

Klinik für Anaesthesiologie
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor : Univ. Prof. Dr. E. Kochs)

**Einfluss der Anästhetika Sevofluran und Propofol
auf die Regulation der apoptoseassoziierten Proteine
Bax, Bcl-2, Mdm-2 und p53
nach inkompletter zerebraler Hemisphärenischämie
bei der Ratte**

Monika Bachl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Chr. Werner

2. Univ.-Prof. Dr. E. Kochs

Die Dissertation wurde am 19.03.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 05.06.2002 angenommen.

„Νοῦσος ἑυγείην ἔποιήσεν ἑδύ καὶ ἄγαθόν,
λιμὸς κόρον, κάματος ἄνάπαυσιν.“

*„Krankheit macht Gesundheit angenehm und gut,
Hunger Satttheit, Mühe Ruhe.“*

Heraklit von Ephesus,
Die Fragmente der Vorsokratiker, 22B111,
Diels, H.-Kranz, W., 3 Bde. Berlin¹⁸ 1985

1 EINLEITUNG	1
1.1 Klinische Aspekte bei zerebraler Minderperfusion	1
1.2 Therapie der zerebralen Minderperfusion	1
1.3 Pathophysiologie der zerebralen Minderperfusion	3
1.4 Apoptose bei zerebraler Minderperfusion	5
1.5 Apoptosefaktoren Bax, Bcl-2, Mdm-2 und p53	6
2 ZIELSETZUNGEN UND HYPOTHESEN	9
2.1 Bisherige Untersuchungen an einem Modell mit inkompletter Hemisphärenischämie	9
2.2 Fragestellung und Studienziele	9
2.3 Hypothesen	10
3 MATERIAL UND METHODEN	11
3.1 Tierexperimentelles Modell	11
3.2 Anästhesie und Beatmung	11
3.3 Chirurgische Präparation	13
3.4 Versuchsprotokoll	14
3.5 Gemessene Größen	17
3.5.1 Systemische Variablen	17
3.5.2 Elektroenzephalogramm (EEG)	17
3.5.3 Messung des zerebralen Blutflusses	17
3.6 Messmethoden	17
3.6.1 Laborchemische Analysen	17
3.6.2 Laser-Doppler-Flussmessung	18
3.6.3 Messung hämodynamischer Parameter	18
3.6.4 Dissektionschema zur Gewinnung von Gewebeschnitten	19
3.6.5 Histologische Untersuchungen	22
3.6.5.1 Untersuchung der Zellmorphologie anhand hämatoxylin- und eosingefärbter Gewebeschnitte	22
3.6.5.2 Messung der Expression der Apoptosefaktoren mit der indirekten Immunfluoreszenzfärbung	23
3.6.6 Westernblotanalyse	33
3.6.6.1 Probengewinnung für die Westernblotanalyse	33
3.6.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	35
3.6.5.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
3.6.6.4 Elektrotransfer von Proteinen	38
3.6.6.5 Westernblotanalyse	40

3.6.6.6 Auswertung der Westernblotanalyse	42
4 ERGEBNISSE	44
4.1 Systemische Variablen	44
4.2 Zerebraler Blutfluss	51
4.3 Expression der Apoptosefaktoren in den verschiedenen Untersuchungsgruppen	54
4.3.1 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung	54
4.3.2 Ergebnisse der Westernblotanalyse	61
4.4 Ergebnisse der Hämatoxylin-Eosinfärbung	67
5 DISKUSSION	68
5.1 Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse	68
5.2 Diskussion der Ergebnisse	69
5.3 Diskussion des Tiermodells	76
5.4 Diskussion der verwendeten Methoden	80
5.5 Geplante weitere Untersuchungen	82
6 ZUSAMMENFASSUNG	84
7 LITERATURVERZEICHNIS	86
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	98
9. DANKSAGUNGEN	100
10. LEBENSLAUF	101

1 EINLEITUNG

1.1 Klinische Aspekte bei zerebraler Minderperfusion

Weltweit stehen Erkrankungen des zentralen Nervensystems in den Morbiditäts- und Mortalitätsstatistiken der WHO nach kardiovaskulären und onkologischen Prozessen an dritter Stelle. In der Bundesrepublik Deutschland sterben jährlich etwa hunderttausend Menschen [86](S.26-28) an den Folgen zerebraler Ischämie. Neben dem Schädel-Hirn-Trauma ist der zerebrale Insult durch Gefäßerkrankungen und Embolien einer der häufigsten Gründe einer zerebralen Minderperfusion.

Viele dieser neurologischen Störungen treten als akute Läsionen (z.B. Apoplex, Schädel-Hirn-Trauma, spinales Trauma, kardiopulmonale Reanimation und Schock) oder als perioperative Komplikation (z.B. vorübergehende Okklusion hirnversorgender Gefäße, perioperative Hypotension, Embolisation und bei Herzoperationen) auf.

Da das Gehirn nur eine gering ausgeprägte Toleranz gegenüber einer Einschränkung der Sauerstoffversorgung besitzt und es bei Überschreiten zu einem irreversiblen Hirnschaden kommt, da einmal untergegangene Nervenzellen nicht mehr ersetzt werden können, ist es in diesen akuten Situationen von entscheidender Bedeutung, dass schnellst möglichst eine Therapie eingeleitet wird. Deshalb ist in erster Linie die adäquate Primärversorgung der Patienten für deren Lebenserhaltung bzw. für das Erreichen einer bestmöglichen Lebensqualität ausschlaggebend. Aber auch volkswirtschaftliche Überlegungen (Frühinvalidität, Arbeitsausfälle, Pflegeaufwand etc.) gewinnen angesichts der aktuellen gesundheits- und sozialpolitischen Entwicklungen zunehmend an Bedeutung, so dass auch aus diesem Grund eine effiziente Initialbehandlung der Patienten immer wichtiger wird. Ziel dieser Behandlung muss sein, dass das Ausmaß der neurologischen Ausfälle minimiert und eine bestmögliche Wiedereingliederung des Patienten in Familie und Beruf erreicht wird.

1.2 Therapie der zerebralen Minderperfusion

Zerebrale Ischämien infolge vaskulärer Verschlüsse (Apoplex, Embolie) werden häufig nur konservativ mit Antikoagulation und Physiotherapie behandelt. Operative Behandlungsmöglichkeit zur Revaskularisation ist die Thrombendarterektomie der A. carotis oder eine Bypassoperation. Bei akutem embolischem Verschluss kann der Versuch einer Rekanalisation durch eine Lysetherapie mit Streptokinase oder rt-PA (rekombinanter Gewebsplasminogenaktivator) unter Ausschluss der entsprechenden Kontraindikationen (z.B. hämorrhagische Diathese, schwerste neurologische Ausfälle, septisch bedingte Embolie) unternommen werden. Nach

Revaskularisation bzw. Rekanalisation kann das sog. Ischämie-Reperfusionssyndrom auftreten (vgl. 1.3). Mögliche klinische Erscheinungsformen sind epileptische Anfälle, Sprachstörungen, Eintrübungen des Bewusstseins etc.

Die Initialtherapie bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma umfasst neben allgemeinen Maßnahmen, wie Aufrechterhaltung der Vitalfunktionen, spezielle Maßnahmen zur Senkung des Hirndruckes, bzw. der Prophylaxe eines sekundären Hirnödems. Ziel jeder Spezialintervention ist die Vermeidung einer Minderperfusion infolge einer intrakraniellen Raumforderung. Daher kann es bei der intensivmedizinischen Überwachung erforderlich sein das Standardmonitoring um eine Hirndrucksonde zu erweitern, um so kontinuierlich den Hirndruck messen und den Erfolg der Therapie abschätzen zu können.

Ein Hirnödem wird durch Oberkörperhochlagerung von etwa 30°, interventionelle Hyperventilation ($p\text{CO}_2 > 30 \text{ mmHg}$) und Infusion osmolarer Lösungen behandelt. Durch die Hyperventilation wird über eine zerebrale Vasokonstriktion eine Reduktion des intrazerebralen Druckes über eine intrakranielle intravasale Blutvolumenverminderung angestrebt. Der Einsatz hyperosmolarer Lösungen wie Mannit oder hypertone Natriumchloridlösung soll über einen osmotischen Gradienten zwischen dem Hirnparenchym und dem Blut eine Flüssigkeitsverschiebung von den Gehirnzellen über die Bluthirnschranke in das Gefäßsystem bewirken. Diese Flüssigkeitsverschiebung hat eine Abnahme des zellulären Ödems und gleichzeitig eine Abnahme der Blutviskosität zur Folge, was die rheologischen Eigenschaften des Blutes verbessert. Voraussetzung hierfür ist eine intakte Nierenfunktion mit zügiger Elimination der infundierten Lösungen, weil die osmotisch wirksamen Stoffe bei zu langer Retention im Blut die Blut-Hirnschranke permeieren können. Folge wäre eine Umkehr des osmotischen Gradienten mit Flüssigkeitseinstrom in das Hirnparenchym und somit eine Zunahme des Hirnödems. Ist durch konservative Maßnahmen keine Hirndrucksenkung zu erzielen, kann die Indikation zur Trepanation bzw. zur Applikation einer externen Ventrikeldrainage frühzeitig gestellt werden.

Sind sedierende und operative Interventionen notwendig, könnte auch die Wahl des richtigen Anästhetikums wichtig sein. Sowohl für volatile als auch für intravenöse Anästhetika sind zerebroprotektive Eigenschaften beschrieben worden. Somit scheint bereits die Narkoseführung das neurologische Endergebnis bei Patienten mit zerebraler Ischämie wesentlich zu beeinflussen.

1.3 Pathophysiologie der zerebralen Minderperfusion

Das Gehirn besitzt gegenüber einem ischämischen Schaden eine höhere Vulnerabilität als die meisten anderen Gewebe [30](S.712). Diese Tatsache ist durch einige Besonderheiten im Stoffwechsel des Gehirnes erklärbar. Das Gehirn eines Erwachsenen wiegt etwa 1350g, das entspricht etwa 2% des gesamten Körpergewichtes. Dabei dienen 12-15% des Herzzeitvolumens der zerebralen Perfusion. Die hohe Durchblutungsrate reflektiert den großen metabolischen Umsatz des Gehirnes. Der zerebrale Sauerstoffverbrauch beträgt 20% des vom Gesamtorganismus verbrannten Sauerstoffs [29](S.689). Der Glukosestoffwechsel des Gehirns findet normalerweise auf aerobem Wege statt. Weder für Sauerstoff noch für Glukose gibt es nennenswerte zerebrale Speicher.

Kommt es zu einer Hirnischämie bzw. zu zerebraler Hypoxie, ist das zerebrale Sauerstoffangebot eingeschränkt. Ohne Sauerstoff ist keine oxidative Phosphorylierung mehr möglich, statt 36 Mol ATP können nur 2 Mol ATP pro Mol Glucose gebildet werden. Innerhalb von Minuten sinkt der ATP-Spiegel [34](S.1-5). Durch die anaerobe Glykolyse entsteht eine Laktatazidose, die zur Senkung des pH von normal 7,4 auf Werte zwischen 6,8 und 6,2 im ischämischen Gewebe führt [30](S.714). Folge des ATP-Mangels ist eine eingeschränkte Funktion mit Zusammenbruch der membranständigen Natrium-Kalium-ATPase, des transmembranösen Ionengradienten und die Depolarisation der Zellmembran. Eine Folge der Depolarisation ist ein deletärer Kalziumeinstrom. Kalzium strömt über spannungsabhängige Kalziumkanäle in die Zelle ein, es erfolgt eine Freisetzung von Glutamat, was über eine Aktivierung der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren und α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazopropionsäure (AMPA)-Rezeptoren zu einem weiteren Einstrom von Kalzium führt. Durch den Energiemangel wird die Membranintegrität der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums so gestört, dass Kalzium auch aus diesen Zellorganellen ausströmt [67](S.710-711). Der massive Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration initiiert Aktivierungskaskaden von Proteasen, Phospholipasen, Proteinkinasen, Lipidkinasen und Endonukleasen mit zytotoxischer Wirkung [19](S.59). Die Phospholipase A₂ setzt aus Phospholipiden der Membran Arachidonsäure frei [67](S.706-709). Zyklooxygenasen und Lipoxygenasen metabolisieren Arachidonsäure zu Prostaglandinen, Prostazyklinen und Leukotrienen. Die Reperusionsphase nach zerebraler Ischämie ermöglicht die Bildung freier Radikale und somit die Lipidperoxidation von freien Fettsäuren [30](S.718-720) [94](S.174-180) [81](S.60-62) [93](S.338-339). Die aktivierte Zysteinprotease Kalpain trägt zur Zerstörung des Zellskeletts bei [109](S.6-7). Durch die kalziumabhängige Aktivierung von Endonukleasen wird die zelluläre DNA zerstört [21](S.364-366). Ein besonders hoher deletärer Effekt kommt der Bildung von freien Sauerstoffradikalen den sog. „reactive oxygen species (ROS)“ zu. Neben den

o.g. direkten toxischen Effekten bewirken sie eine weitere Destabilisierung der Zellmembran, was zur Entstehung eines Zellödems beiträgt [30](S.720). Folge dieser Prozesse ist der Zelltod. Ob sich dieser pathophysiologisch als Nekrose oder Apoptose äußert, hängt wesentlich von dem Ausmaß des initialen Schadens ab [100](S.62).

Ein Hirninfarkt entsteht, wenn infolge eines akuten embolischen Ereignisses eine ausreichende Blutzufuhr in einem Hirnareal nicht mehr gewährleistet ist. Generell kann ein infarziertes Gewebe in eine Kernzone und eine Grenzzone eingeteilt werden. In der Kernzone ist der zerebrale Blutfluss von normal 45–55 ml/100g/min [29](S.690) auf unter 6 ml/100g/min [29](S.712-713) gefallen. Die Grenzzone des Infarkts kann in zwei Zonen eingeteilt werden die sog. Penlucida (lat. lux: das Licht, gr. περι: in der Nähe) und die sog. Penumbra (lat. umbra: der Schatten, gr. περι: in der Nähe). Während die Penlucida noch mit 15–20 ml/100g/min [115](S.29) perfundiert wird und unabhängig von der Ischämiedauer regenerieren kann, wird die Penumbra nur noch mit 6-15 ml/100g/min durchblutet [29](S.712). Energetisch stellt die Penumbra Gewebe ohne Funktionsstoffwechsel (isoelektrisches EEG), aber mit zunächst intaktem Strukturstoffwechsels dar. Wird innerhalb eines bestimmten Zeitfensters der normale Blutfluss wiederhergestellt, ist dieses Areal überlebensfähig, ansonsten wird es Teil des finalen Infarktes [94](S.171-172) [29](S.712-713) [115](S.29-30) [8](S.318-319). Somit wird das Infarktareal größer, das entstehende neurologische Defizit ausgeprägter.

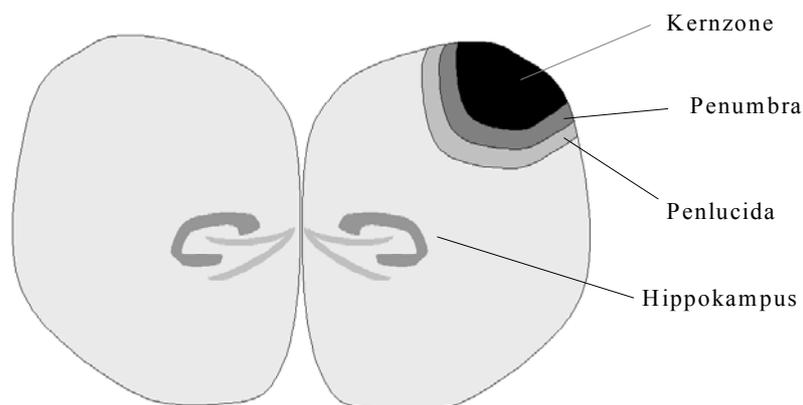


Abbildung 1: Koronarer Hirnschnitt durch ein Rattenhirn nach erfolgter fokaler Ischämie im Kortex; im rechten Kortex sind die Zonen eines Hirninfarktes dargestellt; schwarz: Kernzone, dunkelgrau die Penumbra und hellgrau die Penlucida.

1.4 Apoptose bei zerebraler Minderperfusion

1972 beschrieben Wyllie, Kerr und Mitarbeiter [61](S.239-256) [112](S.254-281) zwei verschiedene Arten von Zelltod: Nekrose und Apoptose. Nekrose (gr. νεκροσ: tot) stellt eine passive Form des Zelltodes dar, bei der es durch eine Schädigung der Plasmamembran zur Störung des osmotischen Gleichgewichts kommt. Folge ist eine Zellschwellung, die zum Platzen der Zelle führt. Biochemisch findet ein statistisch verteilter Abbau der DNA als postlytisches spätes Ereignis des Zelltodes statt. Meist ist eine Gruppe von Zellen betroffen, deren Nekrose durch unphysiologische Störungen, wie z.B. Strahlung und schwere Ischämie, hervorgerufen wird. Die freigesetzten Zellbestandteile initiieren eine Entzündung mit Exsudation und granulozytärer Reaktion [100](S.62-72) [11](S.1-2) [112](S.254-255) [24](S.195-202).

Dem steht als aktiver Prozess die Apoptose (gr. απο: von – weg, πτοσισ: das Fallen) gegenüber [71](S.1), sinnbildlich verglichen mit dem Abfallen der Blätter vom einem Baum im Herbst [61](S.241). Apoptose ist ein „programmierter“, „physiologischer“ Zelltod, der essentiell ist für die Entwicklung und das Überleben von Organismen [24](S.195-200).

Diese Art des Zelltodes beinhaltet die Aktivierung eines biochemischen, zytogenetisch vorbestimmten „Todesprogrammes“, das durch viele Stimuli, wie Verlust von Wachstumsfaktoren [84](S.254-255), Aktivierung von membranständigen Rezeptoren, Infektionen und Hypoxie [14](S.265-267) induzierbar ist. Dabei kann es fakultativ zur Neusynthese von Proteinen kommen [100](S.62). Apoptose ist morphologisch und biochemisch von der Nekrose zu unterscheiden. Morphologisch ist die Apoptose gekennzeichnet durch Zellschrumpfung, Chromatinaggregation, Kondensation von Zytoplasma und Kern, Aufspaltung von Zytoplasma und Kern in membrangebundene Vesikel (Apoptosekörperchen), die von Makrophagen oder Gliazellen rasch phagozytiert werden. Zu jeder Zeit ist die Zellmembran intakt, so dass keine Zellbestandteile nach extrazellulär gelangen und eine entzündliche Reaktion ausbleibt [39](S.102-103). Es werden daher keine gesunden Zellen in Mitleidenschaft gezogen. Auf biochemischer Ebene werden spezifische Proteasen aktiviert. Aktivierte Caspasen beeinflussen den Abbau des Zellskeletts und die DNA-Reparaturmechanismen in Richtung Apoptose. Von kalziumaktivierten Endonukleasen wird die DNA als prälytisches frühes Ereignis des Zelltodes in definierte Nukleosomenfragmente geschnitten, so dass eine sog. DNA-Leiter entsteht [112](S.295-296) [1](S.969) [11](S.7-10) [76](S.819-821).

Entgegen früheren Annahmen steht Apoptose nicht nur mit der Entwicklung von Organismen, sondern auch mit neurodegenerativen Erkrankung, wie amyotrophe Lateralsklerose, Morbus Parkinson, und Schlaganfall in Zusammenhang [99](S.1458). Galt die toxische Erregung durch exzitatorische Aminosäuren, wie Glutamat, und die Hypoxie als prototypische Modelle

der Nekrose [27](S.68-69), weiß man heute, dass gerade bei diesen Ereignissen Apoptose wesentlich beteiligt ist [14](S.1) [11](S.3-4) [20](S.669-670).

1.5 Apoptosefaktoren Bax, Bcl-2, Mdm-2 und p53

Neben den o.g. morphologischen Charakteristika sind eine veränderte Genexpression für die Apoptose typisch. Bei ihrer Induktion werden bestimmte Kaskaden zur Aktivierung und Expression von Proteinen initiiert. Kontrollierte DNA-Fragmentierung ist ein eng mit apoptosekorreliertes Merkmal. Sowohl bei traumatischem als auch bei ischämischen Hirnschaden sind Einzel- und Doppelstrangbrüche nachgewiesen worden [75](S.956). Während und nach der Ischämie wird der größte Schaden an der DNA durch freie Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxid (NO) verursacht. NO kann direkt an der DNA zur Schädigung führen, die Toxizität von NO wird durch die Verbindung mit Superoxid zu Peroxynitrit noch verstärkt. Der intraschämische Energiemangel führt zur Depolarisation der Membran mit deletärem Kalziumeinstrom [109](S.4). Über eine erhöhte Kalziumkonzentration kommt es u.a. zur Aktivierung von Endonukleasen, die DNA fragmentieren [13](S.385-387).

Schäden an der DNA aktivieren Stoffwechselwege die entweder zur Reparatur der DNA oder zum Wachstumsstillstand oder zur Apoptose führen. Dieser Effekt ist abhängig von Zelltyp und vom Ausmaß des Schadens [89](S.932) [32](S.1317-1318).

Eine Hauptwirkung des DNA-Schadens ist die Induktion und Hochregulation von p53 [57](S.2) [76](S.821-822), dem sog. Wächter des Genoms [32](S.1319). Auch bei der Induktion der Apoptose durch Ischämie nimmt das Protein p53 (53 kD schweres Protein, daher p53) eine Schlüsselstellung ein [23](S.1202-1203) [77](S.143) [72](S.851-852).

Eine Induktion von p53 mRNA konnte nach exzitatorischem und ischämischen Hirnschaden gefunden werden [23](S.1203-1207) [90](S.7527-7528) [56](S.1147-1150). P53 fungiert in der geschädigten Zelle als Transkriptionsfaktor. Nicht in jedem Fall wird durch p53 Apoptose eingeleitet. Wenn p53 eine Expression der Proteine GADD45 (Growth-arrest-and-DNA-damage-inducible) und WAF1 initiiert, bewirken diese einen Zellzyklusarrest, während dessen die Zelle die Gelegenheit hat, DNA-Schäden zu reparieren und so möglicherweise überleben kann.

Bindet p53 allerdings an die Bax-Promotorregion, findet eine Transkription und Translation des proapoptotischen Bax-Genes statt [109](S.14). Das Protein Bax kann den Tod der Zelle induzieren. Physiologische Gegenspieler des Bax-Proteins sind das Bcl-2- und das Bcl-x_L-Protein. P53 unterstützt den apoptotischen Prozess zusätzlich, indem es die Expression dieser antiapoptotischen Proteine supprimiert. Bcl-2 und Bax gehören zwar zur selben Gen-Familie, nämlich zur Bcl-2-Familie, diese umfasst jedoch in ihrer Struktur verwandte, aber in ihrer

Funktion verschiedene Proteine, so dient z.B. Bax als Induktor und Bcl-2 als Inhibitor der Apoptose.

Bcl-2-Überexpression erhöht nicht die Zellproliferation, sondern verhindert Apoptose in einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen und unter einer Reihe von unterschiedlichen Bedingungen [48](S.334-336) [49](S.241-250). Auch in neuronalen Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Bcl-2 Apoptose inhibiert.

In-vitro-Studien haben gezeigt, dass die Zellen durch Bcl-2 (B-cell-lymphoma associated protein) vor Erregungstoxizität, erhöhter intrazelluläre Kalziumkonzentrationen, Schaden durch freie Radikale und ischämischen Insulten geschützt werden [76](S.817). Der Infarkt, der durch eine transiente globale Ischämie bei mongolischen Wüstenrennmäusen induziert wurde, konnte auf die Hälfte des Infarktvolumens reduziert werden, indem eine Bcl-2-Transduktion durchgeführt wurde. Über ein Herpes-Simplex-Virus-Amplikon wurde die Bcl-2-Synthese in den Neuronen der CA1-Region des Hippokampus angeregt und wirkte auf diese Weise dem verzögerten neuronalen Zelltod entgegen [20](S.670) [22](S.22) [74](S.1672-1673) [46](S.15-17) [15](S.395-398) [62](S.2617-2618). Bei einer erhöhten Expression von Bax (Bcl-2 assoziiertes Protein X) wird der programmierte Zelltod induziert. [3](S.884-886) [36](S.256-259) [42](S.252) [58](S.55-57) [65](S.1332-1335) [66](S.6371-6372). Bax und Bcl-2 müssen als Homodimere vorliegen um ihre Funktion erfüllen zu können. Liegen sie als Heterodimere vor blockieren sie sich gegenseitig. Somit ist das Verhältnis von Bax und Bcl-2 (Bax/Bcl-2-Ratio) entscheidend [83](S.189) [46](S.17). Die normalerweise vorhandene Bcl-2/Bax-Ratio wird als Folge der transienten Ischämie zugunsten des Bax und somit in Richtung Apoptose verschoben.. Der Überschuss an Bax-Protein ermöglicht eine Oligomerisierung des Proteins. Dadurch kommt es in der Mitochondrienmembran zur Bildung von Bax-Kanälen, durch die Zytochrom C von den Mitochondrien ins Zytoplasma gelangen kann [4](S.276-277). Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) bewirkt zusammen mit Zytochrom C eine Aktivierung der Caspasen 9 und 3, was schließlich in der Apoptose mündet [31](S.813) [25](S.325-327). Durch eine künstliche Erhöhung des Bcl-2-Spiegels wird das Gleichgewicht wieder hin zu einem ausgeglichenen Verhältnis von Bax und Bcl-2 verschoben [2](S.132-136) und der eben skizzierte Weg unterbunden. Zum einen verhindert Bcl-2 durch die Heterodimerbildung mit Bax einen Zytochrom-C-Anstieg im Zytoplasma, zum anderen erhöht Bcl-2 die Konzentration von Glutathion, einem Tripeptid, das die Zelle vor oxidativem Schaden bewahren kann. Glutathion wirkt als biologisches Redoxsystem. Indem zwei Glutathionmoleküle zur Disulfidform oxidiert werden, wird verhindert, dass empfindlichere Zellstrukturen durch Lipidoxidation geschädigt werden [9](S.842) [49](S.246-247).

Die intrinsische Apoptoseinduktion über das Protein p53 kann durch das Mdm-2-Protein moduliert und sogar verhindert werden. Mdm-2 wird auch als der „Große Bruder“ von p53 bezeichnet, da es durch eine Reaktion mit p53, dessen transkriptionsinduzierende Eigenschaften maskiert und dadurch eine Bindung an DNA unmöglich macht [79](S.345). Das Mdm-2-Protein reguliert das p53-Gen auf Ebene seiner Aktivität, p53 beeinflusst das Mdm-2-Gen auf der Ebene seiner Transkription [111](S.1130) [18](S.2446-2449). In verschiedenen Zellkulturen konnte eine p53 induzierte Apoptose durch eine Überexpression von Mdm-2 verhindert werden [45](S.1597-1600). Fehlendes Mdm-2 in Mäusen verursachte embryonale Sterblichkeit, jedoch bei gleichzeitiger Blockade von p53 überlebten die Tiere [59](S.206-207) [80](S.203-205). Diese Beobachtung legt eine enge funktionale Interaktion der Proteine nahe. Die Entdeckung, dass Apoptose eine wichtige Rolle beim ischämiebedingten Zelltod spielt, eröffnet interessante Möglichkeiten der Behandlung mit antiapoptotischen und antiexzitatorischen Therapieoptionen bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma, Herzstillstand und Schlaganfall [20](S.670-671).

2 ZIELSETZUNGEN UND HYPOTHESEN

2.1 Bisherige Untersuchungen an einem Modell mit inkompletter Hemisphärenischämie

Arbeiten mit dem Modell einer inkompletten Hemisphärenischämie hatten zum Ziel, neuroprotektive Wirkungen von Pharmaka zu erforschen und deren Mechanismen der Neuroprotektion zu erkennen.

Untersuchungen von Kochs, Werner und Mitarbeitern haben gezeigt, dass verschiedene anästhesiologische Interventionen eine Reduktion der Infarktgröße sowie eine verbesserte neurologische Funktion herbeiführen können. Als zerebroprotektiv wurden Inhalationsanästhetika [106](S.758-759), Hypnotika [52](S.758-761) [64](S.249-251), α_2 -Agonisten [51](S.331-332) und eine temporäre milde postischämische Hypothermie [54](S.36-38) identifiziert. Die Behandlung mit den Ganglienblockern Hexamethonium und Dexmedetomidin führte bei Ratten, bei denen eine inkomplette Hemisphärenischämie (hämorrhagische Hypotension mit dem Zielwert mittlerer arterieller Blutdruck 35 mmHg und Okklusion der A. carotis communis dextra) induziert wurde, zu einer Verbesserung der neurologischen Funktion und zu einem geringeren histopathologischen Schaden im Infarktgebiet als bei Tieren, die eine Narkose mit Fentanyl/Lachgas erhielten [51](S.330-331).

In weiteren Studien am gleichen Modell überlebten alle Tiere, die mit dem volatilen Anästhetikum Sevofluran anästhesiert wurden, den erzeugten Schlaganfall für den definierten Zeitraum von drei Tagen. In der Kontrollgruppe, die eine Fentanyl-/Lachgasanästhesie erhielten überlebten über 80% der Tiere diesen Zeitraum nicht. Bei den überlebenden Tieren beider Gruppen erreichten die Tiere der Sevoflurangruppe höhere Werte auf einer neurologischen Bemessungsskala, was ein besseres neurologisches Endergebnis belegte [106](S.757). In einem ähnlich konzipierten Versuch wurde auch für die Narkose mit Propofol ein verbessertes neurologisches Ergebnis gefunden im Vergleich zur Anästhesie mit Fentanyl/Lachgas. In der anschließenden histologischen Untersuchung konnten die Ergebnisse des neurologischen Endergebnisses positiv mit dem Ausmaß des histologisch feststellbaren Schadens korreliert werden. Ein geringer histologischer Schaden ging mit einem guten neurologischen Endergebnis einher [64](S.247-249).

2.2 Fragestellung und Studienziele

Bei den bisherigen Untersuchungen wurde als Maßstab für das Ausmaß des neurologischen Schadens die spontane elektrische Gehirnaktivität während und nach dem Versuch, der Gesundheitszustand, die Leistungsfähigkeit des Tieres nach zerebraler Ischämie und die Größe

des histopathologischen Schadens im Gehirn herangezogen. Als Mechanismen zerebroprotektiver Anästhetika wurden eine Senkung des zerebralen Stoffwechsels, eine reduzierte catecholamininduzierte Stimulation, eine Reduktion des zerebralen Blutflusses mit Senkung des intrakraniellen Druckes, das Abfangen freier Radikale, die Stabilisierung der Zellmembran mit Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichtes und eine Beeinflussung des Fettsäurestoffwechsels diskutiert [81](S.75-83). Die aktuelle Forschung ist darum bemüht molekularebiologische Korrelate der Schutzmechanismen zu erforschen. Dabei ist die Beteiligung der Apoptose am Zelltod während zerebraler Ischämie inzwischen bekannt. Bisher unklar ist, ob Anästhetika, wie Sevofluran und Propofol, die Expression von Proteinen beeinflusst, die die Apoptose regulieren und ob darin ein zerebroprotektive Effekt der Substanzen liegt.

2.3 Hypothesen

Aufgrund der vorbeschriebenen zerebroprotektiven Eigenschaften der Anästhetika Sevofluran und Propofol und der Schlüsselstellung der Proteine Bax und p53, bzw. Bcl-2 und Mdm-2 bei der Regulation der Apoptose stellten wir folgende Hypothesen auf: Bei inkompletter Hemisphärenischämie bewirkt die Narkoseführung mit Sevofluran oder Propofol einen zerebroprotektiven Effekt durch

1. Hochregulation des antiapoptotischen Proteins Bcl-2
2. Hochregulation des antiapoptotischen Proteins Mdm-2
3. Unterdrückung der Expression des proapoptotischen Proteins p53
4. Unterdrückung der Expression des proapoptotischen Proteins Bax.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tierexperimentelles Modell

Die Auswirkungen einer zerebralen Ischämie auf die Induktion von Apoptosefaktoren können nur durch direkte Untersuchung des geschädigten Gehirns erfolgen. Dazu ist es nötig das Tier nach dem Versuch zu töten und das Gehirn zu entnehmen. Diese Art der Untersuchung muss ebenso tierexperimentellen Untersuchungen vorbehalten bleiben, wie die standardisierte Induktion einer zerebralen Ischämie.

Die Experimente wurden im Zeitraum von Mai 1999 bis Februar 2000 an insgesamt 36 männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) durchgeführt. Die Tiere wurden gemäß den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes (Bundesgesetzblatt, Jahrgang 1986, Teil I) gehalten. Die Durchführung dieser Studie wurde gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG i. d. F. 25.05.1998; BGBl I S.1105) durch die Tierschutzkommission der Regierung von Oberbayern genehmigt (Genehmigungsbescheid vom 22.06.1999; Aktenzeichen 211-2531-29/99).

Bei 36 männlichen Sprague-Dawley-Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von $350 \text{ g} \pm 50 \text{ g}$ wurde eine halbstündige inkomplette zerebrale rechtseitige Hemisphärenischämie unter hämorrhagischer Hypotension mit anschließender Reperfusion durchgeführt.

Nach Beendigung der chirurgischen Präparation (vgl. 3.3) wurde die Narkose (vgl. 3.2) nach einem Randomisierungsplan fortgeführt mit:

- einem Bolus von $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. Fentanyl und einer Dauerinfusion von $25 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ Fentanyl und einem Sauerstoff-Lachgas-Gemisch ($\text{FiO}_2=0,33$) (Gruppe 1, Kontrollgruppe) oder
- $1,0 \text{ MAC}$ Sevofluran ($2,0 \text{ Vol.}\%$ endexpiratorische Konzentration) in O_2/Luft -Gemisch ($\text{FiO}_2=0,33$) (Gruppe2) oder
- $1,0 \text{ mg}/\text{kg}/\text{min.}$ i.v. Propofol, Beatmung O_2/Luft -Gemisch ($\text{FiO}_2=0,33$) (Gruppe 3)

Eine Scheinversuchsgruppe, bei der keine zerebrale Ischämie induziert wurde (Gruppe 4), wurde dem selben Narkoseregime unterzogen wie Gruppe 1.

3.2 Anästhesie und Beatmung

Zur Einleitung der Anästhesie wurden die Versuchstiere in einen mit Halothan (Halothan ASID, Rüscher Hospital Vertriebs GmbH, Böblingen, Deutschland) gesättigten Glasstandzylinder-

der verbracht, in dem sie spontanatmend bewusstlos wurden. Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurde unter Laryngoskopie ein Tubus (Cavafix Certo 1,5 x 2,0 mm/16G, 5 cm, Fa. Braun, Melsungen, Deutschland) in die Trachea eingeführt, über den die Tiere volumengesteuert (Beatmungsmaschine Havard Rodent Ventilator, Model 683, Harvard Apparatus Inc., South Natick, Massachusetts, USA) beatmet wurden. Während der chirurgischen Präparation wurde die Narkose mit 2,0-2,5 Vol.% Isofluran (Forene[®], Abbot GmbH, Wiesbaden, Deutschland) in einem Sauerstoff–Lachgas–Gemisch ($FiO_2 = 0,33$) fortgeführt. Dabei wurde die Atemfrequenz und das Atemzugvolumen so eingestellt, dass der arterielle Kohlendioxidpartialdruck ($paCO_2$) konstant zwischen 35 und 38 mmHg (Atemgasmonitor Capnomac, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) gehalten wurde.

Zur Monitorisierung (Cardiocap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) der Herzaktion wurde ein EKG perkutan mit zwei Nadelelektroden abgeleitet.

Nach Beendigung der chirurgischen Präparation (vgl. 3.3) wurde das Narkoseregime entsprechend dem Randomisierungsplan (vgl. 3.1) fortgeführt. Bis zur Induktion der zerebralen Ischämie (vgl. 3.4) wurde ein Muskelrelaxans 4 mg/h/kg KG (Norcuron[®] 4 mg, Fa. Organon GmbH, Eppelheim, Deutschland) verabreicht. Zum Zeitpunkt der Induktion der zerebralen Ischämie wurde die Zufuhr des Muskelrelaxans beendet. Zur Konstanthaltung des arteriellen pH-Wertes wurde entsprechend der Formel

$$[NaHCO_3] = -BE \times kg \times KG \times 0,3$$

NaHCO ₃	:	Natriumbikarbonat
BE	:	Basenabweichung
KG	:	Körpergewicht

eine 8,4%ige Natriumbikarbonatlösung (Fa. Braun AG, Melsungen, Deutschland) infundiert. Die Körperkerntemperaturmessung erfolgte über eine in den Enddarm plazierte Temperatursonde, die perikranielle Temperatur wurde über eine im rechten M. temporalis lokalisierte Sonde (Temperature probe Modell No. 552, YSI, Fa. Yellow Springs Instruments Co., Inc., Yellow Springs, Ohio, USA) gemessen. Bei allen Tieren wurde die Körperkerntemperatur mit einer regulierbaren elektrischen Heizmatte konstant bei 37 °C gehalten. Der Zielwert der perikraniellen Temperatur lag zwischen 37,4 °C und 37,6 °C. Über ein Temperaturmessgerät (YSI Indicating Temperature Controller, Mod. 73A, Fa. Yellow Springs Instruments Co., Inc., Yellow Springs, Ohio, USA), das mit einer Infrarotwärmelampe gekoppelt war, wurde die Wärmezufuhr über die Wärmelampe reguliert.

3.3 Chirurgische Präparation

Zur Katheterimplantation (PE-Katheter 33,5 cm lang, Außendurchmesser 0,97 mm, Innendurchmesser 0,58 mm, eigene Herstellung) wurden die rechte A. und V. femoralis, sowie die rechte V. jugularis interna präpariert. Die rechte A. carotis wurde freigelegt und mit einer losen Ligatur (1 mm dickes Gummiband, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) nicht okkludierend angeschlungen.

Der Katheter in der A. femoralis diente zur invasiven Blutdruckmessung, sowie zur Entnahme arterieller Blutproben, über die Katheter in der V. jugularis interna wurden Pharmaka (vgl. 3.1, 3.2) appliziert.

Alle Katheter wurden vor der Implantation heparinisiert (2 I.E. Heparin pro ml, 25000 I.E. Liquemin[®] N 25000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland, Sterofundin, Fa. Braun AG, Melsungen, Deutschland).

Die Schädelkalotte wurde im Bereich des Os frontale freipräpariert und beidseits der Sutura sagittalis mit einem Diamantbohrer (Diamant-Schleifstift Kugelform Ø 1 mm, Fa. Proxxon, Niersbach, Deutschland) bis auf die innere Knochenlamelle aufgefräst. Mit Hilfe eines stereotaktischen Rahmens (Fa. Kopf) wurden zwei Messsonden zur Messung des zerebralen Blutflusses (vgl. 3.6.2) auf die gefrästen Flächen zentriert.

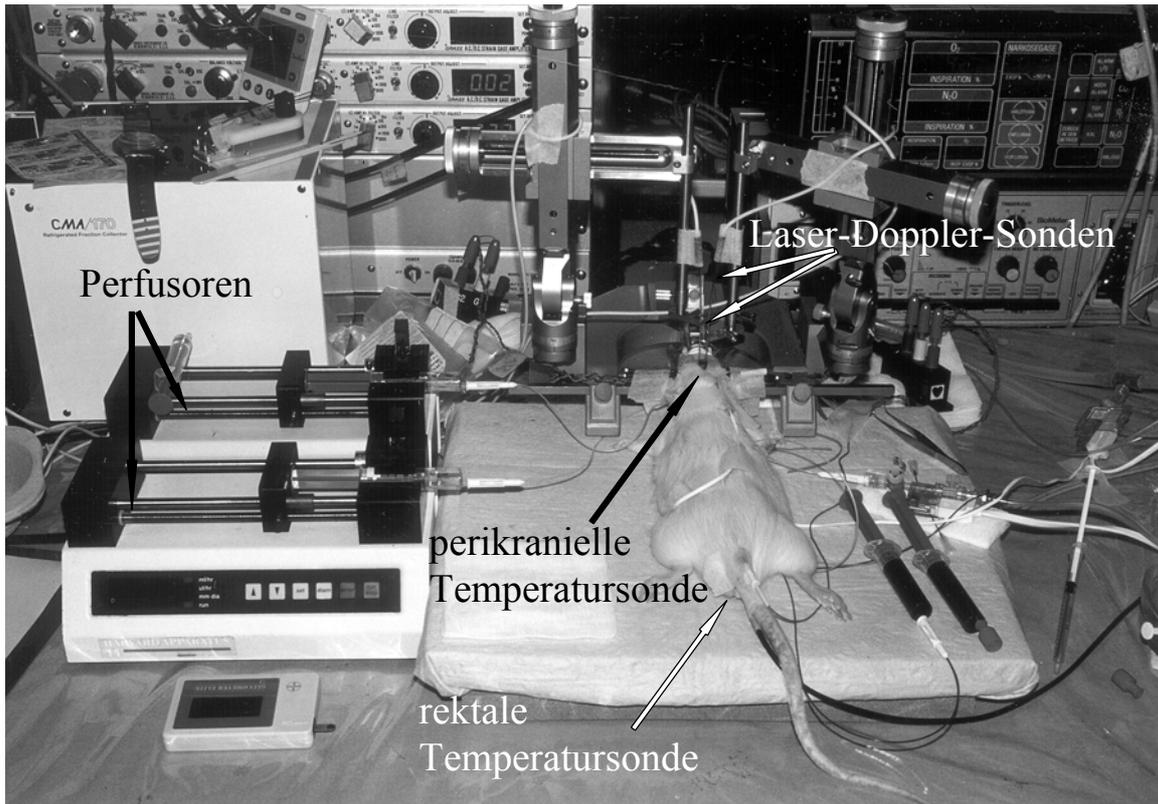


Abbildung 2: Ratte im stereotaktischen Rahmen. Photographische Darstellung des Versuchsaufbaus nach der chirurgischen Präparation und nach Installation aller Messeinheiten.

3.4 Versuchsprotokoll

Zwölf Stunden vor Beginn des Versuches wurden die Tiere unter Nahrungskarenz gehalten. Nach Einleitung der Anästhesie (vgl. 3.2) und Beendigung der chirurgischen Präparation (vgl. 3.3) wurde die Isofluranzufuhr beendet und die Narkose nach einem Randomisierungsplan entsprechend den Versuchsgruppen 1-4 (vgl. 3.1) fortgeführt.

Zur Äquilibration der geänderten Zusammensetzung des inspiratorischen Gasgemisches, sowie zur Etablierung des jeweils neuen Narkoseregimes, folgte eine zweistündige Stabilisierungsphase, an deren Ende die erste Messung („Ausgangsmessung“) stattfand.

Über einen Zeitraum von acht Minuten wurde durch Blutentzug aus der V. femoralis eine hämorrhagische Hypotension mit dem Zielparameter MAP = 35 mmHg induziert. Das entnommene Blut wurde in heparinisierten Spritzen (Fa. Braun AG, Melsungen, Deutschland) bei 37 °C gelagert.

Sobald der Zieldruck erreicht war, wurde die A. carotis communis mit einem Clip für 30 Minuten okkludiert. Der MAP wurde während dieser Ischämiephase konstant bei 35 mmHg gehalten. Die zweite und dritte Messung erfolgte 15 bzw. 30 Minuten nach Ligatur der A. caro-

tis communis („15' Ischämie“, bzw. „30' Ischämie“). Am Ende der Ischämiephase wurde der Klipp entfernt. Das entnommene Blut wurde während der folgenden 15 Minuten retransfundiert. Es folgte die vierte Messung („15' Retransfusion“). Während der folgenden Reperfusionphase wurden die Tiere über einen Zeitraum von vier Stunden beobachtet. Während dieser vier Stunden erfolgten zwei weitere Messungen („75' Reperfusion“)

Im unmittelbarem Anschluss an den Versuch wurde das Gehirn entnommen. In tiefer Narkose wurden die Tiere dekapitiert, indem man mit einer starken Schere den Schädel von der Halswirbelsäule nach vorheriger Präparation trennte. Nach der Tötung wurde die Kopfschwarte von den Ohren nach rostral bis zu den Augen präpariert, um beiderseits den M. temporalis von Schädel zu entfernen. Die Nackenmuskulatur, das Os occipitale und das Os parietale wurden ohne das Gehirn zu beschädigen mit einem Luer abpräpariert. Vor der Gehirnentnahme wurden die Nn. optici und die restlichen Gehirnnerven mit einem geeigneten Spatel durchtrennt. Mit dem Spatel wurde das Gehirn von basal aus dem verbliebenen knöchernen Schädel gehoben. Das Kleinhirn, 3 mm des kaudalen und 3 mm des rostralen Gehirns wurden mit einem Skalpell abgeschnitten.

In einen Aluminiumzylinder (ca. 1,5 cm Durchmesser x ca. 2,5 cm Höhe) wurde das Gehirn so plaziert, dass sein kaudales Ende dem Boden des Zylinders zugewandt war. Der Zylinder wurde mit Einfriermedium (Tissue Freezing Medium[®], Fa. Jung, Leica Instruments, Nussloch, Deutschland) so weit gefüllt, bis das Gehirn gut bedeckt war. In einer mit Trockeneis gekühlten 2-Methylbutan (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde das eingebettete Gehirn samt Einfriermedium tiefgefroren, was einen sicheren Schutz vor kältebedingter thermischer Läsion des Gewebes darstellt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde es bei -70 °C gelagert.

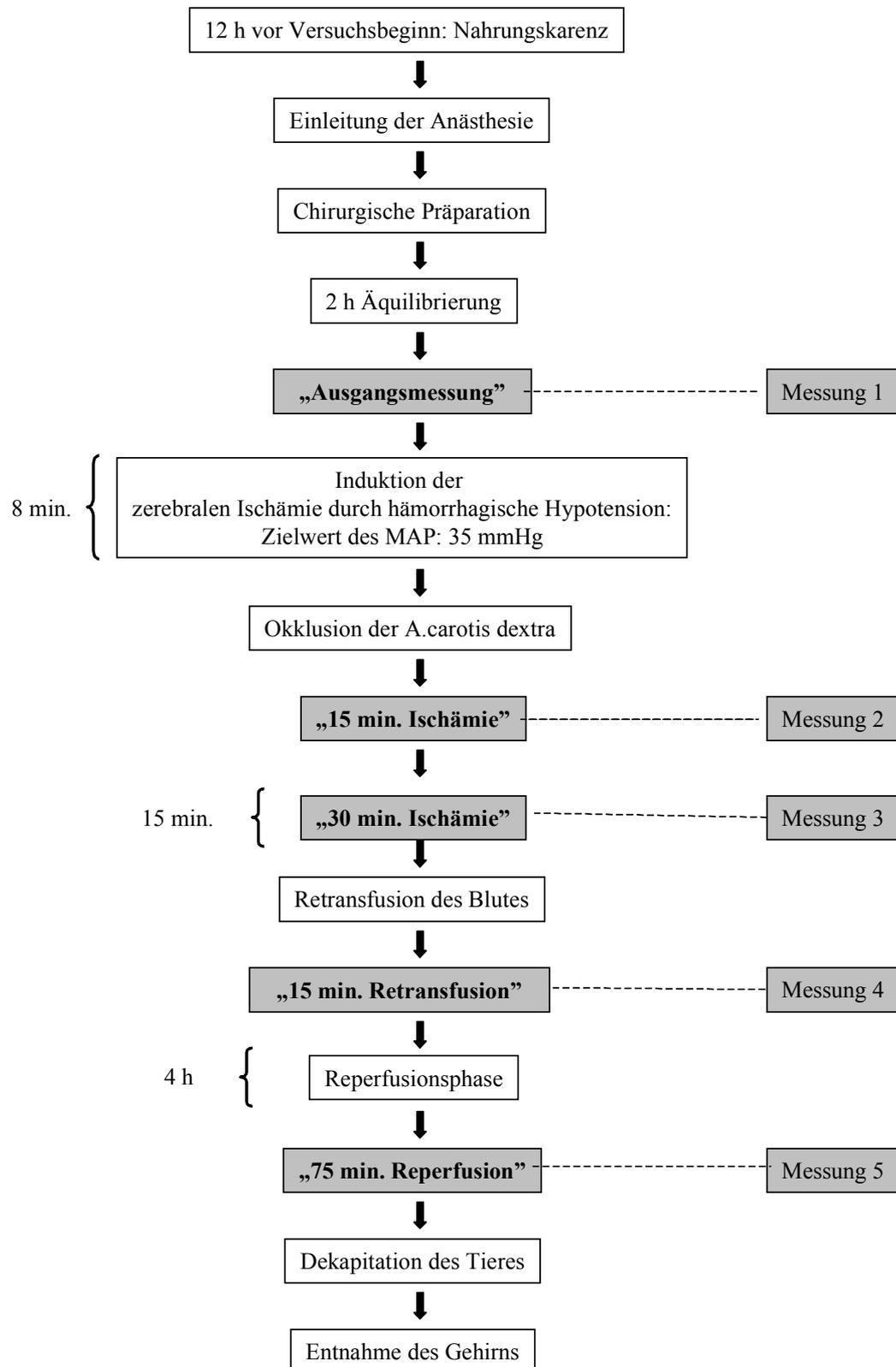


Abbildung 3: Versuchsprotokoll. Chronologischer Ablauf des Versuchs und Abfolge der Messzeitpunkte.

3.5 Gemessene Größen

3.5.1 Systemische Variablen

Zu den Messzeitpunkten (vgl. 3.4) wurden der

- arterielle Blutdruck und die
- Herzfrequenz

als hämodynamische Parameter gemessen.

Folgende laborchemische Parameter wurden zu den Messzeitpunkten bestimmt

- paCO_2 (arterieller Kohlendioxidpartialdruck)
- Basenabweichung (BE)
- pH-Wert des arteriellen Blutes
- Hämoglobinkonzentration (Hb)
- Blutglukosekonzentration

3.5.2 Elektroenzephalogramm (EEG)

Zur Beurteilung der Narkosetiefe und der physiologischen Hirnaktivität wurde ein EEG (Multichannel Laser Doppler System, PeroFlux 4001 Master, Fa. Perimed) während des Versuches abgeleitet. Hierzu wurden fünf Elektroden an definierten Messpunkten (je zwei Elektroden rechts und links perikraniell und eine Erdungselektrode in der Schwanzwurzel) angelegt. Eine weitere Auswertung des EEG erfolgte nicht.

3.5.3 Messung des zerebralen Blutflusses

Der zerebrale Blutfluss

- CBF

wurde kontinuierlich durch Laser-Doppler-Flussmessung (vgl. 3.6.2) detektiert.

3.6 Messmethoden

3.6.1 Laborchemische Analysen

Zu den Messzeitpunkten (vgl. 3.4) wurde mit heparinisierten Kapillaren (MultiCap 175 μl , Chiron Diagnostics GmbH, Fernwald, Deutschland) arterielles Blut zur laborchemischen Blutanalyse entnommen. Die Blutgasanalysen wurden mit dem Blutgasanalysegerät (pH/Blutgasanalyser 1306, Fa. Instrumentation Laboratory, Mailand, Italien) durchgeführt.

Die Hämoglobinkonzentration wurde photometrisch mit dem CO-Oximeter (CO-Oximeter 482, Fa. Instrumentation Laboratory, Mailand, Italien) bestimmt.

Die Messung der Glukosekonzentration erfolgte mit dem Glukoseschnelltestgerät (Glucometer Elite[®], Fa. Bayer Diagnostics, München, Deutschland).

3.6.2 Laser-Doppler-Flussmessung

Zur Beurteilung der zerebralen Perfusion wurde die Gehirndurchblutung mit Hilfe der Laser-Doppler-Flussmessung (PeriFlux 4001 Master, Fa. Perimed, Järfalla, Schweden) bestimmt. Von einer Glasfaseroptiksonde wird ein kontinuierlicher Laserstrahl mit der Wellenlänge 635 nm und der maximalen Energieabgabe von 1 mW auf ein 1 mm³ großes Gehirnareal entsandt und von diesem getroffenen Gewebe reflektiert. Das Licht wird sowohl von stationären Zellen (Neuronen und Gliazellen) als auch von bewegten Zellen (vor allem Erythrozyten) reflektiert. Die Reflektion des Lichts durch bewegte Erythrozyten resultiert in einer Frequenzänderung des entsandten Lichtes, basierend auf dem Dopplereffekt. Licht, das von stationären Zellen zurückgeworfen wird, induziert keine Frequenzänderung. Die Analyse des reflektierten Lichtes liefert die dopplereffektbedingte Änderung der Frequenz, die proportional der Geschwindigkeit der roten Blutzellen ist. Das zurückgestreute Licht wird durch Photodetektoren über separate Fasern in der Sonde registriert und in ein elektrisches Signal umgewandelt [97](S.56-57) [98](S.H441-H442) [33](S.41). Im Gegensatz zu anderen Messsystemen benötigt die Sonde des Perimedsystems keinen direkten Kontakt zum Gewebe, die Eindringtiefe des Laserstrahls beträgt 1 mm [28](S.590). Der Hersteller gibt die Durchblutung in „Perfusion Units“ an.

Zwei Messsonden wurden in den stereotaktischen Rahmen so eingespannt, dass sie die zerebrale Durchblutung über den abgefrästen Ossa frontales (vgl. 3.3) seitengetreunt ermittelten. Um die korrekte Platzierung der Sonden zu kontrollieren, wurde eine CO₂-Provokationsprobe durchgeführt. Dazu wurden die Tiere unter Reduktion der Isoflurankonzentration von 2–2,5 Vol.% auf 1 Vol.% kurzfristig hyperventiliert. Der dadurch bedingte Abfall der CO₂-Konzentration bewirkt eine zerebrale Vasokonstriktion mit messbarem Abfall des zerebralen Blutflusses (CBF). Sank der CBF um ca. 10 %, waren die Sonden richtig plaziert und wurden belassen.

Während des gesamten Versuches wurde der CBF kontinuierlich gemessen.

3.6.3 Messung hämodynamischer Parameter

Über den Katheter in der A. femoralis dextra (vgl. 3.3), der über einen Druckdom (MX 960, Fa. Medex) mit der Messapparatur (Cardiocap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) verbunden

war, wurde der arterielle Blutdruck (systolischer, diastolischer und mittlerer Blutdruck) invasiv ermittelt.

Die Herzfrequenz wurde durch Anlegen eines EKG-Lineales am kurzzeitig gestoppten EKG-Monitor (vgl. 3.2) ausgemessen. Dies war erforderlich, da die Ruheherzfrequenz bei Ratten etwa 400 Schläge pro Minute beträgt und ein so hoher Messwert mit der numerischen Anzeige, die auf 250 begrenzt war, nicht erfasst werden konnte.

3.6.4 Dissektionschema zur Gewinnung von Gewebeschnitten

Für die histologische Untersuchung wurden 7 µm dicke Gefrierschnitte in koronarer Schnittebene (parallel zur Sutura coronalis) mit dem Kryotom (Microtom-Kryostat, HM 500 OM, Firma Microm GmbH, Walldorf, Deutschland) angefertigt. Für die Dissektion wurde vom gefrorenen Gehirn die Aluminiumfolie und das Einfriermedium entfernt. Auf einem Objektisch wurde es mit Einfriermedium aufgefroren und in den Objektischhalter des Kryotoms eingespannt. Dort äquilibrierte es 30 Minuten bis der Zielwert der Objekttemperatur von -20°C erreicht war und wurde dann bis zu der im Protokoll festgelegten Schnittebene, Bregma (Schnittpunkt der Sutura coronalis und sagittalis) – 2.3 mm getrimmt. Das Bregma stellt den Nullpunkt einer Messskala dar, bei der nach rostral die stereotaktischen Koordinaten als positive Messwerte angegeben werden und nach kaudal als negative.

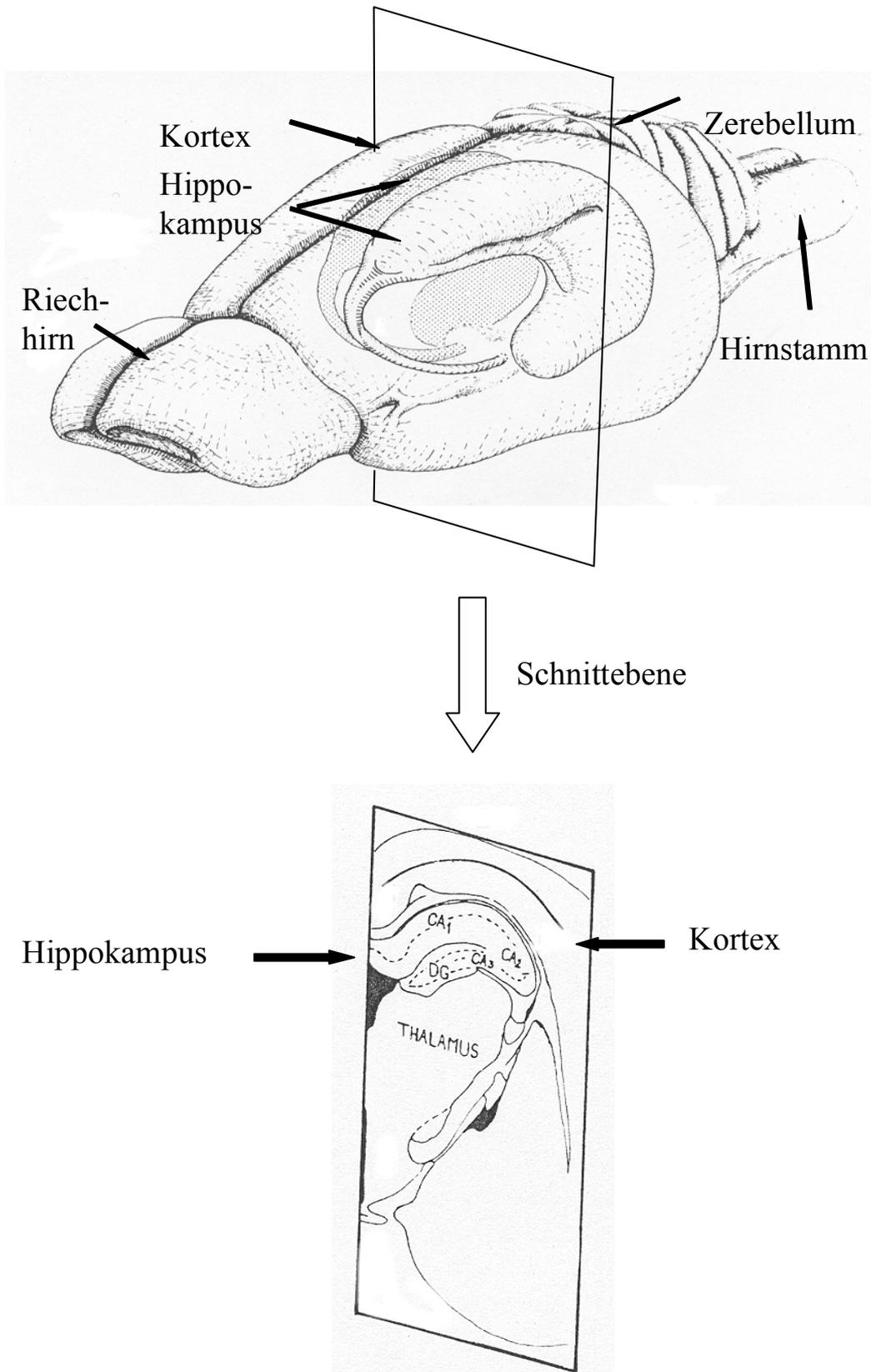


Abbildung 4: Schematisierte Darstellung eines Rattenhirns [86](S.445). Das eingezeichnete Rechteck zeigt die Schnittebene für die molekularbiologischen Analysen.

Nach Erreichen der richtigen Schnittebene wurden die Schnitte angefertigt und mit zimmer-temperaturwarmen Objektträgern (Objektträger SuperFrost®Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgenommen.

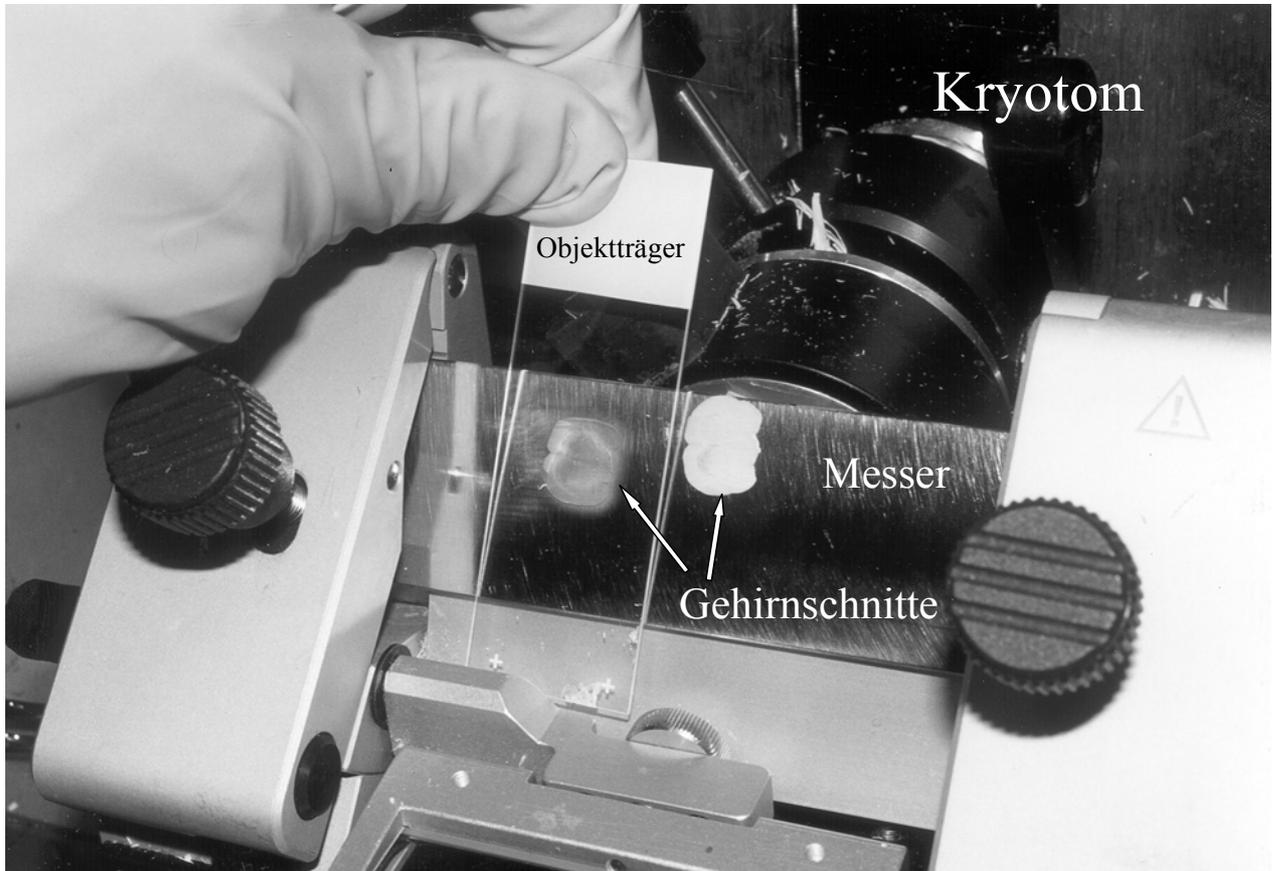


Abbildung 5: Blick in das Kryotom. Ein 7µm dicker Hirnschnitt liegt auf dem Spezialmesser, ein weiterer ist auf dem Objektträger bereits fixiert.

Insgesamt wurden pro Tier 64 Schnitte auf 32 Objektträgern hergestellt. Bis zur Färbung wurden die Schnitte in Objektträgerkästchen (Fa. neoLab, Heidelberg, Deutschland) bei -70°C gelagert. Eine Schwankung der Schnittdicke wurde minimiert, indem während des gesamten Schneidevorgangs die Kammertemperatur konstant bei -23°C und die Objekttemperatur gleichbleibend bei -20°C gehalten wurde.

Ab Bregma -3.2 mm wurden zwei mal zwei $90\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte bei einer Objekttemperatur von -6°C und einer Kammertemperatur von -23°C für die Westernblotanalyse gewonnen. Die rechte und linke Hemisphäre eines Schnittes wurden mit einem Skalpell getrennt. Aus den Hemisphären wurde jeweils der Hippokampus und der zugehörige Kortex herausgelöst. In zwei Eppendorfgefäßen ($1,5\text{ ml}$ Eppendorfgefäß, Fa. Eppendorf, Eppendorf, Deutschland)

wurden je zwei rechte und zwei linke Hippokampi samt Kortex bis zur Analyse bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert

Aus drei nicht behandelten nativen Ratten wurde die Leber entnommen (vgl.3.6.5.2) und sofort in Einfriermedium in einem präformierten Aluminiumzylinder (Durchmesser: ca. 5 cm und Höhe: ca.0,5 cm) mit 2-Methylbutan (vgl.3.4) auf Trockeneis tiefgefroren. Für die Immunfluoreszenzfärbung (vgl.3.6.4.3) wurden $7\text{ }\mu\text{m}$ dicke Gefrierschnitte bei einer Objekttemperatur von $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einer Kammertemperatur von $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ angefertigt.

3.6.5 Histologische Untersuchungen

3.6.5.1 Untersuchung der Zellmorphologie anhand hämatoxylin- und eosin gefärbter Gewebeschnitte

Für die Hämatoxylin-Eosinfärbung (HE-Färbung) wurden die Gefrierschnitte 15 Minuten lang in der Hämalaunlösung nach Mayer gefärbt. Diese wurde wie folgt hergestellt.

- 1g Hämatoxylin,
- 200 mg Natriumjodat,
- 50 g Kalialaun,
- 50 g Chloralhydrat und
- 1 g Zitronensäure

wurden in 1000 ml Aqua destillata gelöst. Danach wurden die Schnitte ca. 15 Minuten lang mit lauwarmem Leitungswasser gespült bis keine Farbwolken mehr zu sehen waren. In der Eosinlösung (0,5%ige Eosinlösung) wurden die Objektträger 5 Minuten belassen, danach wurden sie mit destilliertem Wasser für 3 Minuten gewaschen. In einer aufsteigenden Konzentrationsreihe wurden die Schnitte in 70%igen, 80%igen, 90%igen und in 100%igen Alkohollösungen für je 2 Minuten und weitere 10 Minuten in einer frischen 100%igen Alkohollösung entwässert. Zur Fixierung wurden die Schnitte je 2 und 5 Minuten lang in Roti[®]-Histol (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Um die gefärbten Gewebeschnitte zu schützen, wurden sie mit Roti[®]-Histokitt (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger in lichtundurchlässigen Objektträgerkästen (Fa.neoLab, Heidelberg, Deutschland) aufbewahrt. Pro Tier wurden je zwei Schnitte aus dem rostralen, bzw. kaudalen Hippokampus entnommen und auf je einem Objektträger präpariert und gefärbt (s.o.). Der jeweils qualitativ bessere Schnitt wurde ausgewertet. Kriterien der Schnittqualität waren dabei:

- Homogenität der Färbung
- Faltenfreie Präparation des Ultradünnschnittes auf dem Objektträger

- Anzahl der Artefakte.

Eine unabhängige Neuropathologin wertete die Schnitte lichtmikroskopisch aus. Zur Anonymisierung wurde jedem histologischen Präparaten eine Zahlenkodierung zugeordnet. Im Gyrus dentatus und in der CA1- und CA3-Region des Hippokampus wurde die Anzahl der geschädigten Zellen ermittelt. Als geschädigt wurden Zellen gewertet, die folgende histologische Merkmale aufwiesen:

- Eosinophilie
- Kernschrumpfung
- Kondensation des Zytoplasmas.

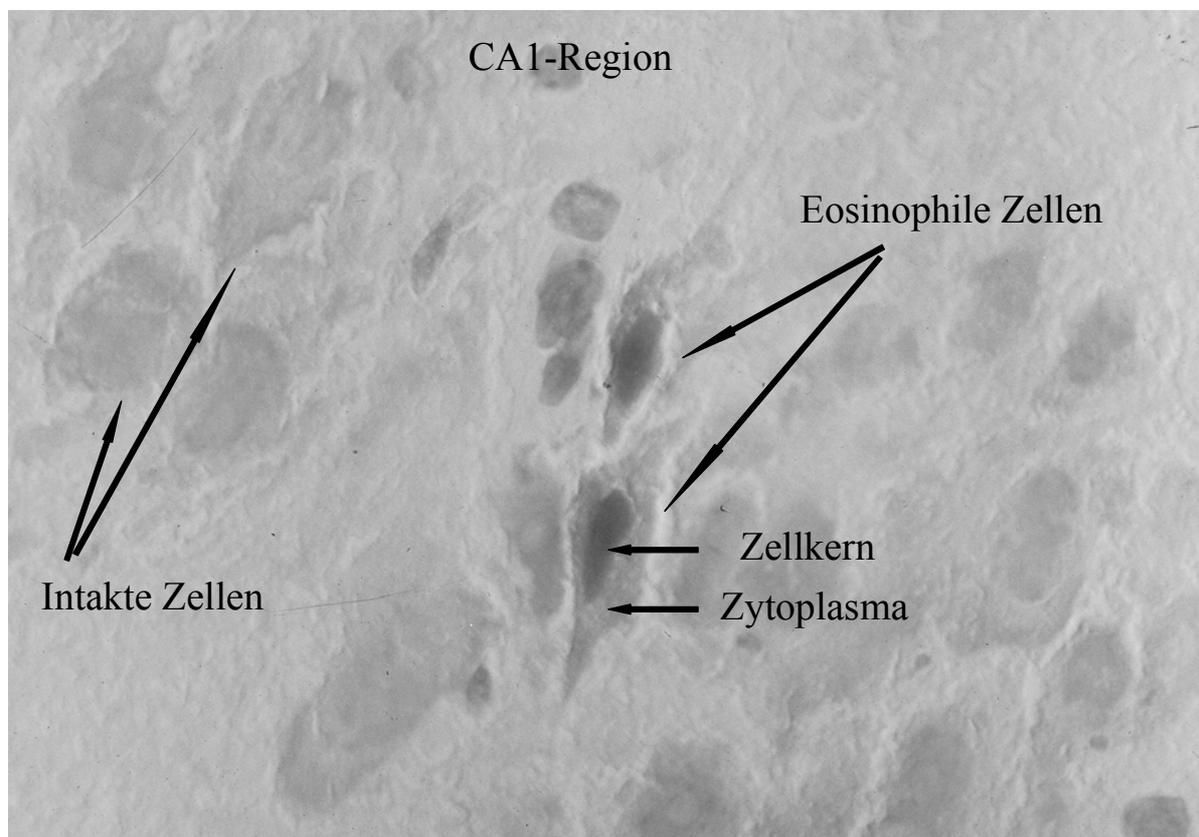


Abbildung 6: Hämatoxylin-Eosinfärbung eines Hirnschnittes eines Tieres der Kontrollgruppe. Die Abbildung zeigt exemplarisch zwei eosinophile Zellen der CA1-Region aus dem rechten Hippokampus. Gegenüber den morphologisch gesunden Neuronen weisen die eosinophilen Zellen eine deutliche Kernschrumpfung und eine starke Kondensation des Zytoplasmas auf.

3.6.5.2 Messung der Expression der Apoptosefaktoren mit der indirekten Immunfluoreszenzfärbung

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung dient zur spezifischen Detektion von Proteinen in Zellausstrichen oder in Gewebeschnitten. Das Zielprotein wird mit einem spezifischen Anti-

körper, dem Primärantikörper, markiert. Der Primärantikörper wird durch Anlagerung eines Sekundärantikörpers visualisiert, der einen Fluoreszenzfarbstoff trägt.

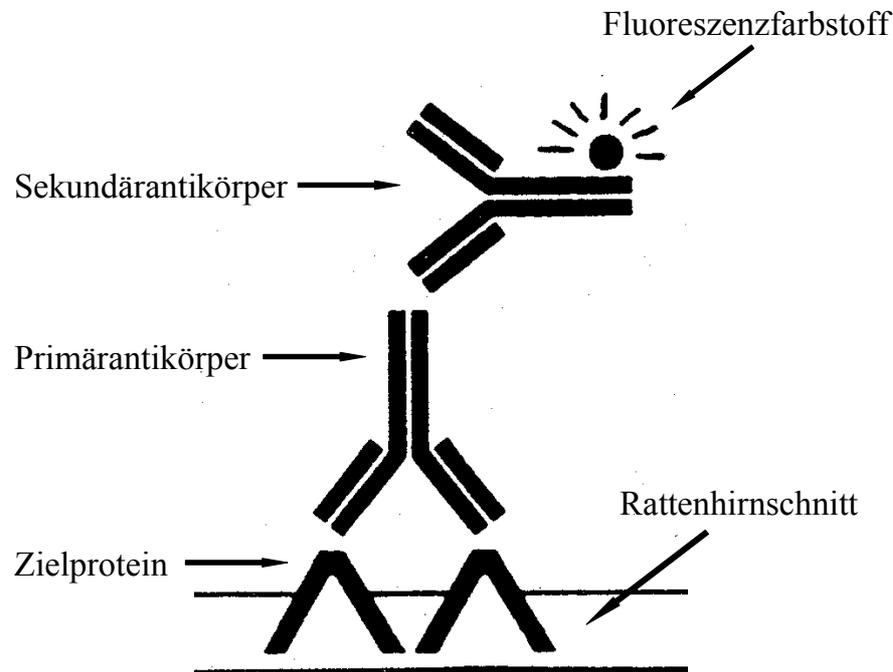


Abbildung 7 Vereinfachtes Schema der indirekten Immunfluoreszenzfärbung. An die Zielproteine (Bax, Bcl-2 und p53) des Rattenhirnschnittes bindet der jeweils spezifische Primärantikörper. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgt durch den mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörper.

In der vorliegenden Studie wurden folgende Apoptoseproteine detektiert:

- Bax
- Bcl-2
- p53.

Als Primärantikörper wurden verwendet:

- Anti-Bax, polyklonales Kaninchen IgG (I – 19) sc-930, Anti-Bax, polyklonales Kaninchen IgG (P–19) sc-526, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
- Anti-p53, polyklonales Kaninchen IgG (FL–393) sc–6243, Santa Cruz Biotechnology
- Anti-Bcl-2, polyklonales Kaninchen IgG, (Δ C 21) sc-783, Santa Cruz Biotechnology

Als Sekundärantikörper fand AlexaTM 488, konjugierter Ziege Anti–Kaninchen-Antikörper IgG (Best. A-11008, Fa. MoBiTec, Göttingen, Deutschland) Anwendung.

Für die Markierung von Bax wurden zwei verschiedene Primärantikörper eingesetzt, der Antikörper P-19 bindet am N-Terminus des Proteins, der Antikörper I-19 am C-Terminus. Durch

die Kombination dieser beiden Primärantikörper wurde ein stärkeres Signal erzielt, als durch Verwendung eines Primärantikörpers. Für die Markierung von p53 und Bcl-2 reichte jeweils ein Primärantikörper aus, um ein ausreichend starkes Signal zu erzeugen.

Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Gefrierschnitte zehn Minuten in 100%igem Ethanol (Ethanol absolut, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal 15 Minuten mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBST), die ein Detergens (Tween 20, Polyoxyethylensorbitolmonolaurat, Fa. Fluka, München, Deutschland) enthält, gewaschen. Zur Herstellung einer zehnfach konzentrierten Stammlösung (10-fach PBS) wurden

- 400 g NaCl (Natriumchlorid)
- 10 g KCl (Kaliumchlorid)
- 57.5 g Na₂HPO₄·2H₂O (Dinatriumhydrogenphosphat)
- 10 g KH₂PO₄ (Kaliumhydrogenphosphat)

in 3 Litern Aqua bidestillata gelöst und mit autoklaviertem zweifach destilliertem Wasser auf 5 Liter aufgefüllt. Diese Stammlösung wurde in Verhältnis 1 : 9 mit autoklaviertem zweifach destilliertem Wasser (ein Teil Wasser und neun Teile Stammlösung) zu einer einfachen Pufferlösung (PBS) verdünnt. Um PBST zu erhalten wurden 1000 ml PBS mit 500 µl Tween 20 vermischt. Durch Verwendung dieses Puffers wird die Hintergrundfärbung durch Reduktion unspezifischer Bindungen der Antikörper vermindert. Hauptsächlich wird die unspezifische Bindung der Antikörper jedoch durch einen sogenannten Blockierungsschritt minimiert. Durch 60-minütige Inkubation mit einer 10%igen Proteinlösung, die ein Teil inaktiviertes fetales Kälberserum (FKS, Seromed Biochrom KG, Berlin) und neun Teile PBST enthielt, wurden diese unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Für den 60-minütigen Detektionsschritt wurden die Antikörper gegen Bax und p53 je im Verhältnis 1 : 80 (ein Teil Antikörper, 80 Teile 10%ige Proteinlösung) und der Antikörper gegen Bcl-2 im Verhältnis 1 : 60 (ein Teil Antikörper, 60 Teile 10%ige Proteinlösung) verdünnt. Diese Verdünnungsverhältnisse sind experimentell ermittelt worden. Der jeweilige Primärantikörper wurde in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe mit 1 : 40, 1 : 60, 1 : 80, 1 : 100 und 1 : 120 verdünnt. Ausschlaggebend für die gewählten Verdünnungen war das günstigste Signal-Rauschverhältnis, d.h. starke spezifische Anfärbung bei gleichzeitig schwacher unspezifischer Hintergrundfärbung. Nach der Inkubation wurden die Schnitte 40 Minuten lang mit PBST gewaschen. Der Puffer wurde sechsmal gewechselt, um den Primärantikörper möglichst vollständig zu entfernen.

Der Sekundärantikörper wurde in der 10%igen Proteinlösung im Verhältnis 1 : 800 (ein Teil Antikörper, 800 Teile 10%ige Proteinlösung) verdünnt. In Analogie zum ersten Antikörper wurde auch für den zweiten das ideale Verdünnungsverhältnis bestimmt.

Da der fluoreszenzmarkierte zweite Antikörper sehr lichtempfindlich ist, wurde er unter Lichtschutz für 60 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Präparate 40 Minuten im Dunkeln unter viermaligem Pufferwechsel in PBST gewaschen. Auf die gefärbten Gewebeschnitte wurde dann ein Tropfen des Eindeckmediums (Vectashield[®] Mounting Medium, Vektor Laboratories, Burlingame, USA) gegeben und das Deckglas (Deckgläser 50 x 24 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) blasenfrei aufgelegt. Das Eindeckmedium stabilisiert die Färbung und vermindert eine vorzeitige Abblassung. Die Verdunstung des Eindeckmediums wurde durch die Versiegelung mit farblosem Nagellack minimiert.

Immunfluoreszenz

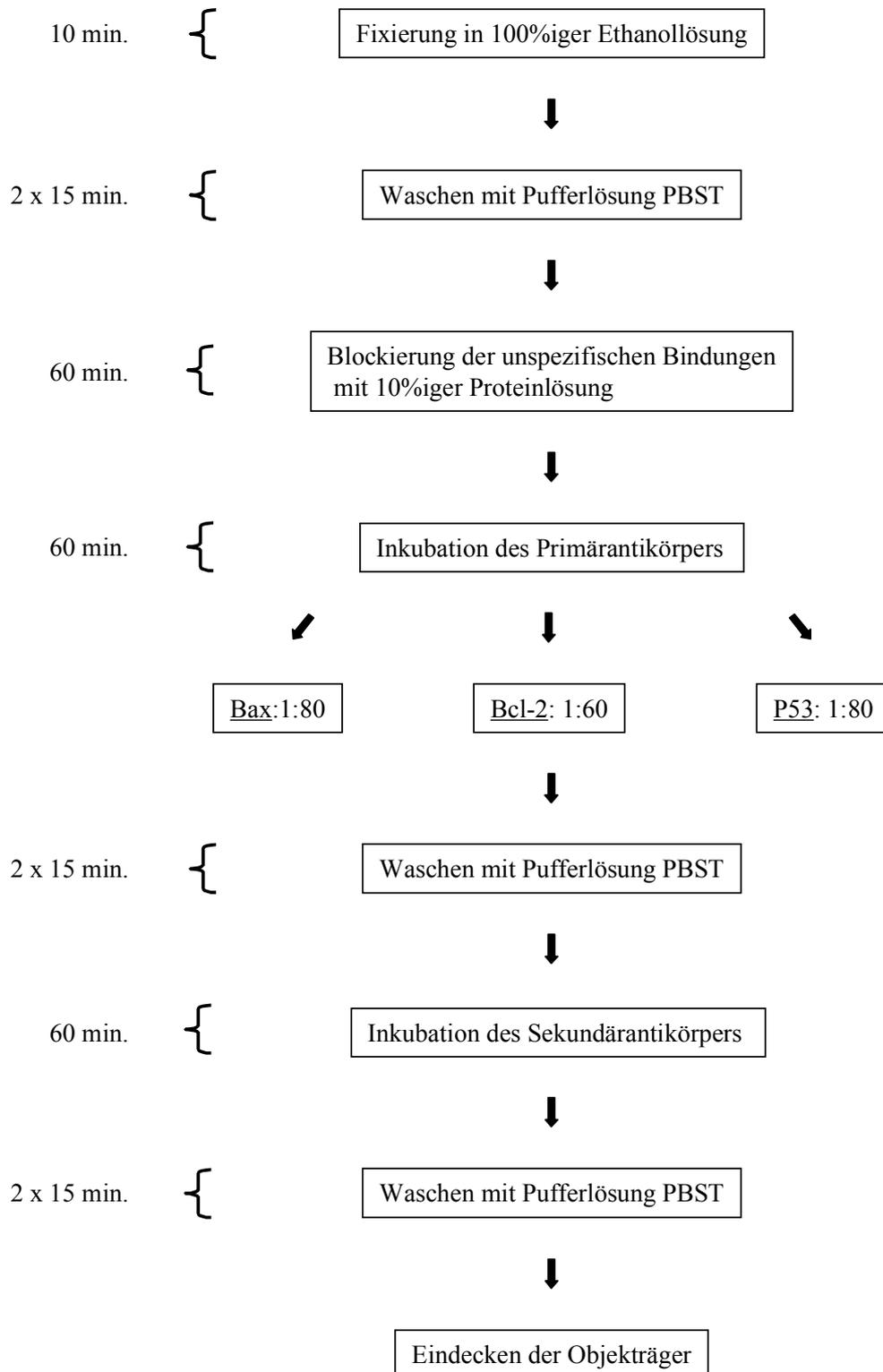


Abbildung 8: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung. Die Abbildung zeigt den chronologischen Verlauf und die Dauer der einzelnen Inkubations- und Waschschrirte der Färbung.

Um eine Verdunstung der Lösungen während den Inkubationsschritten zu verhindern und um einen effizienten Lichtschutz zu gewähren, wurden die Präparate in einer dunklen feuchten Kammer (PVC-Plastik-Kammer, Eigenbau, Werkstatt des Institutes für experimentelle Onkologie und Therapieforschung am Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland) platziert.

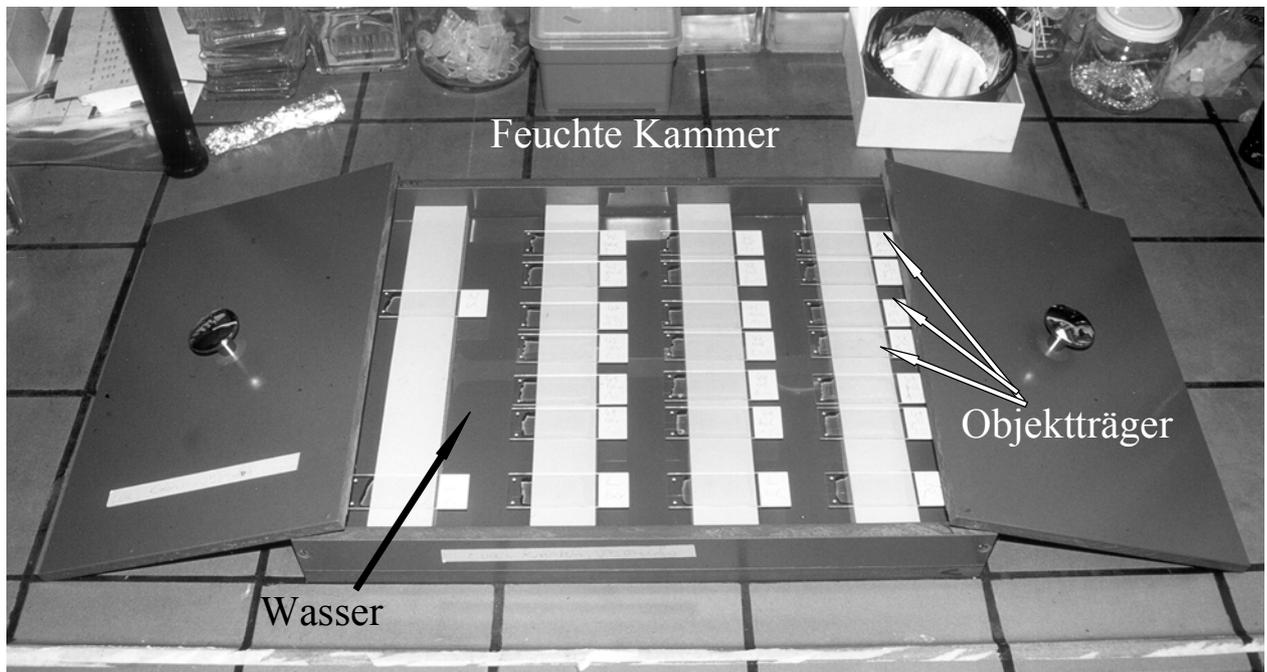


Abbildung 9: Inkubationskammer. Bei der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Schnitte während jedem Inkubationsschritt durch das feuchte Klima in der Kammer vor Austrocknung geschützt.

Diese 30x40x3 cm große Kammer war mit zwei Deckeln verschließbar, wodurch die Präparate vor Licht geschützt waren und in der durch Zugabe von Wasser ein hygrides Klima geschaffen wurde.

Vor dem Blockierungsschritt wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem inerten Fettstift (Pap Pen, Daido Sangyo Co., Japan) umrahmt, um eine gleichmäßige Bedeckung der Schnitte mit den Inkubationsflüssigkeiten sicherzustellen. Der Fettstift muss inert sein, da sonst das Fett durch das Detergens Tween 20 angegriffen wird, sich vom Objektträger abhebt und den Schnitt verunreinigt.

Zum Ausschluss methodischer Fehler bei der Färbung der Gehirnschnitte wurden jeweils Positiv- und Negativproben als Referenz angefertigt. Als Positivkontrollen wurden Gewebeschnitte aus der Leber gesunder Ratten verwendet (vgl. 3.6.4). Diese weisen eine konstant hohe Grundexpression der Proteine Bax, Bcl-2 und p53 auf [60](S.176-179) [44](S.352)

[65](S.1329). Demnach lässt eine fehlende oder mangelhafte Signalintensität im Lebergewebe auf einen Färbefehler schließen. Das Fehlen eines Signals im Hirnschnitt bzw. eine geringe Signalintensität kann hingegen bei Vorliegen eines Signals in der Referenzprobe Leber als tatsächliches Ergebnis gewertet werden.

Zum Nachweis der Spezifität der Messmethode wurden als Negativkontrollen je ein Leber- und ein Gehirnschnitt gefärbt, wobei der Primärantikörper weggelassen wurde. Aufgrund des fehlenden Primärantikörpers sollten diese Proben keine spezifische Färbung aufweisen.

Pro Färbung wurden somit im ganzen 11 Objektträger (OT) angefertigt.

	Bax	Bcl-2	p53	Negativkontrolle
Gehirn	2 Objektträger	2 Objektträger	2 Objektträger	1 Objektträger
Leber	1 Objektträger	1 Objektträger	1 Objektträger	1 Objektträger

Tabelle 1: Anzahl der pro Färbung benötigter Objektträger (OT). Pro Gehirn wurden für jedes Apoptoseprotein zwei OT angefertigt, ein OT wurde als Gehirnnegativkontrolle gefärbt. Für jedes Protein wurde ein OT mit Leberschnitten als Positivkontrolle hergestellt, sowie eine Lebernegativkontrolle.

Die Auswertung der immunfluoreszenzgefärbten Schnitte erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach Färbung mit einem konfokalen Lasermikroskop LSM510 mit Stativ (Axiovert 100M, Fa. Carl Zeiss, Jena, Deutschland) und der zugehörigen Software (LSM 510, Version 2.5 Expert Mode, Fa. Zeiss).

Mit einem Laserstrahl der Wellenlänge 488 nm wurde die Fluoreszenz der Schnitte induziert, es wurden digitale Bilder aufgenommen und zur weiteren elektronischen Datenverarbeitung gespeichert.

Vor Beginn jeder Messreihe wurde die Laserleistung bestimmt, da zwischen den einzelnen Messzeitpunkten Schwankungen in der Laserleistung auftreten. Die Größe dieser Schwankungen musste bekannt sein, um die Ergebnisse der einzelnen Messtage miteinander vergleichen zu können. Die Schwankung der Laserleistung wurde über zwei Meßsysteme erfasst, zum einen über einen direkten Intensitätsmesser (Powermeter, Liconix Model 35PM Power Meter, 441nm Wellenlänge), dessen Sensor direkt im Strahlengang des Laserstrahls gemessen hat, zum anderen über die Messung von sog. Beads (InSpeckTM Tricolor Microscope Image Intensity Calibration Kit, 2,5 µm, Fa. MoBiTec, Göttingen, Deutschland). Beads sind fluores-

zierende Latexkügelchen mit einer über ein Jahr konstanten Leuchtintensität. Vor Beginn der gesamten Messreihe wurden die Beads unter folgenden Messbedingungen aufgenommen.

<i>Parameter der Lasermikroskopie</i>	<i>Beads</i>
Wellenlänge (Wavelength) [nm]	488
Lochblende (Pinhole)	91
Ausgleich (Offset)	- 0,142
Spannung (Detector Gain, Voltage) [Volt]	847
Anzahl der gemittelten Bilder (Average Mode)	2
Vergrößerung (Zoom)	2
Abschwächungsfilter (Reduktion der Laserintensität auf 50 %)	Ja
Laserintensität	25%
Intensitätsregelung der Laserleistung (Transmission)	60-100%
Erweiterungsfaktor (Amplification Gain)	1,0 – 3,0

Tabelle 2: Parameter der Lasermikroskopie. Die Tabelle gibt die Standardeinstellung zur Kalibration des CLSM wieder.

Die erste Messung der Beads vor Beginn der gesamten Messreihe stellte die Referenz für alle folgenden Messungen dar. Für die Erstellung der Vorlage wurden die Lasereinstellungen so gewählt, dass die Beads maximal leuchteten, aber nicht überstrahlt waren und somit das System nicht übersteuert war. Folge der Überstrahlung wäre die Unmöglichkeit einer linearen Messung, d.h. bei Überschreiten einer kritischen Laserstrahlintensität besteht kein linearer Zusammenhang mehr mit der Signalintensität.

Die maximale Signalintensität wurde mit der Software LSM 510, Version 2.5 Expert Mode (Fa. Zeiss) bestimmt.

Die Parameter:

- Wavelength
- Pinhole
- Offset
- Detector Gain (Voltage)

- Average Mode
- Zoom
- Abschwächungsfilter (Reduktion der Laserintensität 50 %)
- Laserintensität

waren konstant. Variabel waren die linearen Parameter Laserintensitätsabschwächung (Transmission) und das Amplification Gain.

Um Messunterschiede des Lasers zwischen zwei Messtagen zu berücksichtigen, wurden die Beads mit den genannten Parametern aufgenommen. Aufgetretene Schwankungen des Lasers wurden erfasst, indem die Transmission von 60% auf die Intensität verstärkt oder abgeschwächt wurde, die erforderlich war, um die gleiche Signalintensität zu erhalten, wie sie die o.g. Referenzaufnahme vorgab. War die Intensität der Referenzaufnahme bei einer 100%igen Transmission nicht erreicht, wurde zur weiteren Angleichung das Amplification Gain zwischen 1,0 und 3,0 angepasst.

Da die Transmission und das Amplification Gain lineare Größen sind, wurde ein Quotient aus der tatsächlichen Bedarfstransmission und der Ausgangstransmission der Referenzaufnahme bzw. ein Umrechnungsfaktor, der dem Amplification Gain entspricht, errechnet. War z.B. die Ausgangstransmission 60% und die Bedarfsintensität 100%, war die Laserleistung 40% schwächer, als bei der Aufnahme des Referenzbildes.

Die Aufnahmen der Gehirnregionen der jeweiligen Messung wurden mit den entsprechenden Faktoren multipliziert. Durch dieses Verfahren war ein quantitativer Vergleich der Messdaten von verschiedenen Tagen möglich.

Nach einer 30-minütigen Vorlaufzeit wurde die Laserleistung, wie oben beschrieben, kalibriert und danach mit der Messung begonnen.

Pro Versuchstier, pro Zielprotein wurden zwei der vier gefärbten Gehirnschnitte ausgewertet, insgesamt waren es pro Tier sechs Gehirnschnitte, pro Zielprotein je zwei.

Der jeweils qualitativ bessere Schnitt auf einem Objektträger wurde ausgewertet. Mit der Fluoreszenzmikroskopfunktion (Fluoreszenzfilter FITC, Objektiv Plan-Neofluar 20x/0,5 Ph2 des o.g. Mikroskops) wurden die Schnitte beurteilt, Kriterien der Schnittqualität waren dabei:

- Homogenität der Färbung
- Faltenfreie Präparation des Ultradünnschnittes auf dem Objektträger
- Anzahl der Artefakte.

Pro Gehirnschnitt wurden im Hippokampus jeweils auf der rechten und auf der linken Seite zwei Aufnahmen mit dem konfokalen Lasermikroskop innerhalb der CA1-, der CA3- Region und des unteren Astes des Gyrus dentatus gemacht.

Die Expression der apoptoseassoziierten Proteine Bax, Bcl-2 und p53 wurde an jedem Messtag unter den gleichen Bedingungen, die vor Beginn der gesamten Messreihe ermittelt worden sind, erfasst. Folgende Parameter umfassten die Einstellungen.

<i>Parameter der Lasermikroskopie</i>	<i>p53</i>	<i>Bax</i>	<i>Bcl-2</i>
Wellenlänge (Wavelength) [nm]	488	488	488
Lochblende (Pinhole)	91	91	91
Ausgleich (Offset)	- 0,142	- 0,142	- 0,172
Spannung (Detector Gain, Voltage) [Volt]	942	847	922
Anzahl der gemittelten Bilder (Average Mode)	8	2	4
Vergrößerung (Zoom)	1	1	
Abschwächungsfiter (Reduktion der Laserintensität auf 50 %)	Nein	Nein	Nein
Laserintensität	25 %	25 %	25 %
Intensitätsregelung der Laserleistung (Transmission)	100 %	100 %	100 %
Erweiterungsfaktor (Amplification Gain)	1,0 – 3,0	1,0 – 3,0	1,0 – 3,0

Tabelle 3: Die Tabelle gibt die Einstellung der Parameter wieder, mit deren Hilfe die Intensität der Proteinexpression gemessen wurde.

Die Einstellungen wurden für die Messung jedes Proteins so gewählt, dass das Verhältnis zwischen spezifischem Signal und unspezifischem Hintergrund optimal war, d.h., dass ein starkes spezifisches Signal bei schwacher Hintergrundintensität erzielt wurde.

Mit entsprechenden Einstellen wurden auch die Positiv- und die Negativkontrollen dokumentiert.

Mit einer speziellen Software (KS 400, Fa. Zeiss) wurden die Aufnahmen ausgewertet. Die Stärke der Signalintensität der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Expression der untersuchten apoptoseassoziierten Proteine. Mit Hilfe dieses Computerprogramms wurde eine Maske erstellt, die die Fläche über den spezifischen Signalen (detektiertes Protein in den Neuronen der CA1-, der CA3- Region und des unteren Astes des Gyrus dentatus) abdeckt. Die

mittlere Intensität des spezifischen Fluoreszenzsignals der Zellen wird bezogen auf die Fläche bestimmt. Der Wert für die Intensität des unspezifisch gefärbten Hintergrundes wird vom Wert der Intensität der spezifischen Färbung subtrahiert. Da man zwei Gehirnschnitte pro apoptoseassoziierten Protein (Bax, Bcl-2 und p53) ausgewertet und jeweils zwei Aufnahmen in den o.g. Regionen anfertigte, ergab sich aus diesen vier Werten ein Mittelwert der Intensität der Fluoreszenzfärbung pro Fläche.

3.6.6 Westernblotanalyse

3.6.6.1 Probengewinnung für die Westernblotanalyse

Das gewonnene Gehirngewebe (vgl. 3.6.4) wurde für die Westernblotanalyse standardisiert aufbereitet. Dazu wurde das Gewebe homogenisiert. In die Eppendorfgefäße, in denen das Gewebe gelagert war, wurden je 300 µl Lysispuffer pipettiert. Der Lysispuffer wurde mit

- 0.5 % Triton[®] X-100 (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)
- 20 mM Tris - HCL pH 8,0 / 7,4 (Fa. Sigma-Aldrich)
- 137 mM NaCl (Natriumchlorid, Fa. Fluka)
- 2 mM EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure, Fa. Merck)
- 1 mM PMSF (in Ethanol vorlösen) (Phenylmethylsulfonylfluorid, Fa. Sigma-Aldrich)
- 0,15 U/ml Aprotinin (10µl/100ml) (Fa. Sigma-Aldrich)

hergestellt.

Das Gewebe wurde in diesem Puffer bei 100 Watt für 15 Sekunden sonifiziert (Sonifier Labsonic 2000, Fa. Braun, Melsungen, Deutschland). Bei 4 °C wurde das Lysat 10 Minuten lang mit 13 000 U/min. in einer Ultrazentrifuge (Biofuge Fresco, Heraeus, Osterode, Deutschland) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit PBS (vgl.3.6.5.2) im Verhältnis 2 : 1 verdünnt, zwei Teile PBS (500µl), ein Teil Überstand (250µl).

Zur quantitativen Auswertung des Westernblots mussten die Proteinkonzentrationen in allen Proben angeglichen werden. Der Proteingehalt jeder Probe wurde über eine Proteinkonzentrationsstandardkurve ermittelt.

Mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe aus bovinem Albumin (BSA, bovines Albumin, Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) wurde eine Standardkurve erstellt.

Proteinstandardkurve

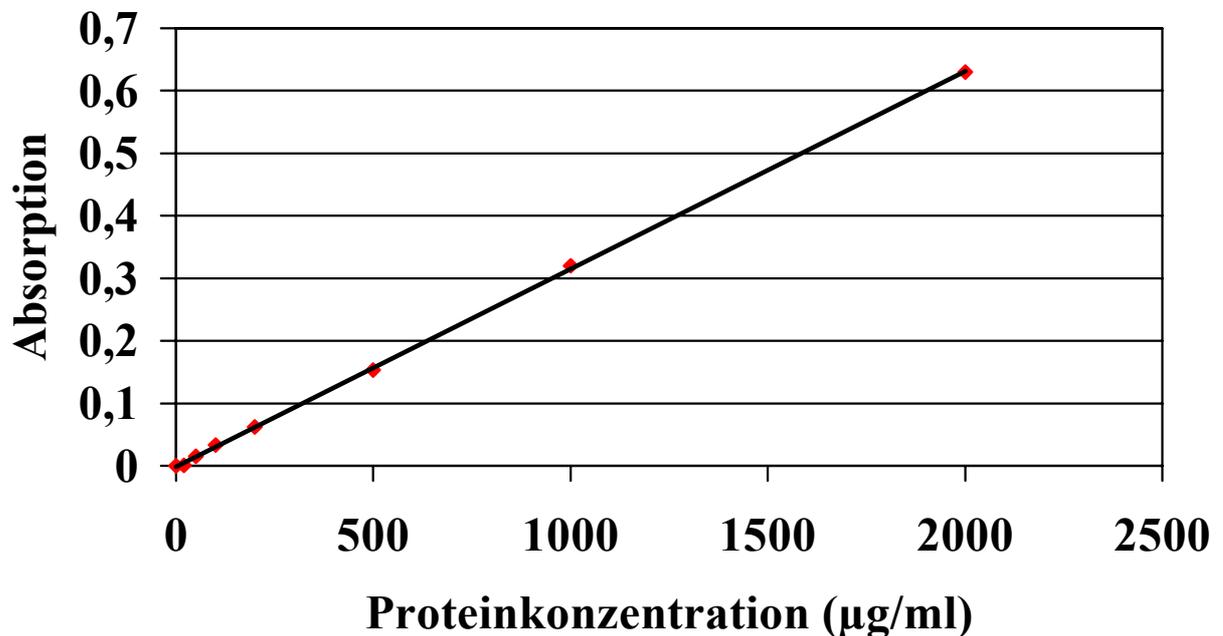


Abbildung 10: Proteinstandardkurve zur Ermittlung der Proteinkonzentration in jeder Probe mittels Bradfordanalyse

Auf der x-Achse wurde die Proteinkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ aufgetragen, auf der y-Achse die Absorption.

Aus jeder Verdünnungsstufe wurden je $5\ \mu\text{l}$ mit $1000\ \mu\text{l}$ Bradfordreagenz verdünnt und deren Absorption bei $595\ \text{nm}$ (vgl. 3.6.5.2) gemessen.

Mit Hilfe der Standardkurve berechnete die Software des Photometers (s.u.) die Proteinkonzentration der doppeltbestimmten Proben (vgl. 3.6.6.2). Durch die Verdünnung der Proben mit PBS im Verhältnis $1 : 2$ war gewährleistet, dass die Absorption des Lysats im linearen Messbereich des Bradfordreagenz lag. Dieser liegt bei Absorptionskoeffizienten zwischen $0,16$ und $0,30$. Die Proteinkonzentrationen wurden innerhalb der Proben angeglichen. Die Exaktheit des Proteinkonzentrationsangleichs wurde durch eine erneute Messung der Proben im Photometer verifiziert, Abweichungen von 10% wurden akzeptiert.

Nach erfolgtem und kontrolliertem Proteinkonzentrationsangleich wurden die Proben mit reduzierendem SDS-Probenpuffer im Verhältnis $1 : 3$, ein Teil Probe und drei Teile SDS-

Probenpuffer, vermischt und im Schüttelinkubator (Thermomixer compact, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert.

Der reduzierende Probenpuffer für die SDS–Polyacrylamidgelelektrophorese enthält:

- 0.2 M Tris – HCl pH 6.8 (Fa. Sigma-Aldrich)
- 6 % SDS (Natriumdodecylsulfat) (Fa. Sigma-Aldrich)
- 20 % Glycerol (Fa. Sigma-Aldrich)
- 10 % DTT (1,4 Dithiothreitol (Fa. Bts)
- 0.1 mg/ml Bromphenolblau (Fa. Sigma-Aldrich)
- 0.1 mg/ml Orange G (Fa. Sigma-Aldrich)

Er wurde aliquotiert bei -20 °C lagert.

Um die verschiedenen Westernblotanalysen miteinander vergleichen zu können, wurde bei jeder Analyse eine selbst hergestellte Referenzprobe als Standard mitgeführt. Dieser wurde durch Aufbereitung eines Rattenhirnes eines Tieres der Gruppe 1 (Fentanyl-/Lachgasnarkose) gewonnen.

3.6.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Grundprinzip der Proteinbestimmung nach Bradford ist die Bindung von Protein an Coomassie Brilliant Blue G250. Dadurch wird sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschoben [7](S.249-250).

Allerdings ist diese Methode nicht bei Anwesenheit von Detergenzien anwendbar und die Sensitivität variiert je nach Protein. 1 ml Bradfordreagenz (Mischverhältnis 1:4, bestehend aus vier Teilen bidestilliertem Wasser und aus einem Teil der Biorad-Stammlösung, Bradford-Reagenz, Fa. Biorad, München, Deutschland) wurde in einer Küvette (Einmalküvette PS, Plastibrand[®], Fa. Brand, Wertheim, Deutschland) mit 5µl der Probe gemischt und die Extinktion im Photometer (Spektrophotometer, DU[®] 640, Fa. Beckmann-Coulter, Oberschleißheim, Deutschland) innerhalb einer Stunde bei 595 nm gemessen.

3.6.5.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach den Verfahren von Lämmli [68](S.681) durchgeführt. Die Gelelektrophoresen werden dabei auf Vertikalgelen in Elektrophoresekammern (Pharmacia Biotech, San Francisco, USA) 12 cm x 14 cm durchgeführt. Das verwendete Gelelektrophorese-system stellt ein diskontinuierliches Gelsystem dar. In einem niedrig prozentigen (5%ig) Sammelgel werden die Proteine konzentriert, um im folgenden Trenngel entsprechen ihrer Größe und ihres Molekulargewichtes aufgetrennt zu werden. Die Zusammensetzung des

Trenngels wurde dabei der Größe des zu untersuchenden Proteins (Bax, Bcl-2 15%ige Gele, p53 10%iges Gel, Mdm-2 7%iges Gel) angepasst.

Trenngele (TG)	7,0%	10%	15%
AA/Bis	7,0 ml	10,0 ml	15,0 ml
4xTG-Puffer	10,0 ml	10,0 ml	10,0 ml
ddH ₂ O	23,0 ml	20,0 ml	15,0 ml
Vol _{ges}	40,0 ml	40,0 ml	40,0 ml

Sammelgel (SG)	5,0%
AA/Bis	5,0 ml
4xSG-Puffer	5,0 ml
ddH ₂ O	10,0 ml
Vol _{ges}	20,0 ml

Tabelle 4: Zusammensetzung des Trenn- und des Sammelgels

AA/Bis	:	Acrylamid und N,N'- Methylbisacrylamid (Rotiphorese Gel 40, Fa. Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland)
4x TG-Puffer	:	vierfacher Trenngelpuffer
4x-Sammelgelpuffer (SG-Puffer)	:	vierfacher Sammelgelpuffer
ddH ₂ O	:	doppelt destilliertes Wasser
Vol _{ges}	:	Gesamtvolumen

Zur Herstellung des vierfachen Trenngelpuffer wurden benötigt:

- 1.5 M Tris – HCl ph 8.80 (Fa. Sigma-Aldrich)
- 0.4 % SDS (Natriumdodecylsulfat)
- 0.01% NaN₃.

Der vierfache Sammelgelpuffer wurde hergestellt mit

- 0.5 M Tris – HCl ph 6.80 (Fa. Sigma-Aldrich)
- 0.4 % SDS (Natriumdodecylsulfat)
- 0.1% NaN₃.

Zum Polymerisieren der Gele wurde Ammonium-Persulfat (Fa. Sigma-Aldrich) und TEMED (N,N, N', N' Tetramethylenethylendiamin, Fa. Sigma-Aldrich) hinzugeben.

Butylalkohol (Fa. Sigma-Aldrich), ca. 1000 μ l, wurde zum Glätten auf die Geloberfläche des Trenngels pipettiert, der abgegossen wurde bevor das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert wurde. In das Sammelgel wurde ein 1,5 mm dicker Elektrophoresekamm (Fa. Hoefer, San Francisco, USA) mit 15 Zähnen steckt, so dass 15 Geltaschen entstanden. Jede Tasche wurde mit 20 μ g Protein beladen. Das Einlaufen der Proben unter Verwendung des SDS-Laufpuffers erfolgt bei den Lämmli-Gelen bei einer Stromstärke von 20 mA für 15 min;

Der Laufpuffer für die SDS-PAGE enthielt

- 30,28 g Tris (Fa. Sigma-Aldrich)
- 144 g Glycin (Fa. Merck)
- 10 g SDS (Natriumdodecylsulfat)
- 0,1 g NaN_3

ad 1000 ml mit Aqua bidestillata.

Danach wird die Stromstärke auf 40 mA erhöht und die Spannung auf maximal 200 V (Elektrophorese Power-supply, EPS-301, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) begrenzt. Eine Erwärmung der Gele und damit unscharfe Detektionsbanden werden durch Wasserkühlung verhindert. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurden käufliche Größenstandards verwendet (Rainbow-Marker RPN 756, Fa. Amersham Life Science, Piscataway, USA).

Die Befüllung der Gele mit Proben erfolgte 24 Stunden nach dem Gießen der Gele. Bei kühler und feuchter Lagerung konnte die Gelsubstanz vollständig auspolymerisieren und so die Gefahr verschwommener Banden minimiert werden [107](S.175).

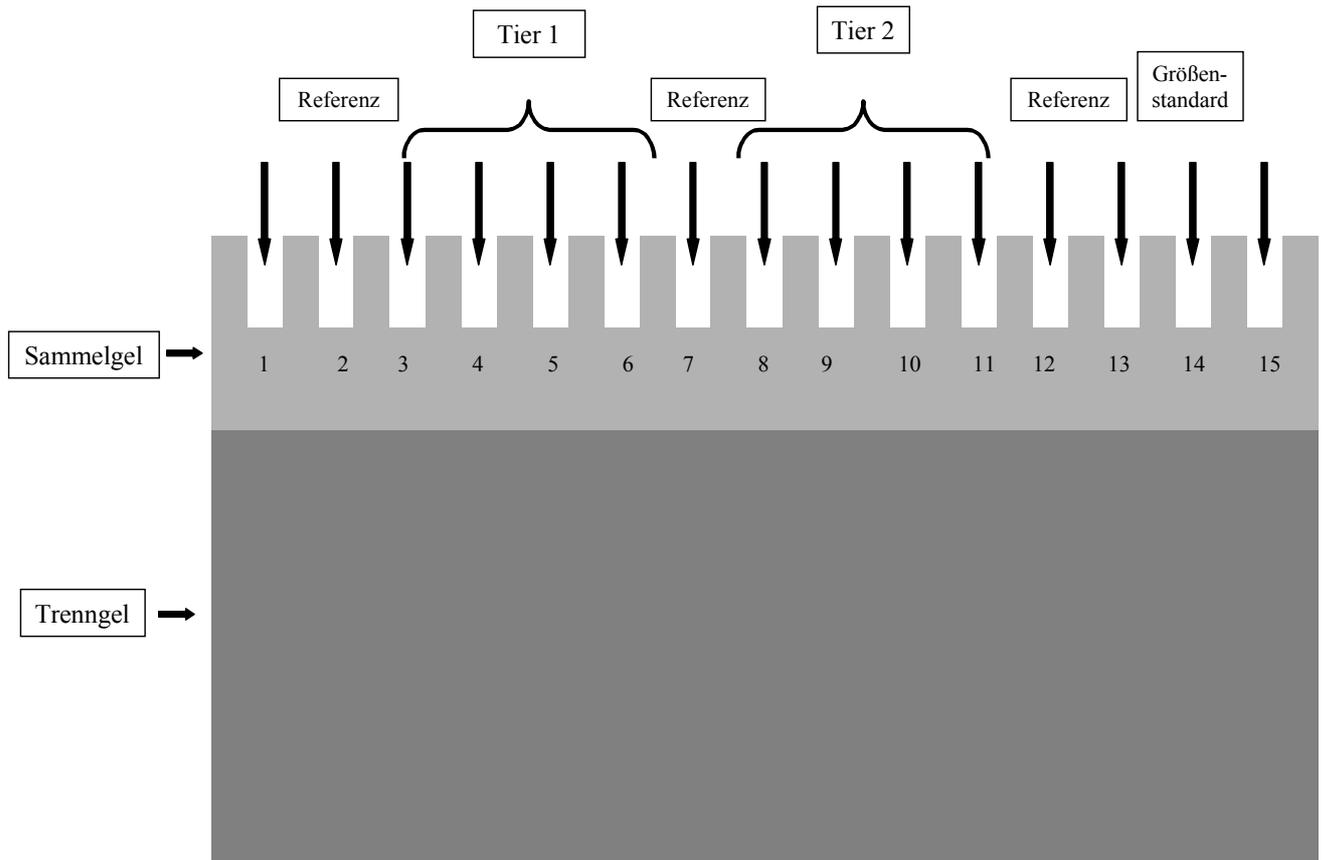


Abbildung 11: Schematisierte Darstellung einer Gelplatte für die Westernblotanalyse. Die hellgrau dargestellte Gelphase (Sammelgel) bestand aus 5%igem Polyacrylamidgel, in die 15 Gelaussparungen (Geltaschen) wurden die Proben pipettiert. In der dunkelgrauen Gelphase (Trenngel) wurden die Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße separiert. Für den Nachweis der jeweiligen Proteine wurden dabei unterschiedliche Gelkonzentrationen verwendet (vgl. Text). Die Taschen 1, 13, und 15 wurden mit einem Platzhalter bestehend aus SDS-Probenpuffer, die Taschen 2, 7 und 12 wurden mit der Referenzprobe, die Taschen 3-6 bzw. 8-11 wurden mit Proben aus dem Hippokampus von zwei Versuchstieren befüllt. In der 14. Tasche wurde der Größenstandard mitgeführt.

3.6.6.4 Elektrotransfer von Proteinen

Der Transfer der geelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon[®]-P Transfer Membran, Millepore, Bedford, USA) wurde nach dem diskontinuierlichen Semi-dry-Verfahren mit der Blotkammer (Fa. Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Durch den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran wurden sie von der löslichen Phase in die unlösliche überführt.

Der Transfer erfolgte unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems bei 0,95 mA/cm² für 2 h. Das Whatman[®]-3MM-Filterpapier (Fa. Whatman, Meldstone, England) war anodenwärts mit Anodenpuffer I und Anodenpuffer II getränkt, darauf wurde die PVDF-Membran mit dem Gel geschichtet, das mit kathodenpuffergetränktem Whatman-Filterpapier bedeckt war.

Der schematische Aufbau des Semi-dry-blot sah wie folgt aus:

Anode (+)

4 Whatmann-3MM-Filterpapiere, getränkt in Anodenpuffer I

2 Whatmann 3MM-Filterpapiere, getränkt in Anodenpuffer II

PVDF-Membran getränkt in 100 % Ethanol

Polyacrylamidgel

6 Whatmann-3MM-Filterpapiere, getränkt in Kathodenpuffer

Kathode (-)

Der Anodenpuffer I wurde hergestellt mit

- 300 mM Tris (Fa. Sigma-Aldrich)
- 20 % (v/v) Ethanol (vor Gebrauch entgasen) (Fa. Merck).

Der Anodenpuffer II enthielt

- 25 mM Tris (Fa. Sigma-Aldrich)
- 20 % (v/v) Ethanol (vor Gebrauch entgasen) (Fa. Merck).

Der Kathodenpuffer wurde hergestellt mit

- 40 mM ε-Amino-n-Caprinsäure (Fa. Sigma-Aldrich)
- 20 % Ethanol (vor Gebrauch entgasen) (Fa. Merck).

Beim Schichten der getränkten Filterpapiere, des Gels und der PVDF-Membran wurde daraufgeachtet, dass keine Luftblasen in und zwischen den einzelnen Lagen waren. Diese Maßnahme verhindert, dass an Stellen eventueller Lufteinschlüsse Proteine nicht transferiert werden.

Der Nachweis der Proteine auf der Membran und damit der Nachweis des Transfers erfolgte durch Coomassie Brilliant Blue (Coomassie Brilliant Blue R-250, Fa. Fluka). Die Coomassie-Färbelösung setzte sich zusammen aus

- 0.8 g Coomassie Brilliant Blue R250
- 200 ml Ethanol (Fa. Merck)
- 200 ml ddH₂O (doppelt destilliertes Wasser)

- 40 ml Eisessig (Fa. Fluka).

3.6.6.5 Westernblotanalyse

Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran für mindestens 30 min. in der Pufferlösung PBST (vgl. 3.6.4.3) gewaschen. Für weitere 60 min. wurde die Membran in ein Blockierserum gelegt, das aus PBST mit entweder 10% Milchpulveranteil (0,1% Fett Naturaflo®r®, Fa. Töpfer, Dietmannsried, Deutschland) oder mit 10% Anteil an fetalem Kälberserum (FKS) bestand. Beide Proteinlösungen dienten der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Die Membranen wurden mit dem Medium blockiert, in dem auch später der erste Antikörper angesetzt wurde.

Anschließend wurde mit dem ersten Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper Mdm-2 (polyklonales Kaninchen IgG (C-18) sc-812, Fa. Santa Cruz Biotechnology) und Bcl-2 (monoklonales Mause IgG (C - 2) sc-7382, Fa. Santa Cruz Biotechnology) wurden mit 10%iger Milchpulverlösung, p53 (polyklonales Kaninchen IgG (Do-1) sc-126, Fa. Santa Cruz Biotechnology) und Bax (polyklonales Kaninchen IgG (P-19) sc-526, Fa. Santa Cruz Biotechnology) mit 10%iger fetaler Kälberserumlösung (FKS) je 1 : 200 verdünnt (ein Teil Antikörper, 200 Teile 10%ige Proteinlösung). Nach der Inkubation wurden nicht gebundene Antikörper durch siebenmaliges Waschen mit reiner PBST-Lösung beseitigt. Der peroxidase markierte Sekundärantikörper (Esel Anti-Mause-Antikörper IgG, Best. NA 931, Esel Anti-Kaninchen-Antikörper IgG, Best. NA 934, Fa. Amersham-Pharmazia) wurde mit 10%iger Milchpulverlösung bzw. 10%iger fetaler Kälberserumlösung 1 : 2000 verdünnt und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut siebenmal mit der Pufferlösung PBST gewaschen.

Westernblot

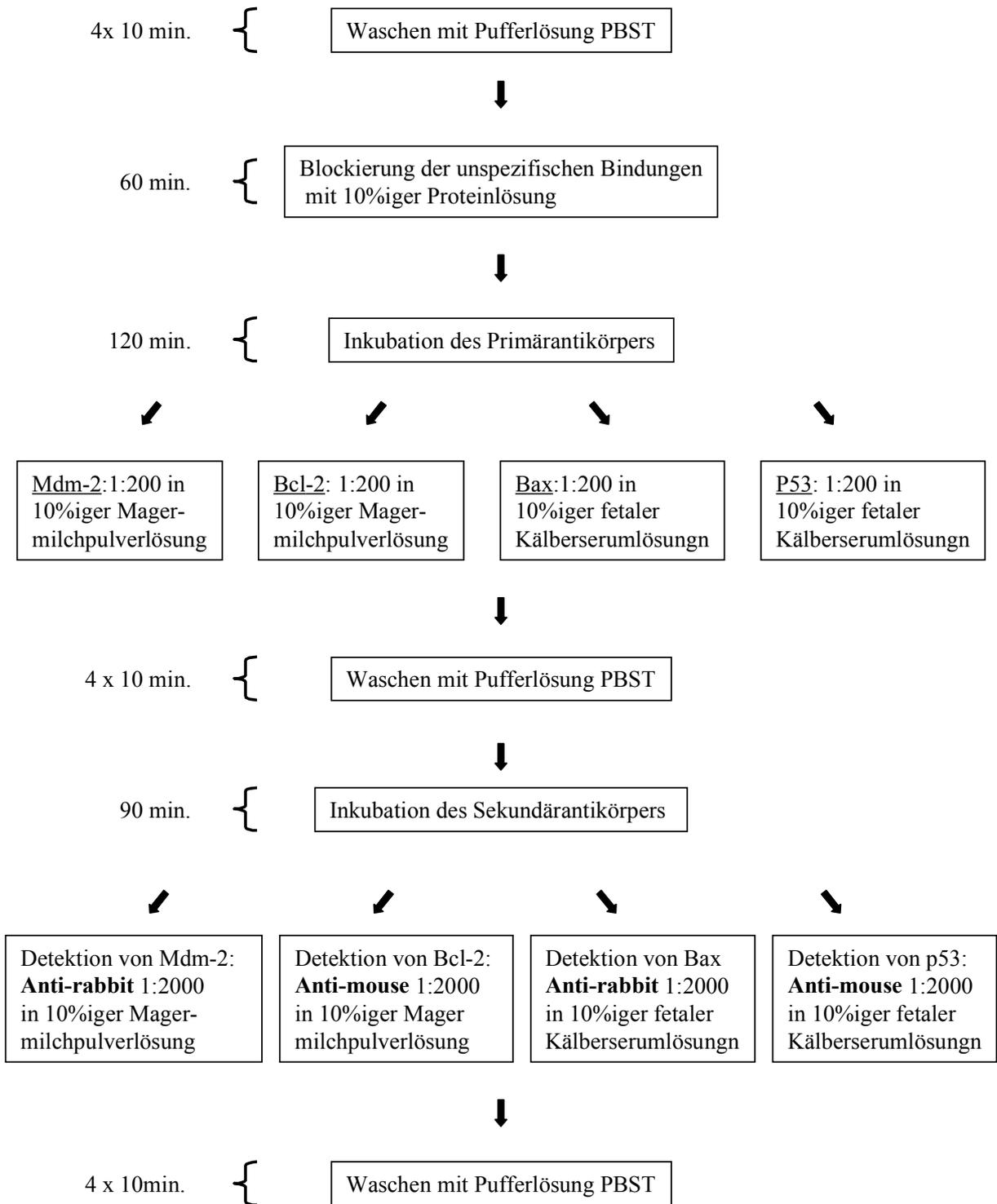


Abbildung 12: Protokoll der Westernblotanalyse. Die Abbildung zeigt den chronologischen Verlauf und die Dauer der einzelnen Inkubations- und Waschschrte des Westernblots.

3.6.6.6 Auswertung der Westernblotanalyse

Die immundetektierten apoptoseassoziierten Proteine wurden mit einem lumineszierenden Farbstoff (ECL[®] Western Blotting Detection Reagents, Fa. Amersham Life Science, San Francisco, USA), dessen Intensität mit einem Spezialfilm (Hyperfilm ECL[®] Fa. Amersham Life Science) dokumentiert wurde, sichtbar gemacht.

Nach dem Westernblot wurde die PVDF-Membran für eine Minute mit dem o.g. Detektionsmedium ECL inkubiert. In dieser Zeit setzt die Peroxidase, die an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, aus dem zugegebenen Substrat einen lumineszierenden Farbstoff frei. Die Lumineszenz wird mit den Spezialfilmen sichtbar gemacht. In Filmkassetten (Fa. Amersham Life Science) wurden die Filme zwischen 10 Sekunden und 90 Minuten belichtet und anschließend in der Entwicklungsmaschine (Fa. Zeiss) entwickelt.

Die Filme wurden zur digitalen Auswertung eingescannt und mit der Software Sigma Scan (Fa. Jandel, San Rafael, USA) analysiert. Die entwickelten Filme zeigten für jede aufgetragene Probe eine schwarze Bande. Die Intensität der Schwärzung der Bande ist direkt proportional der detektierten Proteinmenge. Die Intensität der Bande wurde mit der Software bestimmt, indem eine Maske über die geschwärzte Fläche gelegt wurde und die mittlere Intensität der Bande mit der gemessenen Fläche multipliziert wurde. Von diesem Wert wurde die unspezifische Intensität des Hintergrundes subtrahiert. Ein Vergleich der einzelnen Westernblotfilme war durch das konstante Mitführen eines für alle Westernblots gleichen Standards als Referenz (s.o.) möglich. Man bestimmte für jede Bande die prozentuale Abweichung vom Standard und konnte so die Ergebnisse der einzelnen Banden der verschiedenen Filme miteinander in Beziehung setzen und vergleichen.

3.7 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden 36 Versuchstiere (jede Gruppe n = 9 Tiere) eingeschlossen. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Statistik-Programm StatView (SAS V6.12, SAS Institute, Cary, NC, USA) durchgeführt.

Zunächst wurden die Daten auf Normalverteilung überprüft. Die statistische Analyse der Immunfluoreszenz- und Westernblotdaten erfolgte mittels Zweifache-ANOVA (Vergleiche zwischen den Untersuchungsgruppen und innerhalb der Gruppen zwischen den Hemisphären der Rattenhirne). Posthoc wurde nach Scheffé getestet. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05/2 = 0,025$ festgelegt, da die Kontroll- und die Scheinversuchsgruppe sowohl mit der Propofolgruppe, als auch mit Sevoflurangruppe verglichen wurden. Die physiologischen Parameter wurden mit einer faktoriellen ANOVA auf Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen getestet. Die Scheinversuchsgruppe wurde in diese Testung nicht mit einbezogen.

Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05/2 = 0,025$ festgelegt. Ergaben sich zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede wurden diese mittels Fischer-PLSD-Test für die einzelnen Messzeitpunkte getrennt getestet (Signifikanzniveau: $p < 0,05$).

Die Konzentration der apoptoseassoziierten Proteine wurden auf signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe, der Sevoflurangruppe und der Scheinversuchgruppe und zwischen der Kontrollgruppe, der Propofolgruppe und der Scheinversuchgruppe getestet. Die physiologischen Parameter wurden zwischen Kontrollgruppe und Sevoflurangruppe und zwischen Kontrollgruppe und Propofolgruppe auf signifikante Unterschiede zu den einzelnen Messzeitpunkte getestet.

In den folgenden Graphiken und Tabellen sind die Parameter als Mittelwert und Standardabweichung ($MW \pm SD$) dargestellt. Als Signifikanzzeichen wurde folgendes Symbol verwendet:

* = signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe

4 ERGEBNISSE

4.1 Systemische Variablen

Hinsichtlich des mittleren arteriellen Druckes (MAP) bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Sevoflurangruppe und der Kontrollgruppe (Fentanyl/N₂O). Die Messwerte des MAP waren in der Propofolgruppe zu allen Messzeitpunkten signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe. Zu den Messzeitpunkten „15' Ischämie“ und „30' Ischämie“ war der MAP protokollgemäß (vgl. 3.4) in der Sevofluran- Propofol- und der Kontrollgruppe gegenüber der „Ausgangsmessung“, „15' Retransfusion“ und „75' Reperfusion“ auf 35 mmHg erniedrigt (vgl. Tabelle 5 und Abbildung 13). Das Blutvolumen, welches den Tieren aller Gruppen entzogen werden musste, um den MAP auf 35 mmHg zu senken, betrug 8–12 ml.

Die Herzfrequenz (HF) war in der Kontrollgruppe zu allen Messzeitpunkten signifikant höher als in der Sevofluran- und Propofolgruppe (vgl. Tabelle 5 und Abbildung 14). Innerhalb der Scheinversuchsgruppe wurden die Messwerte von MAP und HF nicht auf Signifikanz überprüft, jedoch war der MAP zu allen Messzeitpunkten tendenziell höher als in der Sevofluran- und in der Propofolgruppe. Entsprechend dem Versuchsprotokoll wurden in der Scheinversuchsgruppe zu den Messzeitpunkten „15' Ischämie“ und „30' Ischämie“ keine Hypotension induziert. Die Herzfrequenz war in der Scheinversuchsgruppe gegenüber der Propofolgruppe tendenziell höher, gegenüber der Kontrollgruppe niedriger und verglichen mit der Sevoflurangruppe etwa gleich (vgl. Tabelle 5 und Abbildung 14).

<i>Parameter</i>	<i>Gruppe</i>	<i>Ausgangs- messung</i>	<i>15' Ischä- mie</i>	<i>30' Ischä- mie</i>	<i>15' Retrans- fusion</i>	<i>75' Reper- fusion</i>
MAP [mmHg]	Kontrolle	118 ± 8 *	33 ± 2 *	33 ± 2 *	126 ± 22 *	95 ± 18 *
	Sevofluran	92 ± 15	30 ± 1	31 ± 2	119 ± 14	81 ± 14
	Propofol	84 ± 16 *	30 ± 0 *	30 ± 0 *	83 ± 15 *	66 ± 11 *
	Scheingr.	123 ± 11	124 ± 11	124 ± 12	126 ± 11	124 ± 11
HF [min. ⁻¹]	Kontrolle	349 ± 47	423 ± 20	411 ± 29	392 ± 41	399 ± 14
	Sevofluran	303 ± 25 *	322 ± 45 *	333 ± 51 *	343 ± 38 *	351 ± 38 *
	Propofol	284 ± 29 *	284 ± 19 *	291 ± 24 *	296 ± 19 *	307 ± 29 *
	Scheingr.	330 ± 34	333 ± 24	331 ± 45	334 ± 43	352 ± 38

Tabelle 5: Parameter der Hämodynamik. Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) und Herzfrequenz (HF). Die Scheinversuchgruppe wurde nicht auf Signifikanz untersucht.

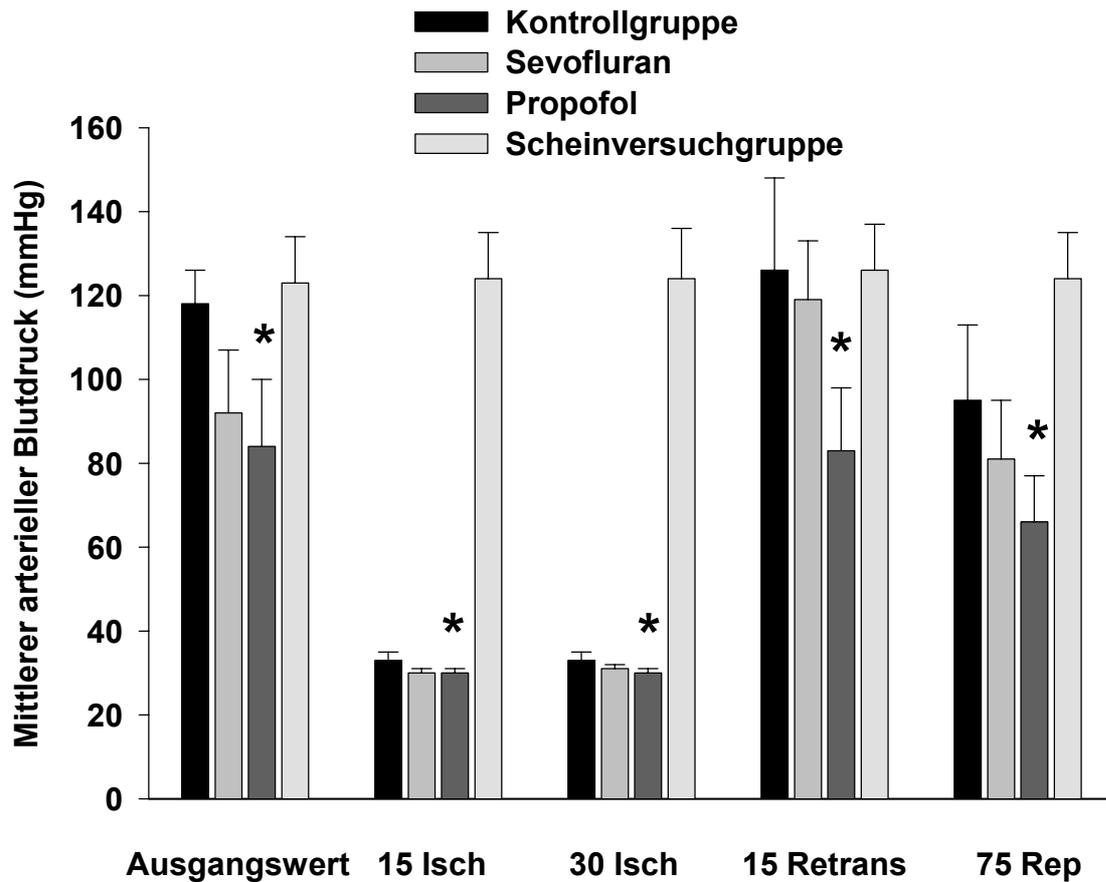


Abbildung 13: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP). Das Balkendiagramm veranschaulicht den protokollgemäßen Abfall des MAP in allen Gruppen außer in der Scheinversuchsgruppe. Zu allen Messzeitpunkten ist der MAP in der Propofolgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt.

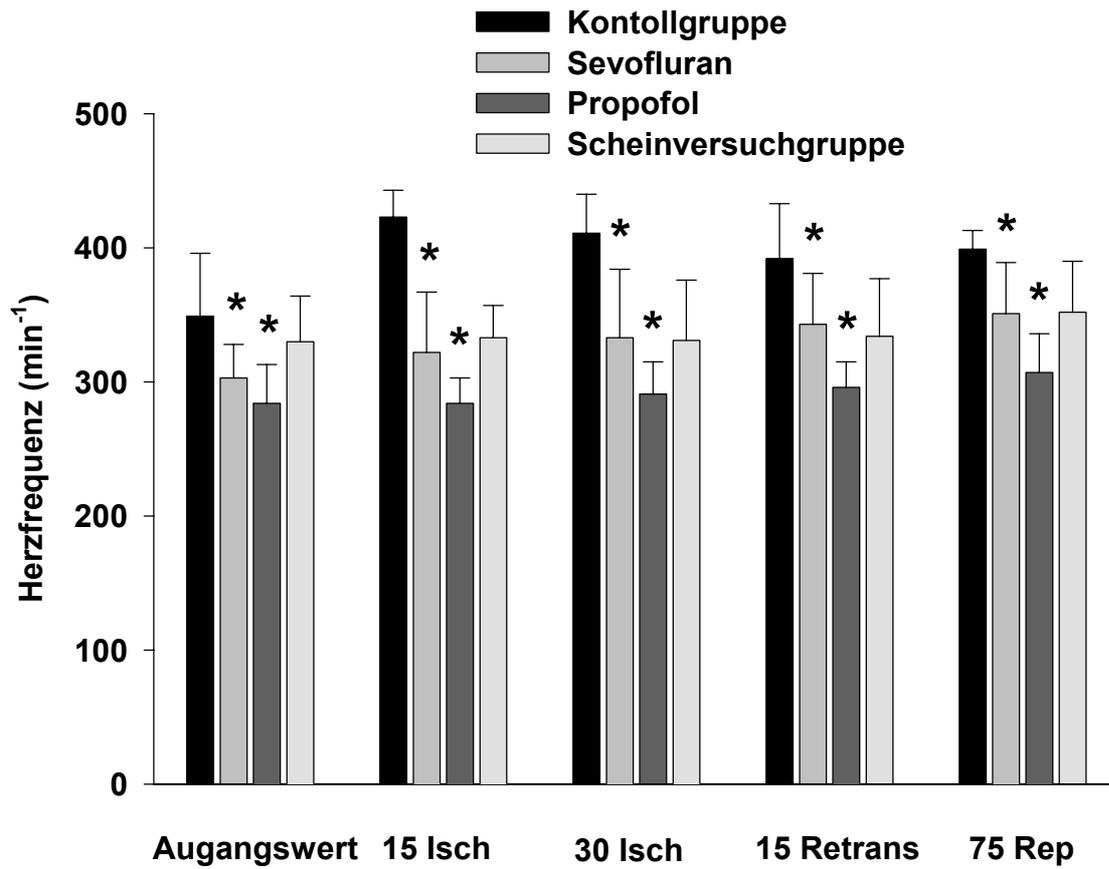


Abbildung 14: Herzfrequenz. Aus dem Balkendiagramm ist eine signifikant erniedrigte Herzfrequenz in der Sevofluran- und Propofolgruppe zu allen Messzeitpunkten verglichen mit der Kontrollgruppe erkennbar.

Der Sauerstoff- und der Kohlendioxidpartialdruck (paO_2 und paCO_2) im arteriellen Blut waren zu keinem Messzeitpunkt zwischen den Gruppen signifikant unterschiedlich, die gemessenen Werte lagen zu jedem Zeitpunkt innerhalb physiologischer Grenzen. Der pH-Wert wurde in jeder Gruppe während des gesamten Versuches stabil gehalten (vgl. Tabelle 6).

Dem Protokoll entsprechend war die Hämoglobinkonzentration im Blut zu den Messzeitpunkten „15' Ischämie“ und „30' Ischämie“ in allen Gruppen erniedrigt. Nach Retransfusion des entnommenen Blutes wurde in allen Gruppen der Ausgangswert annähernd wieder erreicht. Gemäß Protokoll wurde in der Scheinversuchsgruppe zu den Messzeitpunkten „15' Ischämie“ und „30' Ischämie“ kein Abfall der Hämoglobinkonzentration gemessen (vgl. Tabelle 6 und Abbildung 15).

Die Glukosekonzentration war in der Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten „15' Ischämie“, „30' Ischämie“ und „15' Retransfusion“ niedriger als zu den Messzeitpunkten „Ausgangsmessung“ und „75' Reperfusion“, es zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied. In der Propofol-, Sevofluran- und Scheinversuchsgruppe waren diese Unterschiede nicht zu beobachten (vgl. Tabelle 6 und Abbildung 16). Die periphere Temperatur war in allen Gruppen zu allen Messzeitpunkten konstant (vgl. Tabelle 6). Innerhalb der Gruppen wiesen die laborchemischen Parameter pH-Wert, Glukose- und Hämoglobinkonzentration, sowie die periphere Temperatur keine Signifikanz auf. Die genannten Parameter lagen zu allen Zeitpunkten innerhalb physiologischer Grenzen (vgl. Tabelle 6).

<i>Parameter</i>	<i>Gruppe</i>	<i>Ausgangsmessung</i>	<i>15' Ischämie</i>	<i>30' Ischämie</i>	<i>15' Retrusion</i>	<i>75' Reperfusion</i>
PaO₂ [mmHg]	Kontrolle	123 ± 23	133 ± 20	135 ± 16	138 ± 33	135 ± 35
	Sevofluran	139 ± 25	139 ± 27	145 ± 31	150 ± 40	120 ± 32
	Propofol	154 ± 29	152 ± 28	144 ± 24	134 ± 18	123 ± 15
	Scheingr.	121 ± 20	120 ± 20	108 ± 44	116 ± 17	115 ± 9
PaCO₂ [mmHg]	Kontrolle	41 ± 2	38 ± 3	37 ± 8	40 ± 6	39 ± 4
	Sevofluran	39 ± 4	38 ± 4	38 ± 8	37 ± 6	38 ± 6
	Propofol	40 ± 4	37 ± 2	43 ± 2	39 ± 6	40 ± 6
	Scheingr.	40 ± 4	38 ± 4	43 ± 3	40 ± 3	40 ± 2
pH	Kontrolle	7,36 ± 0,02	7,38 ± 0,04	7,38 ± 0,07	7,39 ± 0,07	7,45 ± 0,04
	Sevofluran	7,38 ± 0,02	7,41 ± 0,07	7,39 ± 0,10	7,40 ± 0,10	7,43 ± 0,04
	Propofol	7,39 ± 0,03	7,38 ± 0,06	7,35 ± 0,05	7,45 ± 0,03	7,44 ± 0,04
	Scheingr.	7,38 ± 0,02	7,37 ± 0,02	7,36 ± 0,02	7,36 ± 0,03	7,34 ± 0,02
Hb [g/dl]	Kontrolle	12,8 ± 1,2	9,1 ± 0,7	9,5 ± 1,5	12,0 ± 1,0	11,8 ± 1,1
	Sevofluran	12,6 ± 1,2	9,7 ± 0,9	9,2 ± 1,2	11,5 ± 2,4	11,7 ± 1,0
	Propofol	12,3 ± 1,3	9,7 ± 1,2	10,0 ± 0,9	10,9 ± 0,9	10,8 ± 1,1
	Scheingr.	13,2 ± 1,1	12,6 ± 0,8	12,6 ± 0,8	12,3 ± 1,1	11,8 ± 1,0
Gluc [mg/dl]	Kontrolle	61 ± 13	44 ± 2	42 ± 3	47 ± 9	76 ± 6
	Sevofluran	64 ± 8	57 ± 30	62 ± 11	65 ± 14	84 ± 21
	Propofol	52 ± 2	63 ± 16	46 ± 7	50 ± 7	53 ± 13
	Scheingr.	56 ± 6	56 ± 9	56 ± 7	63 ± 10	61 ± 11s
T_{peri} [°C]	Kontrolle	37,7 ± 0,2	37,4 ± 0,2	37,4 ± 0,3	37,8 ± 0,3	37,7 ± 0,2
	Sevofluran	37,6 ± 0,1	37,3 ± 0,1	37,3 ± 0,2	37,7 ± 0,2	37,6 ± 0,1
	Propofol	37,6 ± 0,2	37,4 ± 0,2	37,1 ± 0,7	37,7 ± 0,3	37,7 ± 0,1
	Scheingr.	37,5 ± 0,3	37,6 ± 0,1	37,3 ± 0,6	37,5 ± 0,2	37,8 ± 0,3

Tabelle 6: Laborchemische Parameter. Die Tabelle zeigt zu allen Messzeitpunkten Mittelwert und Standardabweichung des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (PaO₂), des arteriellen Kohlendioxidpartialdrucks (PaCO₂), des arteriellen pH-Werts (pH), der Hämoglobinkonzentration im arteriellen Blut (Hb), der Glukosekonzentration im arteriellen Blut (Gluc) und der peripheren Temperatur (T_{peri}) in allen Versuchsgruppen. Bis auf die Scheinversuchsgruppe wurden alle Versuchsgruppen auf Signifikanz untersucht.

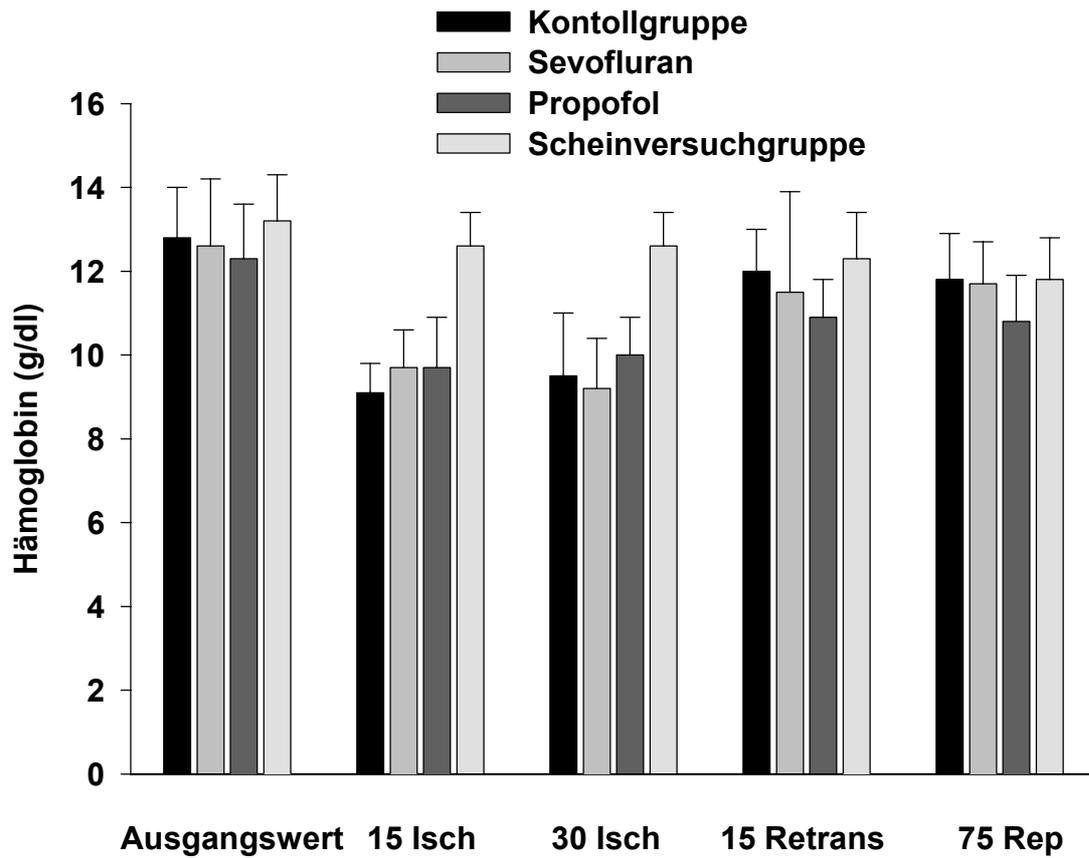


Abbildung 15: Hämoglobinkonzentration. Im Balkendiagramm ist zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied der Hämoglobinkonzentration zwischen den Versuchsgruppen zu sehen. Zu den Messzeitpunkten „15' Ischämie“ und 30' Ischämie“ wird der protokollgemäße Abfall der Hämoglobinkonzentration in der Kontroll-, Sevofluran- und Propofolgruppe deutlich.

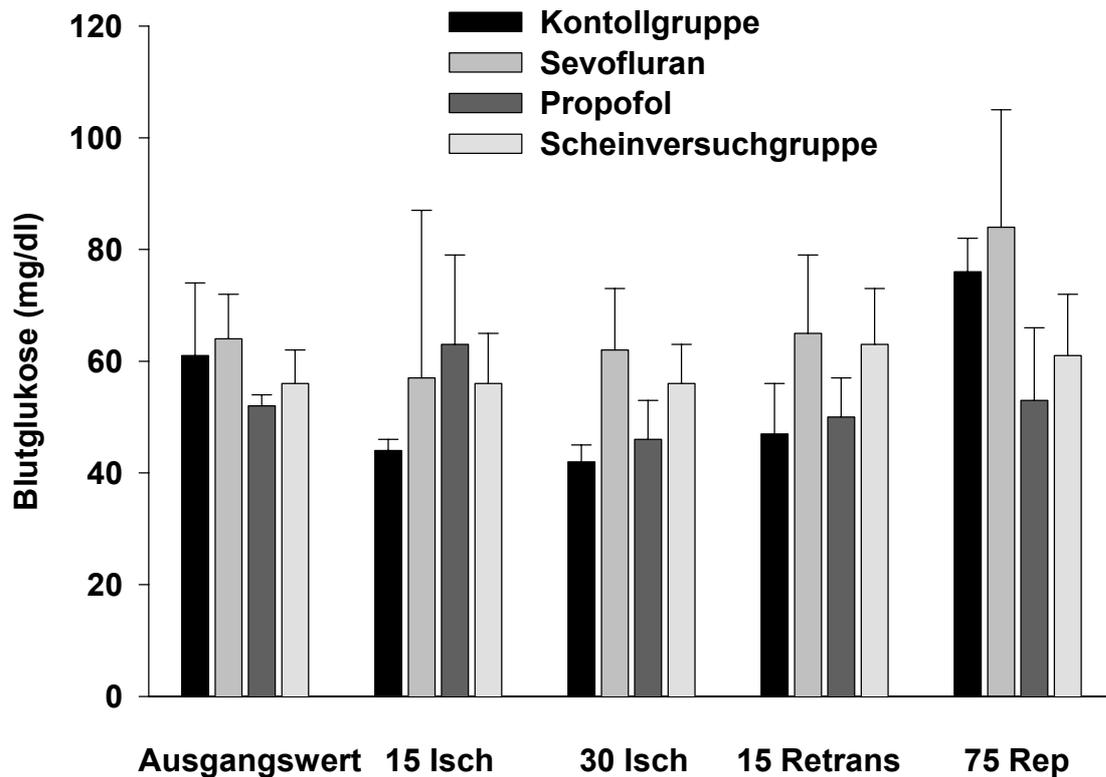


Abbildung 16: Blutglukosekonzentration. Die Abbildung verdeutlicht, dass keine signifikanten Unterschiede der Blutglukosekonzentration zwischen den Versuchsgruppen vorliegen.

4.2 Zerebraler Blutfluss

Der zerebrale Blutfluss (CBF) war in der Kontroll-, Sevofluran-, und Propofolgruppe im Vergleich zur „Ausgangsmessung“, zu den Messzeitpunkten „15' Ischämie“ und „30' Ischämie“ in der rechten Hemisphäre protokollgemäß auf ca. 30% des Ausgangswertes reduziert (vgl. Tabelle 7 und Abbildung 17). In der linken Hemisphäre wurde in der Kontroll- und Sevoflurangruppe zu den Messzeitpunkten „15' Ischämie“ und „30' Ischämie“ eine Reduktion auf etwa 50-60% gemessen (vgl. Tabelle 7 und Abbildung 18).

In der Propofolgruppe war der zerebrale Blutfluss zu den Messzeitpunkten „15' Ischämie“ und „30' Ischämie“ in der linken Hemisphäre signifikant größer als in der Kontrollgruppe. Zu den Messzeitpunkten „Ausgangsmessung“, „15' Retransfusion“ und „75' Reperfusion“ wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Propofol- und der Kontrollgruppe gemessen (vgl. Tabelle 7 und Abbildung 18). Ebenso wenig wurde hinsichtlich des zerebralen Blutflusses in beiden Hemisphären ein signifikanter Unterschied zwischen der Sevofluran- und der Kontrollgruppe beobachtet. In der Scheinversuchgruppe wurde in der rechten und linken

Hemisphäre zu allen Messzeitpunkten eine konstante zerebrale Durchblutung gemessen. Die Ergebnisse der Scheinversuchgruppe wurden nicht auf Signifikanz getestet.

<i>Parameter</i>	<i>Gruppe</i>	<i>Ausgangs-</i> <i>messung</i>	<i>15' Ischä-</i> <i>mie</i>	<i>30' Ischä-</i> <i>mie</i>	<i>15' Retrans-</i> <i>fusion</i>	<i>75' Reper-</i> <i>fusion</i>
CBF rechts [%]	Kontrolle	100 ± 0	32 ± 6	30 ± 2	116 ± 53	97 ± 47
	Sevofluran	100 ± 0	39 ± 5	36 ± 5	97 ± 67	98 ± 29
	Propofol	100 ± 0	45 ± 8	37 ± 10	189 ± 83	102 ± 20
	Scheingr.	100 ± 0	99 ± 7	98 ± 8	96 ± 7	92 ± 11
CBF links [%]	Kontrolle	100 ± 0	54 ± 9	54 ± 10	99 ± 37	81 ± 22
	Sevofluran	100 ± 0	65 ± 15	62 ± 18	100 ± 44	111 ± 25
	Propofol	100 ± 0	78 ± 19 *	77 ± 18 *	97 ± 28	101 ± 30
	Scheingr.	100 ± 0	104 ± 10	104 ± 12	103 ± 12	103 ± 24

Tabelle 7: Messung der zerebralen Perfusion. Zerebraler Blutfluss der linken Hemisphäre (CBF links) und zerebraler Blutfluss in der rechten Hemisphäre (CBF rechts). Die Scheinversuchgruppe wurde nicht auf Signifikanz untersucht.

Ischämische Hemisphäre

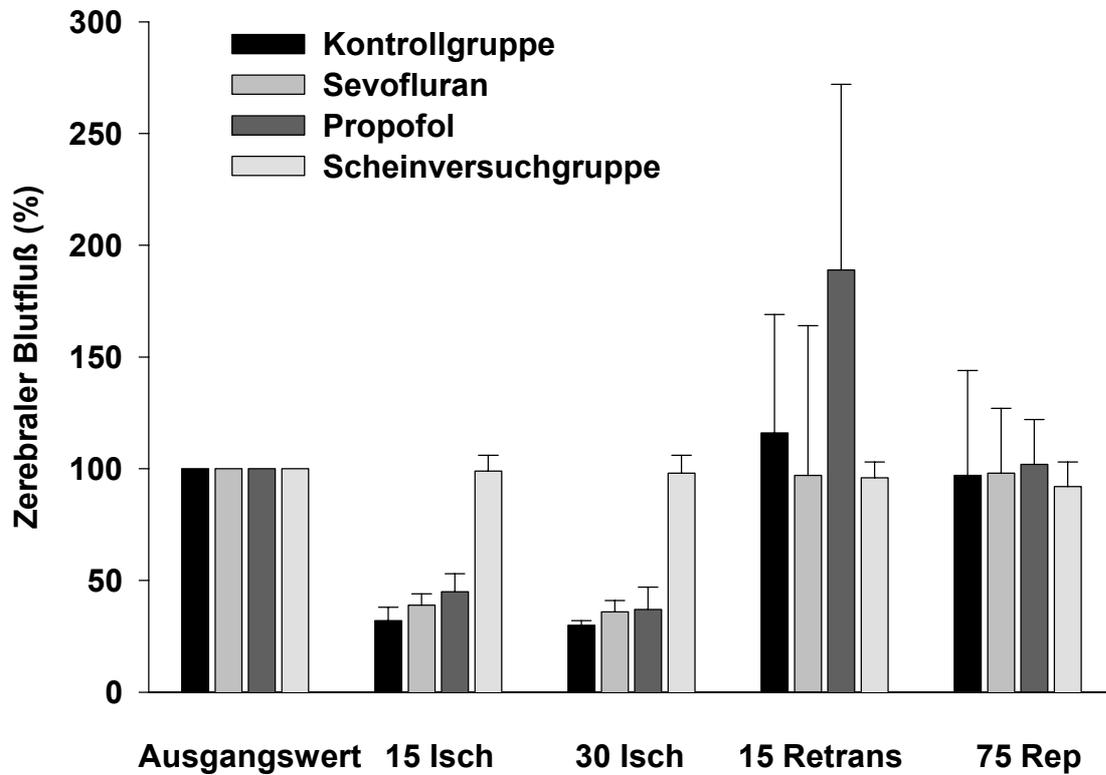


Abbildung 17: Die Graphik zeigt den protokollgemäßen Abfall der zerebralen Durchblutung in der rechten ischämischen Hemisphäre zu den Messzeitpunkten „15‘ und 30‘ Ischämie“ in den Versuchsgruppen. Zu keinem Messzeitpunkt bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Nicht-Ischämische Hemisphäre

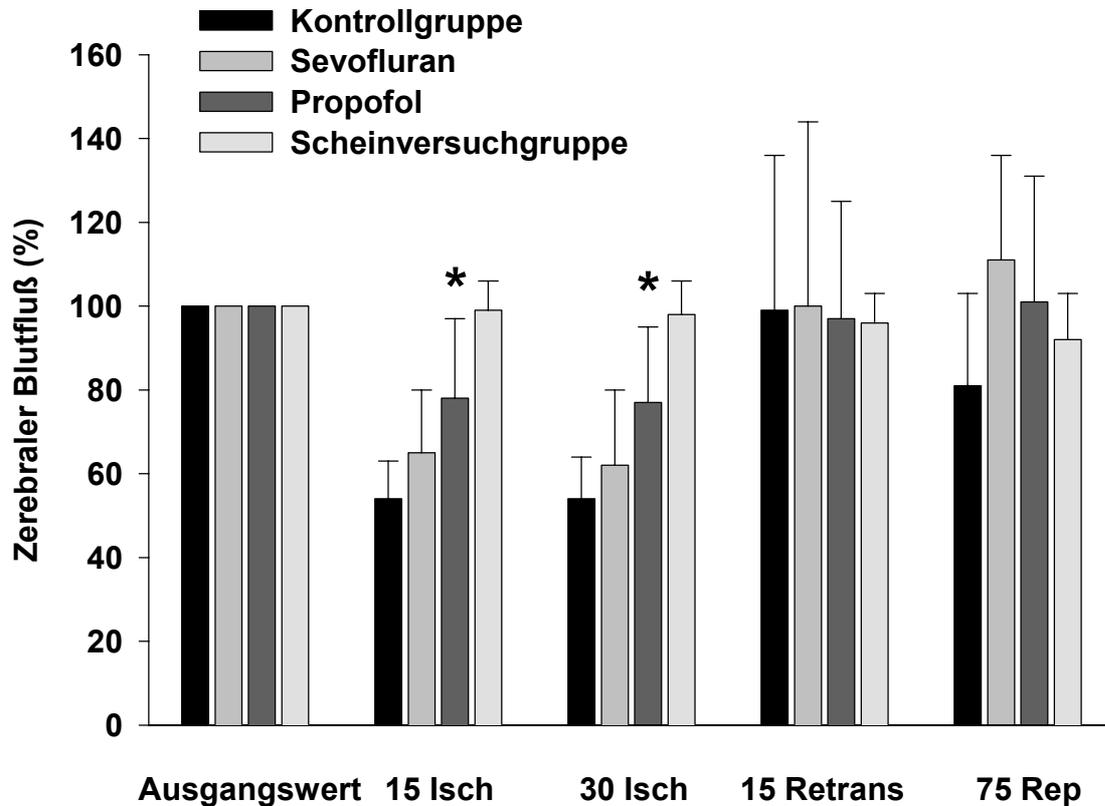


Abbildung 18: Die Abbildung zeigt die Veränderung des zerebralen Blutflusses der linken nicht-ischämischen Hemisphäre. In der Propofolgruppe war der CBF zu den Messzeitpunkten „15‘ und 30‘ Ischämie“ gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht.

4.3 Expression der Apoptosefaktoren in den verschiedenen Untersuchungsgruppen

4.3.1 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung

Wir haben untersucht, ob die Narkose mit Sevofluran und Propofol zu einer unterschiedlichen Expression der Apoptosefaktoren Bax, Bcl-2 und p53 im Hippokampus im Vergleich zur Anästhesie mit Fentanyl/Lachgas (Kontrollgruppe) und einer Scheinversuchsgruppe führte.

Die Expression des Proteins Bcl-2 zeigte im Vergleich der Gruppen keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tabelle 8). Der Vergleich der untersuchten Hippokampusregionen (CA1-, CA-3-Region und Gyrus dentatus) zeigte sowohl innerhalb jeder Gruppe, als auch zwischen den Gruppen keine Signifikanz. In der ligierten rechten Hemisphäre war Bcl-2 im Vergleich zur nicht ligierten linken Hemisphäre nicht signifikant unterschiedlich stark exprimiert (vgl. Abbildung 19).

<i>Bcl-2</i>		<i>Kontrolle</i>	<i>Sevofluran</i>	<i>Propofol</i>	<i>Scheinversuchsgruppe</i>
CA1-Region	rechts	31 ± 27	16 ± 7	30 ± 23	22 ± 7
	links	32 ± 30	18 ± 8	33 ± 26	23 ± 7
CA3-Region	rechts	29 ± 25	16 ± 7	27 ± 19	20 ± 8
	links	28 ± 22	16 ± 8	31 ± 23	21 ± 7
Gyrus dentatus	rechts	22 ± 17	14 ± 7	22 ± 12	22 ± 11
	links	25 ± 19	15 ± 7	26 ± 15	20 ± 3

Tabelle 8: Mittelwert und Standardabweichung der relativen Intensitätsunterschiede in der Expression von Bcl-2-Protein in der Immunfluoreszenzfärbung.

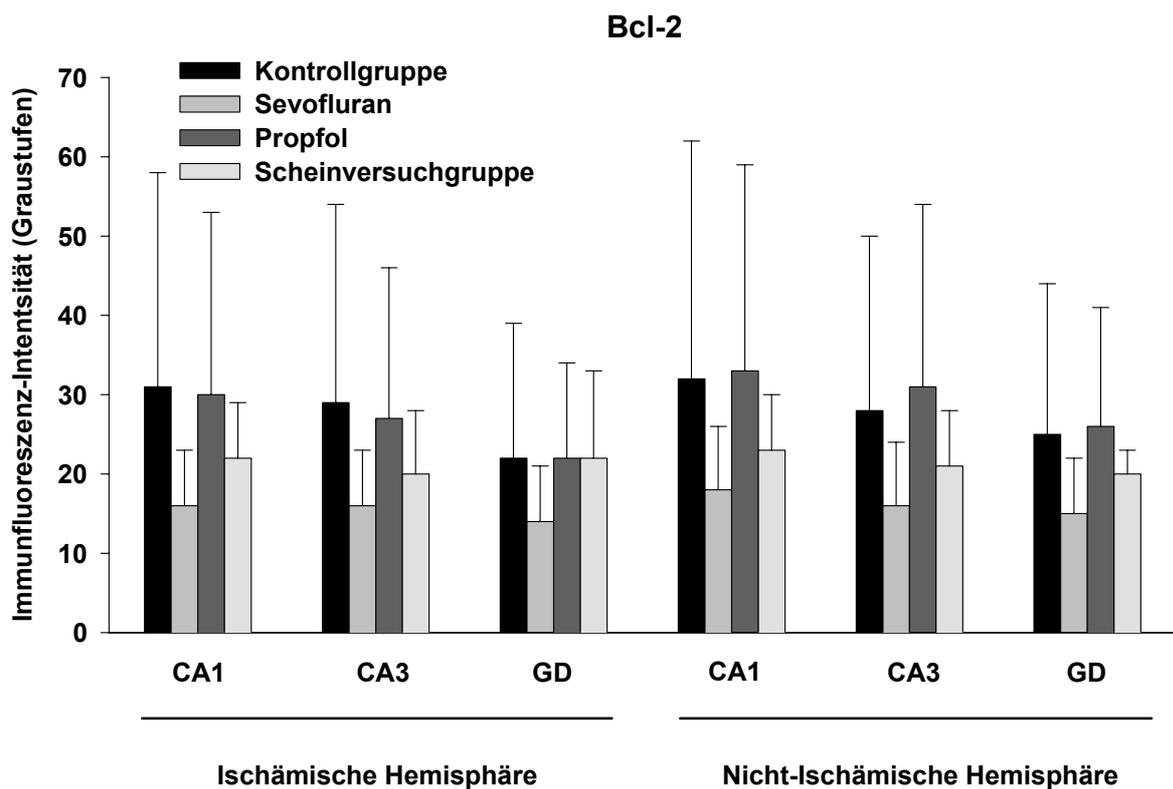


Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung. Die Graustufenanalytik der Intensität der Immunfluoreszenzfärbung zeigte für die Expression des Proteins Bcl-2 innerhalb der Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede.

Die Menge an exprimiertem p53 war zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant verschieden (vgl. Tabelle 9). Der Vergleich der Hippokampusregionen zeigte weder auf der ligierten, noch auf der nicht ligierten Hemisphäre signifikante Unterschiede (vgl. Abbildung 20). Die verschiedenen Hippokampusregionen (CA1-, CA-3-Region und Gyrus dentatus) wiesen innerhalb einer Gruppe und zwischen den Gruppen keine Signifikanz auf.

<i>p53</i>		<i>Kontrolle</i>	<i>Sevofluran</i>	<i>Propofol</i>	<i>Scheinversuchsgruppe</i>
CA1-Region	rechts	17 ± 10	11 ± 4	16 ± 12	12 ± 6
	links	17 ± 11	14 ± 6	17 ± 13	11 ± 5
CA3-Region	rechts	18 ± 8	15 ± 4	17 ± 12	13 ± 8
	links	19 ± 10	15 ± 4	16 ± 12	14 ± 6
Gyrus dentatus	rechts	16 ± 10	16 ± 5	15 ± 10	16 ± 12
	links	18 ± 11	16 ± 5	16 ± 10	14 ± 7

Tabelle 9: Mittelwert und Standardabweichung der relativen Intensitätsunterschiede in der Expression von p53-Protein in der Immunfluoreszenzfärbung.

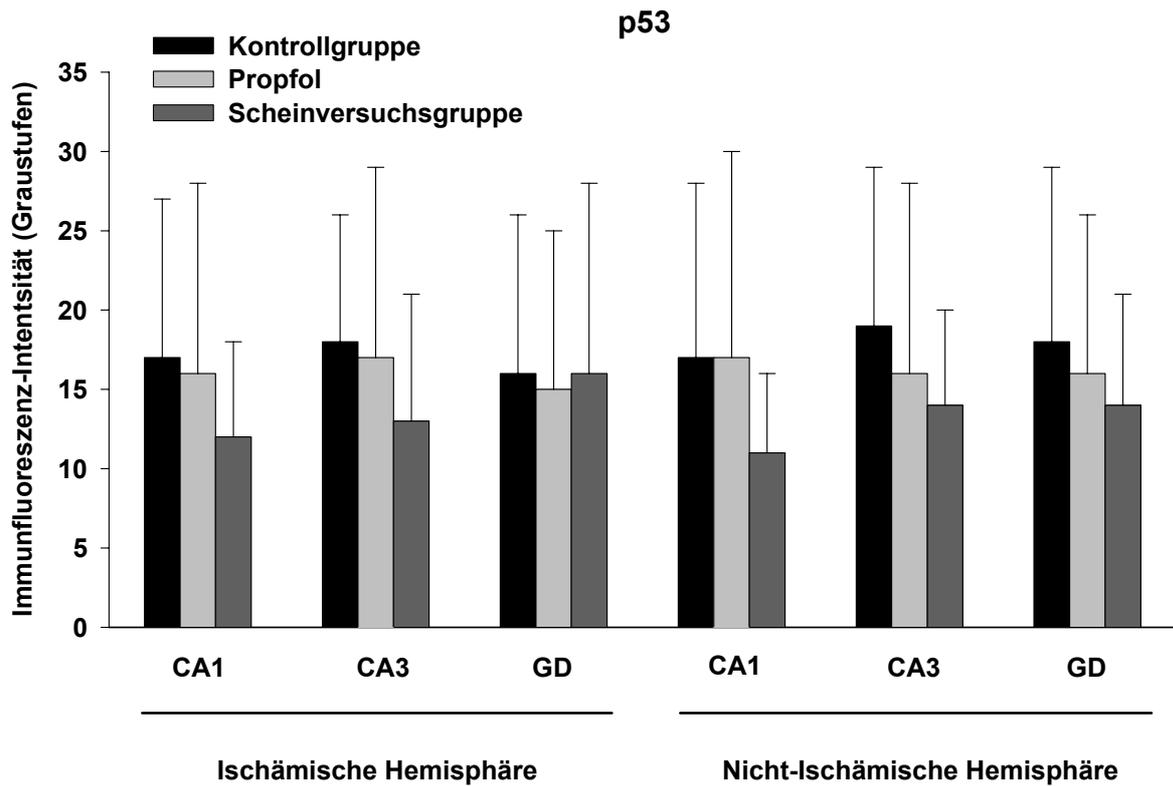


Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung. Innerhalb der Versuchsgruppen zeigte die Expression des Proteins p53 keine signifikanten Unterschiede.

Im Gegensatz zu Bcl-2 und p53 wurde Bax unterschiedlich stark exprimiert. Bei den Kontrolltieren zeigte sich im Hippokampus ein signifikanter Anstieg der Expression des Proteins Bax im Vergleich zur Scheinversuchsgruppe. Die mit Propofol und Sevofluran behandelten Tiere wiesen eine signifikant geringere Proteinmenge an Bax in der CA1-, CA-3-Region und Gyrus dentatus des Hippokampus als die Kontrollgruppe auf. Die Expression von Bax in der Propofol-, Sevofluran- und Scheinversuchsgruppe war ungefähr gleich. Somit bestand innerhalb dieser Gruppen kein signifikanter Unterschied (vgl. Tabelle 10 und Abbildung 21).

<i>Bax</i>		<i>Kontrolle</i>	<i>Sevofluran</i>	<i>Propofol</i>	<i>Scheinversuchsgruppe</i>
CA1-Region	rechts	67 ± 18	20 ± 9 *	19 ± 9 *	28 ± 7 *
	links	72 ± 37	24 ± 13 *	22 ± 11 *	24 ± 4 *
CA3-Region	rechts	78 ± 27	22 ± 10 *	20 ± 6 *	34 ± 9 *
	links	89 ± 33	25 ± 11 *	26 ± 8 *	33 ± 8 *
Gyrus dentatus	rechts	79 ± 22	25 ± 9 *	23 ± 7 *	37 ± 15 *
	links	97 ± 36	29 ± 12 *	31 ± 12 *	32 ± 7 *

Tabelle 10: Mittelwert und Standardabweichung der relativen Intensitätsunterschiede in der Expression von Bax-Protein in der Immunfluoreszenzfärbung.

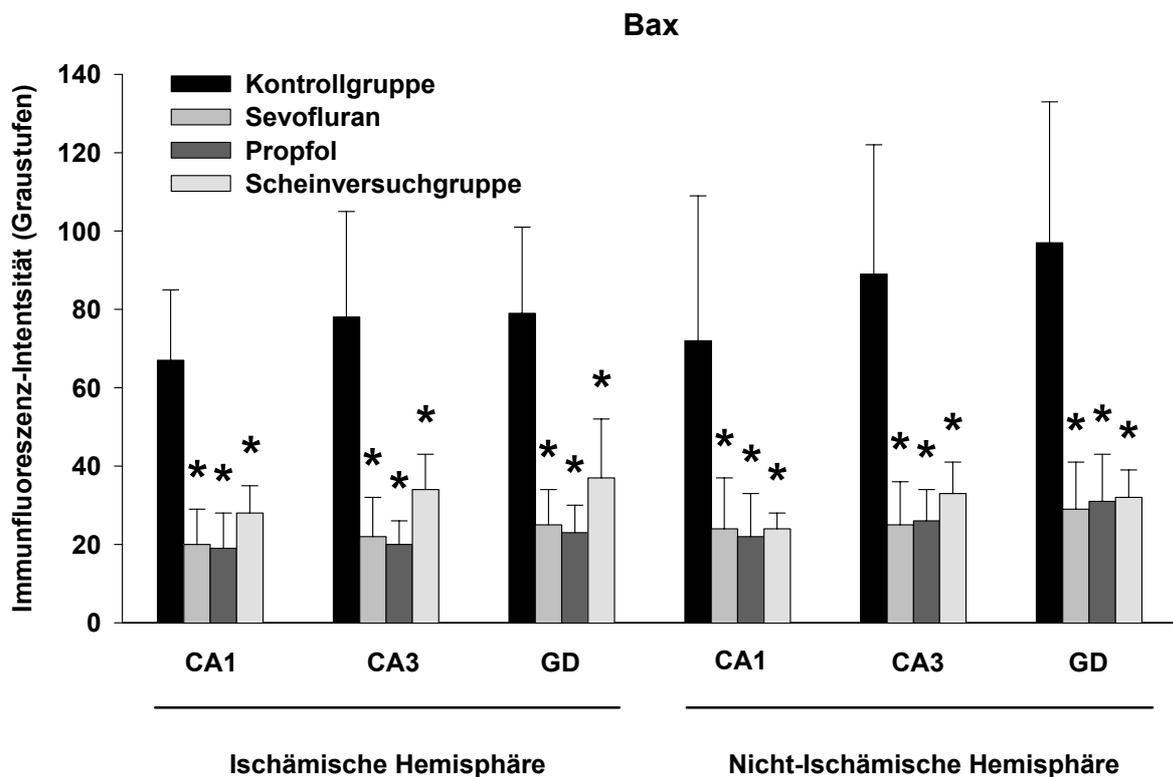


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung. In der Kontrollgruppe war die Expression des Proteins Bax sowohl in der ischämischen als auch in der nicht-ischämischen Hemisphäre gegenüber den anderen Versuchsgruppen signifikant erhöht.

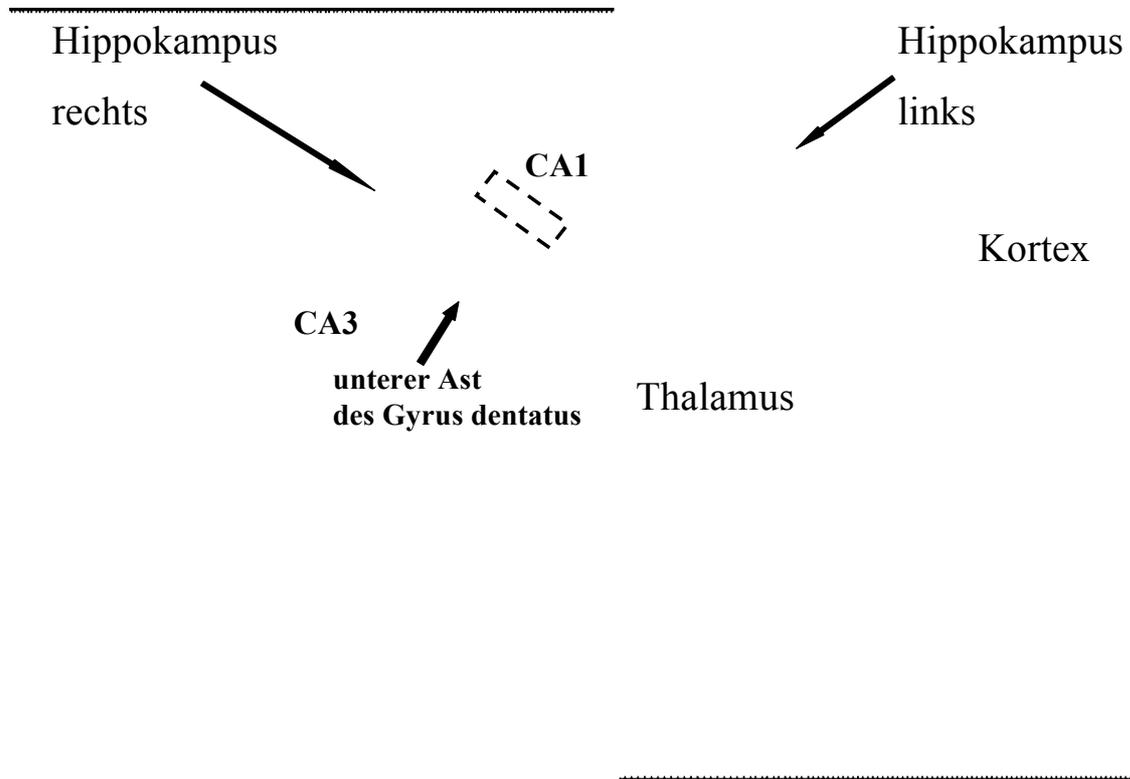


Abbildung 22: Koronarer Rattenhirnschnitt in der Schnittebene bei Bregma $-3,30$ mm [87](Ebene 33). Innerhalb des gestrichelten Rechteckes in der CA1-Region des rechten Hippokampus wurden die Aufnahmen mit dem konfokalen Laserscannmikroskop angefertigt (vgl. Abbildung 23).

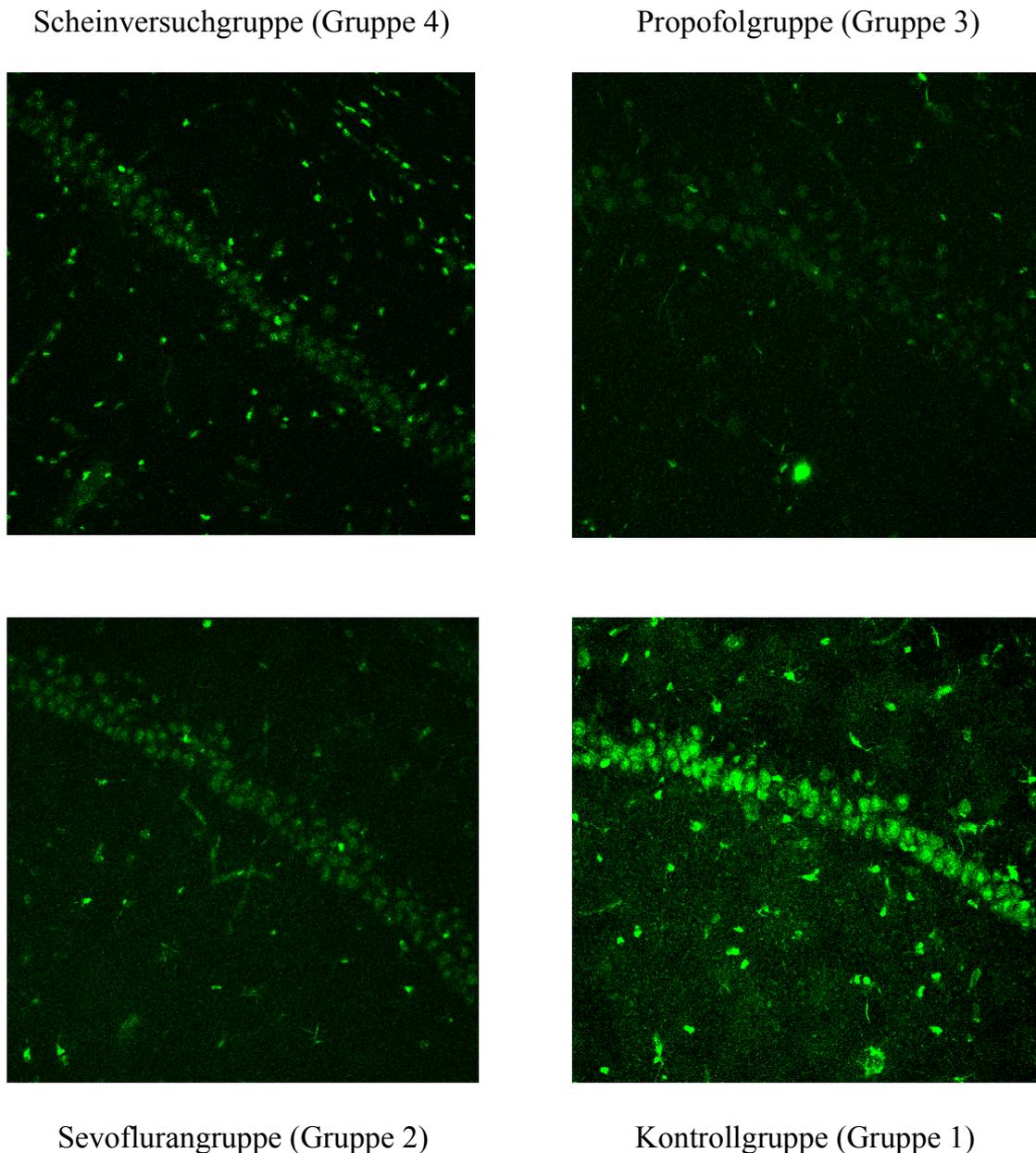


Abbildung 23 : Exemplarische Darstellung der immunhistologischen Detektion des Proteins Bax in einem koronaren Rattenhirnschnitt der CA-1 Region des rechten Hippokampus in der Ebene Bregma -3,30 mm (Lokalisation vgl. Abbildung 22). Stärkere Signalintensität entspricht einer höheren Expression. In der Kontrollgruppe war die Bax-Expression im Vergleich zu den anderen Gruppen jeweils signifikant erhöht ($p < 0.05$ für Gruppe 1 vs. Gruppe 2, Gruppe 1 vs. Gruppe 3 und Gruppe 1 vs. Gruppe 4). Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Bax-Konzentration bestanden zwischen der Sevofluran-, bzw. der Propofolgruppe im Vergleich zur Bax-Grundexpression in der Scheinversuchgruppe.

4.3.2 Ergebnisse der Westernblotanalyse

Die Expression des Proteins Bcl-2 war zwischen den Versuchsgruppen nicht unterschiedlich stark ausgeprägt (vgl. Tabelle 11). Es ergaben sich auch keine Unterschiede zwischen ligierter und nicht-ligierter Hemisphäre (vgl. Abbildung 24).

<i>Bcl-2</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Sevofluran</i>	<i>Propofol</i>	<i>Scheinversuchsgruppe</i>
rechts	57 ± 36	53 ± 43	47 ± 19	43 ± 21
links	46 ± 27	47 ± 34	52 ± 20	51 ± 19

Tabelle 11: Mittelwert und Standardabweichung der relativen Intensitätsunterschiede in der Expression von Bcl-2-Protein in der Westernblotanalyse.

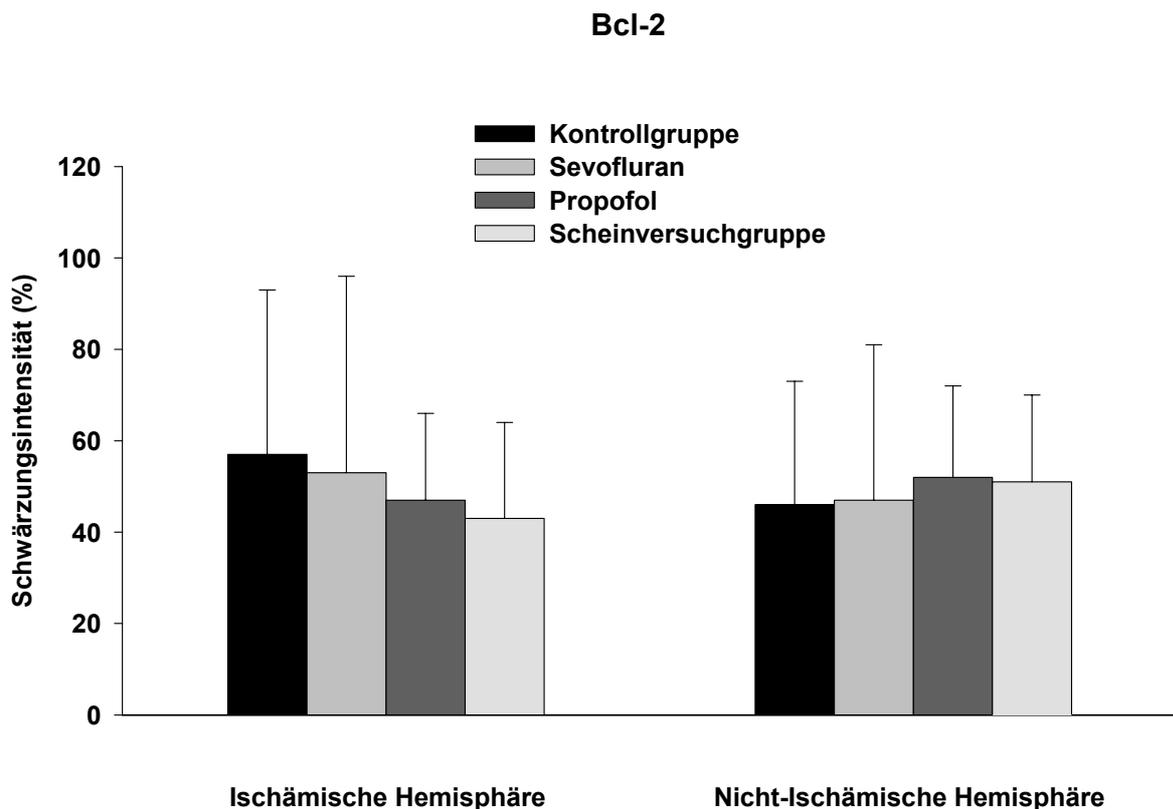


Abbildung 24: Westernblotanalyse. Im Vergleich der Versuchsgruppen zeigte die Expression des Proteins Bcl-2 keinen signifikanten Unterschied. Auch zwischen ischämischer und nicht-ischämischer Hemisphäre war die Menge an Bcl-2 nicht signifikant verschieden.

Das Protein p53 war zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant unterschiedlich exprimiert (vgl. Tabelle 12). Zwischen rechter und linker Hemisphäre konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden (vgl. Abbildung 25).

<i>p53</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Sevofluran</i>	<i>Propofol</i>	<i>Scheinversuchsgruppe</i>
rechts	97 ± 58	68 ± 18	84 ± 33	93 ± 27
links	87 ± 45	74 ± 21	87 ± 29	85 ± 18

Tabelle 12: Mittelwert und Standardabweichung der relativen Intensitätsunterschiede in der Expression von p53-Protein in der Westernblotanalyse.

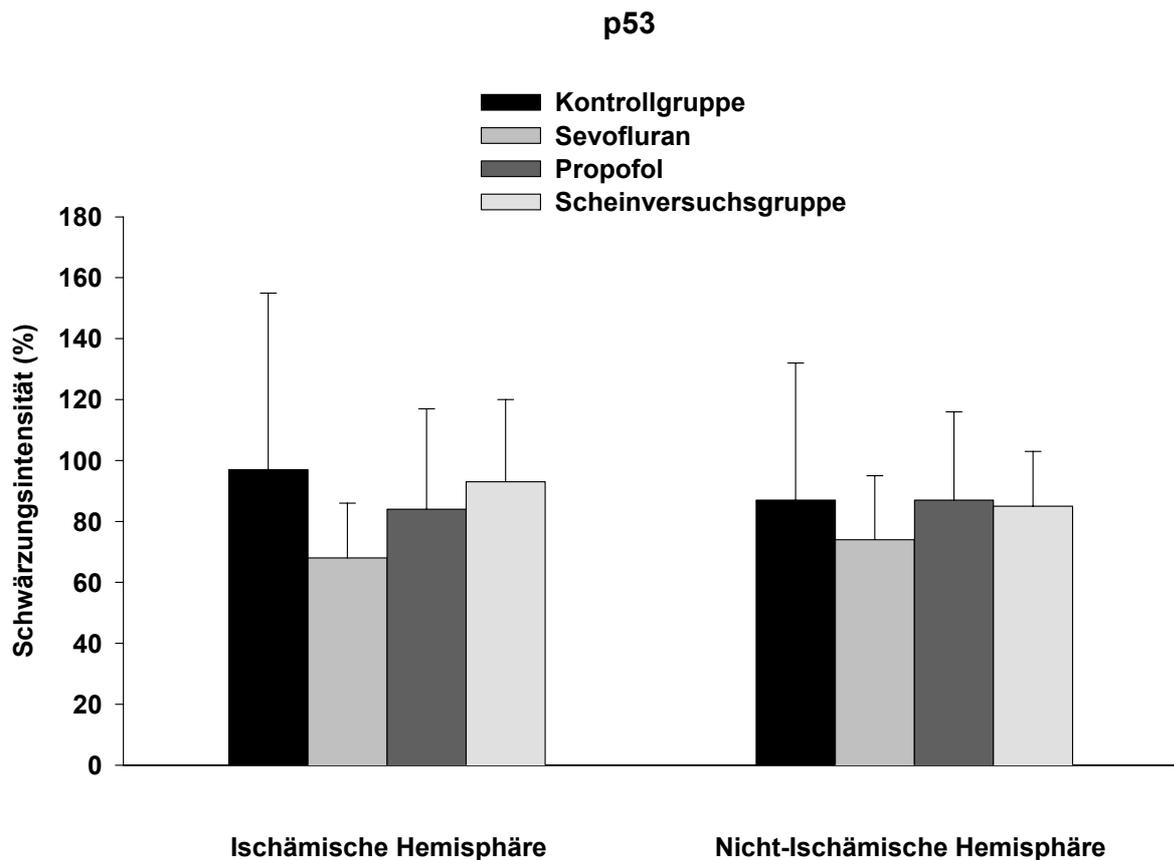


Abbildung 25: Westernblotanalyse. Innerhalb der Versuchsgruppen zeigte die Expression des Proteins p53 keine signifikanten Unterschiede.

Ebenso konnte weder zwischen den Versuchsgruppen noch zwischen der ischämischen und der nicht-ischämischen Hemisphäre innerhalb einer Gruppe ein Unterschied in der Expression des Proteins Mdm-2 detektiert werden (vgl. Tabelle 13 und Abbildung 26).

<i>Mdm-2</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Sevofluran</i>	<i>Propofol</i>	<i>Scheinversuchsgruppe</i>
rechts	380 ± 221	261 ± 179	342 ± 365	422 ± 150
links	406 ± 367	266 ± 192	356 ± 408	420 ± 107

Tabelle 13: Mittelwert und Standardabweichung der relativen Intensitätsunterschiede in der Expression von Mdm-2-Protein in der Westernblotanalyse.

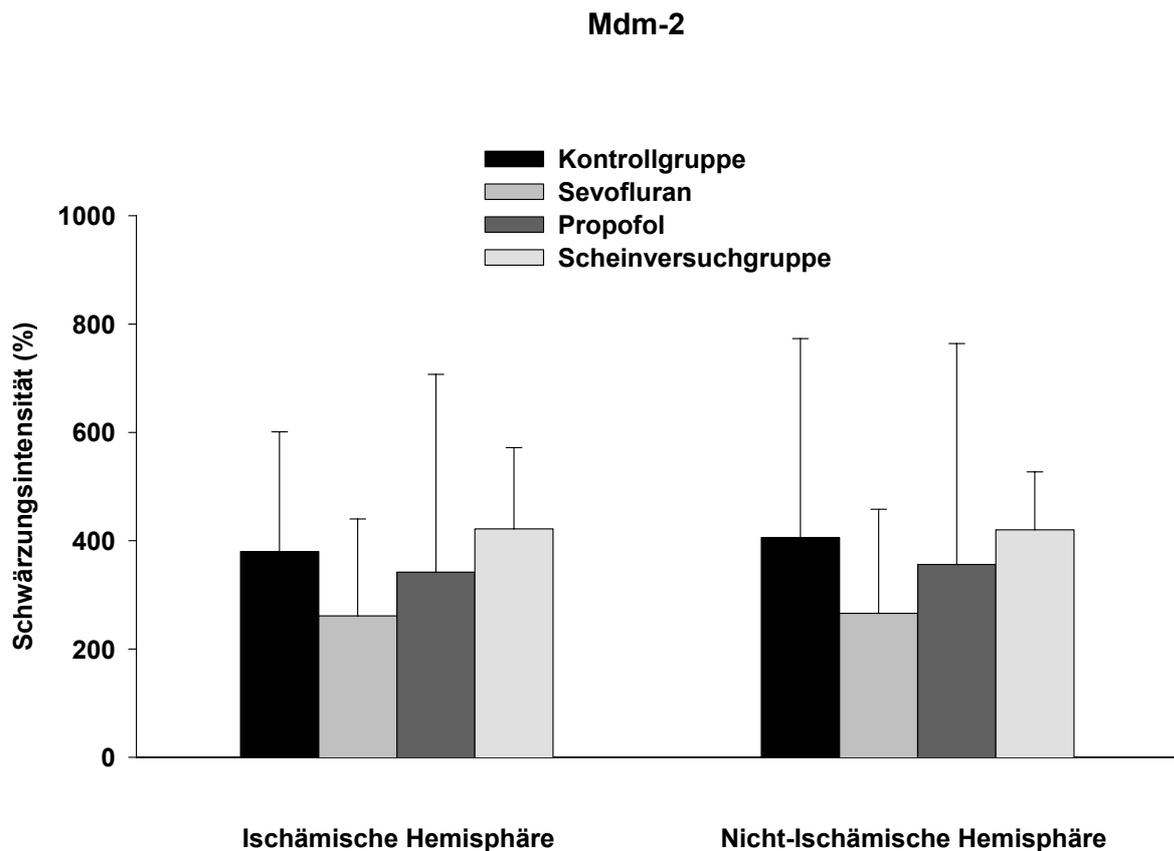


Abbildung 26: Westernblotanalyse. Die Expression des Proteins Mdm-2 zeigte innerhalb der Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede.

Im Gegensatz zu Bcl-2, p53 und Mdm-2 wurde Bax unterschiedlich stark exprimiert. Bei den Kontrolltieren zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Bax-Menge im Vergleich zur Propofol-, Sevofluran- und Scheinversuchsgruppe. Die mit Propofol und Sevofluran behandelten Tiere wiesen eine signifikant geringere Proteinmenge an Bax auf als die Kontrollgruppe (vgl. Tabelle 14, Abbildung 27 und 28). Die Expression von Bax in der Propofol, Sevofluran und Scheinversuchsgruppe war ungefähr gleich. Somit bestand innerhalb dieser Gruppen kein signifikanter Unterschied.

<i>Bax</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Sevofluran</i>	<i>Propofol</i>	<i>Scheinversuchsgruppe</i>
rechts	109 ± 19	68 ± 28 *	58 ± 26 *	73 ± 39 *
links	97 ± 23	61 ± 21 *	56 ± 23 *	72 ± 28 *

Tabelle 14: Mittelwert und Standardabweichung der relativen Intensitätsunterschiede in der Expression von Bax-Protein in der Westernblotanalyse.

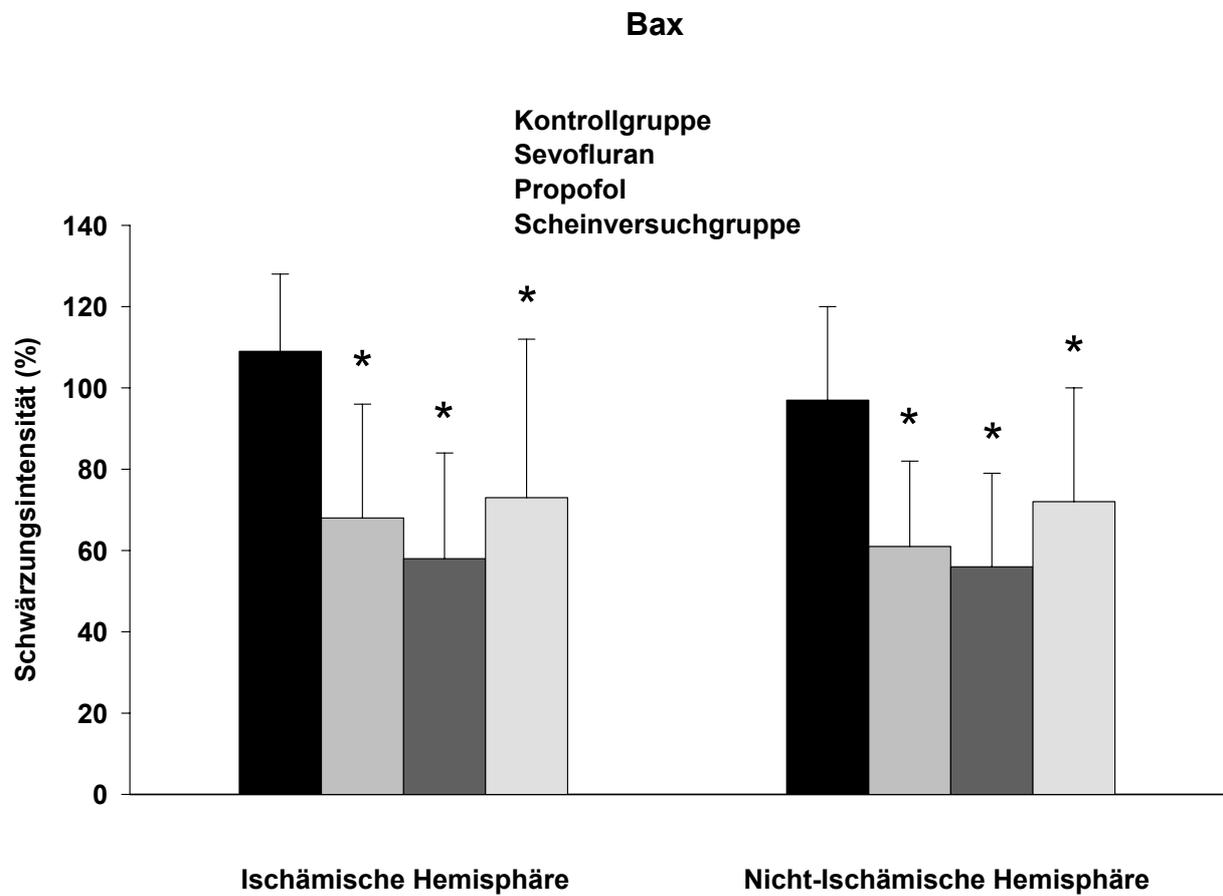


Abbildung 27: Westernblotanalyse. Sowohl in der ischämischen als auch in der nicht-ischämischen Hemisphäre der Kontrollgruppe war die Expression des Proteins Bax gegenüber den anderen Gruppen signifikant erhöht.

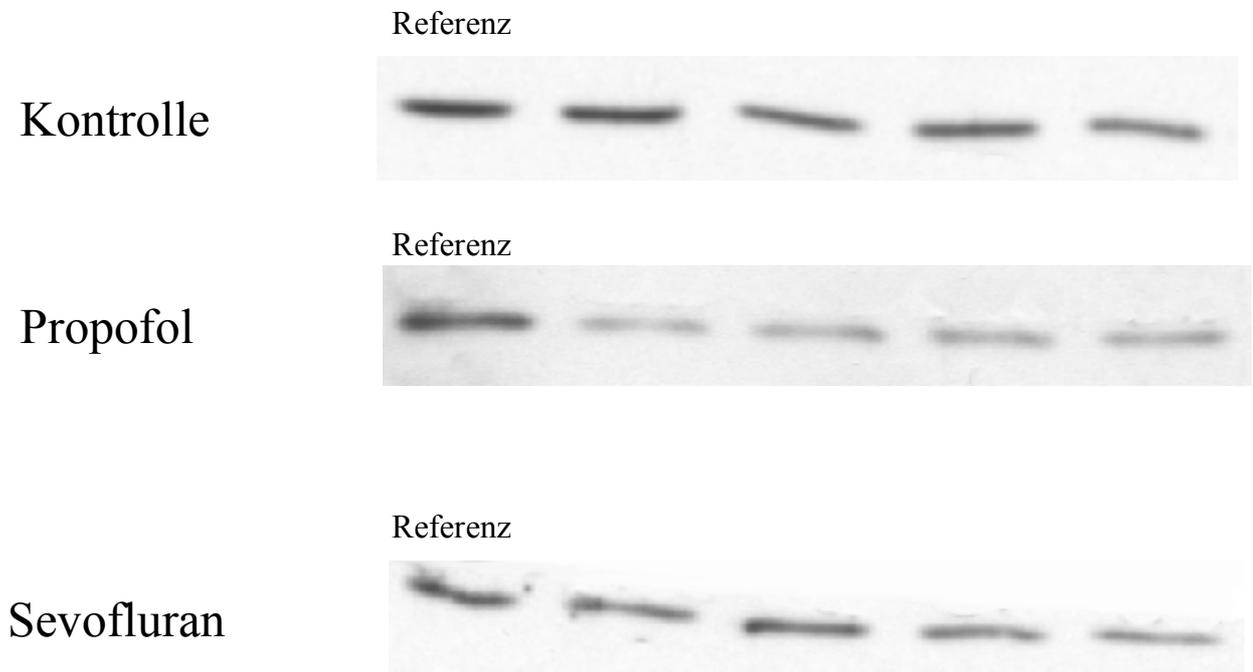


Abbildung 28: Westernblotanalyse. Die Abbildung zeigt drei Ausschnitte eines entwickelten Westernblots. Die schwarzen Banden stellen das Protein Bax dar, dabei entspricht eine stärkere Intensität der Schwärzung einer größeren Menge an Bax-Protein. In der Kontrollgruppe war die Expression von Bax im Vergleich zu den anderen Gruppen jeweils signifikant erhöht.

4.4 Ergebnisse der Hämatoxylin-Eosinfärbung

Die Hämatoxylin-Eosinfärbung wurde durch Auszählen der eosinophilen Zellen in der Hippokampusformation ausgewertet (vgl. 3.6.5.1). Die Daten sind nicht auf Signifikanz getestet worden. In der Kontrollgruppe ist die Anzahl der eosinophilen Zellen in der CA1- und CA3-Region des Hippokampus der rechten Hemisphäre im Vergleich zur Propofol-, Sevofluran- und Scheinversuchsgruppe am höchsten (vgl. Tabelle 15). Bei den Tieren der Scheinversuchsgruppe waren in der rechten Hemisphäre fast keine Eosinophilen nachweisbar. In der linken Hemisphäre traten nur bei den Tieren der Kontrollgruppe vereinzelt eosinophile Zellen auf, während bei den Tieren der Propofol-, Sevofluran- und Scheinversuchsgruppe keine eosinophilen Zellen beobachtet wurden.

<i>Gruppen</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Sevofluran</i>	<i>Propofol</i>	<i>Scheinversuchsgruppe</i>
Anzahl der eosinophilen Zellen rechts	26 ± 37	8 ± 12	19 ± 15	1 ± 1
Anzahl der eosinophilen Zelle links	3 ± 5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Tabelle 15: Mittelwert und Standardabweichung der Anzahl der eosinophilen Zellen in der Hippokampusformation der rechten und der linken Hemisphäre. Die Daten wurden nicht auf Signifikanz überprüft.

5 DISKUSSION

5.1 Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Untersuchung ist die nach vierstündiger Reperfusion signifikant höhere Expression des Bax-Proteins in der Kontrollgruppe in allen untersuchten Hippokampusregionen im Vergleich zur Scheinversuchgruppe. Demgegenüber war die Expression von Bax in der Propofol- und in der Sevoflurangruppe verglichen mit der Scheinversuchgruppe nicht signifikant verändert, in den beiden Anästhetikagruppen wurde kein Anstieg von Bax verzeichnet. Aber damit war die Bax-Expression in der Kontrollgruppe auch signifikant höher als bei den mit Propofol, bzw. mit Sevofluran behandelten Tieren.

Für die Expression der Proteine Bcl-2 und p53 wurden weder durch Immunfluoreszenztechnik noch durch Westernblotanalyse in den untersuchten Hippokampusregionen signifikante Unterschiede nachgewiesen. Dies gilt sowohl für den Vergleich der ischämischen und nicht-ischämischen Hemisphäre innerhalb der jeweiligen Gruppe als auch für den Vergleich der Versuchsgruppen mit der Scheinversuchgruppe, bzw. der Sevofluran- und Propofolgruppe mit der Kontrollgruppe. Lediglich in der Kontrollgruppe war die Konzentration von p53 im Vergleich zur Scheinversuchgruppe tendenziell erhöht. Ebenso wenig konnten signifikante Unterschiede in der Expression von Mdm-2 (Westernblotanalyse) nachgewiesen werden.

Lichtmikroskopisch wurde bei den mit Fentanyl/Lachgas behandelten Tieren anhand der HE-Färbung der Hirnschnitte ein stärker ausgeprägter Zellschaden nachgewiesen als in der Propofol-, Sevofluran- und Scheinversuchgruppe. In der rechten Hemisphäre der Tiere der Kontrollgruppe fand sich jeweils eine höhere Anzahl eosinophiler Zellen. In der linken Hemisphäre traten ausschließlich in der Kontrollgruppe eosinophile Zellen auf.

Den Vorgaben des Protokolls folgend, wurde der arterielle Mitteldruck (MAP) durch kontrollierten Blutentzug aus der rechten V. femoralis auf 35 mmHg gesenkt. In der Propofolgruppe war der MAP zu allen Messzeitpunkten signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe. Die Herzfrequenz war sowohl bei den mit Propofol als auch bei den mit Sevofluran anästhesierten Tieren zu allen Messzeitpunkten signifikant niedriger als bei den mit Fentanyl/Lachgas behandelten Kontrolltieren. Arterieller Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck, pH-Wert, Glukosekonzentration i.S. und Körperkerntemperatur wurden in jeder Versuchsgruppe innerhalb physiologischer Grenzen konstant gehalten.

Protokollgemäß wurde der zerebrale Blutfluss in den Versuchsgruppen (d.h. Kontroll-, Sevofluran- und Propofolgruppe) zur Induktion der zerebralen Ischämie von 100% auf 30% in der rechten bzw. auf 50-60% in der linken Hemisphäre gesenkt. Zu den Messzeitpunkten „15'

Ischämie“ und „30' Ischämie“ war der zerebrale Blutfluss in der linken Hemisphäre bei den mit Propofol behandelten Tieren signifikant größer als der in der Kontrollgruppe. Sowohl zwischen der Propofol- und der Kontrollgruppe als auch zwischen der Sevofluran- und der Kontrollgruppe wurde zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der Durchblutung der rechten Hemisphäre festgestellt.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Anästhesie mit Sevofluran und Propofol zu einem veränderten Expressionsmuster der apoptoseassoziierten Proteine Bax, Bcl-2, Mdm-2 und p53, während einer inkompletten zerebralen Hemisphärenischämie bei der Ratte im Vergleich zu einer Anästhesie mit Fentanyl/Lachgas führte. Inwieweit darin ein dauerhafter zerebroprotektiver Effekt zu sehen ist, muss anhand einer weiteren Längsschnittuntersuchung geklärt werden.

Ratten, die mit Sevofluran oder Propofol anästhesiert waren, wiesen im gesamten Hippokampus eine Suppression des Proteins Bax auf, während die Expression von Bcl-2, Mdm-2 und p53 im Vergleich zur Kontrollanästhesie nicht signifikant verändert war. Diese Ergebnisse lassen sich nicht durch Veränderungen der physiologischen Variablen wie pH-Wert, Körpertemperatur, arterieller Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck, Herzfrequenz, mittlerer arterieller Blutdruck, Hämoglobin- und Glukosekonzentration erklären, die während des gesamten Versuchs innerhalb physiologischer Grenzen gehalten wurden (vgl. 5.3).

Apoptose bei zerebraler Ischämie

In der Originalbeschreibung der Apoptose durch Kerr und Koautoren wurden zytomorphologische Charakteristika u.a. bei hepatischer Ischämie beschrieben [61](S.254). Apoptotische Prozesse wurden in fast jeder Art von Gewebe nachgewiesen. In malignen Tumoren und in gesundem Parenchym konnte die Apoptose anhand histomorphologischer Kriterien (vgl. 1.4) von der Nekrose differenziert werden [61](S.241-251). Kerr und Mitarbeiter etablierten die Vorstellung vom programmierten Zelltod als physiologischen und pathologischen Prozess in der Biologie. Apoptose stellt z.B. bei der normalen Entwicklung des Gehirns und bei der Hämatopoese einen physiologischen Prozess dar. Dabei dient sie der Gewebemöostase, indem sie die Balance zwischen Zellproliferation und Zelltod aufrechterhält [63](S.891). Apoptose kann aber auch im Rahmen der aplastischen Anämie als pathologisches Phänomen auftreten. Auch das Vorhandensein von Apoptose bei zerebraler Ischämie ist seit Jahren bekannt. Linnik

und Mitarbeiter wiesen nach, dass durch zerebrale Ischämie Apoptose induziert werden kann, deren Blockade durch geeignete Inhibitoren zu einer Verkleinerung der Infarktgröße geführt hat [74](S.1672-1673).

Prinzipiell lässt sich die Apoptose durch einen intrinsischen und einen extrinsischen Weg induzieren. Die zytokinvermittelte Apoptose ist ein Beispiel des extrinsischen Wegs. Sowohl der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), als auch der Fas-Ligand (FasL) sind in der Lage, in gesunden und in malignen Zellen rezeptorvermittelte Apoptose zu induzieren. Die Besetzung der entsprechenden Rezeptoren (TNF-R I und II) bzw. Fas (CD₉₅) aktiviert über ihren Rezeptor direkt eine Signalkaskade (FADD, TRADD u.a.) im Zytosol der Zelle. Diese Proteine interagieren mit Caspasen (Cystein-abhängige-Asparat-spezifische Proteasen), die dann als „Exekutoren der Apoptose“ zur Degradation von DNA und Proteinen führen [31](S.813-814). Bei diesem Weg spielen die Apoptoseproteine Bax und p53 kaum eine Rolle. Für Bcl-2 kann jedoch auch hier ein antiapoptotischer Stimulus angenommen werden [63](S.892). Bei zerebraler Ischämie wird die Apoptose über den intrinsischen Weg mit Aktivierung von p53 und Bax induziert. Eine antagonisierende Rolle fällt dabei den Proteinen Bcl-2 und Mdm-2 zu [40](S.8-12).

Zur Untersuchung möglicher zerebroprotektiver Effekte von Sevofluran, bzw. Propofol bei zerebraler Ischämie wählten wir die Expressionsmuster der für die Apoptoseregulation maßgeblichen Proteine p53, Bax, Bcl-2 und Mdm-2 als Zielparameter, deren Bedeutung bei zerebraler Ischämie bereits mehrfach demonstriert worden ist [14](S.267-268) [20](S.669-670) [22](S.22-25) [73](S.125-127).

Bax und Bcl-2

Zentrales Ergebnis der vorliegenden Untersuchung ist die nach 4 Stunden erhöhte Konzentration des proapoptotischen Proteins Bax im rechten und linken Hippokampus der Tiere aus der Fentanyl/Lachgas-Gruppe im Vergleich zur Scheinversuchsgruppe, die durch die Immunfluoreszenz ermittelt wurde und in der Westernblotanalyse Bestätigung fand. Die Menge des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins ist im Vergleich zur Scheinversuchsgruppe etwa gleich geblieben. Die erhöhte Bax-Expression und die nicht signifikant veränderte Bcl-2-Expression zeigen, dass die Tiere unter Narkose mit Fentanyl/Lachgas, so stark geschädigt wurden, dass erste Zeichen der Apoptoseeinleitung in Form von erhöhter Bax-Expression sichtbar wurden. Eine isolierte Erhöhung der Bax-Menge nach transienter Ischämie findet sich vielfach in der Literatur bestätigt. Antonawich und Mitarbeiter fanden in der CA-1-Region des Hippokampus der mongolischen Wüstenrennmaus 6 Stunden nach Induktion einer fünfminütigen transienten

zerebralen Vorderhirnischämie mittels Westernblotanalyse eine Hochregulation des proapoptotischen Proteins Bax, während nicht-ischämische Tiere keinen Anstieg des Proteins zeigten. Hingegen waren die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x₁ in den geschädigten Tieren nicht in erhöhter Menge nachweisbar [3](S.884).

In einem Modell der transienten (10 Minuten) globalen Hirnischämie an der Ratte haben Krajewski et al. durch Westernblotanalyse und Immunfluoreszenz eine erhöhte Expression von Bax in der CA1-Region festgestellt, welche bis zu 3 Stunden nach Ischämie nachweisbar war. Über eine Doppelfärbung von Bax und DNA-Doppelstrangbrüchen wurde die Koinzidenz von erhöhter Bax-Konzentration, Doppelstrangbrüchen und morphologischen Zeichen der Degeneration als Hinweis auf Apoptose demonstriert [66](S.6371-6372). Dabei fanden sich erhöhte Bax-Konzentrationen in der CA1-, CA2- und CA4-Region, nicht jedoch in der CA3-Region [66](S.6371). Die vergleichsweise größere Ischämietoleranz der CA3-Region wird durch eine niedrigere Bax-Grundexpression und eine höhere Bcl-2-Konzentration erklärt [66](S.6365-6370). Bcl-2 kommt zusammen mit erhöhten Glutathionspiegeln vor, was für die Zellen einen erhöhten Oxidationsschutz bedeutet. Unter ischämischen Bedingungen sind diese Zellen gegen die Auswirkungen von freien Radikalen besser geschützt. Zellen, die selektiv vulnerabel sind, weisen hingegen neben einem erniedrigten Bcl-2-Spiegel auch erniedrigte Glutathion-Peroxidase-Spiegel auf, was ihre erhöhte Verwundbarkeit erklärt [109](S.4). In der vulnerablen CA1-Region zeigt sich primär eine höhere Bax-Grundexpression und eine niedrigere Bcl-2-Konzentration [66](S.6365-6370).

In der vorliegenden Studie zeigten die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung eine Erhöhung der Bax-Konzentration in allen Hippokampusregionen, also einschließlich der CA3-Region. Offensichtlich wurde die Ischämieresistenz der CA3-Region in unserem Modell überschritten. Mögliche Ursachen des größeren Schweregrades der Ischämie sind einerseits die zeitliche Dauer (30 Minuten) und andererseits die hämorrhagische Hypotension bei gleichzeitiger Ligatur der rechten A. carotis communis. Die Zeitabhängigkeit der Ischämieresistenz der einzelnen Hippokampusregionen wurde schon 1984 von Smith und Mitarbeitern untersucht. Bereits nach 10 Minuten der Ligatur der A. carotis communis wurden bei vorbestehender Hypotension deutliche histologische Schäden in den Hippokampusregionen CA1-4 beobachtet [96](S.323-324).

Demgegenüber wurden durch Hara et al. in einem Modell mit Wüstenrennmäusen 48 und 96 Stunden nach einer fünfminütigen transienten Vorderhirnischämie eine erhöhte Bax-Expression in der CA1-Region beobachtet, während die Bcl-2-Expression unverändert blieb [42](S.251-252).

Bei den mit Fentanyl/Lachgas behandelten Kontrolltieren war die Expression von Bax hochreguliert, während die Bcl-2-Konzentration keine signifikante Änderung aufwies. Das Bcl-2/Bax-Verhältnis war daher zugunsten von Bax verschoben.

P53

Die bei den mit Fentanyl/Lachgas anästhesierten Kontrolltieren tendenziell vermehrte Expression von p53 im rechten und linken Hippokampus (nachgewiesen durch Westernblot- und Immunfluoreszenzanalyse) ist durch die zerebrale Ischämie zu erklären. Bereits 1992 wurde von Chopp und Mitarbeiter zum ersten Mal eine gesteigerte Expression von p53 nach einer zerebralen Ischämie durch Verschluss der A. cerebri media nachgewiesen [23](S.1202-1203). Der fehlende Nachweis einer signifikanten Steigerung der p53-Expressionsrate im vorliegenden Protokoll könnte jedoch durch das gleichzeitige Vorliegen des p53 in unterschiedlichen sterischen Konformationszuständen erklärt werden. Hughes et al. haben bei exzitatorischer Erregung von NMDA-Rezeptoren durch intrazerebrale Applikation von Quinolinsäure bei Ratten eine erhöhte Expression von p53 mit konsekutiver Induktion von Bax nachgewiesen. Immunhistochemisch reagierte dabei lediglich einer der sechs verwendeten Antikörper und zwar der, der sowohl gegen die denaturierte Form von p53 als auch gegen eine Mutation von p53 (mt-p53) gerichtet war. Obwohl zuvor durch In-situ-Hybridisierung p53-mRNA eindeutig nachgewiesen wurde, zeigten die gegen den Wildtyp von p53 (wt-p53) gerichteten Antikörper keine Reaktion. Daraus wurde gefolgert, dass p53-Proteine bei zerebralem Parenchymschaden möglicherweise einer Konformationsänderung unterliegen oder an andere Protein, wie z.B. Hitzeschockprotein binden und deshalb nicht durch den Anti-Wildtypantikörper detektiert werden konnten [56](S.1147-1156).

Die von uns verwendeten Antikörper (vgl.3.6.5.2 und 3.6.6.5) detektieren nur wt-p53. Dies könnte erklären, dass in der vorliegenden Studie die Expression von p53 in der Fentanyl/Lachgasgruppe zwar tendenziell gegenüber der Scheinversuchsgruppe erhöht ist, aber keine Signifikanz vorliegt. Vielleicht konnten wir lediglich einen Teil des vorhandenen p53 feststellen. Für diese These spricht die vorliegende erhöhte Bax-Konzentration, die p53 als Transkriptionsfaktor (s.o.) benötigt.

Mdm-2

Vier Stunden nach Beginn der Reperfusion fanden sich im Hippokampus der mit Fentanyl/Lachgas narkotisierten Kontrolltiere keine Unterschiede der mit Westernblotanalyse gemessenen Mdm-2-Konzentration im Vergleich zur Scheinversuchsgruppe.

Tu und Mitarbeiter untersuchten die Expression von Mdm-2-Protein bei 90-minütiger Okklusion der A. cerebri media nach 1, 8, 24 und 48 Stunden Reperfusion. Mittels Immunhistochemie und Westernblot wurde die maximale Intensität nach 24 Stunden detektiert. Nach einer Stunde Reperfusion konnte Mdm-2 noch nicht nachgewiesen werden, erste Mdm-2-positive Zellen zeigten sich erst 8 Stunden nach Beginn der Reperfusion. Nach 48 Stunden nahm die Intensität der Färbung wieder ab [101](S.661-663).

Der fehlende Nachweis signifikanter Unterschiede in der Mdm-2-Expression könnte somit protokollbedingt sein.

Inkomplette Hemisphärenischämie.

Hinsichtlich der Expression der untersuchten Proteine zeigte sich kein Unterschied zwischen der rechten und der linken Hemisphäre. Dies kann dadurch erklärt werden, dass bereits durch die hämorrhagische Hypotension in beiden Hemisphären ein Zellschaden herbeigeführt wird, welcher nach 4-stündiger Reperfusion in der Kontrollgruppe zur Induktion von Bax führt.

Im selben experimentellen Modell der inkompletten Hemisphärenischämie (hämorrhagische Hypotension und einseitige Ligatur der A. carotis communis) haben Hoffman et al. ebenfalls histomorphologische Anzeichen von neuronalen Zellschäden auch in der nicht-ligierten Seite beobachtet [50](S.1047).

HE-Färbung

Zur Beurteilung der Zellmorphologie wurde eine HE-Färbung der Gehirnschnitte durchgeführt. Eosinophiles Färbeverhalten des Zytoplasmas zeigt eine Zellschädigung an, ohne dabei Rückschlüsse über das Vorliegen von Apoptose oder Nekrose zuzulassen [38](S.88-89).

Analog zur Erhöhung der Bax-Konzentration als ein Zeichen der Schädigung finden sich in der HE-Färbung der Kontrollgruppe in der CA1- und CA4-Region des Hippokampus der rechten ischämischen Hemisphäre, aber auch im Hippokampus der linken nicht-ischämischen Hemisphäre die höchste Anzahl an eosinophilen Zellen im Vergleich zur Scheinversuchsgruppe. Mit der HE-Färbung der Hirnschnitte der Tiere der Sevofluran- und Propofolgruppe wurden durch die reduzierte Anzahl der Eosinophilen im Hippokampus im Vergleich zur Fentanyl/Lachgasgruppe Ergebnisse früherer Untersuchungen bestätigt. In einer Studie von Kochs et al. war bei transients inkompletter Hemisphärenischämie bei der Ratte der histopathologische Schaden unter einer Narkose mit Propofol (2 mg/kg/min) im Vergleich zur Fentanyl/Lachgasnarkose deutlich reduziert. Das bessere neuropathohistologische Ergebnis bestätigte das bessere neurologische Endergebnis der mit Propofol anästhesierten Ratten [64](S.48). Werner und Mitarbeiter konnten zeigen, dass das neurologische Endergebnis nach

inkompletter zerebraler Ischämie bei Ratten unter Narkose mit Sevofluran signifikant besser war als unter Narkose mit Fentanyl/Lachgas. Der histologische Schaden ist in dieser Arbeit nicht bestimmt worden, das verbesserte neurologische Endergebnis ließ aber auch einen histologisch fassbaren schwächeren Schaden vermuten [106](S.758). Zum Ergebnis der Reduktion der eosinophilen Zellen in beiden Gruppen passt es, dass die Bax-Konzentration im Hippokampus supprimiert ist.

Zerebroprotektion durch Propofol und Sevofluran.

Im Gegensatz zur Fentanyl/Lachgas-Gruppe konnte in der Sevofluran- und in der Propofolgruppe mittels Immunfluoreszenz und Westernblotanalyse trotz Ischämie keine erhöhte Expression von Bax detektiert werden. Bax war im Vergleich zur Kontrollgruppe supprimiert. Die Bax-Konzentration in der Sevofluran-, Propofol- und in der Scheinversuchsgruppe war auf dem gleichen niedrigen Niveau. Infolgedessen führte die Narkose mit Sevofluran oder Propofol zu einer Unterdrückung der Expression des proapoptotischen Proteins Bax. Die Expression des Proteins p53 war in der Sevofluran- und Propofolgruppe zwar nicht signifikant, aber dennoch tendenziell erniedrigt im Vergleich zur Kontrollanästhesie mit Fentanyl/Lachgas.

Doch die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Mdm-2 wurden unter der Narkose mit Sevofluran oder Propofol nicht hochreguliert. Aus diesen Ergebnissen lässt sich die Hypothese folgern, dass ein zerebroprotektiver Wirkmechanismus von Sevofluran und Propofol vier Stunden nach zerebraler Ischämie in der Suppression von proapoptotischen Proteinen zu sehen ist, nicht aber in der Hochregulation von antiapoptotischen Proteinen.

Das volatile Anästhetikum Sevofluran (Fluormethyl-1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propylether) vermindert die elektroenzephalographische Aktivität, den zerebralen Sauerstoffverbrauch und die metabolische Aktivität in ähnlicher Weise wie Isofluran [26](S.680-681) [69](S.1483-1487). Obwohl durch Isofluran die zerebrale Stoffwechselrate (Substratumsatz je perfundierte Gewebseinheit) reduziert wird, wurde im Vergleich mit dem Barbiturat Methohexital ein geringer zerebroprotektiver Effekt bei transientser zerebraler Ischämie beobachtet [103](S.797). Darüber hinaus wurde von Sano et al. in einem Ischämiemodell der Ratte nachgewiesen, dass Isofluran dem zerebroprotektiven Effekt von Hypothermie [54](S.36) unterlegen ist [91](S.224-225).

Sevofluran und Halothan reduzierten in einem fokalen Ischämiemodell mit Okklusion der A. cerebri media das Infarktvolume und verbesserten die neurologischen Funktionen gegenüber Ratten, die nach der ischämischen Phase ohne Narkose waren [102](S.988-989).

Anhand des vorliegenden Modells der inkompletten Hemisphärenischämie wurde bereits gezeigt, dass eine Senkung des peripheren und zentralen Sympathikotonus durch Infusion des ganglienblockierenden Pharmakons Hexamethonium oder des α_2 -Agonisten Dexmedetomidin zur Reduktion des zerebralen Schadens beiträgt [51](S.330-331) [105](S. 925-926); gleichzeitig wurden unter Narkose mit Halothan bzw. Isofluran erniedrigte periphere und zentrale Katecholaminkonzentration festgestellt, so dass diese Narkosegase durch einen verringerten Sympathikotonus zu einer Reduktion des zerebralen Schadens beizutragen scheinen. Demgegenüber stieg in der Kontrollgruppe (Fentanyl/Lachgasnarkose) die zerebrale Noradrenalin-konzentration intraischämisch an [53](S.280). Eigene, bislang noch nicht veröffentlichte Daten haben gezeigt, dass dieser Anstieg durch eine Narkose mit Sevofluran, bzw. Propofol verhindert werden kann.

In einer In-vitro-Studie am Rattenhippocampus konnten Hirota und Roth zeigen, dass durch Sevofluran die inhibitorischen GABA_A- (Regulation des Chlorideinstroms) und GABA_B-Rezeptoren (Regulation des KaliumEinstroms) stimuliert werden [47](S.64). Über die Stimulation dieser zentralnervösen Rezeptoren wird die Zelle hyperpolarisiert, das Membranpotential wird stabilisiert und die Zelle wird gegenüber exzitatorischen Impulsen resistenter [47](S.60). Möglicherweise liegt darin ein Erklärungsansatz, warum der zerebrale Schaden während Ischämie unter Sevoflurannarkose geringer ausgeprägt ist. Da diese Rezeptoren in der CA1-Region besonders stark exprimiert sind [47](S.60), könnte deren Ischämieempfindlichkeit durch die Stabilisierung des Membranpotentials erniedrigt werden. In den Zellen fehlt unter Sevoflurannarkose während der zerebralen Ischämie der negative Stimulus, der zu einer Induktion der Expression von Bax führt.

In einer Zellkultur aus hippokampalen Astrozyten der Ratte konnten Miyazaki et al. nachweisen, dass diese unter Inkubation mit Sevofluran vermehrt Glutamat aus dem Extrazellularräum aufnehmen. Dadurch wird die zentralnervöse exzitatorische synaptische Erregungsübertragung abgeschwächt [78](S.1363-1364). Darin liegt ein weiterer Erklärungsansatz der Zerebroprotektion. Durch die Elimination des exzitatorischen Transmitters Glutamat werden die NMDA-Rezeptoren in geringerem Maße stimuliert und ihr Beitrag zum ischämischen Hirnschaden wird reduziert. Bei Sevofluran ist, wie bei jedem Pharmakon, der kritische Einsatz entscheidend. Aufgrund der vasodilatatorischen Wirkung mit Abnahme des zerebralen Perfusionsdruckes und Anstieg des intrakraniellen Druckes sollte die Anwendung von Sevofluran bei neurochirurgischen Patienten mit intrazerebraler Massenläsion oder mit reduzierter kraniospinaler Compliance nur nach strenger Indikationsstellung erfolgen [106](S.759). Treten bei diesen Patienten Ischämien auf, überwiegen möglicherweise die negativen Effekte der intrazerebralen Druckerhöhung die neuroprotektiven Eigenschaften von Sevofluran.

Propofol (2,6-Diisopropylphenol) kann in der Zellkultur von hippocampalen Neuronen die Neurotoxizität, die über glutamataktivierte NMDA-Rezeptoren vermittelt wird, abschwächen [41](S.251). Propofol wirkt als nicht-kompetitiver Antagonist am NMDA-Rezeptor, ähnlich wie Ketamin. Beide Substanzen enthalten einen Phenolring, der für diese Bindungsfähigkeit verantwortlich gemacht wird [41](S.252). Orser et al. fanden heraus, dass Propofol einen NMDA-Subtyp des Glutamaterezeptors inhibiert, was wahrscheinlich eher durch eine allosterische Modulation des Kalziumkanaleingangs geschieht als durch eine Blockade des offenen Eingangs, wodurch der intrazelluläre Kalziumanstieg minimiert wird [85](S.1766-1767). In einem geringen Ausmaß kann Propofol die Glutamatausschüttung und den glutamatabhängigen Kalziumeinstrom in die Zellen inhibieren, indem es die Funktion spannungsabhängiger Kalziumkanäle drosselt [6](S.445-446). Eine mögliche Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren durch Propofol wurde von Hara und Mitarbeitern an isolierten Hippokampusneuronen der Ratte demonstriert [43](S.782-785). Dieser inhibitorische Effekt reduziert die Übertragung im synaptischen Spalt und drosselt so die Erregung der Neuronen.

Demgegenüber wurde von Zhu und Mitarbeitern an isolierten Hippokampuschnitten von Ratten, die jedoch keiner zerebralen Ischämie unterzogen wurden, nach Inkubation mit Propofol eine signifikante Verschlechterung der Erholung der Populationserregungsamplitude nach NMDA-Rezeptor-vermitteltem Schaden festgestellt [116](S.946-947).

In einer neueren In-vivo-Studie wiesen Yamaguchi et al. zerebroprotektive Eigenschaften für Propofol nach. Der neuronale histologisch fassbare Schaden bei Wüstenrennmäusen nach transientser Vorderhirnischämie war unter Propofolapplikation signifikant geringer im Vergleich zur mit Kochsalz behandelten Gruppe [114](S.595).

Obwohl die endgültigen Mechanismen der Zerebroprotektion durch Propofol noch nicht bekannt sind, dürfte die Inhibition des intrazellulären Kalziumanstieges zur Verringerung des Gewebes Schadens beitragen. Im vorliegenden Modell müssen weitere Untersuchungen zeigen, welche langfristigen Erfolge durch die Anästhesie mit Sevofluran oder mit Propofol erreicht werden können und welche molekularbiologischen Langzeitwirkungen diese Anästhetika haben.

5.3 Diskussion des Tiermodells

Wir wählten für unsere Fragestellung das tierexperimentelle Modell der inkompletten zerebralen Hemisphärenischämie bei narkotisierten Sprague-Dawley-Ratten. Die Ratte stellt einerseits das sinnesphysiologisch am niedrigsten entwickelte Versuchstier dar, andererseits ist die erforderliche Überwachung der Vitalfunktionen, sowie eine kontrollierte Beatmung und

eine Konstanthaltung physiologischer Parameter bei diesen Versuchstieren sehr gut durchführbar. Die niedrigen Kosten der Tiere, ihre relativ hohe Homogenität mit kurzer Generationsdauer und die dadurch erhöhte Vergleichbarkeit der Tiere und nicht zuletzt die große Ähnlichkeit der zerebrovaskulären Anatomie und Physiologie im Vergleich mit höheren Spezies prädestinieren Ratten als Versuchstiere für Ischämie-Modelle. Auch die weitere Laboranalyse wird durch die geringe Größe der Hirne erheblich kostengünstiger verglichen mit höheren Spezies [37](S.1).

Generell lassen sich zwei Formen der zerebralen Ischämie unterscheiden: die fokale und die globale zerebrale Ischämie. Eine fokale zerebrale Läsion wird durch den Verschluss zerebraler Gefäße durch Embolien (Thromben, arteriosklerotische Plaques oder Luft), durch Ligatur von Hirngefäßen, durch Gefäßspasmen im Rahmen einer Subarachnoidalblutung oder durch ein traumatisch bedingtes fokales Ödem hervorgerufen. Der Herzkreislaufstillstand, das globale diffuse Hirnödeme und eine Hypoxie durch Störung der Blutoxygenierung führen zu einer globalen zerebralen Ischämie. Wenn eine residuale Durchblutung (z.B. durch Kollateralen) besteht, ist die zerebrale Ischämie inkomplett; bei sistierender zerebraler Perfusion spricht man von kompletter Ischämie [104](S.121). Tierexperimentell gibt es Modelle mit Induktion einer globalen Ischämie, die gewöhnlich nur vorübergehend ist, und solche mit fokaler Ischämie, beide jeweils mit oder ohne Reperfusion [37](S.1). Fokale Ischämie-Modelle simulieren die Situation eines zerebralen Apoplex. Dabei ist das Modell der Okklusion der A. cerebri media bei der Ratte am weitesten verbreitet [15](S.394) [23](S.1202) [36](S.255). Zu den globalen Ischämie-Modellen zählen das Viergefäß-Okklusionsmodell mit konsekutiver Vorderhirnischämie [88](S.499-500) [16](S.3) oder die Induktion eines Herzstillstandes [66](S.6365).

In dem von uns gewählten Modell der inkompletten Hemisphärenischämie wurde die zerebrale Ischämie durch die Kombination aus hämorrhagischer Hypotension und Ligatur der A. carotis communis dextra induziert. Die dabei vorhandene Restdurchblutung (s.o.) gewährleistet das Anfluten der Anästhetika und damit die Entfaltung möglicher zerebroprotektiver Effekte. Eine alleinige Ligatur der Arterie führt nicht zu einer ausreichenden ischämischen Schädigung des Gehirns, da die Ratte ein sehr ausgeprägtes Kollateralgefäßnetz zur zerebralen Versorgung besitzt [92](S.4-22).

Das von uns gewählte Modell (1988 von Baughman et al. erstmals beschrieben, [5](S.192-193) ist wohl am ehesten auf eine intraoperative Situation zu extrapolieren, bei der es zu einer zerebralen Ischämie kommen kann (z.B. Thrombendarteriektomie, Neurochirurgie, Herzchirurgie mit extrakorporaler Zirkulation). Entscheidend für den anästhesiologischen Denkansatz ist dabei, dass die zerebrale Ischämie erst dann induziert wird, wenn das Äquilibrium des zu

untersuchenden Narkosemittels erreicht wird. Auf diese Weise wird sowohl während, als auch nach der Ischämiephase der Effekt der Narkotika Sevofluran und Propofol auf das Ausmaß der zerebralen Ischämie untersucht.

Der hier gewählte Versuchsansatz ist daher weniger geeignet Auswirkungen dieser Narkotika auf Ischämien zu untersuchen, die präoperativ entstehen, wie z.B. Schädel-Hirn-Trauma und Schlaganfall, in Situationen, in denen Sevofluran und Propofol erst postischämisch zur Anwendung kommen können.

Um potentiell zerebroprotektive Effekte der Narkotika Sevofluran und Propofol quantifizieren zu können, mussten Tiere, die mit Sevofluran oder Propofol anästhesiert waren, mit solchen verglichen werden, die eine geeignete Hintergrundanästhesie hatten. Frühere Untersuchungen bei Ratten oder Primaten mit fokaler oder fast kompletter Vorderhirnischämie zeigten für Isofluran keine zerebroprotektiven Effekte im Vergleich zur Anästhesie mit Halothan oder Barbituraten [108](S.878) [103](S.797) [35](S.680-681) [91](S.224-225). Andererseits wurde bei Ratten, die während und nach Induktion sowohl einer inkompletten Hemisphärenischämie als auch einer fokalen Ischämie mit Isofluran oder Sevofluran anästhesiert wurden, eine deutliche Reduktion der ischämieassoziierten Mortalität, des neurologischen Defizits und der Infarktgröße beobachtet im Vergleich zu Kontrolltieren, die nur leicht anästhesiert oder wach waren [5](S.194-197) [53](S.280) [102](S.988).

Für die Kontrollgruppe wurde eine Kombination aus Fentanyl (Bolus von 10µg/kg Fentanyl i.v. und anschließende Dauerinfusion von 25 µg/kg/h Fentanyl) und einem Sauerstoff-Lachgasgemisch ($FiO_2=0,33$) als Hintergrundanästhesie gewählt, weil der zerebrale und der spinale Blutfluss bei Tieren unter Fentanyl/Lachgas-Narkose dem wache Tiere entspricht [55](S.33). Außerdem unterscheidet sich die Autoregulation des zerebralen Blutflusses bei wachen Tieren nicht signifikant von mit Fentanyl/Lachgas anästhesierten Ratten. Im Vergleich zur Mononarkose mit Lachgas ist der zerebrale Sauerstoffverbrauch unter Fentanyl/Lachgasnarkose nicht reduziert [10](S.377-378). Somit wurde durch die Fentanyl/Lachgas-Narkose einerseits eine hinreichende Analgesie gewährleistet, und andererseits hinsichtlich Durchblutung und Metabolismus des Gehirns Bedingungen geschaffen, die dem Wachzustand sehr ähnlich sind.

Ein modellimmanenter Vorteil besteht bei unserem Ischämiekonzept in der direkten Vergleichbarkeit der rechten und linken Hemisphäre, da nur die rechte A. carotis communis ligiert wurde. Allerdings ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten, dass sich die Senkung des MAP auf beide Hemisphären auswirkt.

Glukosekonzentration

Der negative Einfluss einer erhöhten Glukosekonzentration während zerebraler Ischämie ist seit Jahren bekannt. Unter hypoxischen Bedingungen trägt eine erhöhte Glukosekonzentration zur Verstärkung der Hypoxie während Ischämie bei, da die Glykolyse ein Sauerstoff- und Energie- verbrauchender Prozess ist, der unter hypoxischen Bedingungen zu einer Verstärkung der Gewebsazidose durch Laktatbildung führt [94](S.179-180) [93](S.341-343). Bei verstärkter zerebraler Gewebsazidose sind ausgeprägtere perifokale Ödeme, sowie eine erhöhte Neigung zu postischämischen epileptischen Krampfanfälle beschrieben [95](S.254).

Vor Versuchsbeginn wurde eine 12-stündige Nahrungskarenz eingehalten, um einen intraintrischämischen stressbedingten Anstieg der Glukosekonzentration zu vermeiden [106](S.757).

Hoffman und Mitarbeiter haben beobachtet, dass das neurologische Endergebnis bei nüchternen Ratten, die einer zerebralen Ischämie unterzogen wurden besser war als bei nicht-nüchternen und hyperglykämischen Tieren [50](S.1046-1047).

Dabei wurde nachgewiesen, dass hyperglykämische Tiere zwar während der Ischämie einen besseren Energiestatus hatten, sichtbar durch einen höheren zerebralen ATP-Gehalt im ischämischen Gebiet, aber deren Langzeitergebnisse bzgl. neurologischem Endergebnis und neuronalem Schaden wesentlich schlechter waren verglichen mit hypoglykämischen Tieren [50](S.1048).

Werner und Mitarbeiter fanden bei Ratten mit inkompletter zerebraler Ischämie unter Anästhesie mit Sevofluran 1,98 Vol.% ein besseres neurologisches Endergebnis und einen geringeren zellulären Schaden verglichen mit einer Fentanyl/Lachgasnarkose. Das bessere neurologische und pathohistologische Endergebnis unter Sevoflurannarkose konnte auch durch künstliche Erhöhung der intraintrischämischen Glukosekonzentration bei mit Sevofluran-anesthetisierten Ratten nicht aufgehoben werden. Dies zeigt, dass die erniedrigte Glukosekonzentration unter Sevoflurannarkose nicht der Hauptschutzmechanismus dieses volatilen Anästhetikums ist, da keine Korrelation zwischen Verbesserung des neurologischen Endergebnis und Glukosekonzentration zu finden ist [106](S.758). In einer ähnlich konzipierten Studie von Kochs und Mitarbeitern konnte für die Anästhesie mit Propofol ebenfalls keine Korrelation zwischen verbessertem neurologischem Endergebnis und Glukosekonzentration gefunden werden, was auch für Propofol andere Schutzmechanismen nahe legt [64](S.249).

pH-Wert

Der pH-Wert wurde während des gesamten Versuchs bei allen Tieren durch basenabweichungsgesteuerte Infusion von Natriumbikarbonat (vgl.3.2) konstant gehalten, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. Die basenabweichungsgesteuerte Pufferung ist als

Bestandteil des Modells der inkompletten Hemisphärenischämie beschrieben [105](S.924) [106](S.757) [52](S.756) [5](S.193).

Hämoglobinkonzentration

Die Hämoglobinkonzentration zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Nach Induktion der hämorrhagischen Hypotension nahm die Hämoglobinkonzentration in den Gruppen 1-3 ab und wurde nach Retransfusion des entnommenen Blutes wieder auf die Ausgangswerte angehoben.

Hämodynamik

Bei den mit Fentanyl/Lachgas anästhesierten Kontrolltieren waren Herzfrequenz und MAP signifikant höher als in der Sevofluran- und Propofolgruppe. Hinsichtlich der Narkosetiefe spiegelt dies die Wirksamkeit von Fentanyl/Lachgas als Hintergrundanästhesie wieder.

In der Propofol- und Sevoflurangruppe fand sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein niedriger MAP als Ausdruck einer hinreichenden Narkosetiefe, sowie des vasodilatierenden Effektes beider Anästhetika [110](S.180) [26](S.681).

5.4 Diskussion der verwendeten Methoden

Laser-Doppler-Flussmessung (LDF)

Die LDF ist eine sehr exakte Methode zur kontinuierlichen Messung der zerebralen Durchblutung. Dirnagl und Mitarbeiter evaluierten die Genauigkeit und Verlässlichkeit der Methode in einem fokalen zerebralen Ischämiemodell bei der Ratte. Sie verglichen die etablierte Methode der Autoradiographie mit [¹⁴C]-Iodoantipyrin als Trägersubstanz mit der Laser-Doppler-Flussmessung. Die absoluten Werte der LDF korrelierten sehr schlecht mit den absoluten Werten der [¹⁴C]-Iodoantipyrin-Messung. Die Ergebnisse der relativen Veränderungen für beide Methoden aber korrelierten sehr gut miteinander, so dass die LDF als ein zuverlässiger Indikator für die relativen Durchblutungsänderungen gesehen werden kann [28](S.591-595). Entscheidender Vorteil der LDF gegenüber der Autoradiographie ist die kontinuierliche Messung in vivo, die keine Beeinflussung der Perfusion zur Folge hat und eine sofortige Erfassung von Manipulation an der zerebralen Durchblutung erlaubt [82](S.17-24). Die Messsonde erfasst den zerebralen Blutfluss in einem Messareal von 1 mm³. Der gemessene Wert kann daher nur als repräsentativer, aber dennoch valider Wert, für die Gesamtdurchblutungssituation im untersuchten Gehirngewebe verstanden werden.

In unserem Versuchsaufbau (vgl.3.6.2) wurde die Schädelkalotte nicht penetrierend aufgefäst. Dadurch war das Gehirn vor mechanischem Kontakt mit der Sonde, gegen Austrocknung und chemische Reize (z.B. Kochsalzlösung) geschützt. Durch die geringe Dicke der ausgedünnten Kalotte und ihre vernachlässigbare Lichtabsorption konnten valide Messdaten erhoben werden, zumal die Eindringtiefe des Lasers in der Literatur mit 1000 μm angegeben wird und die Dicke der verbliebenen Kalotte zusammen mit der darunterliegenden Dura ca. 20 μm beträgt [28](S.594).

Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz ist eine etablierte Methode der In-situ-Detektion von apoptoseassoziierten Proteinen im Rattenhirn [70](S.95). Ihr großer Vorteil besteht in der Möglichkeit, die räumliche Verteilung der detektierten Proteine zu analysieren und dabei zu unterscheiden, ob ein zytoplasmatisches oder karyotisches Verteilungsmuster von Bax, Bcl-2 oder p53 vorliegt [58](S.57). Außerdem bietet die Fluoreszenztechnik die Möglichkeit der semi-quantitativen Analyse der Proteinmenge mit einem konfokalen Lasermikroskop (s.u.).

Zu Beginn des Versuchs wurde die Spezifität der Primärantikörper dadurch bewiesen, dass ein sog. blockierendes Peptid verwendet wurde, welches das Fab-Fragment des verwendeten Antikörpers spezifisch bindet und so eine spezifische Bindung des Primärantikörpers an das Zielantigen im Gewebe unmöglich macht. Bei der Verwendung des blockierenden Peptids zeigte sich keine Immunfluoreszenzfärbung. So konnten wir zeigen, dass nur die Bindungs-determinanten des ersten Antikörpers spezifisch an das Zielprotein auf dem Gewebsschnitt gebunden hat und es zu keiner unspezifischen Wechselwirkung des Primärantikörpers mit dem Gewebe gekommen ist [65](S.1326). Bei jeder einzelnen Färbung wurden von uns Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt, um so Färbefehler jeweils ausschließen zu können. Zum Eindecken der gefärbten Schnitte verwendeten wir ein Eindeckmedium, welches die Fluoreszenz vor frühzeitigem Verblässen in besonderem Maße schützte. Durch einen konstanten zeitlichen Abstand zwischen der Färbung und der Auswertung und Dokumentation der Färbung und durch konsequenten Lichtschutz wurden äußere Einflüsse minimiert (vgl. 3.6.5.2). Unsere Ergebnisse lassen sich somit nicht durch Schwankungen der Fluoreszenz, welche durch unterschiedlich lange Liegedauer bedingt sein könnten, erklären.

Auswahl der Hippokampusregion

Die Hippokampusregion des Rattenhirns wurde von uns als repräsentative und gut untersuchte Region des Gehirns gewählt. Der Hippokampus ist durch die Okklusion der A. carotis communis mit Hypotension von einer Minderperfusion stark betroffen, so dass in diesem experi-

mentellem Modell mit Sicherheit ein Schaden zu erwarten ist [5](S.195-196). Die Regionen des Hippokampus sind selektiv vulnerabel, wobei die CA1- und die CA4-Region ischämieempfindlicher sind als die CA3-Region und der Gyrus dentatus, die als ischämie-resistenter gelten [96](S.323-331). Krajewski und Mitarbeiter fanden, dass die CA1-Region primär eine höhere Bax-Grundexpression und eine niedrigere Bcl-2-Konzentration aufweist und dass sich dies bei der CA3-Region genau umgekehrt verhält. Bcl-2 kommt zusammen mit erhöhten Glutathionspiegeln vor, was einen erhöhten Oxidationsschutz darstellt. Zellen, die selektiv vulnerabel sind weisen neben erniedrigten Bcl-2-Spiegel auch erniedrigte Glutathion-Peroxidase-Spiegel auf. [109](S.4)

Westernblot

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Immunfluoreszenz wurde der Westernblot gewählt, der als Goldstandard der semiquantitativen Proteinanalytik gilt. Sowohl beim Westernblot, als auch bei der Immunfluoreszenz werden Proteine nachgewiesen. Gegenüber Methoden, die mRNA nachweisen, wie z.B. Northernblot oder In-situ-Hybridisierung [16](S.3-4), wird durch den Westernblot und die Immunfluoreszenz das agierende Substrat, nämlich das Protein selbst nachgewiesen. Der Nachweis von mRNA ist zwar die sensitivere Methode, aber mit ihr kann nicht bestätigt werden, ob das Genprodukt (das Protein) tatsächlich synthetisiert wird.

Analog zur Immunfluoreszenzfärbung konnten wir für den Westernblot vor Versuchsbeginn die Spezifität der Proteindetektion durch Verwendung von Peptiden, die den Primärantikörper spezifisch blockierten, zeigen.

Möglicherweise war die Proteinbiosynthese zum Zeitpunkt vier Stunden nach Reperfusion noch nicht vollständig abgeschlossen, oder infolge der Ischämie durch Energiemangel eingeschränkt [3](S.884-885).

Die Diskrepanz zwischen nachgewiesener mRNA und fehlendem Nachweis entsprechender Genprodukte in der CA1-, CA3- und Gyrus-dentatus-Region ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben [16](S.6) [109](S.3).

5.5 Geplante weitere Untersuchungen

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von Sevofluran und Propofol auf die Expression von Apoptosefaktoren bei einer inkompletten zerebralen Hemisphärenischämie vier Stunden nach Reperfusion untersucht. Wir konnten mit dieser Untersuchung zeigen, dass die Narkose mit Sevofluran und Propofol zu einer Unterdrückung des proapoptotischen Proteins Bax geführt hat. In diesem Versuchsansatz ist keine Aussage über die Langzeitprognose möglich. Es muss geklärt werden, ob sich die positive Tendenz, die auf molekularbiologischer Ebene

erkennbar wurde, auch nach längerer Überlebensdauer fortsetzt. Das vorliegende Modell muss auf verschiedenen Ebenen ausgebaut werden. Die molekularbiologischen Veränderungen sollten im zeitlichen Verlauf analysiert werden.

Isemann und Mitarbeiter untersuchten die unterschiedliche Regulation der Proteine Bax, Bcl-2, Bcl-x mit Immunhistochemie und Westernblotanalyse und das Ausmaß der DNA-Fragmentation mit Hilfe der TUNEL-Reaktion vier und 12 Stunden, sowie 1, 2, 3, 6 und 14 Tag nach fokaler kortikaler Ischämie der Ratte. Im Zentrum der Läsion war die Expression von Bax zwischen 4 Stunden und 3 Tagen maximal erhöht, in den gleichen Zellen fanden sich erniedrigte Expressionsraten für die antiapoptotischen Bcl-2 und Bcl-x. Im Zentrum der Ischämie konnten DNA-Strangbrüche erst nach einem Tag mit der TUNEL-Färbung detektiert werden. Die Expression der Proteine Bcl-2 und Bcl-x wurde vor allem im Randbereich der Ischämie induziert [58](S.55-59). Ausgehend von diesen Ergebnissen ist unter Beibehaltung der Versuchsgruppen (vgl. 3.1) eine Untersuchung nach 1, 3, 7 und 28 Tagen anhand unseres Modells sinnvoll. Insbesondere ist dabei zu klären, welchen zeitlichen Verlauf die Expressionsmuster von Bax, p53, Bcl-2 und Mdm-2 im vorliegenden Ischämiemodell unter Fentanyl/Lachgasnarkose haben, ob die Expression von p53 und Bax in diesem Modell zur Induktion von Apoptose führt und in welchem Ausmaß dies geschieht, welchen Einfluss Sevofluran und Propofol auf dieses Expressionsmuster haben, und ob die Anästhetika nur eine Verzögerung der Apoptose bewirken oder ob sie die Induktion von Apoptose tatsächlich verhindern können.

Apoptose sollte durch die gleichzeitige Anwendung morphologischer und biochemischer Kriterien festgestellt werden. Morphologische Kriterien können in der HE-Färbung analysiert werden. Als biochemische Marker eignen sich die TUNEL (Terminale Transferase dUTP-nick-end-labelling) –Färbung [12](S.61-62) [17](S.233-234) oder die Detektion aktivierter Caspase-3, deren Vorkommen als relativ apoptosespezifisch gilt [31](S.812-813, 820-823) [113](S.5027).

In einem Verhaltenstest muss geklärt werden, ob Effekte, die auf biochemischer Ebene protektiv erscheinen, auch tatsächlich zu einer verbesserten motorischen und kognitiven Leistung der Tiere führen. Die gewählten Tests sollten so sensitiv sein, dass auch dezente Verbesserungen der Leistung erfasst werden können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Bei zerebraler Ischämie im Rahmen eines Schädel-Hirn-Traumas oder eines Apoplex droht der irreversible Untergang von Gehirnzellen. Die daraus resultierenden Schäden können von leichten motorischen Beeinträchtigungen bis hin zum apallischen Syndrom reichen. Ein frühes gezieltes therapeutisches Eingreifen ist prognostisch entscheidend, da die Sauerstoff- und Glukosereserven des Gehirns unter ischämischen Bedingungen sehr begrenzt sind. Der resultierende Energiemangel führt zu einer Störung des Elektrolythaushaltes der Zellen und zur Aktivierung verschiedener Stoffwechsellaskaden. Wird der Mangelzustand nicht behoben, droht der Zelltod im Form von Nekrose oder Apoptose.

Neben konservativen Therapieoptionen wie z.B. der moderaten Hyperventilation oder der Infusion hyperosmolarer Lösungen, kommt der operativen Behandlung (Revaskularisation, bzw. chirurgische Versorgung des Schädel-Hirn-Traumas) besondere Bedeutung zu. Der Therapieerfolg kann dabei durch mögliche zerebroprotektive Effekte der Narkose unterstützt werden.

Speziell für Sevofluran und Propofol wurden tierexperimentell zerebroprotektive Wirkungen durch Verbesserung des neurologischen Endergebnisses und Reduktion von Nekrose nachgewiesen. Der vorliegende Versuchsansatz trägt zur Beantwortung der bisher noch ungeklärten Frage bei, ob eine Narkose mit diesen Anästhetika die Regulation der Apoptosefaktoren Bax, Bcl-2, Mdm-2 und p53 bei inkompletter zerebraler Hemisphärenischämie der Ratte beeinflusst und es zu einer Reduktion des apoptotischen Zellschadens kommt, der auf molekularbiologischer Ebene fassbar ist. Dementsprechend wurde die Suppression proapoptotischer bzw. die Expression antiapoptotischer Proteine postuliert.

Es wurden 36 männliche Sprague-Dawley-Ratten anästhesiert, intubiert und instrumentiert. Nach einem Randomisierungsplan wurden die Tiere entweder mit Fentanyl/Lachgas (Bolus von 10 µg/kg i.v. Fentanyl und Dauerinfusion von 25 µg/kg/h Fentanyl und Sauerstoff-Lachgasgemisch (FiO₂=0,33), Gruppe 1, Kontrollgruppe, n=9), oder 1,0 MAC Sevofluran (2,0 Vol% endexpiratorische Konzentration in O₂/Luft-Gemisch (FiO₂=0,33) Gruppe 2, n=9), oder Propofol (1,0 mg/kg/min. i.v. Propofol, Beatmung O₂/Luft-Gemisch (FiO₂=0,33) Gruppe 3, n=9) narkotisiert. Bei den Tieren der Gruppe 1-3 wurde eine 30-minütige inkomplette Hemisphärenischämie durch Induktion einer hämorrhagischen Hypotension (MAP 35 mmHg) und Ligatur der rechten A. carotis communis hervorgerufen. Als Endpunkt der zerebralen Ischämie wurde eine 70 %-ige Reduktion der ipsilateralen zerebralen Perfusion definiert, die mit Laser-Doppler-Sonden gemessen wurde. Danach folgte eine 4-stündige Reperfusion. Eine Scheinversuchsgruppe ohne Induktion einer zerebralen Ischämie (Gruppe 4, n=9), wurde dem selben

Narkoseregime unterzogen wie Gruppe 1. Am Protokollende wurden alle Tiere unter Vollnarkose dekapitiert und das Gehirn zur Gewebedissektion entnommen. Die Apoptosefaktoren p53, Bax, Bcl-2 und Mdm-2 wurden mittels Immunfluoreszenztechnik und Westernblotanalyse im Hippokampus des Rattenhirns semiquantitativ bestimmt. Der histopathologische Schaden wurde mit der Hämatoxylin-Eosinfärbung erhoben.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung und der Westernblotanalyse zeigen in Übereinstimmung, dass nur in der Kontrollgruppe die Menge des proapoptischen Proteins Bax signifikant zugenommen hatte und dass das Protein p53 tendenziell erhöht war im Vergleich zur Scheinversuch-, Sevofluran- und Propofolgruppe. Die Analyse der anderen Apoptosefaktoren Bcl-2 und Mdm-2 ergab keinen signifikanten Gruppenunterschied. In Kongruenz zur Erhöhung von proapoptischen Bax-Protein in der Kontrollgruppe wurde der größte histomorphologische Schaden ebenfalls in dieser Gruppe mittels Hämatoxylin-Eosinfärbung nachgewiesen.

Die systemischen Variablen (Hämodynamik, arterielle Blutgase, Glukose i.S., Körperkern-temperatur) lagen in jeder Gruppe während der gesamten Reperfusionphase innerhalb physiologischer Grenzen.

Nach der vierstündigen Reperfusionzeit zeigte sich daher sowohl für Propofol als auch für Sevofluran durch die fehlende Erhöhung von Bax-Protein ein zerebroprotektiver Effekt. Unter Sevofluran- oder Propofolnarkose schienen die Neuronen besser gegen ischämieinduzierte exzitatorische Reize geschützt zu sein. Möglicherweise ist dieser Effekt durch verstärkte zelluläre Aufnahme von Glutamat unter Sevoflurannarkose bei gleichzeitiger Stimulation von inhibitorischen GABA-Rezeptoren zu erklären. Dem Anästhetikum Propofol wird eine abschwächende Wirkung am NMDA-Rezeptor und ebenfalls eine Stimulation des GABA-Rezeptors zugeschrieben. Die genannten Mechanismen tragen zur Stabilisierung des Membranpotentials und zur einer besseren Abschirmung der Neurone bei, was eventuell einen Anstieg der Expression von Bax verhindert hat.

In weiteren Studien muss geklärt werden, ob sich der zerebroprotektive Effekt, der nach 4 Stunden Reperfusion sichtbar ist, auch nach einer längeren Reperfusionzeit fortsetzt.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Ankarcona, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A., Nicotera, P., Glutamate-Induced Neuronal Death: A Succession of Necrosis or Apoptosis Depending on Mitochondrial Function, *Neuron*, 15 (1995) 961-973.
- 2 Antonawich, F.J., Federoff, H.J., Davis, J.N., Bcl-2 Transduction, Using a Herpes Simplex Virus Amplicon, Protects Hippocampal Neurons from Transient Global Ischemia, *Exp Neurol*, 156 (1999) 130-137.
- 3 Antonawich, F.J., Krajewski, S., Reed, J., Davis, J.N., Bcl-x₁/ bax Interaction after Transient Global Ischemia, *J Cereb Blood Flow Metab*, 18 (1998) 882-886.
- 4 Antonsson, B., Montesscuit, S., Lauper, S., Eskes, R., Martinou, J.-C., Bax Oligomerization is Required for Channel Activity in Liposomes undto Trigger Cytochrome C Release from Mitochondria, *Biochem J*, 345 (2000) 271-278.
- 5 Boughman, V.L., Hoffmann, W.E., Miletich, D.J., Albrecht, R.F., Thomas, C., Neurologic Outcome in Rats Following Incomplete Cerebral Ischemia during Halothane, Isoflurane, or N₂O, *Anesthesiology*, 69 (1988) 192-198.
- 6 Bianchi, M., Battistin, T., Galzigna, L., 2,6-Diisopropylphenol, a General Anesthetic, Inhibits Glutamate Action on Rat Synaptosomes, *Neurochem Res*, 16 (1991) 443-446.
- 7 Bradford, M.M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing of Principle of Protein-Dye Binding, *Anal Biochem*, 72 (1976) 248-254.
- 8 Branston, N.M., Strong, A.J., Symon, L., Extracellular Potassium Activity, Evoked Potential and Tissue Blood Flow, *J Neurol Sci*, 32 (1977) 305-321.
- 9 Bredesen, D.E., Neural Apoptosis, *Ann Neurol*, 38 (1995) 839-851.

- 10 Carlsson, C., Smith, D.S., Keyhah, M.M., Englebach, I., Harp, J.R., The Effects of High-Dose Fentanyl on Cerebral Circulation and Metabolism in Rats, *Anesthesiology*, 57 (1982) 375-380.
- 11 Chalmers-Redman, R.M.E., Fraser, A.D., Ju, W.Y.H., Wadia, J., Tatton, N.A., Tatton, W.G., Mechanisms of Nerve Cell Death: Apoptosis or Nekrosis after Cerebral Ischemia. In: Neuroprotective Agents and Cerebral Ischaemia, Green, A.R., Cross, A.J. (Hrsg.), Academic Press, San Diego, 1997, 1-15.
- 12 Charriaut-Marlangue, C., Ben-Ari, Y., A Cautionary Note on the Use of the TUNEL Stain to Determine Apoptosis, *NeuroReport*, 7 (1995) 61-64.
- 13 Charriaut-Marlangue, C., Margaille, I., Plotkine, M., Ben-Ari, Y., Early Endonuclease Activation Following Reversible Focal Ischemia in the Rat Brain, *J Cereb Blood Flow Metab*, 15 (1995) 385-388.
- 14 Charriaut-Marlangue, C., Remolleau, S., Aggoun-Zouaoui, D., Ben-Ari, Y., Apoptosis and Programmed Cell Death: A Role in Cerebral Ischemia, *Biomed Pharmacother*, 52 (1998) 264-269.
- 15 Chen, J., Graham, S.H., Chan, P.H., Lan, J., Zhou, R.L., Simon, R.P., Bcl-2 is Expressed in Neurons that Survive Focal Ischemia in the Rat, *NeuroReport*, 6 (1995) 394-398.
- 16 Chen, J., Graham, S.H., Nakayama, M., Zhu, R.L., Jin, K., Stetler, R.A., 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*, 17 (1997) 2-10.
- 17 Chen, J., Jin, K., Chen, M., Pei, W., Kawaguchi, K., Greenberg, D.A., Simon, R.P., Early Detection of DNA Strand Breaks in the Brain after Transient Focal Ischemia: Implication for the Role of DNA Damage in Apoptosis and Neuronal Cell Death, *J Neurochem*, 69 (1997) 232-245.
- 18 Chen, J., Wu, X., Lin, J., Levine, A.J., Mdm-2 Inhibits the G1 Arrest and Apoptosis Functions of the p53 Tumor Suppressor Protein, *Mol Cell Biol*, 16 (1996) 2445-2452.

- 19 Choi, D.W., Calcium: Still Center-Stage in Hypoxic-Ischemic Neuronal Death, *Trends Neurosci*, 18 (1995) 58-60.
- 20 Choi, D.W., Ischemia-induced Neuronal Death, *Curr Opin Neurobiol*, 6 (1996) 667-672.
- 21 Chopp, M., Chan, P.H., Hsu, C.Y., Cheung, M.E., Jacobs, T.P., DNA Damage and Repair in Central Nervous System Injury, *Stroke*, 27 (1996) 363-369.
- 22 Chopp, M., Li, Y., Apoptosis in Focal Cerebral Ischemia, *Acta Neurochir*, [Suppl] 66 (1996) 21-26.
- 23 Chopp, M., Li, Y., Zhang, Z.G., Freytag, S.O., P53 Expression in Brain after Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat, *Biochem Biophys Res Commun*, 182 (1992) 1201-1207.
- 24 Clarke, P.G.H., Developmental Cell Death: Morphological Diversity and Multiple Mechanisms, *Anat Embryol*, 181 (1990) 185-213.
- 25 Coa, G., Minami, M., Pei, W., Yan, C., Chen, D., O'Horo, C., Graham, S.H., Chen, J., Intracellular Bax Translocation After Transient Cerebral Ischemia: Implications for a Role of the Mitochondrial Apoptotic Signaling Pathway in Ischemic Neuronal Death, *J Cereb Blood Flow Metab*, 21 (2001) 321-333.
- 26 Conzen, P., Nuscheler, M., Neue Inhalationsanästhetika, *Anaesthesist*, 45 (1996) 674-693.
- 27 DeGirolami, U., Crowell, R.M., Marcoux, F.W., Selective Necrosis and Total Necrosis in Focal Cerebral Ischemia. Neuropathologic Observations on Experimental Middle Cerebral Artery Occlusion in the Macaque Monkey, *J Neuropathol Exp Neurol*, 43 (1984) 57-71.
- 28 Dirnagl, U., Kaplan, B., Jacewicz, M., Pulsinelli, W., Continuous Measurement of Cerebral Cortical Blood Flow by Laser-Doppler Flowmetry in a Rat Stroke Model, *J Cereb Blood Flow Metab*, 9 (1989) 589-596.

- 29 Drummond, J.C., Shapiro, H.M., Cerebral Physiology. In: R.J. Miller (Ed.), *Anesthesia*, Churchill Livingstone, New York, 1994, 689-729.
- 30 Dugan, L.L., Choi, D.W., Hypoxic-Ischemic Brain Injury and Oxidative Stress. In: G.J. Siegel (Ed.), *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medial Aspects*, Vol.6, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999, 711-729.
- 31 Eldadah, B.A., Faden, A.I., Caspase Pathways, Neuronal Apoptosis, and CNS Injury, *J Neurotrauma*, 17 (2000) 811-829.
- 32 Evan, G., Littlewood, T., A Matter of Life and Cell Death, *Science*, 281 (1998) 1317-1322.
- 33 Fasano, V.A., Urciuoli, R., Bolognese, P., Mostert, M., Intraoperative Use of Laser Doppler in the Study of Cerebral Microvascular Circulation, *Acta Neurochir*, 95 (1988) 40-48.
- 34 Fitch, W., Brain Metabolism. In: *Anesthesia and Neurosurgery*, Cottrell, J.E., Smith, D.S. (Hrsg.), Mosby Verlag, St. Louis, 1994, 3. Band , 1-16.
- 35 Gelb, A.W., Boisvert, D.P., Tang, C., Lam, A.M., Marchak, B.E., Dowman, R., Mielke, B.W., Primate Brain Tolerance to Temporary Focal Cerebral Ischemia During Isoflurane- or Sodium Nitroprussid-Induced Hypotension, *Anesthesiology*, 70 (1989) 678-683.
- 36 Gillardon, F., Lenz, C., Waschke, K.F., Krajewski, S., Reed, J., Zimmerman, M., Kuschinsky, W., Altered Expression of Bcl-2, Bcl-x, Bax, and C-fos Colocalizes with DNA Fragmentation and Ischemic Cell Damage Following Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats, *Mol Brain Res*, 40 (1996) 254-260.
- 37 Ginsberg, M.D., Busto, R., Rodent Models of Cerebral Ischemia, *Stroke*, 20 (1989) 1627-1642.
- 38 Graham, D.I., Lantos, P.L., *Greenfield's Neuropathology*, Arnold, London, 6. Auflage, 1997, 86-90

- 39 Graham, S.H., Chen, J., Programmed Cell Death in Cerebral Ischemia, *J Cereb Blood Flow Metab*, 21 (2001) 99-109.
- 40 Hale, A.J., Smith, C.A., Sutherland, L.C., Stoneman, V.E.A., Longthorne, V.L., Culhane, A.C., Williams, G.T., Apoptosis: Molecular Regulation of Cell Death, *Eur J Biochem*, 236 (1996) 1-26.
- 41 Hans, P., Bonhomme, V., Collette, J., Albert, A., Moonen, G., Propofol Protects Cultured Rat Hippocampal Neurons Against N-Methyl-D-Aspartat Receptor-Mediated Glutamat Toxicity, *J Neurosurg Anesthesiol*, 6 (1994) 249-253.
- 42 Hara, A., Iwai, T., Niwa, M., Uematsu, T., Yoshimi, N., Tanaka, T., Mori, H., Immunohistochemical Detection of Bax and Bcl-2 Proteins in Gerbil Hippocampus Following Transient Forebrain Ischemia, *Brain Res*, 711 (1996) 249-253.
- 43 Hara, M., Kai, Y., Ikemoto, Y., Propofol Activates GABA_A Receptor-Chlorid Ionophore Complex in Dissociated Hippocampal Pyramidal Neurons of the Rat, *Anesthesiology*, 79 (1993) 781-788.
- 44 Harada, K., Iwata, M., Kono, N., Koda, W., Shimonishi, T., Nakanuma, Y., Distribution of Apoptotic Cells and Expression of Apoptosis-Related Proteins along the Intrahepatic Biliary Tree in Normal and Non-Biliary Diseased Liver, *Histopathology*, 37 (2000) 347-354.
- 45 Haupt, Y., Barak, Y., Oren, M., Cell Type-Specific Inhibition of p53-Mediated Apoptosis by Mdm-2, *EMBOJ*, 15 (1996) 1596-1606.
- 46 Heaton, M.B., Moore, D.B., Paiva, M., Gibbs, T., Bernard, O., Bcl-2 Overexpression Protects the Neonatal Cerebellum from Ethanol Neurotoxicity, *Brain Res*, 817 (1999) 13-18.
- 47 Hirota, K., Roth, S.H., Sevofluran Modulates Both GABA_A and GABA_B Receptors in Area CA1 of Rat Hippocampus, *Br J Anaesth*, 78 (1997) 60-65.

- 48 Hockenbery, D.M., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., Korsmeyer, S.J., Bcl-2 is an Inner Mitochondrial Membrane Protein that Blocks Programmed Cell Death, *Nature*, 348 (1990) 334-336.
- 49 Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.-M., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., Bcl-2 Functions in an Antioxidant Pathway, *Cell*, 75 (1993) 241-251.
- 50 Hoffmann, W.E., Braucher, E., Pelligrino, D.A., Thomas, C., Albrecht, R.F., Miletich, D.J., Brain Lactate and Neurologic Outcome Following Incomplete Ischemia in Fasted, Nonfasted, and Glucose-Loaded Rats, *Anesthesiology*, 72 (1990) 1045-1050.
- 51 Hoffmann, W.E., Kochs, E., Werner, C., Thomas, C., Albrecht, R.F., Dexmedetomidine Improves Neurologic Outcome from Incomplete Ischemia in the Rat, *Anesthesiology*, 75 (1991) 328-332.
- 52 Hoffmann, W.E., Pelligrino, D., Werner, C., Kochs, E., Albrecht, R.F., Schulte am Esch, J., Ketamine Decreases Plasma Catecholamines and Improves Outcome from Incomplete Cerebral Ischemia in Rats, *Anesthesiology*, 76 (1992) 755-762.
- 53 Hoffmann, W.E., Thomas, C., Albrecht, R.F., The Effect of Halothane and Isoflurane on Neurologic Outcome Following Incomplete Cerebral Ischemia in the Rat, *Anesth Analg*, 76 (1993) 279-283.
- 54 Hoffmann, W.E., Werner, C., Baughman, V.L., Thomas, C., Miletich, D.J., Albrecht, R.F., Postischemic Treatment with Hypothermia Improves Outcome from Incomplete Cerebral Ischemia in Rats, *J Neurosurg Anes*, 3 (1991) 34-38.
- 55 Hoffmann, W.E., Werner, C., Kochs, E., Segil, L., Edelmann, G., Albrecht, R.F., Cerebral and Spinal Cord Blood Flow in Awake and Fentanyl-N₂O Anesthetized Rats: Evidence for Preservation of Blood Flow Autoregulation during Anesthesia, *J Neurosurg Anes*, 4 (1992) 31-35.
- 56 Hughes, P.E., Alexi, T., Yoshida, T., Schreiber, S.S., Knusel, B., Excitotoxic Lesion of Rat Brain with Quinolinic Acid Induces Expression of p53 Messenger RNA and Proteins and p53-Inducible Genes Bax and Gadd-45 in Brain Areas Showing DNA Fragmentation, *Neuroscience*, 74 (1996) 1143-1160.

- 57 Hupp, T.R., Lane, D.P., Ball, K.L., Strategies for Manipulating the p53 Pathway in the Treatment of Human Cancer, *Biochem J*, 352 (2000) 1-17.
- 58 Isenmann, S., Stoll, G., Schroeter, M., Krajewski, S., Reed, J.C., Bähr, M., Differential Regulation of Bax, Bcl-2, and Bcl-x Proteins in Focal Cortical Ischemia in the Rat Brain, *Brain Pathol*, 8 (1998) 49-63.
- 59 Jones, S.N., Roe, A.E., Donehower, L.A., Bradley, A., Rescue of Embryonic Lethality in Mdm2-Deficient Mice by Absence of p53, *Nature*, 378 (1995) 206-208.
- 60 Kanzler, S., Galle, P.R., Apoptosis in the Liver, *Semin Cancer Biol*, 10 (2000) 173-184.
- 61 Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics, *Br J Cancer*, 26 (1972) 239-257.
- 62 Kitagawa, K., Matsumoto, M., Tsujimoto, Y., Ohtsuki, T., Kuwabara, K., Matsushita, K., Yang, G., Tanabe, H., Martinou, J.-C., Hori, M., Yanagihara, T., Amelioration of Hippocampal Neuronal Damage after Global Ischemia by Neuronal Overexpression of Bcl-2 in Transgenic Mice., *Stroke*, 29 (1998) 2616-2621.
- 63 Kliche, K.-O., Clement, J.H., Höffken, K., Apoptose, Mechanismen, Regulation und Therapeutische Modulation als Klinische Perspektive, *Onkologe*, 5 (1999) 891-897.
- 64 Kochs, E., Hoffmann, W.E., Werner, C., Thomas, C., Albrecht, R.F., Schulte am Esch, J., The Effects of Propofol on Brain Electrical Activity, Neurologic Outcome, and Neurological Damage Following Incomplete Ischemia in Rats, *Anesthesiology*, 76 (1992) 245-252.
- 65 Krajewski, S., Krajewski, M., Shabaik, A., Miyashita, T., Wang, H.G., Reed, J.C., Immunohistochemical Determination of in Vivo Distribution of Bax, a Dominant Inhibitor of Bcl-2., *Am J Pathol*, 145 (1994) 1323-1336.
- 66 Krajewski, S., Mai, J.K., Krajewski, M., Sikorska, M., Mossakowski, M.J., Reed, J.C., Upregulation of Bax Protein Levels in Neurons Following Cerebral Ischemia., *J Neurosci*, 15 (1995) 6364-6376.

- 67 Kristián, T., Siesjö, B.K., Calcium in Ischemic Cell Death, *Stroke*, 29 (1998) 705-718.
- 68 Laemmli, U.K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- 69 Lenz, C., Rebel, A., Ackern, v.K., Kuschinsky, W., Waschke, K.F., Local Cerebral Blood Flow, Local Cerebral Glucose Utilization, and Flow-Metabolism Coupling during Sevoflurane versus Isoflurane Anesthesia in Rats, *Anesthesiology*, 89 (1998) 1480-1488.
- 70 Li, Y., Chopp, M., Powers, C., Granule Cell Apoptosis and Protein Expression in Hippocampal Dentate Gyrus after Forebrain Ischemia in the Rat, *J Neurol Sci*, 150 (1997) 93-102.
- 71 Li, Y., Chopp, M., Powers, C., Jiang, N., Apoptosis and Protein Expression after Focal Cerebral Ischemia in Rat, *Brain Res*, 765 (1997) 301-312.
- 72 Li, Y., Chopp, M., Zhang, Z.G., Zaloga, C., Niewenhuis, L., Gautam, S., P53-Immunoreactive Proteins and p53 mRNA Expression after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats, *Stroke*, 25 (1994) 849-856.
- 73 Li, Y., Powers, C., Jiang, N., Chopp, M., Intact, Injured, Necrotic and Apoptotic Cells after Focal Cerebral Ischemia in the Rat, *J Neurol Sci*, 156 (1998) 119-132.
- 74 Linnik, M.D., Zahos, P., Geschwind, M.D., Federoff, H.J., Expression of Bcl-2 from a Defective Herpes Simplex Virus-1 Vector Limits Neuronal Death in Focal Cerebral Ischemia., *Stroke*, 26 (1995) 1670-1675.
- 75 Love, C., Barber, R., Wilcock, G.K., Apoptosis and Expression of DNA Repair Proteins in Ischemic Brain Injury in Man, *NeuroReport*, 9 (1998) 955-959.
- 76 MacManus, J.P., Linnik, M.D., Gene Expression Induced by Cerebral Ischemia: An Apoptotic Perspective, *J Cereb Blood Flow Metab*, 17 (1997) 815-832.
- 77 McGahan, L., Hakim, A.M., Robertson, G.S., Hippocampal Myc and p53 Expression Following Transient Global Ischemia, *Mol Brain Res*, 56 (1998) 133-145.

- 78 Miyazaki, H., Nakamura, Y., Arai, T., Kataoka, K., Increase of Glutamate Uptake in Astrocytes, A Possible Mechanism of Action of Volatile Anesthetics, *Anesthesiology*, 86 (1997) 1359-1366.
- 79 Momand, J., Zambetti, G.P., Mdm-2:"Big Brother" of p53, *J Cell Biochem*, 64 (1997) 343-352.
- 80 Montes de Oca Luna, R., Wagner, D.S., Lozano, G., Rescue of Early Embryonic Lethality in Mdm2-deficient Mice by Deletion of p53, *Nature*, 378 (1995) 203-205.
- 81 Newberg Milde, L., Weglinski, M.R., Pathophysiology of Metabolic Brain Injury. In: *Anesthesia and Neurosurgery*, Cottrell, J.E., Smith, D.S. (Hrsg.), Mosby Verlag, St. Louis, 1994, 3. Band , 59-84.
- 82 Oberg, P.A., Tenland, T., Nilsson, G.E., Laser-Doppler-Flowmetry - a Non-Invasive and Continous Method for Blood Flow Evaluation in Microvascular Studies, *Acta Med Scand [Suppl]*, 687 (1984) 17-24.
- 83 Oltvai, Z.N., Korsmeyer, S.J., Checkpoint of Dueling Dimers Foil Death Wishes, *Cell*, 79 (1994) 189-192.
- 84 Oppenheim, R.W., The Neurotrophic Theory and Naturally Occuring Motoneurone Death, *Trends Neurosci*, 12 (1989) 252-255.
- 85 Orser, B.A., Bertlik, M., Wang, L.-Y., MacDonald, J.F., Inhibition by Propofol (2,6-diisopropylphenol) of the N-methyl-D-aspartate Subtype of Glutamate Receptor in Cultured Hippocampal Neurons, *Br J Pharmacol*, 116 (1995) 1761-1768.
- 86 Paxinos, G., *The Rat Nervous System*, Academic Press, San Diego, 1995
- 87 Paxinos, G., Watson, C., *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, San Diego, 1998
- 88 Pulsinelli, W.A., Levy, D.E., Duffy, T.E., Regional Cerebral Blood Flow and Glucose Metabolism Following Transient Forebrain Ischemia, *Ann Neurol*, 11 (1982) 499-509.

- 89 Raghupathi, R., Graham, D.I., McIntosh, T.K., Apoptosis after Traumatic Brain Injury, *J Neurotrauma*, 17 (2000) 927-938.
- 90 Sakhi, S., Bruce, A., Sun, N., Tocco, G., Baudry, M., Schreiber, S.S., P53 Induction is Associated with Neuronal Damage in the Central Nervous System, *Proc Natl Acad Sci*, 91 (1994) 7525-7529.
- 91 Sano, T., Drummond, J.C., Patel, P.M., Grafe, M.R., Watson, J.C., Cole, D.J., A Comparison of the Cerebral Protective Effects of Isoflurane and Mild Hypothermia in a Model of Incomplete Forebrain Ischemia in the Rat, *Anesthesiology*, 76 (1992) 221-228.
- 92 Scremin, O.U., Vasculature. In: *The Rat Nervous System*, Paxinos, G. (Hrsg.), Academic Press, San Diego, 1995, Band 2, 3-35.
- 93 Siesjö, B.K., Pathophysiology and Treatment of Focal Cerebral Ischemia, Part II: Mechanisms of Damage and Treatment, *J Neurosurg*, 77 (1992) 337-354.
- 94 Siesjö, B.K., Pathophysiology and Treatment of Focal Cerebral Ischemia, Part I: Pathophysiology, *J Neurosurg*, 77 (1992) 169-184.
- 95 Siesjö, B.K., Siesjö, P., Mechanisms of Secondary Brain Injury, *Eur J Anaesthesiol*, 13 (1996) 247-268.
- 96 Smith, M.-L., Auer, R.N., Siesjö, B.K., The Density and Distribution of Ischemic Brain Injury in the Rat Following 2-10 min of Forebrain Ischemia, *Acta Neuropathol*, 64 (1984) 319-332.
- 97 Stern, M.D., In Vivo Evaluation of Microcirculation by Coherent Light Scattering, *Nature*, 254 (1975) 56-58.
- 98 Stern, M.D., Lappe, D.L., Bowen, P.D., Chimosky, J.E., Holloway, G.A., Keiser, H.R., Bowman, R.L., Continuous Measurement of Tissue Blood Flow by Laser-Doppler Spectroscopy, *Am J Physiol*, 232 (1977) H441-H448
- 99 Thompson, C.B., Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease, *Science*, 267 (1995) 1456-1462.

- 100 Trump, B.F., Berezsky, I.K., The Reactions of Cells to Lethal Injury: Oncosis and Necrosis-The Role of Calcium. In: R.A. Lockshin, Z. Zakeri and J.L. Tilly (Eds.), *When Cells Die*, Wiley-Liss, New York, 1998, 57-96.
- 101 Tu, Y., Hou, S.-T., Huang, Z., Robertson, G.S., MacManus, J.P., Increased Mdm-2 Expression in Rat after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion, *J Cereb Blood Flow Metab*, 18 (1998) 658-669.
- 102 Warner, D.S., McFarlane, C., Todd, M.M., Ludwig, P., McAllister, A.M., Sevoflurane and Halothane Reduce Focal Ischemic Brain Damage in the Rat, *Anesthesiology*, 79 (1993) 985-992.
- 103 Warner, D.S., Zhou, J., Ramani, R., Todd, M.M., Reversible Focal Ischemia in the Rat: Effects of Halothane, Isoflurane, and Methohexital Anesthesia, *J Cereb Blood Flow Metab*, 11 (1991) 794-802.
- 104 Werner, C., Neuroprotektion. In: *Neuroanästhesie*, Jantzen, J.-P., Löffler, W. (Hrsg.), Thieme Verlag, 2000, 121-142.
- 105 Werner, C., Hoffmann, W.E., Thomas, C., Miletich, D.J., Albrecht, F., Ganglionic Blockade Improves Neurologic Outcome from Incomplete Ischemia in Rats: Partial Reversal by Exogenous Catecholamines, *Anesthesiology*, 73 (1990) 923-929.
- 106 Werner, C., Möllenber, O., Kochs, E., Schulte am Esch, J., Sevoflurane Improves Neurological Outcome after Incomplete Cerebral Ischemia in Rats, *Br J Anaesth*, 75 (1995) 756-760.
- 107 Westermeier, R., *Electrophoresis in Practise*, VCH, Weinheim, 1997
- 108 Whitacre, C.M., Hashimoto, H., Tsai, M.-L., Chatterjee, S., Berger, S.J., Berger, N.A., Involvement of NAD-Poly(ADP-Ribose) Metabolism in p53 Regulation and its Consequences, *Cancer Res*, 55 (1995) 3697-3701.
- 109 White, B.C., Sullivan, J.M., DeGarcia, D.J., O'Neil, B.J., Neumar, R.W., Grossman, L.I., Rafols, J.A., Krause, G.S., Brain Ischemia and Reperfusion: Molecular Mechanisms of Neuronal Injury, *J Neurol Sci*, 179 (2000) 1-33.

- 110 Wiebalck, A., Van Aken, H., Propofol: Das ideale Langzeitsedativum?, *Anaesthesist*, 44 (1995) 178-185.
- 111 Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., Levine, A.J., The p53-Mdm-2 Autoregulatory Feedback Loop, *Genes Dev*, 7 (1993) 1126-1132.
- 112 Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R., Cell Death: The Significance of Apoptosis, *Internat Rev Cytology*, 68 (1981) 251-307.
- 113 Xu, D., Bureau, Y., McIntyre, D.C., Nicholson, D.W., Liston, P., Zhu, Y., Fong, W.G., Crocker, S.J., Korneluk, R.G., Robertson, G.S., Attenuation of Ischemia-Induced Cellular and Behavioral Deficits by Chromosome-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Overexpression in the Rat Hippocampus, *J Neurosci*, 19 (1999) 5026-5033.
- 114 Yamaguchi, S., Midorikawa, Y., Okuda, Y., Kitajima, T., Propofol Prevents Delayed Neuronal Death Following Transient Forebrain Ischemia in Gerbils, *Can J Anesth*, 46 (1999) 593-598.
- 115 Young, W.L., Ornstein, E., Cerebral and Spinal Cord Blood Flow. In: *Anesthesia and Neurosurgery*, Cottrell, J.E., Smith D.S. Hrsg.), Mosby Verlag, St. Louis, 1994, 17-57
- 116 Zhu, H., Cottrell, J.E., Kass, I.S., The Effect of Thiopental and Propofol on NMDA- and AMPA-Mediated Glutamate Excitotoxicity, *Anesthesiology*, 87 (1997) 944-951.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arterie
CBF	zerebraler Blutfluss (engl. cerebral blood flow)
Cl ⁻	Chlorid
DNA	Desoxynukleinsäure (engl. acid)
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
FKS	fetales Kälberserum
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure (engl. acid)
Isch	Ischämie
M.	Musculus
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck (engl. pressure)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid)
N.	Nervus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Nn.	Nervi
PaCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
paO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	gepuffertes Natriumphosphat (engl. phosphore buffered sodium)
PBST	gepuffertes Natriumphosphat mit Tween (engl. phosphore buffered sodium and tween)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rep	Reperfusion
Retrans	Retransfusion
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
TUNEL	Terminale Transferase dUTP-nick-end-labing

V.	Vene
Vol. %	Volumenprozent

9. DANKSAGUNGEN

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. E. Kochs, Direktor der Klinik für Anaesthesiologie der TU München für die Aufnahme in seine Klinik und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. C. Werner, leitender Oberarzt, für die Überlassung des Themas und für die fundierte wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit.

Ein herzlicher Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. E. Hildt (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München) für seine Geduld und seine bereitwilligen Auskünfte aus seinem scheinbar unendlichen Wissensschatz.

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. med. Kristin Engelhard und Frau Dr. vet. med. Eva Eberspächer für ihre freundschaftliche Zusammenarbeit und allzeitmögliche Hilfestellung. Ihre soziale Kompetenz und ihr großes Engagement ermöglichten eine zielgerichtete und effektive Zusammenarbeit.

Bei Herrn Dr. rer. nat. P. Hutzler und Herrn E. Mannweiler (Institut für Pathologie, GSF, München) bedanke ich mich für die Bereitstellung des konfokalen Lasermikroskops und die kontinuierliche fachliche Beratung.

Frau Priv.-Doz. Dr. med. I. Becker (Institut für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie der TU München) danke ich für die Hilfe bei der Auswertung der hämatoxylin-eosin gefärbten Gehirnschnitte.

Vielen Dank an Frau Christine Hilf, Frau Doris Droese, Frau Anne Frye und Frau Christine Heinze für die Bereitschaft mir ihr Wissen und ihre Erfahrung zu vermitteln.

Den Tierpflegerinnen und Tierpflegern möchte ich für die fachgerechte Betreuung der Tiere danken.

Meinem Freund Andreas Pape danke ich von ganzem Herzen dafür, daß er immer für mich da war und ist.

Meinen Eltern danke ich für ihre langjährige Unterstützung und für ihre beständige Liebe.

10. LEBENSLAUF

Persönliche Angaben	Name, Vorname :	Bachl, Monika
	Staatsangehörigkeit :	Deutsch
	Geburtsdatum :	17. Mai 1975
	Geburtsort :	Würzburg
Schulbildung	1981 bis 1985 :	Max-Dauthendey-Grundschule, Würzburg
	1985 bis 1994 :	Wirsberg-Gymnasium, Würzburg Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
Freiwilliges Soziales Jahr	September 1994 bis April 1995 :	Kliniken Dr. M. Schreiber, Innere Medizin, München Träger des Freiwilligen Sozialen Jahres: Bayrisches Rotes Kreuz, München
Hochschulstudium	Mai 1995 bis November 2001	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Praktisches Jahr		
Internistisches Tertial	Oktober 2000 bis Januar 2001 :	2. Medizinische Abteilung des Klinikums rechts der Isar, München
Anästhesiologisches Tertial	Februar 2001 bis Mai 2001 :	Klinik für Anaesthesiologie des Klinikums rechts der Isar, München
Chirurgisches Tertial	Juni 2001 bis September 2001 :	Abteilung für Allgemein Chirurgie der Universitätsklinik San Cecilio, Granada, Spanien
Weiterer Werdegang	seit Januar 2002	ÄIP in der Klinik für Anaesthesiologie des Klinikums rechts der Isar, München