

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Antikörper und Proteine

Anti-iNOS-IgG, sc-651	Santa Cruz Biotechn., Heidelberg, Deutschland
anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat, sc-2004	Santa Cruz Biotechn., Heidelberg, Deutschland
Complete™ protease inhibitor	Roche, Mannheim, Deutschland
Molekulargewichtsstandard	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Rindereiweißserum	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

2-Methylbutan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aminoguanidin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ammoniummetavanadat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Äther	Merck, Darmstadt, Deutschland
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol Absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fuchsinsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycine	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Halothan	Asid Bonz, Böblingen, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isofluran	Forene, Abott, Wiesbaden, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kochsalzlösung 0,9 % NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Rotihistol	Merck, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris (Tris-Hydroxymethylaminomethan)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Geräte

0,58 mm Siliconschlauch	PE 50, Labokion, Sinsheim, Deutschland
Blutdruckmessgerät	RFT Biomonitor, DDR
Blutgasanalysator	Compact 3, AVL Medizintechnik, Bad Homburg, Deutschland
Blutgaskapillaren	Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht, Deutschland
Chirurgische Nähseide 4/0	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Cryostat	Microm HM 500 OM
Diascanner Print Scan 35 Plus	Polaroid, Offenbach, Deutschland
Druckluftmessgeräte	Cole Parmer, Kehl, Deutschland
Elektrophoreseapparatur	Biometra, Göttingen, Deutschland
Glashomogenisator Type B pistil	Loose, Wheaton, USA
Glukosemessgerät	Accutrend sensor, Boehringer Mannheim, Deutschland
Guillotine	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Kühlzentrifuge 30 RF	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Mikromanipulator	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Mikroskop und Lampe	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Operationsinstrumente	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Röntgenfilm Kodak BioMax Light-1	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Spritzdruckpumpe	Injectomat Spritze, Fresenius AG, Deutschland
Insulinspritze (1ml Volumen)	B-Braun, Melsungen, Deutschland
Temperaturmessgerät	RFT Biomonitor, DDR
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vaporen	Dreager Medizintechnik, Lübeck, Deutschland

2.1.4 Software

Scion Image 3b	Scion Corporation, ML, USA
SigmaScan Pro 4.0	Jandel Scientific, San Rafael, USA

2.1.5 Sonstige Materialien

Altromin 1324, Standarddiät,

Altromin GmbH, Lage, Deutschland

Enhanced chemiluminescence kit

Pierce, Rockford, IL, USA

Polyvinylidendifluoridmembran

Millipore corp., Bedford, MA, USA

Xylocaingel

B-Braun, Melsungen, Deutschland

2.1.6 Puffer und Lösungen

Blockierungspuffer	5 % Milchpulver 0,1 % Tween-20 1x TBS
Laufpuffer(5x)	15,0 g Tris-Base 75,0 g Glycine 5,0 g SDS
Lyse-Puffer	8,5 ml Ripa- Puffer 1 Tabl. Boehringer Complete™ protease inhibitor
Ripa-Puffer	5 ml 1M Tris (pH 7,4) 3 ml 5M NaCl 1 ml 0,1M EDTA 1 ml 10 % SDS 1 g Na-Deoxycholate
Sammelgel	0,33 ml 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid 0,4 ml 0,625 M Tris/ HCL (pH 6,8) 0,4 ml 0,5 % SDS 0,87 ml Aqua. bidest 2 µl TEMED 10 µl 10 % APS
SDS-Probenpuffer	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2 % SDS 10 % Glycine 5 % 2- Mercaptoethanol 0,1 % Bromphenolblau

TBS (10x)	24,2 g Tris Base 80 g NaCl pH 7,6 (der 1xTBS-Lösung)
TBST	1x TBS 0,1 % Tween-20
Transfer-Puffer	5,8 g Tris Base 2,9 g Glycine 0,37 g SDS 20 % Methanol
Trenngel	2 ml 30 % Acylamid, 0,8 % Bisacrylamid 1,2 ml 1,88 M Tris/HCL (pH 8,8) 1,2 ml 0,5 % SDS 1,6 ml Aqua. bidest. 5 µl TEMED 30 µl 10 % APS
VAF- Lösung	75 mg Fuchsin 100 ml Aqua. dest. 25 mg 0,5 % Ammonium Metavanadat 1 ml Eisessigsäure

2.2 Tiere

Alle *in vivo* Experimente wurden an ausgewachsenen männlichen Wistar Ratten mit einem Körpergewicht von 250- 350 g durchgeführt.

Die kortikalen Hirnanteile, welche für die Western-Blot-Analysen entnommen wurden, stammen ebenfalls von ausgewachsenen männlichen Wistar Ratten.

Diese Tiere wurden gezüchtet und geliefert von der Firma Charles River, Niederlassung in 97633 Sulzfeld, Deutschland.

Für die Zeit im Labor befanden sich die Tiere in einem Tierstall unserer Abteilung. Eine Klimaanlage sowie ein 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus sorgten für standardisierte

Umweltbedingungen. In den Käfigen hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser und Futter.

Alle Tierexperimente und die Haltung wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien des Tierschutzes für Labortiere unter Aufsicht eines am Ort befindlichen Tierarztes durchgeführt. Die Tierversuchs- und Genehmigungsnummer G0202/00 wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin erteilt.

2.2.1 Ausschlusskriterien der Tiere

Bei unzureichender Nahrungsaufnahme und einem Gewichtsverlust von mehr als 20%, artfremdem Verhaltensauffälligkeiten, Apathie, sichtlichem Erleiden von Schmerzen und Erkrankung an einer Infektion wurden die Tiere vor Beendigung des Experiments unter tiefer Narkose mit Halothan durch Dekapitation getötet.

2.3 Methoden

2.3.1 Präkonditionierung

2.3.1.1 Präkonditionierung mit Isofluran und Halothan

Eine Behandlungsgruppe mit 15 Tieren wurde mit Isofluran und eine weitere Behandlungsgruppe mit sieben Tieren wurde mit Halothan präkonditioniert. Die Anästhetika wurden mit Hilfe kalibrierter Vaporen verdampft. Vermischt mit normaler Atemluft, wurde die Narkose mit 4 % Isofluran oder 4 % Halothan für eine Minute eingeleitet und für die anschließenden drei Stunden mit 1,4 % Isofluran bzw. 1,2 % Halothan aufrechterhalten. Die Werte 1,4 % Isofluran und 1,2 % Halothan entsprechen dem MAC-Wert 1 für Ratten¹⁰³. Über einen eng anliegenden Schnauzenhalter wurden den spontan atmenden Ratten die Narkotika mit einem konstanten Fluss von 500 ml/min appliziert. Für die Erhaltung einer konstanten Körpertemperatur von 37 °C wurden die narkotisierten Tiere auf eine Heizplatte gelegt. Über eine rektal eingeführte Thermosonde wurde die Körpertemperatur permanent kontrolliert (siehe Abbildung 5).

2.3.1.2 Präkonditionierung mit Halothan und Sauerstoff

Während der Überwachung der physiologischen Parameter zeigte sich bei den Tieren, die mit Halothan präkonditioniert wurden, ein Abfall der arteriellen pO₂-Werte und ein Anstieg der arteriellen pCO₂-Werte (Tabelle 4, Seite 43). Aufgrund des leicht atemdepressiven Effektes von Halothan wurde eine weitere Behandlungsgruppe hinzugefügt, bei der die Hypoxie durch zusätzliche Sauerstoffinsufflation auf normale Sauerstoffpartialdrücke im arteriellen Blut ausgeglichen wurde. Es wurde Sauerstoff mit Raumluft im Verhältnis 1:10 zugemischt.

2.3.1.3 Überwachung der physiologischen Parameter

Aus jeder Behandlungsgruppe wurden bei einigen Tieren die physiologischen Parameter überwacht (siehe Tabelle 1).

Folgende Parameter wurden am Anfang der Präkonditionierung, nach 90 Minuten und nach 180 Minuten gemessen:

- der arterielle Blutdruck,

- die arteriellen Partialdrücke von Sauerstoff (PaO_2) und Kohlendioxid (PaCO_2),
- der arterielle pH- und Glukosewert.

Für den arteriellen Zugang diente die ventrale Schwanzarterie der Ratte. Nachdem das Tier ausreichend narkotisiert war, wurde etwa 5-7 cm distal des Schwanzansatzes die Arterie freipräpariert. Mit der Mikroschere wurde die Arterie im Winkel von 45° eröffnet und ein mit 0,9-prozentiger Kochsalzlösung gespülter, 0,58 mm dicker Silikonschlauch als Katheter in das Gefäß plaziert. Danach wurde der Katheter mit Nähseide an der Arterie befestigt und die Wunde zugenäht. Zum Spülen wurde über den Dreiwegehahn 0,9%ige Kochsalzlösung zugeführt. Diese Prozedur dauerte etwa 5 bis maximal 10 Minuten. Sobald Blut rückläufig war, wurden daraus Proben für die Gasanalyse und Blutzuckerbestimmung abgenommen. Die arterielle Blutdruckmessung erfolgte kontinuierlich über diesen Katheter. Nach der Präkonditionierungsphase wurden die Katheter entfernt.

2.3.1.4 Kontrollexperimente

Neben den Behandlungsgruppen wurde eine Kontrollgruppe geführt, die keine Anästhetika erhielten.

Bei sieben Tieren aus der Kontrollgruppe wurden die physiologischen Parameter gemessen. Für den kurzen Eingriff, der für die Anlage des arteriellen Zugangs nötig war, wurden die Tiere mit Isofluran und normaler Druckluft für ca. 5 bis 10 Minuten anästhesiert. Die Blutentnahmen erfolgten wie bei den Behandlungsgruppen am Anfang der Präkonditionierung, nach 90 Minuten und nach 180 Minuten. Während dieser Zeit ließ man sie mit dem Katheter ohne Zugang zu Futter und Wasser frei im Käfig herumlaufen. Anschließend wurde der Katheter entfernt.

Behandlung	Anzahl der Tiere insgesamt	Anzahl der Tiere mit zusätzlicher Überwachung der physiologischen Parameter
Präkonditionierung mit Isofluran	15	8
Präkonditionierung mit Halothan	7	6
Präkonditionierung mit Halothan und Sauerstoff	11	8
Negativkontrolle (keine Präkonditionierung)	13	7

Tabelle 1: Anzahl der Tiere in den Untersuchungsgruppen und Anzahl der Tiere mit zusätzlicher Überwachung der physiologischen Parameter.

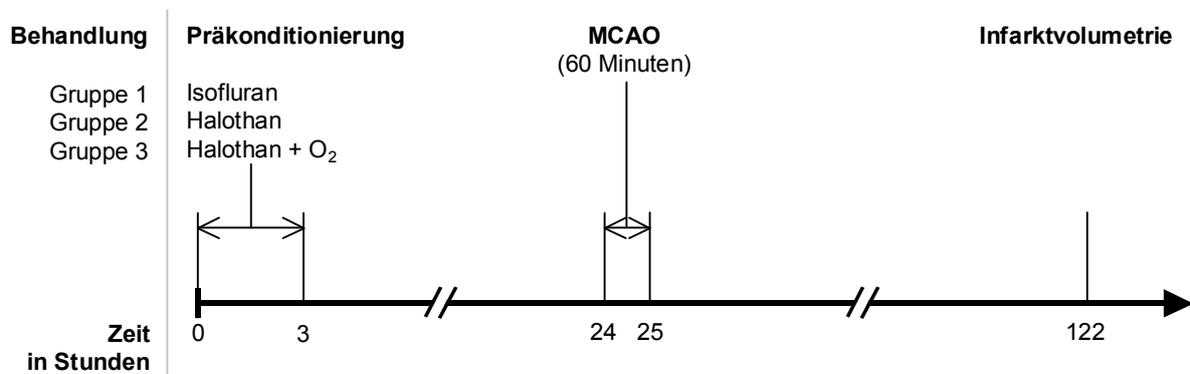


Abbildung 5: Protokoll zu Experimenten über Präkonditionierung mit volatilen Anästhetika.

Ratten wurden für drei Stunden mit den angegebenen Anästhetika präkonditioniert. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe ohne Präkonditionierung mitgeführt. 24 Stunden nach Präkonditionierung wurde eine MCAO durchgeführt, weitere 96 Stunden später die Ratten dekapitiert und eine Messung des Infarkt volumens durchgeführt.

2.3.1.5 Ermittlung des neuroprotektiven Effekts von Isofluran in Abhängigkeit von der Zeit bis zur MCAO

In dieser Versuchsreihe galt für alle Tiere eine Präkonditionierungsphase mit Isofluran für drei Stunden. Außer der Temperatur wurden keine weiteren physiologischen Parameter überwacht.

Die variable Größe dieses Experimentes war die Zeit vom Ende der Präkonditionierungsphase bis zur Okklusion der Arteria cerebri media (Middle cerebral arteri occlusion, MCAO). Es wurden die Zeitpunkte 0 h, 12 h, 24 h und 48 h untersucht (siehe Abbildung 6).

Gruppe	Anzahl der Tiere	Zeit bis zur MCAO
Kontrolle	13	24 Stunden
Isofluran 0 h	13	0 Stunden
Isofluran 12 h	13	12 Stunden
Isofluran 24 h	15	24 Stunden
Isofluran 48 h	15	48 Stunden

Tabelle 2: Präkonditionierung durch dreistündige Isofluranapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten. Den Ratten wurde Isofluran für drei Stunden appliziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde eine MCAO vorgenommen und das Infarktvolumen ermittelt.

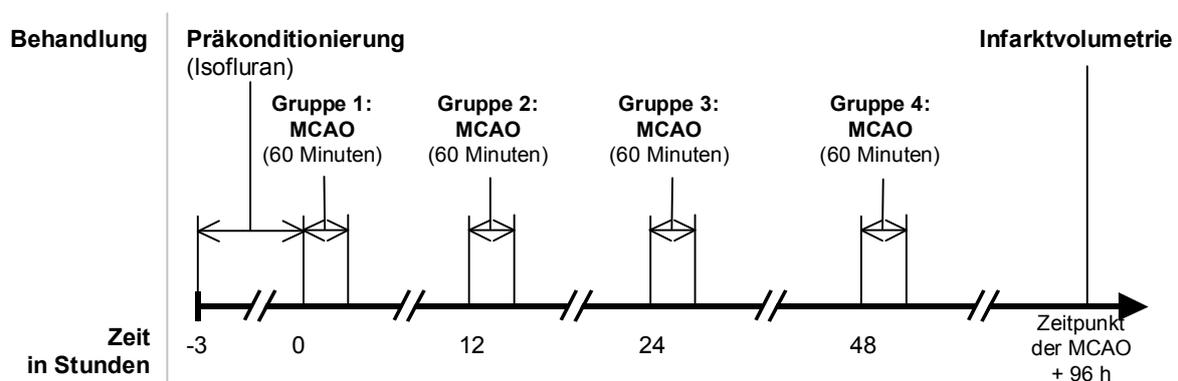


Abbildung 6: Protokoll zu Experimenten über Neuroprotektion durch Isofluranpräkonditionierung zu verschiedenen Zeitpunkten. Zu Beginn wurden Ratten drei Stunden mit Isofluran präkonditioniert, anschließend wurde bei den Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten eine MCAO durchgeführt. 96 Stunden nach Durchführung der MCAO wurden die Ratten dekapitiert und das Infarktvolumen gemessen.

2.3.1.6 Blockade der iNOS- Aktivität mit Aminoguanidin

Für die pharmakologische Blockade der iNOS- Aktivität mit Aminoguanidin wurde ein separates Experiment durchgeführt. Dazu wurden 200 mg/kg Körpergewicht Aminoguanidin in 0,9-prozentiger Kochsalzlösung gelöst und den Ratten intraperitoneal injiziert. In Behandlungsprotokollen verschiedener Studien wurde diese Menge von Aminoguanidin beschrieben, um die iNOS- Aktivität im Rattenhirn zu hemmen¹⁰⁴. Die Behandlung mit Aminoguanidin erfolgte direkt vor der Präkonditionierung sowie zwölf Stunden danach.

Die Kontrolltiere erhielten intraperitoneale Injektionen mit physiologischer Kochsalzlösung.

Bei allen Behandlungsgruppen wurde 24 Stunden nach Beendigung der dreistündigen Präkonditionierung bzw. Scheinbehandlung die MCAO durchgeführt (siehe Abbildung 7).

Gruppe	Anzahl der Tiere	Behandlung
Kontrolle + NaCl	11	Keine Präkonditionierung; 2 x 1 ml 0,9% NaCl i.p.
Kontrolle + Aminoguanidin	11	Keine Präkonditionierung; 2 x 200 mg/kg KG Aminoguanidin i.p.
Isofluran	8	Präkonditionierung mit Isofluran; 2 x 1 ml 0,9% NaCl i.p.
Isofluran + Aminoguanidin	8	Präkonditionierung mit Isofluran; 2 x 200 mg/kg KG Aminoguanidin i.p.

Tabelle 3: Hemmung der Präkonditionierung durch Aminoguanidin. Die Ratten wurden entweder mit Isofluran präkonditioniert oder als Kontrolltiere geführt. Bei einigen Tieren erfolgte die Applikation von Aminoguanidin intraperitoneal zur Hemmung von iNOS. 24 Stunden nach der Präkonditionierung wurde eine MCAO durchgeführt und die Infarktgröße ermittelt.

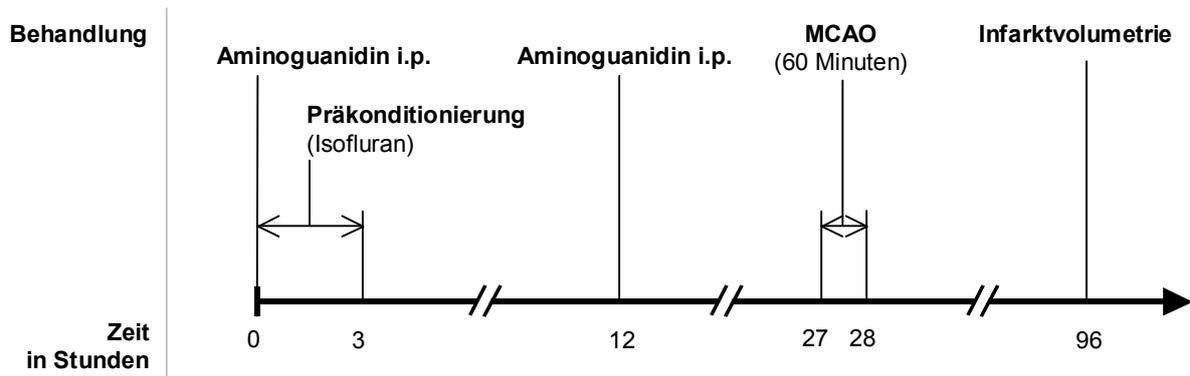


Abbildung 7: Protokoll zu Experimenten über Verhinderung von Neuroprotektion durch Hemmung von iNOS durch Aminoguanidin. Die Ratten wurden drei Stunden mit Isofluran präkonditioniert. Zu Beginn wurde Aminoguanidin appliziert. Zwölf Stunden später erfolgte eine zweite Applikation von Aminoguanidin. 24 Stunden nach Beendigung der Präkonditionierung wurde eine MCAO durchgeführt, 96 Stunden später wurden die Ratten dekapitiert und das Infarktvolumen gemessen.

2.3.2 Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO)

Die Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO) ist ein etabliertes tierexperimentelles Modell eines Schlaganfalls. Durch einen irreversiblen Verschluss der Arteria cerebri media und einer temporären Okklusion der Arteria carotis communis sinistra et dextra wird eine fokale zerebrale Ischämie induziert.

Vor Beginn der Operation wurden die Tiere von einer unbeteiligten dritten Person mittels eines Zahlenkodes verblindet. Mit einem wasserfesten Stift wurde die Kodierung auf dem Schwanz der Tiere markiert. Für den Operateur war nicht ersichtlich, wie die Tiere vorher behandelt wurden und welcher Gruppe sie angehörten.

2.3.2.1 Einleitung der Operation zur MCAO

Die Tiere erhalten eine Initialnarkose mit Isofluran von 4 % für 3-5 Minuten in einem Gasgemisch, bestehend aus Sauerstoff und Lachgas im Verhältnis von 1:2. Mit einem konstanten Fluss von 500 ml/min wird den Ratten dieses Gasgemisch über einen eng anliegenden Schnauzenhalter appliziert. Nach Sicherstellung einer ausreichenden Anästhesie der Tiere wird der Anteil von Isofluran auf 1,4 % eingestellt.

Bei allen Ratten werden während der MCAO die physiologischen Parameter überwacht. Dazu wird die Schwanzarterie ca. 1-2 cm distal des Schwanzansatzes punktiert, wie in Abschnitt 2.3.1.3 beschrieben. Protokolliert wurden der arterielle PaO₂, PaCO₂, pH-

Wert, Glukose und Blutdruck sowie die Körpertemperatur direkt nach Anlage des arteriellen Zugangs, zu Beginn der MCAO, 60 Minuten danach und bei Beenden des Experiments.

2.3.2.2 Transiente Okklusion der Arteria carotis communis dextra und sinistra

Aufgrund der ausgeprägten Kollateralisation der Hirngefäße bei der Wistar-Ratte ist selbst bei einem distalen Verschluss eines größeren Gefäßes ein Infarkt nicht sicher zu erwarten. So bewirkt die alleinige Okklusion der Arteria cerebri media kaum gleichmäßig reproduzierbare Infarkte¹⁰⁵. Brint et al.¹⁰⁶ konnten in ihren Studien über Rattenmodelle zeigen, dass der gleichzeitige Verschluss der ipsilateralen Arteria carotis communis und Arteria cerebri media größere und besser reproduzierbare neokortikale Infarkte aufweist. Dieses Modell wurde in dieser Arbeit verwendet, die MCAO wurde mit dem beidseitigen reversiblen Verschluss der Aa. carot. communes für 60 Minuten durchgeführt.

Ventral des Halses wurde mit einer Schere medial ein ca. zwei cm langer Schnitt geführt. Mit zwei atraumatischen Pinzetten werden die medialen Halsmuskeln und der Thymus zur Seite präpariert. Rechts und links der Trachea wurden die Aa. carotis communis dextra und sinistra aufgesucht und atraumatisch vom N. vagus freipräpariert. Die Aa. carot. communes werden proximal der Bifurkation durch Schlingen verschlossen. Diese speziellen selbsthergestellten Schlingen aus dünnen Silikonbändern lassen sich, ohne die Gefäße zu beschädigen, leicht öffnen und schließen.

2.3.2.3 Präparation und Okklusion der Arteria cerebri media: die MCAO

Es wird die rechte A. cerebri media okkludiert (siehe auch Abbildung 8).

Mit einem Skalpell wurde die Kopfhaut medial eröffnet und der rechte Musculus temporalis vom Schädelknochen abpräpariert. Um einen freien Zugriff auf das Präparationsgebiet für die MCAO zu erhalten, wurde mit einer Pinzette der Processus corioideus des Unterkiefers entfernt. Für die folgenden Präparationsschritte wird ein Operationsmikroskop mit einer bis zu 40-fachen Vergrößerung benötigt. Mit einem Bohrer wurde der Knochen subtemporal etwa auf der Höhe der Fissura rhinalis unter ständiger Kühlung mit Kochsalzlösung vorsichtig ausgefräst und mit einer Pinzette abgeschält. Die Dura wurde mit einer scharfen, modifizierten Kanüle einer Insulinspritze

über dem Hauptstamm der A. cerebri media eröffnet. Mit einem Häkchen (Wolframdraht, Durchmesser 80 µm), geführt mit Hilfe eines Mikromanipulators, wurde die A. cerebri media aufgenommen und soweit herausgehoben, bis kein Kontakt mehr zu den umliegenden Strukturen bestand. Dann wurde die freipräparierte Arterie mit einem Thermokoagulator kauterisiert. Nachdem optisch sichergestellt war, dass der Blutfluss der A. cerebri media unterbrochen ist, wurden die Aa. carot. communes dextra und sinistra mit Hilfe der Carotisschlingen verschlossen wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Die Kopfwunde wurde vernäht und lokalanästhetisch mit Xylocaingel behandelt. Nach 60 Minuten erfolgte die Reperfusion. Dabei wurden die Schlingen an der rechten und linken A. carotis communis gelöst. Die Halswunde wurde vernäht und mit Xylocaingel behandelt. Der Katheter wurde entfernt und die Ratte zurück in ihrem Käfig gelegt. Bis zum Erwachen blieb die Ratte unter Beobachtung. Die Körpertemperatur wurde für weitere zwei Stunden kontrolliert.

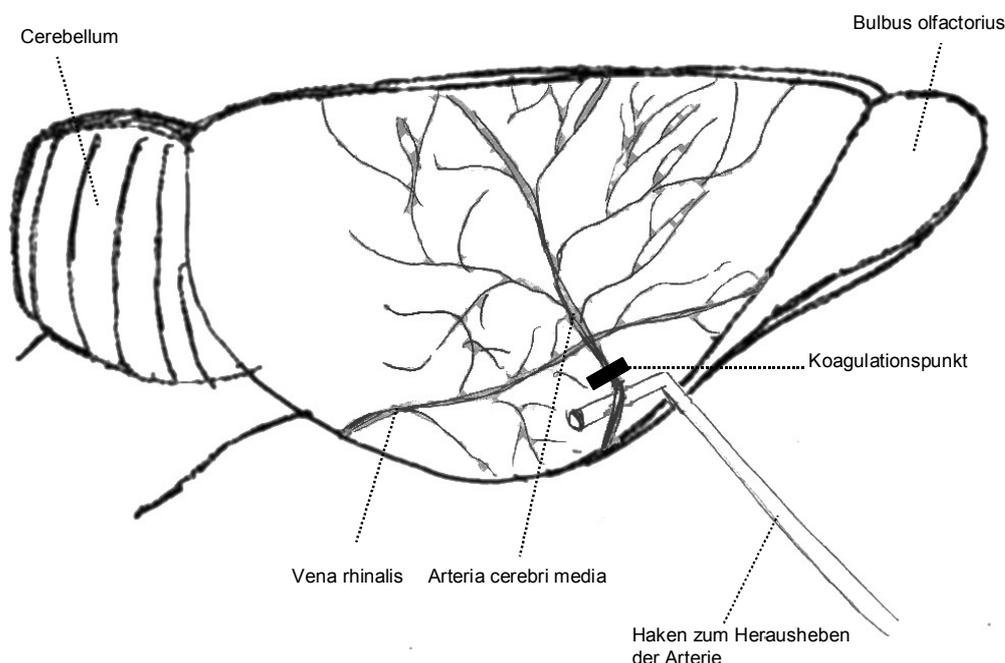


Abbildung 8: Darstellung der Induktion der Ischämie bei den Ratten. Die Arteria cerebri media wird freipräpariert und mittels eines Hakens angehoben. Unterhalb der Vena rhinalis wird die Arterie koaguliert.

2.3.3 Ermittlung des Infarktvolumens

Vier Tage nach der MCAO wurden die Tiere unter Narkose mit Halothan dekapitiert. Die Gehirne wurden herauspräpariert und in $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühltem 2-Methylbutan schockgefroren. Mit dem Cryostat wurden die Hirne bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $40\text{ }\mu\text{m}$ dicke Gewebeschnitte im Intervall von $800\text{ }\mu\text{m}$ geschnitten. Diese Schnitte wurden auf Objektträgern aufgetragen und luftgetrocknet.

2.3.3.1 Die Vanadium-Fuchsinsäure (VAF) Färbung

Die Färbung und das Protokoll folgen der Beschreibung von I. Victorov¹⁰⁷.

Die Vanadium-Fuchsinsäure-Färbung dient der Darstellung von nekrotischen und azidophilen Gewebe. Die Ischämiegebiete erscheinen nach der Färbung rot und weisen einen starken Kontrast gegenüber dem intakten Gewebe auf.

Die Färbung mit VAF und Fixierung der Gewebeschnitte wurde wie folgt durchgeführt:

1. Die Gewebeschnitte wurden für 13-15 Minuten in VAF- Lösung inkubiert
2. Spülen mit destillierten Wasser
3. 5-10 min trocknen lassen
4. 3 x spülen mit 70 % Ethanol
5. 3 x spülen mit 90 % Ethanol
6. 3 x spülen mit absolutem Ethanol
7. 3 x spülen mit Rotihistol
8. in Kanadabalsam einbetten

2.3.3.2 Infarktvolumetrie

Die histologischen Schnitte wurden mit einem Diascanner digitalisiert. Mit Hilfe eines Personal Computer und dem Bildverarbeitungsprogramms SigmaScan Pro 4.0 wurde zunächst bei jedem einzelnen gefärbten Gewebeschnitt die Fläche in mm^2 ermittelt. Bei Auswertung der histologischen Schnitte war dem Untersucher die Zugehörigkeit zu den Experimentgruppen weiterhin unbekannt. Die stark angefärbten Areale wurden markiert und vom Programm wurden die Flächen berechnet.

Die Summe der gemessenen Flächen (ca. 15-20) eines Gehirns wird mit 0,8 multipliziert (da der Abstand der bemessenen Gewebeschnitte 800 μm beträgt) und daraus das Infarktvolumen in mm^3 ermittelt.

Eine Korrektur des Infarktvolumens aufgrund eines Ödems war nicht notwendig, da vier Tage nach der MCAO kein Ödem mehr zu erwarten ist¹⁰⁸.



Abbildung 9: Beispiel einer VAF Färbung: Nach Durchführung einer MCAO wurden die Ratten vier Tage später getötet und eine histologische Untersuchung der Gehirne durchgeführt. Dazu wurden Serienschnitte der Gehirne angefertigt und mit einer VAF-Färbung gefärbt. Nekrotisches Gewebe färbte sich deutlich an (rechts ist das ischämische Areal zur Verdeutlichung blau markiert). Mittels der Software SigmaScan Pro 4.0 wurde die Fläche und über diese das Volumen der Nekrose bestimmt.

2.3.4 Western-Blot- Technik der kortikalen Gehirnabschnitte

Die Ratten wurden drei Stunden mit Isofluran präkonditioniert. Die kortikalen Gehirnanteile wurden zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (0 Stunden, 3 Stunden, 12 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden) nach der Präkonditionierung extrahiert.

Die Gewebestücke wurden in Lysepuffer gelegt, für 15 Minuten auf Eis gestellt und danach mit einem Glashomogenisator vollständig lysiert. Im Anschluss wurde das Lysat für 10 Minuten bei 27000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, davon 5 μl für die Protein-Konzentrationsbestimmung mit dem BCA-Reagenz verwendet. Der Rest wurde bis zum weiteren Verfahren bei -70 °C gelagert.

2.3.4.1 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Protein-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem BCA (Bicinhonic acid) Protein Assay Reagent Kit und wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers (Pierce) durchgeführt. 5 µl des Überstandes wurden mit 45 µl Aqua dest. verdünnt und mit 1 ml des BCA-Reagenz (BCA Protein Reagenz B: A = 1:50) versetzt. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von Serumalbumin in den Konzentrationen von 0; 0,001; 0,002; 0,004; 0,006; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075 µg/µl. Es wurden 50 µl jeder Serumalbuminlösung mit 1 ml BCA-Reagenz versetzt. Anschließend wurden alle Proben für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und jeweils in 1 ml Plastikküvetten überführt. Die optische Dichte wurde im ELISA- Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm ermittelt.

2.3.4.2 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte nach Anweisung des Protokolls von Laemmli et al.¹⁰⁹ (1970).

Zuerst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten der Elektrophoreseapparatur gegossen und mit 0,1 % SDS überschichtet. Nach Polymerisierung wurde die SDS-Lösung entfernt und mit der Sammelgellösung überschichtet. Ein Probenkamm wurde in die flüssige Lösung eingesetzt, so dass nach der Polymerisation des Gels Propentaschen entstanden. Das Gel wurde in die Gelkammer eingespannt und mit Laufpuffer überschichtet.

Vor dem Auftragen der Proben wurden diese 1:1 mit 2 x SDS- Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Es wurden 140 µg des Proteins pro Spalte aufgetragen und für ca. 30-45 Minuten bei 180 V getrennt.

Anschließend wurden die Gele aus der Kammer herausgenommen und für 5 Minuten in Transferpuffer eingelegt.

2.3.4.3 Western-Blot und spezifischer Proteinnachweis durch Antikörper

Der Transfer der aufgetrennten Proteine erfolgte auf Polyvinylidendifluoridmembranen (PVDF). Zunächst wurde die Membran für 5 Minuten in Methanol und Transferpuffer eingelegt, anschließend diese luftblasenfrei auf ein vorher mit Transferpuffer

vollgesogenes Whatman Papier in die Transferapparatur gelegt. Über die PVDF-Membran wurde das Gel geschichtet, darüber wird nochmals Whatman Papier gelegt und die Apparatur verschlossen. Der Transfer erfolgte bei 70 mA/4 V für zwei Stunden. Danach wurden die PVDF-Membranen für eine Stunde in Blockierungspuffer bei Raumtemperatur geblockt. Über Nacht bei 4 °C erfolgte die Inkubation mit primären Kaninchenantikörpern gegen iNOS-Protein (Anti-iNOS-IgG, sc-651) mit einem Titer von 1:250. Nachdem die PVDF-Membran durch viermaliges Spülen mit TBST gewaschen wurde, erfolgt für eine Stunde die Inkubation mit dem sekundären Antikörper gegen Kaninchen IgG, der mit Meerrettichperoxidase (HRP) (anti-rabbit-IgG-HRP, sc-2004) markiert ist, mit einem Titer von 1:1000. Danach wurden die PVDF-Membranen wieder durch viermaliges Spülen mit TBST gewaschen. In der Dunkelkammer erfolgte die Signaldetektion. Die PVDF-Membranen wurden mit Super Signal Ultra Chemiluminescence nach Anweisung des Herstellers für 4-5 Minuten inkubiert, die Signale wurden auf einem Röntgenfilm visualisiert. Die Filme wurden digitalisiert und mit der Densitometerfunktion der Software Scion Image 3b analysiert.

2.3.5 Die statistische Analyse

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung präsentiert. Die Signifikanzen der Infarkt volumina und die densitometrische Auswertung der Westernblotanalysen wurden mittels ANOVA Varianzanalyse berechnet. Der ungepaarte t-Test mit Bonferroni Korrektur wurde für den Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen angewandt, wenn sich signifikante Unterschiede mit ANOVA herausgestellt hatten. Als statistisch signifikant wurden p - Werte $< 0,05$ gewertet.