

Aus der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. C. Werner)

Angefertigt unter der Leitung von Frau Univ.-Prof. Dr. med. Kristin Engelhard

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

**Der Einfluss von aktiviertem Protein C auf das neuronale
Schädigungsmuster des Vorderhirns von Ratten infolge einer Ischämie**

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

vorgelegt von
Melanie Brückner
aus Darmstadt

München, den 20. Mai 2009

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Schmahl
Koreferent:	Univ.-Prof. Dr. Stangassinger

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

Den liebsten und teuersten Menschen:
Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM.....	4
2.1. Das Nervensystem.....	4
2.1.1. Das Gehirn	4
2.1.2. Entwicklung des Gehirns.....	6
2.1.3. Stoffwechsel des Gehirns	7
2.1.4. Gefäßversorgung des Gehirns.....	8
2.1.5. Der Hippokampus	10
2.2. Zerebrale Ischämie	11
2.2.1. Definition	11
2.2.2. Ischämieformen.....	12
2.2.3. Pathophysiologie.....	13
2.2.4. Tiermodelle.....	15
2.3. Formen des Zelltodes.....	20
2.3.1. Nekrose.....	20
2.3.2. Apoptose.....	21
2.3.2.1. Charakteristika der Apoptose.....	21
2.3.2.2. Mechanismen der Apoptose.....	22
2.3.2.3. Caspasen	24
2.3.2.4. Apoptose und globale zerebrale Ischämie	25
2.4. Aktiviertes Protein C (APC).....	26
2.4.1. Allgemeines	26
2.4.2. Wirkungen von APC	26
2.4.3. Drotrecogin alpha (aktiviert)	29
2.4.4. Pharmakokinetische Daten zu APC	30
2.4.5. APC und Neuroprotektion	31
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....	33
3.1. Zielvorstellungen.....	33
3.2. Material und Methoden.....	35
3.2.1. Vorversuch.....	35
3.2.1.1. Versuchstiere.....	35
3.2.1.1.1. Versuchstierhaltung	35
3.2.1.1.2. Versuchstiergruppen	36
3.2.1.1.3. Versuchsplan	36
3.2.1.2. Narkoseeinleitung und Vorbereitung	38

3.2.1.3.	Präparation	38
3.2.1.4.	Narkoseüberwachung und physiologische Parameter	39
3.2.1.5.	Medikamentenapplikation	41
3.2.1.6.	Entnahme der Blutproben	41
3.2.1.7.	Bestimmung der Plasmakonzentration von APC	42
3.2.1.8.	Messung der Plasmaosmolarität	42
3.2.1.9.	Berechnung der Plasmahalbwertszeit (HWZ)	42
3.2.2.	Hauptversuch	43
3.2.2.1.	Versuchstiere	43
3.2.2.1.1.	Versuchstierhaltung	43
3.2.2.1.2.	Versuchstiergruppen	43
3.2.2.1.3.	Versuchsplan, Aufbau und zeitlicher Verlauf	44
3.2.2.2.	Narkoseeinleitung und Vorbereitung	46
3.2.2.3.	Präparation	46
3.2.2.4.	Narkoseüberwachung und physiologische Parameter	47
3.2.2.5.	Positionierung der Sonden zur Laser-Doppler-Flussmessung	48
3.2.2.6.	Narkosereduktion	49
3.2.2.7.	Äquilibration	49
3.2.2.8.	Ischämie	50
3.2.2.9.	Reperfusion	51
3.2.2.10.	Medikamentenapplikation	51
3.2.2.11.	Bestimmung der Plasmakonzentration von APC	52
3.2.2.12.	Messung der Plasmaosmolarität	52
3.2.2.13.	Überwachung der Infusionsphase	52
3.2.2.14.	Beendigung der Anästhesie	52
3.2.2.15.	Verhaltenstest	53
3.2.2.16.	Probengewinnung	54
3.2.2.16.1.	Dekapitierung und Entnahme des Gehirns	54
3.2.2.16.2.	Aufbereitung der Proben	54
3.2.2.16.3.	Schneiden der Gehirne	55
3.2.2.17.	Analyseverfahren	55
3.2.2.17.1.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	55
3.2.2.17.1.1.	Färbevorgang	56
3.2.2.17.1.2.	Auswertung der Präparate	57
3.2.2.17.2.	Immunhistochemische Detektion aktivierter Caspase-3	57
3.2.2.17.2.1.	Färbevorgang	58
3.2.2.17.2.2.	Auswertung der Präparate	60
3.2.2.18.	Chemikalien, Antikörper, Lösungen, Verbrauchsmaterial, Geräte	61
3.2.2.19.	Statistische Analyse	65
3.3.	Ergebnisse	66
3.3.1.	Ergebnisse des Vorversuches	66
3.3.1.1.	Physiologische Parameter	66
3.3.1.2.	Plasmakonzentration von APC	69
3.3.1.3.	Plasmaosmolarität	72

3.3.2. Ergebnisse des Hauptversuches.....	74
3.3.2.1. Physiologische Parameter	74
3.3.2.2. Messung des zerebralen Blutflusses (CBF)	82
3.3.2.3. Plasmakonzentration von APC	84
3.3.2.4. Plasmaosmolarität	84
3.3.2.5. Verhaltenstests	86
3.3.2.6. Analytischer Teil	88
3.3.2.6.1. Histologische Untersuchung der HE-gefärbten Schnitte	88
3.3.2.6.2. Detektion aktivierte-Caspase-3-positiver Zellen im Hippokampus.....	93
4. DISKUSSION	98
4.1. Diskussion der Ergebnisse	98
4.1.1. Ergebnisse des Vorversuches	98
4.1.2. Physiologische Parameter	99
4.1.3. Messung des zerebralen Blutflusses	103
4.1.4. Plasmaosmolarität.....	105
4.1.5. Verhaltenstests.....	106
4.1.6. Quantifizierung des histopathologischen Schadens mit HE-Färbung	108
4.1.7. Detektion aktivierte-Caspase-3-positiver Zellen im Hippokampus	111
4.2. Diskussion der Methoden	113
4.2.1. Zerebrales Ischämiemodell	113
4.2.2. Messung des zerebralen Blutflusses	115
4.2.3. Quantifizierung des histopathologischen Schadens mit HE-Färbung	116
4.2.4. Immunhistochemische Detektion des Apoptosemarkers aktivierte Caspase-3....	117
4.3. Abschlussbetrachtung.....	119
5. ZUSAMMENFASSUNG	120
6. SUMMARY	122
7. LITERATURVERZEICHNIS	124
8. TABELLENVERZEICHNIS	140
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	142
10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	144
11. DANKSAGUNG	149

1. EINLEITUNG

Globale und fokale zerebrale Minderdurchblutungen treten im Rahmen der notfallmedizinischen, anästhesiologischen und intensivmedizinischen Versorgung von Patienten regelhaft auf. In den westlichen Industrieländern kommen pro 100.000 Einwohner jährlich etwa 40-90 pulmonale Wiederbelebungen nach Herzkreislaufstillstand vor. Bei 25-50 % dieser Patienten kann eine spontane Zirkulation wieder erfolgreich hergestellt werden. Allerdings können nur 5-15 % der Patienten aus dem Krankenhaus entlassen werden (BÖTTIGER et al., 1999). Ursache für diese intrahospitale Mortalität ist eine schwere ischämisch-hypoxisch bedingte neuronale Schädigung. Außerdem überlebt von den entlassenen Patienten nur ein geringer Prozentsatz mit schweren neurologischen Defiziten (PROUGH et ZORNOW, 1999). Bei 30-50 % der entlassenen Patienten können milde neurologische Defekte wie das postischämische amnestische Syndrom nachgewiesen werden (VOLPE et al., 1983). Andere mögliche Symptome sind Depressionen, Lähmungen und schwere Psychosen. Diese konnten in klinischen Studien bis zu drei Jahren nach Herzkreislaufstillstand nachgewiesen werden (DRYSDALE et al., 2000).

Der Schlaganfall gehört in den westlichen Ländern zur häufigsten neurologischen Ursache einer Invalidität. Jährlich erleiden 200.000 bis 250.000 Menschen in Deutschland einen Schlaganfall. Die Inzidenz liegt damit bei etwa 400 Personen pro 100.000 Einwohner im Jahr. Bezogen auf das Lebensalter sind mindestens 5 % aller über 65-jährigen von Durchblutungsstörungen des Gehirns betroffen. Bei den über 75-jährigen beträgt die Rate schon mehr als 10 % und bei den über 85-jährigen sind mehr als 20 % betroffen. Damit sind zerebrovaskuläre Erkrankungen mit 20,1 % nach Krebs und ischämischen Herzkrankheiten die dritthäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt Wiesbaden). Der Schlaganfall ist in über 80 % der Fälle ischämisch bedingt infolge eines Verschlusses eines hirnversorgenden Gefäßes wie durch Thromben oder Emboli, während Hirnblutungen etwa 20 % der Ursache ausmachen.

Neben dem akuten Schlaganfall in der Notfallmedizin sind für den Anästhesisten auch während herz- und gefäßchirurgischen Operationen auftretende zerebrale Ischämien von Bedeutung. Hier kann es sowohl zur globalen als auch zur disseminierten fokalen zerebralen Ischämie kommen (ARROWSMITH, 2000, zur Übersicht). Die Häufigkeit kognitiver Defizite nach herzchirurgischen Eingriffen wird mit bis zu 30-80 % angegeben.

Irreversible Schäden nach globaler zerebraler Ischämie machen in der Regel eine Rückkehr des Patienten ins Berufsleben schwer bis unmöglich und schränken die Lebensqualität sehr ein.

Die therapeutischen Möglichkeiten, nach einer zerebralen Minderperfusion das gefährdete Hirngewebe zu schützen, sind zurzeit sehr begrenzt und beschränken sich im Wesentlichen auf symptomatische Behandlungen (SCHIELE et al., 2000). Nach Herzkreislaufstillstand kann eine therapeutische Hypothermie das neurologische Ergebnis günstig beeinflussen (HYPOTHERMIA AFTER CARDIAC ARREST STUDY GROUP, 2002; BERNARD et al., 2002). Eine der wenigen kausalen Therapieansätze nach zerebraler Ischämie stellt die Anwendung von rekombinantem Plasminogenaktivator zur Thrombolyse dar, allerdings ist diese Behandlung umstritten, da Plasminogenaktivatoren das Risiko von Hirnblutungen um 6 % erhöhen (NINDS t-PA Stroke Study Group, 1997), ein sehr kurzes Zeitfenster von drei Stunden nach dem Insult aufweisen und direkt neuronenschädigend wirken können (WANG et al., 1998). Darüber hinaus konnte trotz vielversprechender Ansätze kein neuroprotektiv wirksames Medikament identifiziert werden. Aus diesem Grund sind zukünftige Untersuchungen für die Schlaganfalltherapie von besonderer Relevanz.

Aktiviertes Protein C (APC) ist ein physiologischer Inhibitor der Gerinnung durch die Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa und die verminderte Bildung von Thrombin. Die antikoagulatorische Aktivität von APC wurde in der Vergangenheit bereits mehrfach beschrieben. Eine Verschiebung im Gleichgewicht des Gerinnungssystems, z.B. durch einen Protein C-Mangel, kann zu einem Überwiegen der prokoagulatorischen Effekte führen. Dies ist der Fall beim Vorliegen einer schweren Sepsis. Hier kommt es durch eine Störung des Protein C-Systems zu einer Bildung von Mikrothromben und infolgedessen zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) mit einer Reduktion der Mikrozirkulation und konsekutivem Organversagen. Tatsächlich ist die Plasmakonzentration von Protein C bei Patienten mit schwerer Sepsis um 90 % im Vergleich zu gesunden Probanden vermindert (YAN et al., 2001; LIAW, 2004). Aus diesem Grund scheint eine Normalisierung der Plasmakonzentration von Protein C ein Wiederherstellen des Gleichgewichtes zwischen pro- und antikoagulatorischem System zu versprechen. Da die Unterscheidung zwischen Protein C-Mangel mit normaler Aktivierung und ein normaler Protein C-Spiegel mit gestörter Aktivierung nicht möglich ist, ist die Supplementierung der aktivierten Form sinnvoller als die Gabe der inaktiven Form. Die aktivierte Form des Protein C wirkt in der Sepsis als

Antikoagulans und führt so zu einer verbesserten Mikrozirkulation durch Auflösen der mikrovaskulären Obstruktionen. Zwischen 1998 und 2000 konnte rekombinantes humanes aktiviertes Protein C (rhAPC) in einer multizentrischen, multinationalen, placebokontrollierten und doppelt verblindeten Studie an 1690 Patienten mit schwerer Sepsis die Gesamtletalität signifikant um 6 % senken. Seit Ende 2002 ist es daher als Xigris (Drotrecogin alpha [aktiviert], Fa. Eli Lilly and Company, Indianapolis, USA) zur Behandlung der schweren Sepsis mit Multiorganversagen in Deutschland zugelassen.

Unabhängig von der antikoagulatorischen Aktivität wurden in den letzten Jahren auch eine antiinflammatorische und antiapoptotische Wirksamkeit von APC nachgewiesen. Bisher wurde angenommen, eine antiinflammatorische Aktivität durch APC würde indirekt vermittelt durch die antikoagulatorische Wirkung, da APC die Verminderung von Thrombin induziert, einem proinflammatorischen Agens. Allerdings konnte hier die Beteiligung eines Effektorrezeptors, dem protease activated receptor-1 (PAR-1) nachgewiesen werden, der nicht die antikoagulatorische Wirksamkeit vermittelt. Hier richtet sich die allgemeine Aufmerksamkeit auf eine direkte antiinflammatorische und antiapoptotische Wirkung von APC auf die Zellen, die über diesen Rezeptor vermittelt wird und deren Mechanismus nicht vollends geklärt werden konnte.

Die Tatsache, dass die APC-Konzentration im Blut von Patienten nach einer Routine-Carotis-Endarterektomie anstieg (MACKO et al., 1999), lässt vermuten, dass zerebrale Ischämie eine APC-Produktion induziert und APC hierbei eine protektive Wirkung besitzt. Auf diesen Ergebnissen basierend konnte in tierexperimentellen Studien am Modell der fokalen zerebralen Ischämie der Maus eine antiinflammatorische und neuroprotektive Wirkung von APC bereits beobachtet werden (SHIBATA et al., 2001; FERNANDEZ et al., 2003). Auch die antiapoptotische Wirksamkeit wurde sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen (CHENG et al., 2003). APC offeriert damit ein zyto- und neuroprotektives Potential nach zerebraler Ischämie, das dieses Medikament für den Einsatz in der Behandlung des Schlaganfalls zu einer interessanten Alternative macht.

Da eine neuroprotektive Wirkung von APC bisher nur nach fokaler zerebraler Ischämie im Mausmodell beobachtet wurde, stellt sich die Frage, ob dieser Effekt auch im Modell der globalen zerebralen Ischämie der Ratte reproduzierbar ist. Ziel der vorliegenden Studie ist es daher, den neuroprotektiven Effekt von APC zehn Tage nach globaler zerebraler Ischämie der Ratte zu untersuchen.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Das Nervensystem

Das Nervensystem kann unterschiedlich eingeteilt werden: topographisch in das zentrale und das periphere Nervensystem und funktionell in das somatische und das vegetative Nervensystem. Das zentrale Nervensystem (ZNS) umfasst das Gehirn (Encephalon) und das Rückenmark (Medulla spinalis), während zum peripheren Nervensystem (PNS) alle außerhalb dieser Strukturen gelegenen Anteile wie Ganglien, Hirnnerven und periphere Nerven gerechnet werden. Das somatische (=senso-motorische, willkürliche) und das vegetative (=autonome, unwillkürliche) Nervensystem sind beides Teile sowohl vom ZNS als auch vom PNS. Eine Einteilung in ZNS und PNS ist also rein willkürlich, da periphere Nerven die Axone von Neuronen darstellen, die zum großen Teil im Gehirn oder Rückenmark liegen (NICKEL et al., 1992). Das vegetative Nervensystem, welches im Wesentlichen Steuerungsvorgänge im Organismus regelt, kann weiterhin unterteilt werden in den Sympathikus, Parasympathikus und das intramurale Nervensystem.

2.1.1. Das Gehirn

Das Gehirn ist das übergeordnete Integrations-, Koordinations- und Regulationsorgan des Organismus. Die Leistungsfähigkeit des Gehirns steht im engen Zusammenhang mit seiner Morphologie (NICKEL et al., 1992). Es liegt geschützt in der Schädelhöhle (Cavum crani) und wird von den Hirnhäuten (Meninges encephali) umgeben, welche die Pachymeninx encephali mit der harten Hirnhaut (Dura mater) und die Leptomeninx encephali mit der weichen Hirnhaut (Pia mater) und der gefäßreichen Spinnenhaut (Arachnoidea) umfasst. Die Dura mater bildet zwei Duplikaturen, die Großhirnsichel (Falx cerebri) und das häutige Kleinhirnzelt (Tentorium cerebelli membranaceum). Die Falx cerebri teilt die beiden Großhirnhemisphären in sagittaler Ebene, während das senkrecht dazu stehende Tentorium cerebelli membranaceum nach rostral das Kleinhirn vom Großhirn abtrennt. In die Dura mater eingebettet finden sich mit Endothel ausgekleidete Blutleiter (Sinus), die venöses Blut führen und teilweise durch Knochenkanäle verlaufen können.

Das Gehirn kann aus morphologischer und phylogenetischer Sicht in folgende Abschnitte unterteilt werden:

- das Vorderhirn (Prosencephalon) mit Zwischenhirn (Diencephalon) und Endhirn (Telencephalon),
- das Mittelhirn (Mesencephalon) und
- das Rautenhirn (Rhombencephalon) mit Nachhirn (Myelencephalon) und Hinterhirn (Metencephalon)

Das Telencephalon besteht aus zwei Hälften, den Hemisphären, und einem unpaaren Mittelstück (Telencephalon medium). Jede Hemisphäre setzt sich aus dem äußerlich nicht sichtbaren Stammanteil, dem Ganglienhügel mit dem Corpus striatum, und dem sich darauf aufgebauten Hirnmantel (Pallium) zusammen. Phylogenetisch kann man das Pallium in das Palaeopallium und das Archipallium einteilen. Diese beiden verkörpern zusammen das Riechhirn (=Rhinencephalon) und stellen zwei sehr alte Teile des Gehirns dar. Phylogenetisch jüngeren Ursprungs ist das Neopallium, das sich in der Entwicklung von dorsal zwischen Palaeo- und Archipallium eingefügt hat. Entsprechend des zytoarchitektonischen Aufbaus des Cortex kann man nun zwischen Palaeo-, Archi- und Neocortex unterscheiden, wobei der Neocortex grundsätzlich gleich strukturiert ist und als Isocortex bezeichnet wird und der Palaeo- und der Archicortex zusammengefasst als Allocortex benannt werden.

Beim makroskopischen Aufbau des zentralen Nervensystems unterscheidet man die weiße und die graue Substanz. Als graue Substanz (Substantia grisea) bezeichnet man die Anteile des ZNS, die vorwiegend aus den Somata der Neuronen bestehen. Die Nervenfasern hingegen bilden in ihrer Gesamtheit die weiße Substanz (Substantia alba).

Histologisch kann man das Nervengewebe nach phylogenetischen und funktionellen Kriterien einteilen: In der Phylogenese entstehen aus dem Ektoderm das Nervengewebe, aus dem Mesoderm das umhüllende Bindegewebe und die sekundär einsprossenden Gefäße. Funktionell unterscheidet man beim Nervengewebe zwei unterschiedliche Zelltypen: die Neuronen, die für die Erregungsbildung und –weiterleitung zuständig sind, und die Gliazellen, die Stütz-, Abgrenzungs- und Ernährungsfunktionen übernehmen. Beide Zellarten gehen aus multipotenten Stammzellen des Neuralepithels hervor. Nach mehreren Zellteilungen entstehen unterschiedliche Vorläuferzellen für Neurone und Gliazellen (Neuroblasten und Glioblasten), die sich im Verlauf der Entwicklung zu Neuronen und Gliazellen ausdifferenzieren.

2.1.2. Entwicklung des Gehirns

Allgemein entwickelt sich das Nervengewebe aus dem äußeren Keimblatt (Ektoderm), die Meningen und die sekundär ins Nervengewebe einwachsenden Gefäße sind jedoch mesodermaler Herkunft (RÜSSE et SINOWATZ, 1991). Die primäre Anlage des Nervensystems entsteht rostral der Primitivrinne in Form einer Verdickung im Ektoderm, der sogenannten Neuralplatte, aus der sich durch Aufwölben der Seitenränder die Neuralrinne bildet und sich daraufhin durch Zusammenschluss der Seitenränder das Neuralrohr formt. Am cranialen Ende des Neuralrohrs bildet sich nun eine bläschenartige Erweiterung, die sich im Folgenden bereits morphologisch als auch funktionell untergliedern lässt in eine dorsale Flügelplatte und eine ventrale Grundplatte: die rezeptorischen Zentren des Neuralrohrs befinden sich dabei in der Flügelplatte, die effektorischen Zentren in der Grundplatte. Aus der bläschenartigen Erweiterung entstehen durch eine doppelte Abgrenzung durch die Chorda dorsalis zwei Gehirnbläschen, das prächordale Archencephalon mit dem epichordalen Deuterencephalon. Das vordere Bläschen krümmt sich nun nach ventral ab und wird nun als primäres Vorderhirn, Prosencephalon, bezeichnet. Das Deuterencephalon erweitert sich nun und wird durch eine dorsale Einschnürung zur Mittelhirnanlage umgebildet. Am Prosencephalon bilden sich nun die Augenbläschen und rostral von diesen durch bilateral symmetrisches Wachstum die Anlage des Telencephalon, das durch den Sulcus hemisphaericus vom übrigen Teil des Prosencephalon, das Diencephalon, abgeschnürt wird. Durch Abknicken des Prosencephalon bildet sich das Mesencephalon, dem sich das Rhombencephalon anschließt. Aus diesem entwickeln sich nun das Metencephalon mit der Kleinhirnanlage und das caudale Myelencephalon, welches durch eine ventrale Krümmung vom Medullarrohr abgegrenzt wird. Damit sind die charakteristischen sechs Abschnitte des Gehirns mit Tel-, Di-, Mes-, Met- und Myelencephalon sowie Medulla spinalis festgelegt (NICKEL et al., 1992).

Dieser Aufbau entspricht der anatomischen Einteilung des Gehirns des Menschen und stimmt im Grundprinzip mit dem Gehirn der Ratte überein. Darüber hinaus ist das menschliche Gehirn in seiner Funktion und Blutversorgung mit dem der Ratte vergleichbar. Deshalb geht man davon aus, dass die aus dem Tierversuch gewonnenen Erkenntnisse weitgehend auf die Humanmedizin übertragbar sein können (LIEBMANN, 1993).

2.1.3. Stoffwechsel des Gehirns

Das Gehirn ist eines der stoffwechselaktivsten Organe des menschlichen Körpers. Die Hirndurchblutung bei Gesunden wird im Mittel mit 58 ml/100 g Hirngewebe/min angegeben. Obwohl das Gewicht des Gehirnes nur 2 % des Körpergewichtes beträgt, erhält es 15-20 % des normalen Herzzeitvolumens (700-900 ml/min) und verbraucht 20 % des gesamten Sauerstoffbedarfs (3,3 ml/100 g/min) des Körpers. Die Energieversorgung erfolgt fast ausschließlich über den Metabolismus von Glukose, welche unter physiologischen Bedingungen zu 90 % vollständig oxidativ metabolisiert wird (MAGISTRETTI et PELLERIN, 1996). 25 % des Glukoseverbrauches des Körpers (5,3 mg/100 g/min) finden im ZNS statt. Der Vorrat (Glukose bzw. Glykogen) im Gehirn reicht nur zur Deckung des Energiebedarfes für etwa 1 Minute aus (GELMERS, 1989). Unter physiologischen Bedingungen beträgt der Sauerstoffverbrauch des Gehirns 3-5 ml/100 g/min (40-70 ml/min), das Sauerstoffangebot im Blut 20 bis 50 ml/100 g/min (150 ml/min). Diese Sauerstoffreserve sorgt dafür, dass der aerobe Stoffwechsel mit ausreichender Sicherheit gewährleistet wird. So werden aus einem Mol Glukose unter Aufwendung von 6 Mol O₂ durch Glykolyse und Citrat-Zyklus 36 Mol ATP und 6 Mol CO₂ gewonnen. Da weder in den Neuronen noch in der Neuroglia nennenswerte Mengen an O₂ und Glukose gespeichert werden können, ergibt sich eine extreme Abhängigkeit des Gehirns von einer kontinuierlichen Substratversorgung über den zerebralen Blutfluss.

Der zerebrale Energiebedarf lässt sich unterteilen in:

- Funktionsstoffwechsel (ca. 60 %)
- Erhaltungsstoffwechsel (ca. 40 %)

Der Funktionsstoffwechsel umfasst alle höheren neuronalen Funktionen wie die Generierung von elektrischen Signalen. Der Erhaltungsstoffwechsel sorgt für die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität z.B. die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials und der Ionengradienten und die Synthese von Strukturproteinen (MICHENFELDER et THEYE, 1973). Folglich kann der zerebrale Metabolismus bis zu 60 % abnehmen, bevor es zu einer Einschränkung des Erhaltungsstoffwechsels kommt und die zelluläre Integrität bedroht ist. Der O₂-Verbrauch (und damit der Blutfluss) des Gehirns ist eng an den Energiebedarf gekoppelt, d.h. ATP-Verbrauch und ATP-Neusynthese (unter O₂-Verbrauch) halten sich die Waage. Unter physiologischen Bedingungen stehen alle Stoffwechselprodukte und Substrate in einem dynamischen Gleichgewicht.

2.1.4. Gefäßversorgung des Gehirns

Arterielle Blutversorgung

Die arterielle Blutversorgung des Gehirns erfolgt über vier große extrakranielle Gefäße, die rechte und linke Arteria (A.) carotis interna, die jeweils aus der A. carotis communis entspringen und über die A. intercarotica caudalis eine Anastomose bilden, sowie durch die rechte und linke A. vertebralis, die aus der A. subclavia abzweigen (LIEBMANN, 1993). Die beiden Arteriae (Aa.) vertebrales treten durch das Foramen magnum in die Schädelhöhle ein und vereinigen sich am Oberrand der Medulla oblongata in die A. basilaris, die auf der Ventralseite der Pons nach rostral verläuft und sich wiederum an deren Oberrand in die beiden Aa. cerebri posteriores aufteilt. Diese sind jeweils über eine A. communicans posterior mit der gleichseitigen A. cerebri media verbunden. Die A. carotis interna durchläuft im Canalis caroticus die Schädelbasis und setzt sich als A. cerebri media fort. Diese gibt ihrerseits um das Chiasma opticum herum die beiden Aa. cerebri anteriores ab, welche durch die A. communicans anterior anastomosieren. Die beiden Aa. cerebri anteriores versorgen den cranialen und medialen Teil der Hemisphären, die A. cerebri media den lateralen Teil. Die Aa. communicantes posteriores verbinden auf jeder Seite die A. cerebri posterior mit der A. cerebri media, während dessen die beiden Aa. cerebri anteriores durch die A. communicans anterior miteinander verbunden sind. Durch diese Verbindungsarterien bildet sich um den Hypophysenstil an der Gehirnbasis ein ringförmig geschlossenes arterielles System aus, der Circulus arteriosus cerebri oder Circulus arteriosus Willisii (siehe Abbildung 1). Dieser Gefäßring, der den Hypothalamus umgibt, erlaubt, dass Blut aus jedem Zuflussgebiet in jedes Areal des Gehirns verteilt wird. Von ihm geht die Versorgung der kortikalen (Rami corticales) und subkortikalen Areale (Rami basales) ab.

Die hier geschilderten Verhältnisse entsprechen den anatomischen Gegebenheiten des Menschen. Da die Blutgefäßversorgung von Mensch und Ratte viele Übereinstimmungen zeigt, bietet die Ratte im Tiermodell eine gute Vergleichbarkeit zu Untersuchungen von Störungen und Krankheiten des Gehirns beim Menschen (LEE, 1995, zur Übersicht).

Circulus Arteriosus Cerebri - Gefäße isoliert Ansicht von caudal

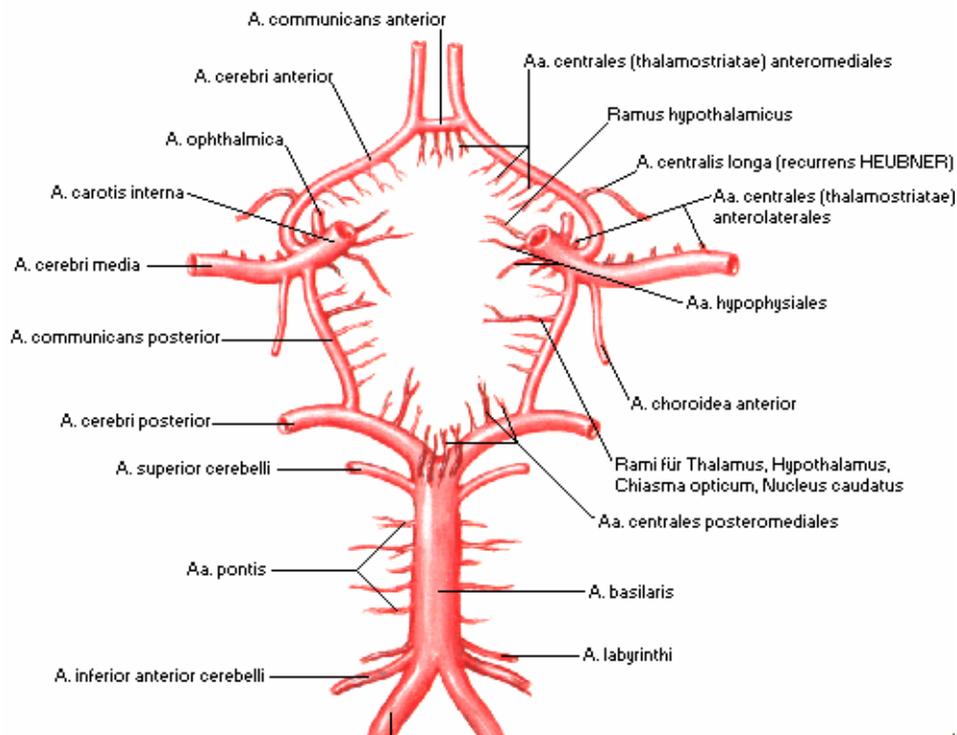


Abbildung 1: Arterielle Gefäßversorgung des Gehirns (Frank H. Netter, MD: Atlas der Anatomie des Menschen)

Venöser Abfluss

Die Venen, die sich nicht an den Verlauf der Arterien halten, sind in die Dura mater eingebettet und werden durch ein ventrales und ein dorsales Venensystem repräsentiert. Charakteristika sind das Fehlen von Klappen sowie der typischen Bauweise der Gefäßwände durch den Einbau in die Dura mater, was einen Ausgleich von schwankenden Druckverhältnissen innerhalb der Schädelhöhle ermöglicht. Der Sinus dorsalis wird im Wesentlichen aus dem in der Falx cerebri verlaufenden Sinus sagittalis dorsalis und dem rechtwinklig dazu im Tentorium cerebelli verlaufenden Sinus transversus repräsentiert und stellt kein einheitliches Gefäß mit Lumen dar, sondern ist von Bindegewebssäulen durchsetzt und unterteilt. Der Sinus dorsalis nimmt das Blut der Venae (Vv.) cerebri dorsales und der Vena (V.) cerebri magna auf. Die Sinus münden in den Confluentium sinuum, der an der Protuberantia occipitalis interna gelegen ist. Vom Confluentium sinuum fließt das venöse Blut durch den Sinus transversus und Sinus sigmoideus in die V. jugularis interna.

Der Sinus ventralis bildet einen die Hypophyse umschließenden ringförmigen Sinus, in den die Vv. cerebri ventrales münden. Er besteht aus den Sinus cavernosi, die die Hypophyse beidseitig, aber auch ventral umschließen sowie den diese rostral und caudal verbindenden Sinus intercavernosi rostralis und caudalis. Rostral anastomosieren die Sinus cavernosi mit dem Plexus ophthalmicus, bieten aber im Allgemeinen Abflussmöglichkeiten in rostraler Richtung aus dem ventralen Sinussytem über die V. ophthalmica externa in die V. facialis. Caudal gehen aus den Sinus cavernosi die Sinus petrosi ventrales hervor (NICKEL et al., 1992).

2.1.5. Der Hippokampus

Die Hippokampusformation (griech. = Seepferdchen) ist Teil des limbischen Systems und besteht im Wesentlichen aus dem Gyrus dentatus, dem Hippokampus (Cornu ammonis, CA, Ammonshorn) und dem Subiculum. Der Hippokampus liegt bogenförmig ausgezogen entlang des Unterhorns des Seitenventrikels (dessen mediale Begrenzung er bildet) im mesialen Temporallappen (siehe Abbildung 2). Nach lateral ist er durch den Sulcus hippocampi vom Gyrus parahippocampalis getrennt. Alle sensorischen Systeme erreichen (über die Area entorhinalis) mit ihren Informationen den Hippokampus. Er kann daher als polymodales sensorisches Assoziationszentrum aufgefasst werden. Phylogenetisch gehört der Hippokampus zum Allocortex und ist im Lauf der Entwicklung von seiner Lage dorsal des Corpus callosum in den Temporallappen verlagert worden. Im Temporallappen lassen sich Unterareale des Hippokampus (CA-Regionen: CA1, CA2, CA3 und CA4) mit den folgenden drei Schichten unterscheiden (NICKEL et al., 1992):

1. Stratum moleculare (Endverzweigungen afferenter Nervenfasern und Spitzendendriten der großen Pyramidenzellen), weitere Untergliederung dieser Schicht in tiefen Lagen = Stratum lacunosum
2. Stratum pyramidale (große, dicht gelagerte Pyramidenzellen)
3. Stratum multiforme sive oriens

Im weißen Muldenblatt oder Alveus vereinigen sich die efferenten Axone der Pyramidalzellen (= weiße Substanz) an der Ventrikelfläche des Hippokampus. Das Grundgerüst dieser Schichtung bilden die Pyramidenzellen. Die apikalen Dendriten erstrecken

sich bis in das Stratum moleculare, die basalen Dendriten in das Stratum multiforme. Das Subiculum ist das zytoarchitektonisch abgrenzbare Areal zwischen der CA1-Region und der Area entorhinalis. Der Gyrus dentatus besteht ebenfalls aus drei Schichten: der Lamina molecularis, der Lamina granularis, in der die Somata der Körnerzellen liegen, und der Lamina multiformis, auch als Hilus bezeichnet.

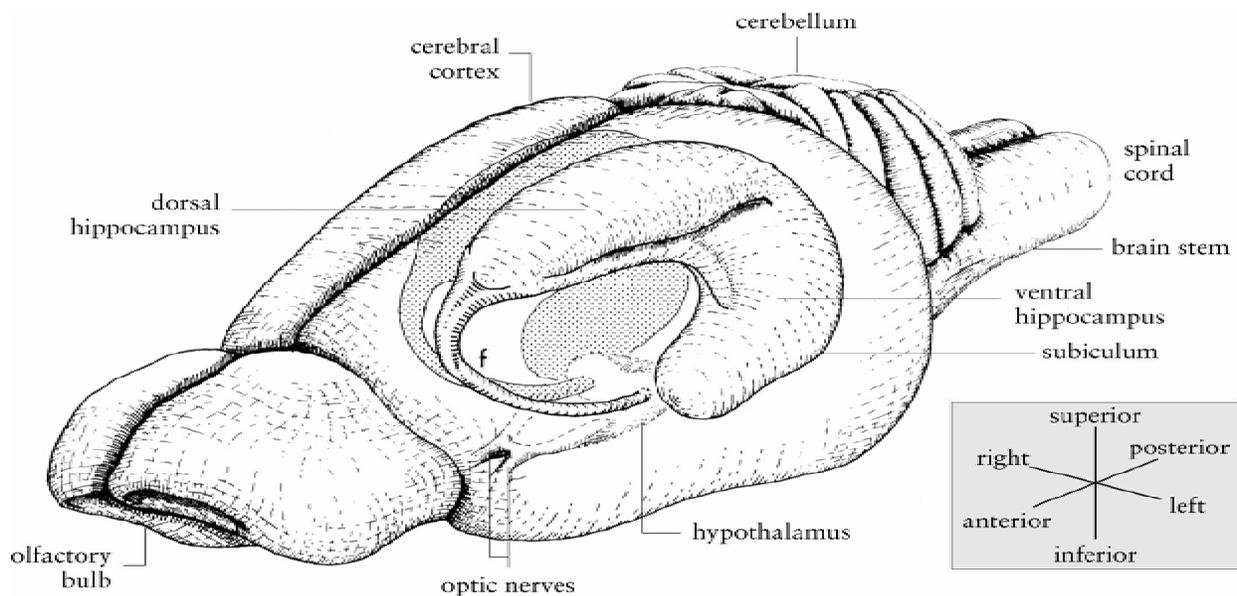


Abbildung 2: Hippokampusformation der Ratte (nach PD Dr. J. Kazca, Veterinär-anatomisches Institut Leipzig)

2.2. Zerebrale Ischämie

2.2.1. Definition

Die zerebrale Ischämie ist definiert als eine Verminderung oder völlige Unterbrechung des zerebralen Blutflusses des gesamten Gehirns bzw. Teilen von diesem oder spezifisch vulnerabler Neuronen (KEMPSKI, 2000). Daraus resultieren eine verminderte Sauerstoffzufuhr mit negativer O₂-Bilanz sowie eine Unterbrechung der Energiezufuhr und Akkumulation toxischer Stoffwechselprodukte, die zu einer Gewebhypoxie führen (WERNER, 2000).

2.2.2. Ischämieformen

Grundsätzlich können zwei verschiedene Formen der zerebralen Ischämie unterschieden werden: die *globale Ischämie*, wenn eine Unterbrechung der gesamten Gehirndurchblutung vorliegt und die *fokale Ischämie*, bei welcher nur das Versorgungsgebiet einer Hirnarterie von der Mangel durchblutung betroffen ist. Bei beiden Formen unterscheidet man nun zusätzlich noch die *komplette* und die *inkomplette* Ischämie in Abhängigkeit vom Auftreten einer Restperfusion des Gewebes (WERNER, 2000).

Eine *komplette globale Ischämie* tritt beispielsweise bei einem Herzkreislaufstillstand auf, bei dem es zur vollständigen Unterbrechung der Gehirndurchblutung kommt. Die *inkomplette globale Ischämie* entsteht z.B. durch ein diffuses Hirnödem mit Erhöhung des intrakraniellen Drucks, bei dem noch eine geringgradige Perfusion vorhanden ist, aber das gesamte Gehirn nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden kann.

Bei einer *kompletten fokalen Ischämie* kommt es nun zum vollständigen Gefäßverschluss eines Gehirngefäßes mit lokal begrenzter Minderperfusion des Versorgungsgebietes einer Hirnarterie, z.B. bei einem Schlaganfall (KEMPSKI, 2000), während der unvollständige Verschluss in einer *inkompletten fokalen Ischämie* resultiert. Eine Sonderform der fokalen Ischämie stellt die *multifokale Ischämie* dar. Bei ihr sind multiple, ungleichmäßig verteilte Areale des Gehirns von einer Minderdurchblutung betroffen, z.B. als Folge einer Embolie (TRAYSTMAN, 2003, zur Übersicht).

In Abhängigkeit von der Dauer der Minderperfusion des betroffenen Gebietes unterscheidet man außerdem eine *permanente* und eine *temporäre/transiente* Ischämie. Bei der permanenten Ischämie ist die Perfusion dauerhaft unterbrochen, während sich einer temporären oder transienten Ischämie die Reperfusion des betroffenen Gewebes anschließt. Die Quantität und Qualität des Schadens nach einer zerebralen Ischämie ist immer abhängig von mehreren Faktoren wie Intensität, Dauer der Ischämie und Reperfuionszeit (ITO et al., 1975). Bei globalen Ischämien kommt es nach wenigen Minuten bereits zu strukturellen Schäden, weshalb dieser Zustand vom betroffenen Organismus nur über einen relativ kurzen Zeitraum toleriert werden kann.

2.2.3. Pathophysiologie

Bei der zerebralen Ischämie handelt es sich um eine Verminderung oder Unterbrechung der Gehirndurchblutung. Eine temporäre Verminderung der regionalen Durchblutung bis auf 20 ml/100 g/min lässt die elektrische Aktivität des Cortex und die evozierten Potentiale unbeeinträchtigt. Erliegen der elektrischen Aktivität tritt bei einer Verminderung auf 15 ml/100 g/min auf, während ein irreversibler Funktionsverlust bei Werten zwischen 6 und 8 ml/100 g/min zu beobachten ist (SIEGENTHALER et BLUM, 2006).

Die zerebrale Ischämie führt zu einer Kaskade von pathophysiologischen Prozessen, die den ischämischen Zelltod der Neuronen vorantreiben. Die pathophysiologischen Mechanismen der globalen Ischämie beinhalten im Wesentlichen die Merkmale Energiemangel, Depolarisation, Akkumulation von Stoffwechselprodukten, Exzitotoxizität, Entstehen freier Sauerstoffradikale, Inflammation und Apoptose.

Aufgrund der verminderten Mikrozirkulation während eines ischämischen Insultes ist die Zufuhr energiereicher Substrate zum Gehirn und damit die ATP-Produktion verringert (MIES et al., 1990). Das im Gehirn produzierte ATP wird zum größten Teil verbraucht, um die Ionengradienten über die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ und damit das Ruhepotential der Nervenzellen zu erhalten und nach synaptischer Erregung wieder aufzubauen. Infolge des ATP-Mangels während der Ischämie nimmt die Funktion der energieabhängigen Ionenpumpen ab und Natrium- und Chlorid-Ionen strömen in die Zellen (WERNER, 1997; PALMER et al., 1985). Das Ruhepotential bricht zusammen, die Neuronen werden durch glutamaterge Erregung depolarisiert und der Repolarisationsmechanismus kommt zum Erliegen. Eine Beeinträchtigung des Energiemetabolismus verhindert auch die ATP-abhängige Entfernung von Calcium-Ionen aus der Zelle sowie die ATP-abhängige Speicherung von Calcium-Ionen im endoplasmatischen Retikulum (TURRENS et al., 1991). Die Calciumüberlastung der Mitochondrien führt zu einer irreversiblen Schädigung dieser. Erhöhte Konzentrationen von intrazellulären Calcium-Ionen führen darüber hinaus zur Aktivierung verschiedener Enzyme, die autolytische Prozesse der Zelle vorantreiben (siehe unten).

Während der ischämischen Phase und der frühen Reperfusion ist ein wesentliches Merkmal die Exzitotoxizität durch ein massives Freiwerden exzitatorischer Neurotransmitter wie Glutamat oder Aspartat, Aktivierung von NMDA- und Calcium-Kanälen durch einen Anstieg von intrazellulärem Calcium und außerdem das Entstehen freier Radikale (WERNER, 1997; BENVENISTE et al., 1984). Eine exzessive Glutamatfreisetzung aus dem präsynaptischen Teil in den synaptischen Spalt und eine Inhibition von Glutamatwiederaufnahme-

mechanismen tragen zu einem Anstieg des extrazellulären Glutamats bei (KAWAGUCHI et al., 2005). Die massive Stimulation von postsynaptischen Glutamatrezeptoren führt zu einem Influx von Calcium über Rezeptor- und spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle, was die metabolischen Defekte noch weiter verstärkt (BUDD et al., 1996). Zusätzlich wird Calcium auch über intrazelluläre Speicher im Zytosol freigegeben. Diese intrazelluläre Akkumulation von Calcium ist schädlich für neuronale Zellen durch die Aktivierung verschiedenster Enzyme und konsekutive katabolische autolytische Prozesse. Calcium aktiviert Lipidperoxidasen, Proteasen, Phospholipasen und Nitritoxid-Synthase, was zu einem Anstieg von freien Fettsäuren und freien Radikalen führt (KAWAGUCHI et al., 2005). Außerdem aktiviert Calcium Caspasen, Translokasen und Endonukleasen, welche Membranen und die nukleosomale DNA durch Fragmentierung zerstören (WERNER, 2007). Die erhöhte Bildung von freien Radikalen und die zusätzlich verminderte Aktivität von endogenen Radikalfängern vergrößern die absolute Menge an freien Radikalen (TYURIN et al., 2000). Letztendlich führen diese Prozesse zusammen zur Zerstörung von Membranen von vaskulären und zellulären Strukturen und zum nekrotischen oder apoptotischen Zelltod.

Eine Phase der Inflammation mit Migration der neutrophilen Leukozyten in das geschädigte Gewebe, Aktivierung von Gliazellen und Sekretion von zytotoxischen Substanzen durch Inflammationszellen ist ebenfalls Bestandteil des Pathomechanismus nach globaler zerebraler Ischämie. Als Antwort auf den ischämischen Insult infiltrieren neutrophile Granulozyten selektiv das betroffene Gewebe (CLARK et al., 1995), was durch die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen wie P-Selectin, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) und vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) vermittelt wird. Die Aktivierung der Mikroglia und Astrozyten aggraviert den neuronalen Schaden weiter und kann bis zu vier Wochen andauern (SUGAWARA et al., 2002). Die inflammatorischen Zellen produzieren innerhalb weniger Stunden proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1-beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und aktivieren die Isoform der induzierbaren Nitritoxid-Synthase (iNOS). Bereits sehr früh nach globaler Ischämie sind mRNA und Proteine dieser Zytokine im Hippokampus nachweisbar (SAITO et al., 1996; SAIRANEN et al., 1997). Globale zerebrale Ischämie resultiert in einer Expression von iNOS in reaktiven Astrozyten innerhalb des hippocampalen CA1-Sektors (ENDO et al., 1994), was bereits drei Tage nach Insult beginnt und bis zu einem Monat anhalten kann.

Apoptose gehört ebenfalls zu den nach globaler zerebraler Ischämie beobachteten pathophysiologischen Mechanismen. Programmierter Zelltod tritt bereits Stunden bis Tage nach Ischämie auf und ist maximal ausgeprägt in Neuronen der CA1-Region drei bis vier

Tage nach Ischämie (NITATORI et al., 1995; CHEN et al., 1998). Die Aktivierung von Caspasen, die spezifische Proteasen der interleukin-converting enzyme Familie (ICE) darstellen, wurde als wichtigster Mechanismus des programmierten Zelltods identifiziert. In der folgenden Abbildung 3 sind die Pathomechanismen in ihrem zeitlichen Auftreten dargestellt.

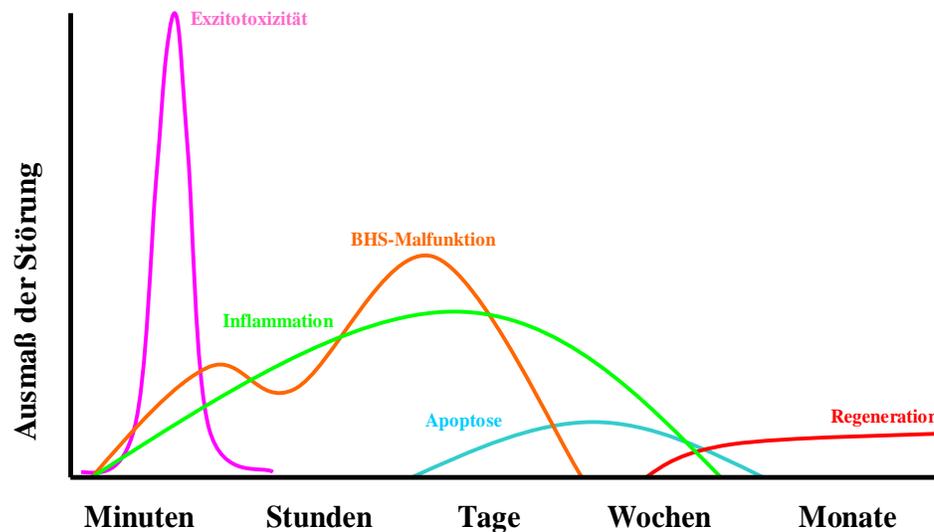


Abbildung 3: Graphische Darstellung der Pathomechanismen nach zerebraler Ischämie im zeitlichen Verlauf (modifiziert nach DIRNAGL et al., TINS 1999)

2.2.4. Tiermodelle

Das Ziel tierexperimenteller Studien im Rahmen der Erforschung einer zerebralen Ischämie stellt die Charakterisierung grundlegender Mechanismen und Generierung potentieller therapeutischer Interventionen dar im Hinblick auf die Verbesserung der Behandlung ischämischer Ereignisse beim Menschen. Die Pathophysiologie der zerebralen Ischämie beinhaltet ein komplexes Zusammenspiel vieler verschiedener Zellen und Gewebe, die bis heute nicht zufriedenstellend in in-vitro-Studien nachgebildet werden können. Aus diesem Grund wird ein Großteil der Forschung zur zerebralen Ischämie an Tiermodellen betrieben. Es wurden verschiedene Modelle in verschiedenen Spezies etabliert, um eine zerebrale Ischämie zu induzieren. Im Folgenden werden die bereits bestehenden Modelle zur Induktion einer zerebralen Ischämie vorgestellt:

Fokale zerebrale Ischämie

Die meisten Modelle der fokalen zerebralen Ischämie beinhalten die Okklusion eines größeren Blutgefäßes wie der Verschluss der A. cerebri media (MCA), die etwa 80 % der Blutversorgung einer Hemisphäre bestreitet und auf Grund ihres anatomischen Verlaufs als Fortsetzung der A. carotis interna sehr oft im Rahmen eines Schlaganfalls betroffen ist. Die Okklusion dieses Gefäßes (MCAO) resultiert in einer Reduktion des zerebralen Blutflusses im Striatum und im Cortex. Der Grad und die Verteilung der Blutflussverminderung sind abhängig von der Dauer der Okklusion und vom Grad des Kollateralzufflusses in das ischämische Gebiet.

Es existieren verschiedene Typen des MCAO-Modells mit permanenter oder temporärer Okklusion des proximalen oder des distalen Teil des Gefäßes. Der permanente Gefäßverschluss gelingt mit Elektrokauterisation der Gefäße (TAMURA et al., 1981). Bei der photochemischen Thrombosierung einiger Äste der distalen MCA mittels Laserstrahlen ist hingegen eine Kraniotomie erforderlich (BERGERON, 2003). Bei dem photothrombotischen Verschluss kommt es zu einer lokal begrenzten Photokoagulation von umschriebenen kortikalen Regionen. Nach der intravenösen Injektion von photosensitiven Stoffen wie des Farbstoffes Rose-Bengal und deren Verteilung im Gefäßsystem kommt es zur Okklusion der Gefäße, was einen sekundären Hirnschaden zur Folge hat. Hier korreliert das Gebiet des verminderten zerebralen Blutflusses eng mit dem Schadensgebiet.

Eine andere Variante stellt die Okklusion der MCA in Verbindung mit einem temporären Verschluss der ipsilateralen A. carotis communis dar (CHEN et al., 1986), um den kollateralen zerebralen Blutfluss im ischämischen Gebiet so gering wie möglich zu halten. Hier finden sich Infarkte im frontoparietalen Cortex, nicht aber im Caudoputamen. Eine temporäre Gefäßokklusion wird mit Gefäßligaturen oder Mikro-Aneurysma-Klemmen vorgenommen.

Weniger invasiv zur Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie sind Modelle mit dem Einsatz intraluminaler Filamente (KOIZUMI et al., 1986). Hier wird ein Nylonfaden in der A. carotis interna platziert und 17-20 mm nach cranial zur Aufzweigung in die A. cerebri media vorgeschoben, um diese zu verschließen (KUGE et al., 1995; BELAYEV et al., 1996). Wird der Faden nach einem bestimmten Intervall entfernt, wird eine Reperfusion des ischämischen Gewebes erreicht (transientes Modell), bei Verbleib des Fadens handelt es sich dagegen um ein permanentes Modell. Ein permanentes proximales MCAO-Modell produziert eine Infarzierung des Cortex und des Caudoputamens (TAMURA et al., 1981). Die Filament-MCAO kann allerdings nicht bei allen Ratten-Stämmen durchgeführt werden (DITTMAR,

2006). Embolie-Modelle wie z.B. die Applikation von sogenannten blood-clots aus Thrombin, die in vitro hergestellt werden (ZHANG et al., 1997), von viskösem Silikon in die A. carotis interna (LAUER et al., 2002) oder die intraarterielle Embolisation mit Makrosphären aus Titandioxid (300-400 µm) (GERRIETS et al., 2003) sowie das Modell der intrazerebralen Mikroinjektion von Endothelin-1 und/oder Endothelin-3, zwei potenten Vasokonstriktoren (SHARKEY und BUTCHER, 1995; HENSHALL et al., 1999) simulieren sehr gut die Pathophysiologie des kardioembolischen Schlaganfalls beim Menschen. Diese Modelle werden vielfach angewendet aufgrund der großen Relevanz in Bezug auf thromboembolische Infarkte bei Menschen.

Der Einsatz dieser Modelle ist außerdem weit verbreitet für die Untersuchung der Pathomechanismen der fokalen zerebralen Ischämie und darüber hinaus für die Identifikation möglicher neuroprotektiver Strategien.

Globale zerebrale Ischämie

Es gibt verschiedene Ansätze zur experimentellen Darstellung der globalen zerebralen Ischämie. Die Modelle der globalen Ischämie können dabei in zwei Bereiche gegliedert werden: in eine *komplette* und in eine *inkomplette* Ischämie.

Die einfachste Methode eine komplette globale Ischämie ohne Rezirkulation zu produzieren ist die Dekapitation. Diese Technik wurde lange Zeit an kleinen Labortieren angewendet (LOWRY et al., 1964), um Kenntnisse über die Pathophysiologie der zerebralen Ischämie, aber auch über metabolische Studien aus biochemischen Analysen zu erlangen. Auch das sogenannte neck tourniquet- oder Manschetten-Modell (SIEMKOWICZ et HANSEN, 1978) kann eine globale zerebrale Ischämie erzeugen. Hier wird eine Druckmanschette dem betäubten Tier um den Hals gelegt und innerhalb einer Sekunde in dieser Manschette ein Druck von 600-700 mmHg aufgebaut, der für zehn Minuten aufrecht erhalten wird. Die zerebrale Perfusion kann so auf unter 1 % der normalen Durchblutung gesenkt werden. Der Nachteil dieser Technik ist die dabei entstehende venöse Stauung und die Kompression des Nervus vagus, was zu großen Variabilitäten in den Resultaten führen kann. Außerdem besitzt das Modell nur geringe Akzeptanz und wird nur noch selten verwendet (GINSBERG et BUSTO, 1989). Die Verwendung einer Nackenmanschette (neck cuff inflation-Methode) wurde 1941 etabliert und bei größeren Versuchstieren wie Hunden eingesetzt (KABAT et al., 1941). Hier müssen die Aa. vertebrales separat okkludiert werden, um eine komplette Ischämie zu erzeugen.

Um ein der klinischen Situation des Herzkreislaufstillstandes ähnliches Modell der globalen Ischämie zu schaffen, wurde in Finalversuchen eine ventrikuläre Fibrillation induziert. Durch die kardiopulmonale Reanimation kann dieses Modell in einen Überlebensversuch umgewandelt werden (BERKOWITZ et al., 1991). Die Technik beinhaltet eine Phase der kompletten Ischämie gefolgt von einer Phase der inkompletten Ischämie während der Reanimation, da hier ein niedriger zerebraler Perfusionsdruck mit minimalem zerebralen Blutfluss unter Kontrollwerten herrscht (KOEHLER et al., 1983). Dieses Modell wurde bisher hauptsächlich in größeren Versuchstieren eingesetzt und birgt einen hohen Arbeitsaufwand durch die postoperative intensive Betreuungsphase bis 48 Stunden nach dem Insult. Doch auch an der Maus konnte ein Herzkreislaufstillstandmodell mit Applikation von Kaliumchlorid und anschließender kardiopulmonaler Reanimation beschrieben werden (KOFLEER et al., 2002). Da diese Modelle meist eine Minderversorgung des ganzen Körpers und aller Organe beinhaltet, wurden Modelle eingeführt, die ein Unterbinden verschiedener hals- und kopfnaher Gefäße vorsahen wie z.B. Okklusion der A. cephalica, A. subclavia in Ursprungsnähe aus dem Aortenbogen oder der A. mammaria.

Die Vier-Gefäßokklusion (four-vessel-occlusion, 4-VO) wurde 1979 als Methode für eine reversible Vorderhirnischämie in Ratten entwickelt und 1988 weiter modifiziert (PULSINELLI et BRIERLY, 1979; PULSINELLI et BUCHAN, 1988). Hier werden durch kleine Klemmen oder Ligaturen die Aa. carotides communes okkludiert und am Tag vor dem eigentlichen Versuch die Aa. vertebrales des ersten Halswirbels elektrokauterisiert. Das Modell kann an wachen Tieren angewendet werden, erfordert aber einen zweistufigen Arbeitsprozess. Am Tag vor dem Experiment werden atraumatische Haken lose um jede A. carotis communis gelegt und im Nacken des Tieres befestigt. Zusätzlich werden die Aa. vertebrales durch das jeweilige Foramen alare des ersten Halswirbels elektrokauterisiert, wobei dieser Vorgang entscheidend für den Erfolg der Ischämie ist, da die Elektrokauterisation ohne Sichtkontrolle erfolgt. Am nächsten Tag werden die Aa. carotides communes der wachen Tieren okkludiert und die Ischämie induziert. Der zerebrale Blutfluss fällt dabei auf weniger als 3 % der Kontrollwerte ab. Wie bei allen Modellen der zerebralen Ischämie zu beobachten, folgt nach der ischämischen Phase eine ausgeprägte zerebrale Hyperämie mit anschließender zerebraler Hypoperfusionsphase, die 24 Stunden anhalten kann. Der Vorteil besteht in der Möglichkeit, das Modell sowohl bei anästhesierten als auch bei wachen Tieren zu verwenden. Allerdings besteht eine große Variabilität in den Ergebnissen und in der Erfolgsrate, die bei 50-75 % liegt.

Die Vorderhirnischämie durch Zwei-Gefäßokklusion (two-vessel-occlusion, 2-VO) wurde 1972 das erste Mal beschrieben und ursprünglich eingesetzt, um den zerebralen Energiestatus nach inkompletter Ischämie zu charakterisieren (EKLOF et SIESJÖ, 1972). In diesem Modell wird eine bilaterale Okklusion der Aa. carotides communes mit einer hämorrhagischen Hypotension kombiniert, um eine reversible Vorderhirnischämie zu produzieren. Hierbei wurde ein mittlerer arterieller Blutdruck von 50 mmHg durch Blutentzug herbeigeführt oder medikamentell mit Trimetaphan oder Phentolamin unterstützt (SMITH et al., 1984). Der zerebrale Blutfluss sinkt unter 5 % im Cortex (KÅGSTROM et al., 1983). Histopathologisch findet im Hippokampus eine selektive Schädigung der CA1-, CA3-Region und gegebenenfalls im Gyrus dentatus, aber auch im Caudoputamen und Neocortex statt. Die Histopathologie ähnelt der des Four-Vessel-Occlusion-Modells, der Vorteil liegt aber darin, dass die chirurgische Präparation einfacher durchzuführen ist, eine Reperfusion vorgenommen werden kann und dieses Modell für chronische Überlebensstudien geeignet ist. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der einseitigen Hemisphärenischämie durch unilaterale Okklusion einer A. carotis communis. Diese bietet einen direkten Vergleich von geschädigter mit ungeschädigter Hippokampus-Seite. Zu beachten ist aber die Einflussnahme des Blutentzuges auch auf die unbeschädigte Seite.

Ein weiteres Modell zur Induktion einer globalen Ischämie durch Gefäßverschluss ist das Fünf-Venen-Okklusionsmodell (five-vessel-occlusion, 5-VO) (SHIRANE et al., 1991). Hier werden die Aa. pterygopalatinae und die Aa. carotides externae verschlossen und die A. basilaris koaguliert, um den kollateralen Blutfluss während der Ischämie zu vermindern. Die temporäre Ischämie wird nun induziert durch Okkludieren der Aa. carotides communes mit Mikroclips.

Ein erweitertes Modell, das Neun-Gefäßokklusions-Modell (nine-vessel-occlusion, 9-VO), dient zur Induktion einer globalen zerebralen Ischämie mit Reperfusion bei der nichtanästhesierten Ratte (MELGAR et al., 2002). Hier wird ein permanenter Verschluss der A. basilaris, der beiden Aa. pterygopalatinae, Aa. carotides externae und der Aa. occipitales durchgeführt und zusätzlich je ein Ballonkatheter in die beiden Aa. carotides communes eingeführt. Auch dieses Modell erfordert einen zweistufigen Prozess mit Präparation am Vortag des Experiments. Eine Ischämie durch Aufblasen des Katheters für zehn Minuten erzeugt einen Abfall des zerebralen Blutflusses auf 5 % des Ausgangswertes. Nach der Ischämie erlangen die Tiere den Stellreflex wieder und erholen sich vollständig innerhalb der nächsten 24 Stunden, weshalb diese Technik ein gut reproduzierbares Recovery-Modell darstellt, aber mit einem hohen Präparationsaufwand verbunden ist.

Abschließend zu erwähnen ist an dieser Stelle der Einsatz von Gerbils im Modell der globalen Ischämie. Gerbils haben eine einzigartige zerebrovaskuläre Anatomie, denn sie besitzen keine A. communicans posterior, also keinen Circulus arteriosus Willisii. Aus diesem Grund kann eine globale Ischämie allein durch bilaterale Okklusion der A. carotis communis herbeigeführt werden. Hier findet eine Reduktion des zerebralen Blutflusses auf Nullwerte statt (CROCKARD et al., 1980).

2.3. Formen des Zelltodes

Der Zelltod ist ein Ereignis, das zum Erlöschen des Stoffwechsels und der morphologischen Integrität einer Zelle führt. Er beendet irreversibel alle Lebensprozesse der Zelle. Der Zelltod spielt eine wesentliche Rolle für die biologische Entwicklung aller Lebewesen, da nur das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum (Proliferation) und Zelltod die Zellzahl auf einem weitgehend konstanten Niveau halten kann. Man unterscheidet zwei Formen des Zelltodes im Organismus: die Nekrose und die Apoptose.

2.3.1. Nekrose

Die Nekrose wird auch "akzidenteller Zelltod" genannt und kann durch extreme Abweichungen physiologischer Bedingungen ausgelöst werden. Sie ist das Ergebnis einer Zellschädigung, die z.B. durch mechanische Verletzung, Toxine, Hypoxie, Hyperthermie oder Krankheitserreger verursacht sein kann. So führt eine mangelnde Blutversorgung, z.B. nach einem Schlaganfall, zu einer Schädigung der Zytoplasmamembran einer Zelle und zum nekrotischen Zelltod (RIEDE et SCHAEFER, 1995). Bei der Nekrose kommt es zum Versagen metabolischer Prozesse sowie zum Verlust der Membranintegrität. Daher kommt es hier zuerst zur Zellschwellung mit anschließender Auflösung der Zelle und unkontrolliertem Austreten des Zellinhaltes in die Umgebung. Dieser Zelldetritus wird als Antigen erkannt und es kommt zu einer Entzündungsreaktion. Die Nekrose ist das irreversible Endstadium einer hypoxischen, toxischen, physikalischen, mikrobiellen oder auch immunologischen Zellschädigung, bei der die Mechanismen der Apoptose nicht zum Zuge kommen. Durch erniedrigtem pH-Wert, Elektrolytverschiebungen und Schädigung der Membranen denaturieren die Zellproteine und es kommt zur enzymatischen Auflösung der Zell- und

Gewebsbestandteile. Nekrotische Zellen werden im Gegensatz zur Apoptose nicht als intakte Zellen beseitigt und verursachen eine Entzündungsreaktion in den umgebenden Gebieten.

2.3.2. Apoptose

Die Apoptose stellt ein genetisch determiniertes, aktives Sterbeprogramm einer Zelle dar und wird auch als programmierter Zelltod (*programmed cell death*) bezeichnet. Der Begriff stammt aus dem Griechischen und bedeutet das Herabfallen der Blätter eines Baumes im Herbst oder das Abfallen von Blütenblättern und wurde 1972 von KERR et al. geprägt. Der Arzt und Philosoph Galen von Pergamon (129-203 n. Chr.) beschrieb bereits den koordinierten Zelluntergang in der Embryonalentwicklung von Föten und bei der Entwicklung von Insektenlarven.

Der apoptotische Zelltod tritt bei vielen physiologischen Prozessen wie Entwicklung und Differenzierung von Zellen, Gewebshomeostase, zellulärem Turn-over (z.B. der Haut), Involutionsprozessen (z.B. seniles Ovar) auf und stellt somit den physiologischen Gegenpol der Mitose dar. Aber auch in einer Vielzahl akuter und chronischer Erkrankungen treten pathophysiologische Mechanismen der Apoptose in Erscheinung, entweder durch eine pathologisch gesteigerte oder inhibierte Form, z.B. bei der Tumorgenese, bei Autoimmunerkrankungen (systemischer Lupus erythematoses, SLE), ischämisch-hypoxischen Schädigungen (zerebral, myokardial), bei neurodegenerativen Erkrankungen oder viralen Infektionen (THOMPSON, 1995, zur Übersicht). Während der Immunantwort ist Apoptose außerdem verantwortlich für das zellvermittelte Töten von Zielzellen, die Beseitigung von Pathogenen und in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen (CHERVONSKY et al., 1997). Auch nach zerebraler Ischämie kann es zum Zelluntergang durch Apoptose kommen (LOVE, 2003, zur Übersicht).

2.3.2.1. Charakteristika der Apoptose

Als prinzipiellen Degenerationsmechanismus einer Zelle muss man die Apoptose morphologisch als auch pathophysiologisch von der Nekrose unterscheiden. Apoptose wird induziert durch eine Vielzahl an Stimuli wie z.B. Mangel an zellulären Wachstumsfaktoren,

Schädigung durch UV-Einstrahlung (Entstehung freier Radikale), Ischämie und Hypoxie oder Apoptose-induzierende Liganden, die von Zellen des Immunsystems freigesetzt werden.

Während die Nekrose ein unmittelbar nach Einwirken der Noxe auftretender Prozess ist, stellt die Apoptose einen zeitlich verzögerten Prozess dar. Da es sich bei der Apoptose um einen aktiven energieabhängigen Vorgang handelt, ist eine bestimmte intrazelluläre Konzentration von ATP notwendig, um apoptotische Prozesse zu initiieren (EGUCHI et al., 1997). Ob nun eine Zelle durch Nekrose oder Apoptose degeneriert, ist letztendlich sowohl abhängig von der Quantität und Qualität der Noxe als auch vom ATP-Gehalt der Zelle (LEIST et al., 1997).

Morphologische Anzeichen des programmierten Zelltodes werden charakterisiert durch Kondensation und Degeneration des nukleären Chromatins, während die Zellmembran zuerst noch intakt bleibt („*boiling stadium*“). Daraufhin kommt es zur Formierung zyttoplasmatischer Protrusionen („*blebbing stadium*“) und zur Schrumpfung der Zelle („*shrinkage necrosis*“), Kondensation des Zytoplasmas sowie die Fragmentierung der Zelle in membranumschlossene Vesikel, die sogenannten „apoptotic bodies“ („*budding*“) (KERR, 2002). Die Phagozytose dieser Zellreste läuft im Gegensatz zur Nekrose ohne Auftreten inflammatorischer Begleitprozesse ab. Bei der Nekrose hingegen kommt es zum Versagen metabolischer Prozesse sowie zum Verlust der Membranintegrität. Daher kommt es hier zuerst zur Zellschwellung mit anschließender Auflösung der Zelle. Die Zellorganellen werden freigesetzt und hierdurch kommt es zu einer inflammatorischen Begleitreaktion. Apoptose ist ein selektiver Prozess zur Eliminierung von einzelnen Zellen, während bei nekrotischen Vorgängen ganze Zellverbände zugrunde gehen. In der lebenden Zelle entscheiden pro- und antiapoptotische Signale über das Auftreten des programmierten Zelltods. Ein Fehlen oder eine Resistenz gegenüber proapoptotischen Signalen verursacht Krebs, während dessen ein übermäßiges Triggern des programmierten Zelltodes neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer oder Autoimmunerkrankungen verursachen kann.

2.3.2.2. Mechanismen der Apoptose

Die Induktion der Apoptose aktiviert intrazelluläre proteolytische Kaskaden („*pathways*“), die letztendlich durch DNA-Fragmentierung und Spaltung lebenswichtiger Proteine im vollständigen Kollaps aller zellulären Funktionen münden. Gemeinsamer Endpunkt dieser

Kaskaden stellt die Aktivierung der Effektorproteasen dar. Die daraus resultierenden Effekte beinhalten die Inhibition der Zellzyklusvorgänge und Proteinsynthese sowie der DNA-Reparationsmechanismen. Es können zwei unterschiedliche Wege der Apoptoseinduktion unterschieden werden: Aktivierung von Todesrezeptoren (*extrinsic pathway*) oder Reaktion auf proapoptotische Signale durch das Freisetzen proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien (*intrinsic pathway*).

Extrinsic Pathway

Bei der rezeptorvermittelten extrinsischen Kaskade binden sich nach Anlagerung von Liganden intrazelluläre Caspase-Adapterproteine an die Todesrezeptoren (z.B. Fas/CD95, TNFR-1 [Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1] oder Rezeptor für TRAIL [TNF-related apoptosis inducing ligand]). Diese Adaptermoleküle stellen nun ein Bindeglied zwischen aktiviertem Todesrezeptor und den Procaspasen dar. Durch diesen Komplex werden die beiden Procaspasen-8 und -10 aktiviert (MUZIO, 1998, zur Übersicht).

Intrinsic Pathway

Hier kommt es zu einer Dysfunktion der mitochondrialen Funktion mit Porenbildung in der Mitochondrienmembran durch ein Ungleichgewicht zwischen anti- und proapoptotischen Signalen (Proteine der Bcl-2-Familie), ausgelöst durch eine Vielzahl an Stimuli (z.B. ischämisch-hypoxische Zustände, Reperfusion, Noxen, Toxine). Durch die Porenbildung wird nun Cytochrom C, ein Enzym der Atmungskette, freigesetzt, das in einem ATP-abhängigen Prozess die Caspase-9 aktiviert (BREDESEN, 2000).

Proteine der Bcl-2-Familie haben antiapoptotische Funktion, wie das Bcl-2 und das Bcl-X_L-Protein, andere hingegen haben proapoptotische Wirkung (Bad, Bax oder Bid). Die Aktivierung der Apoptose ist nun abhängig von dem Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen. Proapoptotische Bcl-2-Proteine sind im Zytosol lokalisiert, wo sie als Sensoren für zellulären Stress oder zellulären Schaden mit einer Integration in die Oberflächenmembran der Mitochondrien reagieren, wo sich die antiapoptotischen Proteine befinden. Diese Interaktion zwischen pro- und antiinflammatorischen Proteinen führt zur Porenbildung und Freisetzung von Cytochrom C und anderen proapoptotischen Molekülen aus dem intermembranösen Raum des Mitochondriums in das Zytosol. Dies wiederum führt zur Bildung der sogenannten Apoptosomen und die Aktivierung der Caspase-Kaskade. Das Cytochrom C interagiert mit dem zytosolischen Protein Apaf-1 (apoptotic protease activating

factor-1), was zur Bildung eines Multi-Protein-Komplexes (=Apoptosom) mit der Procaspase-9, Cytochrom C und Apaf-1 führt. Die Formierung des Apoptosoms führt zur Aktivierung der Caspase-9 und darauffolgend zur Aktivierung der Caspase-3.

2.3.2.3. Caspasen

Caspasen gehören zur Familie der Cystein-Proteasen (**cysteiny**l **asp**artate-specific proteinase) und sind die Schlüsselmoleküle des programmierten Zelltodes. Bisher sind 14 strukturell unterschiedliche Mitglieder der Caspasen identifiziert worden (Caspase 1-14) (ALNEMRI, 1997), die sich ihrer Funktion entsprechend in drei Gruppen einteilen lassen: Initiatorcaspasen (Caspase-8, -9), Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) und inflammatorische Caspasen (Caspase-1, -4, -5, -11, -13) (ELDADAH et FADEN, 2000). Caspasen liegen als inaktive Vorstufen (Procaspasen) vor, werden in der Regel durch Proteolyse aktiviert und bilden eine proteolytische Kaskade. Diese Kaskade wird an den Aktivatoren unter den Caspasen gestartet, die dann ihr apoptotisches Signal durch Proteolyse an die Effektoren weitergeben. Effektoren sind, wie ihr Name besagt, die ausführenden Proteasen der Kaskade. Sie tragen direkt zu den biochemischen und morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen durch Proteolyse ihrer Substrate bei.

Caspase-3 ist die zentrale Effektorprotease in der Signaltransduktion der Apoptose und spielt daher eine wichtige Rolle in der Vermittlung des programmierten Zelltods. Das Enzym liegt als 32 kDa schweres Proenzym vor, das durch Aktivierung in ein Heterotetramer mit zwei kleinen (12 kDa) und zwei großen Untereinheiten (17 kDa) umgesetzt wird (NAMURA et al., 1998). Über den *extrinsic pathway* werden die sogenannten Initiatorcaspasen Caspase-2, -8 und -10 Todesrezeptor-vermittelt aktiviert, während die Initiatorcaspase Caspase-9 über den *intrinsic pathway* durch mitochondriale Dysfunktion vermittelt wird. Beide Kaskaden führen zu der Aktivierung der sogenannten Effektorcaspasen Caspase-3, -6 und -7. Die Effektorcaspasen bewirken die Spaltung von zellulären Proteinen wie zytoskeletale Proteine, was zu den typischen morphologischen Veränderungen in apoptotischen Zellen führt, aber auch die Spaltung der chromosomalen DNA in nukleosomale Untereinheiten, was ein entscheidender Vorgang beim apoptotischen Zelltod ist.

Die Effektorcaspasen vermitteln folgende Mechanismen:

1. Aktivierung von DNasen:

Die Fragmentierung der DNA in nukleosomale Untereinheiten wird durch bestimmte Enzyme verursacht: Caspase-aktivierte DNase oder CAD. Diese liegt als inaktiver Komplex mit einem Inhibitor dieser CADs vor (ICAD = Inhibitor der CAD). ICAD wird nun durch Caspase-3 gespalten und CAD wird frei mit der raschen Fragmentierung der DNA als Folge.

2. Inhibition von DNA-Reparaturenzymen:

Das Enzym Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) ist ein DNA-Reparaturenzym, das durch Caspase-3 gespalten wird und so DNA-Schäden nicht reparieren kann (ELDADAH et FADEN, 2000).

3. Spaltung von Strukturproteinen im Nukleus:

Lamine sind strukturelle intranukleäre Proteine, die die Form des Kerns bewahren und Interaktionen zwischen Chromatin und nukleärer Membran ermöglichen. Die Spaltung von Laminen durch Caspase-6 führt zu Chromatinkondensation und Kernfragmentierung.

2.3.2.4. Apoptose und globale zerebrale Ischämie

Nach ischämischen Zuständen zeigen Neuronen typische histologische und biochemische Charakteristika des apoptotischen Zelltods. Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass zerebrale Ischämie die Aktivierung von Caspase-3 induziert, vor allem in der CA1-Region (KIHARA, 1994) und im Striatum (CHEN et al., 1998). Auf molekularbiologischer Ebene konnten bei der Ratte nach globaler zerebraler Ischämie eine Hochregulierung der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L in der CA3-Region festgestellt werden, während in der CA1-Region eine Hochregulierung des pro-apoptotischen Proteins Bax nachzuweisen war (CHEN et al., 1996). Diese Ergebnisse stimmen überein mit dem Überleben der Neuronen bzw. der Nervenzelldegeneration in den einzelnen Sektoren des Hippokampus.

2.4. Aktiviertes Protein C (APC)

2.4.1. Allgemeines

APC ist ein physiologischer Inhibitor des Gerinnungssystems, der neben der antikoagulatorischen Wirkung auch profibrinolytische und antiinflammatorische Eigenschaften besitzt. Die antikoagulatorische Wirkung kommt durch Inhibition der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa zustande. Hierdurch erfolgen indirekt die Hemmung der Thrombinbildung und damit auch die Ausschaltung der proinflammatorischen Wirkmechanismen von Thrombin. Jedoch soll APC auch direkte antiinflammatorische Eigenschaften besitzen, die vermutlich unabhängig von der antikoagulatorischen Aktivität über die Modulation der Genexpression in Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen zustande kommen. Die profibrinolytische Wirkung von APC ergibt sich aus der Inaktivierung von Hemmern der Fibrinolyse, z.B. des plasminogen activator inhibitor (PAI) oder des thrombin activatable fibrinolytic inhibitor (TAFI). Aufgrund seiner vielfältigen Wirkungen, die in den Pathomechanismus der Sepsis eingreifen, wird APC als rekombinantes humanes aktiviertes Protein C (rhAPC, Xigris, Drotrecogin alpha [aktiviert], Fa. Eli Lilly and Company, Indianapolis, USA) in der Sepsistherapie eingesetzt. RhAPC führte in der placebokontrollierten multizentrischen PROWESS-Studie (Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis) an 1690 Sepsispatienten zu einer signifikanten Reduzierung der Gesamtsterblichkeit (BERNARD et al., 2001).

2.4.2. Wirkungen von APC

APC liegt physiologischerweise im Blut als inaktive Vorstufe vor: das Zymogen Protein C. Um seine Wirkung zu entfalten, muss es zuerst in seine aktive Form überführt werden. Dies geschieht durch Thrombin auf der Oberfläche von Endothelien. Hierzu werden zwei membranständige Rezeptoren benötigt, das Thrombomodulin und der endothelial protein C receptor (endothelialer Protein C-Rezeptor, EPCR). Im Ablauf der Aktivierung bindet nun das Thrombin am Thrombomodulin (STEARNS-KUROSAWA et al., 1996) und die beiden Moleküle formieren einen Komplex. Diese Reaktion wird nun verstärkt durch den EPCR (TAYLOR et al., 2001), der sich in unmittelbarer Nähe des Thrombomodulins befindet. Das Protein C wird von diesem Komplex gebunden und aktiviert. Für die Aktivierung ist

zusätzlich ein Cofaktor obligat, das Protein S, das auch bei der antikoagulatorischen Wirkung von APC eine wichtige Rolle spielt. Das aktivierte Protein C kann nun vom Rezeptorkomplex wegdissoziieren und seine Aktivität entfalten. Viele Studien haben sich bisher mit der vielfältigen Wirkung von APC beschäftigt. Zusammenfassend wurden für APC bisher folgende Effekte beschrieben:

- Antikoagulatorisch
- Profibrinolytisch
- Antiinflammatorisch
- Antiapoptotisch

Antikoagulatorische Wirkung:

In der plasmatischen Gerinnungskaskade spielt Thrombin eine zentrale Rolle. Durch einen Stimulus (geschädigte oder entzündete Endothelzellen) kommt es zu einer Expression von Gewebsthromboplastin („tissue factor“, TF) und daraufhin zusammen mit Faktor VIIa zu einer Aktivierung von Gerinnungsfaktor X, der durch Komplexbildung mit aktiviertem Faktor V die Umwandlung der inaktiven Vorstufe Prothrombin zum aktiven Thrombin auslöst. Zum einen hat Thrombin prokoagulatorische Effekte, indem es Fibrinogen zu Fibrin umwandelt und als Thrombozytenaktivator wirkt. Andererseits hat Thrombin aber auch antikoagulatorische Effekte, indem es an Thrombomodulin bindet, das auf Endothelzellen exprimiert wird. Diese Bindung erfolgt nun aber über die gleichen Bindungsstellen, über die Thrombin normalerweise auch Fibrinogen und Faktor V aktiviert, so dass es zu einer Blockade dieser prokoagulatorischen Effekte kommt. Der Thrombin-Thrombomodulin-Komplex wandelt nun Protein C unter Mitwirkung des EPCR in seine aktive Form um. Endogenes Protein C wird in Abhängigkeit von Vitamin K in der Leber synthetisiert und liegt beim Menschen in einer physiologischen Plasmakonzentration von 3-5 mg/l vor. Nach der Aktivierung von Protein C und der Dissoziation vom EPCR führt APC mit seinen Cofaktoren (Protein S, Faktor V, high-density Lipoproteine, anionische Phospholipide und Glykosphingolipide) zu einer irreversiblen proteolytischen Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa. Hierdurch erfolgt indirekt eine Hemmung der Thrombinbildung durch Inhibierung des APC/Protein-S-Komplex. APC ist damit ein wichtiger Bestandteil der physiologischen Antikoagulation, der ein Überschießen der Gerinnungsaktivierung verhindert.

Profibrinolytische Wirkung:

Das fibrinolytische System ist der physiologische Gegenpol zur Koagulation und hat die Aufgabe, bereits gebildetes Fibrin durch hydrolytische Spaltung von Fibrin in Fibrinspaltprodukte, z.B. D-Dimere, wieder aufzulösen. Das zentrale Enzym der Fibrinolyse ist Plasmin, das aus der inaktiven Vorstufe Plasminogen entsteht. Gewebeplasminogenaktivator („tissue plasminogen activator“, t-PA) wird durch Thrombin aus Endothelzellen freigesetzt und kann durch Bindung an Plasminogen direkt die Bildung von Plasmin auslösen. Außerdem gibt es Inhibitoren der Fibrinolyse, die analog dem Gerinnungssystem ein Überschießen des fibrinolytischen Systems verhindern. Dazu gehören die Plasmininhibitoren, die direkt an freies Plasmin binden und es so aktivieren, aber auch die Inhibitoren der Plasminogenaktivatoren, z.B. plasminogen activator inhibitor-1, (PAI-1), der t-PA durch Komplexbildung inaktiviert. Ein weiterer Inhibitor der Fibrinolyse ist TAFI, der unter katalytischer Wirkung von Thrombin oder dem Thrombin-Thrombomodulin-Komplex in seine aktive Form umgewandelt wird und so die Anlagerung von Plasminogen verhindert. Die profibrinolytischen Effekte von APC erfolgen nun indirekt durch eine Reduktion der Bildung von Thrombin und darüber hinaus direkt durch Inhibition von PAI-1 durch Komplexbildung, wodurch t-PA vor seiner Inaktivierung geschützt wird. Daraus entsteht eine vermehrte Umwandlung von Plasminogen in Plasmin und eine gesteigerte Aktivität des endogenen profibrinolytischen t-PA.

Antiinflammatorische Wirkung

Neben seinen prokoagulatorischen Effekten ist Thrombin auch an der Entstehung der inflammatorischen Immunantwort im Rahmen der Sepsis beteiligt durch Induktion der Expression von P-Selectin auf Endothelzellen. Dieses dient als Adhäsionsmolekül für Monozyten und neutrophile Granulozyten und verstärkt so deren Aktivierung. Außerdem aktivieren im umgekehrten Fall verschiedene Zytokine wie TNF- α , IL-1 β oder IL-6 das Gerinnungssystem durch verstärkte Expression von Gewebsthromboplastin auf Monozyten, durch verminderte Expression von Thrombomodulin, Hemmung der Fibrinolyse und durch Aktivierung des Komplementsystems. APC vermittelt nun indirekt antiinflammatorische Effekte über die Hemmung der Thrombinbildung, direkte Effekte erfolgen über die Hemmung der durch E-Selectin vermittelten Leukozytenadhäsion an Endothelzellen (GRINNELL, 1994) sowie Hemmung der Zytokinbildung bei mononukleären Zellen (GREY, 1994; FERNANDEZ, 2003; BRÜCKMANN, 2004). In einem Modell der experimentell ausgelösten Sepsis verminderte eine APC-Applikation die Leukozyteninfiltration und suppressierte die

Induktion von iNOS, die Chemokin-Antwort und die Induktion von vascular endothelial growth factor (VEGF) (SHARMA, 2008), während eine kontinuierliche Applikation von APC bei Protein C-defizienten Mäusen nach LPS-induzierter Sepsis die Mortalität signifikant senken konnte (LAY et al., 2007).

Antiapoptotische Wirkung:

Die antiapoptotische Wirkung von rekombinatem humanen APC konnte an humanen Endothelzellen gezeigt werden, was anhand der Modulation der Genexpression in vitro bestätigt wurde. APC hemmt die Expressionsrate von proapoptotischen Genen wie Bax und steigert die Aktivität von antiapoptotischen Markern wie Bcl-2. Über die Hemmung des Tumorsuppressorproteins p53 und aktivierte-Caspase-3-modulierten Signalkaskaden wird eine neuroprotektive Wirkung von APC an zerebralen Endothelzellen vermutet. Darüber hinaus bewirkte APC in einem in-vitro-Modell an humanen zerebralen Endothelzellen eine Hemmung von p53, eine Normalisierung des proapoptotischen Bax/Bcl-2-Verhältnisses und eine Reduktion der Caspase-3-Signalkaskade und zeigte so eine direkte antiapoptotische Wirkung auf die Endothelien (CHENG et al., 2003).

2.4.3. Drotrecogin alpha (aktiviert)

Drotrecogin alpha (aktiviert) ist rekombinantes humanes APC (rhAPC). Das Molekül umfasst insgesamt 405 Aminosäuren und wird mit rekombinanter DNA-Technologie in einer humanen Nierenzelllinie hergestellt. Die inaktive Vorstufe des Proteins wird biotechnologisch produziert, chromatographisch gereinigt und durch Thrombin aktiviert. Es handelt sich also um eine rekombinante Form des natürlicherweise im Plasma vorkommenden APC, von dem es sich nur durch einzelne Oligosaccharide im Kohlenhydratteil des Moleküls unterscheidet und verhält sich analog der intrinsischen pharmakologischen Aktivität des endogenen APC. Seit Ende 2001 ist rhAPC in den USA, seit 15.11.2002 auch in Deutschland unter dem Handelsnamen Xigris (Fa. Eli Lilly and Company, Indianapolis, USA) zugelassen. Drotrecogin alpha (aktiviert) wurde zur Behandlung der schweren Sepsis mit Multiorganversagen entwickelt und seine Wirksamkeit und Verträglichkeit in zwei randomisierten, doppelt verblindeten, placebokontrollierten multizentrischen klinischen Studien an 1690 Erwachsenen getestet (BERNARD, 2001 [PROWESS = Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis]).

2.4.4. Pharmakokinetische Daten zu APC

In den Phase 1-Studien wurden die pharmakokinetischen Parameter sowohl an gesunden Probanden, als auch an Patienten mit verschiedenen Erkrankungen (Nierenversagen, Purpura fulminans, heterozygoter Protein C-Mangel) erfasst. In den Phase 2-Studien wurden die Sicherheit und Pharmakokinetik von APC in Hinblick auf effektive Dosierung und Therapiedauer bei Sepsis-Patienten untersucht. Nach Dosisfindung wurde in der Phase 3-Studie (PROWESS-Studie) an 1690 Patienten mit schwerer Sepsis eine Applikation von 24 µg/kg/h i.v. über 96 Stunden getestet. Endpunkt war die 28-Tage-Mortalität der Patienten.

Die Untersuchungen der Phase 1-Studien ergab eine Plasmaclearance von 28 Liter/Stunde mit einer biphasischen Elimination, während in den Phase 2 und 3-Studien bei septischen Patienten die Plasmaclearance im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich erhöht war (42-46 Liter/Stunde). Bei APC-Infusionen von 12 bis 48 µg/kg/h i.v. verhielt sich die Steady State Plasmakonzentration (C^{ss}) mit 72,4 µg/l proportional zur Infusionsrate bei gesunden Probanden. In septischen Patienten dagegen, die mit einer Infusionsrate von 24 µg/kg/h i.v. über 96 Stunden behandelt wurden, war die C^{ss} mit 44,9 µg/l deutlich erniedrigt. Der Anstieg der Plasma-Clearance resultiert in einer geringeren C^{ss} bei septischen Patienten.

APC wird physiologischerweise durch verschiedene endogene Plasma-Serinprotease-Inhibitoren abgebaut: Protein C-Inhibitor, α_1 -Antitrypsin, α_2 -Antiplasmin, plasminogen activator inhibitor-1[PAI-1]). Dies resultiert in einer schnellen initialen Eliminationsphase mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2\alpha} = 13$ Minuten und einer darauffolgenden langsamen zweiten Phase mit $t_{1/2\beta} = 1,6$ Stunden. Die Halbwertszeit ist in gesunden und septischen Probanden gleich. Aufgrund dieser kurzen Halbwertszeit muss APC in der Sepsistherapie als kontinuierliche Infusion intravenös appliziert werden.

Die effektive Infusionsrate und Dauer von APC in Patienten mit schwerer Sepsis wurde festgelegt auf 24 µg/kg/h über 96 Stunden basierend auf der Reduktion von D-Dimeren sowie Entzündungsparametern im Plasma (BERNARD, 2001; Eli Lilly and Company Briefing Document, LYSENG-WILLIAMSON et al., 2002). Mit diesem Dosierungsprotokoll konnte in der PROWESS-Studie die 28-Tage-Letalität von 30,8 % in der Placebo-Gruppe auf 24,7 % in der APC-Gruppe gesenkt werden. Dies entspricht einer relativen Reduktion des Letalitätsrisikos um 19,4 % und einer absoluten Reduktion um 6,4 %.

Die wichtigsten Nebenwirkungen von APC betreffen Blutungen, die während der Infusionsdauer bei 2,4 % der behandelten Patienten in der PROWESS-Studie auftraten. Die am häufigsten dabei auftretenden Blutungskomplikationen waren Haut- oder Gastrointestinalblutungen.

Um nun eine antiinflammatorische, antiapoptotische und neuroprotektive Wirkung von APC nachweisen zu können, ist die Kenntnis des Zeitverlaufs der Wirkeffektivität essentiell. Erstens unterscheidet sich eine bisher nachgewiesene relativ kurze antikoagulatorische Wirksamkeit von einer neuroprotektiven, zweitens lassen sich pharmakokinetische Daten aus einer klinischen Studie nicht auf Tiermodelle übertragen. Nach einer intraarteriellen Injektion von radiomarkiertem APC zur Charakterisierung der Pharmakokinetik beim Meerschweinchen zeigte sich eine biphasische Plasmaelimination von $t_{1/2\alpha} = 13$ Minuten und $t_{1/2\beta} = 133$ Minuten, während ein Abfall der enzymatischen Aktivität um 50 % nach acht Minuten erreicht war (BERGER et al., 1991). Für diese Diskrepanz zwischen APC-Plasmaspiegel und enzymatischer Aktivität wurden die Unterschiede bezüglich der Elimination durch die Leber und die Komplexbildung mit Serinprotease-Inhibitoren verantwortlich gemacht.

2.4.5. APC und Neuroprotektion

In einem Tiermodell der fokalen zerebralen Ischämie der Maus konnte bereits gezeigt werden, dass eine Bolusgabe von 2 mg/kg humanem bzw. 0,2 mg/kg murinem APC nach 24 Stunden eine signifikante Verbesserung des zerebralen Blutflusses in der ischämischen Hemisphäre bewirkte (SHIBATA et al., 2001; FERNANDEZ et al., 2003). Fibrinablagerungen, mikrovaskuläre Obstruktionen sowie die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im ischämischen Gehirnareal wurden darüber hinaus vermindert. Eine Administration von APC zeigte auch einen positiven Einfluss auf das neurologische Defizit bei Ratten drei Tage nach Herzkreislaufstillstand, nicht aber nach sieben Tagen (TESCHENDORF et al., 2006). Die Applikation von 0,2 mg/kg APC vier Stunden nach fokaler zerebraler Ischämie der Maus mit Okklusion der A. cerebri media konnte innerhalb der ersten sieben Tage eine Verbesserung des neurologischen Defizits sowie eine Verminderung des Infarktvolumen bewirken (ZLOKOVIC et al., 2005). Auch in einem Modell traumatisch bedingter

Rückenmarksläsionen wurde eine Verminderung des Schadens nach APC-Applikation beobachtet (TAOKA et al., 2000).

Diese Studien zeigen, dass APC neuroprotektive Effekte aufweisen kann, diese jedoch unabhängig von der antikoagulatorischen Wirkung zu sein scheinen (siehe Abbildungen 4 und 5) und APC direkt auf die Zellen, also zytoprotektiv wirkt, indem es Genexpressionsprofile ändert, Apoptose und Inflammation inhibiert. Diese Effekte benötigen die Mitwirkung vom PAR-1 und dem EPCR. Der genaue Mechanismus über die direkte Wirkung von APC auf die Zielzellen ist jedoch nach wie vor nicht geklärt. Studien belegen nun, dass die zytoprotektiven Wirkungen unabhängig von der antikoagulatorischen Aktivität von APC sind: rekombinante APC-Varianten mit selektiv verminderter (<10 %) antikoagulatorischer Aktivität waren durchaus in der Lage, Endotoxämie-induzierte Letalität bei Mäusen zu verringern (KERSCHEN et al., 2007). Daraus resultiert, dass APC-Varianten mit verminderter antikoagulatorischer, aber normaler zytoprotektiver Aktivität das Blutungsrisiko vermindern, aber dennoch die Letalität durch direkte Wirkung auf die Zielzellen senken können.

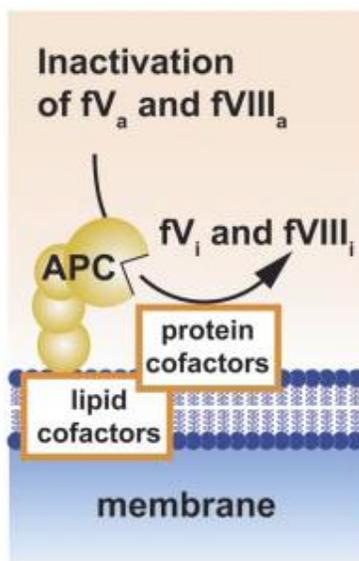


Abbildung 4:
Vermittlung der antikoagulatorischen
Aktivität von APC
 (MOSNIER et al., Blood 2007)

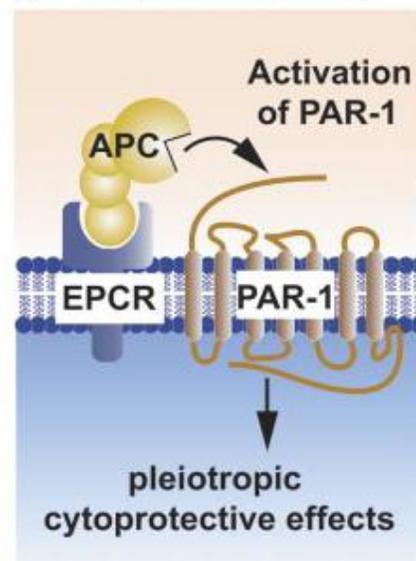


Abbildung 5:
Vermittlung der zytoprotektiven Effekte
von APC
 (MOSNIER et al., Blood 2007)

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. ZIELVORSTELLUNGEN

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von APC auf den neuronalen Schaden nach globaler zerebraler Ischämie der Ratte zu untersuchen.

Bisher durchgeführte Studien belegen, dass APC 24 Stunden nach fokaler zerebraler Ischämie der Maus neuroprotektive Effekte besitzt, indem es den zerebralen Blutfluss verbessert, das Infarktvolume, Fibrinablagerungen, mikrovaskuläre Obstruktionen sowie die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im ischämischen Gehirnareal vermindert (SHIBATA et al., 2001; FERNANDEZ et al., 2003). Außerdem werden auch antiapoptotische Effekte beschrieben: an ischämischen humanen zerebralen Endothelzellen konnte die durch p53 vermittelte apoptotische Signalkaskade reduziert werden (CHENG et al., 2003). Ob APC jedoch auch einen langfristigen neuroprotektiven Effekt nach Vorderhirnischämie der Ratte besitzt, ist unbekannt.

Mit seinen Eigenschaften stellt APC ein neues, potentiell es Medikament im klinisch-therapeutischen Einsatz zur Behandlung des Schlaganfalles dar, weshalb weitere Untersuchungen zu Eigenschaften und Wirkmechanismus auch in anderen zerebralen Ischämie modellen von großer Bedeutung sind. In der vorliegenden Studie wird deshalb der Einfluss von APC auf den zerebralen Blutfluss, das neurologische Defizit, den histopathologischen Schaden und auf die Aktivierung des Apoptosemarkers Caspase-3 nach globaler zerebraler Ischämie der Ratte untersucht. Innerhalb des Beobachtungszeitraums von zehn Tagen wird das neurologische Defizit mit dem Barnes Maze Test ermittelt. Im Anschluss erfolgt die analytische Untersuchung der Gehirnproben. Der histopathologische Schaden wird dabei mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung quantifiziert, die Detektion aktivierter Caspase-3 erfolgt nach immunhistochemischer Färbung.

Der PROWESS-Studie entsprechend wird APC in der Behandlung der schweren Sepsis mit Organversagen beim Menschen in Form einer Infusion über 96 Stunden appliziert, da für eine konstante Plasmakonzentration eine dauerhafte Applikation notwendig ist. Bisherige Ergebnisse tierexperimenteller Studien über die neuroprotektive Wirkung von APC basieren auf einer einmaligen Bolusgabe von 2 mg/kg i.v. unmittelbar nach der Ischämie.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Pharmakokinetische Daten von APC bei Ratten sind bisher jedoch noch nicht veröffentlicht worden. Aus diesem Grund erschien es naheliegend, die pharmakokinetischen Eigenschaften von APC im gesunden Tier zuerst zu charakterisieren, um dann in einem zweiten Schritt den Einfluss von APC auf den neuronalen Schaden nach zerebraler Ischämie zu untersuchen.

3.2. MATERIAL UND METHODEN

3.2.1. Vorversuch

In diesem Teil der Studie werden die pharmakokinetischen Eigenschaften von APC an der Ratte charakterisiert und dargestellt.

3.2.1.1. Versuchstiere

In diesen Teil der Studie gehen sieben männliche Sprague Dawley-Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) mit einem durchschnittlichen Gewicht von $400 \pm 16\text{g}$ zum Zeitpunkt der Operation ein.

3.2.1.1.1. Versuchstierhaltung

Die eingesetzten Versuchstiere werden bei Standard-Laborbedingungen in Makrolon Typ III-Käfigen (mit erhöhtem Deckel) gehalten. Die Ställe unterliegen einem hell-dunkel-Rhythmus (50 bis 100 lux) in einem Intervall von zwölf Stunden. Entsprechend den Vorgaben für Versuchstierhaltung werden die Tiere bei einer Temperatur zwischen 20 und 23 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60 % gehalten. Als Einstreu dient entkeimtes und entstaubtes Weichholzgranulat (Fa. Lignocel, JRS GmbH&Co.KG, Rosenberg). Zwölf Stunden vor Versuchsbeginn wird den Tieren das Futter (Alleinfutterpellets für Ratten und Mäuse, R/M-Haltung, 10mm, nitrosaminarm, Fa. ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) entzogen, Wasser steht ihnen weiterhin ad libitum zur Verfügung. Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG i. d. F. vom 25.05.1998, BGBl I S. 1105) durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz (Zulassungsnummer 23 177-07/§10 BM) genehmigt.

3.2.1.1.2. Versuchstiergruppen

Nach Abschluss der Vorversuche bildeten sich drei Gruppen heraus: eine Gruppe mit einmaliger Bolusgabe 2 mg/kg APC i.v. und zwei Gruppen mit Bolusgabe 2 mg/kg APC i.v. und zusätzlicher Infusion von 3 mg/kg/h bzw. 6 mg/kg/h über drei Stunden. Die Gruppeneinteilung ist in folgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 1: Einteilung der Tiere in die Gruppen des Vorversuches

Gruppe 1 (n = 4)	Bolusgabe 2 mg/kg APC i.v.
Gruppe 2 (n = 1)	Bolusgabe 2 mg/kg APC i.v. danach Infusion mit 3 mg/kg/h über drei Stunden
Gruppe 3 (n = 2)	Bolusgabe 2 mg/kg APC i.v. danach Infusion mit 6 mg/kg/h über drei Stunden

Einteilung der Tiere nach Randomisierung in die drei Gruppen mit unterschiedlicher Dosierung (Gruppe 1 mit Bolusgabe von 2 mg/kg APC i.v. [n = 4], Gruppe 2 mit zusätzlicher Infusion von 3 mg/kg/h [n = 1] und Gruppe 3 mit zusätzlicher Infusion von 6 mg/kg/h [n = 2]).

3.2.1.1.3. Versuchsplan

Der Versuch beinhaltet die Intubation und Präparation der Tiere sowie die Applikation des Medikaments mit nachfolgender Phase der Probenentnahme. Nach der Applikation (Zeitpunkt t = 0) wurden bei allen Tieren zu festgelegten Zeitpunkten Blutproben entnommen. Dies ist in den zwei folgenden Tabellen schematisch dargestellt.

Tabelle 2: Darstellung der Zeitpunkte zur Blutentnahme der Tiere der Bolusgruppe

Zeitpunkt	Zeit nach Applikation in min
t = 0	Baseline
t = 1	2,5
t = 2	5
t = 3	10
t = 4	15
t = 5	20
t = 6	25
t = 7	30
t = 8	45

Darstellung der Zeitpunkte zur Blutentnahme der Tiere der Bolusgruppe (n = 4) zur Bestimmung der Plasmakonzentration von APC: neun Entnahmezeitpunkte bei den Tieren der Bolusgruppe.

Tabelle 3: Darstellung der Zeitpunkte zur Blutentnahme der Tiere der beiden Infusionsgruppen

Zeitpunkt	Zeit nach Applikation in min
t = 0	Baseline
t = 1	2,5
t = 2	60
t = 3	120
t = 4	180

Darstellung der Zeitpunkte zur Blutentnahme der Tiere der beiden Infusionsgruppen (n = 1 mit 3 mg/kg/h und n = 2 mit 6 mg/kg/h) zur Bestimmung der Plasmakonzentration von APC: jeweils fünf Entnahmezeitpunkte bei den Tieren der beiden Infusionsgruppen.

3.2.1.2. Narkoseeinleitung und Vorbereitung

Die Tiere müssen für die Intubation anästhesiert werden. Hierzu werden sie in eine Narkoseinduktionskammer aus Kunststoff gesetzt, die mit Sevofluran (Sevorane, Fa. Abbott, Wiesbaden) geflutet wird. Nach Eintritt der Bewusstlosigkeit wird das Tier aus der Kammer entnommen und zur Intubation in Rückenlage an einer schiefen Ebene fixiert, wobei die Schneidezähne an einer Drahtschlinge eingehakt werden. In dieser gestreckten Position kann mit Hilfe eines modifizierten Laryngoskops (Fa. Stoss, Wiesbaden) die orotracheale Intubation unter Sichtkontrolle erfolgen. Als Tubus wird ein präparierter zentraler Venenkatheter verwendet (Cavafix Certo, 18 G, 5 cm, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Anschließend lagert man die Ratte auf dem Operationstisch in Rückenlage und konnektiert den Tubus an eine volumengesteuerte Beatmungspumpe mit 3,5 Vol% Sevofluran. Nach Fixation des Tubus mit einem Bindfaden legt man die Maulhöhle der Ratte mit feuchten, getränkten Mulltupfern aus, um ein Vorbeiatmen am Tubus zu verhindern und die Maulschleimhaut dauerhaft feucht zu halten. Nun lagert man das Tier um in Bauchlage, um eine Temperaturmesssonde (Hypodermic needle probe, Omega Technologies Co., Stanford CT, USA) im rechten Musculus temporalis zu positionieren, die die perikranielle Temperatur in Annäherung an die Hirntemperatur erfasst. Außerdem trägt man auf die Cornea des Tieres eine Wundsalbe (Panthenol-Augensalbe, Fa. Jenapharm mibe GmbH, Jena) auf, um einer Austrocknung während des Versuchs vorzubeugen. Nach erneutem Umlagern zurück in die Rückenlage werden die Sonden zur Messung des Elektrokardiogramms subkutan in Ellenbogen- und Kniefalten positioniert. Nach dem Rasieren und Desinfizieren (Freka-Derm farblos, Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg) der Haut in Leisten- und Halsgegend beginnt man mit der Präparation.

3.2.1.3. Präparation

Mit einer Skalpellklinge nimmt man in der rechten Leistengegend einen etwa 1 cm langen senkrechten Schnitt vor. Man infiltriert die Wundränder mit Carbostesin 0,5 % (Bubivacainhydrochlorid Injektionslösung, Fa. AstraZeneca GmbH, Wedel) zur Lokalanästhesie und beginnt die Präparation der rechten A. und V. femoralis vor Eintritt in den Leistenspalt. Eine Katheterisierung der A. femoralis ist notwendig zur Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks, die Katheterisierung der V. femoralis hingegen zur Entnahme

von Blutproben. Hierzu trennt man die beiden Gefäße vom Nervus femoralis und von den Bindegewebsfaszien, isoliert sie voneinander auf einer Länge von etwa 1 cm und spannt sie einzeln auf eine Präparationspinzette auf. Zur Gefäßkatheterisierung legt man je eine Fadenligatur an das obere und untere Ende des aufgespannten Gefäßes und eröffnet das Lumen mit einer senkrecht abgebogenen Kanüle. Hiernach bindet man das untere Ende des Gefäßes ab, um Blutungen zu vermeiden. Zur Katheterisierung der A. femoralis verwendet man einen schräg angeschnittenen Polyethylenkatheter (PE-Katheter, 33,5 cm, Fa. dispomedica, Hamburg), der zuvor über Nacht mit Heparin (Heparin-Natrium 25.000, Fa. ratiopharm GmbH, Ulm) eingelegt wurde und nun vor der Präparation nochmals mit einer mit Heparin versetzten Vollelektrolytlösung (2,5 I.E. Heparin-Natrium pro ml) (Sterofundin, Fa. Braun AG, Melsungen) gespült wird, um einer Thrombosierung vorzubeugen. Der Katheter wird in das Gefäßlumen eingeführt und nach Prüfen der Durchgängigkeit an der Gefäßwand mit einem Faden befestigt. Ebenso wird mit der Katheterisierung der V. femoralis verfahren: hierzu verwendet man einen gerade angeschnittenen Katheter, da die Gefäßwände der Vene weniger stabil sind. Nach der Katheterisierung der Gefäße in der rechten Leistengegend bedeckt man die Wundöffnung mit einem feuchten Mulltupfer, um eine Austrocknung der Gefäße zu vermeiden.

Um das Medikament applizieren zu können, ist eine Katheterisierung der V. jugularis notwendig, da die Applikation und gleichzeitige Blutentnahme aus demselben Gefäß eine Messung der Plasmakonzentration des Medikaments nachteilig beeinflussen könnte. Zur Präparation der rechten Halsseite beginnt man ebenfalls nach Rasieren und Desinfizieren mit dem Eröffnen der Haut durch einen längs verlaufenden Schnitt auf einer Länge von etwa 1 cm parallel zur Drosselrinne. Die Wundränder werden erneut mit 0,1–0,2 ml Carbostesin 0,5 % infiltriert. Nun präpariert man stumpf in die Tiefe, bis die V. femoralis zum Vorschein kommt. Diese befreit man von Bindegewebsfaszien und spannt jetzt das Gefäß zur Katheterisierung auf eine Präparationspinzette auf und geht wie bisher beschrieben vor.

3.2.1.4. Narkoseüberwachung und physiologische Parameter

Während des gesamten Versuches werden die physiologischen Parameter überwacht, um konstante und reproduzierbare Bedingungen zu schaffen.

Perikranielle Temperatur

Die Überwachung der perikraniellen Temperatur erfolgt über eine Temperatursonde, die im rechten Musculus temporalis platziert wurde, um einer Auskühlung entgegenwirken zu können. Angestrebt wird eine Temperatur von 37 °C. Um ein Absinken der perikraniellen Temperatur unter diesen Soll-Wert zu vermeiden, werden eine Rotlichtlampe und eine Wärmematte eingesetzt.

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Der MAP wird während des gesamten Versuchablaufes über die A. femoralis gemessen. Der in das Gefäß eingeführte Katheter ist an einem Druckwandler angeschlossen (Fa. Medex Medical GmbH & Co. KG, Klein-Winternheim), welcher den systolischen, diastolischen und den arteriellen Mitteldruck misst. Das Monitoring erfolgt über einen Cardiocap II-Monitor (Fa. Datex Helsinki, Finnland).

Elektrokardiogramm

In Rückenlage werden zur Messung des Elektrokardiogramms zwei Elektroden subkutan in Höhe der Achselhöhlen in der Ellenbogenfalte und eine dritte Elektrode ebenfalls subkutan in der rechten Kniefalte angebracht. Diese stehen mit einer Messapparatur (Cardiocap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) in Verbindung. Auf einem Monitor wird die Herzfrequenz dargestellt.

Atemgasmessung

Die Überwachung der Atmung erfolgt über ein Atemgasmonitor (Capnomac, Fa. Datex Helsinki, Finnland). Hier werden die Atemfrequenz, der in- und expiratorische Kohlendioxid- und Sauerstoffgehalt sowie in- und expiratorische Sevoflurankonzentration gemessen.

Blutgasanalyse

Mit der Messung und Kontrolle der Blutgase wird eine adäquate Beatmung des Tieres sichergestellt. Hier werden zu den genannten Messzeitpunkten über einen Dreivegehahn (BD

Connecta, Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden), der an der A. femoralis angeschlossen ist, arterielles Blut in eine heparinisierte Kapillare (Clinitubes, 85 µl, Fa. Radiometer Medical ApS, Kopenhagen, Dänemark) überführt und folgende Werte mit Hilfe des Blutgasanalysegeräts ABL800 Flex (Fa. Radiometer Medical ApS, Kopenhagen, Dänemark) gemessen:

Kohlendioxidpartialdruck, PaCO₂

Sauerstoffpartialdruck, PaO₂

pH-Wert

Standard-Bikarbonat (SBC)

Basendefizit (BE)

Plasmaglukosekonzentration

Hämoglobingehalt (Hb)

3.2.1.5. Medikamentenapplikation

Nach Beenden der Präparationsphase wird unmittelbar vor der Applikation des Medikaments die Stammlösung frisch hergestellt. Hierzu wird den Angaben des Herstellers zufolge 5 mg des Pulvers mit 2,5 ml Aqua ad iniectabilia (Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen) aufgelöst, so dass eine Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml entsteht. Die Tiere der Bolusgruppe erhielten eine einmalige Applikation von 2 mg/kg, die Tiere der beiden Infusionsgruppen zusätzlich eine Infusion mit einer Rate von 3 mg/kg/h bzw. 6 mg/kg/h.

3.2.1.6. Entnahme der Blutproben

Vor Gabe des Medikaments wird zum Zeitpunkt $t = 0$ eine Blutprobe zur Bestimmung des Ausgangswertes (Baseline) bestimmt. Nach der Applikation werden zu den beschriebenen Zeitpunkten (siehe Tabelle 2 und 3) Blutproben von je 1 ml entnommen und ohne Zusatz von gerinnungshemmenden Faktoren zentrifugiert. Das überstehende Plasma wird abpipettiert und bei -80 °C eingefroren.

3.2.1.7. Bestimmung der Plasmakonzentration von APC

Die Bestimmung der Plasmakonzentration der Proben erfolgt mit einem chromogenen Peptid-Substrat-Assay (BCS) nach Aktivierung des Protein C durch Schlangengift (Protac) mit dem Reagenz Berichrom der Fa. Dade-Behring.

3.2.1.8. Messung der Plasmaosmolarität

Um eine Gewährleistung der Homöostase sicherzustellen, wurden bei einem Tier der Infusionsgruppe mit 6 mg/kg/h zwei Blutproben von je 0,5 ml zur Bestimmung der Plasmaosmolarität genommen: die erste Blutprobe vor Applikation von APC (Baseline) und die zweite Blutprobe nach 180 Minuten Infusionsdauer. Außerdem wurde als dritte Probe 1 ml der Stammlösung von 2 mg/kg APC einer Osmolaritätsmessung unterzogen.

3.2.1.9. Berechnung der Plasmahalbwertszeit (HWZ)

Die Berechnung der HWZ erfolgt anhand der Bestimmung einer Regressionskurve in Annäherung an die Eliminationskurve nach Bolusgabe mit Microsoft Office Excel 2003. Für die Regressionsgerade wird eine Funktionsgleichung erstellt, mit deren Hilfe der Zeitpunkt t berechnet werden kann, zu dem die Plasmakonzentration von APC auf die Hälfte der Ausgangskonzentration nach Bolusgabe abgesunken ist.

3.2.2. Hauptversuch

In diesem Teil der Studie wird der Effekt von APC auf den neuronalen Schaden nach globaler zerebraler Ischämie der Ratte untersucht.

3.2.2.1. Versuchstiere

In diese Studie gehen 26 männliche Sprague Dawley-Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) mit einem durchschnittlichen Gewicht zum Zeitpunkt der Operation von 320 ± 15 g ein.

3.2.2.1.1. Versuchstierhaltung

Die Tiere wurden entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen zur Versuchstierhaltung unter standardisierten Laborbedingungen in identischen Käfigen mit entstaubten und entkeimten Weichholzgranulat-Einstreu sowie Futter und Wasser ad libitum gehalten. Zwölf Stunden vor Versuchsbeginn wird den Tieren das Futter entzogen, Wasser steht ihnen weiterhin ad libitum zur Verfügung. Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG i. d. F. vom 25.05.1998, BGBl I S. 1105) durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz (Zulassungsnummer 23 177-07/G 06-1-023) genehmigt.

3.2.2.1.2. Versuchstiergruppen

Die Versuchstiere werden in drei unterschiedliche Gruppen randomisiert: 1. eine APC-Gruppe, 2. eine Kontrollgruppe mit Natriumchlorid(NaCl)-lösung und 3. eine Nativtiergruppe. Die Einteilung der Tiere in die drei Gruppen ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 4: Einteilung der 26 Tiere in die drei Versuchsgruppen des Hauptversuches

Gruppe	Behandlung	Anzahl der Tiere
APC-Gruppe	APC Bolus 2 mg/kg und 6 mg/kg/h i.v.	n = 10
Kontrollgruppe	NaCl-lösung in äquivalenter Menge	n = 10
Nativ	Keine Ischämie, keine Behandlung	n = 6

Darstellung der Einteilung der Tiere in die drei Gruppen nach Randomisierung: APC-Gruppe (n = 10), Kontrollgruppe mit Natriumchloridlösung (n = 10) und die Nativtiergruppe (n = 6)

3.2.2.1.3. Versuchsplan, Aufbau und zeitlicher Verlauf

Der Versuch gliedert sich in einen operativen und einen postoperativen analytischen Teil. Der operative Teil beinhaltet die Narkoseeinleitung, Beatmung, Präparation, Induktion der zerebralen Ischämie und Medikamentenapplikation (siehe Abbildung 6), während der postoperative Teil die Verhaltenstests, die Tötung der Tiere mit anschließender Gehirnentnahme und Analyse der Proben einschließt.

Die ersten beiden Gruppen unterscheiden sich in der Art des zu verabreichenden Medikaments: die erste Gruppe erhält APC, die zweite Gruppe isotone NaCl-lösung als Kontrolle. Die Tiere der ersten Gruppe erhalten zuerst eine Bolusadministration von 2 mg/kg APC i.v. mit direkt anschließender Infusion von 6 mg/kg/h des Medikaments über fünf Stunden. Die Tiere der zweiten Gruppe erhalten an Stelle des Medikaments die äquivalente Menge an isotoner NaCl-lösung. Die dritte Gruppe setzt sich aus gesunden Ratten zusammen, die keiner chirurgischen Intervention unterzogen werden.

Verlaufsprotokoll:

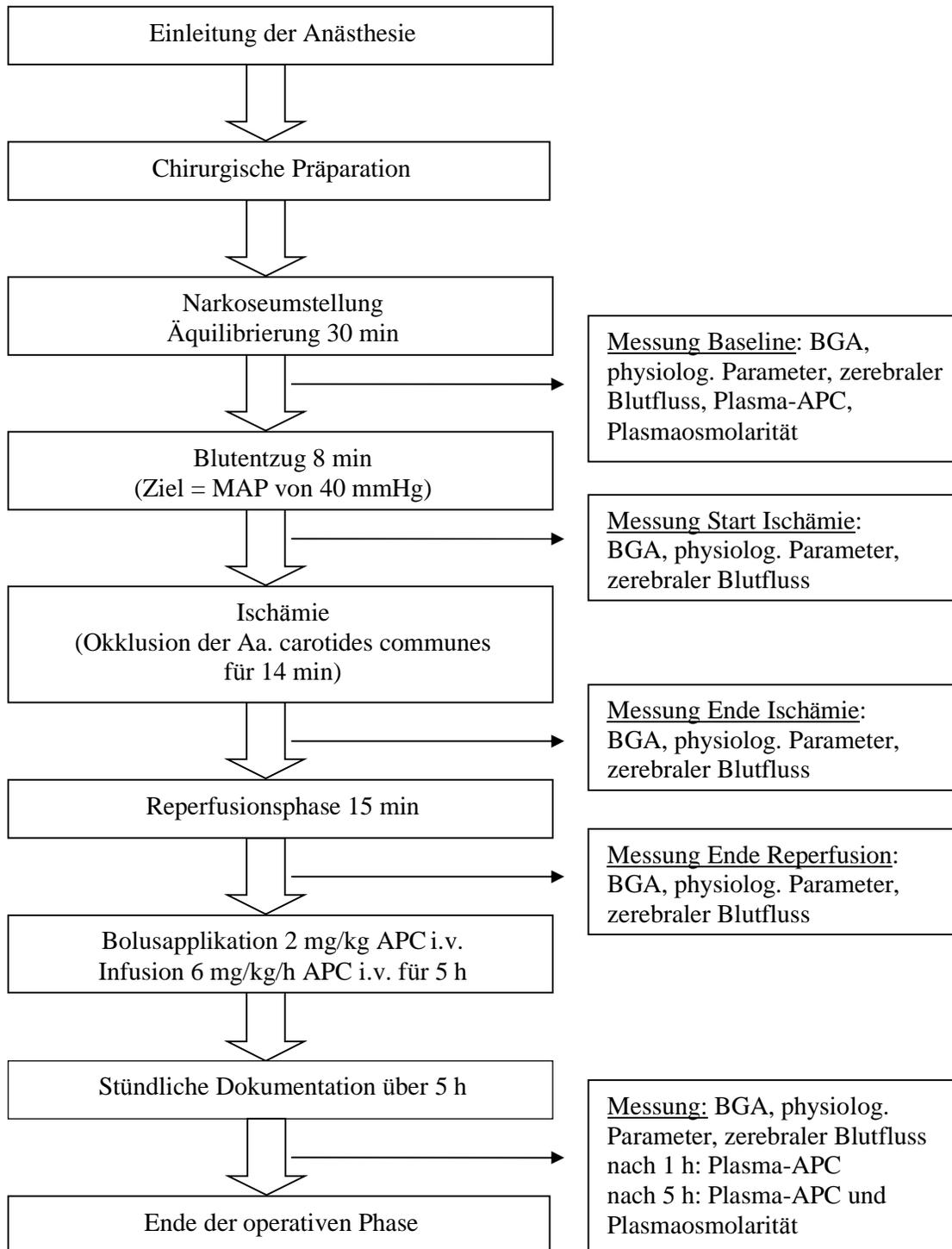


Abbildung 6: Übersicht der einzelnen Phasen der Operation im zeitlichen Verlauf

3.2.2.2. Narkoseeinleitung und Vorbereitung

Um eine Intubation vornehmen zu können, müssen die Tiere anästhesiert werden. Hierzu wird wie bereits im Vorversuch (Kapitel 3.2.1.2.) beschrieben vorgegangen. Auch hier wird das Tier nach der Intubation auf dem Operationstisch in Rückenlage positioniert und mit einer volumengesteuerten Beatmungspumpe mit 3,5 Vol% Sevofluran beatmet. Im Folgenden wird vorgegangen wie bereits beschrieben. Zusätzlich zur perikraniellen Sonde wird eine mit Wundsalbe gleitfähig gemachte Temperatursonde in das Rektum eingeführt.

3.2.2.3. Präparation

Entsprechend den Vorversuchen werden im Hauptversuch sowohl die A. femoralis als auch die V. femoralis in der rechten Leistenenge präpariert und katheterisiert.

Bei der Präparation des Halses sucht man die A. carotis communis auf, welche medial und unter der V. jugularis zu liegen kommt. Der Zugang zur Arterie befindet sich in einem Dreieck zwischen Musculus omohyoideus, sternohyoideus und sternomastoideus. Hier trennt man das Gefäß vorsichtig von den Bindegewebsfaszien unter weitestgehender Schonung des Nervus vagus und legt es komplett frei. Man verwendet ein Gummiband als Gefäßligatur und umschlingt damit das Gefäß, um es für die spätere temporäre Okklusion vorzubereiten. Zur Präparation der linken Halsseite verfährt man entsprechend. Auf der rechten Seite werden nun die V. jugularis präpariert und zwei Katheter in das Gefäß zur dauerhaften Applikation der Studiensubstanz und von Sufentanil (Sufenta mite, Janssen-Cilag GmbH) vorgeschoben, da Eingriffe an Knochen und Periost schmerzhaft sind und die Inhalationsnarkose um ein Opiat ergänzt werden muss. Die Initialdosierung von Sufentanil beträgt 2,5 µg/kg/h, welche im weiteren Verlauf in einer Dosierungsspanne von 2,5-5 µg/kg/h eingestellt wird. Zur Katheterisierung der V. jugularis spannt man jetzt das Gefäß auf eine Präparationspinzette und führt nun zwei Katheter für die Medikamentenapplikation in das Gefäßlumen ein und verschließt kleine Sickerblutungen zwischen den Kathetern mit einem Hämostyptikum (Tabotamp, Ethicon, Norderstedt).

Nach Beenden der Gefäßpräparation lagert man das Tier vorsichtig zurück in die Bauchlage, um es für die Präparation am Kopf zur Messung des zerebralen Blutflusses vorzubereiten (siehe unten).

3.2.2.4. Narkoseüberwachung und physiologische Parameter

Während der gesamten operativen Phase werden zu genau definierten Messzeitpunkten (siehe Abbildung 6) die folgenden physiologischen Parameter erhoben und dokumentiert, um einen konstanten Versuchsablauf und standardisierte, reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können:

Temperatur:

Zur Überwachung der Körpertemperatur wird rektal eine Sonde eingeführt, die die Körperinnentemperatur misst. Außerdem wird mit einer Messsonde, die in der Präparationsphase im rechten Musculus temporalis möglichst schädelnah platziert wird, die perikranielle Temperatur gemessen, da bei intraintrinsischen Bedingungen die perikranielle Temperatur von der Körperinnentemperatur abweicht (BUSTO et al., 1987). Mit Hilfe einer Rotlichtwärmelampe und einer Wärmematte wird die perikranielle Temperatur konstant auf 37 °C gehalten.

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP):

Der Blutdruck wird entsprechend den Vorversuchen während des gesamten Versuchablaufes über die A. femoralis gemessen. Der in das Gefäß eingeführte Katheter ist an einem Druckwandler angeschlossen, welcher den systolischen, diastolischen und den arteriellen Mitteldruck misst.

Elektrokardiogramm:

Zur Messung der Herzfrequenz wird ein Elektrokardiogramm abgeleitet. Hierzu werden der zweiten Ableitung entsprechend zwei Messsonden jeweils subkutan in der Ellenbogenfalte und die dritte Sonde in der rechten Kniefalte platziert. Die Messung erfolgt über den Cardiocap II-Monitor (Fa. Datex, Helsinki, Finnland).

Atemgasmessung:

Die Überwachung der Atmung erfolgt über einen Atemgasmonitor, wobei die Atemfrequenz, der in- und expiratorische Kohlendioxidpartialdruck und die inspiratorische Sauerstofffraktion sowie in- und expiratorische Sevoflurankonzentration gemessen werden.

Blutgasanalyse (BGA):

Hier wird zu den genannten Messzeitpunkten arterielles Blut in eine heparinisierte Kapillare überführt und folgende Werte gemessen:

Kohlendioxidpartialdruck, PaCO₂

Sauerstoffpartialdruck, PaO₂

pH-Wert

Standard-Bikarbonat (SBC)

Basendefizit (BE)

Plasmaglukosekonzentration

Hämoglobingehalt (Hb)

3.2.2.5. Positionierung der Sonden zur Laser-Doppler-Flussmessung

Mit Hilfe des Laser-Doppler-Messsystems (Periflux 4001 Master, Fa. Perimed, Järfälla, Schweden) kann die kortikale Hirndurchblutung gemessen werden. Da die Manipulationen an Schädel und Periost sehr schmerzhaft sind, wird vor der Präparation zur Analgesie eine permanente Sufentanil-Applikation mit einer Dosierung von 2,5 µg/kg/h begonnen. Zur korrekten Messung des zerebralen Blutflusses ist eine Fixierung des Schädels notwendig, um eine exakte Positionierung der Laser-Doppler-Sonden (Stainless Steel Probe, Probe 403, Perimed, Järfälla, Schweden) zu gewährleisten und Messungenauigkeiten zu vermeiden. Hierzu hakt man die Schneidezähne des Oberkiefers in der Klammer der Stereotaxie ein und befestigt den Schädel mit der darüber befindlichen Klemme in der Längsachse. Um seitliche Bewegungen zu vermeiden, werden atraumatische Ear Bars in den knöchernen Gehörgang eingeführt und seitlich in der Stereotaxie befestigt. Der Schädel ist nun fest fixiert.

Die Haut über dem Os parietale und Os frontale wird nun desinfiziert, rasiert und mit einem kleinen Schnitt durch eine Präparationsschere auf etwa 1 cm Länge eröffnet, mit Carbostesin

0,5 % infiltriert und das Bindegewebe und die Faszien stumpf zur Seite präpariert, um Blutungen zu vermeiden. Die Galea wird nun mit zwei Schnitten jeweils 2 mm medial der Sutura sagittalis und 2 mm caudal der Sutura coronalis eröffnet. Mit einer spitzen Präparierpinzette wird diese im Anschluss nach lateral präpariert und der Schädel auf einer Fläche von etwa 2 × 3 mm freigelegt. Die Galea wird nun mit vier Zügeln zur Seite fixiert, um die nachfolgenden Schritte zu erleichtern. Hiernach wird mit einem Diamantbohrer der Knochen an zwei Lokalisationen jeweils etwa 2 mm medial der Sutura sagittalis und 2 mm caudal der Sutura coronalis bis auf eine dünne Knochenlamelle, die auf Druck nachgibt, unter ständiger Wasserkühlung abgefräst mit dem Ziel, die Dura mater zu schonen und dennoch eine ausreichende Eindringtiefe für die Messung der zerebralen Durchblutung zu gewährleisten. Die Messsonden besitzen eine Eindringtiefe von 1 mm, daher ist ein Abfräsen des Schädelknochens notwendig. Mit zwei Manipulatoren werden die Messsonden nun exakt auf die Knochenlamellen aufgesetzt. Vor jedem Versuch werden die Sonden in vitro kalibriert. Die korrekte Positionierung wird überprüft, indem man mit einer kurzzeitigen Hyperventilation einen Abfall des zerebralen Blutflusses um über 10 % provoziert. Die Messung erfolgt in willkürlich gewählten Einheiten (Perfusion Units).

3.2.2.6. Narkosereduktion

Nach Abschluss der Präparation erfolgt die Reduktion der Sevoflurankonzentration auf 1,5 Vol%. Die Beatmungsfrequenz und das Beatmungsvolumen werden mit einer Blutgasanalyse kontrolliert und bei Bedarf angepasst.

3.2.2.7. Äquilibration

Nach der Reduktion der Sevoflurankonzentration erfolgt über einen Zeitraum von einer halben Stunde die Äquilibrationsphase, in der der Organismus sich an die neuen Bedingungen adaptieren kann und Stoffwechselfvorgänge sich wieder stabilisieren können. Dies ist notwendig, um nach unterschiedlich schneller und konzentrierter Anflutung des Inhalationsnarkotikums in den verschiedenen Geweben mit unterschiedlicher Verteilung eine möglichst konstante Konzentration des Narkotikums zu gewährleisten. Am Ende der Äquilibration werden die präischämischen Basiswerte dokumentiert (Baseline).

3.2.2.8. Ischämie

Die Ischämie gliedert sich in eine Phase des Blutentzuges mit hämorrhagischer Hypotension und in die eigentliche ischämische Phase, in der die A. carotides communes abgeklemmt werden. Die Phase des Blutentzuges dauert acht Minuten und erfolgt über den Katheter in der V. femoralis. Hierzu wird vor Beginn die Durchgängigkeit des Katheters geprüft. Das venöse Blut wird in heparinisierten Spritzen (gespült mit Heparin-Lösung 2,5 I.E. Heparin-Natrium pro ml) aufgefangen und körperwarm gehalten. Ziel des Blutentzuges ist es, einen MAP von 40 mmHg zu erreichen. Hierzu wird so viel Blut entzogen bis der anzustrebende Wert erreicht ist und dieser bis zur Phase der eigentlichen Ischämie konstant gehalten wird. Nach Ablauf der acht Minuten schließt sich die Phase der eigentlichen Ischämie an. Es werden die Gefäßligaturen der A. carotides communes vorsichtig angezogen und die Gefäße werden mittels Gefäßclips okkludiert, um den Blutfluss zu unterbinden. Daraufhin muss der MAP weiter durch Blutentzug oder geringfügiger Blutgabe konstant auf 40 mmHg gehalten werden. Außerdem muss die Beatmung den veränderten Bedingungen angepasst werden, indem man die Atemfrequenz vermindert, um einer Hyperventilation vorzubeugen. Die ischämische Phase dauert 14 Minuten. Hiernach werden die Gefäßclips und die Gefäßligaturen komplett entfernt (Versuchsaufbau siehe Abbildung 7).

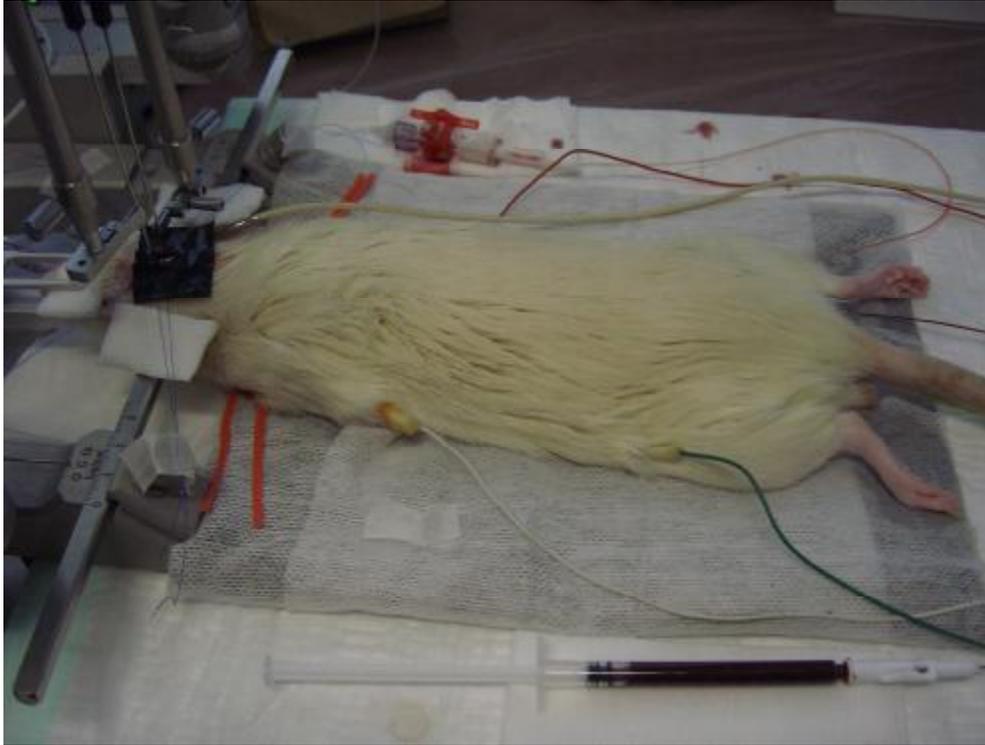


Abbildung 7: Versuchsanordnung in der Ischämiephase; das Tier ist im stereotaktischen Rahmen fixiert.

3.2.2.9. Reperfusion

In der Phase der Reperfusion wird das entzogene Blut über einen Zeitraum von 15 Minuten kontinuierlich zurückgegeben. Durch die Gabe kohlendioxidreichen Blutes muss die Beatmung den Verhältnissen angepasst und die Atemfrequenz auf den Ausgangswert erhöht werden, damit das vermehrte Kohlendioxid abgeatmet werden kann.

3.2.2.10. Medikamentenapplikation

Nach Ablauf der Reperfusionsphase erfolgt unmittelbar die Bolusapplikation von APC 2 mg/kg und daraufhin die Konnektierung der Infusion mit einer Infusionsrate von 6 mg/kg/h. Xigris wird als Pulver vom Hersteller angeboten und wird nach Herstellerangaben mit Aqua ad iniectabilia aufgelöst, so dass eine Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml entsteht. Im vorliegenden Versuch wurde aufgrund der Ergebnisse der Vorarbeiten (siehe

Kapitel 3.3.1.3.) unmittelbar vor der Applikation des Medikaments eine Stammlösung von 1 mg/ml unter sterilen Kautelen hergestellt.

3.2.2.11. Bestimmung der Plasmakonzentration von APC

Zu drei verschiedenen Messzeitpunkten wird die Konzentration von APC im Blut bestimmt (Ausgangswert = Baseline, nach einer Stunde Infusion und nach sechs Stunden Infusion), um einen konstanten Plasmaspiegel zu gewährleisten

3.2.2.12. Messung der Plasmaosmolarität

Zu zwei verschiedenen Messzeitpunkten (Ausgangswert = Baseline, nach fünf Stunden) wird die Plasmaosmolarität des Blutes bestimmt, um eine Aufrechterhaltung der Homöostase zu kontrollieren.

3.2.2.13. Überwachung der Infusionsphase

Während der Infusion von APC werden stündlich die physiologischen Parameter, zerebraler Blutfluss sowie Sevoflurankonzentration dokumentiert. Zusätzlich werden nach jeweils drei und fünf Stunden Infusion die Blutgase kontrolliert.

3.2.2.14. Beendigung der Anästhesie

Nach Abschluss des Versuches werden die Katheter und Sonden entfernt, alle Hautschnitte erneut mit Carbostesin 0,5 % infiltriert und mit nicht-resorbierbaren Fäden (Prolene 4-0, Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt) sorgfältig verschlossen. Zur Vermeidung eines Flüssigkeitsdefizits werden 4 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung subkutan injiziert. Anschließend wird die Anästhesie beendet, nach Eintreten der Spontanatmung die Beatmung mit einem Sauerstoff-Luftgemisch beendet und das Tier extubiert. Das Tier wird bis zur Erholung auf

einer Wärmematte gewärmt und anschließend in den Käfig verbracht und regelmäßig kontrolliert.

3.2.2.15. Verhaltenstests

Der Barnes Maze Test stellt ein hippocampusabhängiges Modell dar, mit dem räumliches Denken, Erinnerungsvermögen und Lernverhalten nach zerebraler Ischämie getestet werden kann (MILANI et al., 1998). Die Tiere werden am 4. postoperativen Tag zweimal getestet (Lauf 1 und Lauf 2), im Folgenden an den postoperativen Tagen 6 (Lauf 3), 8 (Lauf 4) und 10 (Lauf 5). Die untersuchten und dokumentierten Parameter sind die Zeit bis zum Auffinden des ersten Loches und die Zeit bis zum Erreichen des Zielloches in Sekunden. Der Test ist nach fünf Minuten beendet, das Nichtauffinden des Zielloches wird daher mit einer Zeit von 300 Sekunden dokumentiert.

Vor jedem Durchgang müssen Testfeld und Zielbox mit 70 % Ethanol desinfiziert werden. Das Testfeld besteht aus einer 2 × 2 m großen schwarzen Holzplatte mit acht zirkulär angeordneten Löchern in der Platte. Unter einem Loch verbirgt sich die Zielbox, welche von der Ratte als Endpunkt des Tests aufgesucht werden muss. In Richtung der Zielbox befindet sich in unmittelbarer Nähe eine Einrichtung, um aversive Reize wie weißes Radorauschen und helles Licht auszusenden. Am postoperativen Tag 4 wird das zu testende Tier in seinem Käfig für 15 Minuten in den Testraum verbracht, um es an die neue Umgebung zu gewöhnen. Nach Reinigen und Desinfizieren des Testfeldes und der Zielbox wird letztere mit Zellstoff ausgelegt, um sie der Ratte als sicheres Ziel begreiflich zu machen. Das Tier wird nun in die Zielbox gesetzt und diese als nächstes unter dem Zielloch in einer Halterung platziert, um das Tier an die räumliche Situation zu adaptieren. Nach Ablauf von einer Minute wird die Ratte zügig in die Mitte des Testfeldes gesetzt und mit einer Box abgedeckt. Nach einer halben Minute zur Beruhigung in der Dunkelheit wird die Box angehoben und entfernt und der Test beginnt. Ab diesem Zeitpunkt wird gemessen, wie lange das Tier zum Erreichen des ersten Loches und der Zielbox benötigt. Hat das Tier nach 5 Minuten die Zielbox nicht gefunden, wird es unter Beibehalten der aversiven Stimuli zur Zielbox geführt. Am 4. postoperativen Tag wird im Anschluss an den ersten Durchgang und einer Erholungsphase von 15 Minuten ein zweiter Durchgang vorgenommen. Der dritte Durchgang erfolgt wie beschrieben am postoperativen Tag 6, der vierte an Tag 8 und der fünfte Durchgang an Tag 10. Zu beachten

ist, dass bei allen Durchgängen immer gleiche Bedingungen herrschen und immer zu gleichen Uhrzeiten gemessen wird, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

3.2.2.16. Probengewinnung

Zehn Tage post operationem werden die Hirnproben zur weiteren Untersuchung entnommen. Dies erfolgt im Anschluss an den fünften Durchgang des Barnes Maze Tests.

3.2.2.16.1. Dekapitierung und Entnahme des Gehirns

Am zehnten Tag nach der Operation wird das Tier in tiefer Narkose mit Sevofluran getötet und das Hirn entnommen. Hierzu setzt man es in die Narkoseinduktionskammer unter Einleitung von 8 Vol% Sevofluran. Ist die Narkose tief genug, entnimmt man das Tier aus der Kammer und legt es in Bauchlage unter einer Maskennarkose vor sich. Mit einem Skalpell durchtrennt man auf Höhe des Atlantookzipitalgelenks Haut, Bindegewebe, Sehnen und Muskeln und schneidet zügig mit einer chirurgischen Schere das Gelenk durch. Der abgetrennte Schädel wird mit einer Hand fixiert und die Haut sowie das Periost über dem Schädeldach mit dem Skalpell wegpräpariert. Ebenso löst man die Musculi temporales vom Knochen, um die Hirnentnahme zu erleichtern. Mit einer Hohlmeißelzange beginnt man am Foramen magnum, rostralwärts den Knochen vorsichtig abzuheben. Dies geschieht bis zu den beiden Bulbi olfactorii, die Dura mater wird dabei vorsichtig mit einem Spatel entfernt. Mit diesem Spatel durchtrennt man als nächsten Schritt die basal und lateral gelegenen Hirnnervenansätze und arbeitet sich unter Sichtkontrolle basal bis zum Riechhirn vor. Die beiden Bulbi werden durchtrennt, so dass das Gehirn lose in der eröffneten Schädelhöhle liegt und mit einer Pinzette entnommen werden kann.

3.2.2.16.2. Aufbereitung der Proben

Nach der Gehirnentnahme müssen die Proben fixiert werden. Hierzu legt man das frisch entnommene Gehirn für fünf Minuten in einen Falcon Tube gefüllt mit etwa 30 ml Methylbutan (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim), das zuvor mit Trockeneis auf -80 °C

heruntergekühlt worden ist. Zur Lagerung wird das Gehirn in Alufolie eingepackt und bei -80 °C zur dauerhaften Lagerung eingefroren.

3.2.2.16.3. Schneiden der Gehirne

Von den tiefgefrorenen Gehirnen werden bei -20 °C mit dem Mikrotom Mikrom HM 560 (Fa. Mikrom GmbH, Walldorf, Germany) sieben Mikrometer dicke Schnitte angefertigt. Im Folgenden wird nun die im Atlas „The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates“ (PAXINOS und WATSON, 1997) als Bregma -2,3 definierte Schnittebene als Nulllinie festgelegt. Dies geschieht unter mikroskopischer Kontrolle nach kurzem Anfärben des Schnittes mittels verdünnter Hämalaunlösung. Es werden jeweils drei Schnitte auf einen Objektträger aufgetragen, so dass insgesamt 150 Schnitte von jedem Gehirn angefertigt werden. Diese werden sofort auf die Objektträger aufgetragen und bei -20 °C gelagert.

3.2.2.17. Analyseverfahren

Zur Bestimmung des histopathologischen Schadens wird die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin verwendet, zur Bestimmung der Apoptosevorgänge die immunhistochemische Färbung gegen aktivierte Caspase-3.

3.2.2.17.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum und muss zuerst zu Hämalaun aufbereitet werden, um seine färbende Eigenschaft zu entwickeln. Hämalaun färbt alle sauren (=basophilen) Strukturen wie Desoxyribonucleinsäure in Zellkernen und Zytoplasmaanteile, die reich an endoplasmatischem Reticulum sind, blau und wird somit überwiegend als Kernfärbung genutzt. Nach der Färbung mit Hämalaun erscheinen die Zellkerne zunächst rötlich-braun aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Färbelösung. Durch Spülen in Leitungswasser erhöht sich der pH und der Farbton schlägt nach blau um. Die Gegenfärbung erfolgt mit Eosin; dieses ist ein synthetischer Farbstoff, der alle basischen (=eosinophilen) Bestandteile wie das Zytoplasma kräftig rot färbt.

Ein ischämischer Gewebeschaden wird durch eine vermehrte Eosinophilie (= Rotfärbung) des Zytoplasmas markiert. Die zu Grunde gehenden Zellkerne erscheinen klein und pyknotisch, während vitale Neuronen durch basophiles Plasma mit gut erkennbarem Kern dargestellt werden.

3.2.2.17.1.1. Färbevorgang

Von jedem Gehirn werden für die Färbung insgesamt neun Gefrierschnitte in drei Ebenen verwendet. Es werden der 1., 25. und der 50. Objektträger mit jeweils drei Gehirnschnitten angefärbt.

Protokoll der HE-Färbung:

Absteigende Alkoholreihe: 10 Minuten in 100 % Ethanol

1 Minute in 96 % Ethanol

1 Minute in 70 % Ethanol

2 x Waschen in ddH₂O

1 Minute in Hämalaun-Lösung

10 Minuten Waschen in kaltem, fließendem Leitungswasser

2 x Waschen in ddH₂O

1,15 Minute in Eosin (200 ml + 80 µl 100 % Eisessig [2 Tropfen])

2 x Waschen in ddH₂O

Aufsteigende Alkoholreihe: 5 Minuten in 70 % Ethanol

2,5 Minuten in 80 % Ethanol

1 Minuten in 96 % Ethanol

1 Minuten in 100 % Ethanol

2 Minuten Fixierung in Roti-Histol

5 Minuten erneute Fixierung in Roti-Histol

Eindeckeln mit Roti-Histokitt (1-2 Tropfen)

Nach Lagerung bei -80 °C erfolgt zu Beginn die Rehydratation der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (10 Minuten in 100 % Ethanol, 1 Minute in 96 % Ethanol, 1 Minute in 70 % Ethanol). Im Anschluss werden die Schnitte zweimal kurz in destilliertem Wasser gewaschen. Zur Färbung werden die Schnitte nun 1 Minute lang in Mayers

Hämalaunlösung gefärbt. Hiernach werden diese dann 10 Minuten unter kaltem, fließendem Leitungswasser und zweimal in destilliertem Wasser gewaschen. (Durch das Spülen in Leitungswasser [pH-Wert über 3] führt man das Hämatoxylin in seine blaue Form über [Bläuen]). Für die Gegenfärbung mit Eosin werden die Schnitte für 1,15 Minuten in wässrige Eosin-Lösung verbracht. Im Anschluss erfolgt die Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe (5 Minuten in 70 % Ethanol, 2,5 Minuten in 80 % Ethanol, 1 Minute in 96 % Ethanol, 1 Minute in 100 % Ethanol). Zur Fixierung gibt man die Schnitte zuerst für 2 Minuten in Roti-Histol und im Anschluss nochmals für 5 Minuten in frisches Roti-Histol. Zum Einbetten und endgültigen Fixieren der Schnitte bedeckt man diese mit ein bis zwei Tropfen Roti-Histokitt und einem Deckglas. Über Nacht lässt man die fertigen Präparate trocknen und lagert sie dann bei Raumtemperatur in Objektträgerkästen.

3.2.2.17.1.2. Auswertung der Präparate

Der histopathologische Schaden wird durch Zählung aller vitalen Neuronen in der CA1-, CA2-, CA3- und CA4-Region bestimmt. Vitale Neuronen stellen sich in der HE-Färbung als blass-bläuliche, gut abgrenzbare Zellen mit dunkler gefärbtem Zellkern dar. Zur Auswertung werden jeweils die CA1- und CA2-, sowie die CA3- und CA4-Region zusammengefasst (CA1/CA2- und CA3/CA4-Region) und die absoluten Zellzahlen dokumentiert. Von jeder Gehirnprobe werden der 1., 25. und der 50. Schnitt unter einem Lichtmikroskop (Wilozyt BX 300, Fa. Will, Wetzlar) zunächst unter 100facher Vergrößerung betrachtet und die Hippokampusformation aufgesucht. Nun beginnt man in 200facher Vergrößerung mit der Zählung aller vitalen Neuronen in der CA1/CA2-Region, wobei man das Zellband konsequent abfährt und alle bläulich gefärbten, gut abgrenzbaren Zellen bis zum Übergang zur CA3-Region zählt und dokumentiert. Ab hier beginnt man mit einer neuen Zählung.

3.2.2.17.2. Immunhistochemische Detektion aktivierter Caspase-3

Die immunhistochemische Detektion von aktivierter Caspase-3 dient dazu, spezifisch das nur während der Apoptose in der Zelle exprimierte und aktivierte Protein Caspase-3 mit Hilfe eines Antikörpers zu markieren. Aktivierte Caspase-3 wird hier mit Hilfe der indirekten

Es werden pro Tier jeweils neun Schnitte auf insgesamt drei Objektträgern gefärbt. Pro Färbedurchgang werden insgesamt 16 Objektträger gefärbt: zwölf Objektträger von vier Tieren mit je neun Schnitten, ein Objektträger mit drei Schnitten eines Nativtieres als Spezifitätskontrolle, zwei Objektträger mit Thymusschnitten (als Positivkontrolle) und ein Objektträger mit drei Hirnschnitten ohne Primärantikörper (als Negativkontrolle).

Zu Beginn der Färbung werden die gefrorenen Gehirnschnitte beschriftet und in einer 4 %igen Paraformaldehydlösung (eigene Herstellung) fixiert. Hiernach werden die Schnitte für fünf Minuten in einer Standküvette auf dem Schüttler in PBS Puffersubstanz gewaschen und anschließend für 10 Minuten in einer 3 %igen Wasserstoffperoxidlösung in Methanol verbracht. Daraufhin erfolgt zweimaliges Waschen in PBS für je 3 Minuten, um die Reste des H_2O_2 -Methanol von den Schnitten zu entfernen. Um nun das Proteinblockierungsmedium auf die Schnitte geben zu können, werden die Objektträger aus der Lösung genommen, überschüssige Flüssigkeit abgeschüttelt und die Schnitte eng mit einem inerten Fettstift (DakoPen, Fa. Dako Denmark, Glostrup, Denmark) umrandet. Dies verhindert ein Abfließen der Lösung während der Inkubationszeit und hält die Flüssigkeit auf den Gehirnschnitten umschlossen. Nun wird das Proteinblockierungsmedium (jeweils 70 μ l pro Schnitt) aufgebracht und die Schnitte für 20 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Nach der Blockierung wird die Flüssigkeit wieder ohne Waschen abgeschüttelt und der Primärantikörper (Purified Rabbit Anti-Active Caspase-3 Monoclonal Antibody, Fa. BD Pharmingen) in einer Konzentration von 1:200 auf die Schnitte aufgebracht. Diese Verdünnung wurde im Vorfeld über Verdünnungsreihen ermittelt, wobei hier die Verdünnung verwendet wird, welche die geringste Hintergrundfärbung bei dennoch eindeutiger Färbung der Zellen liefert. Zur Verdünnung werden 5 μ l des Antikörpers in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit 995 μ l des Proteinblockierungsreagenz vorsichtig vermischt.

Es erfolgt eine Inkubation mit dem Primärantikörper in der feuchten Kammer über Nacht bei + 4 °C. Am zweiten Färbetag werden die Schnitte zunächst wieder nach Abschütteln des aufbrachten Antikörpers zweimal in PBS für je 3 Minuten in der Standküvette gewaschen. Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 15 Minuten. Nach erneutem Waschen mit PBS lässt man nun die Schnitte für 15 Minuten mit dem Streptavidin-HRP inkubieren und verbringt die Schnitte im Anschluss wieder zum Waschen in PBS. Zum Färben der Schnitte bereitet man im Vorfeld das Chromogensubstrat vor. Hierzu wird ein Tropfen DAB auf 1 ml Substratpuffer gegeben. Nach einer Inkubation der Schnitte für 10 Minuten mit dem Chromogensubstrat (70 μ l pro Schnitt) erfolgt nun ein dreimaliger

Waschgang für je 10 Minuten in ddH₂O. Zur Gegenfärbung der Schnitte werden diese nun für 45 Sekunden in Hämalanlösung verbracht und daraufhin in Leitungswasser kurz gewaschen. Danach lässt man die Schnitte kurz bei Raumtemperatur antrocknen und gibt diese nun zur Dehydratation in eine aufsteigende Alkoholreihe: zwei Minuten in 70 %iger, eine Minute in 96 %iger und eine Minute in 100 %iger Ethanollösung. Im Anschluss erfolgt die Fixierung in Roti-Histol, zuerst für 2 Minuten und dann wiederholt in einem zweiten Gefäß mit Roti-Histol für 5 Minuten. Abschließend werden die Schnitte nun luftdicht mit Roti-Histokitt und einem Deckglas eingedeckt und zum Trocknen aufbewahrt.

3.2.2.17.2.2. Auswertung der Präparate

Die quantitative Auswertung der Schnitte erfolgt durch Zählung aller gefärbten Zellen im Zellband der Hippokampusformation, wobei die CA1/CA2- und die CA3/CA4-Region getrennt voneinander untersucht werden. Die CA2-Region wird entsprechend der Auswertung der HE-gefärbten Schnitte zur CA1-Region und die CA4-Region zur CA3-Region subsummiert. Von jeder Gehirnprobe untersucht man den 2., 26. und den 49. Schnitt, um möglichst repräsentativ die Strukturen des Hippokampus zu erfassen. Wie bereits bei der HE-Färbung beschrieben sucht man zuerst unter einem Lichtmikroskop unter 100facher Vergrößerung das Zellband der CA1-Region im Hippokampus auf und stellt nun diesen Bereich auf die 200fache Vergrößerung ein. Beginnend mit der CA1-Region fährt man nun das Zellband des Hippokampus ab und zählt alle positiven Zellen, die sich als braun gefärbte gut abgegrenzte Zellen darstellen und dokumentiert das Ergebnis.

3.2.2.18. Chemikalien, Antikörper, Lösungen, Verbrauchsmaterial, Geräte

Chemikalien

- Acetic Acid, min 99 % (Eisessig), Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
- Aqua B. Braun Ecotainer (doppelt destilliertes Wasser [ddH₂O]), Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Autostainer, Fa. Dako North America, Inc., CA, USA
- DAB Liquid Dako + Substrate Chromogen System, Fa. Dako North America, Inc., CA, USA
- Destilliertes Wasser, Aqua B. Braun, Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany
- Dinatrium-Hydrogenphosphat-Heptahydrat (Na₂HPO₄ x 7 H₂O), Fa. Roth, Karlsruhe
- Eosin-Lösung, Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig, Fa. Merck KGaA, Darmstadt
- Ethanol p.A., Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
- Hämalaun-Lösung, Mayers Hämalaunlösung, Fa. Merck KGaA, Darmstadt
- Isotonische Natriumchloridlösung 0,9 %, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- 2-Methylbutane 99,5 % HPLC grade, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
- Methanol HPLC grade, Fa. Fisher Scientific, Leicestershire, UK
- Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat pro analysi (NaH₂PO₄), Fa. Merck KGaA, Darmstadt
- Paraformaldehyd, reinst, Fa. Merck KGaA, Darmstadt
- PBS Dulbecco, Fa. Biochrom AG, Berlin
- Peroxidase-konjugiertes Streptavidin-HRP Dako LSAB + System-HRP Kit, Fa. Dako North America, Inc., CA, USA
- Proteinblockierungsreagenz DakoCytomation Protein Block Serum-free, Ready-To-Use, Fa. DakoCytomation, Inc., CA, USA
- Roti-Histol, Fa. Roth, Karlsruhe, Germany
- Roti-Histokitt Eindeckmedium, Fa. Roth, Karlsruhe, Germany
- Sodium Hydroxide Solution 10 M (NaOH), Fluka, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
- Streptavidin-HRP Biotinylated Link Universal Dako LSAB + System-HRP Kit, Fa. Dako North America, Inc., CA, USA
- Wasserstoffperoxid 30 %, Fa. Merck KGaA, Darmstadt

Antikörper

- Purified Rabbit Anti-Active Caspase-3 Monoclonal Antibody, Fa. BD Pharmingen (Primärantikörper)
- Biotinylated Link Universal Dako LSAB + System-HRP Kit, Fa. Dako North America, Inc., CA, USA (Sekundärantikörper)

Lösungen

- Ethanol, 70 %, 300 ml gesamt: 210 ml Ethanol pro analysi (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt) und 90 ml destilliertes Wasser
- Ethanol, 80 %, 300 ml gesamt: 240 ml Ethanol pro analysi (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt) und 60 ml destilliertes Wasser
- Ethanol, 96 %, 300 ml gesamt: 288 ml Ethanol pro analysi (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt) 12 ml destilliertes Wasser
- 3 % H₂O₂ in Methanol, 300 ml gesamt:
 - 270 ml Methanol 100 % pro analysi (Fa. Merck, Darmstadt)
 - 30 ml destilliertes Wasser
- Paraformaldehyd 4 %, 250 ml gesamt:
 - 125 ml ddH₂O, 10 g Paraformaldehyd
 - 0,25 ml 10 M NaOH
 - 125 ml 0,2 M Phosphatpuffer
- PBS (Fa. Biochrom AG, Berlin), 1000 ml gesamt: 9,55 g auf 1 Liter ddH₂O
- 0,2 M Phosphatpuffer, 1000 ml gesamt:
 - 6,35 g NaH₂PO₄ × H₂O
 - 21,91 g Na₂HPO₄ × 7 H₂O
 - 1000 ml ddH₂O
- Verdünnte Hämalaunlösung, 300 ml gesamt:
 - 150 ml Hämalaun (Mayers Hämalaunlösung, Fa. Merck KGaA, Darmstadt)
 - 150 ml ddH₂O

Verbrauchsmaterialien

- Alleinfutterpellets für Ratten und Mäuse, R/M-Haltung, 10 mm, nitrosaminarm,, Fa. ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
- Aqua ad iniectabilia, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Carbostesin 0,5 %, Bupivacainhydrochlorid Injektionslösung, Fa. AstraZeneca GmbH, Wedel
- Cavafix Certo 18 G, 5 Zentimeter (cm, Tubus), Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Deckgläser 24 x 50 mm, Fa. Diagonal
- Dreiwegehahn BD Connecta, Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden
- Faltenfilter, Fa. Whatman GmbH, Dassel
- Fettstift DakoPen, Fa. Dako Denmark, Glostrup, Denmark
- Feuchte Kammer, Fa. Gerda, Gestell Eigenbau
- Freka-Derm farblos (Hautantiseptikum), Fa. Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
- Heparin-Natrium 25.000, Fa. ratiopharm GmbH, Ulm
- Kapillaren Clinitubes, 85 µl, Fa. Radiometer Medical ApS, Kopenhagen, Dänemark
- Makrolon Typ III-Käfige (mit erhöhtem Deckel), Fa. E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel
- Neg-50, Frozen Section Medium, Fa. Richard-Allan-Scientific, MI, USA
- Objektträger SuperFrost Plus, Fa. Menzel-Glaser, Braunschweig
- Panthenol-Augensalbe, Fa. Jenapharm mibe GmbH, Jena
- Pipettenspitzen 100-1000 µl; 20-200 µl; 10-100 µl; 2-20 µl; 0,5-10 µl, Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- Polyethylenkatheter (PE-Katheter), 33,5 cm, Fa. dispomedica, Hamburg
- Prolene 4-0 (Nahtmaterial), Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt
- Sevorane (Sevofluran), Fa. Abbott, Wiesbaden
- Sterican 26 G (Kanülen, steril), Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Sterofundin Vollelektrolytlösung, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Sufenta mite 10 (Sufentanil), Fa. Janssen-Clag GmbH, Neuss
- Tabotamp Hämostyptikum, Ethicon, Norderstedt
- Weichholzgranulat, Fa. Lignocel, JRS GmbH & Co. KG, Rosenberg
- Xigris, Drotrecogin alpha, Fa. Eli Lilly and Company, Indianapolis, USA

Geräte

- Atemgasmonitor Capnomac Ultima, Fa. GE Healthcare, München
- Beatmungsgerät Rodent Ventilator 683, Fa. Harvard Apparatus, Holliston, USA
- Blutgasanalysegerät ABL800 Flex, Fa. Radiometer Medical ApS, Kopenhagen, Dänemark
- Druckwandler, Fa. Medex Medical GmbH & Co. KG, Klein-Winternheim
- Elektrokardiogramm Cardiocap II, Fa. Datex, Helsinki, Finnland
- Flowmeter Unit 760, Fa. Siemens AG, Erlangen
- Inkubator, Fa. Köttermann, Kühn & Bayer Laboreinrichtungen, Nidderau
- Kryostat Mikrom HM 560, Fa. Mikrom GmbH, Walldorf
- Laryngoskop, modifiziert, Fa. Stoss, Wiesbaden
- Laser-Doppler-Sonden Stainless Steel Probe 403, Perimed, Järfälla, Schweden
- Lichtmikroskop Wilozyt BX 300, Fa. Will, Wetzlar
- Magnetrührer IKAMAG Ret-G, Fa. IKA Labortechnik, Staufen
- Narkoseinduktionkammer, Fa. Sciencelab.com Inc., Houston, USA
- Perfusor Syringe Pump 11 Plus, Fa. Harvard Apparatus, Holliston, USA
- Periflux 4001 Master, Fa. Perimed, Järfälla, Schweden
- Schüttler Rotamax 120, Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
- Temperatur-Kontrollgerät TCAT-2DF Controller, Fa. Physiotemp Instruments Inc., Clifton, USA
- Temperatur-Messsonde Hypodermic needle probe, Fa. Omega Technologies Co., CT, USA
- Vapor 2000, Fa. Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck
- Zentrifuge Hettich Universal 16 R, Fa. Hettich, Tuttlingen

3.2.2.19. Statistische Analyse

Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss von APC auf den neuronalen Schaden nach Vorderhirnischämie zu charakterisieren. Die Anzahl der vitalen Neuronen in der CA1/CA2- und in der CA3/CA4-Region als primärer Endpunkt wurde jeweils konfirmatorisch zwischen den beiden Gruppen mit einem zweiseitigen *WILCOXON-Test* verglichen. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,025$ (Adjustierung nach Bonferroni) festgelegt.

Alle anderen Auswertungen sind explorativ zu interpretieren.

Für die Veränderungen des zerebralen Blutflusses gegenüber der Baseline wurde ein *Varianzanalysenmodell* berechnet mit den kategorialen Einflussvariablen Behandlungsgruppe (APC, Natriumchlorid) und Zeitpunkt (Ischämie, Reperfusion, nach 1 h, nach 2 h, nach 3 h, nach 4 h und nach 5 h) und der stetigen Einflussvariable Veränderung im mittleren arteriellen Blutdruck gegenüber Baseline.

Für die Zeit bis zum Auffinden des ersten Lochs bzw. des Ziellochs im Barnes Maze Test wurde jeweils ein *stratifiziertes Cox proportional hazard Modell* mit *Strata Lauf* (1. Lauf, 2. Lauf, 3. Lauf, 4. Lauf, 5. Lauf) und der Kovariate Gruppe berechnet. Versuche, die nach 300 Sekunden ohne Erfolg abgebrochen wurden, wurden in dem Modell als zum Zeitpunkt 300 Sekunden zensierte Beobachtung berücksichtigt.

Die Anzahl aktivierte-Caspase-3-positiver Zellen in der CA1/CA2- und der CA3/CA4-Region wurde mit einem zweiseitigen *WILCOXON-Test* zwischen den beiden Behandlungsgruppen verglichen.

Die physiologischen Parameter wurden auf Grund ihrer großen Anzahl explorativ analysiert.

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm *SPSS Version 12.0* durchgeführt.

3.3. ERGEBNISSE:

3.3.1. Ergebnisse des Vorversuches

In die Ergebnisse der Vorstudie gehen die intraoperativ erhobenen Werte von sieben männlichen Sprague Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 400 ± 15 g ein. Die Einteilung der Gruppen erfolgte im Verlauf der Ergebnisse der Einzelversuche.

3.3.1.1. Physiologische Parameter

Die physiologischen Parameter wurden zu festgelegten Zeitpunkten erhoben. Die erste Messung wurde vor der Applikation von APC vorgenommen (Baseline), die übrigen Werte der Bolusgruppe (Gruppe 1) wurden nach 30 und 45 Minuten und die Werte der beide Infusionsgruppe mit 3 mg/kg/h i.v. (Gruppe 2) und der Infusionsgruppe mit 6 mg/kg/h i.v. (Gruppe 3) nach 60, 120 und 180 Minuten erhoben.

Perikranielle Temperatur

Die perikranielle Temperatur lag bei allen Tieren während der gesamten Versuchsdauer im physiologischen Bereich. Die mittlere perikranielle Temperatur betrug bei den Tieren der Gruppe 1 $36,8 \pm 0,2$ °C, bei dem Tier der Gruppe 2 $36,5$ °C und bei den beiden Tieren der Gruppe 3 $37,3 \pm 0,2$ °C.

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Bei der Messung des MAP wurden bei den Tieren der Gruppe 1 zu Beginn des Versuchs mittlere Werte von 66 ± 18 mmHg dokumentiert. Im Verlauf des Versuchsprotokolls fiel der MAP bis zum Versuchsende auf einen Wert von 52 ± 4 mmHg ab. Die Werte des Tieres der Gruppe 2 zeigten im Versuchsverlauf ebenfalls einen Abfall des MAP von 59 auf 53 mmHg auf. Bei den Tieren der Gruppe 3 wurde hingegen ein Anstieg von 85 ± 9 mmHg als Baseline auf 88 ± 1 mmHg verzeichnet. Die Werte der einzelnen Messzeitpunkte der Gruppen sind in den folgenden beiden Tabellen dargestellt.

Tabelle 5: Ergebnisse der Messung des MAP der Tiere der Gruppe 1 (Vorversuch)

		Bolus 2 mg/kg i.v. (n = 4)
MAP (mmHg)	Baseline	66 ± 18
	30 min	38 ± 6
	45 min	52 ± 4

Darstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks (mmHg) der Tiere der Gruppe 1 (n = 4) zu den drei festgelegten Messzeitpunkten (MW \pm SD).

Tabelle 6: Ergebnisse der Messung des MAP der Tiere der Gruppen 2 und 3 (Vorversuch)

		Infusion 3 mg/kg/h i.v. (n = 1)	Infusion 6 mg/kg/h i.v. (n = 2)
MAP (mmHg)	Baseline	59	85 ± 9
	60 min	60	77 ± 1
	120 min	63	80 ± 6
	180 min	53	88 ± 1

Darstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks (mmHg) des Tieres der Gruppe 2 mit 3 mg/kg/h i.v. (n = 1) und der Tiere der Gruppe 3 mit 6 mg/kg/h i.v. (n = 2) zu den vier festgelegten Messzeitpunkten (absolute Werte; MW \pm SD).

Blutgasanalyse

Die Messung der im Blut gelösten Gase und des pH-Wertes wurde zu den beschriebenen Zeitpunkten bestimmt. Der PaCO₂ lag in der Gruppe 1 nach 45 Minuten bei 30,2 ± 0,8 mmHg unter den Werten des physiologischen Bereiches.

Die einzelnen Werte der Gruppen sind in den folgenden beiden Tabellen dargestellt.

Tabelle 7: Ergebnisse der Messung von Sauerstoffpartialdruck (PaO₂), Kohlendioxidpartialdruck (PaCO₂) und pH-Wert der Tiere der Gruppe 1 (Vorversuch)

		Bolus 2 mg/kg i.v. (n = 4)
PaO₂ (mmHg)	Baseline	167,8 ± 3,8
	30 min	182,4 ± 6,2
	45 min	188 ± 8,6
PaCO₂ (mmHg)	Baseline	35,6 ± 1,7
	30 min	35,3 ± 0,3
	45 min	30,2 ± 0,8
pH-Wert	Baseline	7,46 ± 0,03
	30 min	7,48 ± 0,02
	45 min	7,46 ± 0,06

Darstellung des Sauerstoffpartialdruckes (PaO₂, mmHg), des Kohlendioxidpartialdruckes (PaCO₂, mmHg) und des pH-Wertes der Tiere der Gruppe 1 (n = 4) zu den drei festgelegten Messzeitpunkten (MW ± SD).

Tabelle 8: Ergebnisse der Messung von Sauerstoffpartialdruck (PaO_2), Kohlendioxidpartialdruck ($PaCO_2$) und pH-Wert der Tiere der Gruppen 2 und 3 (Vorversuch)

		Infusion 3 mg/kg/h i.v. (n = 1)	Infusion 6 mg/kg/h i.v. (n = 2)
PaO₂ (mmHg)	Baseline	142	182 ± 25
	60 min	143	195 ± 11
	120 min	146	202 ± 3
	180 min	140	206 ± 1
PaCO₂ (mmHg)	Baseline	43,0	36,7 ± 1,7
	60 min	40,0	42,1 ± 0,3
	120 min	39,2	39,1 ± 2,3
	180 min	37,8	35,3 ± 1,2
pH-Wert	Baseline	7,44	7,40 ± 0,03
	60 min	7,46	7,46 ± 0,06
	120 min	7,46	7,43 ± 0,05
	180 min	7,46	7,40 ± 0,05

Darstellung des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes (PaO_2 , mmHg), des arteriellen Kohlendioxidpartialdruckes ($PaCO_2$, mmHg) und des pH-Wertes des Tieres der Gruppe 2 mit 3 mg/kg/h i.v. (n = 1) und der Tiere der Gruppe 3 mit 6 mg/kg/h i.v. (n = 2) zu den vier festgelegten Zeitpunkten (absolute Werte; MW ± SD).

3.3.1.2. Plasmakonzentration von APC

Die Plasmakonzentration von APC wurde bei den Tieren der Gruppe 1 zu neun definierten Zeitpunkten gemessen: nach 0 (Baseline), 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 45 Minuten (Abbildung 8). Die Messung der Plasmakonzentration der Gruppen 2 und 3 erfolgte zu fünf Zeitpunkten: nach 0 (Baseline), 2,5, 60, 120 und 180 Minuten (Abbildung 9 und 10). Die Ergebnisse der Messungen sind in den folgenden Abbildungen graphisch dargestellt.

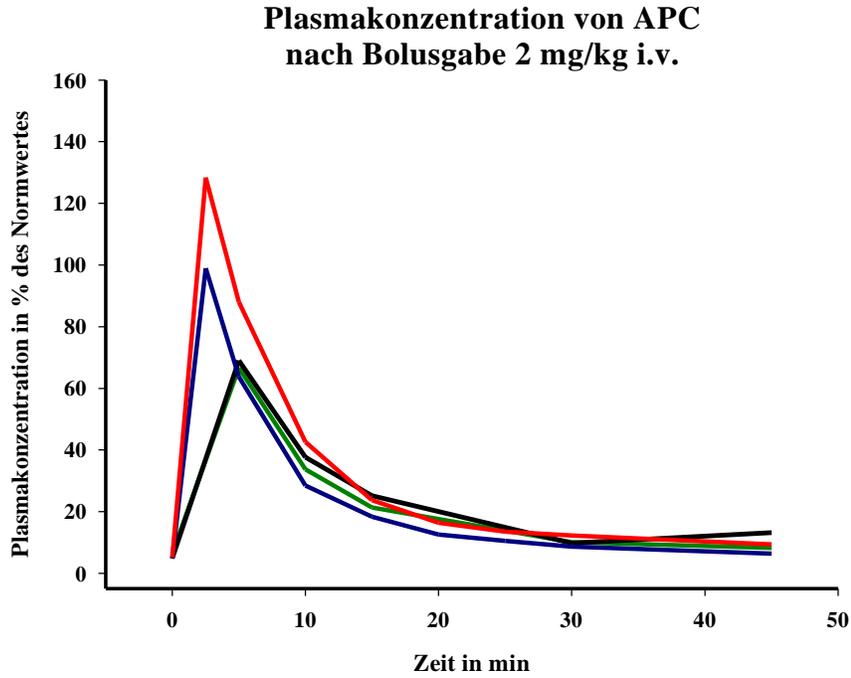


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Plasmakonzentration von APC nach einmaliger Bolusgabe von 2 mg/kg i.v. zu verschiedenen Messzeitpunkten der Gruppe 1 (n = 4)

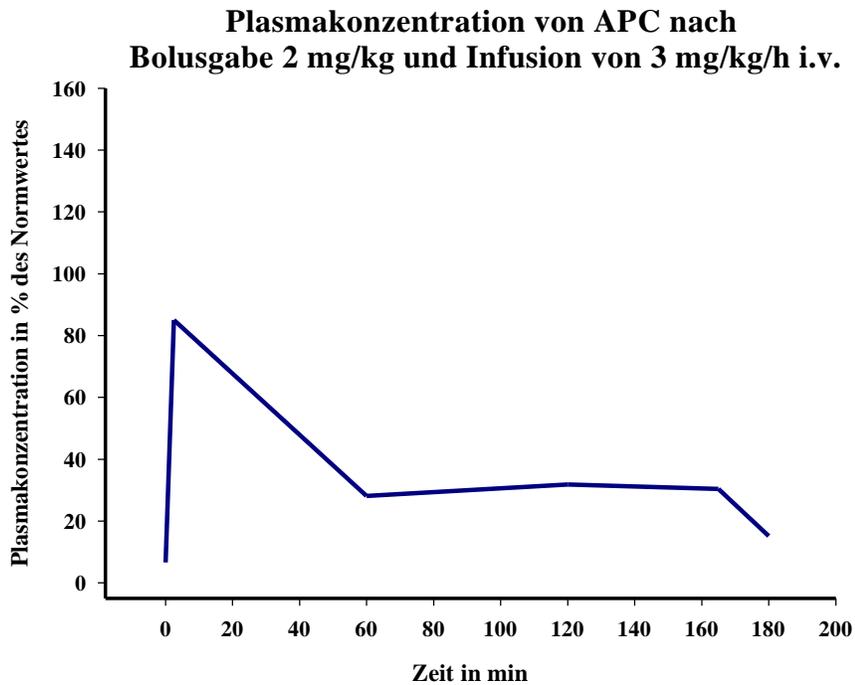


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Plasmakonzentration von APC nach Bolusgabe von 2 mg/kg und zusätzlicher Infusion von 3 mg/kg/h i.v. über drei Stunden der Gruppe 2 (n = 1)

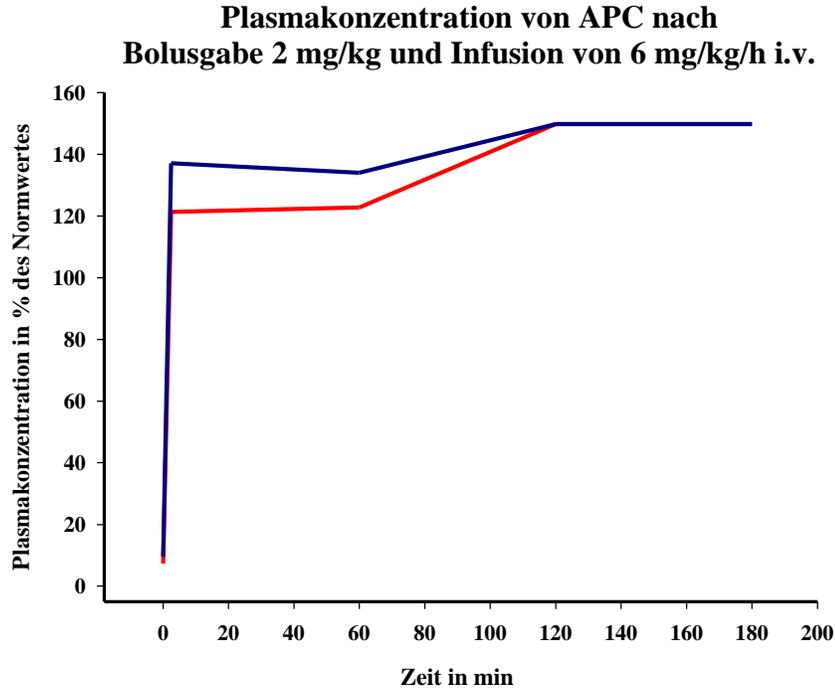


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Plasmakonzentration von APC nach Bolusgabe von 2 mg/kg und zusätzlicher Infusion von 6 mg/kg/h i.v. über drei Stunden der Gruppe 3 (n = 2)

Vergleichende Darstellung der Plasmakonzentration von APC nach unterschiedlichem Dosierungsschema zu den jeweiligen Messzeitpunkten (Abb. 8-10): Konzentration im Plasma nach Bolusgabe von 2 mg/kg i.v. (n = 4), Bolusgabe von 2 mg/kg i.v. und Infusion von 3 mg/kg/h (n = 1) sowie Bolusgabe von 2 mg/kg i.v. und Infusion von 6 mg/kg/h (n = 2) jeweils über drei Stunden.

Die Bestimmung der basalen Plasmakonzentration von APC ergab zum Messzeitpunkt t = 0 mittlere Werte von $6,4 \pm 1,7$ % des Normwertes in Prozent. Diese Konzentration wird durch das endogen vorhandene murine APC repräsentiert. Fünf Minuten nach der Bolusgabe konnten bei den Tieren der ersten Gruppe mittlere Werte von $71,8 \pm 11$ % gemessen werden, die nach zehn Minuten aber auf $35,6 \pm 5,98$ % abfielen. Nach 45 Minuten wurden wieder Werte im Bereich der Baseline gemessen ($9,3 \pm 2,9$ %). Anhand der Werte der Plasmakonzentration nach Bolusgabe konnte die Plasmahalbwertszeit bestimmt werden. Diese betrug für die Tiere der ersten Gruppe im Mittel 7,3 Minuten.

Nach der kontinuierlichen Applikation von APC mit einer Infusionsrate von 3 mg/kg/h über drei Stunden (Gruppe 2) konnten 2,5 Minuten nach der initialen Bolusgabe maximale Werte von 85 % des Normwertes gemessen werden. Diese fielen nach 60 Minuten auf Werte von etwa 35 % ab.

Bei den Tieren, die eine dauerhafte Applikation von 6 mg/kg/h nach der initialen Bolusgabe erhielten (Gruppe 3), konnten 2,5 Minuten nach Gabe maximale Werte von über 120 % gemessen werden. Im Verlauf der Infusion über drei Stunden war kein Abfall der Plasmakonzentration festzustellen. Die Konzentration von APC im Plasma stieg bis über die messbare Grenze des Chromogen-Peptid-Substrat-Assays von 149 % des Normwertes hinaus.

Die Ergebnisse dieser Vorstudie liefern die Grundlage für die Wahl von Dosierung und Applikationsart von APC in den Hauptversuchen. Hierfür wurde die Applikation von 2 mg/kg i.v. mit zusätzlicher Infusion von 6 mg/kg/h als die Dosierung der Wahl identifiziert.

3.3.1.3. Plasmaosmolarität

Bei einem Tier der Infusionsgruppe mit 6 mg/kg/h APC (Gruppe 3) wurde eine Bestimmung der Plasmaosmolarität vorgenommen. Zusätzlich wurde als Vergleich eine 1 ml-Probe der Stammlösung (2 mg/ml) des Medikaments ebenfalls einer Osmolaritätsmessung unterzogen.

Tabelle 9: Darstellung der Osmolarität im Plasma und in der Stammlösung des Medikaments

Probe	Baseline	Nach 180 min	Stammlösung
Osmolarität in mosmol/kg	296	307	615

Vergleich der Plasmaosmolarität eines Tieres der Infusionsgruppe vor der APC-Applikation (Baseline) und nach dreistündiger Infusion sowie der Osmolarität der Stammlösung von 2 mg/ml Xigris

Die Messung ergab eine Plasmaosmolarität bei der Ratte vor Applikation im physiologischen Bereich (280-300 mosmol/kg). Nach einer Infusion von 6 mg/kg/h über drei Stunden war die Plasmaosmolarität auf einen Wert von 307 mosmol/kg angestiegen. Eine Kontrolle der Stammlösung von 2 mg/ml ergab eine mehr als zweimal so hohe Osmolarität im Vergleich zum Blut.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Auch diese Ergebnisse waren Grundlage für die Anwendung von Xigris in den Hauptversuchen. Um die Osmolarität der Stammlösung zu halbieren, wurden statt 2 mg nur 1 mg Xigris in 1 ml Aqua ad iniectabilia gelöst.

3.3.2. Ergebnisse des Hauptversuches

Die Ergebnisse von 20 männlichen Sprague Dawley-Ratten nach zerebraler Ischämie und die Werte von sechs Nativtieren gehen in die Analyse ein. Vor der Induktion der Ischämie erfolgt die Randomisierung in eine der zwei Versuchsgruppen: APC-Gruppe (n = 10) oder Kontrollgruppe mit NaCl-lösung (n = 10). Zusätzlich liefern sechs Tiere ohne operativen Eingriff (Nativtiergruppe) die Referenzwerte für die histologischen Ergebnisse und das Lernverhalten im Barnes Maze Test.

3.3.2.1. Physiologische Parameter

Die physiologischen Parameter werden zu genau definierten Messzeitpunkten erhoben. Der erste Messzeitpunkt $t = 0$ (Basalwert) erfolgt nach einer Äquilibrationsphase von 30 Minuten direkt vor Beginn des Blutentzuges. Weitere Messungen werden nach dem Blutentzug, am Ende der Ischämiephase und am Ende der Reperfusionphase erhoben und dokumentiert. Im Anschluss erfolgt stündlich je eine Messung während der Infusion über fünf Stunden.

Körpergewicht

Die Tiere werden vor der Operation nach einem zwölfstündigen Futterentzug gewogen. Das mittlere Gewicht und die Standardabweichung aller gewogenen Tiere betragen am Tag der Operation $319,7 \pm 14,9$ g. Die einzelnen Werte der beiden Versuchsgruppen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 10: Messung des Körpergewichts der Tiere der APC- und der Kontrollgruppe

		APC	NaCl
Gewicht (g)	OP-Tag	$316,0 \pm 16,2$	$323,3 \pm 13,5$
	1. Tag post OP	$305,5 \pm 16,0$	$311,2 \pm 10,7$
	2. Tag post OP	$301,5 \pm 18,7$	$310,2 \pm 19,5$
	3. Tag post OP	$301,4 \pm 18,5$	$314,7 \pm 14,2$
	4. Tag post OP	$307,8 \pm 23,5$	$320,9 \pm 14,2$
	5. Tag post OP	$313 \pm 26,3$	$321,5 \pm 16,8$
	6. Tag post OP	$320,5 \pm 21,1$	$329,1 \pm 16,4$
	7. Tag post OP	$321,9 \pm 25,11$	$332,4 \pm 16,2$
	8. Tag post OP	$328,6 \pm 27,74$	$338,7 \pm 19,3$
	9. Tag post OP	$330,1 \pm 29,23$	$341,8 \pm 18,5$
	10. Tag post OP	$336,8 \pm 27,76$	$348,6 \pm 17,4$

Darstellung des Körpergewichts (g) der Tiere der APC-Gruppe (n = 10) und der Kontrollgruppe (n = 10) (MW ± SD).

Die tägliche Kontrolle des Körpergewichts ergibt in der APC-Gruppe einen Abfall des Gewichtes am Tag nach der OP um 3,4 %, während die Tiere der Kontrollgruppe um 3,9 % abgenommen haben. Ein Vergleich am zehnten postoperativen Tag ergibt bei der APC-Gruppe eine Gewichtszunahme um 6,6 % und bei den Tieren der Kontrollgruppe eine Zunahme um 7,8 %.

Temperatur

Die perikranielle Temperatur (T_{peri}) wird während des gesamten operativen Teils überwacht. Angestrebt wird eine Temperatur von 37,0 °C. Neben der T_{peri} wird auch die Körpertemperatur über eine rektale Sonde mit erfasst. Die Ergebnisse der Messung der T_{peri} sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 11: Ergebnisse der Messung der perikraniellen Temperatur

		APC	NaCl
T_{peri} (in °C)	Baseline	36,9 ± 0,1	36,9 ± 0,6
	Ischämie	35,2 ± 1,5	35,2 ± 0,9
	Reperfusion	37,0 ± 0,5	37,4 ± 0,7
	1 h	36,9 ± 0,6	36,9 ± 0,2
	2 h	36,9 ± 0,7	36,7 ± 0,4
	3 h	37,0 ± 0,3	36,9 ± 0,4
	4 h	37,0 ± 0,3	36,9 ± 0,3
	5 h	36,8 ± 0,3	37,3 ± 0,5

Darstellung der perikraniellen Temperatur (°C) der Tiere der APC-Gruppe (n = 10) und der Kontrollgruppe (n = 10) zu acht intraoperativen Messzeitpunkten (MW ± SD).

Die mittleren Werte der T_{peri} in der Ischämiephase in beiden Gruppen sind um 1,7 °C gegenüber den Werten der Baseline erniedrigt. In der Reperfusionphase wurden wieder physiologische Werte gemessen. Zu anderen Zeitpunkten wurden keine Abweichungen gegenüber der Baseline erfasst.

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Gemäß dem Versuchprotokoll wird der MAP während der 14minütigen Ischämiephase auf 40 mmHg gesenkt. Eine signifikante Erniedrigung des MAP während der Ischämie im Vergleich zu den anderen Messzeitpunkten innerhalb der Versuchsgruppen ist daher bewusst herbeigeführt. In der folgenden Tabelle ist der MAP im Verlauf der Operation dargestellt.

Tabelle 12: Ergebnisse der Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks

		APC	NaCl
MAP (mmHg)	Baseline	109 ± 25	110 ± 20
	Ischämie	40 ± 0	40 ± 0
	Reperfusion	118 ± 13	123 ± 14
	1 h	91 ± 17	82 ± 12
	2 h	82 ± 14	77 ± 11
	3 h	94 ± 23	85 ± 19
	4 h	85 ± 15	80 ± 11
	5 h	94 ± 20	95 ± 16

Darstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks (mmHg) der Tiere der APC-Gruppe (n = 10) und der Kontrollgruppe (n = 10) zu acht intraoperativen Messzeitpunkten (MW ± SD).

Der MAP ist während der ischämischen Phase in beiden Gruppen im Vergleich zu den anderen Messzeitpunkten versuchsbedingt auf 40 mmHg erniedrigt. Alle übrigen Mittelwerte der gemessenen Parameter zeigen keine Veränderungen und liegen im physiologischen Bereich.

Herzfrequenz

Die zu den genannten Messzeitpunkten erhobenen Herzfrequenzen sind in der folgenden Tabelle als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

Tabelle 13: Ergebnisse der Messung der Herzfrequenz

		APC	NaCl
Herzfrequenz (Schläge/min)	Baseline	336 ± 47	337 ± 46
	Ischämie	341 ± 34	338 ± 30
	Reperfusion	332 ± 38	331 ± 41
	1 h	336 ± 36	331 ± 36
	2 h	350 ± 27	321 ± 34
	3 h	350 ± 32	338 ± 31
	4 h	356 ± 24	333 ± 29
	5 h	349 ± 34	340 ± 36

Darstellung der Herzfrequenz (Schläge/Minute) der Tiere APC-Gruppe (n = 10) und der Kontrollgruppe (n = 10) zu acht intraoperativen Messzeitpunkten (MW ± SD).

Die mittleren Werte der gemessenen Herzfrequenzen innerhalb und zwischen den Gruppen zeigen keine Abweichungen und liegen im physiologischen Bereich.

Blutgasanalyse und Beatmungsfrequenz

Es werden arterielle Messungen des Sauerstoffpartialdrucks (PaO₂), des Kohlendioxidpartialdrucks (PaCO₂) und des pH-Wertes sowie der Beatmungsfrequenz während des Versuchs zu den fünf festgelegten Messzeitpunkten durchgeführt, deren Werte in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 14: Ergebnisse der Messung von Sauerstoffpartialdruck (PaO_2), Kohlendioxidpartialdruck ($PaCO_2$), pH-Wert und Beatmungsfrequenz

		APC	NaCl
PaO₂ (mmHg)	Baseline	181 ± 18	171 ± 11
	Ischämie	185 ± 15	177 ± 10
	Reperfusion	194 ± 16	183 ± 18
	3 h	200 ± 14	185 ± 11
	5 h	164 ± 33	186 ± 11
PaCO₂ (mmHg)	Baseline	37,8 ± 2,8	36,8 ± 4,1
	Ischämie	31,1 ± 5,5	32,8 ± 6,2
	Reperfusion	36,8 ± 3,2	36,0 ± 4,8
	3 h	34,6 ± 3,4	33,9 ± 4,0
	5 h	37,3 ± 4,7	36,3 ± 2,2
pH-Wert	Baseline	7,40 ± 0,03	7,42 ± 0,03
	Ischämie	7,39 ± 0,05	7,38 ± 0,04
	Reperfusion	7,38 ± 0,03	7,39 ± 0,02
	3 h	7,42 ± 0,03	7,42 ± 0,02
	5 h	7,40 ± 0,05	7,40 ± 0,03
Beatmungs- frequenz (Atemzüge/min)	Baseline	57 ± 5	54 ± 6
	Ischämie	46 ± 3	43 ± 5
	Reperfusion	58 ± 5	56 ± 5
	3 h	57 ± 5	54 ± 6
	5 h	57 ± 5	53 ± 5

Darstellung des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (PaO_2 , mmHg), des arteriellen Kohlendioxidpartialdrucks ($PaCO_2$, mmHg), des pH-Werts und der Atemfrequenz (Atemzüge/Minute) der Tiere der APC-Gruppe ($n = 10$) und der Kontrollgruppe ($n = 10$) zu fünf intraoperativen Messzeitpunkten (MW ± SD).

Die mittleren Werte des PaO₂ in der APC-Gruppe zeigen nach drei Stunden eine tendenzielle Erhöhung im Vergleich zum Ausgangswert. In beiden Gruppen liegt nach Ischämie und nach drei Stunden eine Erniedrigung des PaCO₂ vor. Die Atemfrequenz ist während der Ischämie in beiden Gruppen im Vergleich zum Ausgangswert erniedrigt (APC 46 vs. 57 Züge/min und Natriumchloridlösung 43 vs. 54 Züge/min). Zu anderen Zeitpunkten und innerhalb der Gruppen zeigen sich bei allen Messwerten ansonsten keine auffälligen Abweichungen.

Plasmaglukosekonzentration

In der folgenden Tabelle findet sich, aufgeteilt nach den beiden Versuchs-Gruppen, eine Darstellung der intraoperativen Plasmaglukosekonzentration zu den fünf verschiedenen Messzeitpunkten.

Tabelle 15: Ergebnisse der Plasmaglukosekonzentration

		APC	NaCl
Plasma- glukose- konzentration mg/dl	Baseline	111 ± 12	123 ± 23
	Ischämie	132 ± 60	143 ± 16
	Reperfusion	138 ± 17	133 ± 33
	3 h	111 ± 16	98 ± 18
	5 h	109 ± 18	97 ± 17

Darstellung des Plasmaglukosekonzentrationsverlaufs (mg/dl) der Tiere der APC-Gruppe (n = 10) und der Kontrollgruppe (n = 10) zu fünf intraoperativen Messzeitpunkten (MW ± SD).

Die Mittelwerte der Plasmaglukosekonzentration zeigen im Versuchsverlauf keine auffälligen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Hämoglobingehalt

In der folgenden Tabelle findet sich, aufgeteilt nach den beiden Versuchsgruppen, eine Darstellung der intraoperativ gemessenen Hämoglobinkonzentrationen zu den fünf verschiedenen Messzeitpunkten.

Tabelle 16: Ergebnisse der Hämoglobinkonzentrationsbestimmung

		APC	NaCl
Hämoglobin mg/dl	Baseline	12,39 ± 0,91	12,6 ± 0,91
	Ischämie	10,14 ± 0,7	10,51 ± 1,45
	Reperfusion	11,56 ± 1,06	11,71 ± 1,13
	3 h	10,08 ± 1,04	10,38 ± 1,17
	5 h	9,71 ± 1,07	9,82 ± 0,58

Darstellung der Hämoglobinkonzentration (mg/dl) der Tiere der APC-Gruppe (n = 10) und der Kontrollgruppe (n = 10) zu fünf intraoperativen Messzeitpunkten (MW ± SD).

Zwischen den beiden Versuchsgruppen bestehen keine Abweichungen der Hämoglobinkonzentration. Drei und fünf Stunden nach Beginn der Infusionsphase sind die mittleren Werte der Hämoglobinkonzentration gegenüber dem Ausgangswert tendenziell erniedrigt.

3.3.2.2. Messung des zerebralen Blutflusses (CBF)

Während des gesamten Versuchsverlaufes wird bei allen Tieren kontinuierlich der zerebrale Blutfluss mittels Laser-Doppler-Flussmessung gemessen. Die Werte werden in absoluten Werten in Perfusion Units (PU, fiktive willkürlich gewählte Einheit) gemessen und aufgezeichnet.

Tabelle 17: Ergebnisse der Messung des zerebralen Blutflusses beider Hemisphären

		APC	NaCl
Zerebraler Blutfluss (PU)	Baseline	324 ± 60	313 ± 80
	Ischämie	62 ± 45	45 ± 14
	Reperfusion	672 ± 335	822 ± 164
	1 h	325 ± 126	263 ± 134
	2 h	322 ± 95	291 ± 150
	3 h	352 ± 147	331 ± 152
	4 h	332 ± 128	335 ± 154
	5 h	341 ± 141	391 ± 167

Darstellung der mittleren zerebralen Durchblutung in Perfusion Units (PU) der beiden Hemisphären mittels Laser-Doppler-Flussmessung der Tiere der APC-Gruppe (n = 10) und der Kontrollgruppe (n = 10) zu acht intraoperativen Messzeitpunkten (MW ± SD).

In der Ischämiephase ist ein Abfall des zerebralen Blutflusses um 262 Perfusion Units in der APC-Gruppe, in der Kontrollgruppe dagegen um 268 Perfusion Units zu verzeichnen (siehe Tabelle 17 und Abbildung 11). Dies entspricht einem Abfall auf 19 % bzw 14 % des Ausgangswertes (Baseline), während in der Reperfusionsphase ein Anstieg der Werte auf 207 % bzw. 262 % des Ausgangswertes zu erkennen ist. Alle anderen gemessenen Werte bewegen sich im Bereich der Baseline. Nach Reperfusion erholen sich die Werte wieder und steigen im weiteren Verlauf über das Ausgangsniveau an. Die Werte nach fünfstündiger Infusionsphase sind in der APC-Gruppe um 17 PU, in der Kontrollgruppe um 78 PU gegenüber der Baseline erhöht. Dies entspricht einer Steigerung des zerebralen Blutflusses um 5 % bzw. um 25 %

gegenüber der Baseline. Innerhalb der beiden Gruppen liegt allerdings keine auffällige Erhöhung des Blutflusses fünf Stunden nach Infusionsbeginn vor.

Messung des zerebralen Blutflusses beider Hemisphären

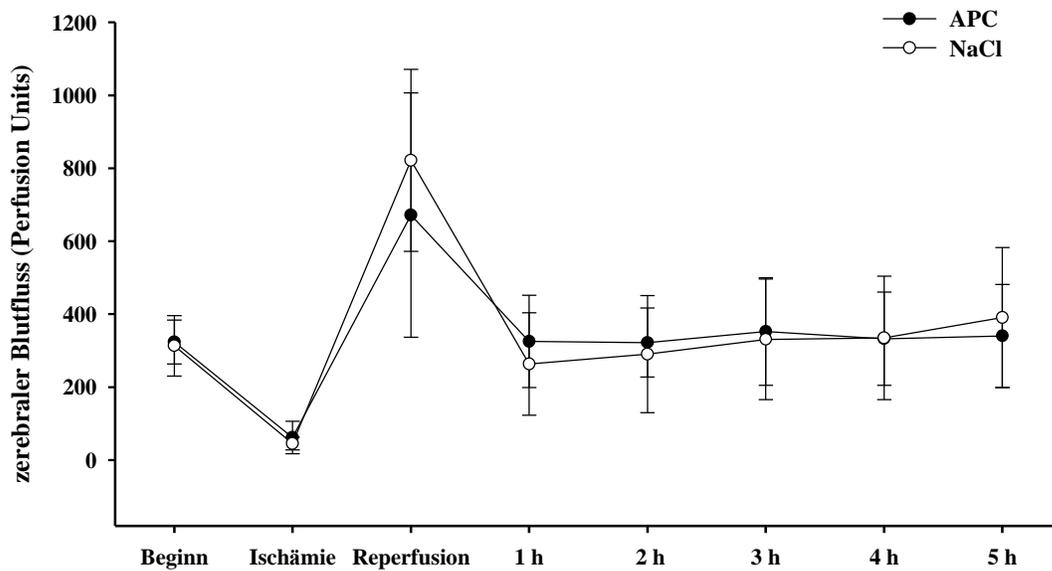


Abbildung 11: Mittlerer zerebraler Blutfluss in Perfusion Units

Graphische Darstellung der Mittelwerte des zerebralen Blutflusses beider Hemisphären in Perfusion Units (PU) der APC-Gruppe ($n = 10$) und der Kontrollgruppe ($n = 10$) zu acht intraoperativen Messzeitpunkten ($MW \pm SD$).

Signifikanzen: keine zwischen den beiden Behandlungsgruppen

3.3.2.3. Plasmakonzentration von APC

Die Konzentration von APC im Plasma wurde zu drei festgelegten Zeitpunkten (Beginn des Versuchs = Baseline, nach einer Stunde, nach fünf Stunden) bestimmt. Die Ergebnisse finden sich in der folgenden Tabelle.

Tabelle 18: Ergebnisse der Messung der Plasmakonzentration von APC

		APC	NaCl
APC- Plasmakonzentration in % des Normwertes	Baseline	4,02 ± 1,17	4,0 ± 1,0
	1 h	88,5 ± 34	3,7 ± 1,7
	5 h	116,1 ± 36,9	2,3 ± 1,2

Darstellung der Plasmakonzentration (% der Norm) der APC-Gruppe (n = 10) und der Kontrollgruppe (n = 10) zu Versuchsbeginn (Baseline), nach einer Stunde und nach fünf Stunden (MW ± SD).

3.3.2.4. Plasmaosmolarität

Zur Überprüfung der Isoosmolarität wird zu zwei festgelegten Zeitpunkten (zu Beginn des Versuches = Baseline, am Ende des Versuches = nach fünf Stunden) die Plasmaosmolarität gemessen. Die Werte sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 19: Ergebnisse der Messung der Plasmaosmolarität

		APC	NaCl
Plasmaosmolarität in mosmol/kg	Baseline	299 ± 6	302 ± 5
	5 h	309 ± 7	309 ± 5

Darstellung der Mittelwerte der Plasmaosmolarität (mmosmol/kg) der Tiere der APC-Gruppe (n = 10) und der Kontrollgruppe (n = 10) zu Beginn (Baseline) und am Ende (nach fünf Stunden) des Versuches (MW ± SD).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Werte der Plasmaosmolarität zeigen keine Unterschiede innerhalb der Gruppen. Nach Beenden des Versuches sind die Werte gegenüber dem Ausgangswert tendenziell erhöht.

3.3.2.5. Verhaltenstests

Die Ergebnisse des Barnes Maze Test sind in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt.

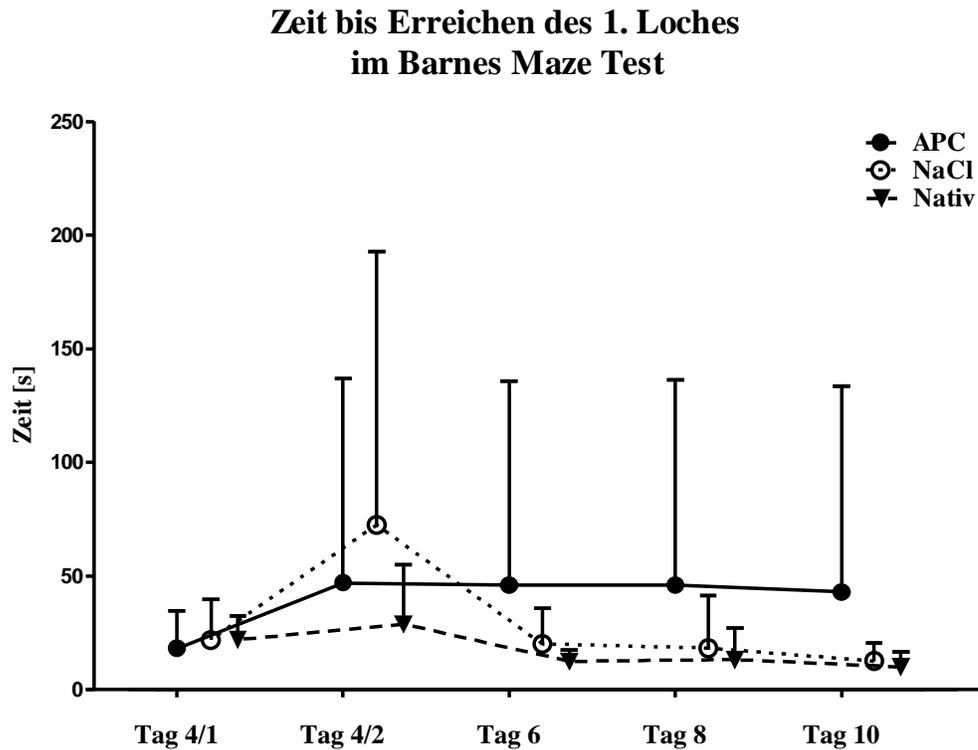


Abbildung 12: Zeit bis zum Erreichen des ersten Loches im Barnes Maze Test

Graphische Darstellung der Mittelwerte der Zeit bis zum Erreichen des ersten Loches (Abb.12) der Tiere der APC-Gruppe ($n = 10$), der Kontrollgruppe ($n = 10$) und der Nativtiergruppe ($n = 6$) im Barnes Maze Test ($MW \pm SD$).

Signifikanzen: keine zwischen den beiden Behandlungsgruppen

Zeit bis Erreichen des Zielloches im Barnes Maze Test

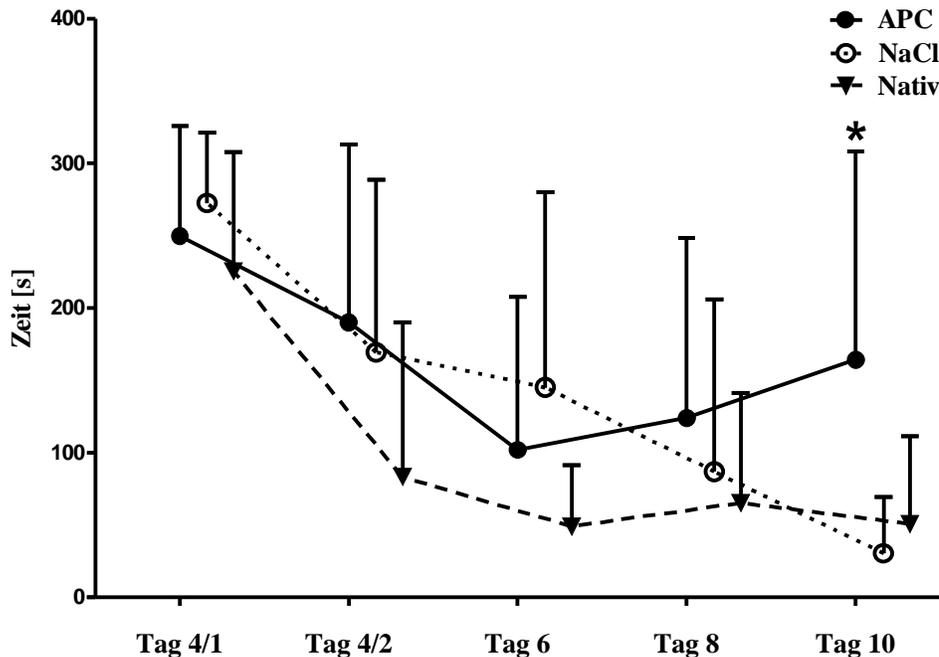


Abbildung 13: Zeit bis zum Erreichen des Zielloches im Barnes Maze Test

Graphische Darstellung der Mittelwerte der Zeit bis zum Erreichen des Zielloches (Abb.13) der Tiere der APC-Gruppe ($n = 10$), der Kontrollgruppe ($n = 10$) und der Nativtiergruppe ($n = 6$) im Barnes Maze Test (MW \pm SD).

Signifikanzen: * = signifikant im Vergleich APC versus NaCl mit $p = 0,013$

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen die graphische Darstellung der Zeit, die ein Tier bis zum Auffinden des ersten Loches und bis zum Auffinden des Zielloches benötigt. Die Darstellung der **Zeit bis zum Erreichen des ersten Loches** zeigt, dass im Verlauf aller Durchläufe die Nativtiere von Lauf zu Lauf weniger Zeit benötigten. Die Tiere beider Ischämiegruppen wiesen beim zweiten Lauf längere Zeiten auf, verbesserten sich aber an den folgenden Tagen. Der Vergleich der APC-Gruppe und der Kontrollgruppe am Testtag 10 zeigt, dass hier kein statistisch signifikanter Unterschied in der Zeit zum Auffinden des ersten Loches besteht (43 bzw. 15 Sekunden), wobei die APC-Tiere tendenziell mehr Zeit benötigten. Auch im **Auffinden des Zielloches** haben die Tiere der Nativtiergruppe am schnellsten gelernt, also im Vergleich zu den Ischämietieren weniger Zeit bis zum Erreichen der Zielbox benötigt. Zwischen den Tieren der beiden Ischämiegruppen zeigte sich kein Unterschied im Auffinden der Zielbox, wobei der letzte Test am Tag 10 eine Ausnahme bildet. Hier haben die Tiere der APC-Gruppe signifikant mehr Zeit benötigt als die Kontrollgruppe (164 bzw. 31 Sekunden).

3.3.2.6. Analytischer Teil

Nach der Aufbereitung der Gehirne wird zur Quantifizierung des histopathologischen Schadens eine HE-Färbung durchgeführt. Die Anfärbung von aktivierter Caspase-3 dient zur Detektion aktivierte-Caspase-3-positiver Zellen im Hippokampus und somit dem Nachweis von Apoptoseprozessen in Neuronen.

3.3.2.6.1. Histologische Untersuchung der HE-gefärbten Schnitte

Die zerebrale Ischämie induziert einen Schaden, der in der HE-Färbung unter dem Lichtmikroskop beurteilt und klassifiziert werden kann. Dabei wird sowohl die linke als auch die rechte Hemisphäre anhand gefärbter Schnitte untersucht, wobei besonderes Augenmerk auf der Hippokampusformation liegt. Die einzelnen Zellen, die sich im Hippokampus und Gyrus dentatus zu einem Zellband formieren, werden in eosinophile (rot angefärbte) und basophile (blau-lila angefärbte) Zellen unterschieden. Die vitalen Neuronen, die sich blassbläulich, gut abgrenzbar und mit dunkler gefärbtem Zellkern darstellen, werden ausgezählt und dokumentiert.

Es werden pro Tier drei Objektträger mit jeweils drei Gehirnschnitten angefärbt. Wie bereits beschrieben wird die im Atlas „The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates“ (PAXINOS und WATSON, 1997) als Bregma -2,3 definierte Schnittebene als Nulllinie vorgegeben. Nun werden von dieser Nulllinie ausgehend der 1., der 25. und der 50. Objektträger für die Färbung ausgewählt, um repräsentative Ergebnisse der gesamten Struktur des Hippokampus zu erzielen.

Die Auswertung der Schnitte erfolgt durch Zählen aller vitalen Neuronen in der Hippokampusformation. Die Beurteilung des induzierten Schadens erfolgt dabei getrennt für die CA1-Region und die CA3-Region. Die CA2-Region wurde in der Auswertung der CA1-Region, die CA4-Region der CA3-Region zugeordnet (siehe Abbildung 14).

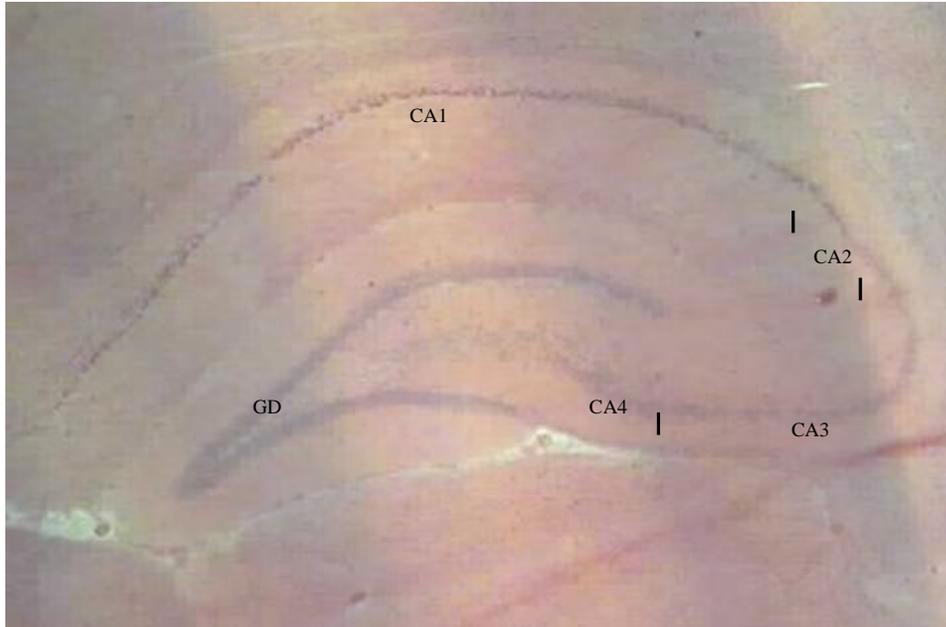


Abbildung 14: Hippokampusformation eines Tieres nach globaler zerebraler Ischämie

*HE-Färbung, Vergr. 25×; Ausschnitt eines Präparates eines Tieres der APC-Gruppe mit globaler zerebraler Ischämie nach HE-Färbung, Darstellung der Hippokampusformation mit Gyrus dentatus und den CA-Regionen 1-4.
(GD = Gyrus dentatus; CA1-4 = CA-Regionen 1-4)*

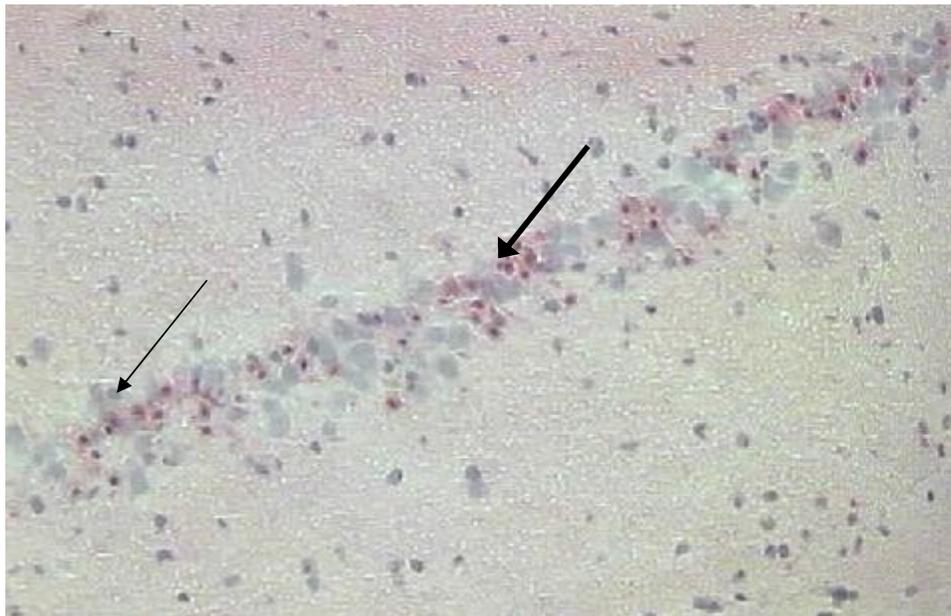


Abbildung 15: CA1-Region der Hippokampusformation eines Tieres nach globaler zerebraler Ischämie

HE-Färbung, Vergr. 200×; Ausschnitt eines Präparates eines Tieres der APC-Gruppe mit globaler zerebraler Ischämie nach HE-Färbung, Darstellung der Hippokampusformation und der Neuronen der CA1-Region im Zellband des Hippokampus; vitale Neuronen sind basophil mit gut abgrenzbarem Kern (→), pyknotische Neuronen eosinophil angefärbt (→→).

Die Ergebnisse der Auswertung der absoluten Zellzahl aller vitalen Zellen in der CA1/CA2- und der CA3/CA4-Region sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 20: Ergebnisse der histologischen Auswertung der HE-Färbung

Anzahl der vitalen Neuronen	APC	NaCl	Nativ
CA1/CA2-Region	514 [386; 578]	420 [309; 456]	830 [646; 923]
CA3/CA4-Region	555 [535; 600]	519 [501; 538]	650 [556; 682]

Darstellung der absoluten Anzahl aller vitalen Neuronen der CA1/CA2- und der CA3/CA4-Region im Hippokampus der APC-Gruppe (n = 10), der Kontrollgruppe (n = 10) und der Nativtiergruppe (n = 6) (Median[Q1; Q3]).

Die Gehirnpräparate von Tieren aus der Nativtiergruppe, die keiner zerebralen Ischämie unterzogen wurden, weisen wie zu erwarten im Hippokampus keine eosinophil angefärbten Zellen auf. Die Tiere der APC- und der Kontrollgruppe mit NaCl-lösung zeigen in der Hippokampusformation sowohl in der CA1/CA2- als auch in der CA3/CA4-Region deutlich eosinophil angefärbte Zellen.

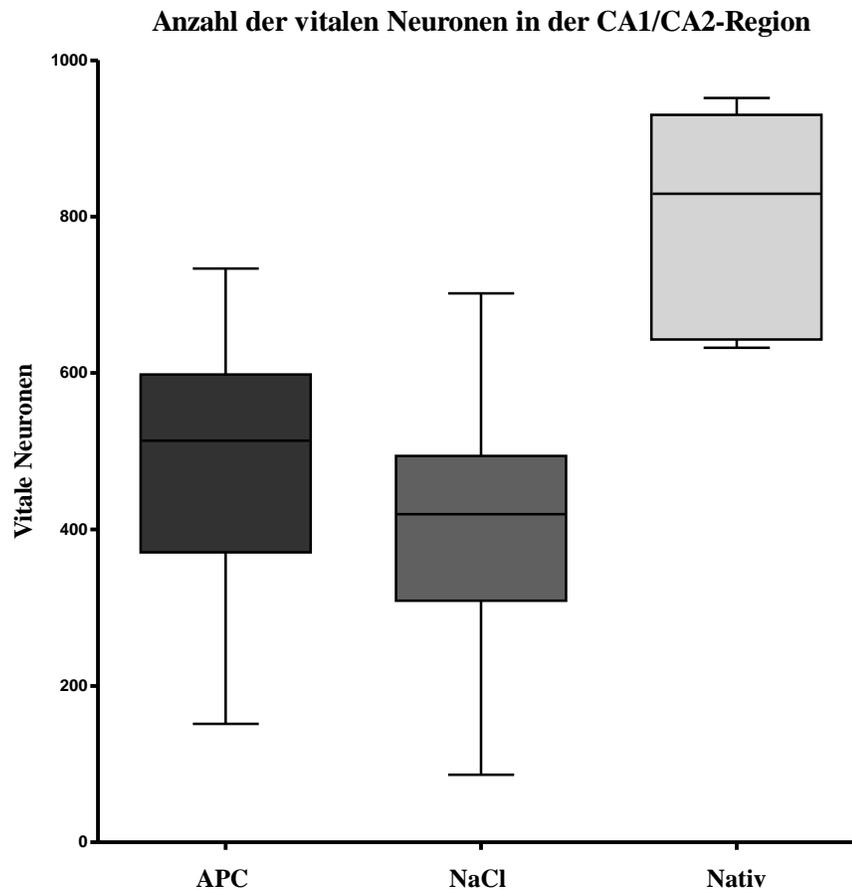


Abbildung 16: Anzahl der vitalen Neuronen in der CA1/CA2-Region

Graphische Darstellung der absoluten Anzahl der vitalen Neuronen in der CA1/CA2-Region (Abb.16) der Hippokampusformation beider Hemisphären der APC-Gruppe ($n = 10$), der Kontrollgruppe ($n = 10$) und der Nativtiergruppe ($n = 6$) (Median [Q1; Q3]).
 Signifikanzen: keine zwischen den beiden Behandlungsgruppen

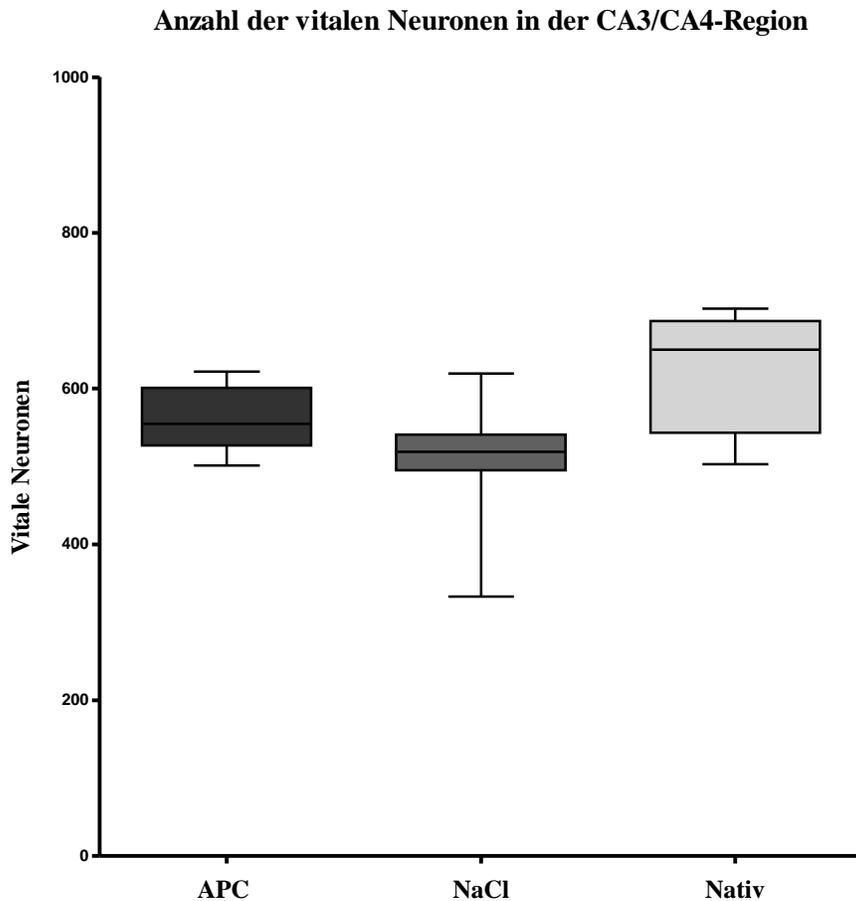


Abbildung 17: Anzahl der vitalen Neuronen in der CA3/CA4-Region

Graphische Darstellung der absoluten Anzahl der vitalen Neuronen in der CA3/CA4-Region (Abb.17) der Hippokampusformation beider Hemisphären der APC-Gruppe ($n = 10$), der Kontrollgruppe ($n = 10$) und der Nativtiergruppe ($n = 6$) (Median [Q1; Q3]).
Signifikanzen: keine zwischen den beiden Behandlungsgruppen

Die tabellarische und graphische Darstellung der absoluten Anzahl der Neuronen in der CA1/CA2- und in der CA3/CA4-Region zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen der APC- und der Kontrollgruppe mit NaCl-Lösung (siehe Tabelle 20 und Abbildungen 16, 17). Eine tendenzielle Erhöhung der Neuronenanzahl der APC-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ist in beiden Regionen erkennbar.

3.3.2.6.1. Detektion aktivierte-Caspase-3-positiver Zellen im Hippokampus

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate erfolgt ebenfalls mit dem Lichtmikroskop. Man unterscheidet hier aktivierte-Caspase-3-positive, braun angefärbte Zellen und aktivierte-Caspase-3-negative, mit Hämalaun gegengefärbte bläuliche Zellen (siehe Abbildung 18, 19). Die Anzahl der braungefärbten Zellen wird im Bereich der Hippokampusformation für die CA1/CA2- und die CA3/CA4-Region getrennt ausgezählt und dokumentiert. Aktivierte-Caspase-3-positive Zellen sind in Präparaten beider Behandlungsgruppen, nicht aber in den Präparaten der Nativtiere nachweisbar.

Um den verwendeten Antikörper auf seine Spezifität zu überprüfen, wurde bei jedem Färbedurchgang ein Gehirnpräparat eines gesunden Tieres (Nativtier) ohne Induktion einer zerebralen Ischämie mitgefärbt. Wie zu erwarten waren kaum aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen im Hippokampus der Nativtiere zu finden. Als Positiv- und Negativkontrolle wurden außerdem ein Thymuspräparat und ein Präparat ohne Primärantikörper mitgeführt. Im Thymusgewebe waren aktivierte-Caspase-3-positive Zellen immer nachweisbar, da hier ständig apoptotische Prozesse stattfinden (UCKER et al., 1994), während die Negativkontrolle immer negativ ausgefallen ist.

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen je ein Präparat mit aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen in der CA1-Region.

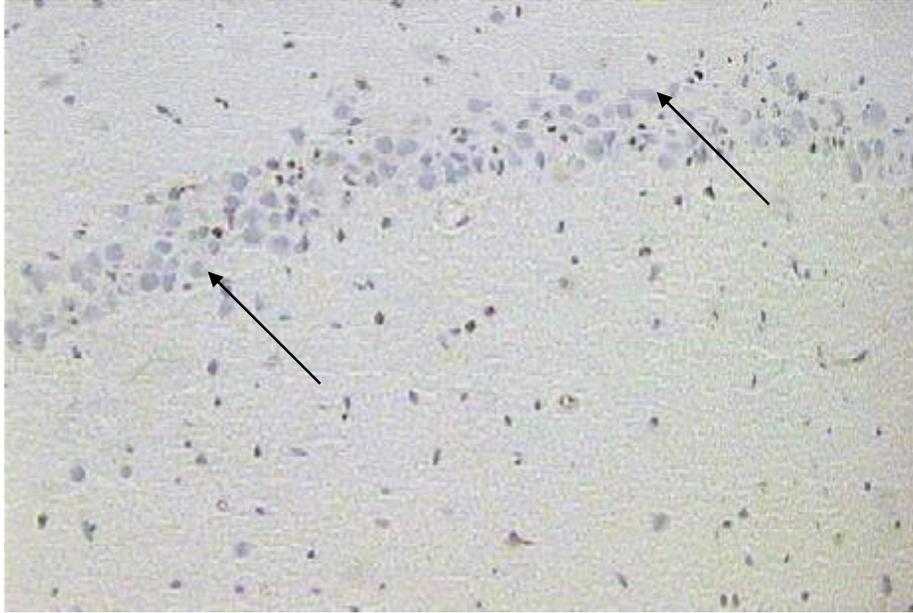


Abbildung 18: CA1-Region eines Tieres nach globaler zerebraler Ischämie mit aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen

Immunohistochemische Färbung gegen aktivierte Caspase-3, Vergr. 200×; Darstellung der Neuronen der CA1-Region im Zellband des Hippokampus; vitale Zellen sind basophil, aktivierte-Caspase-3-positive Zellen hingegen sind bräunlich angefärbt (→).



Abbildung 19: aktivierte-Caspase-3-positive Zelle in der CA1-Region eines Tieres nach globaler zerebraler Ischämie

Immunohistochemische Färbung gegen aktivierte Caspase-3, Vergr. 400×; vergrößerte Darstellung der Neuronen der CA1-Region im Zellband des Hippokampus; vitale Zellen sind basophil, aktivierte-Caspase-3-positive Zellen hingegen sind bräunlich angefärbt ().

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Auswertung aller aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen dargestellt.

Tabelle 21: Ergebnisse der immunohistochemischen Auswertung der aktivierte-Caspase-3-Färbung

Anzahl der aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen	APC	NaCl	Nativ
CA1/CA2-Region	5,8 [1,3; 14,7]	18,2 [4,7; 32,9]	0,2 [0; 1]
CA3/CA4-Region	0 [0; 0,6]	0 [0; 1,4]	0 [0; 0,5]

Darstellung der absoluten Anzahl aller aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen der CA1/CA2- und der CA3/CA4-Region im Hippokampus der APC-Gruppe (n = 10), der Kontrollgruppe (n = 10) und der Nativtiergruppe (n = 6) (Median[Q1; Q3]).

Im Präparat eines Tieres der Nativtiergruppe waren in der CA1/CA2- und in der CA3/CA4-Region des Hippokampus bräunlich angefärbte Zellen zu sehen, die Präparate der übrigen Tiere jedoch wiesen keine angefärbten Zellen auf. In den Präparaten der Tiere der APC- und der Kontrollgruppe waren in der CA1/CA2-Region der Hippokampusformation deutlich braun angefärbte Zellen zu sehen.

Die Ergebnisse sind in den folgenden beiden Abbildungen graphisch dargestellt.

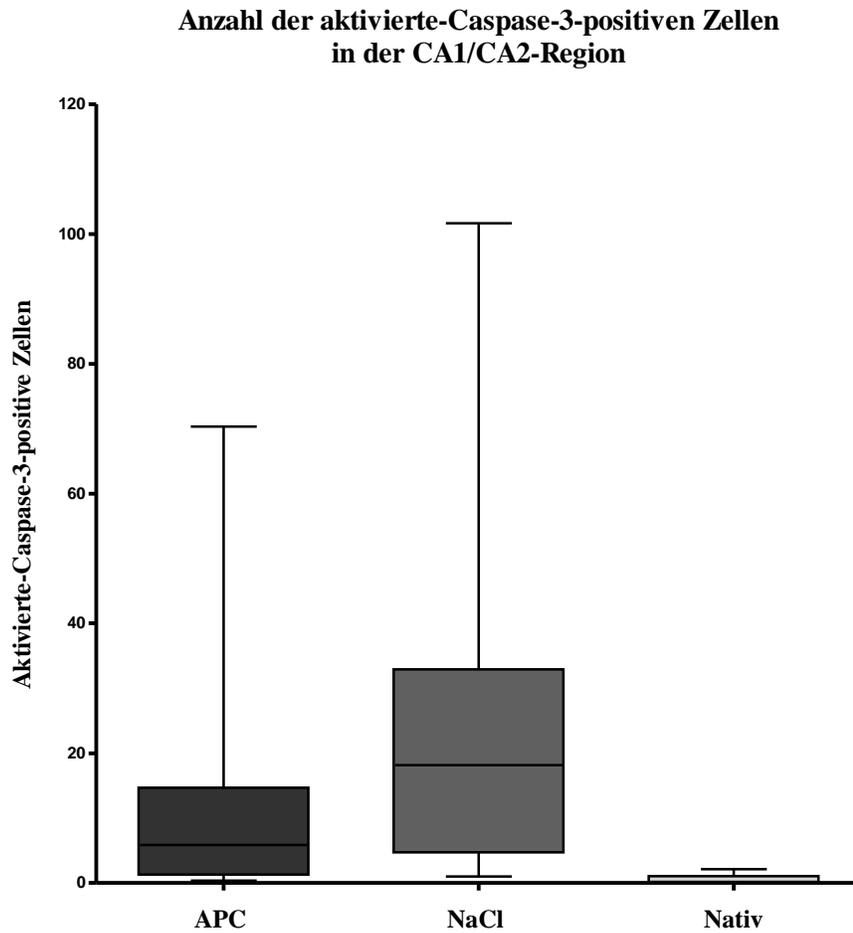


Abbildung 20: Anzahl der aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen in der CA1/CA2-Region des Hippokampus

Graphische Darstellung der absoluten Anzahl der aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen in der CA/CA21-Region der Hippokampusformation beider Hemisphären der APC-Gruppe ($n = 10$), der Kontrollgruppe ($n = 10$) und der Nativtiergruppe ($n = 6$) (Median [Q1; Q3]).
Signifikanzen: keine zwischen den beiden Behandlungsgruppen

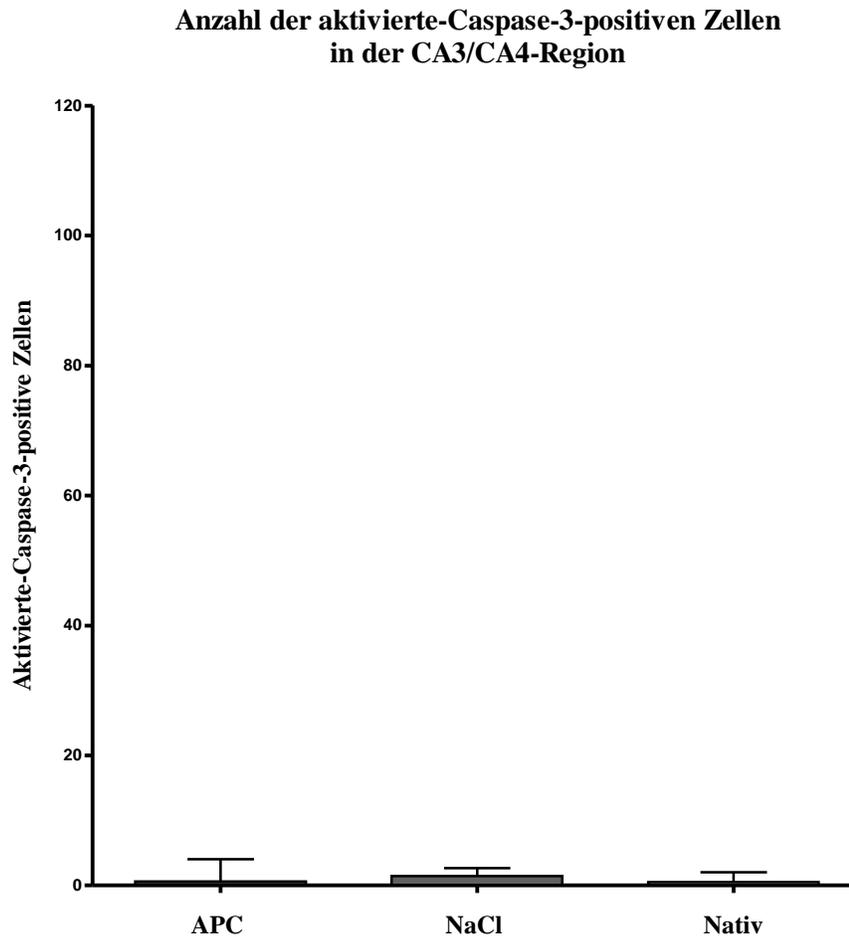


Abbildung 21: Anzahl der aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen in der CA3/CA4-Region des Hippokampus

Graphische Darstellung der absoluten Anzahl der aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen in der CA3/CA4-Region der Hippokampusformation beider Hemisphären der APC-Gruppe (n = 10), der Kontrollgruppe (n = 10) und der Nativtiergruppe (n = 6) (Median [Q1; Q3]).

Signifikanzen: keine zwischen den beiden Behandlungsgruppen

Die Tiere der Nativtiergruppe weisen keine aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen auf. Die tabellarische und graphische Darstellung der Zahlen der aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen zeigt zwischen den beiden Ischämiegruppen keine signifikanten Unterschiede in der CA1/CA2- und in der CA3/CA4-Region (siehe Abbildung 20, 21). Die Tiere der APC-Gruppe weisen aber in der CA1/CA2-Region weniger aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen auf als die Tiere der Kontrollgruppe (5,8 bzw. 18,2 aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen), hier besteht also eine Tendenz zu einer verminderten Anzahl der positiven Zellen. Die Zahl der apoptotischen Zellen in der CA3/CA4-Region dagegen ist gleich.

4. DISKUSSION

4.1. Diskussion der Ergebnisse

4.1.1. Ergebnisse des Vorversuches

Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen nach drei unterschiedlichen Dosierungsschemata ergab, dass eine einmalige Bolusgabe von 2 mg/kg APC i.v. nur einen kurzfristig hohen Wirkspiegel generiert (Abbildung 8), während die zusätzliche Infusion mit 3 mg/kg/h i.v. nicht in der Lage ist, diesen hohen Wirkspiegel längerfristig aufrecht zu erhalten (Abbildung 9). Hier zeigt sich nach kurzem Anstieg auf über 80 % des Normwertes ein Abfall auf Werte um 35 % mit einer anschließenden Plateauphase. Nach 160 Minuten erfolgt ein zweiter Abfall der Plasmakonzentration. Hier ist von einer biphasischen Halbwertszeit nach APC-Infusion auszugehen, wie sie beim Menschen und beim Meerschweinchen nachgewiesen werden konnte (BERNARD, 2001; BERGER et al., 1991). Dieser Versuch (Gruppe 2; n = 1) diente dazu, eine Dosierung zu finden, die der klinischen Situation des Menschen relativ nahe kommt und darüber hinaus so gering wie möglich und so hoch wie nötig ist. Eine Dosierung, die diesen Anforderungen genügt, konnte mit diesem Versuch nicht identifiziert werden. Die Konsequenz war die Erhöhung der Dosierung der Infusion auf 6 mg/kg/h. Hier konnte man eine Plasmakonzentration von über 100 % des Normwertes über einen Zeitraum von drei Stunden verzeichnen (Abbildung 10). Die Berechnung der Halbwertszeit erfolgte anhand einer Regressionskurve in Annäherung an die Eliminationskurve nach Bolusgabe.

Bisherige Studien über die pharmakokinetischen Daten von APC wurden nur anhand klinischer Untersuchungen am Menschen vorgenommen, während dessen tierexperimentelle Daten der Ratte bisher nicht veröffentlicht wurden. In einer Studie zur Pharmakokinetik beim Meerschweinchen wurde beobachtet, dass eine Minute nach Injektion 85 % und nach acht Minuten bereits nur noch 50 % des APC im Blut zirkulierten (BERGER et al., 1991). Aus diesem Grund und der Tatsache, dass APC in der klinischen Anwendung zur Behandlung der schweren Sepsis mit Multiorganversagen als Infusion von 24 µg/kg/h über 96 Stunden verabreicht wird, war es naheliegend, ein derartiges Infusionsprotokoll als Grundlage für den Nachweis neuroprotektiver Effekte von APC in die Studie aufzunehmen.

4.1.2. Physiologische Parameter

Die vorliegende Studie wurde unter definierten, standardisierten und reproduzierbaren Versuchsbedingungen unter enger Kontrolle der physiologischen Parameter durchgeführt. Vor dem eigentlichen Versuch wird das Körpergewicht aller Tiere dokumentiert. Während der operativen Phase und der fünfstündigen Infusionsphase wurden zu festgelegten Zeitpunkten die verschiedenen Parameter wie rektale Temperatur, T_{peri} , MAP, Herzfrequenz, die arteriellen Blutgase, Hämoglobinkonzentration und Plasmaglukosekonzentration erhoben und dokumentiert. Die Messung und Konstanthaltung dieser Parameter ist notwendig, um Einflüsse auf das Ausmaß des zerebralen Schadens zu verhindern. Ziel ist die Schaffung standardisierter Bedingungen, um vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten.

Körpergewicht

Das Körpergewicht der Tiere der APC-Gruppe ist im Vergleich zur Kontrollgruppe um 0,5 % (ausgehend vom Gewicht vor dem Versuch) am ersten postoperativen Tag vermindert. Am letzten postoperativen Tag zeigen die Tiere der APC-Gruppe eine Gewichtszunahme um 6,6 %, während die Tiere der Kontrollgruppe um 7,8 % zugenommen hatten. Da es sich hier aber um geringe Unterschiede handelt, ist eine Beeinflussung auf die Ergebnisse auszuschließen.

Rektale Temperatur und T_{peri}

Eine alleinige Kontrolle der rektalen Temperatur ist nicht ausreichend, da es in der ischämischen Phase zu einer Abweichung der Gehirntemperatur von der rektalen Temperatur kommen kann (BUSTO et al. 1987). Eine Erhöhung der T_{peri} um 1,2 °C kann bereits das Infarktvolume nach fokaler zerebraler Ischämie um über das Doppelte vergrößern (WARNER et al., 1993), während eine milde oder moderate Hypothermie vor und während der Ischämie den histopathologischen Schaden und neurologische Defizite reduziert (WERNER, 1997). Auch bei globaler zerebraler Ischämie sind neuroprotektive Effekte durch Hypothermie mehrfach beschrieben worden (HOLZER et al., 1997; STERZ et al., 2006).

Die rektale Temperatur und T_{peri} werden zu acht festgelegten Zeitpunkten gemessen und dokumentiert: Baseline (Ausgangswert), Ende der Ischämie, Ende der Reperfusion und stündlich während der Infusionsphase. Um ein Absinken oder Ansteigen der T_{peri} zu

verhindern, wird diese über einen Rückkopplungsmechanismus auf einen physiologischen Wert von 37,0 °C konstant gehalten. In beiden Gruppen wurden während der Ischämie mittlere Werte der T_{peri} von 35,2 °C gemessen (Tabelle 11). Ursachen hierfür sind vermutlich die verminderte Blutzirkulation in der Phase der hämorrhagischen Hypotension, gleichbedeutend mit einer verminderten Wärmezufuhr im Gehirn durch das Abklemmen der Aa. carotides communes. Ein Absinken der T_{peri} wird zusätzlich verstärkt durch die Präparation am Schädel zur Messung der zerebralen Durchblutung. Hier kommt es durch die Freilegung des Schädelknochens zu einer verstärkten Abgabe der Wärme am Kopf. Ein möglicher neuroprotektiver Effekt, der die Wirkung von APC nach zerebraler Ischämie verdeckt, kann hier nicht ausgeschlossen werden. Da aber bei beiden Gruppen dieselbe niedrige intraintrischämische T_{peri} herrschte, ist hier von gleichen Bedingungen auszugehen.

Herzfrequenz

Die Herzfrequenz liegt bei allen Versuchstieren während des gesamten Versuchsablaufs im physiologischen Bereich von 250-450 Schlägen pro Minute (SHARP, The Laboratory Rat, 1998) oder 328 Schläge pro Minute (WAYNFORTH et FLECKNELL, Experimental and Surgical Technique in The Rat, 2. Auflage, 1992) (Tabelle 13) und hat daher keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Sevofluran erniedrigt bekanntermaßen die Herzfrequenz (PATEL et al., 1996; zur Übersicht). Da aber bei allen Tieren eine Anästhesie mit Sevofluran durchgeführt wurde, sind keine Unterschiede und daraus resultierende Einflüsse auf die Ergebnisse zu erwarten.

Blutgasanalyse und Atemgasmessung

Unter physiologischen Bedingungen reduzieren endogene Regulationsmechanismen bei erniedrigten Kohlenstoffdioxidpartialdrücken die Gehirndurchblutung (CBF) durch Vasokonstriktion, während bei erhöhten Werten durch Vasodilatation die Durchblutung verstärkt wird. Dieses Phänomen wird als CO_2 -Reaktivität bezeichnet und ermöglicht dem Gehirn, den Blutfluss in entsprechenden Arealen zu modulieren. Dadurch kann der CBF dem Substratbedarf und dem Abtransport der Metaboliten angepasst werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Steigerung des PaCO_2 um 1 mmHg den Blutfluss um ungefähr 3 % erhöht (MICHENFELDER et THEYE, 1969). Werden hingegen PaCO_2 -Werte von 25-30 mmHg unterschritten, kann die resultierende Vasokonstriktion zu einer ischämischen

Minderversorgung führen. Während der Ischämiephase wird der Blutdruck künstlich abgesenkt und infolge dessen die Gehirndurchblutung dermaßen vermindert, dass von einer Kopplung der Gehirndurchblutungsrate an den CO₂-Wert im Blut nicht mehr ausgegangen werden kann (KÅGSTROM et al., 1983), das heißt, dass bei hypoxisch-ischämischen Zuständen die CO₂-Reaktivität aufgehoben ist, da die Gefäße maximal dilatiert und zu keiner regulativen Vasomotion fähig sind. Bei einer zerebralen Ischämie bedeutet ein Abfall des PaCO₂ also eine weitere Hypoperfusion des Gehirns, während bei fokaler zerebraler Ischämie durch Anstieg des PaCO₂ mit konsekutiver Hyperperfusion die Gefahr eines Steal-Effektes zulasten benachbarter gesunder Gehirnregionen besteht, da im ischämischen Bereich bereits alle Gefäße maximal dilatiert sind (WERNER, 2000).

Der Normwert für den PaCO₂ liegt bei 35–45 mmHg. In der vorliegenden Studie liegen die Werte des Kohlenstoffdioxidpartialdruckes in beiden Gruppen im physiologischen Bereich, lediglich während der Ischämiephase sind tendenziell erniedrigte Werte erhoben worden (Tabelle 14), da es in dieser Phase durch den venösen Blutentzug zu einer verminderten CO₂-Produktion in den Geweben kommt. Darüber hinaus geht die Hypovolämie mit einer schweren Hypotonie durch einen künstlich herbeigeführten Abfall des MAP auf Werte von 40 mmHg einher und führt so zu einer völligen Aufhebung der CO₂-vermittelten Autoregulation. Um einer Hyperventilation mit Hypokapnie vorzubeugen, wird während der Ischämie die Atemfrequenz erniedrigt. Dies gilt für beide Gruppen gleichermaßen, da die CO₂-Reaktivität in der Ischämie nicht wirken und somit keine Beeinflussung der Ergebnisse verursachen kann. Die Ergebnisse der pH-Wertmessung zeigen, dass alle Werte im Normbereich von 7,36 und 7,44 liegen und Verschiebungen im Säure-Basenhaushalt nicht vorlagen.

Plasmaglukosekonzentration

Glukose ist der Hauptenergielieferant für das Gehirn und spielt eine wichtige Rolle bei hypoxisch-ischämischen Zuständen. So wird unter physiologischen Bedingungen, in denen das Gehirn ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird, Glukose zu Energie umgesetzt: aus einem Mol Glukose entstehen 36 Mol ATP. Kommt es aber nun zu einer Unterbrechung oder Verminderung der Sauerstoffzufuhr, steigt der Stoffwechsel auf anaerobe Energiegewinnung um. Hier werden nur noch 2 Mol ATP an Energie und zusätzlich der saure Metabolit Laktat produziert. Durch andauernden Sauerstoffmangel kommt es nun zur vermehrten Bildung von Laktat und einen verlangsamten Abtransport durch verringerte Stoffwechselleistung und somit zur Akkumulation des Stoffwechselproduktes (MEHMET et al., 1998). Ein zu hoher

Glukosespiegel während der Ischämie kann sich nun durch hohe Laktatkonzentration im Gehirn negativ auf das Ausmaß des neurologischen Schadens auswirken (HOFFMANN et al., 1999). Der Zusammenhang zwischen Hyperglykämie und schlechtem neurologischem Ergebnis wurde bereits mehrfach in klinischen Studien beschrieben (ROVLIAS et al., 2004; LONGSTRETH et al, 1984). Darüber hinaus sind auch CBF-abhängige Effekte auf Neuronen durch Hyperglykämie beschrieben worden (PHILLIS, 1999). Es wurde in der Vergangenheit mehrfach erläutert, dass ein Anstieg der Plasmaglukosekonzentration zu einer Vergrößerung des neuronalen Schadens nach zerebraler Ischämie führt (CRONBERG, 2004). Eine in-vitro-Studie postuliert jedoch, dass nicht der Laktatanstieg, sondern eine Hyperglykämie-bedingte Freisetzung von Glukokortikoiden für die Verschlechterung nach Ischämie verantwortlich ist (PAYNE et al., 2001).

Aus den genannten Gründen wurden die Tiere der vorliegenden Studie einer zwölfstündigen Nahrungskarenz unterzogen. Die physiologische Plasmaglukosekonzentration der Ratte liegt bei 80 – 300 mg/dl (SHARP, The Laboratory Rat, 1998). Bei allen Tieren der Studie lagen zu Beginn des Versuches die Plasmaglukosekonzentrationen (Basalwert) im niedrig-normoglykämischen Bereich (Tabelle 15). Während der Ischämie stiegen die Werte geringgradig an, erreichten aber keine hyperglykämischen Konzentrationen. Dies kann auf einen stressinduzierten Effekt bedingt durch die Ischämie beruhen. Zu keinem der Messzeitpunkte konnte zwischen den beiden Gruppen ein auffälliger Unterschied in der Plasmaglukosekonzentration festgestellt werden, so dass hier kein Einfluss auf die Ergebnisse zu erwarten ist.

Hämoglobinkonzentration

Eine Verlaufskontrolle der Hämoglobinwerte ist essentiell, da Blutungskomplikationen – vor allem Haut- und Gastrointestinalblutungen - eine wesentliche Nebenwirkung von APC darstellen. In beiden Gruppen bestehen allerdings keine signifikanten Abweichungen im Hämoglobingehalt (Tabelle 16). Durch den Blutentzug in der Ischämiephase kommt es entsprechend dem Protokoll bei allen Tieren zu einem geringgradigen Abfall des Hämoglobins. Während der Reperfusionphase normalisiert sich der Wert wieder, da hier das vorher entzogene Blut wieder zurück infundiert wird. Drei und fünf Stunden nach Infusionsbeginn sind die Werte ebenfalls geringgradig erniedrigt. Dies kann zum einen durch den mehrfachen Blutentzug zur Kontrolle der Blutgase, Plasmaglukose, Hämoglobingehalt und pH-Wert und zum anderen durch die nach fünf Stunden protokollbedingte Entnahme

zweier Blutproben zur Bestimmung der APC-Konzentration im Plasma und der Plasmaosmolarität mit anschließender Volumensubstitution durch isotone Natriumchloridlösung erklärt werden. Die übrigen Werte befinden sich aber im physiologischen Bereich von 11-19 g/dl (SHARP, The Laboratory Rat, 1998), weshalb auch hier nicht von negativen Einflüssen auf die Aussagekraft der Ergebnisse ausgegangen werden muss.

4.1.3. Messung des zerebralen Blutflusses (CBF)

Der CBF ist vom zerebralen Perfusionsdruck (CPP) und zerebrovaskulären Widerstand (CVR) abhängig und wird analog zum Ohmschen Gesetz ($I = P / R$; I: Stromstärke, U: Spannung, R: Widerstand) als Quotient aus zerebralem Perfusionsdruck und Gefäßwiderstand berechnet:

$$CBF = CPP / CVR$$

Die Höhe des CPP errechnet sich aus dem mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) und dem intrakraniellen Druck (ICP):

$$CPP = MAP - ICP$$

Der CBF ist also direkt abhängig vom zerebralen Perfusionsdruck und vom MAP und wird durch diesen beeinflusst. Dieses Phänomen wird als zerebrovaskuläre Autoregulation bezeichnet.

Hierunter versteht man die Fähigkeit, den zerebralen Blutfluss trotz Änderungen des systemischen arteriellen Blutdruckes innerhalb eines Bereiches konstant zu halten. Außerdem beeinflussen auch arterieller Blutgasdruck und pH-Wert den Mechanismus der zerebrovaskulären Autoregulation. Die zerebralen Arteriolen konstringieren, wenn der systemische MAP steigt, und erweitern sich, wenn er sinkt. Eine Erniedrigung des MAP führt also zur Vasodilatation und eine Erhöhung zur Vasokonstriktion. Der MAP-Bereich, in dem der CBF unter physiologischen Bedingungen konstant gehalten wird, liegt ungefähr zwischen 50 und 150 mmHg. Außerhalb der genannten Grenzen ist die zerebrovaskuläre Autoregulation aufgehoben und die Durchblutung folgt passiv dem Perfusionsdruck. Der zweite Mechanismus der Autoregulation erfolgt über die Blut- und Gewebegase sowie über

die Wasserstoffionenkonzentration. Bei Hypokapnie (Abfall des PaCO₂ im Rahmen einer Hyperventilation) konstringieren die Gefäße und die zerebrale Durchblutung nimmt ab. Steigt der PaCO₂, dilatieren die Arteriolen und der CBF steigt an. Die Autoregulation erlaubt eine sofortige Anpassung des regionalen CBF an sich plötzlich ändernde Anforderungen an Sauerstoff- und Glukosebedarf.

Bedingt durch das Versuchsprotokoll liegt während der ischämischen Phase ein MAP von 40 mmHg vor (Tabelle 17). Der MAP wird beeinflusst vom Grundtonus der Arteriolen und somit von der CO₂-Reaktivität der Gefäße. Mit zunehmender Hypotension nimmt die Fähigkeit des Gehirns, auf Änderungen im PaCO₂ zu reagieren, ab. Aus diesem Grund ist hiervon auch die zerebrale Durchblutung betroffen, die während der Ischämie deutlich erniedrigt ist. Die Veränderung im MAP ist daher eine stetige Einflussvariable auf den CBF. In einem Modell der globalen zerebralen Ischämie mit beidseitiger Okklusion der Aa. carotides communes und zusätzlicher hypobarer Hypotension auf 55 mmHg kam es zu einem Abfall des CBF auf 5 % des Ausgangswertes (DIRNAGL et al., 1993). In der vorliegenden Studie kam es nach Beenden der Okklusion sofort zur spontanen Rezirkulation und Wiedererreichen normobarer Blutdruckwerte.

Nach Ende der Ischämie erfolgte in der vorliegenden Studie ein Anstieg des CBF, da in dieser Phase (Reperfusion) das vorher entnommene Blut reinfundiert wird und es hier infolgedessen zu einem Anstieg des MAP und somit des CPP kommt. Nach dieser Phase der postischämischen Hyperperfusion oder zerebralen Hyperämie kam es zu einem Abfall der Werte, also zu einer Verminderung des CBF (Abbildung 11). Nach einer Stunde lagen die Messwerte bereits wieder im Bereich der Baseline, es kam aber zu keinem Abfall unterhalb der Ausgangswerte (verzögerte postischämische Hypoperfusionsphase), wie dies schon mehrfach in dem Modell der globalen zerebralen Ischämie beschrieben wurde. Der CBF kann hierbei postischämisch auf 65 % der basalen CBF-Werte in der Reperfusionsphase reduziert sein (MACFARLANE et al., 1991). In der vorliegenden Untersuchung lagen die CBF-Werte jedoch im Verlauf über denen des Ausgangsniveaus. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Ausmaß der Unterbrechung der zerebralen Durchblutung zu gering war, um eine postischämische Hypoperfusion zu erzeugen. Eine andere Erklärung ist der angestrebte Wert des intraischämischen MAP. Hier verursacht ein MAP von 50 mmHg große Variabilitäten im hippokampalen Blutfluss gegenüber einem MAP von 30 mmHg (GIONET, 1992). Eine weitere Erniedrigung des MAP während der ischämischen Phase könnte größere Unterschiede im Ausmaß des Schadens ausschalten und so konstante Ergebnisse erzielen, was die Voraussetzung für den Nachweis einer Medikamentenwirkung darstellt.

In einem Modell der fokalen zerebralen Ischämie der Maus bewirkte eine Bolusgabe von 2 mg/kg APC i.v. zehn Minuten nach Insult eine Verbesserung des CBF. Dies wurde erklärt durch die antikoagulatorische Aktivität von APC, welche die ischämischen mikrovaskulären Obstruktionen in Folge von Fibrinablagerung und Neutrophilenakkumulation im Infarktgebiet vermindert und so einen postischämischen Blutfluss auf Ausgangsniveau wieder gewährleisten kann (SHIBATA et al., 2001). Auch eine Bolusgabe von 0,2 mg/kg rekombinanten murinen APC i.v. konnte zehn Minuten nach fokaler zerebraler Ischämie der Maus in der Reperfusionphase den CBF auf 85 % der Basalwerte bei behandelten Tieren verbessern, während bei den Kontrolltieren der CBF nur auf 55 % der Basalwerte anstieg. Hier wird die Verbesserung des CBF ebenfalls mit der Reduzierung thrombotischer Okklusionen in zerebralen Gefäßen erklärt (FERNANDEZ et al., 2003).

Im Gegensatz hierzu konnte in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied in der zerebralen Durchblutung gemessen werden. APC hat somit in der vorliegenden Studie den CBF nicht günstig beeinflusst. Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis könnte sein, dass die Verminderung der zerebralen Durchblutung durch koagulative Prozesse nach Ischämie zu gering war, um sichtbare Effekte durch APC erzielen zu können.

4.1.4. Plasmaosmolarität

Laut Herstellerangaben soll vor der Anwendung von APC (Xigris, Drotrecogin alpha aktiviert) eine Stammlösung von 2 mg/ml hergestellt werden. Dies geschieht durch Auflösen des Pulvers mit der entsprechenden Menge an Aqua ad iniectionem. Im weiteren Vorgehen in der klinischen Anwendung wird nun die Stammlösung mit isotoner Natriumchloridlösung verdünnt und beim septischen Patienten über 96 Stunden infundiert. In der vorliegenden Studie wurde nun lediglich die Stammlösung verwendet, um das Volumen der Infusion so gering wie möglich zu halten und eine Hyperinfusion zu vermeiden.

Eine Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml bedingt nun eine Osmolarität von 615 mosmol/kg (Tabelle 19). Eine erhöhte Osmolarität des Plasmas durch Applikation einer hyperosmolaren Lösung kann eine Verminderung des Hirnwassergehalts in ischämischem Hirngewebe verursachen wie mit der Verwendung von Mannitol an einem fluid-percussion-Modell an der Ratte beobachtet wurde (TODD et al., 2006). Ebenso wird der positive Einfluss von hypertoner Natriumchloridlösung auf den zerebralen Schaden nach fokaler Ischämie durch Flüssigkeitsverschiebungen vom intrazellulären in das intravaskuläre Kompartiment

beschrieben (KEMPSKI, 2005). Hyperosmolarität kann also den zerebralen Schaden und das neurologische Defizit vermindern und ist somit ein potentiell neuroprotektiver Faktor, der ausgeschlossen werden muss. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie eine Stammlösung mit der Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Somit kann ein neuroprotektiver Effekt durch rein osmotische Prozesse ausgeschlossen werden.

4.1.5. Verhaltenstests

Maze Tests (maze = engl. Labyrinth) beinhalten umweltbedingte, optisch-räumliche Aufgaben. So sind zum Beispiel offene Maze Tests gut geeignet, um Lokalisationslernen und Erinnerung zu beurteilen. Es gibt eine Vielzahl von Mazes, die man nach den verschiedenen Kriterien unterscheidet (HODGES, 1996, zur Übersicht): Es gibt unterschiedliche Einrichtungstypen wie den Water Maze oder den Barnes Maze, aber auch hochstrukturierte Gebilde wie der Radial Arm Maze. Die Fragestellungen behandeln meist viso-spatiale, assoziative oder sensorische Fähigkeiten und die Aufgaben reichen von spontaner Erkundung bis hin zu komplexen Sequenzen von Entscheidungen. Motivation der Tiere, die gestellten Aufgaben zu lösen, können z.B. Flucht aus Angst, Suche nach Zufluchtsmöglichkeiten, Neugier oder Erkundungsdrang sein, aber auch die Möglichkeit, Fressen an bestimmten Lokalisationen zu finden.

Der hier angewendete modifizierte Barnes Maze Test untersucht die hippocampusabhängigen Funktionen Lernverhalten, räumliche Koordination und Erinnerungsvermögen. Der ursprünglich beschriebene Barnes Maze Test zur Untersuchung des kognitiven Defizits beinhaltet eine offene Plattform mit 18 zirkulär angeordneten Löchern und einer abgedunkelten Box, die sich unter einem der Löcher befindet (BARNES, 1979). Visuelle Anhaltspunkte dienen der Verbesserung im Erinnerungsvermögen und der räumlichen Orientierung während der Testphase. Der Barnes Maze Test hat Ähnlichkeit mit dem Morris Water Test und dem Radial Arm Maze Test, aber macht sich keine starken aversiven Reize wie Wasser oder gar Deprivation zur Verstärkung der Ergebnisse zunutze. Starke aversive Reize verursachen Stress im Testtier und können die Absolvierung der Aufgabe beeinflussen. Im Gegensatz dazu werden schwache aversive Stimuli appliziert, um die Motivation, der Umgebung des Testfeldes zu entfliehen, zu fördern. Es wurden in der Vergangenheit vielfach unterschiedliche Protokolle und Modifikationen des Barnes Maze Test je nach Fragestellung eingesetzt. In der vorliegenden Studie wurde ein Protokoll angewendet, in dem die Tiere an

den postoperativen Tagen 4, 6, 8 und 10 getestet wurden, wobei am Tag 4 zwei Testdurchläufe hintereinander vorgenommen wurden. Dokumentiert wurde für jeden Durchlauf die Zeit bis zum Auffinden des ersten Loches und die Zeit bis zum Auffinden des Zielloches. Das **Auffinden des ersten Loches** im ersten Testdurchlauf erfolgt nach dem Zufallsprinzip (Abbildung 12). Wie zu erwarten haben die Nativtiere im weiteren Verlauf der Testung das erste Loch immer früher aufgefunden als die Tiere der beiden Ischämiegruppen. Vergleicht man die Ergebnisse der APC- und der Kontrollgruppe mit NaCl-Lösung, fällt auf, dass die APC-Tiere langsamer im Auffinden des ersten Loches wurden. Bei der Zeit bis zum **Auffinden des Zielloches** waren die Nativtiere am schnellsten, haben also wie zu erwarten war, am schnellsten gelernt (Abbildung 13). Die Tiere der APC-Gruppe waren im Lernerfolg langsamer als die Tiere der Kontrollgruppe. Bei Lauf 5 fällt auf, dass die APC-Tiere sich signifikant verschlechtert haben, das heißt das Zielloch langsamer gefunden wurde als in Durchgängen zuvor. Hier stellt sich die Frage, ob diese Verschlechterung im neurologischen Defizit einen Effekt durch das Medikament darstellen könnte oder ob durch eine hohe Abweichung in den Messwerten ein falsch negatives Ergebnis zustande gekommen ist. Eine weitere Testung nach dem 10. postoperativen Tag könnte eine solche Frage in zukünftigen Untersuchungen beantworten. Für eine große Abweichung als Ursache für die Verschlechterung im letzten Lauf könnte sprechen, dass die übrigen Ergebnisse im Verhaltenstest nicht denen des histopathologischen Schadens und des Apoptosemarkers aktivierte Caspase-3 entsprechen. Bekannt ist, dass ein Lerndefizit im modifizierten Barnes Maze Test mit dem Grad des histopathologischen Schadens in der CA1-Region korreliert (MILANI et al., 1997). Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Möglicherweise kann ein Unterschied der beiden Gruppen im Lernverhalten zehn Tage nach Ischämie nicht mehr erkannt werden. Dies würde erklären warum die Tiere der APC-Gruppe sich ab dem 8. postoperativen Tag im Auffinden des Zielloches wieder verschlechterten. Entsprechend ergab eine Studie zum neurologischen Defizit sechs Minuten nach Herzkreislaufstillstand bei der Ratte eine Verbesserung nach APC-Gabe in einem modifizierten Tape Removal Test nach drei, nicht aber nach sieben Tagen (TESCHENDORF et al., 2006). Der Tape Removal Test wurde jedoch in bisherigen Studien im Zusammenhang mit somatosensorischen Dysfunktionen nach fokaler Ischämie angewendet, da hier eine eindeutige Korrelation zwischen Dysfunktion und Lokalisation der Schädigung besteht. Im Modell der fokalen zerebralen Ischämie der Maus konnte eine Bolusgabe von 0,2 mg/kg APC i.v. nach dem Insult eine Verbesserung der motorischen Funktion in einem Motor Neurological Score mit fünf verschiedenen Scores (kein Defizit = 0 Punkte bis Ischämie-

induzierter Tod = 5 Punkte) erzeugen (SHIBATA et al., 2001). Eine Untersuchung auf das kognitive Defizit wurde hier allerdings nicht durchgeführt.

Die Ergebnisse der Verhaltenstests in der vorliegenden Studie zeigen, dass die Tiere der APC-Gruppe im zweiten Lauf am 4. postoperativen Tag schneller im Auffinden des ersten Loches und am 6. Tag schneller im Auffinden des Zielloches waren. Da der neuronale Schaden am dritten Tag nach der Ischämie am ausgeprägtesten ist, kann man in diesem Zeitraum von einer verbesserten kognitiven Leistung bei den APC-Tieren sprechen. Allerdings nimmt diese bis zum zehnten Tag wieder ab, was möglicherweise eine Medikamentenwirkung sein könnte. Die Tatsache, dass die Tiere der Kontrollgruppe im letzten Lauf das Zielloch schneller gefunden haben als die Nativtiere ohne zerebrale Ischämie, könnte bedeuten, dass der Barnes Maze Test nach zehn Tagen keine Aussagen mehr zu Unterschieden im kognitiven Defizit treffen kann.

4.1.6. Quantifizierung des histopathologischen Schadens mit HE-Färbung

Ziel der vorliegenden Studie war es, eine Verringerung des histopathologischen neuronalen Schadens nach zerebraler Ischämie durch APC nachzuweisen. Die Ergebnisse der Nativtiere zeigen erwartungsgemäß eine vollständig intakte Hippokampusformation auf, während die Tiere der beiden Ischämiegruppen in der CA1/CA2-Region 40 % (APC) bzw. 50 % (Kontrolle) weniger Neuronen und in der CA3/CA4-Region 15 % (APC) bzw. 20 % (Kontrolle) weniger Neuronen im Vergleich zur Nativtiergruppe aufwiesen (Tabelle 20). Eine vergleichende Betrachtung innerhalb der beiden Ischämiegruppen zeigt in beiden Regionen keinen signifikanten Unterschied in der Neuronenzahl durch APC-Applikation (Abbildungen 16 und 17). APC beeinflusst demnach den histopathologischen Schaden im Hippokampus nicht.

Die direkte zytoprotektive Wirkung von APC wurde bisher mehrfach in tierexperimentellen Studien mit unterschiedlichsten Fragestellungen nachgewiesen. Es handelt sich nicht um einen zellspezifischen Effekt und schließt viele Zelltypen von neuronaler, endothelialer, epithelialer und mononukleärer Art ein. Außerdem wurden zytoprotektive Wirkungen auch in Ischämie-Reperusionsmodellen verschiedenster Organe nachgewiesen wie an Herz, Gehirn, Rückenmark, Pankreas, Nieren, Gastrointestinaltrakt und Skelettmuskulatur (HIROSE et al. 2000; MIZUTANI et al., 2000; SCHOOTS et al., 2004; SHIBATA et al., 2001). Die neuroprotektive Wirkung von APC im Besonderen wurde in vitro an ischämischen zerebralen

Endothelien des Menschen (CHENG et al., 2003) und kortikalen Neuronen der Maus (GUO et al., 2004), in vivo an einem Modell der Rückenmarkskompression (TAOKA et al., 2000), des perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens der Ratte (YESILIRMAK et al., 2008) und in zwei Studien nach fokaler zerebraler Ischämie der Maus (SHIBATA et al., 2001, FERNANDEZ et al., 2003) nachgewiesen. Diese neuroprotektive Wirkung von APC wird vermutlich über verschiedene Mechanismen vermittelt wie Modulation von zellerhaltenden Signalkaskaden, Erhöhung der Expression von antiapoptotischen Proteinen, die Modulation des intrazellulären Calciummetabolismus, die Verminderung der Stickoxidproduktion und viele andere. Der exakte Mechanismus des zytoprotektiven Effektes ist allerdings bis heute nicht geklärt. Bekannt ist aber, dass der zyto- und neuroprotektive Effekt über einen anderen Rezeptor (PAR-1) als die antikoagulatorische Aktivität vermittelt wird und somit anzunehmen ist, dass diese beiden Mechanismen unabhängig voneinander existieren und funktionieren (CHENG et al., 2003). Um den Effekt von APC in einem Modell der globalen zerebralen Ischämie erforschen zu können, sind weitere Untersuchungen zu Grundlagen über den exakten Wirkungsmechanismus des Medikaments von Nöten.

Eine Erklärung für die fehlende Wirksamkeit von APC könnte das **Ausmaß der Ischämie** darstellen. Möglicherweise produziert eine hämorrhagische Hypotension mit Reduktion des MAP auf 40 mmHg einen weniger konstanten Schaden im Hippokampus innerhalb einer Gruppe und hat so eine größere Variabilität zur Folge. Entsprechend konnte bereits nachgewiesen werden, dass interhemispärische Unterschiede des neuronalen Zellverlusts der CA1-Region bei einem MAP von 50 mmHg in der ischämischen Phase mit 25 % im Vergleich zu 30 bzw. 60 mmHg am größten waren (GIONET et al., 1992). Dies spricht vermutlich dafür, dass eine weitere Erniedrigung des MAP in der ischämischen Phase auf zum Beispiel 30 mmHg in der Lage sein könnte, einen mehr standardisierten konstanten Schaden zu erzielen, um eindeutige Effekte nachzuweisen.

Der **Zeitpunkt** der Tötung der Tiere war relativ spät gewählt mit dem Ziel, nur einen längerfristigen protektiven Effekt nachzuweisen. Bekanntermaßen ist ein Schaden nach globaler zerebraler Ischämie am dritten postischämischen Tag am größten, danach ist hingegen eine weitere Schädigung neuronaler Zellen nicht zu beobachten (SUGAWARA et al., 2002). Häufig kann ein initial positiver Effekt nach kurzer Beobachtungszeit (zwei Tage) nach Langzeitüberleben (14 Tage) nicht mehr beobachtet werden (KAWAGUCHI, 2000). Dies könnte erklären, weshalb im Gegensatz zur vorliegenden Studie in zwei Untersuchungen mit APC an einem Mausmodell der fokalen zerebralen Ischämie nach 24 Stunden neuroprotektive Wirkungen von APC mit Verminderung des Infarktvolumens und des

Hirnödems nachgewiesen werden konnten (FERNANDEZ et al., 2003; SHIBATA et al., 2001). Da hier aber ein längerfristiger neuroprotektiver Effekt von Interesse ist, wurde bewusst der späte Untersuchungszeitpunkt von zehn Tagen gewählt.

In einem Modell der **fokalen zerebralen Ischämie** der Maus wurden neuroprotektive Effekte von APC festgestellt. Untersuchungen nach globaler zerebraler Ischämie wurden bisher jedoch noch nicht veröffentlicht. Es stellt sich die Frage, ob hier andere Mechanismen von APC eine Wirkung verursacht haben, die bei dem Modell in der vorliegenden Studie nicht greifen können. Beispielsweise steht bei fokaler zerebraler Ischämie die Unterbrechung der Mikrozirkulation in engem Zusammenhang mit der topographischen Ausbildung des histopathologischen Schadens, weshalb hier eine Wirkung von APC über das Gefäßsystem nahe liegt. Hier kommt es zur Ausbildung mikrovaskulärer Obstruktionen im ischämischen Kerngebiet (DEL ZOPPO et al., 1991), die durch eine antikoagulatorische Wirkung des APC möglicherweise beseitigt werden können. Nicht nur die Lokalisation der Minderversorgung ist bei der fokalen zerebralen Ischämie entscheidend, sondern auch die Größe des betroffenen Areals und die Kollateralisierung durch nicht geschädigte Gefäße (ASTRUP et al., 1981). Die Zellen in der peripheren Penumbra-Zone um die zentrale ischämische Läsion sind lebensfähig, aber elektrisch inaktiv. Ein Zusammenbruch der Ionengradienten entlang der Zellmembran bleibt bei diesen Zellen aus. Der Funktionsstoffwechsel ist zwar erheblich beeinträchtigt, es entstehen jedoch keine irreversiblen strukturellen Schäden, wenn rechtzeitig eine ausreichende Reperfusion gewährleistet werden kann. In der globalen zerebralen Ischämie hingegen kommt es durch einen sehr raschen Energieverlust der Zellen zu einem Versagen der energieabhängigen Ionenpumpen mit nachfolgender Depolarisation der Zellmembranen und massiver Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren wie z.B. Glutamat oder Aspartat sowie der Aktivierung verschiedener Calcium- und Natrium-Ionenkanäle (PALMER et al., 1985), was zu einem verzögert einsetzenden Zelltod führt und als entscheidender Pathomechanismus nach globaler zerebraler Ischämie angesehen wird (SIESJÖ et al., 1995; zur Übersicht). Möglicherweise basiert die neuroprotektive Wirkung von APC auf einer Verbesserung der Gewebesperfusion durch die Auflösung von mikrovaskulären Obstruktionen in der Endstrombahn, was bei der fokalen zerebralen Ischämie einen Einfluss haben kann, aber bei der globalen zerebralen Ischämie aufgrund eines anderen vorherrschenden Pathomechanismus keine Rolle spielt.

Ein anderer Ansatzpunkt ist die **Dosierung von APC**. Möglicherweise ist für den Nachweis neuroprotektiver Effekte keine dauerhafte Applikation notwendig, da andere Arbeiten bereits mit einer einmaligen Bolusgabe von 2 mg/kg i.v. neuroprotektive Effekte nachgewiesen

haben. In Anbetracht der kurzen Halbwertszeit von 7,3 Minuten ist also scheinbar keine dauerhaft hohe Konzentration von APC im Plasma nach zerebraler Ischämie notwendig. Fraglich bleibt demnach, ob eine kurzzeitig erhöhte Plasmakonzentration nach Bolusgabe von 2 mg/kg i.v. in der Lage wäre, einen ischämischen Schaden in der vorliegenden Studie zu reduzieren oder ob nicht zusätzlich andere Faktoren wie das Schadensmodell selbst (siehe oben) das Wirkungsspektrum von APC einschränken. Darüber hinaus scheint eine Anlehnung der Dosierung und Applikation an die des Menschen zur Behandlung der schweren Sepsis nur bei Nachweis der antikoagulatorischen Wirksamkeit von APC folgerichtig zu sein, nicht aber bei der neuroprotektiven Wirksamkeit. Auch dies spricht für die Unabhängigkeit dieser beiden Wirkmechanismen.

4.1.7. Detektion aktivierte-Caspase-3-positiver Zellen im Hippokampus

Mit dieser Einfachfärbung wird das in Zellen während der Apoptose exprimierte Protein aktivierte Caspase-3 detektiert, da es als Indikator für den programmierten Zelltod gilt (ZHU et al., 2000; NIWA et al., 2001). Analog zur Auswertung des histopathologischen Schadens wird hier das Ausmaß apoptotischer Vorgänge mit der immunhistologischen Färbung gegen aktivierte Caspase-3 quantifiziert. Bei jedem Färbedurchgang wurde der verwendete Antikörper auf seine Spezifität gegenüber aktivierter Caspase-3 getestet. Hierzu wurde jeweils ein Gehirnpräparat eines gesunden Tieres (Nativtier) ohne Induktion einer zerebralen Ischämie mitgefärbt. In gesundem Gewebe sind keine apoptotischen Prozesse zu erwarten. Entsprechend waren hier keine aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen mit Ausnahme eines Präparates zu sehen, was als sporadisch auftretender physiologischer Zelluntergang gedeutet wird. Außerdem wurde zu jedem Färbedurchgang eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt: die Positivkontrolle (Thymusgewebe juveniler Ratten) enthält immer positive Zellen, da in Thymusgewebe täglich etwa 10 % aller Zellen den Zelluntergang durch Apoptose erfahren (UCKER et al., 1994). Die Negativkontrolle (Präparat ohne Primärantikörper) muss dagegen immer negativ ausfallen. Wie zu erwarten waren kaum aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen im Hippokampus der Nativtiere zu finden. Dies entspricht der Beobachtung, dass in nicht geschädigten Nervenzellen physiologischerweise keine Immunreaktivität von aktivierter Caspase-3 nachzuweisen ist (KRAJEWSKA et al., 1997). In ischämischem Nervengewebe hingegen ist in Neuronen der CA1-Region eine erhöhte Immunreaktivität von aktivierter Caspase-3 bereits nach acht Stunden zu

beobachten, die nach 72 Stunden ihren Höhepunkt erreicht (CHEN et al., 1998). Es konnte zwar aktivierte Caspase-3 auch bereits fünf Minuten nach zerebraler Ischämie nachgewiesen werden (NAMURA et al., 1998), doch ist Apoptose ein andauernder dynamischer Prozess, der noch vier Wochen nach zerebraler Schädigung beobachtet werden kann (CHOPP et LI, 1996). So konnten in der vorliegenden Studie aktivierte-Caspase-3-positive Zellen auch zehn Tage nach globaler Ischämie erwartet werden. In einem Modell der fokalen zerebralen Ischämie betrug der Anteil aktivierte-Caspase-3-positiver Zellen 46 Stunden nach MCAO an der Gesamtzahl der Neuronen 5,4 % (LI et al., 1998), während in einem Modell der inkompletten globalen Ischämie lediglich 2,2 % apoptotische Neuronen gesehen wurden (PAPE et al., 2006). Mehrfach wurde bisher die antiapoptotische Wirksamkeit von APC beschrieben: APC verminderte die durch p53-vermittelte Apoptose an hypoxischen humanen zerebralen Endothelzellen (CHENG et al., 2003) und reduzierte die Zahl der aktivierte-Caspase-3-positiven Neuronen durch NMDA-induzierte Apoptose um über 60 % (GUO et al., 2004). Einen derartig signifikanten Effekt von APC nach globaler zerebraler Ischämie konnte in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden. Während in der Literatur die Zahl aktivierte-Caspase-3-positiver Zellen bis zu vier Wochen nach einem ischämischen Insult mit 4 % an der Gesamtzahl der Neuronen angegeben wird (CHOPP et LI, 1996), waren in der vorliegenden Studie die Werte für die CA1/CA2-Region mit 1,1 % in der APC-Gruppe niedriger als mit 4,3 % in der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 21 sowie Abbildungen 20 und 21). Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Zahl apoptotischer Zellen zwischen den beiden Gruppen. Möglicherweise liegt die Ursache in der relativ hohen Streuung in der Zahl apoptotischer Zellen begründet. Parallel zum histopathologischen Schaden, der nekrotischen und apoptotischen Zelluntergang darstellt, aber keine Unterscheidung treffen kann, könnte eine Erniedrigung des MAP auf 35 oder 30 mmHg in der ischämischen Phase des globalen zerebralen Ischämie Modells konstante Werte sowohl im neuronalen Zellschaden als auch in der Aktivierung der Caspase-3 erzielen (GIONET et al., 1992). Darauf basierend könnte eine signifikante Verminderung der Zahl aktivierte-Caspase-3-positiver Zellen nach APC-Gabe und somit eine neuroprotektive Wirkung nachgewiesen werden.

4.2. Diskussion der Methoden

4.2.1. Zerebrales Ischämiemodell

Um einen Einblick in die pathologischen Vorgänge des Gehirns nach zerebraler Ischämie zu gelangen, ist es notwendig, mit reproduzierbaren und kontrollierten in-vivo-Tiermodellen zu arbeiten, da die Pathophysiologie der zerebralen Ischämie ein komplexes Zusammenspiel vieler verschiedener Zellen und Gewebe beinhaltet, die nicht zufriedenstellend in in-vitro-Studien nachgebildet werden können. Tierversuche geben immer wieder Anlass für moralische und ethische Bedenken mit der gleichzeitigen Forderung nach Ersatz durch in-vitro-Modelle. Jedoch ist es nicht möglich, an einzelnen Zellen in Kultur, Gewebeverbänden oder Gewebeschnitten die komplexen und bisher unzureichenden Kenntnisse über die pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen Morphologie und Funktion darzustellen, wie dies beispielsweise bei der Perfusion des Hirngewebes notwendig ist. Aus diesem Grund ist für die Klärung der Fragestellung allein die Untersuchung in einem intakten Organismus das Mittel der Wahl. Ein Vorteil der Tierversuche ist auch, dass intra- und postoperativ Untersuchungen in Hinblick auf Histologie, Pathologie und Veränderungen im Verhalten miterfasst werden können. Außerdem ermöglichen Tierversuche eine hohe Standardisierung und Reproduzierbarkeit durch Kontrolle, Überwachung und Konstanthaltung von Parametern vor, während und nach dem Versuch. Eine solche Reproduzierbarkeit kann durch klinische Studien nicht vermittelt werden, da hier die Variabilitäten in der Art und der Ausprägung der Ischämie zu groß sind. Diese Problematik macht präzise Studien, die vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse generieren, praktisch unmöglich. Davon abgesehen ist die Beantwortung der Fragestellung in klinischen Untersuchungen am Menschen auch aus ethischen Gründen nicht durchführbar, da sich die Erforschung bestimmter medizinischer Fragestellungen und neuer therapeutischer Ansätze primär am Menschen grundsätzlich verbietet.

In Tierversuchen zur zerebralen Ischämie kommen neben Nagern die verschiedensten Tierarten zum Einsatz (Katzen, Hunde, Schweine, Schafe, Affen). Der Vorteil in der Verwendung von größeren Tieren ist die bessere Darstellung von modernen bildgebenden Verfahren, aber auch die erleichterte Kontrolle des physiologischen Monitorings. Sehr viele Messungen und Untersuchungen können gleichzeitig an ein und demselben Tier vorgenommen werden. Allerdings tritt bei Ischämie modellen an größeren Tieren meist eine

sehr hohe Variabilität in der Ischämieausprägung und physiologischen Parametern auf, was eine Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einschränkt (TRAYSTMAN, 2003, zur Übersicht). Letztendlich verursachen größere Versuchstiere auch einen größeren Kosten- und Arbeitsaufwand, was vor allem das Handling und die postoperative Kontrolle betrifft.

Die Verwendung von kleinen Labortieren, vor allem von Nagern, steht hier klar im Vorteil. Nagetiere sind weniger kostenintensiv in Anschaffung und Unterbringung und sind darüber hinaus einfacher zu handhaben. Sie sind gut verfügbar, leicht zu halten und während des Versuchs ergibt sich durch ihr wesentlich geringeres Gewicht auch ein geringerer Medikamentenbedarf. Eine rasche Generationsfolge ermöglicht Inzuchtlinien, die eine hohe genetische Homogenität repräsentieren und die durch Produktion genetischer Modifikationen (knock-out-Mäuse) die Beantwortung vieler wissenschaftlicher Fragestellungen erleichtern. Die geringere Größe der Nager ermöglicht eine Vereinfachung der Probengewinnung, -verarbeitung und späteren Lagerung von Untersuchungsmaterialien, da die Proben entsprechend kleiner sind und weniger Aufwand bereiten. Kleinere Versuchstiere stellen so eine kostengünstige Alternative im Vergleich zu größeren Säugetieren dar. Entscheidend ist aber auch die Ähnlichkeit des zerebrovaskulären Systems der Nager gegenüber höher entwickelten Tieren. Letztendlich stoßen Tierversuche an Ratten und Mäusen in der Bevölkerung auf mehr Akzeptanz als Versuche an größeren Tieren (GINSBERG et BUSTO, 1989).

Für die Induktion einer zerebralen Ischämie stehen je nach Fragestellung verschiedenste Modelle zur Verfügung, die je nach Art, Manifestation und Schweregrad unterschiedliche Schadensgrößen im Gehirn hervorrufen können.

Im vorliegenden Versuch wurde das Modell der bilateralen Okklusion der beiden Aa. carotides communes mit anschließender Reperfusion unter Sevofluran-Narkose vorgenommen. Für die Induktion der beidseitigen Vorderhirnischämie werden für 14 Minuten die beiden Aa. carotides communes mit Clips verschlossen und es wird gleichzeitig über venösen Blutentzug der MAP auf 40 mmHg gesenkt. Dieses Modell verursacht gezielt einen neuronalen Schaden in der selektiv vulnerablen CA1- und CA3-Region der Hippokampusformation (PULSINELLI et al., 1982). Ziel der Studie war es, das neuroprotektive Potential eines Medikamentes nach zerebraler Ischämie zu untersuchen.

Bei der Wahl der Hintergrundanästhesie stehen mehrere Faktoren im Vordergrund. Zum einen ist es entscheidend, ein Narkoseverfahren zu wählen, das einen geringen Einfluss auf die

zerebrale Ischämie nimmt, aber andererseits das Tier optimal deafferenziert. Sevofluran sowie andere Anästhetika wie Desfluran und Isofluran zeigen neuroprotektive Effekte nach globaler und zerebraler Ischämie (PAPE et al., 2006; WERNER et al., 1995; ENGELHARD et al., 1999; SAKAI et al., 2007). Da aber Sevofluran gegenüber anderen Inhalationsanästhetika am geringsten vasoaktiv wirkt, den CBF vermindert und somit den intrakraniellen Druck nicht erhöht, findet es vermehrt Anwendung bei neurochirurgischen Eingriffen. Um diese Anforderungen zu erfüllen und der klinischen Situation möglichst nahe zu kommen, wurde hier bei beiden Untersuchungsgruppen eine Inhalationsanästhesie mit 1,5 Vol% Sevofluran in einem Sauerstoff-Luftgemisch ($FiO_2 = 0,33$) gewählt, die mit Sufentanil 2,5 bis 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ i.v. supplementiert wurde. Da dies den Einfluss der Anästhesie auf einen neuronalen Schaden so gering wie möglich hält und beide Gruppen dieselbe Dosierung erhalten haben, ist in der vorliegenden Studie von einem Einfluss auf die Ergebnisse durch die Anästhesie nicht auszugehen.

4.2.2. Messung des zerebralen Blutflusses

Die Laser-Doppler-Technik wurde erstmals 1975 zur Messung der Blutflussgeschwindigkeit im Gewebe angewendet und gewährleistet eine augenblickliche, kontinuierliche und noninvasive Messung des mikrozirkulatorischen Blutflusses von Geweben (STERN, 1975; OBERG et al., 1984, zur Übersicht). Basierend auf dieser Methode wurde die Laser-Doppler-Flussmessung später an einem Modell der fokalen zerebralen Ischämie der Ratte validiert (DIRNAGL et al., 1989). Eine aufwändige Erweiterung der Messung des CBF ist die Laser-Doppler-Scanning-Methode. Diese erlaubt die Aufzeichnung von bis zu 100 kortikalen Messpunkte und ermöglicht so die Erfassung kleinster Schwankungen im lokalen CBF, die zum Beispiel in der Penumbra-Zone nach fokaler zerebraler Ischämie auftreten (HEIMANN et al., 1994; KEMPSKI et al., 1995).

In der vorliegenden Studie wurde der CBF kontinuierlich mit zwei Laser-Doppler-Sonden aufgezeichnet. Hierbei wurde darauf geachtet, die Sonden nicht direkt über größeren Gefäßen zu positionieren, um lediglich die Blutflussveränderungen im Bereich der Mikrozirkulation zu erfassen. Die Lokalisation der Sonde wurde so gewählt, dass ein Blutfluss von mindestens 250, maximal 350 PU gemessen wurde. Nachteil dieser Methode ist, dass die lokale Mikrozirkulation nur in einem Gewebewolumen von 1 mm^3 erfasst wird, so dass eine Neupositionierung der Sonden während des Experiments die Messergebnisse erheblich

verfälschen würde. Aus diesem Grund wurden alle Tiere in einem stereotaktischen Rahmen positionsstabil fixiert. Verfälschungen durch externes Licht, beispielsweise durch die Wärmelampe, wurden durch Abdeckung der Sonden mit speziell zurechtgeschnittenen lichtundurchlässigen Folien verhindert.

In Anbetracht dieser Maßnahmen kann ein externer Einfluss auf die Ergebnisse ausgeschlossen und von validen Messungen ausgegangen werden.

4.2.3. Quantifizierung des histopathologischen Schadens mit HE-Färbung

Die HE-Färbung stellt in der Histologie und Histopathologie eine Standarduntersuchung zur Analyse der Morphologie von Geweben und Zellen dar. Sie ist preiswert, schnell (Dauer des Färbeprotokolls etwa eine Stunde) und unkompliziert in der Durchführung.

Der Einsatz der HE-Färbung dient in Studien zur zerebralen Ischämie vor allem der Untersuchung der neuronalen Schädigung. Findet in Geweben ein ischämischer Insult statt, kommt es durch das Erliegen der Stoffwechselfvorgänge und Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr zur anaeroben Glykolyse und somit zur Akkumulation von Laktat. Diese Anhäufung saurer Stoffwechselprodukte führt nun zu einer Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich. Die Zelle wird nun durch das Eosin rot angefärbt, nicht geschädigte Zellen hingegen werden blau angefärbt.

Die Färbung eines solchen Gewebes ermöglicht die Unterscheidung zwischen intakten und geschädigten Zellen. Nicht in ihrem Stoffwechsel beeinträchtigte Zellen färben sich demnach bläulich, geschädigte Zellen dagegen rot. Wichtig ist an dieser Stelle, dass mit der HE-Färbung eine Unterscheidung zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen nicht getroffen werden kann. Um nun apoptotische Neuronen eingrenzen zu können, ist die Darstellung mit anderen Färbeverfahren (z.B. aktivierte-Caspase-3-Färbung) notwendig, wobei der Goldstandard zur Erfassung der Morphologie apoptotischer Zellen die Elektronenmikroskopie darstellt (SLOOP et al., 1999; OHNO et al., 1998).

Die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin erlaubt nun eine Einteilung der Zellen in stoffwechselintakt oder –geschädigt, aber auch die Beurteilung deren Lokalisation im Gewebeverband (CA1-CA4-Region, Gyrus dentatus, Cortex). In Abhängigkeit davon kann man auch Aussagen über Schweregrad und Ausmaß des ischämischen Insultes (Auflockerung des Gewebes, Infiltration von Leukozyten) treffen.

Es existieren nun zwei Möglichkeiten, den histopathologischen Schaden in der HE-Färbung zu quantifizieren: durch Auszählung der intakten, vitalen Neuronen oder durch Auszählung der geschädigten, pyknotischen Neuronen. Das Erfassen der Zahl aller vitalen Neuronen hat den Vorteil, dass diese sich eindeutiger darstellen und sicherer auszuzählen sind als geschädigte, pyknotische Zellen. Davon abgesehen kann nie die Gesamtzahl der geschädigten Zellen erfasst werden, da es sich um einen dynamischen Prozess handelt, Neuronen bereits abgeräumt sein können und einer Zählung so nicht mehr zur Verfügung stehen. Der histopathologische Schaden ist am dritten Tag nach globaler zerebraler Ischämie am größten (SUGAWARA et al., 2002) und aus diesem Grund ist bei einem Untersuchungszeitraum von zehn Tagen davon auszugehen, dass ein Großteil der Neuronen bereits zugrundegegangen ist und hier nur ein Bruchteil geschädigter Zellen erfasst werden könnte.

4.2.4. Immunhistochemische Detektion des Apoptosemarkers aktivierte Caspase-3

Der immunhistochemische Antigennachweis aktivierter Caspase-3 dient dazu, das während der Apoptose in der Zelle exprimierte Protein mit einem Antikörper zu markieren und nachzuweisen und stellt daher eine sichere Methode für die selektive Detektion apoptotischer Zellen dar.

Aktivierte Caspase-3 ist bereits wenige Stunden nach zerebraler Ischämie nachweisbar (BENCHOUA et al., 2001) und zeigt nach drei Tagen ein Maximum (CHEN et al., 1998). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass eine Aktivität von Caspase-3 auch 14 Tage (XU et al., 2005) und sogar vier Wochen (CHOPP et LI, 1996) nach zerebraler Ischämie noch vorhanden ist. Da es sich bei dem apoptotischen Zelltod um einen anhaltenden dynamischen Prozess handelt, liefert der Nachweis der aktivierten Caspase-3 nur einen zeitlichen Ausschnitt aus dem Gesamtbild des apoptotischen Prozesses. Aus diesem Grund ist es möglich, auch zehn Tage nach zerebraler Ischämie die Aktivierung der Caspase in apoptotischen Zellen nachzuweisen.

Apoptotische Prozesse nach globaler zerebraler Ischämie erfassen nicht nur Neuronen, sondern auch andere Zellen wie Astrozyten, Oligodendrozyten oder Mikroglia-Zellen, aber auch Leukozyten und Endothelzellen. Die Expression aktivierter Caspase-3 tritt in allen apoptotischen Zellen auf und besitzt keine Spezifität für Neuronen. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass bei einer immunhistochemischen Antigen-detektion alle apoptotischen Zellen miterfasst werden. Um die Art der apoptotischen Zellen nun eingrenzen zu können,

könnte im Weiteren nun eine Doppelmarkierung der Zellen mit einem spezifischen Neuronenmarker wie Neuronen-spezifischem nukleären Protein (NeuN) vorgenommen werden (DAVOLI et al., 2002). NeuN stellt sich als nukleäres Strukturprotein dar, das im Zellkern lokalisiert ist und nur in postmitotischen Neuronen zu finden ist (MULLEN et al., 1992). Mittlerweile wurde aber nun über den Verlust der Immunoreaktivität von NeuN nach zerebraler Ischämie diskutiert (UNAL-CEVIK et al., 2004). Ein anderer Punkt ist die Überlebensdauer der Tiere und der Untersuchungszeitpunkt der Gehirnproben. Es stellt sich die Frage, ob zehn Tage nach zerebraler Ischämie das neuronale Strukturprotein NeuN in apoptotischen Zellen zum Zeitpunkt der Färbung nicht bereits so weit abgebaut ist, dass es von Antikörpern nicht mehr detektiert werden kann und eine Identifikation der Zelle als Neuron überhaupt noch möglich ist. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie keine Doppelfärbung durchgeführt.

Eine Alternative zur aktivierte-Caspase-3-Färbung stellt die TUNEL-Färbung (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) dar. Die Spezifität von TUNEL wird allerdings mittlerweile kontrovers diskutiert, da hier nicht nur apoptotische Prozesse miterfasst werden, sondern auch eine Schädigung und Fragmentierung der DNA im Allgemeinen. DNA-Strangbrüche entstehen auch bei nekrotischem Zelltod, bei Autolyse und bei Gewebefixierung und -bearbeitung, weshalb TUNEL nicht mehr als spezifischer Marker für Apoptose angesehen werden kann. Beobachtungen nach fokaler zerebraler Ischämie ergaben, dass eine Doppelfärbung von aktivierter Caspase-3 und TUNEL nur wenige Übereinstimmungen im zeitlichen Verlauf ergab, da die Aktivierung der Caspase-3 der DNA-Fragmentierung vorausgeht (DAVOLI et al., 2002).

Die Färbedurchgänge sowie die Auswertung am Mikroskop werden nach standardisierten Bedingungen immer nach demselben Protokoll und von derselben, verblindeten Person durchgeführt, um Fehlerquellen zu vermeiden.

4.3. Abschlussbetrachtung

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen zusammenfassend, dass APC nach globaler zerebraler Ischämie der Ratte keine Verbesserung des CBF und des neurologischen Defizits bewirkt und auch die Verminderung des histopathologischen Schadens und das Auftreten apoptotischer Prozesse nach zehn Tagen nicht günstig beeinflussen kann. Diese Schlussfolgerungen beruhen auf den Ergebnissen der Auswertungen der intraoperativen Messung des CBF, des Barnes Maze Test sowie der HE- und der immunhistochemischen Färbung der Gewebeproben. Ein signifikant neuroprotektives Potential von APC konnte dementsprechend nicht nachgewiesen werden.

Die möglichen Ursachen hierfür sind vielfältig. Ein heterogenes Schadensausmaß innerhalb der Gruppen könnte eine Reduktion des histopathologischen Schadens durch APC maskieren. Es besteht auch die Möglichkeit, dass im Modell der globalen zerebralen Ischämie ein neuroprotektiver Effekt von APC nicht zum Tragen kommt, da die hier vorliegenden Pathomechanismen nicht den Angriffspunkten von APC entsprechen und von einer potentiellen neuroprotektiven Wirkung unbeeinflusst bleiben. Der gewählte Tötungszeitpunkt zehn Tage nach globaler zerebraler Ischämie könnte zu spät und ein Effekt durch APC bereits wieder am Abklingen gewesen sein. Möglicherweise hat die gewählte Dosierung von APC in der vorliegenden Studie keinen Einfluss auf den histopathologischen Schaden gezeigt. Die Tatsache, dass mit der gewählten Dosierung in Anlehnung an die Sepsisbehandlung des Menschen kein Effekt nachgewiesen werden konnte, unterstützt die Theorie, dass die neuroprotektive Wirkung von APC unabhängig von der antikoagulatorischen Aktivität auftritt und hier ein anderer Mechanismus zugrunde liegt.

Trotz intensiver Erforschung des neuroprotektiven Potentials von APC sind die genauen Mechanismen immer noch weitgehend unbekannt. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, um genauere Kenntnisse über die Wirkweise von APC nach zerebraler Ischämie zu erlangen, bevor es Einzug in die klinische Forschung zur Erprobung des therapeutischen Nutzens erhält.

5. ZUSAMMENFASSUNG:

Der Effekt von aktiviertem Protein C (APC) auf den neuronalen Schaden zehn Tage nach Vorderhirnischämie der Ratte

Die hier vorliegende Studie befasst sich mit den pharmakokinetischen Eigenschaften von APC bei der Ratte und der neuroprotektiven Wirkung auf den neuronalen Schaden zehn Tage nach Vorderhirnischämie.

Zu diesem Zweck wurden in einem Vorversuch sieben männliche Sprague Dawley-Ratten (400 ± 16 g) in drei Gruppen randomisiert: Gruppe 1 mit Bolusgabe von APC 2 mg/kg i.v. ($n = 4$), Gruppe 2 mit Bolusgabe 2 mg/kg i.v. und Infusion 3 mg/kg/h ($n = 1$) und Gruppe 3 mit Bolusgabe 2 mg/kg i.v. und Infusion 6 mg/kg/h ($n = 2$) über drei Stunden.

Die Tiere wurden anästhesiert, intubiert und mit 3-3,5 Vol% Sevofluran in einem Sauerstoff-Luftgemisch ($FiO_2 = 0,33$) beatmet. Zur Überwachung des mittleren arteriellen Blutdrucks und zur Blutentnahme wurden die rechte Arteria und Vena femoralis sowie die Vena jugularis zur Medikamentenapplikation katheterisiert. Zur Kontrolle der rektalen und perikraniellen Temperatur wurden Sonden angebracht. Nach der Applikation von APC wurden zu festgelegten Zeitpunkten den Tieren Blutproben entnommen, um die Konzentration von APC im Plasma zu bestimmen.

Zur Beantwortung der Hauptfragestellung wurden 26 männliche Sprague Dawley-Ratten (320 ± 15 g) in eine der drei Gruppen randomisiert: APC-Gruppe ($n = 10$) mit Bolusgabe 2 mg/kg i.v. und Infusion 6 mg/kg/h über fünf Stunden, die Kontrollgruppe ($n = 10$) mit der äquivalenten Menge an Natriumchloridlösung und eine Nativtiergruppe ($n = 6$) mit Tieren ohne chirurgische Präparation und Induktion einer zerebralen Ischämie. Bei den Tieren der APC- und der Kontrollgruppe erfolgte die Einleitung der Anästhesie, Intubation, Beatmung und Präparation dem Vorversuch entsprechend, zusätzlich wurde ein zweiter Katheter in die Vena jugularis eingeführt, um die Inhalationsanästhesie mit Sufentanil (2,5-5 μ g/kg/h i.v.) zu ergänzen. Außerdem wurden beide Arteriae carotides communes präpariert und mit Gefäßligaturen umschlungen. Um die zerebrale Durchblutung zu messen, wurden nach Präparation des Schädels Laser-Doppler-Sonden positioniert. Nach Adjustierung der Sevoflurankonzentration auf 1,5 Vol% und nachfolgender Äquilibrierungsphase erfolgte die Ischämieinduktion durch temporären Verschluss der beiden Arteriae carotides communes für 14 Minuten mit zusätzlicher hämorrhagischer Hypotension auf einen mittleren arteriellen Blutdruck von 40 mmHg. Nach der ischämischen Phase wurde den Tieren der beiden

Ischämiegruppen APC oder die Kontrolllösung als Bolus mit zusätzlicher Infusion über fünf Stunden appliziert. An den postoperativen Tagen 4, 6, 8 und 10 wurde das neurologische Defizit der Tiere im Barnes Maze Test untersucht und diese zehn Tage nach der Ischämie in tiefer Narkose mit Sevofluran dekapitiert. Die Gehirne wurden entnommen, bei -80 °C eingefroren und daraufhin 7 µm dicke Gefrierschnitte von diesen angefertigt. Die Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung diente zur Bestimmung der absoluten Zahl basophil angefärbter Neuronen in der Hippokampusformation und somit der Quantifizierung des neuronalen Schadens. Mit der immunhistochemischen Detektion aktivierter Caspase-3 in den Zellen konnten apoptotischer Prozesse in dieser Hirnregion bestimmt werden.

Im Vorversuch ergab die Bestimmung der Plasmakonzentration nach alleiniger Bolusgabe eine errechnete Plasmahalbwertszeit von 7,3 Minuten, während die Infusion mit 3 mg/kg/h einen Plasmaspiegel von 35 % und die Infusion von 6 mg/kg/h über 149 % des Normwertes erreichte. Aus diesem Grund wurde die Bolusapplikation von 2 mg/kg APC i.v. mit anschließender Infusion von 6 mg/kg/h über fünf Stunden als das Dosierungsschema der Wahl identifiziert.

Im Hauptversuch ergab die intraoperative Messung der zerebralen Durchblutung zu keinem der Messzeitpunkte einen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Im Barnes Maze Test zeigte sich zu den Testzeitpunkten kein signifikanter Unterschied im Lernverhalten. Die Ergebnisse der HE-Färbung zeigten keinen Unterschied zwischen der APC-Gruppe und den Tieren der Kontrollgruppe, während die Tiere der Nativtiergruppe erwartungsgemäß die höchste Anzahl vitaler Zellen aufwiesen. Die Anzahl apoptoseverdächtiger Zellen war ebenfalls nicht durch die APC-Gabe beeinflusst. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass APC in dem Modell der Vorderhirnischämie der Ratte mit dem verwendeten Dosierungsschema keinen Einfluss auf den neuronalen Schaden hat. Weitere Untersuchungen in Hinblick auf Dosierung und Beobachtungszeitraum sind notwendig, um Kenntnisse über den Wirkmechanismus von APC zu erreichen und erfolgreiche Therapiekonzepte zur Behandlung der zerebralen Ischämie und ihrer Folgeerscheinungen entwickeln zu können.

6. SUMMARY

The effect of activated protein C (APC) on neuronal damage ten days after forebrain ischemia in rats

The present study investigates the pharmacokinetic characteristics and the neuroprotective potential of APC on neuronal damage ten days after forebrain ischemia in rats.

Firstly, seven Sprague Dawley rats (400 ± 16 g) were randomly assigned to one of three study-groups: group 1 with bolus application of 2 mg/kg APC i.v. ($n = 4$), group 2 with additional infusion of 3 mg/kg/h i.v. and group 3 with infusion of 6 mg/kg/h i.v. for three hours. Animals were anesthetized, tracheally intubated and ventilated with 3-3.5 Vol% sevoflurane in oxygen and air ($FiO_2 = 0.33$). Catheters were inserted into the right femoral artery and vein for arterial blood pressure control and blood withdrawal. The left jugular vein was catheterized for drug administration. Blood gases, rectal and pericranial temperature were maintained constant. After application of APC blood samples were taken and plasma levels of APC were measured.

To investigate neuroprotective effects of APC 26 Sprague Dawley rats (320 ± 15 g) were randomly assigned to one of three study-groups before starting surgery: animals receiving a bolus application of APC (2 mg/kg i.v.) followed by infusion (6 mg/kg/h) over five hours ($n = 10$), control animals receiving equivalent saline bolus and infusion ($n = 10$) and naïve animals without any surgery ($n = 6$). Animals of the first and second group received anesthesia and preparation as described above. Additionally, a second catheter was inserted into the right jugular vein to administer sufentanil at a dose range of 2.5-5 μ g/kg/h. The left and right carotid artery was prepared with ligatures for later clamping. Cerebral blood flow was monitored using laser Doppler flowmetry during the study after skull preparation. After reduction of the concentration of sevoflurane (1.5 Vol%) forebrain ischemia was induced by occlusion of both common carotid arteries for 14 minutes and hemorrhagic hypotension to a mean arterial blood pressure of 40 mmHg. After the ischemic period animals received bolus and infusion administration of either APC or saline for five hours. On postoperative days 4, 6, 8 and 10 neurologic deficits were investigated using the Barnes Maze test. After ten days of observation animals were deeply anesthetized with sevoflurane and decapitated. Brains were immediately removed, frozen and stored at -80 °C and were later cut into frozen sections of 7 μ m thickness. Hematoxylin-eosin-staining was used to quantify histopathological damage by counting all vital neurons in the hippocampus formation. To detect markers of apoptosis

SUMMARY

(activated caspase-3) slices were stained immunohistochemically and all positive cells were counted in the same region.

Plasma levels of APC after bolus application revealed a calculated half-life of 7.3 minutes. Administration of 3 mg/kg/h i.v. showed plasma levels of 35 % and infusion of 6 mg/kg/h i.v. showed plasma levels of more than 149 % of normal values. Therefore, an infusion regime of 2 mg/kg i.v. bolus application followed by 6 mg/kg/h continuous infusion for five hours was chosen for the second study.

In the second study measurement of cerebral blood flow showed no difference between both groups at any time points. Investigating neurologic deficits in the Barnes Maze there was no amelioration seen in learning behaviour and spatial memory by APC. The results of histopathological damage showed no reduction in the number of vital neurons in CA1/CA2- and CA3/CA4-region of animals treated with APC. Immunohistochemistry revealed no significant influence of APC on apoptotic cell death.

In conclusion, administration of 6 mg/kg/h i.v. of APC for five hours exerts no effect on neuronal damage after ten days in this model of forebrain ischemia. More investigation will be required to gain more extensive knowledge about APC's mechanisms and to find new targets of treatment of cerebral ischemia and its consequences.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Alnemri ES.

Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases.

J Cell Biochem. 1997 Jan;64(1):33-42

Arrowsmith JE, Grocott HP, Reves JG, Newman MF.

Central nervous system complications of cardiac surgery.

Br J Anaesth. 2000 Mar;84(3):378-93. Comment in: Br J Anaesth. 2000 Mar;84(3):304-7

Barnes CA.

Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat.

J Comp Physiol Psychol. 1979 Feb;93(1):74-104

Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD.

Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model.

Stroke. 1996 Sep;27(9):1616-22; discussion 1623

Benchoua A, Guégan C, Couriaud C, Hosseini H, Sampaio N, Morin D, Onténiente B.

Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction.

J Neurosci. 2001 Sep 15;21(18):7127-34

Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer N.

Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis.

J. Neurochem. 43:1369–1374, 1984

Berger H Jr, Kirstein CG, Orthner CL.

Pharmacokinetics of activated protein C in guinea pigs.

Blood. 1991 May 15;77(10):2174-84

Bergeron M.

Inducing photochemical cortical lesions in rat brain.

Curr Protoc Neurosci. 2003 Jul;Chapter 9:Unit 9.16.

Berkowitz ID, Gervais H, Schleien CL, Koehler RC, Dean JM, Traystman RJ.

Epinephrine dosage effects on cerebral and myocardial blood flow in an infant swine model of cardiopulmonary resuscitation.

Anesthesiology 1991; 75:1041-1050

Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr; Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group.

Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis.

N Engl J Med. 2001 Mar 8;344(10):699-709

Bernard GR, Ely EW, Wright TJ, Fraiz J, Stasek JE Jr, Russell JA, Mayers I, Rosenfeld BA, Morris PE, Yan SB, Helterbrand JD.

Safety and dose relationship of recombinant human activated protein C for coagulopathy in severe sepsis.

Crit Care Med. 2001 Nov;29(11):2051-9

Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, Smith K.

Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia.

N Engl J Med. 2002 Feb 21;346(8):557-63

Bickler PE

Energetics of cerebral metabolism and ion transport.

Anaesth Clin North Am 10 (1992) 563-573

Böttiger BW, Grabner C, Bauer H, Bode C, Weber T, Motsch J, Martin E.

Long term outcome after out-of-hospital cardiac arrest with physician staffed emergency medical services: the Utstein style applied to a mid-sized urban/suburban area.

Heart. 1999 Dec;82(6):674-9

Brambrink AM, Kopacz L, Astheimer A, Noga H, Heimann A, Kempinski O.

Control of brain temperature during experimental global ischemia in rats.

J Neurosci Methods. 1999 Oct 15;92(1-2):111-22

Bredesen DE

Apoptosis: overview and signal transduction pathways.

J Neurotrauma 2000; 17: 801-810

Brueckmann M, Hoffmann U, De Rossi L, Weiler HM, Liebe V, Lang S, Kaden JJ, Borggreffe M, Haase KK, Huhle G.

Activated protein C inhibits the release of macrophage inflammatory protein-1-alpha from THP-1 cells and from human monocytes.

Cytokine. 2004 May 7;26(3):106-13

Budd SL, Nicholls DG

Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate toxicity in cultured cerebellar granule cells.

J. Neurochem. 67: 2282-2291, 1996

Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdés I, Scheinberg P, Ginsberg MD.

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

J Cereb Blood Flow Metab. 1987 Dec;7(6):729-38

Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD.

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

Stroke. 1986 Jul-Aug;17(4):738-43

Chen J, Zhu RL, Nakayama M, Kawaguchi K, Jin K, Stetler RA, Simon RP, Graham SH.

Expression of the apoptosis-effector gene, Bax, is up-regulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia.

J Neurochem. 1996 Jul;67(1):64-71

Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP.

Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia.

J Neurosci. 1998 Jul 1;18(13):4914-28

Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernández JA, Castellino F, Rosen ED, Fukudome K, Zlokovic BV.

Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective.

Nat Med. 2003 Mar;9(3):338-42. Epub 2003 Feb 3

Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, Visintin I, Flavell RA, Janeway CA Jr, Matis LA.

The role of Fas in autoimmune diabetes.

Cell. 1997 Apr 4;89(1):17-24

Chopp M, Li Y

Apoptosis in focal cerebral ischemia.

Acta Neurochir 1996; 66:21-26

Clark WM, Lauten JD, Lessov N, Woodward W, Coull BM.

Time course of ICAM-1 expression and leukocyte subset infiltration in rat forebrain ischemia.

Mol Chem Neuropathol. 1995 Dec;26(3):213-30

Crockard A, Iannotti F, Hunstock AT, Smith RD, Harris RJ, Symon L.

Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in the gerbil.

Stroke. 1980 Sep-Oct;11(5):494-8

Cronberg T, Rytter A, Asztely F, Soder A, Wieloch T. Glucose but not

Lactate in combination with acidosis aggravates ischemic neuronal death in vitro.

Stroke. 2004;35:753-757

Davoli MA, Fourtounis J, Tam J, Xanthoudakis S, Nicholson D, Robertson GS, Ng GY, Xu D.

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

Neuroscience. 2002;115(1):125-36

Del Zoppo GJ, Schmid-Schönbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang C-M

Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons.

Stroke 1991;22:1276-1284

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 1989 Oct;9(5):589-96

Dirnagl U, Thorén P, Villringer A, Sixt G, Them A, Einhüpl KM.

Global forebrain ischaemia in the rat: controlled reduction of cerebral blood flow by hypobaric hypotension and two-vessel occlusion.

Neurol Res. 1993 Apr;15(2):128-30

Dittmar, M. S., B. Vatankhah, N. P. Fehm, G. Schuierer, U. Bogdahn, M. Horn, F. Schlachetzki

Fischer-344 rats are unsuitable for the MCAO filament model due to their cerebrovascular anatomy

J Neurosci Methods (2006) doi:10.1016/j.jneumeth.2006.02.003

Drysdale EE, Grubb NR, Fox KA, O'Carroll RE.

Chronicity of memory impairment in long-term out-of-hospital cardiac arrest survivors.

Resuscitation. 2000 Sep;47(1):27-32

Eguchi Y., Shimizu S. und Tsujimoto Y.

Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis

Cancer Res 1997; 57; S. 1835-40

Eklöf B, Siesjö BK.

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

Acta Physiol Scand. 1972 Oct;86(2):155-65

Eldadah BA, Faden AI.

Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury.

J Neurotrauma. 2000 Oct;17(10):811-29

Endoh M, Maiese K, Wagner J.

Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia.

Brain Res. 1994 Jul 18;651(1-2):92-100

Engelhard K, Werner C, Reeker W, Lu H, Möllenberg O, Mielke L, Kochs E.

Desflurane and isoflurane improve neurologic outcome following incomplete cerebral ischemia in rats

Brit J Anaesth 1999; 83: 415-421

FDA Clinical Review

Drotrecogin alpha (activated) [Recombinant human activated Protein C (rhAPC)], Xigris™

BLA#125029/0, November 21, 2001

Fernández JA, Xu X, Liu D, Zlokovic BV, Griffin JH.

Recombinant murine-activated protein C is neuroprotective in a murine ischemic stroke model.

Blood Cells Mol Dis. 2003 May-Jun;30(3):271-6

Fitch W

Brain Metabolism. In: Cottrell JE, Smith DS (Eds):

Anaesthesia and Neurosurgery; Third Edition; Mosby, St. Louis, Baltimore, Boston (usw.), 1994, S.1ff

Fortune JB et al.

Continuous measurement of jugular venous oxygen saturation in response to transient elevations of blood pressure in head-injured patients.

J Neurosurg 80 (1994) 461-368

Gelmers, H. J.; Krämer, G.; Hacke, W. und Hennerici, M. (1989)

Zerebrale Ischämie

Springer-Verlag

Gerriets T, Li F, Silva MD, Meng X, Brevard M, Sotak CH, Fisher M.

The macrosphere model: evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats.

J Neurosci Methods. 2003 Jan 30;122(2):201-11

Ginsberg MD, Busto R.

Rodent models of cerebral ischemia.

Stroke. 1989 Dec;20(12):1627-42

Gionet TX, Warner DS, Verhaegen M, Thomas JD, Todd MM

Effects of intra-ischemic blood pressure on outcome from 2-vessel occlusion forebrain ischemia in the rat.

Brain Res. 1992 Jul 24;586(2):188-94

Grey ST, Tsuchida A, Hau H, Orthner CL, Salem HH, Hancock WW.

Selective inhibitory effects of the anticoagulant activated protein C on the responses of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN-gamma, or phorbol ester.

J Immunol. 1994 Oct 15;153(8):3664-72

Grinnell BW, Hermann RB, Yan SB.

Human protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion: role of unique fucosylated oligosaccharide.

Glycobiology. 1994 Apr;4(2):221-5

Guo H, Liu D, Gelbard H, Cheng T, Insalaco R, Fernández JA, Griffin JH, Zlokovic BV

Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3.

Neuron. 2004 Feb 19;41(4):563-72

Heimann A, Kroppenstedt S, Ulrich P, Kempfski OS.

Cerebral blood flow autoregulation during hypobaric hypotension assessed by laser Doppler scanning.

J Cereb Blood Flow Metab. 1994 Nov; 14(6):1100-5

Henshall DC, Butcher SP, Sharkey J.

A rat model of endothelin-3-induced middle cerebral artery occlusion with controlled reperfusion.

Brain Res. 1999 Oct 2;843(1-2):105-11

Hirose K, Okajima K, Taoka Y, Uchiba M, Tagami H, Nakano K, Utoh J, Okabe H, Kitamura N.

Activated protein C reduces the ischemia/reperfusion-induced spinal cord injury in rats by inhibiting neutrophil activation.

Ann Surg. 2000 Aug;232(2):272-80

Hodges H.

Maze procedures: the radial-arm and water maze compared.

Brain Res Cogn Brain Res. 1996 Jun;3(3-4):167-81

Hoffman WE, Braucher E, Pelligrino DA, Thomas C, Albrecht RF, Miletich DJ.

Brain lactate and neurologic outcome following incomplete ischemia in fasted, nonfasted, and glucose-loaded rats.

Anesthesiology. 1990 Jun;72(6):1045-50

Holzer M, Behringer W, Schörkhuber W, Zeiner A, Sterz F, Laggner AN, Frass M, Siostrzonek P, Ratheiser K, Kaff A.

Mild hypothermia and outcome after CPR. Hypothermia for Cardiac Arrest (HACA) Study Group.

Acta Anaesthesiol Scand Suppl. 1997;111:55-8

Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group.

Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest.

N Engl J Med. 2002 Feb 21;346(8):549-56

Ito U, Spatz M, Walker JT Jr, Klatzo I.

Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations.

Acta Neuropathol. 1975 Aug 27;32(3):209-23

Kabat H, Dennis C, Baker AB.

Recovery of function following arrest of the brain circulation.

Am J Physiol 1941; 132:737-747

Kawaguchi M, Kimbro JR, Drummond JC, Cole DJ, Kelly PJ, Patel PM.

Isoflurane delays but does not prevent cerebral infarction in rats subjected to focal ischemia.

Anesthesiology. 2000 May;92(5):1335-42

Kawaguchi, M., Furuya, H., Patel, P. M.

Neuroprotective effects of anesthetic agents.

Journal of Anesthesia 2005;19: 150 - 156

Kågström E, Smith ML, Siesjö BK.

Local cerebral blood flow in the recovery period following complete cerebral ischemia in the rat.

J Cereb Blood Flow Metab. 1983 Jun;3(2):170-82

Kempski O.

Hypertonic saline and stroke.

Crit Care Med. 2005 Jan;33(1):259-60

Kempski, O.

Pathologische Neurophysiologie

Georg Thieme Verlag, Stuttgart und New York (2000)

Kempski O, Heimann A, Strecker U

On the number of measurements necessary to assess regional cerebral blood flow by local laser Doppler recordings: a simulation study with data from 45 rabbits.

Int J Microcirc Clin Exp. 1995 Jan-Feb; 15(1):37-42

Kerr JF.

History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept.

Toxicology. 2002 Dec 27;181-182:471-4. Review.

Kerr J.F.R., Wyllie A.H. und Currie A.R.

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics

Br J Cancer 1972; 26; S. 239-57

Kerschen EJ, Fernandez JA, Cooley BC, Yang XV, Sood R, Mosnier LO, Castellino FJ, Mackman N, Griffin JH, Weiler H.

Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C.

J Exp Med. 2007 Oct 1;204(10):2439-48. Epub 2007 Sep 24.

Kihara S, Shiraishi T, Nakagawa S, Toda K, Tabuchi K.

Visualization of DNA double strand breaks in the gerbil hippocampal CA1 following transient ischemia.

Neurosci Lett. 1994 Jul 4;175(1-2):133-6

Koehler RC, Chandra N, Guerci AD, Tsitlik J, Traystman RJ, Rogers MC, Weisfeldt ML.

Augmentation of cerebral perfusion by simultaneous chest compression and lung inflation with abdominal binding after cardiac arrest in dogs.

Circulation 1983 67:266-275

Kofler J, Hattori K, Sawada M, DeVries AC, Martin LJ, Hurn PD, Traystman RJ.

Histopathological and behavioral characterization of a novel model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice.

J Neurosci Methods. 2004 Jun 15;136(1):33-44

Koizumi, J., Y. Yoshida, T. Nakazawa, G. Ooneda

Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area

Jpn J Stroke 1986; 8: 1-8

Kolominsky-Rabas P.L. and Heuschmann, P. U.

Incidence, Etiology and Long-Term Prognosis of Stroke.

Fortschritte der Neurologie Psychiatrie 2002;70:657-62

Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC.

Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease.

Cancer Res. 1997 Apr 15;57(8):1605-13

Kuge Y, Minematsu K, Yamaguchi T, Miyake Y.

Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats.

Stroke. 1995 Sep;26(9):1655-7; discussion 1658

Lauer KK, Shen H, Stein EA, Ho KC, Kampine JP, Hudetz AG.

Focal cerebral ischemia in rats produced by intracarotid embolization with viscous silicone.

Neurol Res. 2002 Mar;24(2):181-90

Lay AJ, Donahue D, Tsai MJ, Castellino FJ.

Acute inflammation is exacerbated in mice genetically predisposed to a severe protein C deficiency.

Blood. 2007 Mar 1;109(5):1984-91. Epub 2006 Oct 17.

Lee RM.

Morphology of cerebral arteries.

Pharmacol Ther. 1995 Apr;66(1):149-73. Review.

Li Y, Powers C, Jiang N, Chopp M.

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

J Neurol Sci. 1998 Apr 1;156(2):119-32

Liaw PC.

Endogenous protein C activation in patients with severe sepsis.

Crit Care Med. 2004 May;32(5 Suppl):S214-8

Liebmann M.

In: *Blutversorgung des Gehirns.* Schünke M. und Schünke G.(Hrsg.), Basiswissen

Neuroanatomie. George Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 113-117 (1993)

Longstreth WT Jr, Inui TS.

High blood glucose level on hospital admission and poor neurological recovery after cardiac arrest.

Ann Neurol. 1984 Jan;15(1):59-63

Love S.

Apoptosis and brain ischaemia

Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psych 2003; 27; S. 267-82

Lowry OH, Passonneau JV, Hasselberger FX, Schulz DW.

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

J Biol Chem 1964; 249:18-30.

Lyseng-Williamson KA, Perry CM.

Drotrecogin alfa (activated).

Drugs. 2002;62(4):617-30; discussion 631-2

Magistretti PJ, Pellerin L.

Cellular bases of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging: evidence for a prominent role of astrocytes.

Cereb Cortex. 1996 Jan-Feb;6(1):50-61

Macfarlane R, Tasdemiroglu E, Moskowitz MA, Uemura Y, Wei EP, Kontos HA.

Chronic trigeminal ganglionectomy or topical capsaicin application to pial vessels attenuates postocclusive cortical hyperemia but does not influence postischemic hypoperfusion.

J Cereb Blood Flow Metab. 1991 Mar;11(2):261-71

Macko RF, Killewich LA, Fernández JA, Cox DK, Gruber A, Griffin JH.

Brain-specific protein C activation during carotid artery occlusion in humans.

Stroke. 1999 Mar;30(3):542-5

Mehmet H, Yue X, Penrice J, Cady E, Wyatt JC, Sarraf C, Squier M, Edwards AD.

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

Cell Death Differ. 1998 Apr;5(4):321-9

Melgar MA, Park H, Rafols JA, Diaz FG.

A model of global forebrain ischemia/reperfusion in the awake rat.

Neurol Res. 2002 Jan;24(1):97-106

Michenfelder JD, Theye RA

Cerebral protection by thiopental during hypoxia.

Anaesthesiology 39 (1973) 510-517

Michenfelder JD, Theye RA

The effects of profound hypocapnia and dilutional anaemia on canine cerebral metabolism and blood flow.

Anaesthesiology 31 (1969) 449-455

Mies G, Paschen W, Hossmann KA

Cerebral blood flow, glucose utilization, regional glucose, and ATP content during the maturation period of delayed ischemic injury in gerbil brain.

J. Cereb. Blood Flow Metab. 10: 638-645, 1990

Milani H, Uemura UU, Oliveira RM, Lepri ER, Xavier GF

Loss of CA1 cells following global ischaemia correlates with spatial deficits in the circular platform task

J Neurosci Methods. 1998 Mar 13;80(1):19-27

Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, Noguchi T.

Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation.

Blood. 2000 Jun 15;95(12):3781-7

Mosnier LO, Gale AJ, Yegneswaran S, Griffin JH.

Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity.

Blood. 2004 Sep 15;104(6):1740-4. Epub 2004 Jun 3

Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH.

The cytoprotective protein C pathway.

Blood. 2007 Apr 15;109(8):3161-72. Epub 2006 Nov 16

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM.

NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates.

Development. 1992 Sep;116(1):201-11

Muzio M.

Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis.

Int J Clin Lab Res. 1998;28(3):141-7. Review.

Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA.

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

J Neurosci. 1998 May 15;18(10):3659-68

Nickel, R., Schummer, A., Seiferle E.

Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen. Band 4. S. 74 - 199

In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. 3. Auflage. Paul Parey Verlag, Berlin (1992)

NINDS t-PA Stroke Study Group

Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke

Stroke 1997; 28: 2109-2118

NINDS t-PA Stroke Study Group

Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group.

N Engl J Med. 1995 Dec 14;333(24):1581-7. Comment in: ACP J Club. 1996 May-Jun;124(3):58-9

Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibanaï K, Kominami E, Uchiyama Y.

Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis.

J Neurosci. 1995 Feb;15(2):1001-11

Niwa M, Hara A, Iwai T, Wang S, Hotta K, Mori H, Uematsu T.

Caspase activation as an apoptotic evidence in the gerbil hippocampal CA1 pyramidal cells following transient forebrain ischemia.

Neurosci Lett. 2001 Mar 9;300(2):103-6

Oberg PA, Tenland T, Nilsson GE:

Laser-Doppler flowmetry-a noninvasive and continuous method for blood flow evaluation in microvascular studies.

Acta Med Scand 1984 suppl 687:17-24

Ohno M, Takemura G, Ohno A, Misao J, Hayakawa Y, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H.

"Apoptotic" myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation: analysis by immunogold electron microscopy combined with In situ nick end-labeling.

Circulation. 1998 Oct 6;98(14):1422-30

Palmer GC, Palmer SJ, Christie-Pope BC, Callahan AS III, Taylor MD, Eddy LJ.

Classification of ischemic-induced damage to Na/K ATPase in gerbil forebrain.

Neuropharmacology 24: 509-516, 1985

Pape M, Engelhard K, Eberspächer E, Hollweck R, Kellermann K, Zintner S, Hutzler P, Werner C.

The long-term effect of sevoflurane on neuronal cell damage and expression of apoptotic factors after cerebral ischemia and reperfusion in rats.

Anesth Analg. 2006 Jul;103(1):173-9, table of contents

Payne RS, Schurr A.

Corticosterone-aggravated ischemic neuronal damage in vitro is relieved by vanadate.

Neuroreport. 2001 May 8;12(6):1261-3

Patel SS, Goa KL.

Sevoflurane. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and its clinical use in general anaesthesia.

Drugs. 1996 Apr;51(4):658-700

Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F.

Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest.

Neurology. 1987 Aug;37(8):1281-6

Phillis JW, Song D, O'Regan MH.

Effect of hyperglycemia on extracellular levels of amino acids and free fatty acids in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex.

Brain Res. 1999 Aug 7;837(1-2):177-83

Prough DS, Zornow MH.

Why is cardiac arrest lasting more than five minutes associated with poor neurologic outcome?

Crit Care Med. 1999 Jul;27(7):1398-400 Comment on: Crit Care Med. 1999 Jul;27(7):1335-42

Pulsinelli WA, Brierley JB.

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

Stroke. 1979 May-Jun;10(3):267-72

Pulsinelli WA, Buchan AM.

The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation.

Stroke. 1988 Jul;19(7):913-4

Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F.

Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia.

Ann Neurol. 1982 May;11(5):491-8

Riede UN, Schaefer H E

Letale Zellschädigung

Allgemeine und spezielle Pathologie; Georg Thieme Verlag, 4. Auflage; 1995; S. 135-44

Rovlias A, Kotsou S.

The influence of hyperglycemia on neurological outcome in patients with severe head injury.

Neurosurgery. 2000 Feb;46(2):335-42

Rüsse I, Sinowatz F

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

Seite 247-284

Sacco, R. L., J. H. Ellenberg, J. P. Mohr, T. K. Tatemichi, D. B. Hier, T. R. Price, and P. A. Wolf

Infarcts of undetermined cause: the NINCDS

Stroke Data Bank. Ann Neurol. (1989) 25:382-90

Sairanen TR, Lindsberg PJ, Brenner M, Sirén AL.

Global forebrain ischemia results in differential cellular expression of interleukin-1beta (IL-1beta) and its receptor at mRNA and protein level.

J Cereb Blood Flow Metab. 1997 Oct;17(10):1107-20

Sakai H, Sheng H, Yates RB, Ishida K, Pearlstein RD, Warner DS.

Isoflurane provides long-term protection against focal cerebral ischemia in the rat.

Anesthesiology. 2007 Jan;106(1):92-9; discussion 8-10

Saito K, Suyama K, Nishida K, Sei Y, Basile AS.

Early increases in TNF-alpha, IL-6 and IL-1 beta levels following transient cerebral ischemia in gerbil brain.

Neurosci Lett. 1996 Mar 15;206(2-3):149-52

Schiele R, Senges J.

Acute myocardial infarction: selection of reperfusion strategies in the individual patient.
Thromb Haemost. 1999 Sep;82 Suppl 1:62-3

Schoots IG, Levi M, van Vliet AK, Maas AM, Roossink EH, van Gulik TM.

Inhibition of coagulation and inflammation by activated protein C or antithrombin reduces intestinal ischemia/reperfusion injury in rats.
Crit Care Med. 2004 Jun;32(6):1375-83

Schreiber W, Gabriel D, Sterz F, Muellner M, Kuerkciyan I, Holzer M, Laggner AN.

Thrombolytic therapy after cardiac arrest and its effect on neurological outcome.
Resuscitation. 2002 Jan;52(1):63-9

Sharkey J, Butcher SP.

Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery.
J Neurosci Methods. 1995 Aug;60(1-2):125-31

Sharma GR, Gerlitz B, Berg DT, Cramer MS, Jakubowski JA, Galbreath EJ, Heuer JG, Grinnell BW.

Activated protein C modulates chemokine response and tissue injury in experimental sepsis.
Adv Exp Med Biol. 2008;614:83-91
(Biotechnology Discovery Research, Lilly Research Laboratories, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285, USA.)

Sharp, P. E., LaRegina, M. (1998)

The Laboratory Rat.
CRC Press LLC, Boca Raton Florida

Shibata M, Kumar SR, Amar A, Fernandez JA, Hofman F, Griffin JH, Zlokovic BV.

Anti-inflammatory, antithrombotic, and neuroprotective effects of activated protein C in a murine model of focal ischemic stroke.
Circulation. 2001 Apr 3;103(13):1799-805

Shirane R, Shimizu H, Kameyama M, Weinstein PR.

A new method for producing temporary complete cerebral ischemia in rats.
J Cereb Blood Flow Metab. 1991 Nov;11(6):949-56

Siegenthaler und Blum

Klinische Pathophysiologie
Georg Thieme Verlag, 2006

Siemkowicz E, Hansen AJ.

Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo-, normo- and hyperglycemic rats.
Acta Neurol Scand 1978; 58:1-8

Siesjö BK, Katsura K, Zhao Q, Folbergrová J, Pahlmark K, Siesjö P, Smith ML.

Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis.
J Neurotrauma. 1995 Oct;12(5):943-56. Links

- Sloop GD, Roa JC, Delgado AG, Balart JT, Hines MO 3rd, Hill JM.**
Histologic sectioning produces TUNEL reactivity. A potential cause of false-positive staining.
Arch Pathol Lab Med. 1999 Jun;123(6):529-32
- Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosén I, Wieloch T, Siesjö BK.**
Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model.
Acta Neurol Scand. 1984 Jun;69(6):385-401
- Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT.**
The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:10212-10216
- Stern MD.**
In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering.
Nature. 1975 Mar 6;254(5495):56-8
- Sterz F, Behringer W, Holzer M.**
Global hypothermia for neuroprotection after cardiac arrest.
Acute Card Care. 2006;8(1):25-30
- Sugawara T, Lewén A, Noshita N, Gasche Y, Chan PH.**
Effects of global ischemia duration on neuronal, astroglial, oligodendroglial, and microglial reactions in the vulnerable hippocampal CA1 subregion in rats.
J Neurotrauma. 2002 Jan;19(1):85-98
- Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM.**
Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion.
J Cereb Blood Flow Metab. 1981;1(1):53-60
- Taoka Y, Schlag MG, Hopf R, Redl H.**
The long-term effects of pre-treatment with activated protein C in a rat model of compression-induced spinal cord injury.
Spinal Cord. 2000 Dec;38(12):754-61
- Taylor CR**
Immunoperoxidase techniques - practical and theoretical aspects.
Arch Pathol Lab Med 1978; 102: 113-121
- Taylor FB Jr, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT.**
Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo.
Blood. 2001 Mar 15;97(6):1685-8
- Teschendorf P, Albertsmeier M, Popp E, Vogel P, Böttiger B**
The Effects of drotrecogin alfa (activated) on the neurological outcome after cardiac arrest in rats
ASA Abstract List 2006; 105: A677

Thompson CB.

Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.
Science. 1995 Mar 10;267(5203):1456-62. Review.

Todd MM, Cutkomp J, Brian JE.

Influence of mannitol and furosemide, alone and in combination, on brain water content after fluid percussion injury.
Anesthesiology. 2006 Dec;105(6):1176-81

Traystman RJ.

Animal models of focal and global cerebral ischemia.
ILAR J. 2003;44(2):85-95

Turrens JF, Beconi M, Barilla J, Chavez UB, McCord JM

Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues.
Free Radical Res. Commun.12-13: 681-689, 1991

Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, Sokolova TV, Ritov VB, Quinn PJ, Rose M, Kochanek P, Graham SH, Kagan VE.

Oxidative stress following traumatic brain injury in rats: quantitation of biomarkers and detection of free radical intermediates.
J Neurochem. 2000 Nov;75(5):2178-89

Ucker DS, Hebshi LD, Blomquist JF, Torbett ET

Physiological T-cell death: susceptibility is modulated by activation, aging and transformation, but the mechanism is constant.
Immunol Rev 1994; 142: 273-299

Unal-Cevik I, Kilinç M, Gürsoy-Ozdemir Y, Gurer G, Dalkara T.

Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note.
Brain Res. 2004 Jul 23;1015(1-2):169-74

Volpe BT, Hirst W.

The characterization of an amnesic syndrome following hypoxic ischemic injury.
Arch Neurol. 1983 Jul;40(7):436-40

Wang YF, Tsirka SE, Strickland S:

Tissue plasminogen activator (t-PA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and t-PA-deficient mice
Nat Med 1998; 4: 228-231

Warner DS, McFarlane C, Todd MM, Ludwig P, McAllister AM.

Sevoflurane and halothane reduce focal ischemic brain damage in the rat. Possible influence on thermoregulation.
Anesthesiology. 1993 Nov;79(5):985-92

Waynforth, H.B., Flecknell, P.A.

Experimental and Surgical Technique in the Rat
Academic Press, Suffolk, Great Britain

Werner C.

Mild and moderate hypothermia as a new therapy concept in treatment of cerebral ischemia and craniocerebral trauma. Pathophysiologic principles
Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther. 1997 Apr;32(4):210-8

Werner C, Möllenberg O, Kochs E, Schulte J am Esch .

Sevoflurane improves neurological outcome after incomplete cerebral ischaemia in rats.
Br J Anaesth. 1995 Dec;75(6):756-60

Werner C

Neuroprotektion

In: Löffler W (Hrsg.) Neuroanästhesie, Jantzen J-P, Thieme Verlag, Stuttgart, 2000; 121-142

Werner C, Engelhard K.

Pathophysiology of traumatic brain injury.
Br J Anaesth. 2007 Jul;99(1):4-9. Review

Xu XH, Zhang SM, Yan WM, Li XR, Zhang HY, Zheng XX.

Development of cerebral infarction, apoptotic cell death and expression of X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein following focal cerebral ischemia in rats.
Life Sci. 2006 Jan 11;78(7):704-12. Epub 2005 Sep 1

Yan SB, Helterbrand JD, Hartman DL, Wright TJ, Bernard GR.

Low levels of protein C are associated with poor outcome in severe sepsis.
Chest. 2001 Sep;120(3):915-22, Comment in: Chest. 2001 Sep;120(3):699-701

Yesilirmak DC, Kumral A, Tugyan K, Cilaker S, Baskin H, Yilmaz O, Duman N, Ozkan

Effects of activated protein C on neonatal hypoxic ischemic brain injury.
Brain Res. 2008 May 19;1210:56-62. Epub 2008 Mar 10

Zhang, Z., R. L. Zhang, Q. Jiang, S. B. Raman, L. Cantwell, M. Chopp

A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia
J Cereb Blood Flow Metab 1997; 17: 123–35

Zlokovic BV, Zhang C, Liu D, Fernandez J, Griffin JH, Chopp M.

Functional Recovery after Embolic Stroke in Rodents by Activated Protein C
Ann Neurol 2005 Sep; 58(3):474-7

Zhu C, Wang X, Hagberg H, Blomgren K

Correlation between caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia.
J Neurochem 2000; 75: 819-829

8. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Einteilung der Tiere in die Gruppen des Vorversuches	36
Tab. 2:	Darstellung der Zeitpunkte zur Blutentnahme der Tiere der Bolusgruppe	37
Tab. 3:	Darstellung der Zeitpunkte zur Blutentnahme der Tiere der beiden Infusionsgruppen	37
Tab. 4:	Einteilung der 26 Tiere in die drei Versuchsgruppen des Hauptversuches.....	44
Tab. 5:	Ergebnisse der Messung des MAP der Tiere der Gruppe 1 (Vorversuch).....	67
Tab. 6:	Ergebnisse der Messung des MAP der Tiere der Gruppen 2 und 3 (Vorversuch) ..	67
Tab. 7:	Ergebnisse der Messung von Sauerstoffpartialdruck (PaO ₂), Kohlendioxidpartialdruck (PaCO ₂) und pH-Wert der Tiere der Gruppe 1 (Vorversuch).....	68
Tab. 8:	Ergebnisse der Messung von Sauerstoffpartialdruck (PaO ₂), Kohlendioxidpartialdruck (PaCO ₂) und pH-Wert der Tiere der Gruppen 2 und 3 (Vorversuch)	69
Tab. 9:	Darstellung der Osmolarität im Plasma und in der Stammlösung des Medikaments	72
Tab. 10:	Messung des Körpergewichts der Tiere der APC- und der Kontrollgruppe	75
Tab. 11:	Ergebnisse der Messung der perikraniellen Temperatur.....	76
Tab. 12:	Ergebnisse der Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks	77
Tab. 13:	Ergebnisse der Messung der Herzfrequenz.....	78
Tab. 14:	Ergebnisse der Messung von Sauerstoffpartialdruck (PaO ₂), Kohlendioxidpartialdruck (PaCO ₂), pH-Wert und Atemfrequenz	79
Tab. 15:	Ergebnisse der Plasmaglukosekonzentration	80
Tab. 16:	Ergebnisse der Hämoglobinkonzentrationsbestimmung.....	81
Tab. 17:	Ergebnisse der Messung des zerebralen Blutflusses beider Hemisphären.....	82
Tab. 18:	Ergebnisse der Messung der Plasmakonzentration von APC	84
Tab. 19:	Ergebnisse der Messung der Plasmaosmolarität	84
Tab. 20:	Ergebnisse der histologischen Auswertung der HE-Färbung.....	90

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 21:	Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung der aktivierte-Caspase-3-Färbung	95
-----------------	---	----

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Arterielle Gefäßversorgung des Gehirns (Frank H. Netter, MD: Atlas der Anatomie des Menschen, Seite 133).....	9
Abb. 2:	Hippokampusformation der Ratte (nach PD Dr. J. Kazca, Veterinär-anatomisches Institut Leipzig).....	11
Abb. 3:	Graphische Darstellung der Pathomechanismen nach zerebraler Ischämie im zeitlichen Verlauf (nach DIRNAGL et al., TINS 1999)	15
Abb. 4:	Vermittlung der antikoagulatorischen Aktivität von APC (MOSNIER et al., Blood 2007)	32
Abb. 5:	Vermittlung der zytoprotektiven Effekte von APC (MOSNIER et al., Blood 2007)	32
Abb. 6:	Übersicht der einzelnen Phasen der Operation im zeitlichen Verlauf	45
Abb. 7:	Versuchsanordnung in der Ischämiephase	51
Abb. 8:	Graphische Darstellung der Plasmakonzentration von APC nach einmaliger Bolusgabe von 2 mg/kg i.v. zu verschiedenen Messzeitpunkten der Gruppe 1 (n = 4).....	70
Abb. 9:	Graphische Darstellung der Plasmakonzentration von APC nach Bolusgabe von 2 mg/kg und zusätzlicher Infusion von 3 mg/kg/h i.v. über drei Stunden der Gruppe 2 (n = 1)	70
Abb. 10:	Graphische Darstellung der Plasmakonzentration von APC nach Bolusgabe von 2 mg/kg und zusätzlicher Infusion von 6 mg/kg/h i.v. über drei Stunden der Gruppe 3 (n = 2)	71
Abb. 11:	Mittlerer zerebraler Blutfluss in Perfusion Units.....	83
Abb. 12:	Zeit bis zum Erreichen des ersten Loches im Barnes Maze Test	86
Abb. 13:	Zeit bis zum Erreichen des Zielloches im Barnes Maze Test	87
Abb. 14:	Hippokampusformation eines Tieres nach globaler zerebraler Ischämie	89
Abb. 15:	CA1-Region der Hippokampusformation eines Tieres nach globaler zerebraler Ischämie.....	89
Abb. 16:	Anzahl der vitalen Neuronen in der CA1/CA2-Region	91
Abb. 17:	Anzahl der vitalen Neuronen in der CA3/CA4-Region	92

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 18:	CA1-Region eines Tieres nach globaler zerebraler Ischämie mit aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen.....	94
Abb. 19:	aktivierte-Caspase-3-positiv Zelle in der CA1-Region eines Tieres nach globaler zerebraler Ischämie	94
Abb. 20:	Anzahl der aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen in der CA1/CA2-Region des Hippokampus.....	96
Abb. 21:	Anzahl der aktivierte-Caspase-3-positiven Zellen in der CA3/CA4-Region des Hippokampus.....	97

10. ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
§	Paragraph
2-VO	two-vessel-occlusion (engl. Verschluss von zwei Gehirnarterien)
4-VO	four-vessel-occlusion (engl. Verschluss von vier Gehirnarterien)
5-VO	five-vessel-occlusion (engl. Verschluss von fünf Gehirnarterien)
9-VO	nine-vessel-occlusion (engl. Verschluss von neun Gehirnarterien)
α	statistisches Signifikanzniveau
A.	Arteria (lat. Arterie)
Aa.	Arteriae (lat. Arterien)
Abb.	Abbildung
AMPA	Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1 (engl.)
APC	aktiviertes Protein C
ATP	Adenosin-tri-Phosphat
Bad	Bcl-2-Antagonist of Cell Death (engl.)
BCAO	bilateral carotid artery occlusion (engl. beidseitige Okklusion der A. carotis communis)
Bcl-2	B-cell lymphoma gene 2 product
BE	Base Excess (engl. Basendefizit)
BGA	Blutgasanalyse
BO	Bulbus olfactorius (lat.)
bzw.	beziehungsweise
CA	Cornu ammonis (lat. Ammonshorn)
ca.	zirka
CAD	Caspase-aktivierte DNase
CBF	cerebral blood flow (engl. zerebraler Blutfluss)
cm	Zentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CPP	cranial perfusion pressure (engl. cranialer Perfusionsdruck)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CVR	cerebrovascular resistance (engl. zerebrovaskulärer Widerstand)
Da	Dalton
d. h.	das heißt
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
dl	Deziliter
DNA	desoxyribonucleic acid (engl. Desoxyribonukleinsäure)
DS	Donkey serum (engl.)
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
EPCR	endothelial protein C receptor (engl. endothelialer Protein C-Rezeptor)
et al.	et alii (lat. und andere)
Fa.	Firma
FiO₂	fraction of inspired oxygen (engl. inspiratorische Sauerstofffraktion)
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GD	Gyrus dentatus (lat.)
GFAP	glia fibrillary acidic protein (engl.)
h	Stunde
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Herzfrequenz
ICAD	Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase
ICAM-1	intracellular adhesion molecule 1 (engl.)
ICE	interleukin converting enzyme (engl.)
ICP	intracranial pressure (engl. intrakranieller Druck)
i.d.F.	in der Fassung vom
I.E.	Internationale Einheiten
iNOS	inducible nitric oxide synthase (engl.)
IL-1β	Interleukin-1-beta
IL-6	Interleukin-6
i.p.	intraperitoneal

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
M	Molar
m	Meter
M.	Musculus (lat. Muskel)
MAP	middle arterial pressure (engl. mittlerer arterieller Blutdruck)
MCA	middle cerebral artery (engl. A. cerebri media)
MCAO	middle cerebral artery occlusion (engl. Okklusion der A. cerebri media)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm³	Kubikmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mosmol/kg	Milliosmol pro Kilogramm (Einheit der Osmolarität)
mRNA	messenger ribonucleic acid (engl.)
MW	Mittelwert
n	Anzahl
Na⁺-K⁺-ATPase	ATP-abhängiger Kanal für Natrium- und Kalium-Ionen
n. Chr.	nach Christus
N₂O	Lachgas
Na₂HPO₄ x 7 H₂O	Dinatrium-Hydrogenphosphat-Heptahydrat
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NaH₂PO₄ x H₂O	Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat
NeuN	neuronal specific nuclear protein (engl.)
NiCl₂	Nickeldichlorid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O₂	Sauerstoff
p53	Tumorsuppressorprotein p53
PaCO₂	arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1 (engl. Plasminogenaktivator-

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

	Inhibitor-1)
PAR-1	protease activated receptor-1 (engl. Protease-aktivierter-Rezeptor-1)
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PaO₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphate buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
pH	pro Hundert
PNS	Peripheres Nervensystem
P-Selectin	plateled selectin (engl.)
PU	Perfusion Units
Q1	unteres Quartil, 1. Quartil
Q3	oberes Quartil, 3. Quartil
rhAPC	rekombinantes humanes aktiviertes Protein C
RNA	ribonucleic acid (engl. Ribonukleinsäure)
SBC	Standard-Bikarbonat
SD	standard deviation (engl. Standardabweichung)
sec	Sekunde
SLE	systemischer Lupus erythematoses
t	Zeitpunkt
t_{1/2}	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TAFI	thrombin activatable fibrinolytic inhibitor (engl. Thrombin-aktivierbarer Fibrinolyseinhibitor)
TBS	trizma base solution (engl. Trizma Base-Lösung)
TF	tissue factor (engl. Gewebsthromboplastin)
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNFR-1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1
t-PA	tissue plasminogen activator (engl. Gewebefibrinolyseaktivator)
T_{peri}	perikranielle Temperatur
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
T_{rektal}	rektale Temperatur
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling
u. a.	unter anderem

v. a.	vor allem
V.	Vena (lat. Vene)
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1 (engl.)
vgl.	vergleiche
Vol%	Volumen Prozent
vs	versus (lat. gegen)
Vv.	Venae (lat. Venen)
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Sonderzeichen

α	alpha
β	betha
γ	gamma
μ	mikro
+	positiv
-	negativ
2	Quadrat
3	Kubik
\geq	größer gleich

11. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. C. Werner, Direktor der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, herzlich dafür bedanken, dass er mir das Thema meiner Dissertation bereitgestellt und mir die Arbeit im Labor der Arbeitsgruppe Neuroprotektion ermöglicht hat. Auch bedanken möchte ich mich für die immerwährende Unterstützung und Hilfe.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Univ.-Prof. Dr. med. Kristin Engelhard für Ihre Unterstützung und Ihr stets offenes Ohr für alle Probleme und Fragen.

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

Herrn PD Dr. med. Peetz danke ich für die Unterstützung für den analytischen Teil dieser Arbeit.

Frau Dr. rer. physiol. Antje Jahn aus dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz sei gedankt für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten.

Frau Dr. med. Irina Lasarzik danke ich für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, das Modell und die Thematik sowie für die Betreuung dieser Doktorarbeit.

Frau Frida Kornes danke ich sehr herzlich für Ihre aufopfernde Hilfe und stetige Unterstützung in allen Fragen.

Robert möchte ich danken, dass er mir auf einzigartige Weise immer seelisch und moralisch beigestanden und mir den Rückhalt gegeben hat, auch schwierigste Situationen zu meistern.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mich in allem so aufopfernd und großartig unterstützt haben und dies immer noch tun und in allen Situationen für mich da waren. Ohne Euch wäre ich nie so weit gekommen.