 271-2

Scorrano L. und Korsmeyer S.J.
Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic bcl-2 familiy members
Biochem Biophys Res Commun 2003; 304; S. 437-44

Sebel P.S. und Lowdon J.D.
Propofol: a new intravenous anesthetic
Anesthesiology 1989; 71; S. 260-77

Shaulsky G., Ben-Ze'ev A. und Rotter V.
Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells
Oncogene 1990; 5; S. 1707-11

Sieber F.E.
The neurologic implications of diabetic hyperglycemia during surgical procedures at increased risk for brain ischemia
Clin Anesth 1997; 9; S. 334-40

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

Siliciano J.D., Canman C.E., Taya Y., Sakaguchi K., Appella E. und Kastan M.B.
DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53
Genes Dev 1997; 11; S. 3471-81

Simons P. J., Cockshott I. D., Douglas E. J., Gordon E. A., Hopkins K. und Rowland M.
Disposition in male volunteers of a subanaesthetic intravenous dose of an oil in water emulsion of 14C-propofol
Xenobiotica 1988; 18; S. 429-40

Stephan H., Sonntag H., Schenk H. D. und Kohlhausen S.
Effects of Disoprivan (propofol) on the circulation and oxygen consumption of the brain and CO2 reactivity of brain vessels in the human
Anaethesist 1987; 36; S. 60-5

Striebel H.W.
Medikamente für die Anästhesie
Die Anästhesie Grundlagen und Praxis, Schattauer Verlag, Stuttgard,1. Auflage; 2003; S 121-23

Tu Y., Hou S.T., Huang Z., Robertson G.S. und Macmanus J.P.
Increased mdm2 expression in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion
J Cereb Blood Flow Metab 1998; 18; S. 658-69

Vanicky I., Cizkova D., Prosbova T. und Marsala M.
Audiogenic seizures after neck tourniquet-induced cerebral ischemia in the rat
Brain Res 1997; 766; S. 262-5

Velly L.J., Guillet B.A., Masmejean F.M., Nieoullon A.L., Bruder N.J., Gouin F.M. und Pisano P.M.
Neuroprotective effects of propofol in a model of ischemic cortical cell cultures: role of glutamate and its transporters
Anesthesiology 2003; 99; S. 368-75

Vogelstein B., Lane D. und Levine A.J.
Surfing the p53 network
Nature 2000; 408; S. 307-10

Wang J., Yang X., Camporesi C.V., Yang Z., Bosco G., Chen C. und Camporesi E.M.
Propofol reduces infarct size and striatal dopamine accumulation following transient middle cerebral artery occlusion: a microdialysis study
Eur J Pharmacol 2002; 452; S. 303-8

Warner D.S., Mcfarlane C., Todd M., Ludwig P. und Mcallister A.
Sevoflurane and halothan reduce focal ischemic brain damage in the rat. Possible influence on thermoregulation.
Anesthesiology 1993; 79; S. 985-92

Weaver B.M. und Raptopoulos D.
Induction of anaesthesia in dogs and cats with propofol
Vet Rec 1990; 126; S. 617-20

Weihgt H.U., Georgieff M., Beyer C. und Fohr K.J.
Activation of neuronal N-methyl-D-aspartate receptor channels by lipid emulsions
Anesth Analg 2002; 94; S. 331-7

Werner C.
Milde und moderate Hypothermie in der Anästhesie und Intensivmedizin - Neuroprotektive Ansätze
Refresher Course; Aktuelles Wissen für den Anästhesisten; Springer-Verlag, Hamburg; 1997; S. 189-97

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

Westermeier R.
Electrophoresis in practice; a guide to methods and applications of DNA and protein separations
VCH, Weinheim, 2. Auflage; 1997; S. 175ff

Wiebalck A. und Van Aken H.
Propofol: Das ideale Langzeitsedativum?
Anaesthesist 1995; 44; S. 178-85

Wilhelm S., Gröbler B., Gluch M. und Heinz H.
Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie
Mikroskopie von Carl Zeiss; 2000; S. 1-28

Wyllie A.H.
Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation
Nature 1980; 284; S. 555-6

Yamaguchi S., Hamaguchi S., Mishio M., Okuda Y. und Kitajima T.
Propofol prevents lipid peroxidation following transient forebrain ischemia in gerbils
Can J Anaesth 2000; 47; S. 1025-30

Yamasaki T., Nakakimura K., Matsumoto M., Xiong L., Ishikawa T. und Sakabe T.
Effects of graded suppression of the EEG with propofol on the neurological outcome following incomplete cerebral ischaemia in rats
Eur J Anaesthesiol 1999; 16; S. 320-9

Young Y., Menon D. K., Tisavipat N., Matta B. F. und Jones J. G.
Propofol neuroprotection in a rat model of ischaemia reperfusion injury
Eur J Anaesthesiol 1997; 14; S. 320-6

Zhang Z., Sobel R.A., Cheng D., Steinberg G.K. und Yenari M.A.
Mild hypothermia increases bcl-2 protein expression following global cerebral ischemia
Brain Res Mol Brain Res 2001; 95; S. 75-85

Zhao H., Yenari M.A., Cheng D., Sapolsky R.M. und Steinberg G.K.
Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity
Neurochem 2003; 85; S. 1026-36

Zhu W., Cowie A., Wasfy G.W., Penn L.Z., Leber B. und Andrews D.W.
Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types
EMBO J 1996; 15; S. 4130-41

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1. Messparameter 24
Tab. 2. Gruppenplan 24
Tab. 3. Einstellung des konfokalen Laserscan-Mikroskops 37
Tab. 4. Gruppeneinteilung und Behandlung 53
Tab. 5. Mittlerer arterieller Blutdruck, Herzfrequenz und Blutglucose 54
Tab. 6. Ergebnisse der Blutgasanalyse 55
Tab. 7. Immunfluoreszenzintensität des Bcl-2-Proteins der ischämischen Gehirnhälfte 57
Tab. 8. Immunfluoreszenzintensität des Bcl-2-Proteins der nicht-ischämischen Gehirnhälfte 58
Tab. 9. Immunfluoreszenzintensität des Mdm-2-Proteins der ischämischen Gehirnhälfte 60
Tab. 10. Immunfluoreszenzintensität des Mdm-2-Proteins der nicht-ischämischen Gehirnhälfte 61
Tab. 11. Immunfluoreszenzintensität des Bax-Proteins der ischämischen Gehirnhälfte 63
Tab. 12. Immunfluoreszenzintensität des Bax-Proteins der nicht-ischämischen Gehirnhälfte 64
Tab. 13. Immunfluoreszenzintensität des p53-Proteins der ischämischen Gehirnhälfte 66
Tab. 14. Immunfluoreszenzintensität des p53-Proteins der nicht-ischämischen Gehirnhälfte 67
Tab. 15. Relative Intensität der Chemilumineszenz des Bcl-2-Proteins 69
Tab. 16. Relative Intensität der Chemilumineszenz des Mdm-2-Proteins 72
Tab. 17. Relative Intensität der Chemilumineszenz des Bax-Proteins 74
Tab. 18. Relative Intensität der Chemilumineszenz des p53-Proteins 77

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Hippocampusformation mit den Ästen des Gyrus dentatus 3
Abb. 2 Arterielle Gefäßversorgung des Gehirns - modifizierte Darstellung nach HUNGERHUBER (2003) 4
Abb. 3 Modifizierte schematische Darstellung der Nekrose und der Apoptose (nach www.ukammann.de/apoptose/; 2001) 9
Abb. 4 Modifizierte schematische Darstellung der Bcl-2-Familie nach SCORRANO und KORSMEYER (2003) 14
Abb. 5 Modifizierte schematische Darstellung eines p53-Proteins nach LEVINE 1997 17
Abb. 6 Molekülstruktur von Propofol (FREY und LÖSCHER 1996) 18
Abb. 7 Darstellung des operativen Abschnitts einschließlich des Narkoseregimes 23
Abb. 8 Übersicht über den Operationsplatz während der Ischämie-Phase 29
Abb. 9 Mit Objektträgern bestückte feuchte Kammer 34
Abb. 10 Schematische Darstellung der Antikörperbindung an das Zielprotein 35
Abb. 11 Modifizierte Darstellung des prinzipiellen Strahlenganges eines Laserscan-Mikroskops nach WILHELM et al. (2000) 37
Abb. 12 Pipettierschema des Western-Blot Gels 40
Abb. 13 Schematische Darstellung der Transferkammer 41
Abb. 14 Immunfluoreszenz: Bcl-2-Protein ischämische Hemisphäre 57
Abb. 15 Immunfluoreszenz: Bcl-2-Protein nicht-ischämische Hemisphäre 58
Abb. 16 Immunfluoreszenz: Mdm-2-ischämische Hemisphäre 60
Abb. 17 Immunfluoreszenz: Mdm-2-nicht-ischämische Hemisphäre 61
Abb. 18 Immunfluoreszenz: Bax-ischämische Hemisphäre 63
Abb. 19 Immunfluoreszenz: Bax-nicht-ischämische Hemisphäre 64
Abb. 20 Immunfluoreszenzaufnahmen des Bax-Proteins 65
Abb. 21 Immunfluoreszenz: p53- ischämische Hemisphäre 66
Abb. 22 Immunfluoreszenz: p53-nicht-ischämische Hemisphäre 67
Abb. 23 Western-Blot: Bcl-2-Protein ischämische Hemisphäre 70
Abb. 24 Western-Blot: Bcl-2-Protein nicht-ischämische Hemisphäre 70
Abb. 25 Western-Blot: Mdm-2-Protein ischämische Hemisphäre 72
Abb. 26 Western-Blot: Mdm-2-Protein nicht-ischämische Hemisphäre 73
Abb. 27 Western-Blot: Bax-Protein ischämische Hemisphäre 74
Abb. 28 Western-Blot: Bax-Protein nicht-ischämische Hemisphäre 75
Abb. 29 Ausschnitte der Western-Blot Entwicklung 75
Abb. 30 Western-Blot: p53-Protein ischämische Hemisphäre 77
Abb. 31 Western-Blot: p53-Protein nicht-ischämische Hemisphäre 78

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A.	Arterie
Aa.	Arterien
Abb.	Abbildung
AMPA	Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosintrphosphat
BGA	Blutgasanalysegerät
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
©	Copyright
CBF	cerebraler Blutfluss
CCA	Arteria carotis communis (engl.: commen carotid artery)
CLSM	konfokales Laserscan-Mikroskop (engl.: confocal laserscan mikroscope)
cm	Centimeter
DAP	diastolischer arterieller Druck
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
dl	Deziliter
DTT	Dithiothreitol
EEG	Elektroenzephalogramm
et al.	et alii (lateinisch: und Mitarbeiter)
engl.	englisch
Fa.	Firma
FiO_2	Fraction of inspriratory oxygen
FKS	Fetales Kälberserum
Erh	Erholungsphase
g	Gramm
Gluc	Glucose
h	Stunde

Hb	Hämoglobingehalt des Blutes
HF	Herzfrequenz
Isch	Ischämie
i.v.	intravenös
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
LSM	Laserscan-Mikroskop
m	Meter
M.	Musculus
MAP	mittlerer arterieller Druck (engl.: mean arterial pressure)
MCA	Artera cerebri media (engl.: middel cerebral artery)
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Milimol
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule
mW	Milliwatt
MW	Mittelwert
n	Anzahl
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Ø	Durchmesser
O_2	Sauerstoff
OT	Objektträger
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P	Probe
$PaCO_2$	Partialdruck Kohlendioxid
PaO_2	Partialdruck Sauerstoff
PBS	gepuffertes Natriumphosphat (engl.: phospored buffered sodium)
PBST	gepuffertes Natriumphosphat und Tween (engl.: phosphored buffered sodium and tween)
PVDF	Polyvinylidendifluorid

®	eingetragene Marke
Rep	Reperfusion
RM	Rainbow-Marker
SAP	systolischer arterieller Druck
SD	Standardabweichung (engl. Standard deviation)
STD	Standard
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfat)
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylenethylendiamid
T. peri	perikranielle Temperatur
T. rec	rektale Temperatur
V.	Vena
Vol %	Volumenprozent
z.B.	zum Beispiel

11 DANKSAGUNG

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.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Direktor des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl danke ich für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

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.

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.

Vielen Dank an Herrn Dr. rer. nat. Peter Hutzler (Leiter) und Herrn Ernst Mannweiler vom Institut für Pathologie der GSF Neuherberg für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, ihre freundliche und geduldige Hilfe im Umgang mit dem konfokalem Laserscan-Mikroskop und der Auswertung der Bilder.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Doris Droese, Herrn Sepp Straßmair und Frau Anne Frye für ihre große Hilfe, ebenso wie den Kolleginnen und Kollegen des Labors Gebäude 522.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinem Lebenspartner Martin Winkelheide für seine geduldige und tatkräftige Unterstützung.

Bei meiner Familie möchte ich mich besonders für ihre großartige Unterstützung auf meinem Lebensweg bedanken.

12 LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name:	Uta Stegemann
Geburtsdatum:	16.01.1973
Geburtsort:	Recklinghausen
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Konfession:	Römisch katholisch
Eltern:	Chefarzt, Dr. med. Johannes Klemens Stegemann verstorben am 04.10.1999 Mechthild Annette Stegemann geb. Schaub Medizinisch Technische Assistentin
Geschwister:	Dipl.-Ing. Knut Stegemann

Schulbildung:	1979-1983	Kardinal-von-Galen-Schule, städtisch katholische Grundschule,Waltrop
	1983-1992	Theodor-Heuss-Gymnasium, Waltrop
	Abschluss:	Allgemeine Hochschulreife

Praktika:

Sommer 1990:	vierwöchiges Praktikum in der Intensivabteilung, Laurenzius Stift Krankenhaus, Waltrop
Sommer 1991:	sechswöchiges Praktikum in der Klein- & Großtierpraxis Dr. Ulrike & Dr. Achim Werner, Buchen

Studium:

1992-1993	Studium der Veterinärmedizin an der Rijksuniversitair Zentrum Antwerpen, Belgien
1993-2001	Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
20.09.2001	Letzte Prüfung des Dritten Staatsexamens
11.01.2002	Approbation

mit den folgenden Praktika:

01.09.-31.03.1994	Teilnahme an der Lehrveranstaltung Biometrie
04.08-21.09.1997	Praktikum in den Veterinärmedizinischen Kliniken der Universität Zürich
01.03.-30.05.1999	Praktikum in der Kleintierpraxis Dr. Ulrike Werner, Buchen
07.06.-21.07.1999	Ausbildung in der Schlachttier- und Fleischuntersuchung am Schlachthof Oer-Erkenschwick

Beruflicher Werdegang:

01.08.–14.11.2002	Wissenschaftliche Assistentin in der hereditären Tumorforschung bei Herrn Dr. Vogelsang im Klinikum rechts der Isar
16.09. –27.09.2002	Versuchstierkundlicher Kurs des Tierschutz-Informations-Zentrums für die Biomedizinische Forschung
Seit 01.12.2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Forschungsgruppe „Cerebrale Ischämie und Neuroprotektion“ der Klinik für Anaesthesiologie im Klinikum rechts der Isar