

Aus der Neurologischen Klinik
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neuroprotektion durch Präkonditionierung mit volatilen Anästhetika bei Ratten

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Diana Nogai, geb. Löwl

aus Chemnitz

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. U. Dirnagl
2. Prof. Dr. med. M. Schwaninger
3. Prof. Dr. med. G. Stoll

Datum der Promotion: 28.09.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Die zerebrale Ischämie	7
1.2	Pathophysiologie des ischämischen Hirninfarktes	10
1.3	Therapie des Schlaganfalls.....	12
1.4	Präkonditionierung und Ischämietoleranz	14
1.5	Mechanismen der Ischämietoleranz	15
1.6	Ischämietoleranz beim Menschen	17
1.7	Die induzierbare NO- Synthase (iNOS) und Stickstoffmonoxid (NO).....	18
1.8	iNOS und Präkonditionierung	20
1.9	Volatile Anästhetika	22
1.10	Volatile Anästhetika und Neuroprotektion.....	23
1.11	Hypothesen.....	24
2	Materialien und Methoden.....	25
2.1	Materialien	25
2.1.1	Antikörper und Proteine	25
2.1.2	Chemikalien	25
2.1.3	Geräte.....	26
2.1.4	Software.....	26
2.1.5	Sonstige Materialien	27
2.1.6	Puffer und Lösungen.....	28
2.2	Tiere.....	29

2.2.1	Ausschlusskriterien der Tiere.....	30
2.3	Methoden.....	31
2.3.1	Präkonditionierung.....	31
2.3.1.1	Präkonditionierung mit Isofluran und Halothan	31
2.3.1.2	Präkonditionierung mit Halothan und Sauerstoff.....	31
2.3.1.3	Überwachung der physiologischen Parameter	31
2.3.1.4	Kontrollexperimente	32
2.3.1.5	Ermittlung des neuroprotektiven Effekts von Isofluran in Abhängigkeit von der Zeit bis zur MCAO.....	34
2.3.1.6	Blockade der iNOS- Aktivität mit Aminoguanidin	35
2.3.2	Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO).....	36
2.3.2.1	Einleitung der Operation zur MCAO.....	36
2.3.2.2	Transiente Okklusion der Arteria carotis communis dextra und sinistra..	37
2.3.2.3	Präparation und Okklusion der Arteria cerebri media: die MCAO	37
2.3.3	Ermittlung des Infarktolumens.....	39
2.3.3.1	Die Vanadium-Fuchsinsäure (VAF) Färbung	39
2.3.3.2	Infarkt volumetrie	39
2.3.4	Western-Blot- Technik der kortikalen Gehirnabschnitte.....	40
2.3.4.1	Protein-Konzentrationsbestimmung	41
2.3.4.2	SDS Polyacrylamidgelelektrophorese.....	41
2.3.4.3	Western-Blot und spezifischer Proteinnachweis durch Antikörper.....	41
2.3.5	Die statistische Analyse	42

3	Ergebnisse	43
3.1	Physiologische Parameter während der Präkonditionierung mit volatilen Anästhetika	43
3.2	Physiologische Parameter während der MCAO.....	44
3.3	Präkonditionierung mit volatilen Anästhetika ist neuroprotektiv	46
3.3.1	Vergleich des neuroprotektiven Effektes von Halothan und Isofluran.....	46
3.3.2	Die Effektivität der Isofluranpräkonditionierung ist zeitabhängig.....	48
3.4	Anästhetische Präkonditionierung mit Isofluran induziert iNOS	49
3.5	Inhibierung der iNOS-Aktivität mit Aminoguanidin eliminiert die Neuroprotektion nach Präkonditionierung mit Isofluran	51
3.6	Anzahl der vom Experiment ausgeschlossenen Tiere	52
4	Diskussion.....	53
4.1	Präkonditionierung mit volatilen Anästhetika	53
4.2	Neuroprotektion durch Isofluran.....	55
4.3	Hypothesen zu Wirkmechanismen der anästhetischen Präkonditionierung durch volatile Anästhetika.....	56
4.3.1	Beeinflussung des zerebralen Metabolismus durch volatile Anästhetika	56
4.3.2	Beeinflussung des zellulären Metabolismus durch volatile Anästhetika..	58
4.4	Die induzierbare NO - Synthase und Neuroprotektion	60
4.4.1	Hypothesen des Wirkmechanismus von iNOS	61
4.5	Der klinische Ausblick.....	63
5	Zusammenfassung der Arbeit	64
6	Literaturverzeichnis.....	65

7	Anhang	81
7.1	Abkürzungen.....	81
7.2	Abbildungsverzeichnis	83
7.3	Tabellenverzeichnis	84
8	Publikationsliste	85
9	Selbständigkeitserklärung	86
10	Danksagung	87
11	Lebenslauf.....	88

5 Zusammenfassung der Arbeit

In dieser Doktorarbeit wurde der prolongierte neuroprotektive Effekt volatiler Anästhetika untersucht. Die Möglichkeit, die volatilen Anästhetika Isofluran und Halothan als Präkonditionierungsstimuli einzusetzen, um eine Ischämietoleranz auf einen subsequents ischämischen Insult zu induzieren, wurde *in vivo* an männlichen ausgewachsenen Wistarratten geprüft. Die Tiere wurden drei Stunden einer 1,2 %igen Halothan- oder 1,4 %igen Isoflurannarkose im atmosphärischen Luftgemisch ausgesetzt. Zusätzlich wurde aufgrund von Blutgasveränderungen während der Halothannarkose eine weitere Gruppe eingeführt, die zusätzlich zu Halothan und Luftgemisch 10 % Sauerstoff erhielt. Nach 24 Stunden wurde eine Okklusion der Arteria cerebri media bei den Ratten durchgeführt und vier Tage danach das Infarktvolumen evaluiert. Eine Isofluranpräkonditionierung oder die Präkonditionierung mit Halothan und Sauerstoff führten zu einer signifikanten Verringerung des Infarktvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die alleinige Behandlung mit Halothan bewirkte keine signifikante Reduzierung des Infarktvolumens.

Der neuroprotektive Effekt von Isofluran war direkt nach Präkonditionierung nachweisbar und hielt bis 24 Stunden nach Präkonditionierung an.

Mittels Western-Blot-Analysen von homogenisierten Anteilen des Neokortex von Ratten wurde eine signifikante Expression der induzierbaren NO Synthase (iNOS) 18 Stunden bis 24 Stunden nach Präkonditionierung nachgewiesen.

Hemmung der iNOS-Aktivität mit Aminoguanidin *in vivo* führte zu einem Verlust des neuroprotektiven Effektes von Isofluran. Somit scheint iNOS ein wichtiger Vermittler der durch Präkonditionierung induzierten Ischämietoleranz zu sein.

Aufgrund der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse sind weitere Untersuchungen sinnvoll, die die Mechanismen der Präkonditionierung aufklären und eventuell zu klinisch durchführbaren Methoden der Neuroprotektion als Therapie oder Prophylaxe von ischämischen Schlaganfällen führen.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

AG	Aminoguanidin
AP-1	Aktivator-Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Arbitrary Units</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CCAO	Verschluss der A. carotis communis (common carotid artery occlusion)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eNOS	endotheliale NO- Synthase
ETDA	Ethylendiamintetraessigsäure
h	Stunde
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
HIV	Humanes Immunodefizienzvirus
HSP	Hitzeschockproteine
IL-1	Interleukin-1
iNOS	induzierbare NO-Synthase
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MABD	Mittlerer arterieller Blutdruck
MAPK	<i>Mitogen activated Protein Kinase</i>
MCAO	<i>Middle cerebral artery occlusion</i> (Verschluss der A. cerebri media)
mg/kgKG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>

NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nukleärer Faktor kappa B
NH ₄ VO ₃	Ammonium-Metavanadat
NMDA-R	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren
nNOS	neuronale NO- Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
OGD	Sauerstoff-Glukose-Deprivation (<i>oxygen glukose deprivation</i>)
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PVDF	Polyvinylidifluoridmembranen
Ras/Erk	p21 _{ras} /extrazellulär regulierte Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TIA	Transitorische Ischämische Attacke
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
V	Volumen
VAF	Vanadium-Acid Fuchsin
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Entwicklung des endgültigen Infarktareals	9
Abbildung 2: Kaskade der pathophysiologischen Ereignisse nach zerebraler Ischämie.....	12
Abbildung 3: Sensoren, Transduktoren und Effektoren der Ischämietoleranz.....	16
Abbildung 4: Intrazelluläre Signaltransduktion bei der Präkonditionierung.....	21
Abbildung 5: Protokoll zu Experimenten über Präkonditionierung mit volatilen Anästhetika	33
Abbildung 6: Protokoll zu Experimenten über Neuroprotektion durch Isofluranpräkonditionierung zu verschiedenen Zeitpunkten	34
Abbildung 7: Protokoll zu Experimenten über Verhinderung von Neuroprotektion durch Hemmung von iNOS durch Aminoguanidin	36
Abbildung 8: Darstellung der Induktion der Ischämie bei den Ratten.	38
Abbildung 9: Beispiel einer VAF Färbung.	40
Abbildung 10: Präkonditionierung mit volatilen Anästhetika führen zu verminderter Infarktgröße.....	47
Abbildung 11: Zeitverlauf der neuroprotektiven Wirkung durch Präkonditionierung mit Isofluran.....	48
Abbildung 12: Western-Blot-Analysen der kortikalen Gehirnannteile auf iNOS zu verschiedenen Zeitpunkten.....	50
Abbildung 13: Densiometrische Analysen des Western-Blots	50
Abbildung 14: iNOS ist ein Vermittler der Neuroprotektion durch Präkonditionierung mit Isofluran	51

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl der Tiere in den Untersuchungsgruppen und Anzahl der Tiere mit zusätzlicher Überwachung der physiologischen Parameter.....	33
Tabelle 2: Präkonditionierung durch drei-stündige Isofluranapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten.	34
Tabelle 3: Hemmung der Präkonditionierung durch Aminoguanidin.	35
Tabelle 4: Physiologische Parameter während der Präkonditionierungsphase.	43
Tabelle 5: Physiologische Parameter während der MCAO.	45
Tabelle 6: Physiologische Parameter während der MCAO bei Behandlung der Ratten mit Aminoguanidin (AG).....	46

8 Publikationen

Kapinya K. J., Lowl D., Futterer C., Maurer M., Waschke K.F., Isaev N.K., Dirnagl U.

Tolerance against ischemic neuronal injury can be induced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependend. Stroke 2002 Jul; 33:1889-1898

Prass K., Scharff A, Ruscher K, Lowl D, Muselmann C, Victorov I, Kapinya K, Dirnagl U, Meisel A.

Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin.

Stroke. 2003 Aug;34(8):1981-1986

9 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Diana Nogai, geborene Löwl, geboren am 7. August 1976, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Alle benutzten Hilfsmittel, die Literatur sowie die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften sind vollständig angegeben.

Berlin, den 28.09.2006

Diana Nogai

10 Danksagung

Krisztian Kapinya

Ulrich Dirnagl

Ute Lindauer

Konstantin Prass

Dorette Freyer

Renate Gusinda

Dem gesamten Team der Experimentellen Neurologie

Hans Richter

Meine Familie

Besonderen Dank an Axel Nogai

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version nicht mit veröffentlicht.