

Einleitung

Eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen in den Industriestaaten ist der Schlaganfall. Diese Erkrankung steht nach Herz- und Krebserkrankungen in der Todesursachenstatistik in Deutschland mit 11,4 % an dritter Stelle. Bei einer mit dem Lebensalter steigender Inzidenz von jährlich 300 - 500 Erkrankungen pro 100000 Einwohner und einer Prävalenz von 800000 Erkrankungen in Deutschland ist der Schlaganfall allgegenwärtig. Die Folgen reichen von temporären Funktionsverlusten über bleibende Behinderungen bis hin zu letalen Verläufen. Der Schlaganfall ist einer der häufigsten Ursachen von Invalidität.

Circa 80 % der Schlaganfälle werden durch zerebrale Ischämie verursacht. Neben der Erforschung pathophysiologischer Grundlagen des ischämischen Schlaganfalls gilt es auch, erfolgreiche Therapiestrategien zu entwickeln. Ein in diesem Zusammenhang interessantes Phänomen ist die Präkonditionierung, mit welcher Ischämietoleranz und somit Neuroprotektion während einer Ischämie induziert werden kann. Auch wenn Präkonditionierung in der neurologischen Klinik bisher noch keine realistische Therapieoption darstellt, so ist die Aufklärung der Wirkmechanismen dieses Phänomens ein wichtiger Bestandteil in der Grundlagenforschung.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Neuroprotektion, die durch Präkonditionierung mit volatilen Anästhetika bei Ratten induziert wird. Weiterführend wird die Bedeutung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) im Rahmen der Präkonditionierung untersucht.

1.1 Die zerebrale Ischämie

Um die Stoffwechselaktivität des Gehirns aufrechterhalten zu können, ist eine ausreichend hohe Versorgung mit Sauerstoff und Glukose erforderlich. Ca. 15 % des Herzzeitvolumens, dies sind 1,2 l Blut pro Minute, entfällt beim Menschen auf das Hirngewebe.

Durch den Bayliss-Effekt wird aufgrund der Autoregulation der Hirngefäße selbst bei größeren Blutdruckschwankungen eine konstante Durchblutung des Gehirns gewährleistet. Neben dieser vaskulären Autoregulation des Gehirns besteht zwischen dem normalen zerebralen Blutfluss (CBF) bei einem gesunden Erwachsenen, der etwa 60-80 ml pro Minute pro 100 g Hirngewebe beträgt, und dem zerebralen Blutfluss, bei

dem es zu neurologischen Funktionsstörungen kommt (ab 20 ml/100 g/min)^{1;2}, eine breite zerebrale Reserve.

Mit dem CBF-Wert von 20 ml/100 g/min ist die Ischämieschwelle definiert, bei deren Unterschreiten es zum Funktionsausfall von neuronalem Gewebe kommt. Es wird dabei zwischen der globalen zerebralen Ischämie und der fokalen zerebralen Ischämie unterschieden. Die globale zerebrale Ischämie betrifft das gesamte Gehirn, welches z. B. aufgrund eines Herz-Kreislauf-Versagens nicht mehr ausreichend durchblutet wird.

Die fokale zerebrale Ischämie ist beschränkt auf eine Hirnregion, deren Nährstoffbedarf nicht mehr ausreichend gedeckt wird. Dies kann beispielsweise durch Stenosierung oder thrombotischen Verschluss der versorgenden Hirnarterie hervorgerufen werden.

Neben kompletten Unterbrechungen der Nährstoffzufuhr kann ein Rest der Durchblutung erhalten bleiben. Dies wird durch den Begriff der relativen Ischämie beschrieben. Hier ist trotz vorhandener Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr ein Missverhältnis zwischen Angebot und Bedarf vorhanden. Bei steigendem Energiebedarf sind die am weitesten distal von der versorgenden Arterie gelegenen Gebiete in ihrer Integrität bedroht.

Die Dauer der Ischämie hat dabei wesentlichen Einfluss auf das langfristige Resultat einer solchen Unterversorgung. Hierbei wird die temporäre Ischämie von der permanent anhaltenden Ischämie abgegrenzt.

Eine permanente Ischämie bedeutet, dass es in einem bestimmten Versorgungsgebiet zu einem vollständigen und anhaltenden Sistieren der Durchblutung kommt. Im Kern des Ischämiegebietes besteht ein zerebraler Blutfluss von weniger als 20 % des Normalwertes. Dies führt zu Gewebnekrosen, welche als Infarkt bezeichnet werden und die einen irreversiblen Funktions- und Strukturverlust für das betroffene Gewebe bedeuten.

Im Gegensatz dazu steht die temporäre Ischämie, bei der nach einem zeitlichen Intervall wieder eine ausreichende Nährstoffversorgung erreicht wird. Wenn dies innerhalb weniger Minuten geschieht, können die Funktionsstörungen noch reversibel sein. Klinisch äußert sich dieses Phänomen als Transitorische Ischämische Attacke (TIA).

Zwischen dem Infarktgebiet und dem Hirngewebe, das nicht von der Ischämie betroffen ist, befindet sich der ischämische „Halbschatten“. Dieses Gebiet wird Penumbra genannt. Das Gewebe der Penumbra ist partiell ischämisch geschädigt und in seiner Funktion gestört, der Energiemetabolismus bleibt aber teilweise erhalten. Bricht dieser

Energiemetabolismus zusammen, so expandiert das Infarktgebiet im Bereich der Penumbra (siehe Abbildung 1). Während eine Reduktion der Gewebnekrosen im Infarktkern nach stattgehabter zerebraler Ischämie nicht möglich ist, kann durch protektive Prozesse in der Penumbra die endgültige Ausdehnung eines Infarktes verringert werden. Hieraus ergibt sich ein mögliches Potential für therapeutische Interventionen.

Entwicklung des endgültigen Infarktareals

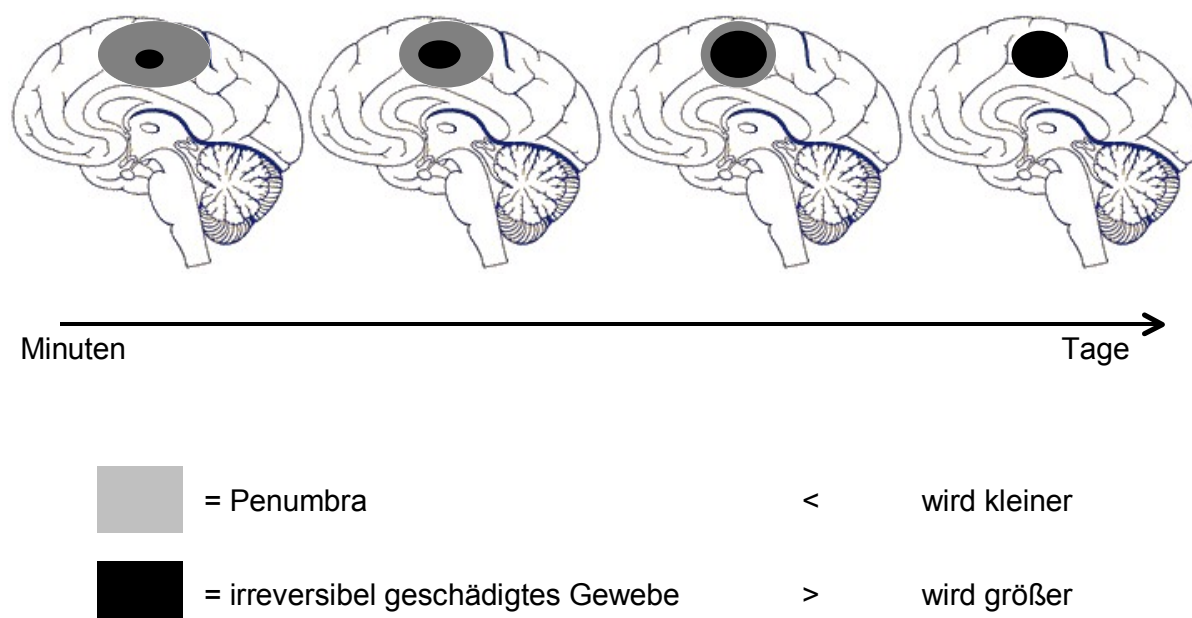


Abbildung 1: Schema der Entwicklung des endgültigen Infarktareals: Zunächst ist der Infarktkern durch die Ischämie irreversibel geschädigt, während es in der Penumbra noch Stoffwechselaktivität gibt. Bei Ausbleiben einer Verbesserung der Nährstoffversorgung in dem entsprechenden Gebiet dehnt sich der Infarktkern durch Peri-Infarkt-Depolarisationen und Akkumulation toxischer Substanzen allerdings weiter aus (siehe Text).

1.2 Pathophysiologie des ischämischen Hirninfarktes

Nach Eintritt der zerebralen Ischämie kommt es zu pathologischen Abläufen, die wenige Minuten bis mehrere Tage anhalten (siehe Abbildung 2). Eingeleitet wird die Schadenssequenz mit der Phase der Exzitotoxizität. Dieser folgen zeitlich überlappend die Phasen der Periinfarkt-Depolarisationen, der Inflammation und der Apoptose.

Während der Phase der Exzitotoxizität kommt es primär zum Versagen des Funktionsstoffwechsels. Das bedeutet, dass die Ionenpumpen, insbesondere die Na/K-ATPasen, die den Ionengradienten und somit das Membranpotential aufrecht erhalten, aufgrund des Mangels an Glukose und Sauerstoff nicht mehr ausreichend mit ATP versorgt werden. Der Ionengradient bricht zusammen und es kommt zum Verlust des Membranpotentials³ mit konsekutiver Depolarisation der Zelle. Diese Depolarisation hat eine Aktivierung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen zur Folge. Exzitatorische Transmitter, insbesondere Glutamat, werden in den synaptischen Spalt freigesetzt, akkumulieren in unphysiologisch hoher Konzentration und aktivieren auch bei den umliegenden Neuronen ligandenabhängige NMDA- Rezeptoren für metabotrope Natrium- und Kalziumkanäle. Intrazelluläre Akkumulation von Natrium und Chlorid führt zum Wassereinstrom mit Entwicklung eines zytotoxischen Ödems und schließlich zur Lyse der betroffenen Zellen. Der Einstrom von Kalzium in die Zelle führt zur Enzyminduktion von Proteasen, Proteinkinasen und Phospholipasen. Diese aktivieren die Bildung freier Fettsäuren, Radikale und Stickoxid (NO). Stickoxid und freie Radikale greifen die Zellmembran und die Mitochondrien an, welches zur Akkumulation dieser Schadstoffe in der Zelle und zur Schädigung der DNA führt^{1:4-6}.

Die Elimination der exzitatorischen Transmitter im synaptischen Spalt und die Repolarisation der Zelle erfordern einen hohen Energieaufwand. Im Ischämiekern führt der Energiemangel zu anoxischen Depolarisationen ohne Repolarisation. In Bereichen, in denen der Energiemetabolismus noch teilweise erhalten ist, speziell in der Penumbra, wird die Repolarisation erreicht. Dieser Zustand ist jedoch aufgrund des bestehenden relativen Energiemangels sehr instabil, so dass weitere Depolarisationen folgen. Diese Periinfarkt-Depolarisationen treten oszillierend auf und können sich noch mehreren Stunden nach dem ischämischen Insult wiederholen⁷. Der hieraus resultierende Energiemehrbedarf führt zu weiterer Schädigung der Zellen; je öfter

solche Periinfarkt-Depolarisationen erfolgen, um so größer ist der Ischämieschaden des Infarktgebietes⁸.

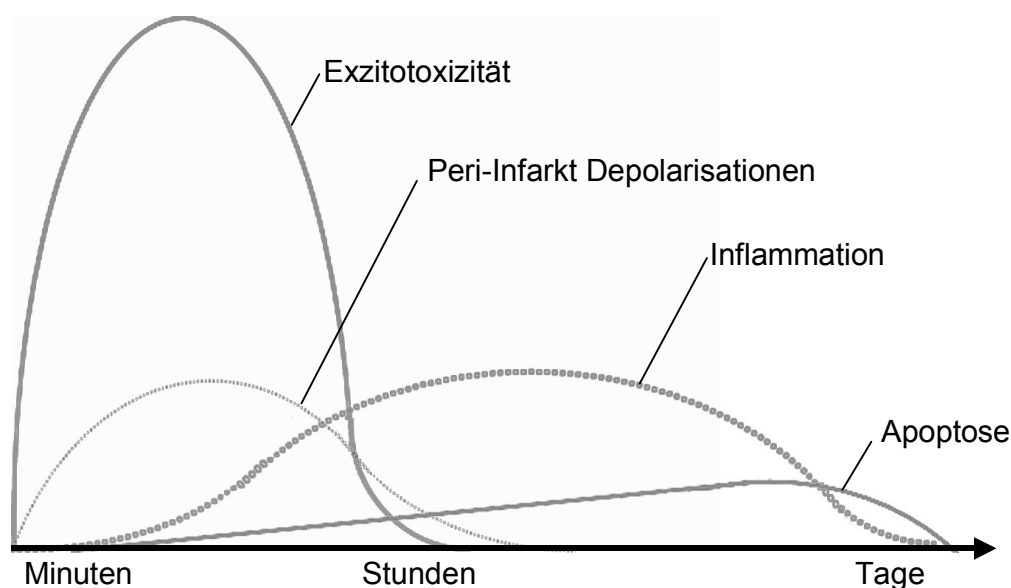
Schädigung der Zelle durch Radikale, Exzitotoxizität und Hypoxie induzieren die Phase der Inflammation, die bereits wenige Minuten nach dem ischämischen Insult eintritt und bis zu mehreren Tagen danach anhält. In der Frühphase werden Entzündungsmediatoren freigesetzt, die zur Aktivierung der Mikroglia und zur Leukozyteninfiltration in das geschädigte Gewebe führen. Hier bewirkt unter anderem das Einwandern von Leukozyten in und um das Gebiet der Ischämie eine Störung der zerebralen Mikrozirkulation⁹. Außerdem werden durch Granulozyten toxische Zwischenprodukte freigesetzt. Besonders wichtig scheint hierbei die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und die Cyclooxygenase-2 (COX-2) zu sein, welche die Entstehung von NO bzw. von Superoxidanionen (Radikale) und toxischen Prostanoiden (ungesättigte freie Fettsäuren) fördern^{6;10}. Diese tragen zusätzlich zur Schädigung der Zellstrukturen bei¹¹.

Die Relevanz der Inflammation für die Pathogenese der Ischämie wurde in Experimenten belegt, in denen in Schlaganfallmodellen eine experimentelle Neutropenie induziert oder die Leukozyteninfiltration in das Ischämiegebiet verhindert wird^{12;13}. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass der durch eine Ischämie hervorgerufene Schaden reduziert wurde.

Aufgrund dieser Schadenskaskaden sterben Hirnzellen durch Apoptose oder Nekrose ab. Die Art des Zelltods wird bestimmt durch das Ausmaß der Zellschädigung. Die Apoptose ist ein aktiver, von der Zelle ausgehender Zelltodmechanismus, der nach einem programmierten physiologischen Mechanismus verzögert erfolgt. Dieses muss von der Nekrose abgegrenzt werden, welche akut und passiv auftritt. Der Gewebeuntergang durch Nekrose erfolgt hauptsächlich im Kern des Infarktgebietes, wo aufgrund der Stärke der Ischämie die Exzitotoxizität direkt zum Zelltod führt. Im Gegensatz dazu erfolgt die Apoptose in Territorien, welche weniger von der Ischämie betroffen sind, zum Beispiel in der Penumbra. Intrazellulär erfolgt nach Aktivierung membranständiger Rezeptorkomplexe die Expression und Aktivierung von Caspasen, die u.a. durch Endonukleasenaktivierung zur Degradation des Kernchromatins führen. Es folgen irreversible Zytoplasmaschädigungen mit Kalziumsequestration in den Mitochondrien und Lysosomen. Das Zisternensystem des endoplasmatischen Retikulums dilatiert und fragmentiert. Die Neuronen verlieren ihre Dendriten und Axone,

aus der Zelloberfläche stülpen sich Zytoplasmabläschen heraus, die sich als Apoptosekörperchen ablösen und phagozytiert werden.

Kaskade der pathophysiologischen Ereignisse nach zerebraler Ischämie



Nach Dirnagl¹¹

Abbildung 2: Kaskade der pathophysiologischen Ereignisse nach zerebraler Ischämie. Bei Unterbrechung der Nährstoffversorgung kommt es innerhalb von Minuten im betroffenen Areal durch Exzitotoxizität zu Zellschädigungen. Durch die Peri-Infarkt-Depolarisationen und die später einsetzende Inflammation wird umliegendes Gewebe geschädigt und geht konsekutiv in Apoptose.

1.3 Therapie des Schlaganfalls

Die Erkenntnisse, dass die endgültige Ausdehnung eines Infarktes durch Rettung von Gewebe in der Penumbra wesentlich verkleinert werden kann, haben zu der notfallmäßigen Behandlung des Schlaganfalls geführt. So wurde beispielsweise durch die Einrichtung von auf Schlaganfälle spezialisierte Stationen (sogenannte „Stroke units“) in den letzten Jahren die schnelle und spezialisierte primäre Versorgung von Schlaganfällen vorangetrieben. Die Maßnahmen, die hierbei ergriffen werden, bestehen zum einen darin, die Vitalfunktionen zu sichern (die Kontrolle der Atmung, des Kreislaufes, des Wasser- und Elektrolythaushaltes, des Blutzuckers und der

Temperatur sind obligat), zum anderen gilt es auch, einen optimalen zerebralen Perfusionsdruck sicherzustellen. Dabei wird die Aufrechterhaltung eines hochnormalen Blutdruckes angestrebt^{14;15}. Neben Hypo- und Hyperglykämie ist auch Fieber prognostisch ungünstig¹⁴⁻¹⁶. Erhöhte Temperaturen im Gehirn führen zu einem erhöhten Stoffwechselumsatz, da es zu einer vermehrten Akkumulation von toxischen Stoffwechselprodukten kommt und diese den ischämischen Schaden vergrößern^{15;17}. Die Senkung der erhöhten Körpertemperatur durch Paracetamol oder Metamizol führen somit zu einer Protektion des Gehirns¹⁸.

Bei Ausschluss einer Blutung oder eines früheren ausgedehnten Infarkts im CT führt außerdem eine schnelle Revaskularisierung thrombotisch oder embolisch verschlossener Gefäße zu einer verbesserten Prognose des Patienten¹⁹. Das Zeitfenster für eine erfolgreiche Lyse ist jedoch sehr klein und beschränkt sich auf die ersten drei Stunden nach Ischämiebeginn²⁰. Deswegen können nur maximal 3-5 % der Schlaganfallpatienten erfolgreich lysiert werden.

Bei Hirnembolien sollten eine Antikoagulation mit Heparin und eine überlappende Rezidivprophylaxe mit Cumarinen erfolgen.

Als Ziel der Therapie steht schließlich, je nach Ausmaß der Schädigung durch den Infarkt, die Rehabilitation und die weitestgehende Wiedereingliederung des Patienten in den Alltag.

Das Risiko eines Schlaganfalls ist nach dem Erleiden eines ersten Apoplex erhöht. Patienten sollten daher im Rahmen der Sekundärprophylaxe mit Thrombozytenaggregationshemmern wie Acetylsalicylsäure oder Dipyridamol therapiert werden, um das sekundäre Schlaganfallrisiko zu mindern. Ebenso wichtig ist das Vermeiden von Risikofaktoren. So sollte ein Nikotinabusus beendet werden, der Blutzucker bei Diabetes mellitus und der Blutdruck bei Hypertonie auf physiologische Werte eingestellt werden.

All diese Ansätze sind allerdings sehr unspezifisch. Zur gezielteren Therapie werden neue Behandlungsansätze angestrebt. Voraussetzung dafür ist die Erforschung der Pathomechanismen des ischämischen Schlaganfalls. Angesichts der Komplexität der Schadensmechanismen ist es jedoch bereits eine große Herausforderung, die klinisch relevanten Schadensmechanismen zu identifizieren und Angriffspunkte möglicher therapeutischer Strategien abzuleiten.

1.4 Präkonditionierung und Ischämietoleranz

Janoff²¹ entwickelte die Hypothese, dass die Wirkung eines Stimulus je nach Dosis protektiv oder destruktiv sein kann. Geringe Dosen eines potentiell schädlichen Reizes führen zu protektiven Mechanismen im Organismus. Für dieses Phänomen führte er die Begriffe „Präkonditionierung“ und „Toleranz“ ein.

1964 wurde analog dazu beobachtet, dass eine kurzdauernden Hypoxie im Gehirn zu einer Art Resistenz gegen eine folgende, länger dauernde Hypoxie führt²². Ratten, die vorher Episoden von kurzen hypoxischen Zuständen ausgesetzt waren, konnten eine 90 Sekunden anhaltende komplette Anoxie überleben. Nicht behandelte Tiere überlebten nur bis zu 60 Sekunden Anoxie. Kitagawa et al.²³ konnten 1990 tierexperimentell die Induktion einer Ischämietoleranz in Wüstenrennmäusen zeigen. Zwei zweiminütige Verschlüsse beider Aa. carotis communis im Intervall von 24 Stunden bewirkten noch keinen signifikanten Verlust von CA1-Neuronen im Hippokampus. Wurde 48 h später eine letale Ischämie von fünf Minuten induziert, so bewirkte die vorhergehende Behandlung für hippokampale Neurone eine komplette Protektion gegen den neuronalen Zelltod. Es folgten noch weitere Tiermodelle globaler Ischämie, die eine Induktion von Ischämietoleranz nachwiesen. Perez-Pinzon et al.²⁴, Heurteaux et al.²⁵ und Dowden et al.²⁶ sind einige Arbeitsgruppen, die mit verschiedenen Methoden zeigen konnten, dass ein vorhergehender subletaler Stress neuroprotektiv auf einen folgenden ischämischen Zustand wirken kann. Allen genannten Modellen ist gemein, dass ein Stimulus dem ischämischen Insult vorangeht. Dieser Stimulus ist ein subletaler Stress, welcher die Zellen nicht schädigt, aber einen Schutz gegen die nachfolgende tödliche Substratdeprivation induziert.

Ischämietoleranz kann durch multiple Stimuli induziert werden. So sind neben Hypoxie als präkonditionierender Stimulus unter anderem hyperbare Oxygenierung²⁷, Hyperthermie²⁸, Hypothermie²⁹ und Inflammation³⁰ Auslöser der ischämischen Toleranz. Die Vielzahl der auslösenden Stimuli lässt auf einen unspezifischen endogenen Protektionsmechanismus schließen. Tatsächlich gilt die Ischämietoleranz als eine archetypische, unspezifische Stressantwort³¹. Viele Erkrankungen des ZNS teilen gemeinsame Schadensmechanismen. Da die molekularen Mechanismen der Zellschädigung weitestgehend stereotypisch ablaufen, kann die Induktion auch zu Toleranz in anderen Organen des Organismus führen. Der Gewebeschaden durch Ischämie, Epilepsie oder Inflammation ist ein Resultat komplexer pathophysiologischer

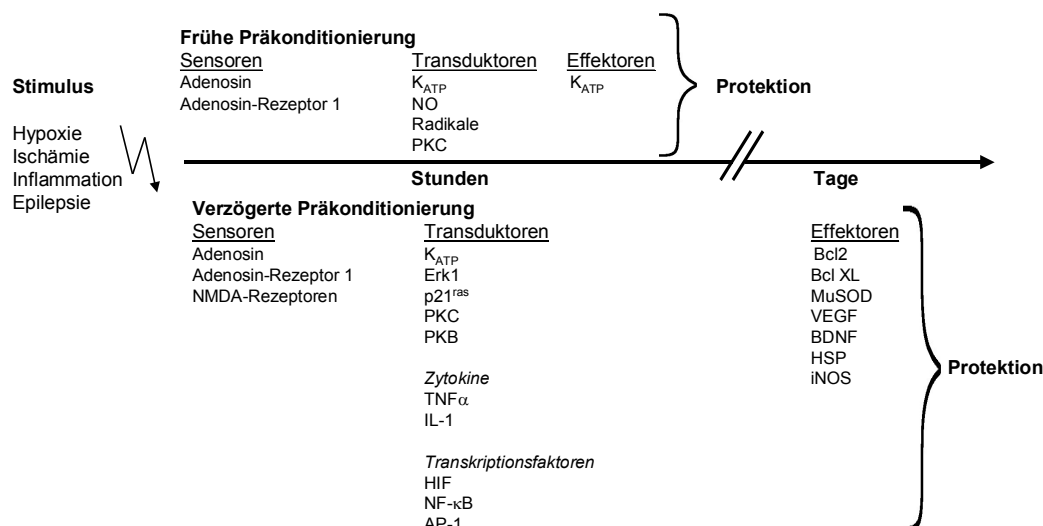
Kaskaden, die Produkte der Schadensmechanismen können ihrerseits wiederum auch Induktoren der Ischämietoleranz sein.

1.5 Mechanismen der Ischämietoleranz

Man unterscheidet die frühe, „klassische“ Präkonditionierung und die späte, verzögerte Präkonditionierung.

Die klassische Präkonditionierung tritt 5 bis 120 Minuten nach Stimulus auf und ist eine unmittelbare Antwort, die u. a. auf die Aktivierung von G-gekoppelten Membranrezeptoren und nachfolgende Kinasenaktivierung beruht³². Die späte, verzögerte Präkonditionierung folgt 12 bis 24 Stunden später und kann bis zu 72 Stunden andauern. Es ist eine verzögerte, aber länger anhaltende Adaption an Stress, die höchstwahrscheinlich die *de novo* Proteinsynthese involviert. Die meisten Stressoren, u. a. auch Hypoxie, induzieren beide Arten der Präkonditionierung^{33;34}.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich insbesondere mit der Induktion der verzögerten Präkonditionierung. Im folgenden wird deswegen auf diese speziell eingegangen. Die Entstehung der Ischämietoleranz kann in drei Phasen eingeteilt werden (siehe Abbildung 3): die Induktionsphase, die Transduktionsphase und die Toleranzphase. In der Induktionsphase führt ein externer Stimulus (z. B. Hypoxie) zur Aktivierung von NMDA-Rezeptoren. Einströmende Kalziumionen und dadurch generierte freie Radikale und NO können über NMDA-Rezeptoren direkt zur Toleranzinduktion führen. Aufgrund des erhöhten Verbrauchs an ATP während der Hypoxie akkumuliert Adenosin. Durch Aktivierung von Adenosin-1 Rezeptoren und Öffnen der K_{ATP} -sensiblen Kanäle induziert Adenosin ebenfalls Ischämietoleranz²⁵. Diese Signale werden in der Transduktionsphase über verschiedene Signaltransduktionswege umgesetzt. Zu den Transduktoren gehören die Proteinkinasen, die durch Phosphorylierung andere Proteine aktivieren³⁵. Dazu gehören u.a. die extrazellulär regulierten Kinasen (ERKs) p21ras³⁵, sowie die Proteinkinase B³⁶ und die Proteinkinase C³⁷.



Nach Dirnagl³¹

Abbildung 3: Sensoren, Transduktoren und Effektoren der Ischämietoleranz. Durch einen externen Stimulus werden innerhalb von Minuten bis Stunden durch die Sensoren die Transduktoren stimuliert. Diese induzieren die vermehrte Expression von Effektoren, die bei einer Ischämie dann zu einer Neuroprotektion führen.

Weitere Transduktoren sind Zytokine (z. B. Interleukin 1³⁸, Tumor Nekrose Faktor alpha³⁹) und die Transkriptionsfaktoren. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, welche zum Teil auch durch Proteinkinasen direkt oder indirekt aktiviert wurden. Diese binden sich im Zellkern an DNA-Erkennungssequenzen und aktivieren die Transkription protektiver Gene. Dazu gehören der Hypoxie-induzierbare-Faktor 1 (HIF-1)⁴⁰, Nukleärer Faktor kappa B (NF- κ B)⁴¹ und Aktivator Protein 1 (AP-1)⁴².

In der Toleranzphase führen die durch Transduktoren induzierten Effektormoleküle zu einer erhöhten Resistenz gegen ischämische Ereignisse. Zu den Effektoren gehören u. a. antiapoptische Proteine wie Bcl2 und Bcl-XL, die durch Inhibition mitochondrialer Permeabilität und Formierung freier Radikale sowie Induktion der Bildung von Heterodimeren mit proapoptischen Proteinen neuroprotektiv wirken. Des Weiteren sind antioxidative Proteine, wie die Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD)⁴³, Wachstumsfaktoren (VEGF)⁴⁴, neutrophe Faktoren (BDNF)⁴⁵ und Proteine aus der Gruppe der Hitzeschockproteine^{46;47} Effektoren der Ischämietoleranz.

Die Einteilung der Entstehung der Ischämietoleranz in drei Phasen ist eine abstrakte Darstellung. Die Phasen überschneiden sich zeitlich und die Wirkungen einiger Substrate sind divers. So sind z.B. kaliumsensitive ATP-Kanäle sowohl als Transduktoren als auch als Effektoren wirksam¹¹. Diese Schematisierung erleichtert jedoch das Verständnis über das komplexe Zusammenspiel der zellulären Mechanismen, die zur Ischämietoleranz führen und welche endogenen Protektionsmechanismen im Gehirn existieren.

1.6 Ischämietoleranz beim Menschen

Neben den tierexperimentellen Modellen, bei denen das Phänomen der Ischämietoleranz durch Präkonditionierung dargestellt werden konnte, gibt es aber auch Hinweise, dass unter klinischen Bedingungen Toleranz gegen Ischämie durch Präkonditionierung eine Rolle spielt.

In retrospektiven Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten, deren koronare Herzkrankheit sich primär durch Angina pectoris manifestiert, nach einem Herzinfarkt mildere Verläufe, kleinere Infarkte und eine bessere Prognose^{48;49} haben. Auch wurde bereits die Induktion der Ischämietoleranz durch Präkonditionierung in der Kardiologie angewandt. Wiederholte kurze ischämische Episoden, bei denen nach zeitlich begrenzter Okklusion der Koronararterien durch Ballonierung intermittierende Reperusionsphasen vollzogen wurden, führten zu einer erhöhten Toleranz gegen eine nachfolgende längere Unterbrechung der myokardialen Blutzufuhr während der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA)⁵⁰. Ein Beispiel der „Präkonditionierung“ im menschlichen Gehirn scheint durch Transitorische Ischämische Attacken (TIA) gegeben. Anhand klinischer Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten, bei denen es vor einem Apoplex zu TIA kam, mildere Schlaganfälle erlitten und diese Patienten eine höhere Wahrscheinlichkeit hatten, ins Alltagsleben zurückzukehren, als Patienten, bei denen es unvermittelt zu einem Apoplex kam^{51;51;52}. TIAs bewirken keine strukturellen Schäden, induzieren aber Protektion gegen einen nachfolgenden Schlaganfall. Hiermit stehen die Erkenntnisse in der Klinik im Einklang mit der experimentellen Forschung auf dem Gebiet der durch Präkonditionierung induzierten Ischämietoleranz.

Die potentiellen Anwendungsgebiete der Präkonditionierung des Gehirns sind bei therapeutischen Maßnahmen zu sehen, durch die das Risiko einer zerebralen Ischämie gegeben ist, beispielsweise bei operativen kardialen oder zerebralen Eingriffen und bei Hochrisikopatienten für einen Schlaganfall. Erhofft werden jedoch auch Anwendungen, bei denen diese endogenen Protektionsmechanismen nach einem erfolgten Kreislaufstillstand oder Schlaganfall gezielt gefördert oder beschleunigt werden können.

1.7 Die induzierbare NO- Synthase (iNOS) und Stickstoffmonoxid (NO)

NO ist ein physiologischer Mediator, der durch NO-Synthasen (NOS) katalysiert wird. Dabei wird enzymatisch der endständige Stickstoff des L-Arginins abgespalten und zu den Reaktionsprodukten L-Citrullin und Stickoxid umgewandelt. Das Radikal NO wird ubiquitär im Organismus hergestellt.

In Abhängigkeit von der Konzentration und der Effektorzelle werden vielfältige Reaktionen hervorgerufen. So kommt es neben der Relaxierung der glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation^{53;54}. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass NO bei immunologischen Prozessen einerseits zytotoxisch wirken⁵⁵ kann, aber andererseits auch die Chemotaxis von Monozyten und Granulozyten verhindert⁵⁶. NO wurde außerdem als ein Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette⁵⁷ und DNS- Synthese⁵⁸ beschrieben.

Die Synthese des NO ist abhängig von den NO-Synthasen, von denen bisher die endotheliale NOS (eNOS oder NOS-1), die neuronale NOS (nNOS oder NOS-2) und die induzierbare NOS (iNOS oder NOS-2) identifiziert wurden. Während die Expression der eNOS und nNOS konstitutiv erfolgt, wird die Synthese der zytosolischen iNOS bei oxidativem Stress sowie durch Endotoxine, Exotoxine und Entzündungsmediatoren induziert^{59;60}. Die NO-Freisetzung der konstitutiven NOS erfolgt nur für wenige Sekunden und im Picomolarbereich, dagegen beträgt die NO- Freisetzung der iNOS das 1000-fache und kann bis zu mehreren Stunden anhalten. Die Rolle von iNOS wird in der Literatur sehr widersprüchlich diskutiert.

Die Expression der iNOS wurde in zahlreichen Zelltypen im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen, denen Infektionen, Erkrankungen und Gewebeschädigungen folgen, beschrieben. Es wird u. a. postuliert, dass eine unkontrollierte hohe Freisetzung von NO durch iNOS während inflammatorischer

Prozesse für die Pathogenese, insbesondere septischer Zustände, verantwortlich ist, wie beispielsweise die systemische Hypotension und die myokardiale Dekompensation⁶¹. Im Gehirn wurde die iNOS-Expression in Astrozyten, Mikrogliazellen^{62;63} und in Neuronen⁶⁴ nach inflammatorischer Stimulation charakterisiert. Bei Erkrankungen des Nervensystems, z. B. Morbus Alzheimer, Amyotrophe Lateralsklerose und AIDS-Demenz sowie zerebrale Ischämie⁶⁵ und nach Trauma⁶⁶ konnte eine erhöhte iNOS Expression in Gliazellen beschrieben werden⁶⁷⁻⁶⁹.

Experimentell induzierte Olivenza et al.⁷⁰ die iNOS-Expression durch chronischen Stress. Ratten wurden für sechs Stunden am Tag immobilisiert. Diese Prozedur wurde für eine, zwei oder drei Wochen durchgeführt und zeitabhängig ein Anstieg der iNOS-Expression beobachtet. Auch bei alternden Ratten (>24 Monate) wurde eine erhöhte iNOS-Expression festgestellt⁷¹. Interessanterweise wird in beiden Studien postuliert, dass die quantitative iNOS Expression mit dem Verlust der kognitiven Fähigkeiten sowie der neurologischen Schädigung korreliert.

Andererseits wurde die Expression des iNOS Proteins im Zusammenhang mit der frühen neuronalen Zelldifferenzierung von der Arbeitsgruppe Peunova et al. beschrieben⁷². Behandlung von PC12 Zelllinien (Phäochromozytomzellen präpariert aus dem Phäochromozytom von Ratten) mit Nerve-growth-faktor (NGF) für 10 bis 14 Tage führten zu Wachstumsstillstand und Differenzierung, charakterisiert durch den neuronalen Phänotyp und der Expression neuronaler Markerproteine. Zusätzlich führte die Behandlung mit NGF zur Expression zeitlich variierender NOS Isoformen. Es wurde nur zum frühen Zeitpunkt der Zelldifferenzierung die iNOS Expression und iNOS Aktivität dokumentiert, vier Tage nach Behandlung mit NFG sank die Höhe der iNOS Expression bereits ab.

Arnhold et al.⁷³ beobachteten iNOS Expression während der frühen Zelldifferenzierung der olfaktorischen Nervenzellen bei Mäusen. Es zeigte sich, dass zu einem bestimmten Zeitabschnitt während der Embryonalphase in diesen Zellen nur die iNOS-Expression vorhanden war. Nach Abschluß der Zelldifferenzierung konnten auch die beiden konstitutiven NOS Isoformen ermittelt werden.

Daneben konnte auch eine Rolle von iNOS im Rahmen der Zelldifferenzierung in anderen Organen nachgewiesen werden, z.B. in Kardiomyozyten und in Monozyten^{74,75}.

1.8 iNOS und Präkonditionierung

Guo et al.⁷⁶ zeigten die iNOS Aktivität während der verzögerten Präkonditionierung am Herzen und konnten dieses Enzym als einen wichtigen protektiven Vermittler der verzögerten Präkonditionierung identifizieren. Bei gezielter Inhibierung der iNOS Genexpression wurde der Effekt der Präkonditionierung aufgehoben.

Auch bei der verzögerten Präkonditionierung des Gehirns scheint iNOS eine Schlüsselfunktion auszuüben. So wurde eine Induktion von iNOS in Neuronen und Gliazellen in einem experimentellen Modell der Ischämie und Reperfusion beschrieben. Moro et al.⁷⁷ entzogen präparierten Frontalhirnschnitten von Ratten für 20 Minuten Sauerstoff und Glukose (OGD) und konnten eine Transkription des iNOS-Gens und eine iNOS Aktivität nach zwei Stunden zeigen. Die Menge der iNOS-mRNA und des Enzyms steigerten sich bis zu drei Stunden nach initialem Reiz. Dabei wurden die Pyramidenzellen und assoziative Neurone der Schichten 4 und 5 des Neokortex als iNOS-exprimierende Zellen identifiziert. Melillo et al.⁷⁸ beschrieben Zytokinausschüttung nach Durchführung der OGD, Cardenas und Moro et al.⁷⁷ konnten in einer weiteren Studie die iNOS Expression während der OGD mit dem NMDA Rezeptorantagonist MK801 blockieren.

Es wird vermutet, dass die iNOS Aktivität sowohl eine nützliche als auch eine schädliche Rolle spielen kann. Das Resultat ist abhängig von der Intensität der iNOS Induktion und von dem spezifischen pathologischen Hintergrund. Im Falle der ischämischen Präkonditionierung ist die Induktion von iNOS protektiv, weil im Vergleich zu anderen Situationen (z. B. Inflammation und Sepsis) verhältnismäßig wenig iNOS exprimiert wird⁷⁶.

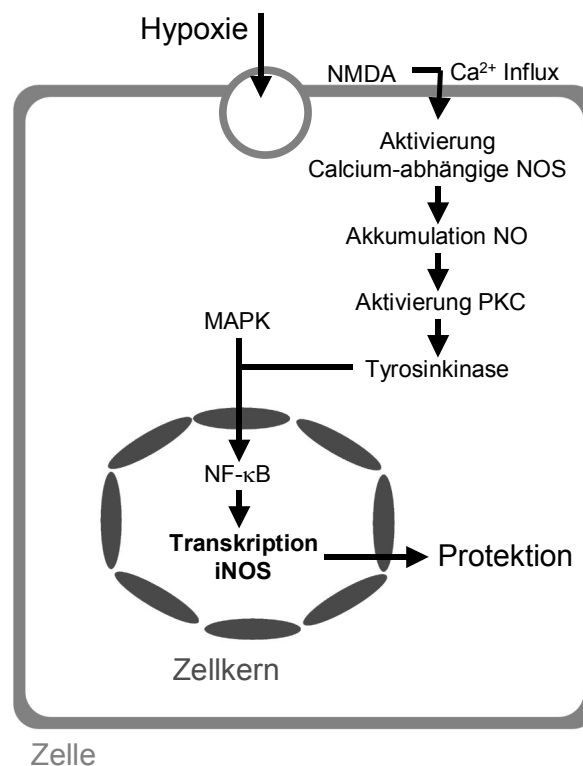
Die für die Induktion der iNOS Expression erforderlichen Signaltransduktionswege sind bisher nur wenig untersucht. Es gibt Hinweise, dass einer der Transkriptionsfaktoren, der die iNOS Genexpression als Antwort auf ischämischer Präkonditionierung induziert, der nukleäre Faktor kappa B (NF- κ B) ist. Dieser sauerstoffsensitive Transkriptionsfaktor spielt eine entscheidende Rolle bei der frühen Aktivierung einer großen Zahl von Genen, die für die Expression von Abwehrproteinen in verschiedenen Stresssituationen verantwortlich sind. Deswegen gilt NF- κ B als ein Hauptvermittler der zellulären Stressantwort.

Die Erkenntnis, dass iNOS und NF κ B wichtige, miteinander assoziierte Vermittler der verzögerten Präkonditionierung sind, wird durch den Nachweis unterstützt, dass die 5'-

Endregion des iNOS Gens mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B eine übereinstimmende Sequenz beinhaltet, an den NF- κ B binden kann⁷⁹.

Die Aktivierung von NF- κ B wird durch die Aktivität der Tyrosinkinase und der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) reguliert⁸⁰. Weiterhin ist bekannt, dass die Aktivierung der Tyrosinkinase abhängig von der Aktivität der Proteinkinase C ist^{81;82} und diese durch NO induziert wird⁸³.

Intrazelluläre Mechanismen der Präkonditionierung



Modifiziert nach Riksen et al.⁸⁴

Abbildung 4: Intrazelluläre Signaltransduktion bei der Präkonditionierung: Durch einen externen Reiz kommt es über NMDA-Kanäle zu einem Einstrom von Kalziumionen. Die kalziumabhängige NOS wird aktiviert und es akkumuliert NO in der Zelle. Dadurch wird über die Proteinkinase C die Tyrosinkinase aktiviert, die an NF- κ B bindet, was eine erhöhte Transkription von iNOS zur Folge hat. Die Bindung an NF- κ B kann auch durch MAPK erfolgen. Eine erhöhte iNOS Expression ist mit einer Protektion der Zelle assoziiert (siehe Text).

Mit diesen Erkenntnissen wird folgender, vereinfachter Signaltransduktionsweg angenommen: Zustände mit kurzen ischämischen Zuständen verursachen eine Akkumulation von NO und Sauerstoffradikalen. Diese führen dann zu einer nacheinander abfolgenden Aktivierung von PKC, Tyrosinkinase und schließlich nF-κB, welches dann im Zellkern die Expression von iNOS induziert⁸⁵ (siehe Abbildung 4).

1.9 Volatile Anästhetika

Als pharmakologische Induktoren von Ischämietoleranz werden in der vorliegenden Arbeit Inhalationsnarkotika, sogenannte volatile Anästhetika, untersucht. Der Wirkungsmechanismus volatiler Anästhetika ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Es bestehen aber Hinweise, dass sie durch Proteinbindung an ligandengesteuerte Ionenkanäle der Zellmembran wirken^{86,87}.

Zu der Gruppe der volatilen Anästhetika gehören die halogenierten Narkotika Halothan und Isofluran. Beides sind halogenierte Äther und haben ähnliche Wirkungsmechanismen und Pharmakokinetiken. Pharmakokinetisch gleichen sich diese beiden Substanzen durch einen schnellen Wirkungsein- und austritt. Sie unterscheiden sich beim Löslichkeitskoeffizienten (Konzentration im Blut dividiert durch die Konzentration in Luft, wenn das Äquilibrium erreicht ist). Halothan zeigt mit einem Löslichkeitskoeffizienten von 2,3 eine größere Lipidlöslichkeit als Isofluran mit 1,4. Allgemein gilt, je höher die Lipidlöslichkeit der Narkotika, umso geringer ist die minimale alveolare Konzentration (MAC-Wert), bei welcher bei 50 % der Patienten ein Toleranzstadium bei einem definierten Schmerzreiz hervorgerufen wird. Für den Menschen gilt bei Anwendung von Isofluran ein MAC-Wert von 1,2 Vol. % und bei Halothan von 0,75 Vol. %.

Klinisch relevant unterscheiden sich Isofluran und Halothan in ihrer Verträglichkeit. Diese wird bestimmt durch das Ausmaß des metabolischen Abbaus zu toxischen Produkten. Bis zu 20 % des inhalierten Halothans werden zu Bromidionen und Trifluoressigsäure abgebaut. Unter ungünstigen Bedingungen können diese eine Leberschädigung auslösen. Neben einer starken kreislauf- und atemdepressiven Wirkung können Herzrhythmusstörungen und maligne Hyperthermie auftreten. In der Klinik wird Halothan nicht mehr verwendet, jedoch bei zahlreichen tierexperimentellen Studien, in denen Narkosen benötigt werden.

Bei Isofluran werden nur 0,2 % des Isoflurans zu toxischen Metaboliten umgesetzt, dementsprechend sind die toxischen Wirkungen gering, weswegen Isofluran zur Zeit breite Anwendung in der Klinik findet⁸⁸.

1.10 Volatile Anästhetika und Neuroprotektion

Bereits 1988 zeigte die Arbeitsgruppe Baughman et al.⁸⁹ Neuroprotektion bei Ratten, denen die Narkotika Halothan oder Isofluran 30 Minuten vor und während einer Ischämie zugeführt wurde. Dabei wurde das Modell der unvollständigen halbseitigen Ischämie (Verschluss der rechten A. carotis und Hypotension auf 30 mmHg) angewandt. Warner et al.⁹⁰ demonstrierten den neuroprotektiven Effekt von Halothan und Sevofluran, wenn während einer 90-minütigen fokalen zerebralen Ischämie in Ratten diese Narkotika appliziert wurden. Auch an Hunden konnte gezeigt werden, dass Isofluran den neuronalen Zelluntergang im Hippocampus nach einem künstlich induzierten Herzstillstand reduziert⁹¹. Mirua et al.⁹² lieferte mit seinen Experimenten Evidenzen, dass mit Isofluran der schützende Effekt gegen neuronale Schädigung gegenüber anderen Anästhetika, wie z.B. Fentanyl oder Ketamin, weit überlegen ist. In einer 2002 veröffentlichten Arbeit präsentierten Bhardwaj und seine Arbeitsgruppe⁹³ Daten über Neuroprotektion mit Halothan und Propofol. Diese Narkotika wurden für eine oder für acht Stunden den Tieren appliziert, im Anschluss erfolgte die Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie (Okklusion der A. cerebri media, MCAO) für zwei Stunden. Bei Ende der MCAO wurde auch die Anästhesie beendet. Hier, wie auch in den anderen Arbeiten, zeigte sich ein signifikant verringertes Infarktvolume durch volatile Anästhetika.

Bei allen diesen Studien wurden die volatilen Anästhetika nur kurz vor oder während der ischämischen Periode verabreicht. Somit wurden die neuroprotektiven Effekte nie unabhängig von einem reduzierten Metabolismus *in vivo* oder *in vitro* dargestellt. In vielen vorangehenden Arbeiten wurde der neuroprotektive Effekt der Anästhesie in einer Reduktion des cerebralen Metabolismus gesehen^{94;95}. Unter anderem ist aber auch bekannt, dass volatile Anästhetika die Expression von c-fos und s-jun Genen, die zur Klasse der Immediate Early Genes (IEG) gehören, induzieren. Diese Fähigkeit ist nicht nur auf neuronales Gewebe beschränkt, sondern kommt beispielsweise auch im Herzen vor^{96;97}. IEG sind Transkriptionsfaktoren, die insbesondere nach zellulärem Stress exprimiert werden und ebenfalls an der Induktion der ischämischen Toleranz im

Gehirn beteiligt sind^{98;99}. Die Induktion von IEG führt schließlich zu langanhaltenden Veränderungen in der Expression von Proteinen. Weiterhin wurde die Aktivierung der Proteinkinase C im Hirngewebe von Ratten durch volatile Anästhetika beschrieben¹⁰⁰.

Auch die Induktion von iNOS durch Isofluran konnten die Arbeitsgruppen Zuo et al. und Tschakowsky et al. beobachten, allerdings in Makrophagen^{101;102}.

Wie oben bereits dargestellt sind dies alles Mechanismen, die eine Induktion von Ischämietoleranz zur Folge haben.

Somit kommen volatile Anästhetika als pharmakologische Induktoren von verzögerter Präkonditionierung in Frage, was im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden soll.

1.11 Hypothesen

Auf dem Boden der oben dargestellten Erkenntnisse sollen im Rahmen der hier durchgeführten Dissertation folgende Hypothesen überprüft werden:

1. Hypothese: Präkonditionierung mit volatilen Anästhetika führt zu Neuroprotektion.
2. Hypothese: Isofluran induziert die iNOS Expression in kortikalen Gehirngewebe.
3. Hypothese: Die Induktion der iNOS durch Isofluran hat einen wesentlichen Anteil an der verzögerten Präkonditionierung.