

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. Hansdetlef Wassmann-

Effekte von Methohexital auf extrazelluläre Aminosäure-
Konzentrationen in Hippocampus-Schnitten von Ratten unter
ischämischen Bedingungen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Slottosch, Ingo Jürgen
aus Köln

2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. V. Arolt

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. H. Wassmann
2. Berichterstatter: em. Univ.-Prof. Dr. E.-J. Speckmann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. Hansdetlef Wassmann-
Referent: Univ.-Prof. Dr. H.Wassmann
Koreferent: em. Univ.-Prof. Dr. E.-J. Speckmann

Zusammenfassung

Effekte von Methohexital auf extrazelluläre Aminosäure-Konzentrationen in Hippocampus-Schnitten von Ratten unter ischämischen Bedingungen

Einleitung: Das Gehirn des Menschen kann nur kurze Zeit ohne eine ausreichende Sauerstoffversorgung überstehen. Danach kommt es zu irreversiblen Schäden. Deshalb sind Methoden zur Protektion des Gehirns in solchen Situation Ansatzpunkte zur Verbesserung der Therapie. Ein Weg zur Zerebroprotektion ist der Einsatz von Medikamenten, die die Ischämietoleranz der Nervenzellen erhöhen sollen. Zu diesen Medikamenten gehört Methohexital aus der Gruppe der Barbiturate. Seit den 70er Jahren werden Barbiturate mit einer protektiven Wirkung auf Nervenzellen in Verbindung gebracht. Da die Ischämie des Gehirns mit einer vermehrten Ausschüttung exzitatorischer Neurotransmitter einhergehen soll, stellt sich hier die Frage inwieweit der Einsatz von Methohexital Einfluss auf diese Exzitotoxizität hat.

Methoden: Die Untersuchung wird in-vitro an Hippocampus-Schnitten von Ratten durchgeführt. In einer speziell angefertigten Versuchskammer werden die Schnitte mit Sauerstoff und Glukose versorgt, so dass sie funktionell aktiv bleiben. Durch Veränderung der Sauerstoff- und Glukosezufuhr kann eine Ischämie simuliert werden. Zur Erfassung der extrazellulären Konzentrationen von Glutamat, Aspartat, GABA, Glutamin, Taurin, Alanin, Arginin und Serin wird die Mikrodialyse eingesetzt. Durch das portionierte Sammeln des Dialysats lässt sich der zeitliche Verlauf der Konzentrationen während und nach Ischämie erkennen. Darüberhinaus werden auch elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt, um die Funktion der Hippocampus-Schnitte zu überwachen. Für die tierexperimentellen Versuche liegt die Genehmigung der Bezirksregierung Münster vom 19.12.2002 mit dem Aktenzeichen 50.0835.1.0 (G 79/2002) vor.

Ergebnisse: Durch die Ischämie-Simulation kam es zu einer Veränderung des extrazellulären Milieus. Jedoch zeigte sich bei Glutamat, dem exzitatorischen Neurotransmitter, kein signifikanter Anstieg im Sinne der Exzitotoxizität. Elektrophysiologisch liess sich dabei eine signifikante funktionelle Schädigung der Hirnschnitte durch die Ischämie-Simulation in der Versuchskammer erfassen. Unsere Versuche konnten aber keine signifikante Wirkung von Methohexital bei Ischämie im Hirnschnittmodell nachweisen. Weder die elektrophysiologischen Messwerte noch die Aminosäure-Konzentrationen im Dialysat der Mikrodialyse wurden durch Methohexital signifikant im Sinne eines neuroprotektiven Effektes beeinflusst.

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2007

Aktenzeichen tierexperimentelle Genehmigung: 50.0835.1.0 (G 79/2002)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Hintergrund	6
1.1 Einführung in die klinische Praxis der Neuroprotektion	6
1.2. Pathophysiologie der Hirnischämie	7
1.2.1. Fokale zerebrale Ischämie	8
1.2.2. Globale zerebrale Ischämie	10
1.2.3. Mechanismen der zerebralen Ischämie	11
1.2.3.1 Ionen-Verschiebungen während der Ischämie	12
1.2.3.2 Azidose durch Ischämie	14
1.2.3.3 Exzitotoxizität und Kalzium-Einstrom	15
1.2.4. Aminosäure-Freisetzung während der Ischämie	19
1.2.5. Elektrophysiologische Veränderungen während Ischämie	21
1.2.5.1. Anoxische Terminalnegativierung (ATN)	21
1.2.5.2. Evozierte Potentiale (EP)	22
1.3. Aufgaben von Aminosäuren im Gehirn	24
1.3.1. Glutamat und Aspartat	25
1.3.2. GABA	26
1.3.3. Glutamin	27
1.3.4. Taurin	29
1.4. Barbiturate als Mittel zur Neuroprotektion	30
1.4.1. Auswirkungen der Barbiturate auf den Hirnstoffwechsel	31
1.4.2. Molekulare Wirkmechanismen der Barbiturate	32
1.5. Ziel der Untersuchung	33
2. Material und Methoden	34
2.1. Präparation der Hippocampus-Schnitte	34
2.2. Versuchsaufbau	35
2.2.1. Interphase-Kammer	35
2.2.1.1. Einrichtung der Interphase-Kammer	37
2.2.2. Elektrophysiologie	38
2.2.2.1. Aufbau der elektrophysiologischen Messgeräte	39
2.2.2.2 Vorbereitung der Elektroden vor der Messung	40
2.2.2.3 Positionieren der Elektroden im Hippocampus-Schnitt	41
2.2.2.4. Messen der evozierten Potentiale	44
2.2.2.5. Messen des DC-Potentials	44
2.2.3. Mikrodialyse	45
2.2.3.1. Vorbereitung der Mikrodialyse	45
2.2.3.2. Aufbau der Mikrodialyse	46
2.2.3.3. Durchführung der Mikrodialyse	47
2.2.3.4. Auswertung der Mikrodialyse-Ergebnisse	48
2.3. Versuchsablauf	49
2.3.1. Versuchsschema	49
2.4. Bestimmung der Aminosäure-Konzentrationen mittels HPLC	51
2.5. Statistische Auswertung der Ergebnisse	54
3. Ergebnisse	56
3.1. Ergebnisse der elektrophysiologischen Messung	56
3.1.1. Evozierte Potentiale	56
3.1.1.1. Evozierte Potentiale vor und nach Ischämie	56

3.1.1.2. Wirkung von Methohexital auf evozierte Potentiale vor Ischämie	58
3.1.1.3. Auswirkung von Methohexital auf evozierte Potentiale bei Ischämie-Simulation	61
3.1.2. DC-Potential	62
3.1.2.1. Auswirkungen von Methohexital auf die ATN-Latenz bei Ischämie-Simulation	62
3.1.2.2. Auswirkungen von Methohexital auf die Amplitude der anoxischen Terminalnegativierung bei Ischämie-Simulation	64
3.2. Ergebnisse der Mikrodialyse	66
3.2.1. Veränderungen der Aminosäure-Konzentrationen bei Ischämie unter Normbedingungen	66
3.2.1.1. Zusammenfassung der Veränderungen der Aminosäure-Konzentrationen bei Ischämie	73
3.2.2. Wirkung von Methohexital auf die gemessenen Aminosäuren-Konzentration während und nach Ischämie	75
3.2.2.1. Zusammenfassung der Auswirkungen von Methohexital auf die Aminosäure-Konzentrationen bei Ischämie	88
4 Diskussion	89
4.1. Diskussion der Methodik	89
4.1.1. In vitro-Schnittmodell des Hippocampus	89
4.1.2. Mikrodialyse zur Erfassung der extrazellulären Aminosäuren	91
4.1.3. Statistische Auswertung	93
4.2. Diskussion der Ergebnisse	95
4.2.1. Veränderungen der elektrophysiologischen Messwerte durch Ischämie	95
4.2.2. Einfluss der Ischämie auf die extrazellulären Aminosäure-Konzentrationen	96
4.2.2.1. Glutamat und Aspartat	96
4.2.2.2. GABA	99
4.2.2.3. Taurin	101
4.2.2.4. Glutamin	103
4.2.2.5. Serin, Arginin und Alanin	103
4.2.3. Auswirkungen von Methohexital auf die Hippocampuschnitte	104
4.2.4. Wirkung von Methohexital bei Ischämie	105
4.3. Zusammenfassung	108
5 Literaturverzeichnis	110

1 Einleitung und Hintergrund

1.1 Einführung in die klinische Praxis der Neuroprotektion

Das Gehirn des Menschen hat eine sehr geringe Ischämietoleranz, so dass bereits eine Ischämiezeit von 5 Minuten zum Zelltod der Nervenzellen führen kann. Deshalb ist das Gehirn in Situationen, in denen es zu einer zerebralen Minderperfusion kommt, gefährdet. Mit solchen Situationen werden verschiedene Fachrichtungen der Medizin konfrontiert, u.a. die Neurochirurgie. Zum Schutz des Gehirns werden in der Neurochirurgie perioperativ, auf der Intensivstation und während der Operationen Methoden zum Zwecke der Neuroprotektion angewendet. Die jeweilige Vorgehensweise ist abhängig vom zugrunde liegenden Befund. Schädel-Hirn-Traumen mit Steigerung des intrakraniellen Druckes (ICP) und Subarachnoidalblutungen, intrakranielle Aneurysmen, aber auch die Karotidesobliteration sind Indikationen für den Einsatz von neuroprotektiven Maßnahmen in der Neurochirurgie. Neben der Verbesserung des zerebralen Perfusionsdruckes (CPP) durch Volumensubstitution und Vasopressoren im Rahmen der „Triple H“-Therapie (Hämodilution, Hypervolämie, Hypertension) dienen u.a. Mannit und Hyperventilation der Senkung des ICP. Als weitere Therapieoption werden Medikamente verabreicht, die eine spezifisch neuroprotektive Wirkung haben sollen. Annähernd 70% der neurochirurgischen Kliniken in Deutschland gaben in einer Umfrage an, solche Medikamente zu verwenden. Die Anwendung dieser Medikamente beschränkt sich dabei besonders auf Situationen mit bereits bestehenden Komplikationen und Notfallsituationen. Die prophylaktische Verwendung dieser Medikamente z.B. während einer Karotidesobliteration ist in deutschen Kliniken im Jahr 1997 äußerst selten gewesen⁵⁷. Als Medikamente mit zerebroprotektiver Funktion werden am häufigsten Barbiturate (z.B. Methohexital) und Nimodipin eingesetzt. Daneben wurden neue Stoffgruppen hinsichtlich ihres neuroprotektiven Potentials untersucht. Zu diesen Medikamenten, die bereits in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit geprüft wurden, gehören Clomethiazol, Gavestinel, Lubeluzol, Selfotel und Tirilazad¹⁶¹. Problematisch bei der

Anwendung dieser Medikamente ist das Fehlen des Nachweises einer klinisch fassbaren neuroprotektiven Wirkung, die zu einer Verringerung der Morbidität und Mortalität führt, obwohl sich experimentell signifikante Effekte auf ischämisches Nervengewebe ergeben haben ⁸².

1.2. Pathophysiologie der Hirnischämie

Die Zellen des menschlichen Gehirns sind auf eine kontinuierliche Versorgung mit Glukose und Sauerstoff angewiesen. Wird der Nachschub von Glukose und Sauerstoff durch einen reduzierten Blutfluss verringert, kommt es innerhalb kürzester Zeit zum Funktionsverlust, weil die Reserven der Nervenzellen beschränkt sind. Es ergeben sich zwei Schwellenwerte für den Blutfluss. Als erstes die Funktionsschwelle, deren Unterschreitung zur Einstellung des Funktionsstoffwechsels und zum Erlöschen der elektrischen Aktivität im EEG führt. Die Nervenzellen sind nicht mehr in der Lage, ihre Aufgaben wie z.B. die Signalübermittlung zu erfüllen. Als nächstes wird die Infarktschwelle erreicht, die dem untersten Maß für den überlebensnotwendigen Blutfluss der Zellen entspricht. Ein Absinken des Blutflusses unter die Infarktschwelle führt zum Verlust des Ionen-Gleichgewichts und der strukturellen Integrität und daraufhin zum Zelltod durch Zellnekrose ⁴¹. Die Ischämie des Gehirns kann in zwei Formen auftreten, zum einen als fokale zerebrale Ischämie und zum anderen als globale zerebrale Ischämie ¹³⁸.

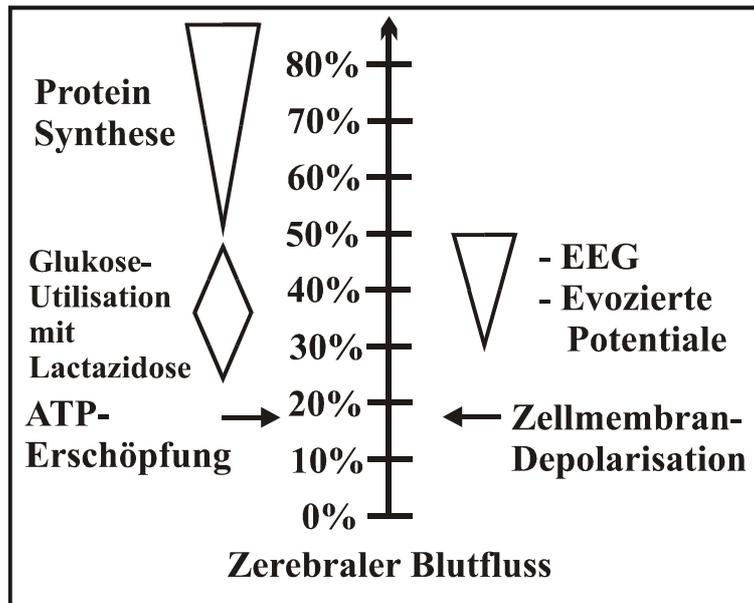


Abb.1: In der Abbildung sind die metabolischen und funktionellen Veränderungen im Gehirn in Abhängigkeit vom zerebralen Blutfluss dargestellt. Die anaerobe Glykolyse, die zur Laktazidose führt, nimmt zunächst zu, sinkt aber dann bei stärker reduziertem Blutfluss durch den Glukosemangel. [Hossmann KA, Metabolic Dysfunctions: in Bähr (ed.), Neuroprotection 2004]

1.2.1. Fokale zerebrale Ischämie

Bei der fokalen Ischämie sistiert die Durchblutung in einem bestimmten Teil des Gehirns durch Stenosierung oder Verschluss der versorgenden Arterie. Die Kollateralgefäße können diesen Ausfall nicht hinreichend kompensieren, so dass es in diesem Bereich zu einer unzureichenden Blutversorgung kommt. Diese Situationen sind häufig bedingt durch Thrombembolien, wie sie bei Herzrhythmusstörungen und Plaques in der Karotisarterie vorkommen. Fokale Ischämien können aber auch perioperativ im Rahmen von herz- und gefäßchirurgischen Eingriffen auftreten. Es resultiert ein Verschluss einer oder mehrerer hirnversorgenden Arterien. Dieser Verschluss führt zum Mangel an Sauerstoff und Glukose, wodurch eine Parenchymnekrose im Zentrum des minderperfundierten Gebietes entsteht. Diese zentrale Nekrose wird von einer so genannten Penumbra umgeben, die ein Areal beschreibt in dem die Nervenzellen ihre Funktion eingestellt haben, jedoch noch nicht irreversibel geschädigt sind. Es handelt

sich um einen Bereich, in dem der Blutfluss ebenfalls eingeschränkt ist, jedoch über der Infarktschwelle liegt und damit zunächst ausreicht, um die essentiellen Stoffwechselfunktionen aufrecht zu erhalten. Diese Penumbra ist aber besonders empfindlich gegenüber schädigenden Reizen, die ihren Ursprung im nekrotischen Infarktkern haben⁵. Mit zunehmender Dauer nimmt die Größe der zentralen Infarktzone, in der die Zellen irreversibel geschädigt sind, auf Kosten der Penumbra zu. In mehreren Experimenten ergaben sich Hinweise, dass die Induktion der Apoptose für den verzögerten Nervenzelluntergang in der Penumbra eine pathophysiologische Relevanz besitzt⁹⁶. Die Apoptose ist aber für ihr Fortschreiten auf Energie in Form von ATP angewiesen, die benötigt wird um die aktiven Vorgänge, die zum kontrollierten Absterben der Zelle führen, aufrecht zu erhalten. Der Zelltod im Infarktkern entsteht vorwiegend durch Zellnekrose; die Apoptose trägt hierzu nicht wesentlich bei, weil in diesem Bereich die ATP-Reserven erschöpft sind. Die Apoptose hat ihre Bedeutung beim verzögerten Zelluntergang in der Penumbra, der nach Rezirkulation im betroffenen Areal fortschreiten kann. Die Vorgänge, die die Apoptose einleiten, sind aber noch nicht vollständig aufgeklärt. Wird die fokale Ischämie durch Revaskularisierung des verschlossenen Gefäßes nicht terminiert, geht schließlich die Penumbra vollständig in eine irreversible Parenchymnekrose über. Jedoch kann auch gerade die Wiederherstellung der Perfusion zur Schädigung des Hirngewebes führen. Zum einen wird Energie für die bereits induzierte Apoptose bereitgestellt und zum anderen können sich so freie Radikale bilden, die für den Reperfusionsschaden mitverantwortlich sind¹⁴⁵. Diese progrediente Schädigung im Bereich der Penumbra stellt einen möglichen Ansatzpunkt für eine pharmakologische Therapie dar. Die klinische Symptomatik bei fokalen Durchblutungsstörungen kann sehr unterschiedlich sein. Je nachdem welches Areal des Gehirns betroffen ist, zeigen sich Paresen der Extremitäten, Sprachstörungen, Sehstörungen, Gleichgewichtsstörungen und weitere Symptome.¹⁴⁰

1.2.2. Globale zerebrale Ischämie

Bei der globalen zerebralen Ischämie ist der Blutfluss im gesamten Gehirn reduziert oder sistiert vollständig. Dies wird durch einen Abfall des Blutdrucks oder einen Kreislaufstillstand sowie durch einen erhöhten Hirndruck verursacht, so dass keine ausreichende Perfusion des Gehirns mehr vorhanden ist. Diese Form der Mangelversorgung wird durch einen Herzstillstand, eine akute Herzinsuffizienz oder einen akut raumfordernden Prozess im Gehirn hervorgerufen, kann aber auch durch Verschluss aller hirnversorgenden Arterien entstehen. Bei einer stark eingeschränkten Perfusion im Gehirn entstehen zunächst Grenzzoneninfarkte. Bei diesen Grenzzoneninfarkten sind die Bereiche des Gehirns betroffen, die die geringste Gefäßversorgung haben. In diesen Arealen sind die Blutflussreserven so gering, dass es bei Blutdruckabfällen als erstes in diesen Regionen zum Unterschreiten der Infarktschwelle kommt. Dabei handelt es sich immer um die Bereiche, die an den Grenzen der Versorgungsgebiete der Hauptarterien des Gehirns liegen. Die zellulären Mechanismen der globalen zerebralen Ischämie gleichen denen im Kern der fokalen zerebralen Ischämie. Die globale zerebrale Ischämie unterscheidet sich jedoch von der fokalen zerebralen Ischämie durch das Fehlen der Penumbra, weil das gesamte Gehirn von der Ischämie betroffen ist. Bei der globalen zerebralen Ischämie zeigen sich aber Gebiete im Gehirn, die besonders empfindlich auf eine Reduktion der Durchblutung reagieren. Es kommt zunächst zur Schädigung der Neurone in diesen selektiv vulnerablen Regionen des Gehirns. In diesen Regionen konnte ein Fortschreiten der Zelluntergänge durch Apoptose auch nach Wiederherstellung der Durchblutung nachgewiesen werden⁹⁶. Zu diesen Regionen zählen die Schichten 3,5,6 des Neokortex, die Regionen CA1 und CA4 des Hippocampus, Striatum und Purkinjzellschicht im Kleinhirn, in denen die Nervenzellen besonders empfindlich auf ischämische Situationen reagieren^{27,111}. Bleibt die globale Ischämie weiterhin bestehen kommt es in den übrigen Regionen des Gehirns zur ischämischen Schädigung der Zellen. Diese globale zerebrale Ischämie kann nur wenige Minuten ohne neurologische Schäden überstanden werden; bei längerer Dauer bis zur Rezirkulation treten zunächst neurologisch-neuropsychologische Symptome auf¹¹⁰. Bleibt es bei der globalen

zerebralen Ischämie, kommt es unter normalen Umständen schon nach 5-10 Minuten zum Hirntod des Menschen.

1.2.3. Mechanismen der zerebralen Ischämie

Kommt es im Gehirn zu einer Ischämie, werden die Nervenzellen nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Glukose versorgt. Als Folge dieser Mangelversorgung sinkt der Sauerstoff-Partialdruck in den Zellen und somit auch in den Mitochondrien, woraufhin die ATP-Neusynthese in der Atmungskette eingestellt wird. Dies führt zu einer Erschöpfung der intrazellulären ATP-Reserve und somit der Energieträger der Zelle. Als Folge der Hypoxie kommt es zur anaeroben Glykolyse mit intra- und extrazellulärer Azidose, jedoch wird die anaerobe Glykolyse durch den entstehenden Mangel an Glukose begrenzt. Als nächstes bricht das Ionen-Gleichgewicht durch ATP-Mangel zusammen und es entstehen Ionenströme, die am Zelltod der Neurone mitbeteiligt sind. Es resultieren eine Schwellung der Neurone und ein Verlust der strukturellen Integrität der Zelle. Als ein weiterer Mechanismus, der zur Zellschädigung bei der Ischämie beiträgt, ist die Bildung freier Radikale, besonders bei der Reperfusion, zu beachten. Auf diese molekularen Mechanismen, die bei Ischämie auftreten, wird im Folgenden detaillierter eingegangen ³².

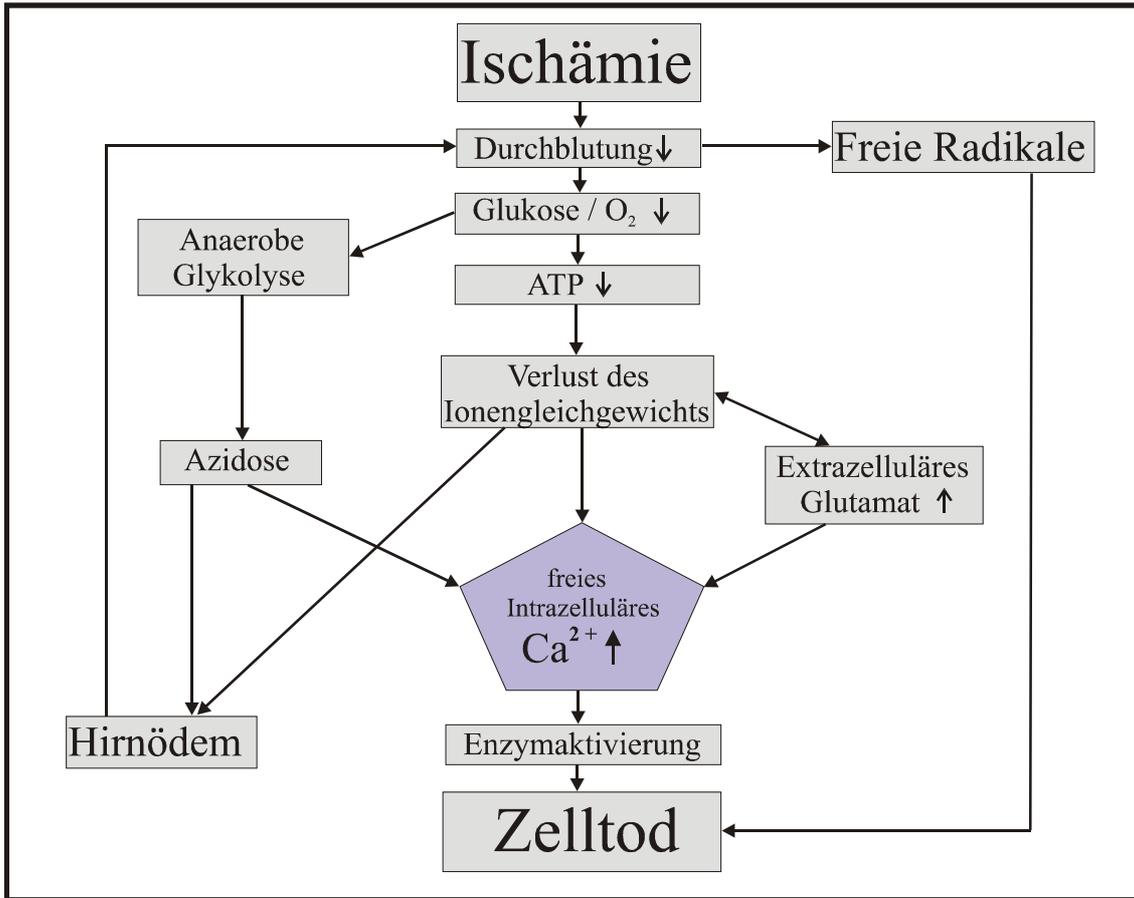


Abb.2: Die Abbildung zeigt eine Übersicht über die wesentlichen Abläufe bei Hirnischämie. Die Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Ionenkonzentration stellt dabei einen zentralen Schritt beim Zelltod während der Ischämie dar (siehe 1.2.3.3. Exzitotoxizität und Kalzium-Einstrom). [eigene Grafik]

1.2.3.1 Ionen-Verschiebungen während der Ischämie

Unter Bedingungen mit ausreichender ATP-Versorgung ist die Nervenzelle in der Lage die ungleiche Ionen-Verteilung von Natrium, Kalium und Kalzium aktiv aufrecht zu erhalten. Dieses ist notwendig um das Membranpotential zu erzeugen, welches u.a. essentiell für die Reizleitung und Signalübermittlung im Nervensystem ist. Die ATP-abhängige Na^+/K^+ -Pumpe sorgt für die entsprechenden Gradienten, so dass Natrium-Ionen sich im Extrazellulärraum und Kalium-Ionen im Intrazellulärraum anreichern. Weiterhin entsteht ein großer Kalzium-Ionen-Gradient, bei dem die Ca^{2+} -Konzentration extrazellulär um den Faktor 10^4 höher ist als im intrazellulären Raum. Der Ca^{2+} -

Gradient wird durch Ca^{2+} -Auswärtstransport mittels ATP-abhängiger Pumpe und eines $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiports erzeugt. Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiport wird durch den Na^+ -Einstrom entlang seinem Konzentrationsgefälle angetrieben, wodurch die Energie für den Transport von Kalzium-Ionen nach extrazellulär bereitgestellt wird. Außerdem werden Kalzium-Ionen in das Endoplasmatische Retikulum als intrazellulären Ca^{2+} -Speicher überführt. Dadurch entsteht ein Ca^{2+} -Gradient zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Zytoplasma. Dieser Ca^{2+} -Gradient mit der hohen Ca^{2+} -Konzentration im Endoplasmatischen Retikulum unterstützt die Signaltransduktion und die Protein-Synthese⁹⁸.

Im Falle einer Ischämie sinkt die ATP-Konzentration soweit, dass die Ionen-Pumpen nicht mehr die entsprechenden Konzentrations-Gradienten und das daraus resultierende Membranpotential erhalten können. Es kommt folglich zu einem Ausstrom von Kalium-Ionen und einem Einstrom von Natrium-Ionen mit einer darauf folgenden Depolarisation des Membranpotentials, die in diesem Zusammenhang als anoxische Depolarisation bezeichnet wird. Zusammen mit den Natrium-Ionen strömen Chlorid-Ionen und somit auch Wasser in die Zellen, wodurch die Neurone anschwellen. Die weitere Konsequenz ist eine Reduzierung der sekundär-aktiven Transporte durch Verlust des Natrium-Ionen-Gradienten¹³⁹. Diese Transporter haben u.a. die Aufgabe Glutamat auf zu nehmen und wie bereits angeführt Kalzium-Ionen in den Extrazellulärraum zu befördern. Unter ischämischen Bedingungen können diese Transporter durch Verlust des Membranpotentials und somit des Na^+ -Gradienten, der ihnen als Antrieb dient, ihre Aufgabe nicht mehr erfüllen. Es kann sogar zu einer Umkehrung dieser Transport-Systeme kommen, wodurch sich die Verschiebung der Ionen-Konzentrationen weiter verstärkt.

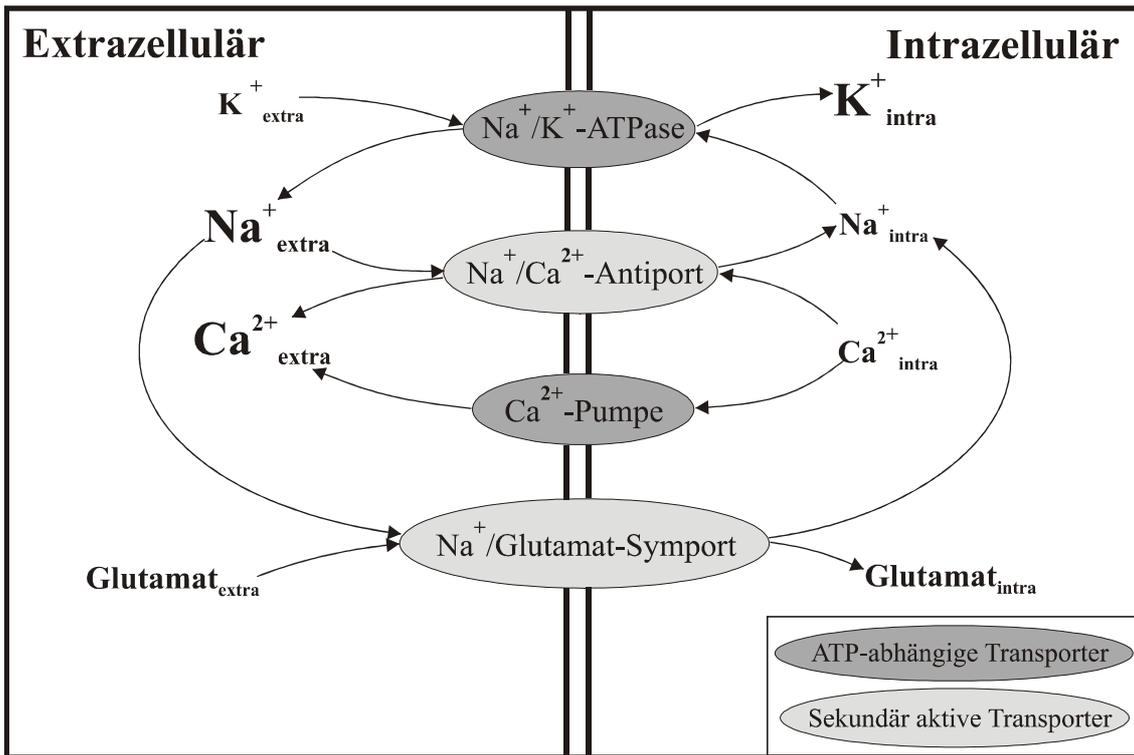


Abb.3: Übersicht über wesentliche aktive Ionen-Transporter der Zellmembran [eigene Grafik]

1.2.3.2 Azidose durch Ischämie

Während der Ischämie kommt es zur Azidose im intrazellulären und extrazellulären Raum. Die Hauptursache liegt in der anaeroben Glykolyse durch den Sauerstoffmangel, bei der es zur Bildung von Laktat und Protonen kommt. Obwohl bekannt war, dass die Azidose den Zellschaden durch Ischämie verstärkt, konnten die molekularen Mechanismen zunächst nur ansatzweise beschrieben werden ^{79,142,150,174}. Mittlerweile sind die molekularen Mechanismen, über die eine erhöhte Protonen-Konzentration im Gehirn wirkt, besser erforscht. Es wurden Ionenkanäle entdeckt, die als Rezeptor für Protonen dienen und durch diese aktiviert werden. Es stellte sich heraus, dass die Azidose die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration über diese Ionenkanäle (Acid-Sensing Ion Channels, ASIC) beeinflusst, die für Kationen wie Kalzium-Ionen, Natrium-Ionen und Kalium-Ionen durchgängig sind. Diese Ionenkanäle werden in großen Mengen im Hirngewebe exprimiert und sollen unter anderem eine Funktion beim Lernen und beim

Gedächtnis haben, sowie im peripheren Nervensystem bei der Nozizeption. Diese Kanäle werden durch Protonen-Konzentrationen aktiviert, die denen bei Ischämie im Hirngewebe entsprechen, und bewirken den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen nach intrazellulär. Es konnte durch Blockade dieser Kanäle eine Reduktion des Zellschadens durch Ischämie erreicht werden. Somit konnte ihre Bedeutung für den Ca^{2+} -Einstrom während der Ischämie und bei der Entstehung der ischämischen Zellschädigung belegt werden ^{60,71,164,171}.

Das Ausmaß der Azidose während der Ischämie wird durch die Versorgung mit Glukose bestimmt. Unter ischämischen Bedingungen limitiert der eingeschränkte Antransport von Glukose die anaerobe Glykolyse und somit die Azidose ^{140,141}. Deshalb kommt es zur Zunahme des Schadens bei hyperglykämischen Zuständen, weil der Glukosegehalt der Zellen erhöht ist. Dieses macht sich in Form der Größe des Infarkt volumens und der neurologischen Veränderungen bemerkbar ^{18,97}.

1.2.3.3 Exzitotoxizität und Kalzium-Einstrom

Es gilt als gesichert, dass exzitatorische Neurotransmitter, besonders Glutamat, eine Bedeutung für den Zelltod während der Hirnischämie haben ^{75,91}. Ihre genaue Rolle bei den pathophysiologischen Vorgängen ist in zahlreichen Veröffentlichungen dargelegt, jedoch noch nicht gänzlich geklärt. Es ist aber bekannt, dass die Exzitotoxizität mit einem massiven Einstrom von Kalzium-Ionen in die Zelle zusammenhängt. Untersuchungen wiesen auf einen Zusammenhang zwischen Reduzierung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, und somit des Ca^{2+} -Einstroms in die Zelle, und einer Verminderung des Nervenzellschadens hin ^{24,117}. Weiterhin konnte durch Versuche gezeigt werden, dass eine Abhängigkeit zwischen der neurotoxischen Wirkung von Agonisten an Rezeptoren der exzitatorischen Transmitter und der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration besteht ³⁹.

Der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat wird als Folge des ATP-Mangels und der Ionen-Verschiebungen während der Ischämie in großen Mengen freigesetzt. Bei physiologischer Gehirnfunktion öffnen sich durch Depolarisation der präsynaptischen Membran Spannungs-gesteuerte Ca^{2+} -Kanäle. Durch diese Kanäle strömen Kalzium-

Ionen in die präsynaptische Endigung und triggern so die Glutamat-Freisetzung zur Signalübertragung. Dieser Vorgang ist aber auf Energie in Form von ATP angewiesen, weshalb die Ca^{2+} -abhängige Exozytose des Glutamats nur zu Beginn der Ischämie zur Erhöhung des extrazellulären Glutamats beiträgt und vorwiegend das Fortschreiten der neuronalen Schädigung nach Rezirkulation unterhält. Sie trägt jedoch nicht wesentlich zur hohen Glutamat-Konzentration im Rahmen der akuten Hirnischämie bei. Dadurch lässt sich aber die neuroprotektive Wirksamkeit von NMDA-Blockern, Antagonisten an bestimmten Glutamat-Rezeptoren, auch noch nach Ischämie erklären ^{42,55}.

Während der Ischämie wird die Erhöhung der Glutamat-Konzentrationen im synaptischen Spalt im Wesentlichen durch die Blockierung der Wiederaufnahme des Glutamats und die Aktivierung Volumen-abhängiger Kanäle (VRAC) bewirkt ^{66,151}. Der Verlust des Na^+ -Gradienten verhindert die Glutamat-Wiederaufnahme über den Na^+ /Glutamat-Transporter, der aufgrund der Depolarisation seine Funktion sogar umkehren kann. Dieses führt zusammen mit dem Ausstrom durch Volumen-abhängige Kanäle, die durch das begleitende Zellödem bei Ischämie aktiviert werden, zu einer Erhöhung der Glutamat-Konzentration und damit einer vermehrten Bindung an postsynaptischen Rezeptoren.

Bei den Volumen-abhängigen Kanälen handelt es sich um Membrankanäle, die durch Veränderungen des Zellvolumens in ihrer Aktivität verändert werden. Sie sollen einer Zellschwellung durch Ausstrom osmotisch wirksamer Substanzen entgegen wirken. Der Mechanismus der Detektion des Zellvolumens und somit der Aktivierung dieser Kanäle ist komplex und Gegenstand weiterer Forschung ^{90,120,149}.

Der durch Glutamat hervorgerufene Ionen-Einstrom erfolgt größtenteils über den NMDA-Rezeptor, bei dem es sich um einen nicht-selektiven Ionenkanal handelt, so dass er neben Kalzium-Ionen noch für andere Kationen, im wesentlichen Natrium- und Kalium-Ionen, passierbar ist. Somit verstärkt Glutamat die durch den ATP-Mangel bereits bestehenden Ionen-Verschiebungen.

Jedoch bestehen Hinweise, dass die exzitatorischen Neurotransmitter nicht alleinig für den Zelltod der Neurone verantwortlich sind ⁹¹. Zum einen fehlt die Korrelation zwischen der selektiven Vulnerabilität der Nervenzellen bestimmter Hirnregionen während der globalen zerebralen Ischämie und deren NMDA-Rezeptoren-Dichte ¹¹¹. Als Erklärung für die selektive Vulnerabilität dient die Abwesenheit von GABA oder

Acetylcholinesterase in empfindlicheren Neuronen, wodurch es zu einer verminderten Resistenz gegenüber der Hirnischämie kommt ^{70,154}. Weiterhin soll in den selektiv vulnerablen Neuronen des Gehirns die Protein-Synthese empfindlicher auf Ischämie reagieren. Die Folge ist, dass es nach Rezirkulation in den selektiv vulnerablen Regionen länger als in den anderen Hirnregionen dauert, bis die Protein-Synthese wieder einsetzt und es häufiger nach Ischämie zu einem vollständigen Sistieren der Protein-Synthese kommt ⁵⁹. Zum anderen zeigten sich in Bezug auf die Exzitotoxizität in einigen tierexperimentellen Versuchen widersprüchliche Ergebnisse bei der Verwendung von NMDA-Antagonisten. Einerseits zeigte sich an Tieren eine neuroprotektive Wirkung der NMDA-Antagonisten in ischämischen Situationen ¹⁴³, obwohl wiederum andere Studien eine fehlende Wirksamkeit von NMDA-Antagonisten ergaben ^{13,38}. Als Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse dienen zum einen die unterschiedlichen Modelle zur Simulation der Ischämie und zum anderen die Wirkung von Glutamat über nicht-NMDA-Rezeptoren. Zu bedenken ist dabei auch, dass die Glutamat-Rezeptoren wichtig für die Funktion des zentralen Nervensystems sind und folglich eine Blockade dieser Rezeptoren zu deutlichen Nebenwirkungen führen kann. Hierbei können die Nebenwirkungen zur Reduktion der Dosis während des Versuchs zwingen und dann entsprechend eine deutliche Verringerung der neuroprotektiven Wirkung zur Folge haben ^{12,32}.

Darüberhinaus führt das Phänomen der Spreading Depression ebenfalls zu einer deutlichen Steigerung der Glutamat-Ausschüttung; es ergibt sich jedoch kein neuronaler Schaden durch die Spreading Depression ⁸⁹. Bei der Spreading Depression handelt es sich um ein bioelektrisches Phänomen, bei dem es zu einer langsam fortschreitenden Depolarisation in neuronalem Gewebe kommt. Sie wird in Verbindung mit einigen Krankheiten beobachtet; unter anderem soll sie in Zusammenhang mit der Entstehung der Migräne stehen. Auch bei zerebraler Ischämie wird die Spreading Depression beobachtet. Die hierbei entstehende Depolarisationsfront verstärkt den Nervenzellschaden im ischämischen Areal, ist aber nicht als primäre Ursache des neuronalen Schadens anzusehen. Insgesamt ist das Wissen über die Spreading Depression noch nicht ausreichend, um ihre Rolle bei der zerebralen Ischämie endgültig zu bewerten ^{47,146}.

Die Anzeichen für die Beteiligung von Glutamat über NMDA-Rezeptoren sind aber so stark, dass bereits erste klinische Versuche mit entsprechenden Antagonisten unternommen wurden ⁴⁹.

Resultierend wird als Hauptmechanismus für den neuronalen Zellschaden der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle angesehen ¹³¹, der auch über andere Wege als den NMDA-Rezeptor-Kanal erfolgt. Die Kalzium-Ionen strömen auch über Spannungs-gesteuerte Kanäle, die durch die Depolarisation bei Ischämie geöffnet werden, und durch die Protonen-gesteuerten Ionenkanäle (ASIC, siehe 1.2.3.2.), die durch die Azidose aktiviert werden, in die Nervenzellen. Den Einstrom kann die Zelle während der Ischämie wegen ihrer erschöpften ATP-Reserven nicht ausgleichen, weil dadurch die primär und sekundär aktiven Ca^{2+} -Transporter ausfallen.

Die Kalzium-Ionen aktivieren als Signaltransmitter intrazellulär verschiedene Enzyme, deren Funktionen zum Zelluntergang beitragen. Zu diesen Enzymen gehören die Phospholipase A_2 , die Proteinkinase C und die Ca^{2+} -abhängige Calmodulin-Kinase ⁶⁹. Als zusätzliche Quelle für eine Erhöhung der intrazellulären zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration ist der Einstrom aus dem Endoplasmatischen Retikulum als intrazellulären Kalzium-Speicher erkannt worden. Dies führt zu einer Reduktion der Ca^{2+} -Konzentration im Endoplasmatischen Retikulum mit negativen Folgen für die Protein-Synthese und die Zellfunktion ^{98,99}. Weiterhin werden Kalzium-Ionen bei hohen intrazellulären Konzentrationen in den Mitochondrien angereichert. Die Mitochondrien verlieren so aufgrund verschiedener Mechanismen den elektrochemischen Gradienten über ihrer inneren Membran. Außerdem kann es bedingt durch die Freisetzung proapoptotischer Proteine aus den Mitochondrien zur Induktion der Apoptose kommen ^{37,59}. Mittlerweile geht man also davon aus, dass die unterschiedlichen Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentration in den verschiedenen intrazellulären Kompartimenten (Zytoplasma, Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien) an der Entstehung des Zelltodes beteiligt sind ⁹⁹. Außerdem gibt es Hinweise, dass auch der Weg über den die Kalzium-Ionen in die Zelle einströmen für ihre toxische Wirkung entscheidend ist ¹²⁴. Obwohl gesichert ist, dass Kalzium-Ionen Vermittler des neuronalen Zelltodes sind, sind die exakten Signalwege noch nicht vollständig aufgeklärt worden.

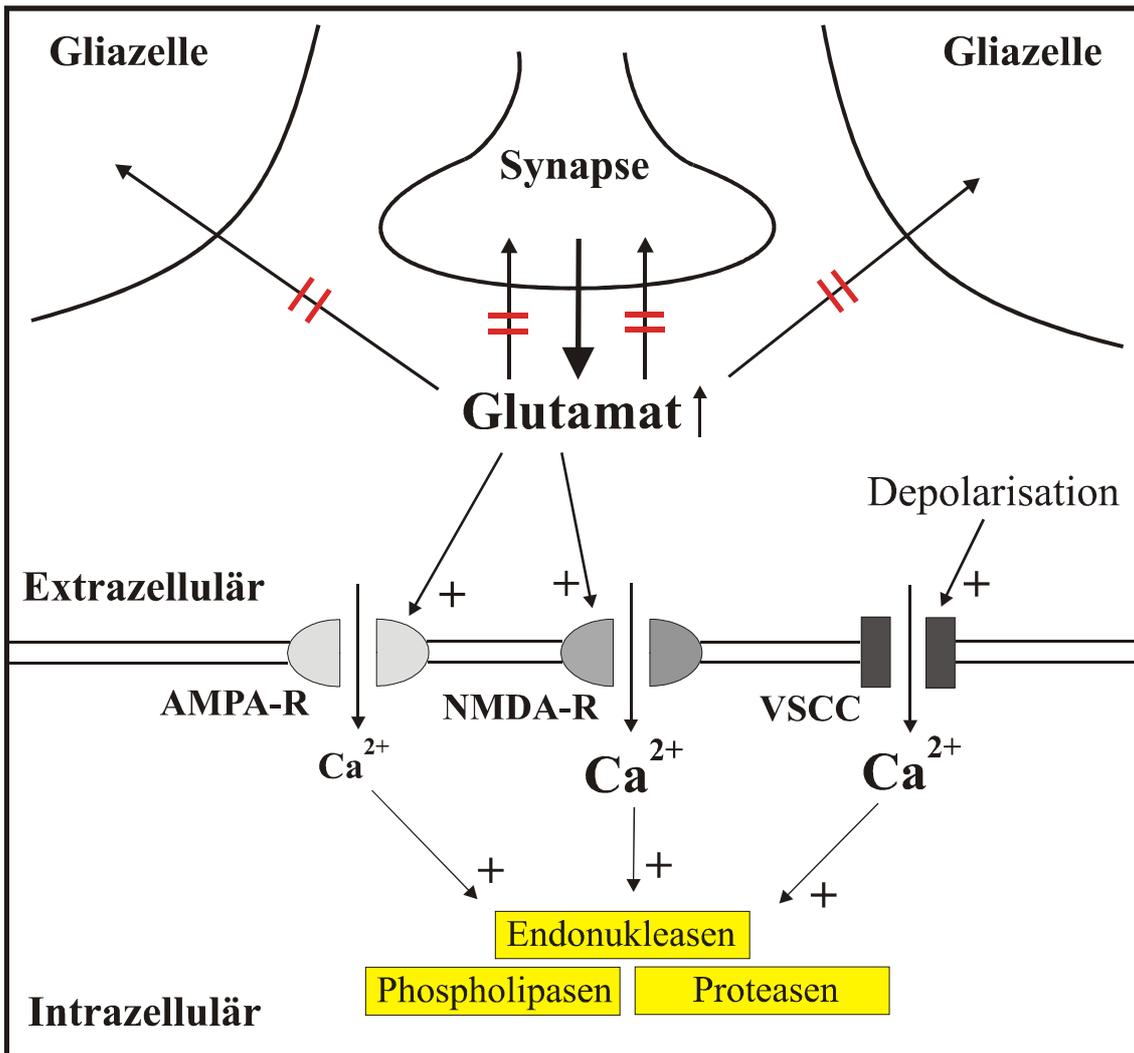


Abb.4: Bei Ischämie erhöht sich die extrazelluläre Glutamat-Konzentration. Es folgt ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über Glutamat-Rezeptor-Kanäle (AMPA, NMDA), aber auch über Spannungsgesteuerte Ionenkanäle (VSCC). Die Kalzium-Ionen wirken als intrazelluläre Botenstoffe, die innerhalb der Zelle Enzyme aktivieren. Diese Enzyme tragen zum Zelltod der Nervenzellen bei. [eigene Grafik]

1.2.4. Aminosäure-Freisetzung während der Ischämie

Die Ischämie wirkt sich auf die Konzentration der extrazellulären Aminosäuren aus. Dies deutet auf Veränderungen bei der Freisetzung bzw. Aufnahme von Aminosäuren unter ischämischen Bedingungen und nach Reperfusion hin. Von Interesse sind zunächst das Verhalten der Neurotransmitter Glutamat, Aspartat und GABA in dieser

Situation; aber auch Glutamin, Taurin und weitere Aminosäuren zeigen Veränderungen. In Untersuchungen an Tiermodellen zeigte sich während der Ischämie ein signifikanter Anstieg der Extrazellulärkonzentrationen der exzitatorischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat. Weiterhin konnte eine signifikante Erhöhung der Konzentrationen von Taurin und GABA festgestellt werden. Die erhöhten Konzentrationen dieser Aminosäuren kehrten nach Reperfusion auf das Ausgangsniveau zurück. Währenddessen war der Verlauf der Glutamin-Konzentration in den verschiedenen Untersuchungen unterschiedlich. Einerseits kam es zu einem Konzentrationsabfall von Glutamin im extrazellulären Raum nach der Reperfusion, während andererseits keine Veränderungen der Glutamin-Konzentration auftraten ^{7,66,105,159,175}. Zusätzlich wurde mit Hilfe der Mikrodialyse auch menschliches Hirngewebe untersucht, in dem wie in den Tierexperimenten die extrazellulären Aminosäuren anstiegen. Die Zunahme war stärker als bei den Tieren, wobei die Daten zum menschlichen Hirngewebe jedoch begrenzt sind ⁶³. Als Mechanismen der Anreicherung der Aminosäuren im extrazellulären Raum gelten zum einen die Hemmung der Wiederaufnahme über Aminosäure-Transporter und zum anderen der Ausstrom über Volumen-regulierte Ionenkanäle. Diese beiden Wege haben einen großen Anteil an der Zunahme der Konzentration der extrazellulären Aminosäuren durch die Ischämie ^{66,115}. Aber auch die Schädigung der Zellmembran durch die Ischämie trägt zum Austritt der Aminosäuren in den extrazellulären Raum bei ^{95,104}. Der Beitrag der ATP-abhängigen Exozytose aus den Synaptosomen ist dagegen gering, weil es zu einem ATP-Abfall während der Ischämie kommt ¹⁰⁶.

1.2.5. Elektrophysiologische Veränderungen während Ischämie

Elektrophysiologisch messbare Größen des Hirngewebes sind das Membranpotential der Zellen und die evozierten Potentiale in bestimmten Bereichen des Nervengewebes. Diese bioelektrischen Signale korrelieren mit der Funktion und Integrität der Nervenzellen und ihres Netzwerkes. Die elektrophysiologischen Parameter dienen als Indikatoren für die Vitalität des Hirngewebes, da sie sich während der Ischämie verändern und diese Veränderungen bei entsprechendem Zellschaden persistieren können.

1.2.5.1. Anoxische Terminalnegativierung (ATN)

Im Zentralnervensystem zeigen Gleichspannungsunterschiede die Veränderungen des Membranpotentials an. Diese DC-Potentiale werden genutzt, um Veränderungen des Ionen-Gleichgewichts des Hirngewebes unter ischämischen Bedingungen zu erfassen. Die anoxische Terminalnegativierung (ATN) stellt ein Ereignis bei Ischämie dar, bei dem es zu einer plötzlichen Negativierung des extrazellulären DC-Potentials kommt. Jedoch folgt sie auf den Beginn der Ischämie mit einer Latenz von wenigen Minuten. Die Ursache liegt im Verlust des Ionen-Gleichgewichts, welcher zum Nettofluss positiver Valenzen in den intrazellulären Raum führt. Durch Erschöpfung der zellulären ATP-Konzentrationen kommt es zum Ausstrom von Kalium-Ionen und zum Einstrom von Natrium-, Kalzium und Chlorid-Ionen, was zur Depolarisation der Zellmembran führt (s.o.). Die ATN wird als Signal für den Eintritt eines kritischen ischämischen Schadens angesehen. Wird das Nervengewebe innerhalb kurzer Zeit reoxygeniert, steigt das DC-Potential zurück zum Ausgangsniveau. Trotzdem kann es bereits zu irreversiblen Schäden der Nervenzellen gekommen sein^{20,68}.

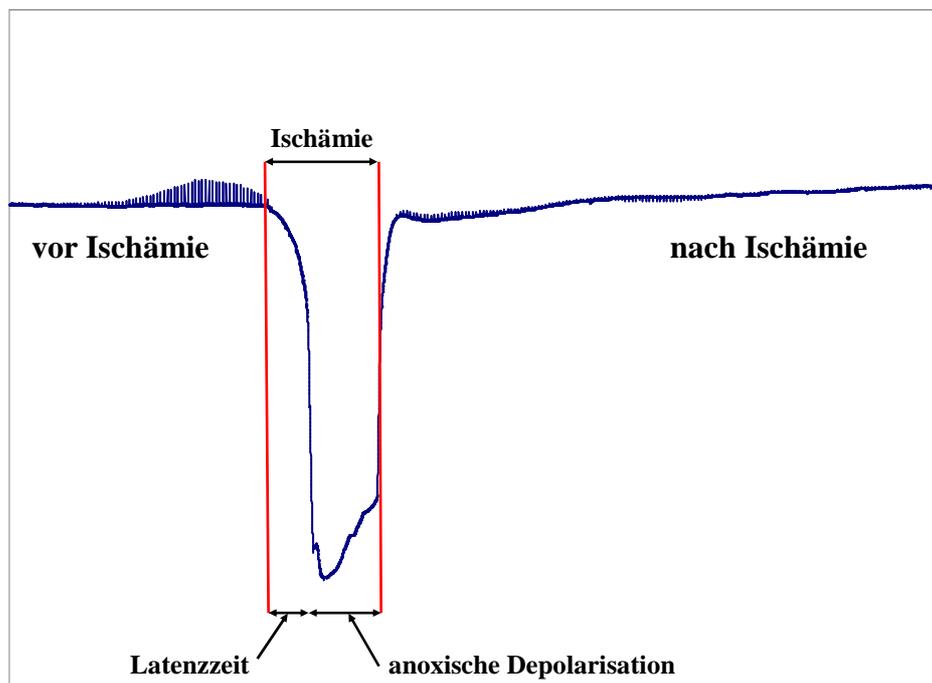


Abb.5: Die Abbildung stellt den Verlauf des DC-Potentials während eines Versuches dar [eigene Messung].

1.2.5.2. Evozierte Potentiale (EP)

Die evozierten Potentiale stellen Summenaktionspotentiale einer Vielzahl von Neuronen dar. Sie entstehen durch einen bestimmten Reiz, der zu einer Reaktion des neuronalen Netzwerks führt. Diese Reaktion des neuronalen Netzwerks erfolgt synchron, ist reizbezogen und kann als Verarbeitungsprozess auf diesen Reiz verstanden werden. Sind evozierte Potentiale ableitbar, ist dies zunächst ein Hinweis auf die synaptische Signalübertragung und somit Voraussetzung für die Verarbeitung im neuronalen Netzwerk. Bei der synaptischen Signalübermittlung bewirkt die Transmitterbindung an die postsynaptischen Rezeptoren die Entstehung von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP) bzw. inhibitorischen postsynaptischen Potentialen (IPSP). Die Summe dieser EPSP und IPSP führt zu Veränderungen des Membranpotentials. Falls ein bestimmter Schwellenwert erreicht wird, entsteht an der Nervenzellmembran ein Aktionspotential, das dann entlang der Zellmembran fortgeleitet wird. Als Antwort auf einen Reiz werden in mehreren

Neuronen Aktionspotentiale erzeugt, deren Summe als Summenaktionspotential messbar ist. Das evozierte Potential ist also die Summe der auf einen bestimmten Reiz in etwa synchron erzeugten Aktionspotentiale. Durch die unterschiedliche Verarbeitung verschiedener Reize ist die Form der evozierten Potentiale variabel und der Verlauf meistens typisch für bestimmte Reize. Zur anschaulichen Darstellung lassen sich die evozierten Potentiale in Form von Feldpotentialen im Gewebe erfassen. Die Feldpotentiale entstehen durch Potentialgradienten entlang der Nervenzellmembran, die die Folge lokaler Veränderungen des Membranpotentials durch die Aktionspotentiale und die postsynaptischen Potentiale sind. Durch die Potentialgradienten kommt es zu extrazellulären Ionenströmen, die die Feldpotentiale induzieren. Diese Feldpotentiale lassen sich mit Elektroden sowohl an der Oberfläche als auch im Gewebe ableiten. Es ist zu beachten, dass die Form der Feldpotentiale in Abhängigkeit von der Platzierung der Elektroden variiert ^{72,147}. Bei Ischämie verschwinden die evozierten Potentiale, weil die synaptische Signalweiterleitung eingestellt und durch die Membrandepolarisation die Bildung von Aktionspotentialen verhindert wird. Wird das Gewebe wieder ausreichend versorgt, kommt es zu einer Erholung dieser neuronalen Vorgänge. Die Regeneration der evozierten Potentiale ist abhängig von der Dauer der Ischämie. Bei längerer Ischämiezeit erreichen die evozierten Potentiale nicht mehr die ursprüngliche Größe, weil ein Teil der Nervenzellen irreversibel geschädigt wurde und somit die Zahl der Neurone, die am Summenaktionspotential beteiligt sind, reduziert ist.

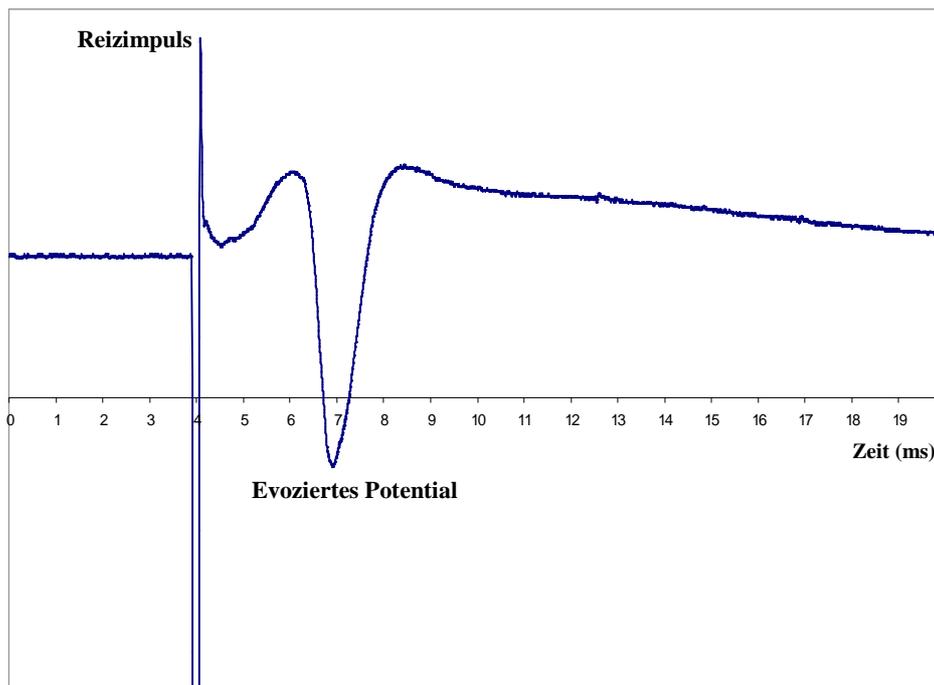


Abb.6: Darstellung eines evozierten Potentials als Reaktion auf einen Stimulationsreiz in Form der messbaren Feldpotentiale. Das evozierte Potential zeigt die Form einer Gauß-Kurve, weil die Aktionspotentiale der beteiligten Neurone nicht exakt synchron entstehen. [Die Abbildung zeigt ein evoziertes Potential, das bei den eigenen Versuchen aufgezeichnet wurde]

1.3. Aufgaben von Aminosäuren im Gehirn

Aminosäuren haben im Gehirn ebenso wie im gesamten menschlichen Organismus eine essentielle Bedeutung. Im Gehirn erfüllen sie neben ihrer Funktion als Bausteine der Proteine weitere Aufgaben, vor allem als Neurotransmitter bei der Signalübertragung. Die Aufgaben einiger wichtiger Aminosäuren werden in den folgenden Abschnitten näher dargestellt.

1.3.1. Glutamat und Aspartat

Glutamat und Aspartat sind nicht-essentielle Aminosäuren des menschlichen Organismus. Sie stehen im Zusammenhang mit zahlreichen Stoffwechselfvorgängen, z.B. Transaminierung und Harnstoff-Zyklus, und gehören beide zu den 20 Aminosäuren, die als Bausteine der Proteine dienen⁶⁴. Im ZNS erfüllen sie die Aufgabe von Botenstoffen, die für die Signalübertragung an den Synapsen zuständig sind. Dabei sind sie die wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter im ZNS. Sie werden in Synaptosomen, Transmitter enthaltenden Vesikeln in der synaptischen Endigung, gespeichert und durch Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzt. Das Signal für die Mg^{2+} /ATP-abhängige Freisetzung erfolgt durch intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg über Spannungs-gesteuerte Ca^{2+} -Kanäle in der präsynaptischen Membran. Für Glutamat als Liganden konnten mehrere Rezeptor-Typen identifiziert werden¹². Es wird zwischen ionotropen und metabotropen Rezeptoren unterschieden. Die ionotropen Rezeptoren sind mit Ionenkanälen verbunden, die für Kationen, im wesentlichen Kalzium-, Natrium- und Kalium-Ionen, durchgängig sind. Sie werden in drei Gruppen unterteilt, die sich von exogenen Agonisten ableiten. Es gibt den NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptor³¹. Während die AMPA-Rezeptoren eine geringere Affinität für Glutamat aufweisen als NMDA-Rezeptoren, wird ihre Wirkung schneller vermittelt als die der NMDA-Rezeptoren. Die NMDA-Rezeptoren besitzen zusätzlich einen Mg^{2+} -Block, der durch Depolarisation aufgehoben wird, und Bindungsstellen für Glyzin als Koagonisten. Deshalb wird von den NMDA-Rezeptoren auch eine Rolle bei Gedächtnisvorgängen angenommen. Die metabotropen Glutamat-Rezeptoren, bei denen drei Typen unterschieden werden, sind an G-Proteine gekoppelt. Der Typ I überträgt das Signal über die Phospholipase C auf Inositoltriphosphat als Signalübermittler, während bei den Typen II und III die Signaltransduktion über die Hemmung der Adenylatzyklase läuft. Neben seiner Funktion als Neurotransmitter wirkt Glutamat auch auf die Entwicklung der Nervenzellen, kann aber darüber hinaus zur Neurodegeneration und Exzitotoxizität beitragen⁸¹. Im Zusammenhang mit Glutamat als Neurotransmitter wird oft das Aspartat erwähnt. Obwohl die Rolle des Aspartats als Neurotransmitter lange Zeit nicht gesichert war, konnte in neueren Untersuchungen dieses Konzept unterstützt werden⁵¹. Aspartat ist dabei auch ein Ligand an den Glutamat-Rezeptoren,

wobei es nur eine geringe bis keine Affinität zum AMPA-Rezeptor besitzt und so fast nur über den NMDA-Rezeptor wirkt. Die Auswirkungen des Aspartat während der zerebralen Ischämie wurden im Vergleich zum Glutamat kaum untersucht.

1.3.2. GABA

GABA ist die Kurzform für gamma-Aminobuttersäure und dient im Gehirn als wichtiger inhibitorischer Neurotransmitter. GABAerge Synapsen kommen vor allem in Interneuronen und in Axonen der Purkinje-Zellen im Gehirn vor. Grundlage für die Synthese von GABA bildet alpha-Ketoglutarat aus dem Glukosestoffwechsel. Alpha-Ketoglutarat wird zu Glutamat transaminiert, das wiederum durch die Glutamatdecarboxylase (GAD) zu GABA decarboxyliert wird. Die GAD ist relativ spezifisch für Neurone mit GABA-Synthese. GABA wirkt dabei über zwei verschiedene Rezeptor-Klassen, GABA_A und GABA_B. GABA_A-Rezeptoren sind an einen Ionenkanal gekoppelt, der durch die Bindung des Liganden aktiviert wird. Es handelt sich um einen Cl⁻-Kanal, dessen Öffnung zur Hyperpolarisation des Membranpotentials durch Einstrom von Chlorid-Ionen führt. Durch die Hyperpolarisation entsteht ein inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP), das erregenden Einflüssen entgegen wirkt. Der GABA_A-Rezeptor-Komplex verfügt über weitere Bindungsstellen, die die Ansatzpunkte von Pharmaka wie Benzodiazepinen und Barbituraten sind. Die entsprechenden endogenen Liganden konnten bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Der GABA_B-Rezeptor leitet sein Signal über ein G-Protein als intrazellulären Signalübermittler weiter. Das G-Protein überträgt das Signal auf einen K⁺-Kanal und öffnet diesen somit. An der präsynaptischen Membran werden über das G-Protein Ca²⁺-Kanäle geschlossen und dadurch die Freisetzung der Transmitter in den synaptischen Spalt gehemmt. Die Terminierung der Signalübermittlung erfolgt durch Aufnahme von GABA sowohl über die präsynaptische Membran als auch in die Gliazellen des Gehirns^{67,136}.

1.3.3. Glutamin

In den 70er Jahren fand man heraus, dass Glutamin als Substrat zum Energie-Metabolismus des Gehirns normalerweise keinen bedeutenden Beitrag leistet. Dagegen zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Glutamin-Konzentration und der Synthese und Freisetzung einiger Neurotransmitter. Die Schlussfolgerung war, dass Glutamin im Nervensystem die Aufgabe eines Präkursors für die Synthese der wichtigen Neurotransmitter Glutamat, Aspartat und GABA hat ¹⁴. Der Glutamin-Metabolismus findet sowohl in den Nervenzellen als auch in den Gliazellen statt. Es entsteht ein Zyklus, der für die Aufrechterhaltung des Neurotransmitter-Pools in den synaptischen Endigungen von Bedeutung ist. Die Gliazellen nehmen als Substrate Glukose aus dem Blut auf und können auch das aus dem synaptischen Spalt aufgenommene Glutamat und GABA verwerten. Für die Glutamat-Aufnahme verfügt die Astrozytenmembran über eine große Dichte an Glutamat-Transportern, die die der präsynaptischen Membran übersteigt ¹¹⁸. Die Substanzen werden zum Teil durch die Glutamin-Synthetase, die besonders stark in der Neuroglia exprimiert wird, in Glutamin überführt. Dieses Glutamin verlässt das gliale Kompartiment in den extrazellulären Raum und wird aus diesem von den Nervenzellen aufgenommen. Für den Transport des Glutamins durch die Zellmembran stehen verschiedene Transporter bereit, deren genauer Beitrag zum Glutamat-Glutamin-Zyklus noch Gegenstand der Forschung ist. Diese Glutamin-Transporter sind zum einen an Ionen-Flüsse gekoppelt und zum anderen mit dem gleichzeitigen Transport anderer Aminosäuren verbunden. Das Glutamin, das in die Nervenzellen gelangt, wird durch spezifische Enzyme verstoffwechselt. Die Neurone enthalten die Enzyme Glutaminase und Glutamatdecarboxylase, deren jeweilige Aktivität vom Typ der Nervenzelle, glutamaterg oder GABAerg, abhängt. Diese Enzyme katalysieren die Umwandlung des Glutamins und der Glukose in die Neurotransmitter Glutamat und GABA. Obwohl die Neurone ihre Botenstoffe auch aus Glukose synthetisieren können, dominiert bei der Bildung von Glutamat das gliale Glutamin. Die Transmitter werden dann von den Neuronen auf einen entsprechenden Stimulus hin in den synaptischen Spalt freigesetzt und können so wieder in die Gliazellen gelangen, wodurch der Kreislauf geschlossen wird. Somit ist Glutamin ein wichtiger Bestandteil beim „Recycling“ von Glutamat ¹⁷. Außerdem gibt es Hinweise,

dass unter ischämischen Bedingungen Glutamin sowie Glutamat und GABA als Substrate für die Energiegewinnung eingesetzt werden können ¹⁰⁰. Darüber hinaus ermöglicht das Glutamin aus den Gliazellen den Neuronen bei unzureichender Glukose-Versorgung ihren Neurotransmitter-Pool auf zu füllen. Dieser Weg trägt zum exzitotoxischen Schaden bei Ischämie bei, weil die glutamatergen Nervenzellen trotz mangelnder Glukose-Versorgung ihre Neurotransmitter produzieren können. Dadurch kann Glutamat weiterhin in den synaptischen Spalt freigesetzt werden ^{46,52}. Weiterhin kann Glutamin während Ischämie als Energiesubstrat dienen und somit protektive Wirkung auf das Hirngewebe haben. Jedoch kommt es bei Zugabe zunehmender Glutamin-Konzentrationen zu einer zunehmenden Glutamatfreisetzung in den extrazellulären Raum und somit einer Überlagerung des protektiven Effekts durch die vermehrte Exzitotoxizität ¹⁰⁵.

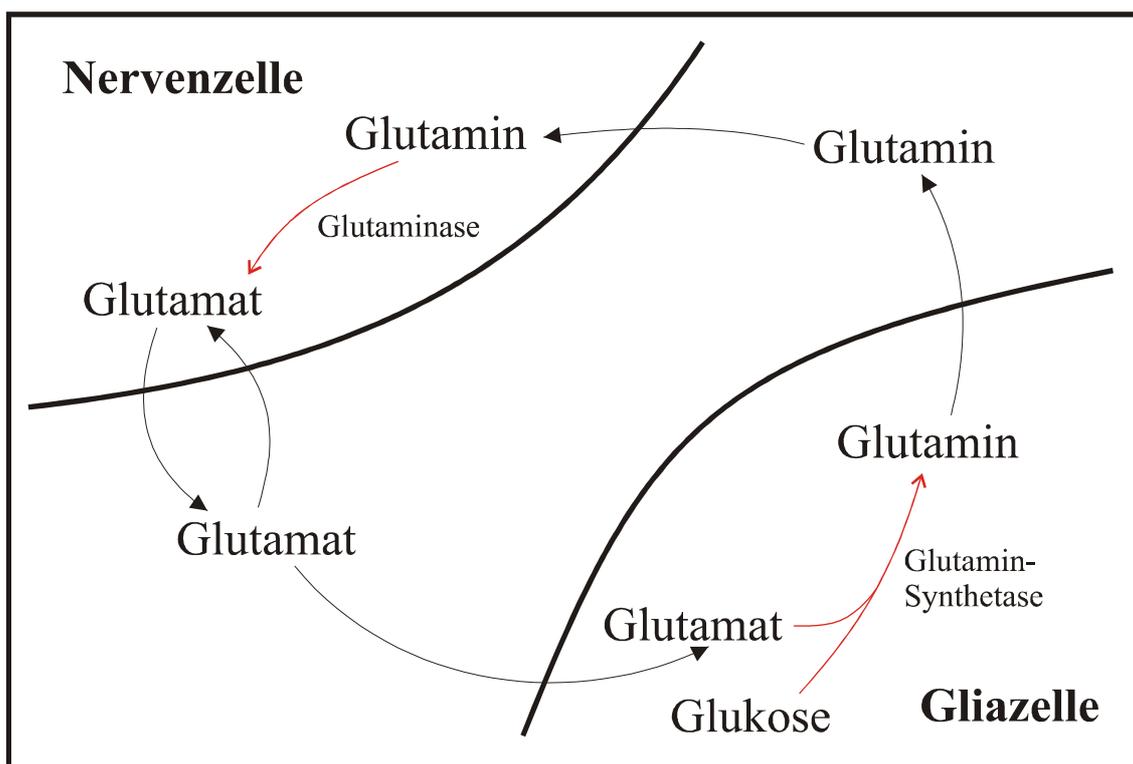


Abb.7: Schematische Darstellung des Glutamat-Glutamin-Zyklus [eigene Grafik]

1.3.4. Taurin

Bei Taurin handelt es sich um ein Abbauprodukt der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin. Genau genommen ist Taurin eine Aminosulfonsäure, wird aber im Sprachgebrauch häufig als Aminosäure bezeichnet. Taurin kommt im Gehirn in hohen Konzentrationen vor, insbesondere intrazellulär. Dem Taurin werden vorwiegend Aufgaben der Osmoregulation zugesprochen ¹²⁵. Bei Schäden der neuronalen Zellen, z.B. bei Ischämie, strömt Taurin in den extrazellulären Raum und soll somit als Osmoregulator die Zellschwellung reduzieren. Zum großen Teil ist der Taurin-Efflux nach extrazellulär ein Ca^{2+} -unabhängiger Vorgang. Er findet über Diffusion durch die Membran und eine verringerte Wiederaufnahme in die Zellen statt. Zusätzlich sind auch Volumen-regulierte Kanäle vorhanden, die auf Veränderungen des Zellvolumens mit einem Ausstrom von u.a. Taurin reagieren ⁶⁶. Der Ausstrom des Taurin ist dabei teilweise auch an Glutamat-Rezeptoren gekoppelt, so dass der ischämische extrazelluläre Anstieg von Glutamat die Taurinfreisetzung verstärkt. Weiterhin wird Taurin eine neuromodulatorisch-inhibitorische Wirkung zugesprochen; u.a. beeinflusst Taurin Cl^- -Kanäle und ist Bestandteil des Dipeptids gamma-Glutamyltaurin. Die Aufgaben und die Wirkmechanismen dieses Dipeptids sind bisher noch nicht vollständig verstanden. Es gibt aber deutliche Hinweise auf Effekte von gamma-Glutamyltaurin auf neurales Gewebe. Diesem Dipeptid wird eine Aufgabe als Modulator der Signalübertragung durch exzitatorische Aminosäuren im ZNS zugeschrieben. Dabei wurde eine antagonistische Wirkung auf exzitatorische Aminosäuren und ihre Effekte beschrieben. Weiterhin wurden bei gamma-Glutamyltaurin Wirkungen auf Emotionen und antikonvulsive Eigenschaften festgestellt ¹⁰. Auffällig sind auch Homologien in der Molekülstruktur des Taurin zum GABA, die Wechselwirkungen bei den Wirkmechanismen vermuten lassen ⁷³. Zusätzlich soll Taurin auch den Ca^{2+} -Haushalt beeinflussen. Zusammenfassend kann von einer protektiven Wirkung des Taurins ausgegangen werden, indem es den schädlichen Einfluss der Hyperexzitation mindert und die Zellschwellung reduziert ^{76,122,162}. Darüber hinaus hat Taurin auch eine Funktion bei der Entwicklung des ZNS. Es beeinflusst sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung der Nervenzellen ¹⁷³.

1.4. Barbiturate als Mittel zur Neuroprotektion

Die Idee der pharmakologischen Neuroprotektion kann bis zum Anfang der 70er Jahre zurückverfolgt werden. Damals konnte gezeigt werden, dass Barbiturate in der Lage sind den ICP zu senken und somit eine protektive Wirkung bei Hirntraumata haben könnten¹³⁴. Bis heute folgten zahlreiche Experimente an Tieren, die die neuroprotektive Wirkung der Barbiturate nachweisen konnten. Es konnten sowohl histologisch eine Reduzierung des Umfangs des ischämischen Hirninfarkts als auch elektrophysiologische Auswirkungen gezeigt werden, wobei in-vivo und in-vitro-Experimente durchgeführt wurden^{22,28,48,65,108,113,123,144,165,172}. Es gibt aber auch Veröffentlichungen laut derer im Tierversuch keine protektiven Wirkungen der Barbiturate nachweisbar waren⁴³. Die trotzdem meist positiven tierexperimentellen Ergebnisse mit Barbituraten konnten insbesondere im klinischen Einsatz nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden. Es zeigte sich lediglich in einer klinischen Studie ein signifikanter Effekt auf postoperative neuropsychiatrische Untersuchungen, wobei dieses Ergebnis kritisch bewertet wurde^{93,133}. Eine zerebroprotektive Wirkung der Barbiturate in der klinischen Anwendung beim Menschen konnte in weiteren Studien nicht untermauert werden^{1,15,166}. Dieser Misserfolg bei der Reproduktion der experimentellen Ergebnisse in klinischen Studien ergab sich aber nicht nur bei Barbituraten, sondern auch bei anderen potentiell neuroprotektiven Medikamenten^{32,44,157}. Zu bedenken ist, dass dabei jeweils unterschiedliche klinische Situationen vorlagen, die die Vergleichbarkeit hinsichtlich der Wirksamkeit der Barbiturate einschränken⁸⁶. Teilweise lassen sich die unterschiedlichen Ergebnisse dadurch erklären, dass Barbiturate vor allem in Situationen, in denen die Hirnfunktion noch erhalten ist, eine protektive Wirkung haben. Diese noch vorhandene Hirnfunktion ist anhand der Aktivität im EEG feststellbar. Sobald das EEG keine Aktivität mehr zeigt, lässt der protektive Effekt von Barbituraten auf das Gehirn nach⁸⁴.

1.4.1. Auswirkungen der Barbiturate auf den Hirnstoffwechsel

Zunächst wurde erkannt, dass Barbiturate den ICP zu senken vermögen. Dieses ist jedoch nur einer der Mechanismen, welche der klinischen Nutzung der Barbiturate zugrunde liegen. Als Hauptmechanismus wird die Fähigkeit der Barbiturate angesehen den zerebralen Metabolismus zu senken. Die Senkung des ICP und die Umverteilung des Blutflusses in das ischämische Gewebe, reverse-steal oder inverse-steal Effekt genannt, werden als sekundärer Beitrag zur Neuroprotektion angesehen. Diese Eigenschaften beruhen auf der Vasokonstriktion durch Barbiturate. Die Erhöhung des Gefäßwiderstands führt zu einer verminderten Durchblutung, betrifft aber nicht die durch Ischämie geschädigten Bereiche des Gehirns. In ischämischen Arealen haben die Barbiturate durch den pathologischen Zustand des Gefäßsystems keine vasokonstriktive Wirkung, so dass es zu einer Umverteilung in diese Bezirke kommt ^{16,34,148}. Als weitere vaskuläre Komponente der Barbiturate kann der Einfluss auf die Blut-Hirn-Schranke angesehen werden. Während unter physiologischen Bedingungen kein Einfluss von Barbituraten auf die Blut-Hirn-Schranke entdeckt werden konnte, zeigte sich während Ischämie eine verminderte Zunahme der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke durch die Gabe von Barbituraten ^{35,36}. Demgegenüber beeinflussen die Barbiturate auch direkt den Metabolismus des Nervengewebes. Bei der Beeinflussung des Hirnstoffwechsels zeigt sich eine deutliche Reduzierung des Funktionsstoffwechsels der Nervenzellen. Dieses macht sich in einer verminderten synaptischen Übertragung bemerkbar und somit in einer Hemmung der EEG-Aktivität. Der Erhaltungsstoffwechsel, der für die strukturelle Integrität und damit das Überleben der Zelle verantwortlich ist, bleibt unverändert. Das Gehirn und sein vaskuläres System reagieren auf eine Reduktion des Hirnmetabolismus jedoch mit einer Verringerung des Blutflusses, weil eine Kopplung zwischen Metabolismus und Blutversorgung im Gehirn besteht. Während Ischämie besteht bereits ein eingeschränkter Blutfluss und die Kopplung zwischen Metabolismus und Blutversorgung ist aufgehoben. Die Folge ist eine Verbesserung des Verhältnisses zwischen Nervenzellstoffwechsel und Blutfluss zugunsten der Blutversorgung durch die Gabe von Barbituraten. Die Auswirkungen von Barbituraten auf den Metabolismus sind dabei von der verabreichten Dosis abhängig ²⁸. Dabei zeigte sich zunächst, dass der

neuroprotektive Effekt sich durch eine Dosissteigerung verstärken ließ bis das EEG abflachte. Darüber hinaus konnten keine weiteren Verbesserungen durch Barbiturate erzielt werden⁸⁵. Daraus schloss man, dass die Wirkung der Barbiturate mit Erreichen der „burst-suppression“ im EEG maximal ist. Bei der „burst-suppression“ handelt es sich um ein Phänomen im EEG, bei dem eine niederamplitudige Aktivität unter 20µV („suppression“) vorliegt vermischt mit abrupt auftretenden EEG-Wellen („burst“), die sich von der Grundfrequenz deutlich unterscheiden. Die „burst-suppression“ wird bei schwerer Hirnschädigung und bei Gabe bestimmter Anästhetika beobachtet⁹². Deshalb wird die Dosierung bei zerebroprotektiver Indikation gesteigert, bis ein „burst-suppression“-EEG erreicht wird. Jedoch kamen nachfolgende Studien zu dem Ergebnis, dass das Auftreten der „burst-suppression“ im EEG für einen maximalen protektiven Effekt nicht erforderlich ist. Diese Ergebnisse führten zur Annahme, dass Barbiturate über weitere neuroprotektive Mechanismen das Gehirn schützen^{26,129,167}. So wurden in verschiedenen Veröffentlichungen weitere Mechanismen benannt, die zur Neuroprotektion durch Barbiturate beitragen sollen. Zu diesen gehören die Unterdrückung epileptischer Anfälle, das Abfangen freier Radikale, die Beeinflussung des Fettsäuremetabolismus, die Verringerung eines Hirnödems, die Membranstabilisierung und die Reduktion der Exzitotoxizität^{53,83}.

1.4.2. Molekulare Wirkmechanismen der Barbiturate

Die Barbiturate entfalten ihre Wirkung, indem sie Rezeptoren im Hirngewebe beeinflussen. Der GABA_A-Rezeptor konnte als ein wesentlicher Angriffspunkt identifiziert werden¹⁶³. Die Barbiturate sind Coagonisten an diesem inhibitorischen Rezeptor und verstärken so die hemmende Wirkung des Transmitters GABA auf das ZNS. Bei diesem Rezeptor handelt es sich wie bereits oben angeführt um einen Liganden-gesteuerten Cl⁻-Kanal, dessen Aktivierung zu einer Hyperpolarisation der Zelle führt^{137,153}. Barbiturate verändern aber auch die Leitfähigkeit der Spannungs-gesteuerten Ca²⁺-Kanäle. Die Folge ist ein verminderter Ca²⁺-Einstrom in die Nervenzellen bei Depolarisation^{11,50,83,177,178}. Weiterhin sollen Barbiturate auch Einfluss auf Rezeptoren für exzitatorische Aminosäuren haben. Studien geben

Hinweise, dass sie insbesondere den über NMDA- und AMPA-Rezeptoren vermittelten ischämischen Schaden der Nervenzellen vermindern^{178,179}. Darüber hinaus sollen die Barbiturate die extrazelluläre Glutamat-Konzentration unter hypoxischen Bedingungen reduzieren⁹. Dazu sind allerdings auch gegenteilige Aussagen vorhanden, die keine Beeinflussung der Konzentration von Glutamat und anderen exzitatorischen extrazellulären Aminosäuren durch Barbiturate während der Ischämie anführen konnten⁸⁸.

1.5. Ziel der Untersuchung

Diese Arbeit untersucht die Auswirkungen des Barbiturates Methohexital auf die Konzentrationen von Aminosäuren im extrazellulären Raum eines Hirnschnitt-Modells und auf elektrophysiologische Parameter unter ischämischen Bedingungen. Die Konzentrationen der extrazellulären Aminosäuren werden beginnend vor Ischämiesimulation für eine Stunde bestimmt, um die kurzfristigen Auswirkungen von Methohexital auf die Aminosäuren während und nach der ischämischen Situation zu ermitteln. Zusätzlich wird diese Erfassung mit der Messung von elektrophysiologischen Veränderungen kombiniert. Grundlage dieser Untersuchung war die prophylaktische Gabe von Methohexital bei Operationen, bei denen mit reduzierter Durchblutung des Gehirns zu rechnen ist. Das Ziel dieser Untersuchung ist die Erfassung der Veränderungen der extrazellulären Aminosäure-Konzentration durch Methohexital-Gabe vor und während Ischämie. Es besteht die Hypothese, dass Methohexital während Ischämie die extrazellulären Aminosäure-Konzentrationen beeinflusst und dieses zu einer protektiven Wirkung auf die Nervenzellen beiträgt.

2. Material und Methoden

2.1. Präparation der Hippocampus-Schnitte

Die Hirnschnitte der Ratte werden am Versuchstag im Institut für Physiologie präpariert. Diese Arbeit wird standardisiert vom medizinisch-technischen Personal des Institutes durchgeführt. Die 200-400g schweren männlichen und weiblichen Ratten werden zunächst durch eine intraperitoneale Injektion von Methohexital (250mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Danach erfolgt die Dekapitation und die Trepanation des Schädels. Nach Entnahme des Gehirns wird die Hippocampusformation dargestellt. Mit einem McIlwain-Tissue-Chopper werden transversale, parallel zu den Alveus-Fasern verlaufende Gewebeschnitte mit einer Dicke von 500 µm angefertigt. Nach der Präparation werden die Hippocampus-Schnitte in einer Inkubationskammer platziert. Diese Kammer enthält künstliche zerebrospinale Flüssigkeit (ACSF) mit folgender Zusammensetzung: 124 mmol/L NaCl, 4 mmol/L KCl, 1,24 mmol/L NaH₂PO₄, 1,3 mmol/L MgSO₄, 26 mmol/L NaHCO₃, 2 mmol/L Ca₂Cl und 10 mmol/L Glukose. Sie wird mit 95% O₂ und 5% CO₂ begast, so dass ein pH-Wert von 7,4 konstant gehalten wird. Die Temperatur in der Inkubationskammer wird auf 28° Celsius eingestellt. In der Inkubationskammer befinden sich mehrere separate Behältnisse, in die die Hippocampus-Schnitte verteilt werden. Die Verteilung erfolgt nach Lokalisation im Hippocampus, wobei eine Gliederung in ventraler, medialer und dorsaler Hippocampus jeweils für die linke und rechte Seite vorgenommen wird. Diese Unterteilung ermöglicht die Verwendung von Schnitten, die aus demselben Bereich des Hippocampus stammen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde können die Hippocampus-Schnitte in die Versuchskammer überführt werden. Zu diesem Zweck wird eine Kunststoffpipette verwendet, die mit ACSF gefüllt ist. Einzelne Schnitte werden durch eine ausreichend große Öffnung der Pipette vorsichtig angesaugt und dann zum Bestimmungsort überführt.

2.2. Versuchsaufbau

Die Durchführung der Versuche erfordert es, dass wesentliche Parameter in einer Interphase-Kammer ferngesteuert verändert werden können. Zu den steuerbaren Größen gehören die Temperatur sowie die Zufuhr der Flüssigkeit (Glukose) und des Gases (Sauerstoff). Dieses ist notwendig, weil die Versuchsapparatur mit den Hirnschnitten sich in einem Faradayschen Käfig befindet. Der Faradaysche Käfig vermindert die Beeinflussung der Messungen durch elektromagnetische Felder. Durch die Isolation des Versuchsplatzes werden die äußeren Einflüsse auf das Experiment verringert.

2.2.1. Interphase-Kammer

Die Interphase-Kammer ist eine von unserer Arbeitsgruppe konstruierte Apparatur, in der das Versuchsmaterial platziert wird. Sie bietet die Möglichkeit die Umweltbedingungen für die Hippocampus-Schnitte zu verändern und so den Erfordernissen des Versuches anzupassen. Diese Anpassung des Versuchsmilieus kann in kürzester Zeit vorgenommen werden. Die Hirnschnitte befinden sich dabei an der Grenzfläche zwischen wasserdampfgesättigter Gasphase und gasgesättigter Flüssigkeitsphase. Die Zusammensetzung beider Phasen ist unabhängig voneinander steuerbar. Dafür verfügt die Kammer über zwei Einlässe für die flüssigen Lösungen und weitere zwei Einlässe für die Gaszufuhr. So ist es möglich abwechselnd über jeweils einen der beiden Einlasskanäle die Kammer zu versorgen. Die Umschaltung zwischen den Kanälen erfolgt mit einer Relais-Schaltung für beide Phasen getrennt voneinander. Dieser Umschalt-Mechanismus ist ein Eigenbau der Elektrotechnik des Institutes der Physiologie der WWU Münster. Weiterhin wird von außerhalb des Versuchsplatzes die Temperatur in der Kammer gesteuert. Die Temperierung der Kammer erfolgt über Peltier-Elemente, die eine schnelle und stufenlose Veränderung der Temperatur erlauben. Zusammen mit einem Sensor, der die Temperatur in der Kammer misst, lässt sich über diese thermoelektrischen Elemente die gewünschte Temperatur einstellen. Damit die Bedingungen in der Versuchskammer stabil bleiben, wird eine

Kunststoffabdeckung verwendet. Die Abdeckung besitzt eine Öffnung, die oberhalb der Position des Versuchspräparates liegt. Diese Öffnung ist für die Elektroden gedacht, die die bioelektrischen Signale erfassen, und kann nach Platzierung der Elektroden ausreichend gegen äußere Einflüsse isoliert werden. Eine weitere Öffnung befindet sich zwischen Abdeckung und Kammer zum Abstrom des Gases und zum Abfluss der Lösungen. Die Strömungsrichtung des Gases durch die Öffnung beschränkt das Eindringen von Umgebungsluft und sichert den Erhalt des internen Milieus. Dieser Aufbau der Interphase-Kammer ermöglicht es eine Ischämie für den Hirnschnitt zu simulieren.

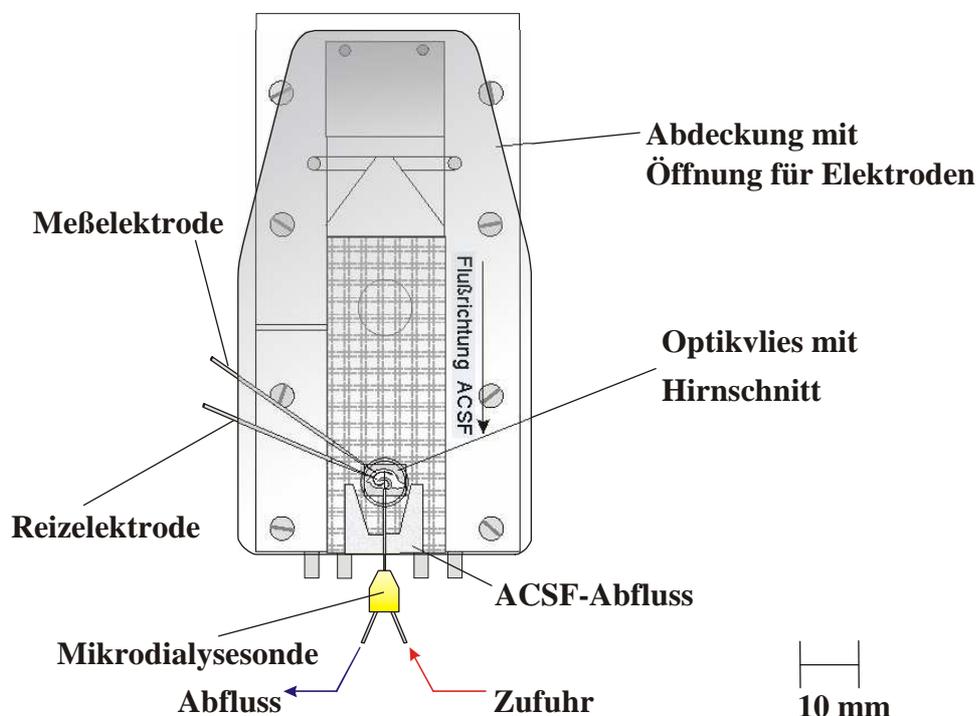


Abb.8: Bei der auf der Abbildung gezeigten Interphase-Kammer sind zusätzlich die Elektroden und die Mikrodialyse-sonde dargestellt. Die Öffnung für die Elektroden wird während des Experiments weitgehend abgedeckt, um den Einstrom von Umgebungsluft in die Kammer zu minimieren. [eigene Grafik]

2.2.1.1. Einrichtung der Interphase-Kammer

Die Interphase-Kammer muss vor Beginn der Experimente vorbereitet werden. Zunächst wird für den kontinuierlichen Abfluss der Lösungen gesorgt, damit die Versuchspräparate nicht überschwemmt und ihre Position in der Kammer während des Versuches verändert wird. Zu diesem Zweck wird die Kammer mit Filterpapier ausgelegt, um die Flüssigkeit kontrolliert abzuleiten und somit einen Stau zu verhindern, und der Hirnschnitt auf ein Optikvlies positioniert. Diese Maßnahmen gewährleisten die Lage des Hirnschnittes an der Grenzfläche zwischen flüssiger und gasförmiger Phase. Bei der gasförmigen Phase kann zwischen zwei Gasgemischen gewählt werden. Das erste Gemisch setzt sich aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid zusammen, während beim anderen Gasgemisch der Sauerstoff durch Stickstoff ersetzt wird. Die Gase durchströmen vor Einleitung in die Interphase-Kammer eine auf 34°C beheizte Befeuchtungskammer, damit sie einen wasserdampfgesättigten Zustand erreichen. Für die Flüssigkeitsphase unter Normbedingungen wird künstliche zerebrospinale Flüssigkeit (ACSF) verwendet (s.o.). Die Ischämie unterscheidet sich lediglich im Glukosegehalt. Sie hat eine Glukose-Konzentration von nur 2 mmol/L, während die restlichen Bestandteile der ACSF entsprechen. Die Lösungen werden vor Einleitung in die Versuchskammer mit den Gasgemischen der gasförmigen Phase äquilibriert. Die ACSF mit 10 mmol/L Glukose wird mit dem sauerstoffhaltigen Gas gesättigt, während die Lösung mit reduziertem Glukosegehalt mit dem stickstoffhaltigen Gas durchströmt wird. Zur Erzeugung von physiologischen Bedingungen werden das sauerstoffhaltige Gas und die glukosereiche ACSF verwendet. Dieses entspricht der Simulation des Zustandes bei uneingeschränkter Durchblutung des Nervengewebes. Zur Simulation einer Ischämie wird die Zufuhr zur Kammer entsprechend umgestellt, d.h. es wird das stickstoffhaltige Gas und die Lösung mit reduzierter Glukose-Konzentration zugeführt. Dadurch kommt es zu einem drastischen Absinken von Sauerstoffspannung und Glukosekonzentration, die dem Hirnschnitt zur Verfügung stehen. Somit ist es möglich innerhalb kürzester Zeit von außen die Bedingungen in der Interphase-Kammer so an zu passen, dass sie denen bei Ischämie entsprechen. Diese Versuche finden bei 34°C statt, weil das biologische

Verhalten des verwendeten Hirngewebes bei dieser Temperatur stabiler und besser reproduzierbar ist.

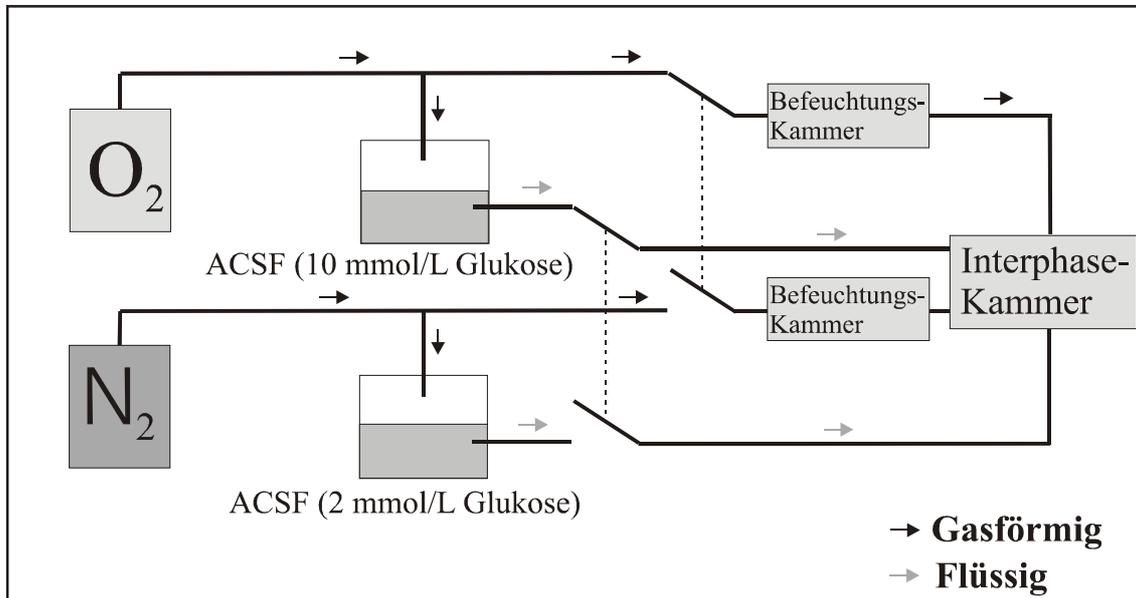


Abb.9: Schema der Anschlüsse an die Interphase-Kammer

Die dargestellte Stellung der Schalter entspricht der Simulation der Verhältnisse bei uneingeschränkter Durchblutung. Beide Schalter sind prinzipiell getrennt bedienbar, werden jedoch bei Ischämiesimulation gemeinsam umgeschaltet, so dass bei den Experimenten zwei Einstellungen für die Interphase-Kammer angewendet werden: zum einen Sauerstoff und hoher Glukosegehalt zur Simulation physiologischer Bedingungen und zum anderen Stickstoff und niedriger Glukosegehalt zur Simulation ischämischer Bedingungen. [eigene Grafik]

2.2.2. Elektrophysiologie

Die elektrophysiologische Messung erfasst die bioelektrischen Parameter des Hirngewebes. Zu diesen Parametern gehören die evozierten Potentiale und das DC-Potential¹⁶⁸. Deren Erfassung erfordert den Einsatz mehrerer Geräte und Materialien. Dabei ergibt sich die Notwendigkeit die Elektroden zur Ableitung dieser bioelektrischen Signale an die Größenverhältnisse in der Interphase-Kammer an zu passen.

2.2.2.1. Aufbau der elektrophysiologischen Messgeräte

Zur Messung der elektrophysiologischen Signale werden drei Elektroden benutzt. Zum einen die Referenzelektrode, für die eine Öffnung an der Seite der Interphase-Kammer vorhanden ist. In diese Öffnung kann die Referenzelektrode so positioniert werden, dass sie mit ihrer Spitze in Kontakt mit der Lösung in der Interphase-Kammer kommt. Zum anderen die Reizelektrode und die Messelektrode, die durch die bereits beschriebene Öffnung in der Abdeckung der Interphase-Kammer zum Hippocampus-Schnitt gelangen. Diese beiden Elektroden werden an entsprechenden Stellen in den Hirnschnitt vorgeschoben. Um die Positionierung der Elektroden im Hirnschnitt vornehmen zu können, sind zwei mechanische Manipulatoren vorhanden. Diese Haltearme sind durch Drehregler stufenlos in drei Ebenen verstellbar und erlauben dadurch ein exaktes Einführen der Elektroden. Zum Positionieren der Elektroden wird wegen der geringen Maße der Versuchsanordnung ein binokulares Mikroskop (Zeiss Stemi SV 6) eingesetzt. Die Geräte zur Reizerzeugung und Potentialmessung befinden sich aufgrund ihrer Maße und zur besseren Abschirmung des Versuchsplatzes außerhalb des Faradayschen Käfigs. Das Gerät zur Reizerzeugung ist mit der Reizelektrode verbunden und stimuliert über diese den Hirnschnitt. Bei diesem Gerät handelt es sich um eine aus vier Modulen bestehende Einheit, die es ermöglicht die Reizstärke und das Intervall zwischen den Reizen ein zu stellen. Bei den Modulen handelt es sich um ein Hi-Med HG 222 (Clock-Control Unit), ein Hi-Med HG 128 (Quad Pulse Unit), ein Hi-Med HG 107 (Relay Unit) und ein LSE NRI 97 (Bipolar Stimulus). Die mit der Messelektrode abgeleiteten Signale werden zur Aufzeichnung an verschiedene Geräte weiter geleitet. Zuvor wird das Signal noch über einen von der Elektrotechnik des Institutes für Physiologie konstruierten Verstärker um den Faktor 200 verstärkt. Das DC-Potential wird über einen Endlospapier-Schreiber der Firma Siemens in Echtzeit wieder gegeben. Die Geschwindigkeit des Papiervorschubs beträgt während des Versuches 1 cm/min, ist jedoch in mehreren Stufen variierbar. Die Position der Basislinie des DC-Potentials ist frei einstellbar und die Auflösung in Stufen veränderbar. Das Signal des DC-Potentials wird zur elektronischen Datenspeicherung auch an den PC geleitet. Als Signalwandler dient ebenfalls ein Eigenbau der Elektrotechnik des Institutes für Physiologie, der die Datenübermittlung über die serielle Schnittstelle an den PC ermöglicht. Zur

Registrierung des DC-Potentials wird ein Programm verwendet, welches im Institut für Physiologie entwickelt wurde. Dieses Programm erfasst das DC-Potential nicht in Echtzeit, weshalb beim Versuchsablauf der Papierschreiber zur Steuerung der Ischämiezeiten verwendet wird. Für die Darstellung der evozierten Potentiale wird ein Gould Digital Storage Oscilloscope OS 4040 benutzt, der den Reizimpuls als Trigger für die Aufzeichnung verwendet. Die Zeitachse und die Amplitudenauflösung sind in Stufen einstellbar. Die Position der Basislinie ist frei einstellbar. Gleichzeitig werden die evozierten Potentiale auf dem PC elektronisch gespeichert. Dazu wird das Signal über ein Digital-Oszilloskop SDS 200 von softDSP an die USB-Schnittstelle des PC übermittelt. Die Triggerung erfolgt wie beim Gould OS 4040 über den Reizimpuls. Die beim SDS 200 mitgelieferte Software ermöglicht die Speicherung und Wiedergabe des evozierten Potentials am PC.

2.2.2.2 Vorbereitung der Elektroden vor der Messung

Referenzelektrode und die Messelektrode müssen zunächst zusammengesetzt und mit entsprechenden Lösungen befüllt werden, bevor sie einsatzbereit sind. Bei der Referenzelektrode handelt es sich um eine Glaselektrode, die an ihrer Spitze eine semipermeable Membran besitzt. Die Glaselektrode wird vor Versuchsbeginn mit 2 molarer KCl-Lösung gefüllt. In diese mit KCl-Lösung gefüllte Glaselektrode wird dann eine Silberelektrode eingeführt. Diese Silberelektrode wird zuvor in einem 1 molaren Salzsäure-Bad elektrochemisch chloriert. Nach Zusammenbau der Referenzelektrode wird sie mit dem entsprechenden Kabel verbunden und in die seitliche Öffnung der Interphase-Kammer eingeführt, so dass ihre Spitze Kontakt mit der ASCF erhält. Für die Herstellung der Messelektrode werden Glaselektroden verwendet, die selbstständig produziert werden. Für die Herstellung steht eine Eigenentwicklung des Institutes für Physiologie zur Verfügung, mit dem Glaselektroden mit passenden Massen und Spitzendurchmessern erstellt werden. Die Glaselektroden werden mit NaCl (150 mmol/L) gefüllt und über eine Kopplung mit dem entsprechenden Kabel verbunden. Diese Kopplung besteht aus einem Kunststoffrohr, in dem sich eine semipermeable Membran befindet. Dadurch wird die Kopplung in zwei Abschnitte unterteilt. Der

Abschnitt, der in Kontakt mit der Glaselektrode steht, wird ebenfalls mit NaCl-Lösung (150 mmol/L) gefüllt, während der andere Abschnitt 2 molare KCl-Lösung enthält. Auf das Ende mit der KCl-Lösung wird eine chlorierte Silberelektrode gesteckt, über die das Signal an die Messgeräte geleitet wird. Die Chlorierung der Silberelektrode erfolgt wie bei der Referenzelektrode elektrochemisch im 1 molaren Salzsäurebad. Damit die Messelektrode einsatzfähig ist, muss die Spitze der Glaselektrode so abgebrochen werden, dass eine kleine Öffnung entsteht. Der Durchmesser der Öffnung entscheidet über den elektrischen Widerstand der Messelektrode. Die Spitze wird so entfernt, dass sich ein Widerstand von 0,5-1 M Ω ergibt. Die Höhe des elektrischen Widerstandes wird nach dem Anschließen der Messelektrode mit einem elektrischen Testimpuls überprüft. Liegt der Widerstand nicht im vorgegebenen Bereich, wird eine neue Messelektrode vorbereitet.

2.2.2.3 Positionieren der Elektroden im Hippocampus-Schnitt

Zur sinnvollen Ableitung von evozierten Potentialen und des DC-Potentials ist die richtige Platzierung der Elektroden wichtig. Dafür werden Kenntnisse über die Anatomie des Hippocampus mit dem Verlauf der wichtigsten Nervenbahnen benötigt^{58,135}. In vereinfachter Darstellung erfolgt die Informationsverarbeitung im Hippocampus in einem trisynaptischen System. Die Efferenz aus dem entorhinalen Cortex erreicht die Körnerzellen im Gyrus dentatus des Hippocampus. Hier befindet sich die erste Synapse. Die Körnerzellen wiederum bilden mit ihren Axonen die Mossy-Fasern (Moosfasern). Die Mossy-Fasern bilden dann Synapsen mit den Pyramidenzellen in der CA3-Region. Diese Pyramidenzellen senden ihre Axone als Schaffer-Kollaterale in die CA1-Region. In der CA1-Region bilden die Schaffer-Kollaterale mit den Dendriten der dortigen Pyramidenzellen die dritte Synapse in diesem System. Bei allen drei synaptischen Verschaltungen des trisynaptischen Systems handelt es sich um exzitatorische Synapsen. Diese Beschreibung dient jedoch nur der prinzipiellen Veranschaulichung der neuronalen Vorgänge im Hippocampus und kann nicht als vollständige Beschreibung des neuronalen Netzwerks verstanden werden. Im Hippocampus befinden sich zahlreiche Interneurone und weitere Faserverbindungen,

die zu einem weitaus komplexeren System führen. Die Besonderheit der Anatomie des Hippocampus ist der transversale Aufbau der Nervenfaserbahnen, insbesondere des trisynaptischen Systems. Diese Struktur ermöglicht die Verwendung von transversalen Hirnschnitten des Hippocampus für elektrophysiologische Untersuchungen, weil in den transversalen Schnitten die wesentlichen Nervenbahnen erhalten sind. Jedoch enthält der Hippocampus auch longitudinal verlaufende Bahnen, die durch diese Schnitttechnik durchtrennt werden. Ihre Funktion ist bei weitem nicht so detailliert erforscht wie die der transversalen Bahnen. Neben diesem funktionellen Aufbau des Hippocampus lässt sich auch eine histologische Unterteilung vornehmen. Die Einteilung des Hippocampus in vier Schichten ist in Abbildung 10 dargestellt. Es werden Stratum oriens, Stratum pyramidale, Stratum radiatum und Stratum lacunosum-moleculare unterschieden.

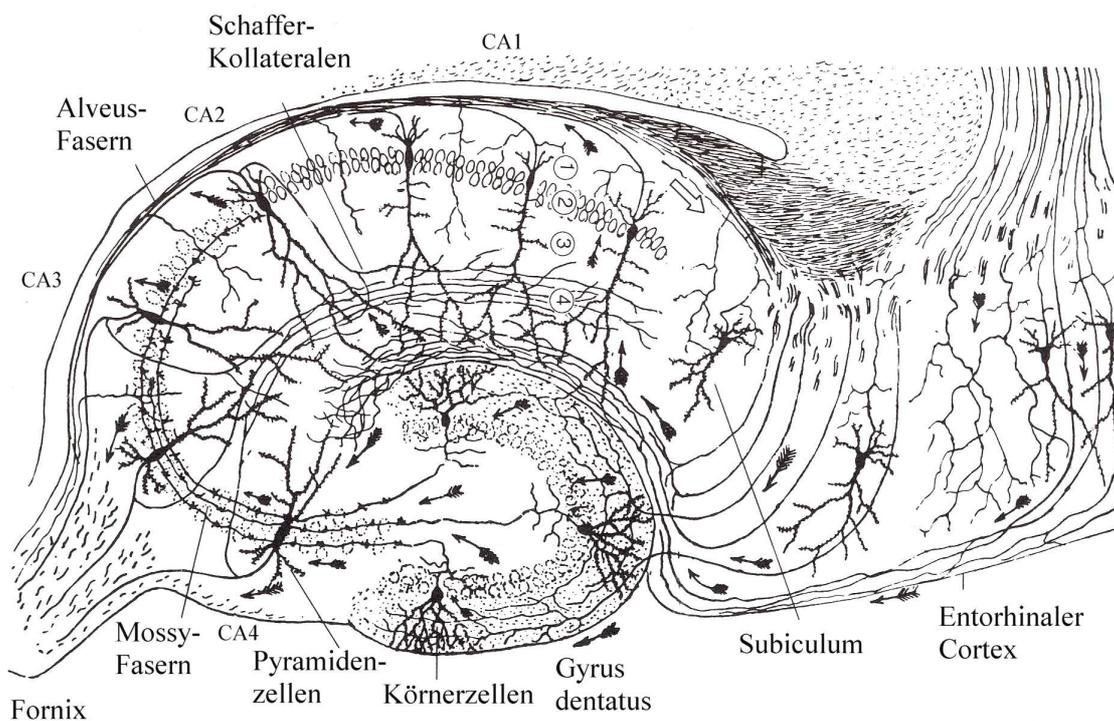


Abb.10: Die Abbildung zeigt den anatomischen Aufbau anhand eines transversalen Schnitts durch den Hippocampus. Der Hippocampus setzt sich aus vier Schichten zusammen: (1) Stratum oriens, (2) Stratum pyramidale, (3) Stratum radiatum, (4) Stratum lacunosum-moleculare. Weiterhin sind die wesentlichen Bestandteile des neuronalen

Netzwerks wiedergegeben [aus Shepherd GM, The synaptic organization of the brain, 1990].

Bei der Positionierung der Elektroden wird die bipolare Reizelektrode in das Stratum radiale im Bereich der CA3-Region platziert. Dadurch werden die Schaffer-Kollateralen stimuliert. Die synaptische Signalübertragung erfolgt auf die Pyramidenzellen in der CA1-Region über die dritte Synapse des trisynaptischen Systems. Die Messelektrode wird folglich in das Stratum pyramidale des CA1-Areals eingeführt, um die synaptischen Prozesse mit Erzeugung von evozierten Potentialen als Reaktion auf die Stimulation aufzeichnen zu können. Somit wird ein evoziertes Potential, das durch einen monosynaptischen Verarbeitungsprozess entsteht, zur Beurteilung der Funktionalität des neuronalen Systems herangezogen.

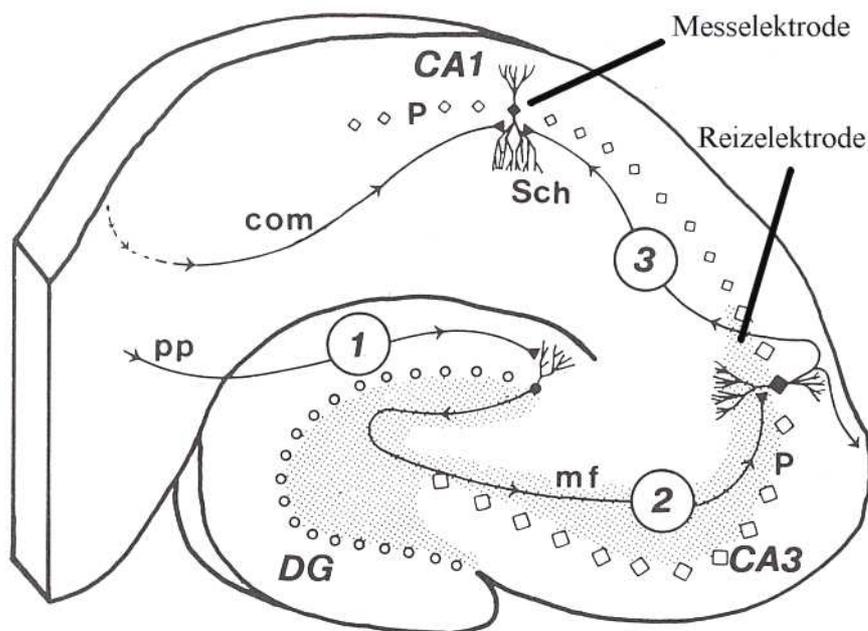


Abb.11: Die Abbildung zeigt schematisch vereinfacht den funktionellen Aufbau des Hippocampus und die Positionierung der Elektroden während des Versuchs. Legende: (pp) efferente Fasern, (DG) Gyrus dentatus, (mf) Mossy-Fasern, (P) Stratum pyramidale, (Sch) Schaffer-Kollateralen, (com) Kommissuren-Fasern. [aus Shepherd GM, The synaptic organization of the brain, 1990]

2.2.2.4. Messung der evozierten Potentiale

Die Größe der Amplitude der evozierten Potentiale wird bestimmt, indem die Differenz zwischen dem interpolierten Verlauf der Basislinie des Feldpotentials und dem maximalen Ausschlag des Summenaktionspotentials berechnet wird. Als Einschlusskriterium wird bei den evozierten Potentialen eine Amplitude des Summenaktionspotentials von mindestens 4mV vorausgesetzt. Dabei gilt als Maßstab das evozierte Potential, das vor Beginn der Ischämie aufgezeichnet wurde. Zur Beurteilung des ischämischen Schadens wird die Erholung der evozierten Potentiale nach Ischämie bestimmt. Im folgenden Text wird die Erholung des Summenaktionspotentials auch als Recovery bezeichnet. Es wird der Quotient der Amplitude des evozierten Potentials am Ende des Versuchs und der Amplitude des evozierten Potentials vor Ischämie in Prozenten berechnet. Dieser Wert gibt einen Anhalt über die Schwere des ischämischen Schadens, den der Hippocampus-Schnitt erlitten hat.

2.2.2.5. Messung des DC-Potentials

Das DC-Potential wird während der Versuche kontinuierlich aufgezeichnet. Dadurch lassen sich Veränderungen des Membranpotentials aufzeichnen, die während der Ischämie auftreten. Die Auswirkung auf das Membranpotential lassen sich mit zwei Messgrößen erfassen. Zum einen wird die Latenzzeit vom Anfang der Ischämie bis zum Eintreten der anoxischen Terminalnegativierung erfasst und zum anderen die Amplitude der Membrandepolarisation gemessen. Zur Bestimmung der Latenzzeit wird als Beginn der anoxischen Terminalnegativierung das Erreichen von 10% der Amplitude der anoxischen Terminalnegativierung definiert. Die Amplitude wird als Differenz zwischen der Basislinie vor Ischämie und dem maximalen negativem Ausschlag des DC-Potentials bestimmt.

2.2.3. Mikrodialyse

Die Mikrodialyse dient der Erfassung der Aminosäuren im extrazellulären Raum des Hippocampusgewebes der Ratte. Durch die Mikrodialysesonde wird ein Dialysat gewonnen, welches diejenigen Bestandteile des extrazellulären Raumes enthält, die einem Konzentrationsgefälle folgend durch eine Dialysemembran in eine Dialyseflüssigkeit diffundieren. Dadurch lassen sich Veränderungen in der Zusammensetzung des extrazellulären Kompartiments erfassen.

2.2.3.1. Vorbereitung der Mikrodialyse

Vor dem Einsatz der Mikrodialyse müssen zunächst die Lösungen vorbereitet werden, die zur Gewinnung des Dialysats benötigt werden. Als Dialyseflüssigkeit wird artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (ACSF) mit 2 mmol/L Glukose eingesetzt. Es wird auf die ACSF mit reduzierter Glukosekonzentration zurückgegriffen, weil die Glukose sonst aus der Sonde ins umliegende Gewebe diffundieren und somit der Glukosereduktion während der Ischämiesimulation entgegen wirken würde. Weiterhin wird destilliertes ultrafiltriertes Wasser zur Spülung und Reinigung der Mikrodialysematerialien verwendet. Diese Lösungen werden entgast, um die Bildung kleiner Gasblasen im Mikrodialysesystem zu verhindern. Die entgasten Lösungen werden jeweils in eine Glasspritze der Firma CMA Microdialysis aufgezogen. Diese Glasspritzen sind in ihren Ausmaßen an die Mikrodialysepumpe (CMA/102 Microdialysis Pump) angepasst, so dass eine Durchflussrate zwischen 0,1 $\mu\text{L}/\text{min}$ und 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ einstellbar ist. Als weiteres werden die Behälter zum Sammeln des Dialysats vorbereitet. Diese Probenbehälter werden beschriftet und jeweils mit 5 μL einer 500 nmol/L Homocystein enthaltenden Lösung gefüllt. Die Homocystein-Lösung wird als interner Standard vorgelegt, um Veränderungen der Dialysatproben zu erkennen, die nach dem Sammeln des Dialysats und vor der weiteren Analyse durch die HPLC durch Verdunstung oder Kondensation entstehen könnten.

2.2.3.2. Aufbau der Mikro dialyse

Ein wesentlicher Bestandteil des Mikro dialysesystems ist die Mikro dialy sesonde. Hierbei handelt es sich um das Modell CMA/11 von CMA Micro dialysis, welches aufgrund der geringen Ausma ße einen geringen Gewebeschaden verursacht. Diese Sonde hat einen Stahlschaft, an dessen Ende sich die Dialyse membran befindet. Die Sonden membran erreicht laut Herstellerspezifikation über Ladungszustand und Porengröße einen Ausschluss von Molekülen mit einem Gewicht von mehr als 6 kD (sog. Cut-off). Die Membran der Sonde wird vollständig in den Schnitt eingebracht. Weiterhin verfügt die Sonde über je einen Abfluss- und Einlasskanal. Über den Einlasskanal wird die Dialyseflüssigkeit aus der Mikro dialysepumpe eingeleitet. Zwischen Mikro dialysepumpe und Mikro dialy sesonde ist noch ein manueller Umschalter (CMA/110 Liquid Switch) geschaltet, welcher es ermöglicht zwischen den beiden Lösungen der Mikro dialysepumpe zu wechseln. Über den Abflusskanal erreicht das Dialysat den Probensammler (CMA/170 Refrigerated Fraction Collector). Dabei ist die Verbindung zwischen Sonde und Sammler so konstruiert, dass bei einer Flussrate von 1 µl/min das Dialysat exakt 14 Minuten braucht um von der Sonde in den Probenbehälter im Probensammler zu gelangen. Die automatische Steuerung des Probensammlers erfolgt über den PC. Zusätzlich kann der Probensammler auf 4°C gekühlt werden und so die Kühlung des Dialysats sicherstellen. Die Verbindung zwischen den einzelnen Komponenten des Mikro dialysesystems wird über Kunststoffschläuche (FEP Tubing vom CMA Micro dialysis) und passende Adapter (Tubing Adaptors von CMA Micro dialysis) gewährleistet. Die Adapter schwellen in 70% Alkohol und ermöglichen so eine Verbindung der Kunststoffschläuche untereinander und mit den Bestandteilen des Mikro dialysesystems. Nachdem der Alkohol verdunstet ist, schrumpfen die Adapter wieder und sorgen so für eine feste Verbindung zwischen den einzelnen Komponenten ohne selbst ein Totvolumen zum Leitungsverlauf hinzu zu fügen.

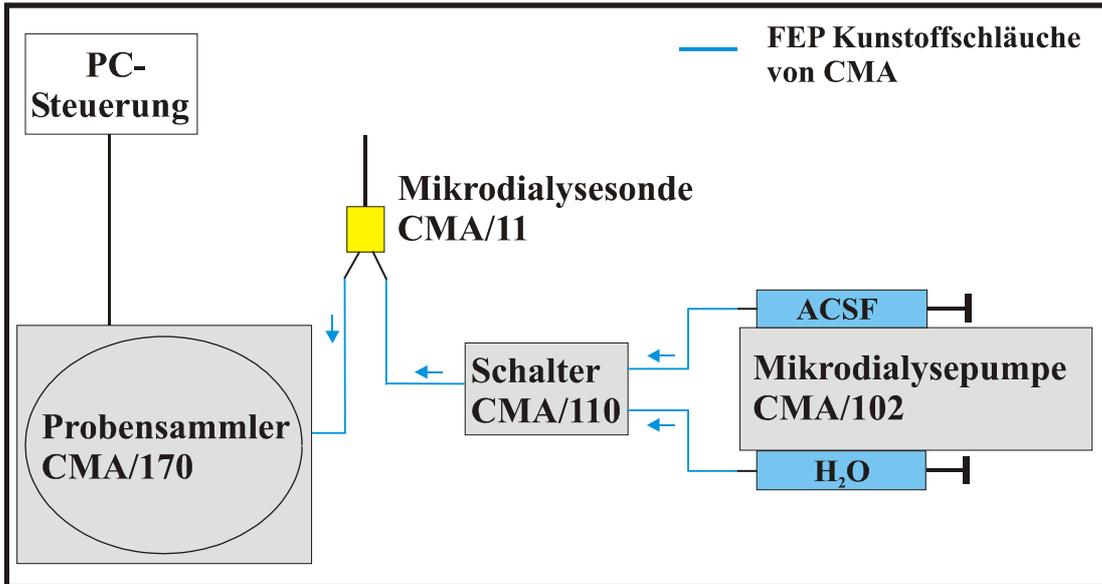


Abb.12: Die Abbildung zeigt die Anordnung der Komponenten für die Mikro dialyse. Als Dialyseflüssigkeit wird artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (ACSF) mit 2 mmol/L Glukose verwendet. [eigene Grafik]

2.2.3.3. Durchführung der Mikro dialyse

Vor dem Einführen der Mikro dialysetsonde in den Hippocampus-Schnitt wird diese vorher nach einem festgelegten Protokoll mit destilliertem Wasser und dann mit der Dialyseflüssigkeit gespült. Dadurch werden die Verbindungsschläuche und die Komponenten der Mikro dialyse gesäubert und die Durchgängigkeit der Sonde geprüft. Nach dieser Vorbereitung wird die Sonde in einen Mikro manipulator eingespannt, der stufenlos über Drehregler in drei Ebenen verstellbar ist. Die Sonde kann dann über die 500µm dicke seitliche Schnittkante in den Hirnschnitt eingeführt werden. Sie wird vor dem Einführen der Elektroden positioniert, weil die Lage des Hirnschnitts dabei verändert werden kann und bereits gesetzte Elektroden das Gewebe verletzen würden. Das Vorschieben der Sonde ins Nervengewebe erfolgt langsam, um die Traumatisierung des Gewebes zu minimieren. Nachdem die Sonde sich im Versuchspräparat befindet, wird die Flussrate an der Mikro dialysepumpe auf 1 µl/min eingestellt. Bereits vor Durchführung der Experimente wird der Probensammler über die mitgelieferte Software programmiert. Bei der Programmierung wird die zur

Überwindung des Tonraums erforderliche Zeit (hier 14 Minuten) kompensiert. Als Sammelzeit für eine einzelne Probe werden 5 Minuten programmiert, wobei sich die gesamte Sammelperiode über 60 Minuten erstreckt. Folglich werden 12 Proben während eines Versuchs gewonnen, die mit jeweils 5 µl des Dialysats gefüllt werden. Erfasst werden sollen Veränderungen im Hirnschnitt ab 10 Minuten vor Beginn der Ischämie bis zu Ende der Sammelperiode 50 Minuten nach Ischämiebeginn. Nach dem Versuch werden die Probenbehälter mit Kunststoffkappen verschlossen. Zusätzlich wird ein weiterer Probenbehälter, der sich während des Versuchs auch im Probensammler befand, mit 5 µl der Dialyseflüssigkeit aus der Mikrodialysepumpe befüllt. Diese Kontrollprobe wurde ebenfalls wie die anderen Proben vorher mit 5 µl der 500 nmolaren Homocystein-Lösung beschickt. Dadurch lassen sich Verunreinigungen der Dialyseflüssigkeit erfassen und so aus den Ergebnissen der Proben herausrechnen. Die Proben werden bis zur Messung in der HPLC bei -80°C aufbewahrt.

2.2.3.4. Auswertung der Mikrodialyse-Ergebnisse

Die zwei Proben, die in den 10 Minuten vor Ischämiebeginn gewonnen werden, dienen als Ausgangswert für die Auswertung der relativen Veränderungen der Aminosäurekonzentrationen. Die absoluten Werte der Aminosäurekonzentrationen unterliegen sehr großen Schwankungen, so dass die statistische Analyse mit relativen Werten durchgeführt wird. Zu diesem Zweck wird für jede analysierte Aminosäure der Mittelwert aus den beiden präischämisch bestimmten Konzentrationen errechnet. Diese mittlere präischämische Konzentration wird als Referenzwert genutzt, zu dem die nachfolgenden, nach Beginn der Ischämie, bestimmten Konzentrationen in Relation gesetzt werden. Die Angabe der Aminosäurekonzentrationen erfolgt somit als relativer prozentualer Wert und bezieht sich auf die Konzentrationen die vor Start der Ischämie-Simulation vorlagen. Die Aminosäuren die durch die HPLC erfasst werden sind zum einen Glutamat, Glutamin, GABA, Aspartat und Taurin. Darüber hinaus werden auch die Konzentrationen von Serin, Arginin und Alanin erfasst.

2.3. Versuchsablauf

Mit den Hirnschnitten einer Ratte werden an einem Versuchstag zwei Experimente durchgeführt. Je ein Versuch findet mit Methohexital-Gabe und der andere ohne Methohexital-Gabe als Kontrolle statt. Beim Methohexital handelt es sich um das Präparat Brevimytal-Natrium der Firma Lilly. Die Dosierung des Methohexital richtet sich nach den Konzentrationen, die nötig sind um eine „burst-suppression“ im EEG zu erreichen. Daraus ergibt sich ein Bereich von etwa 40 $\mu\text{mol/L}$ bis 140 $\mu\text{mol/L}$ Methohexital ^{48,128,170}. Somit wird bei den Experimenten mit den Methohexital-Konzentrationen von 40 $\mu\text{mol/L}$, 90 $\mu\text{mol/L}$ und 140 $\mu\text{mol/L}$ in der ACSF gearbeitet. Der mittlere Wert dient zur Abklärung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung im Falle des Nachweises der Wirksamkeit des Barbiturates. Damit äußere Einflüsse auf das Ergebnis, wie klimatische Verhältnisse oder ein Übungseffekt bei der Durchführung der Versuche, minimiert werden, wird die Barbituratkonzentration für den jeweiligen Versuchstag zufällig festgelegt. Weil die Hirnschnitte beim zweiten Experiment des Tages, bedingt durch die längere Inkubationszeit, möglicherweise bereits einer vermehrten Belastung ausgesetzt waren, werden Kontroll- und Verumversuche in ihrer Reihenfolge ebenfalls abgewechselt.

2.3.1. Versuchsschema

Bei allen Experimenten wird nach Positionierung der Elektroden und der Mikrodialysesonde zunächst eine Erholungsphase von 30 Minuten eingehalten. Hierbei wird der Hippocampus-Schnitt mit sauerstoffhaltigem Gas und glukosereicher ACSF ohne Methohexital versorgt. Das Intervall zwischen den elektrischen Reizen des Hirnschnittes wird auf 10 Sekunden gestellt. Durch die Ruhephase kann der Hirnschnitt sich vom Stress erholen, der durch den Transport in die Interphase-Kammer und das Einbringen der Elektroden und der Mikrodialysesonde entsteht. Kurz vor Ende der 30 Minuten wird ein evoziertes Potential als Ausgangspotential elektronisch gespeichert. Während beim Kontrollexperiment nach dieser Ruhephase mit der Ischämiesimulation begonnen wird, wird beim Methohexital-Versuch der Schnitt weitere 30 Minuten mit

einer glukosereichen ACSF versorgt, der Methohexital in einer der drei vorgesehenen Konzentration zugesetzt wird. Dadurch wird das Barbiturat ins Hirngewebe aufgenommen und muss nicht erst bei Beginn der Ischämiesimulation anfluten. Nach diesen 30 Minuten kann beim Barbituratexperiment ebenfalls mit der Ischämiesimulation gestartet werden. Davor wird aber noch ein evoziertes Potential elektronisch gespeichert, so dass die Einflüsse des Methohexital auf die bioelektrische Aktivität dokumentiert werden. Die Ischämie wird durch Umschalten der Gas- und Flüssigkeitszufuhr eingeleitet. Für die Dauer der Ischämiesimulation orientiert man sich an der Anoxischen Terminalnegativierung (ATN), die sich im DC-Potential zeigt und nach einer variablen Zeit nach Ischämieeinleitung auftritt. Die Dauer der Ischämie erstreckt sich nach Einsetzen der ATN über weitere 3 Minuten, bis durch Umschalten der Gas- und Flüssigkeitszufuhr die Ischämiesimulation beendet wird. Der Dauer der Ischämie von 3 Minuten nach ATN wurde in Vorversuchen bestimmt. Bei geringeren Ischämiezeiten kam es zu keiner signifikanten Minderung der Evozierten Potentiale nach der Ischämie.

Danach folgt bei allen Versuchen eine Erholungsphase von etwa 45 Minuten Dauer, in der sich das Hirngewebe von der Ischämie erholen kann. Nach diesen 45 Minuten wird ein letztes evoziertes Potential aufgezeichnet und elektronisch gespeichert.

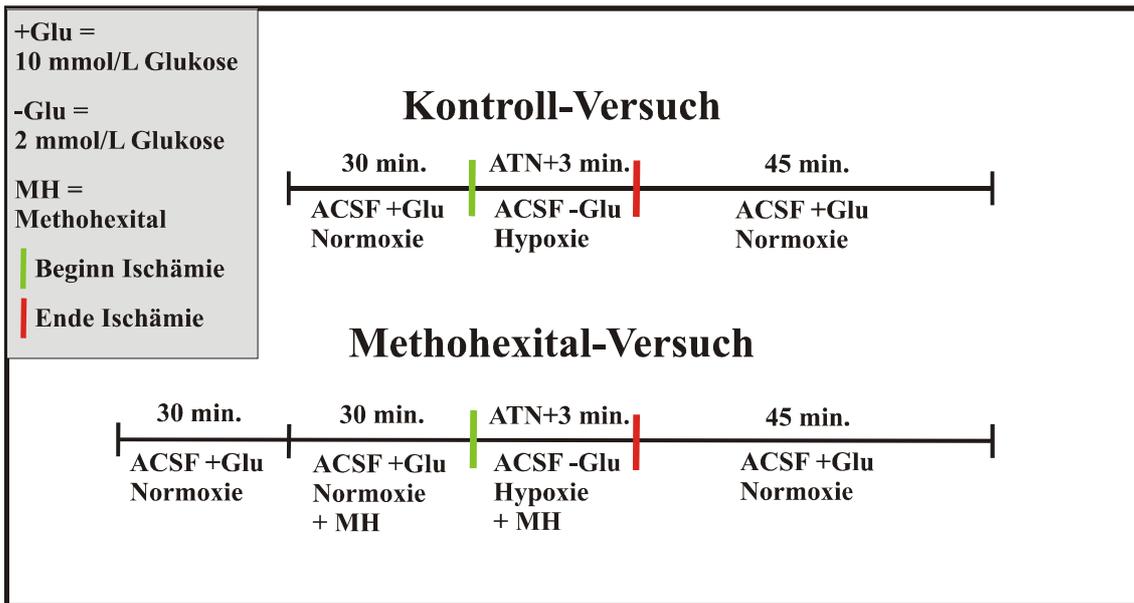


Abb.13: Schema des Versuchsablauf beim Kontroll-Versuch und beim Methohexital-Versuch. Die Dauer der Ischämie ist variabel und richtet sich nach dem Auftreten der Anoxischen Terminalnegativierung (ATN) [eigene Grafik]

2.4. Bestimmung der Aminosäure-Konzentrationen mittels HPLC

Die Bestimmung der Aminosäuren-Konzentration mit der HPLC wird durch medizinisch-technisches Personal der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie durchgeführt. Zur Analyse wird eine Umkehr-Phasen-HPLC verwendet, bei der eine Vorsäulenderivatisierung der Proben mit o-Phthalaldehyd vorgenommen wird. Als Eluenten für die mobile Phase werden zwei Lösungen verwendet. Eluent A besteht aus 150ml Di-Natriumhydrogenphosphat (250 mmolar), 150 ml Propionsäure (250 mmolar), 48ml Acetonitril und 1,5ml Octylsulfat (100 mmolar) in 383ml destilliertem Wasser. Eluent B setzt sich zusammen aus 150ml Acetonitril, 200ml Methanol und 150ml destilliertem Wasser. Es handelt sich um eine Gradienten-HPLC, bei der sich die Zusammensetzung der Eluenten im Verlauf der Analyse ändert. Der stärker polare Eluent A überwiegt zu Beginn des Durchlaufs der HPLC, während der Anteil des weniger polaren Eluenten B an der mobilen Phase im weiteren Verlauf steigt. Die stationäre Phase befindet sich in einer Hypersil ODS-Säule mit 5 µm Partikelgröße. Mit einer Shimadzu CTO-10Avp Säulenheizung wird die Säule während der Durchführung

der HPLC-Analytik auf konstant 34°C erwärmt. Die Vorsäulenderivatisierung der Dialysatproben geschieht in einem auf 4°C gekühlten Autosampler CMA 200 durch Hinzugabe von jeweils 10 µl Derivatisierungsreagenz. Dieses Reagenz besteht aus 0,0108g o-Phthaldialdehyd, 200µl Methanol und 8µl Mercaptoethanol in 1792µl Boratpuffer (0,1 molar). Als Pumpen werden die LC-10AS der Firma Shimadzu benutzt. Die Durchlaufzeit für eine Probe beträgt bei der eingesetzten HPLC-Anordnung 23 min. Der Probennachweis geschieht über die 440nm-Fluoreszenz des Aminosäurederivates bei Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 340nm. Zur Fluoreszenzanalyse wird ein Shimadzu RF-10AXL Detektor verwendet. Die aufgezeichneten Emissionen werden mit einem Shimadzu Chromatopac CR-8 Integrator analysiert und aus diesen Ergebnissen die Konzentrationen der Aminosäuren berechnet. In der vorliegenden Programmierung werden folgende Aminosäuren mit ihren Konzentrationen erfasst: Aspartat, Glutamat, Glutamin, Arginin, Alanin, Taurin, GABA, Serin und Homocystein. Zur Kalibrierung und Kontrolle der Genauigkeit der HPLC-Anordnung wird beim Durchlauf der Proben in regelmäßigen Abständen eine Standardlösung der analysierten Aminosäuren mit vorgegebenen Konzentrationen eingefügt. Ebenfalls werden regelmäßig Proben mit Wasser durch die HPLC-Anlage geschleust, um Verunreinigungen fest zu stellen.

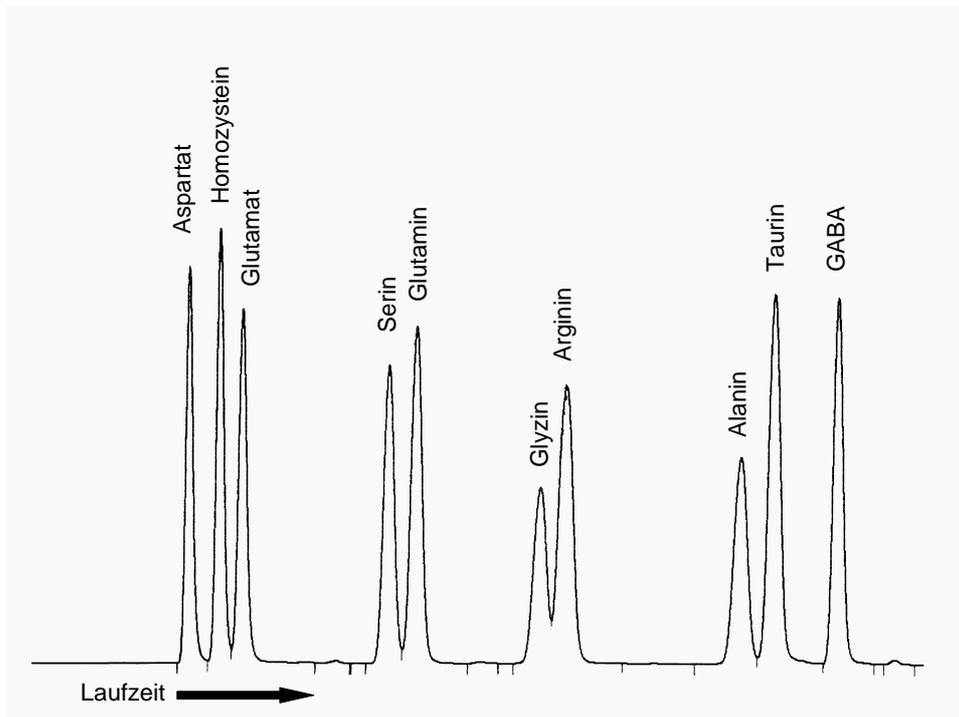


Abb.14: Die Abbildung zeigt das graphisch dargestellte Ergebnis der HPLC bei Analyse einer Standard-Probe zur Kalibrierung der Analyseanordnung. Die Aminosäuren werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Laufzeiten durch die HPLC-Säule getrennt. Dadurch werden sie getrennt vom Detektor erfasst und durch die gemessene Amplitude ihre jeweilige Konzentration in der Probe bestimmt.

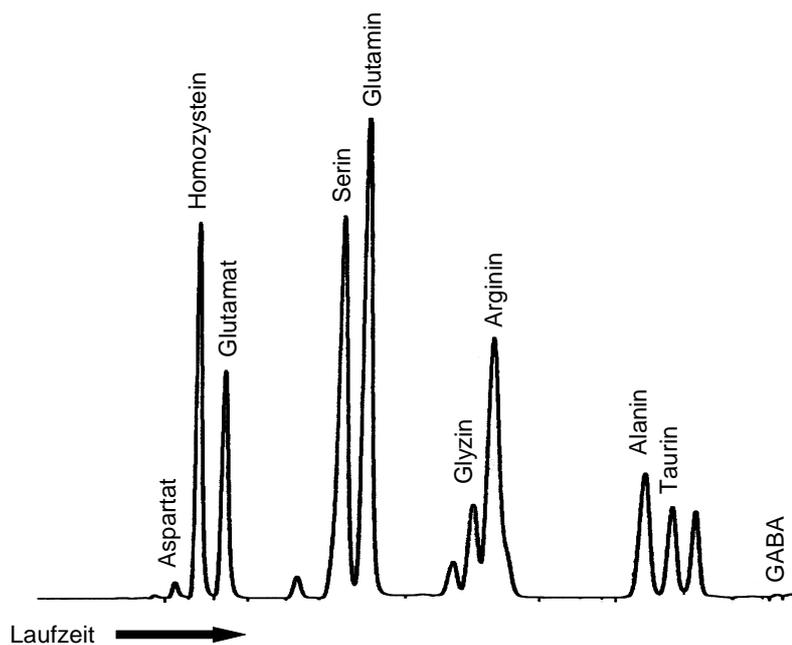


Abb.15: Die Abbildung zeigt das graphische Ergebnis der HPLC bei Analyse einer Versuchs-Probe.

2.5. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Bei der statistischen Auswertung werden zunächst die elektrophysiologischen Versuchsergebnisse vor Ischämie mit denen nach Ischämie verglichen. Ebenso werden die Aminosäuren-Konzentrationen auf signifikante Veränderungen während Ischämie getestet und die evozierten Potentiale auf eine signifikante Beeinflussung durch die Methohexital-Gabe noch vor Ischämie überprüft. In allen diesen Fällen wird folglich die Situation vor mit der nach einem definierten Ereignis verglichen. Es handelt sich also um zwei verbundene Stichproben, die mit dem gepaarten t-Test auf einen signifikanten Unterschied getestet werden. Als Entscheidungskriterium für einen statistisch signifikanten Unterschied wird ein $p < 0,05$ beim gepaarten t-Test definiert. Der gepaarte t-Test wird als zweiseitiger Test angewendet, weil offen ist in welche Richtung die Versuchsergebnisse durch das definierte Ereignis verändert werden. Somit lässt sich eine Aussage hinsichtlich einer signifikanten Auswirkung des definierten Ereignisses auf die erfassten Parameter treffen. Die Durchführung der statistischen Tests erfolgt mit

dem Programm SigmaStat 3.0, das auch eine deskriptive Statistik über die Verteilung der Messwerte liefert. Als nächstes wird der Einfluss von Methohexital auf die Versuchsergebnisse während und nach Ischämie im Vergleich zu den Kontrollversuchen ohne Methohexital-Gabe überprüft. Dafür wird eine Gegenüberstellung der Kontrollversuche mit den Methohexital-Versuchen vorgenommen. Die drei verwendeten Methohexital-Konzentrationen werden getrennt voneinander betrachtet. Die Grundlage der statistischen Auswertung ist in diesem Fall die Paarung von Kontrollversuch und Medikamentenversuch bei Hirnschnitten des gleichen Versuchstieres. Dabei wird wie bereits oben beschrieben mit den Hippocampus-Schnitten einer Versuchsratte jeweils ein Versuch mit Methohexital und einer ohne Methohexital durchgeführt. Also handelt es hierbei ebenfalls um zwei verbundene Stichproben, die mit dem zweiseitigen gepaarten t-Test auf signifikante Unterschiede untersucht werden. Ein signifikanter Unterschied wird bei einem $p < 0,05$ angenommen. Die statistische Auswertung erfolgt auch hier mit der Software SigmaStat 3.0. Die statistischen Ergebnisse ermöglichen eine Aussage über eine signifikante Wirkung von Methohexital auf die Hippocampus-Schnitte bei Ischämie.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der elektrophysiologischen Messung

Bei der elektrophysiologischen Messung werden wie im Abschnitt 2 „Material und Methoden“ bereits angeführt die evozierten Potentiale und das DC-Potential abgeleitet. In den folgenden Abschnitten erfolgt eine Zusammenstellung der Ergebnisse der elektrophysiologischen Messung während der Versuche.

3.1.1. Evozierte Potentiale

3.1.1.1. Evozierte Potentiale vor und nach Ischämie

Zur Auswertung der Auswirkungen der Ischämiesimulation auf die evozierten Potentiale im Hippocampus-Schnitt werden die Ergebnisse der Kontrollversuche herangezogen, in denen kein Methohexital appliziert wurde. Es sind Daten aus 35 Kontrollversuchen verwertbar, um die Veränderungen der evozierten Potentiale durch die Ischämie zu erfassen. Die Amplituden der evozierten Potentiale liegen vor Beginn der Ischämie im Bereich zwischen 4mV und 15,9mV mit einem Mittelwert von 7,7mV. Die Daten weisen eine Normalverteilung auf und haben eine Standardabweichung von 3,085mV. Nach Beendigung der Ischämie und Erholung der Schnittpräparate liegt die Amplitude der evozierten Potentiale zwischen 0mV und 12,65mV mit einem Mittelwert von 2,704mV und einer Standardabweichung von 3,36mV. Zum statistischen Vergleich der Daten vor Ischämie mit denen nach Ischämie wird der gepaarte t-Test angewendet. Bei $p < 0,05$ wird ein signifikanter Unterschied angenommen. Der gepaarte t-Test ergibt einen Wert von $p < 0,001$ beim Vergleich der Datenreihen. Somit ist ein signifikanter Unterschied der Amplitudengrößen der evozierten Potentiale vor und nach Ischämie vorhanden. Die Amplitude der evozierten Potentiale wird folglich durch die Ischämie statistisch signifikant reduziert und deutet auf eine messbare Schädigung des Nervengewebes der Schnittpräparate hin.

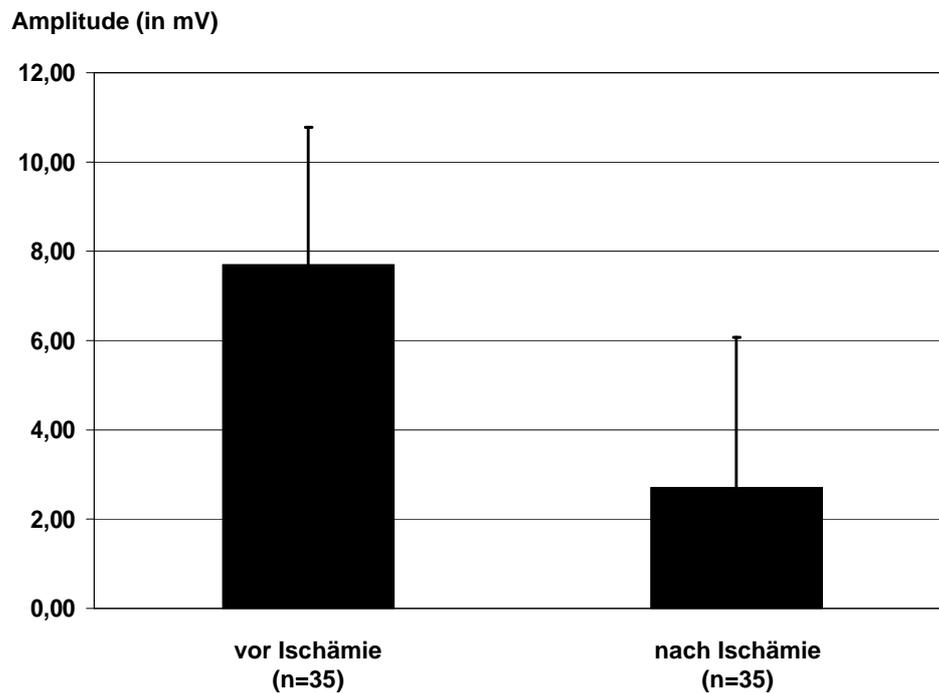


Abb.16: Die Abbildung zeigt den Mittelwert der Amplitudengröße der evozierten Potentiale in den Kontrollversuchen mit den entsprechenden Standardabweichungen

Während der Ischämie lassen sich durch Reizung keine evozierten Potentiale im Hippocampus-Schnitt erzeugen. Dieser Verlust der evozierten Potentiale in der Phase während der Simulation der Ischämie tritt in allen Versuchen auf. Die Recovery als prozentuale Größe der Amplituden nach Ischämie im Verhältnis zu denen vor Ischämie liegt im Bereich zwischen 0% und 123,1% mit einem Mittelwert von 32,3%. Die Standardabweichung beträgt 36,7%.

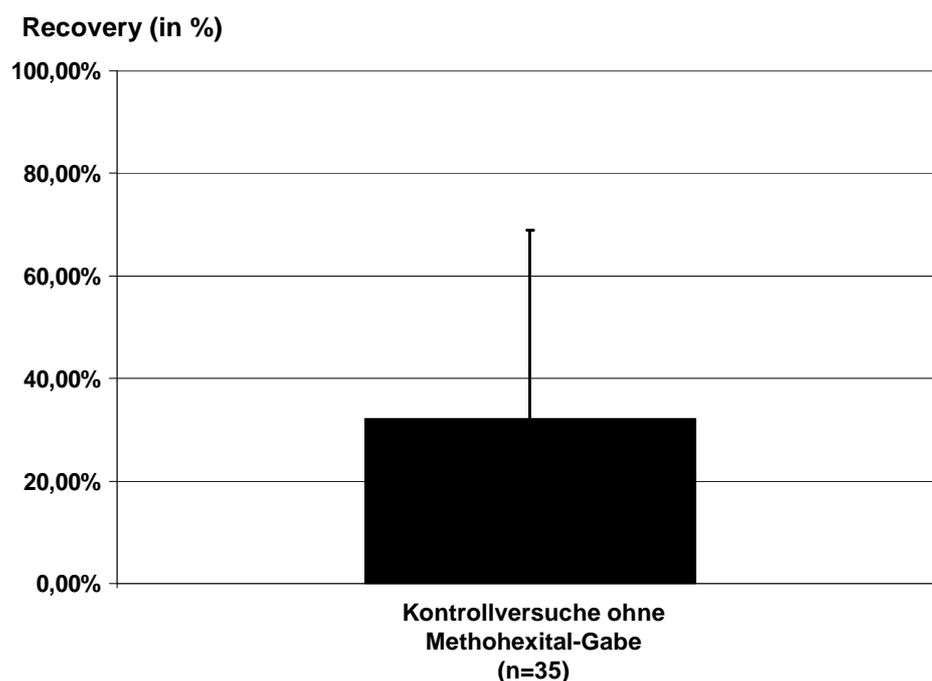


Abb.17: Die Abbildung zeigt den Mittelwert der Quotienten aus der Amplitude nach Ischämie und der Amplitude vor Ischämie in Prozent an. Dieser Quotient wird auch als Recovery bezeichnet.

3.1.1.2. Wirkung von Methohexital auf evozierte Potentiale vor Ischämie

Methohexital hat eine inhibitorische Wirkung auf die synaptische Übertragung im Nervensystem. Die Auswirkung von Methohexital auf das evozierte Potential wird für die einzelnen Methohexital-Konzentrationen getrennt angegeben. Zur Beurteilung der Wirkung von Methohexital wird der Quotient aus der Amplitude der evozierten Potentiale nach Einwirkung von Methohexital und aus der Amplitude der evozierten Potentiale vor Gabe von Methohexital in Prozent gebildet.

Bei 40µmol/L liegen die relativen Werte zwischen 115,3% und 188,4% im Vergleich zu den Ausgangswerten der Amplituden vor Methohexital-Gabe; der Mittelwert beträgt 141,2% mit einer Standardabweichung von 23,8%. Der gepaarte t-Test ergibt ein $p < 0,001$ und weist einen signifikanten Unterschied auf.

Bei 90 μ mol/L beträgt der Mittelwert 124,2% mit einem Bereich zwischen 89,1% und 154,2% und einer Standardabweichung von 21,8%. Der gepaarte t-Test zeigt einen signifikanten Unterschied mit einem $p=0,006$.

Bei 140 μ mol/L Methohexital errechnet sich ein Mittelwert von 117,4% mit einem Bereich von 89,2% bis 146,6% und einer Standardabweichung von 15,6%. Der gepaarte t-Test ergibt ebenfalls einen signifikanten Unterschied mit einem $p=0,002$.

Zur richtigen Beurteilung dieser Ergebnisse ist es noch notwendig, die Veränderungen der evozierten Potentiale in der Ruhephase vor der Ischämie ohne Einwirkung von Methohexital anzugeben. Ohne die Gabe von Methohexital kommt es zu einem Anstieg der evozierten Potentiale auf einen Mittelwert von 145,84% mit einer Standardabweichung von 37,96%. Der gepaarte t-Test zeigt einen signifikanten Unterschied mit einem $p<0,001$.

Zusammenfassend fällt der unter Kontrollbedingungen über die Zeit zu beobachtende Anstieg der Amplitude der evozierten Potentiale mit zunehmender Methohexital-Konzentration also immer geringer aus (siehe Abb.18).

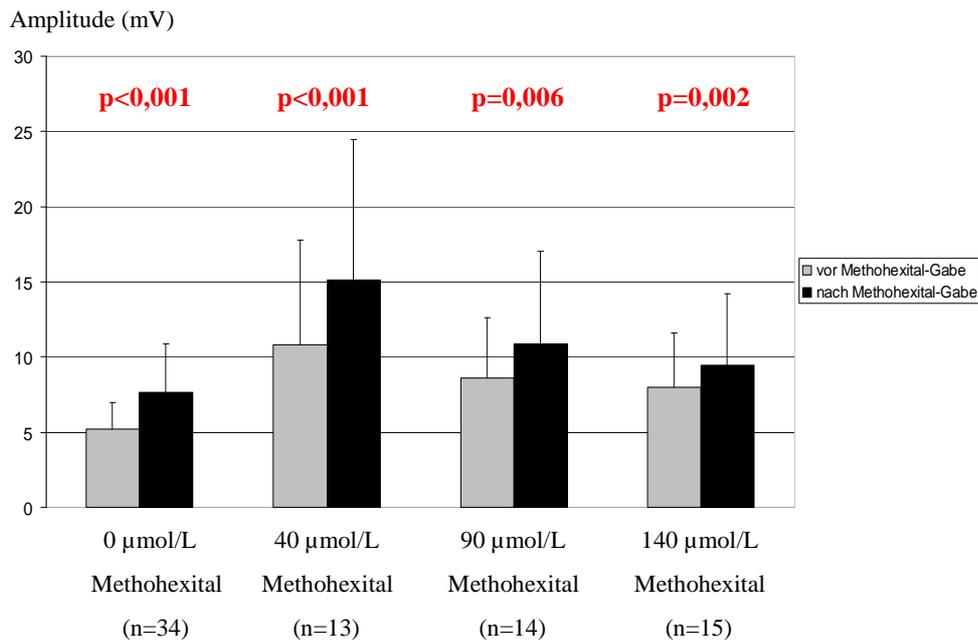


Abb.18: Im Diagramm werden die Amplituden der evozierten Potentiale vor und nach Gabe von Methohexital in den Konzentrationen 40µmol/L, 90µmol/L und 140µmol/L mit den Veränderungen während der Versuche ohne Gabe von Methohexital verglichen.

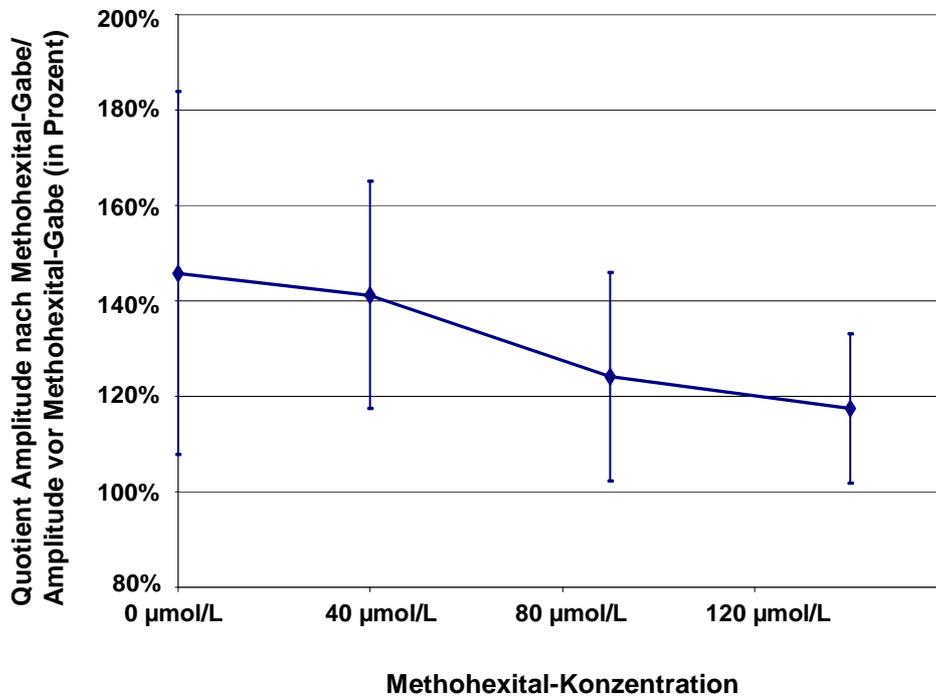


Abb.19: Das Diagramm zeigt die Veränderung der evozierten Potentiale in der Ruhephase vor Hirnischämie in Abhängigkeit von der Methohexital-Konzentration.

3.1.1.3. Auswirkung von Methohexital auf evozierte Potentiale bei Ischämie-Simulation

Zur Bewertung der Wirkung von Methohexital auf die evozierten Potentiale während Ischämie wird die Recovery der evozierten Potentiale ohne und mit Methohexital für jede der drei Konzentrationen jeweils getrennt betrachtet. Dabei gehen die Versuchsergebnisse immer als Paarung eines Versuchs ohne Methohexital mit einem Versuch unter Wirkung von Methohexital in die statistische Auswertung ein.

Bei den Versuchsreihen mit 40 µmol/L Methohexital ergibt sich für die Kontrollgruppe ein Mittelwert von 24,4% bei einem Bereich von 0% bis 81,8%, während in der Medikamentengruppe der Mittelwert 33,6% beträgt bei einem Wertebereich von 0% bis 63,7%.

In der Versuchsreihe bei 90 µmol/L Methohexital berechnet sich für die Kontrollgruppe ein Mittelwert von 28,1% mit einem Bereich von 0% bis 122,7%. In der Methohexitalgruppe ergibt sich ein Mittelwert von 20,1% mit einem Minimum von 0% und einem Maximum von 47,9%.

In der dritten Versuchsreihe mit 140 µmol/L Methohexital hat die Kontrollgruppe einen Mittelwert von 41,6% und umfasst den Bereich von 0% bis 123,1%, während in der Medikamentengruppe der Mittelwert 29,4% beträgt und die Werte von 0% bis 90,7% reichen.

Während der Mittelwert der Recovery bei Gabe von 40µmol/L Methohexital höher liegt als in der entsprechenden Kontrollgruppe, weisen die Kontrollgruppen im Vergleich zu Konzentrationen von 90 µmol/L und 140µmol/L Methohexital beim Mittelwert tendenziell eine höhere Recovery der evozierten Potentiale am Ende des Versuchs auf. Zur genauen statistischen Analyse wird der gepaarte t-Test angewendet. Hierbei ergibt sich bei keiner der drei verwendeten Konzentrationen ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe bei der statistischen Analyse. Bei allen drei Konzentrationen von Methohexital errechnet sich bei den statistischen Tests ein $p > 0,05$.

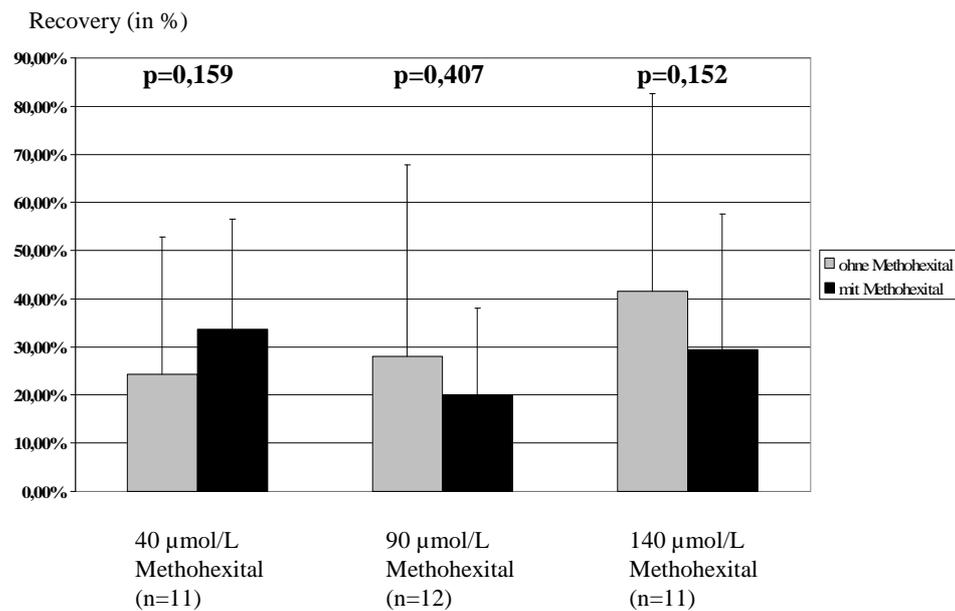


Abb.20: Das Diagramm stellt die Gegenüberstellung der Mittelwerte der Recovery der evozierten Potentiale mit ihren jeweiligen Standardabweichungen dar. Für jede Konzentration sind Kontrollgruppe und Methohexitalgruppe gepaart dargestellt. Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind ebenfalls angeführt.

3.1.2. DC-Potential

3.1.2.1. Auswirkungen von Methohexital auf die ATN-Latenz bei Ischämie-Simulation

Die Wirkung von Methohexital auf die Hippocampus-Schnitte während der Ischämie wird anhand der Latenzzeit bis zum Eintreten der ATN betrachtet. Die Auswertung der bei den Versuchen gesammelten Daten erfolgt wie bei der statistischen Analyse bei den evozierten Potentialen separat für jede Methohexital-Konzentration. Weiterhin gehen die Versuchsergebnisse gepaart, Medikamentenversuch mit entsprechender Kontrolle, in die statistische Berechnung ein.

Bei einer Methohexital-Konzentration von 40 µmol/L ergibt sich für die Kontrolle eine mittlere Latenzzeit von 1,89min. Die Latenzzeiten liegen zwischen 0,9min und 3,0min

und haben eine Standardabweichung von 0,60min. Bei Verabreichung von 40 $\mu\text{mol/L}$ Methohexital liegt der Mittelwert bei 1,52min und die Werte in einem Bereich von 0,7min bis 3,9min mit einer Standardabweichung von 0,80min.

Die Versuchsreihen bei 90 $\mu\text{mol/L}$ Methohexital zeigen ein ähnliches Bild. Bei den Kontrollen errechnet sich ein Mittelwert von 2,25min bei Latenzzeiten von 1,0min bis 3,8min und einer Standardabweichung von 0,91min. Die mittlere Latenzzeit ist in den entsprechenden Methohexitalversuchen mit 1,60min geringer als bei den Kontrollen. Die Werte erstrecken sich von 0,5min bis 4,2min mit einer Standardabweichung von 1,02min.

Bei den Versuchen mit 140 $\mu\text{mol/L}$ Methohexital zeigt sich bei den Kontrollen eine mittlere Latenzzeit von 2,84min bei Werten von 1,6min bis 4,3min mit einer Standardabweichung von 0,97min. Auch hier zeigt sich bei Gabe von Methohexital ein niedrigerer Mittelwert von 1,92min. Die Latenzzeiten liegen zwischen 0,8min und 5,1min bei einer Standardabweichung von 1,25min.

Zusammenfassend ergibt die alleinige Betrachtung der Mittelwerte der Latenzzeiten, dass in den Versuchen, bei denen Methohexital gegeben wird, es zu einer Reduktion der Zeit vom Beginn der Ischämie bis zur anoxischen Terminalnegativierung kommt. Bei Durchführung der statistischen Analyse mit dem gepaarten t-Test ergeben sich bei 90 $\mu\text{mol/L}$ und 140 $\mu\text{mol/L}$ signifikante Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Medikamentengruppe. Bei 40 $\mu\text{mol/L}$ wird kein statistisch signifikanter Unterschied erkannt. Insgesamt zeigt sich bei Konzentrationen von 90 $\mu\text{mol/L}$ und 140 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Reduktion der Latenzzeiten in den Methohexital-Gruppen, während bei 40 $\mu\text{mol/L}$ kein signifikanter Unterschied vorhanden ist.

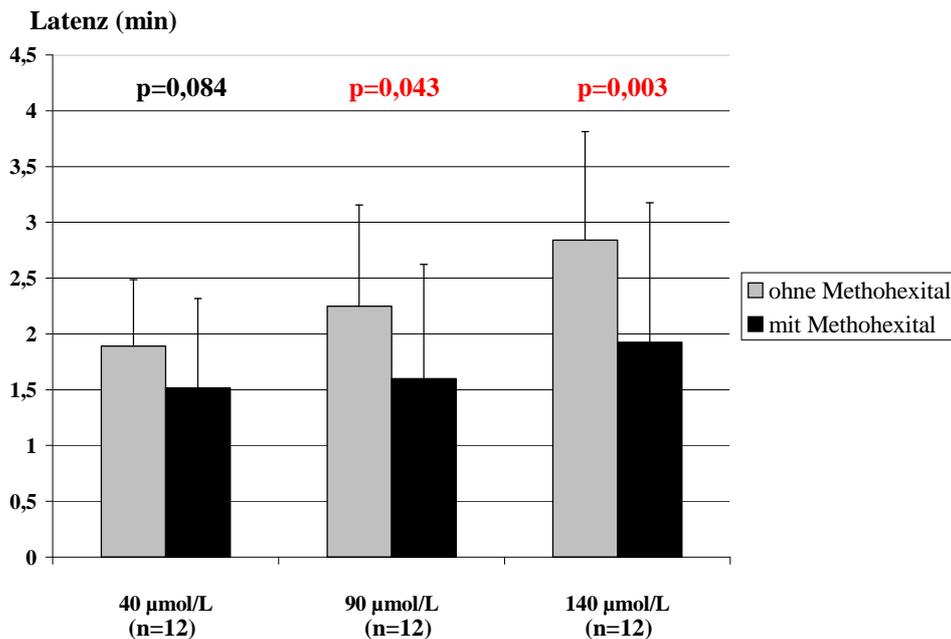


Abb.21: Im Diagramm sind die Mittelwerte der Latenzzeit bis zum Auftreten der anoxischen Terminalnegativierung nach Beginn der Ischämie abgebildet. Ebenfalls sind die jeweiligen Standardabweichungen eingezeichnet und die entsprechenden p-Werte der statistischen Tests.

3.1.2.2. Auswirkungen von Methohexital auf die Amplitude der anoxischen Terminalnegativierung bei Ischämie-Simulation

Die statistische Auswertung der Amplitudenmesswerte erfolgt nach demselben Prinzip wie bei der Latenzzeit in Abschnitt 3.2.2.1. Zunächst werden mit der deskriptiven Statistik wesentliche Größen zur Beschreibung der Verteilung der gemessenen Werte erfasst.

In den Versuchsgruppen bei 40 µmol/L Methohexital ergibt sich bei den Kontrollen ein Mittelwert von 8,5mV. Die Amplituden liegen zwischen 4,9mV und 15,2mV bei einer Standardabweichung von 3,29mV. Im Vergleich dazu errechnet sich bei Gabe von Methohexital eine mittlere Amplitude von 12,26mV. Der Wertebereich erstreckt sich von 5,5mV bis 23,0mV mit einer Standardabweichung von 6,21mV.

Bei den Versuchsreihen mit 90 $\mu\text{mol/L}$ Methohexital hat die Kontrollgruppe einen Mittelwert von 10,13mV. Die Werte reichen von 6,3mV bis 19,4mV bei einer Standardabweichung von 4,26mV. Die Medikamentengruppe weist im Mittel eine Amplitudengröße von 11,18mV auf. Das Minimum liegt bei 4,0mV und das Maximum bei 19,1mV mit einer Standardabweichung von 4,33mV.

In der dritten Methohexital-Gruppe mit einer Konzentration von 140 $\mu\text{mol/L}$ hat die Kontrollgruppe eine mittlere Amplitudengröße von 8,62mV. Die Verteilung der Amplitudengrößen reicht von 2,6mV bis 16,5mV und hat eine Standardabweichung von 4,45mV. Bei Verabreichung von Methohexital zeigt sich ein Mittelwert von 9,90mV. Die Reichweite der gemessenen Werte liegt zwischen 4,6mV und 21,0mV mit einer Standardabweichung von 4,69mV.

Die weitere Analyse der gemessenen Amplituden erfolgt mit dem gepaarten t-Test getrennt für jede Methohexital-Konzentration. Die Ergebnisse der statistischen Berechnung ergeben bei der Versuchsgruppe mit 40 $\mu\text{mol/L}$ Methohexital einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und Medikamentengruppe. Die Amplitudengröße der anoxischen terminalen Negativierung ist bei der Kontrollgruppe signifikant geringer als bei Zugabe von Methohexital. Bei höheren Methohexital-Konzentrationen zeigt sich jedoch kein signifikanter Einfluss auf die Amplitudengröße durch Gabe von Methohexital.

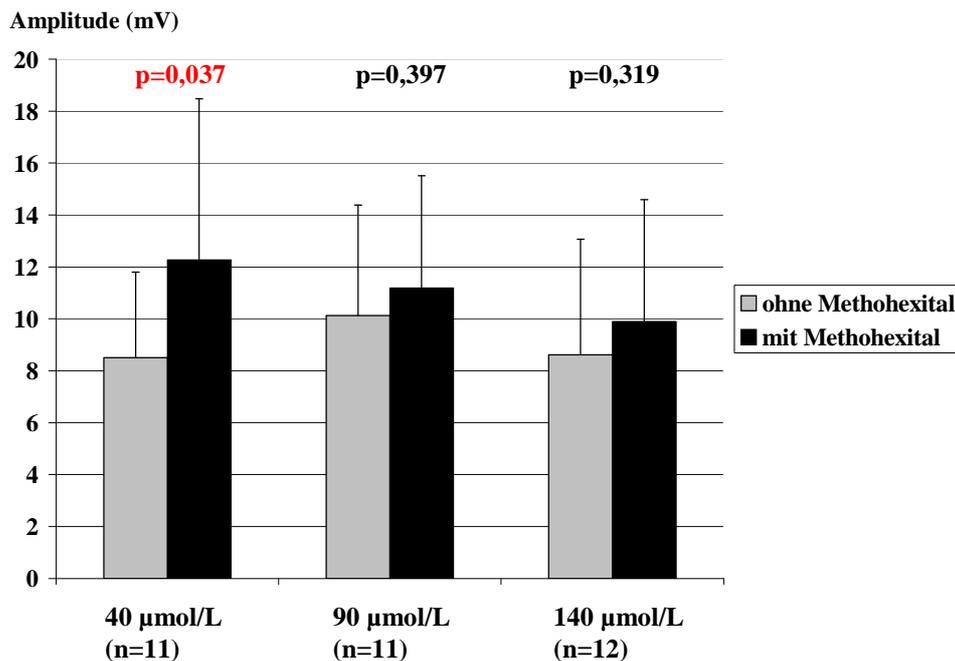


Abb.22: Das Diagramm stellt die Mittelwerte der Amplituden der anoxischen Terminalnegativierung dar. Weiterhin sind die Standardabweichungen und die Ergebnisse des gepaarten t-Tests in der Abbildung enthalten.

3.2. Ergebnisse der Mikrodialyse

3.2.1. Veränderungen der Aminosäure-Konzentrationen bei Ischämie unter Normbedingungen

Zunächst erfolgt eine genaue Betrachtung der Auswirkungen der Ischämie auf die Konzentrationen der Aminosäuren im Dialysat. Dafür werden die Ergebnisse aus den Kontrollversuchen zusammengefasst, bei denen die Konzentrationen der Aminosäuren nicht der Wirkung von Methohexital unterliegen. Dabei können sowohl die Veränderungen während der Ischämie als auch im weiteren Verlauf nach Beendigung der Ischämie ausgewertet werden. Für die Auswertung wird aus den relativen Konzentrationen der Proben, die zum selben Zeitpunkt nach Ischämiebeginn gesammelt wurden, der Mittelwert berechnet. Aus diesen Mittelwerten für die jeweiligen Proben lassen sich Verlaufskurven für die Aminosäuren darstellen.

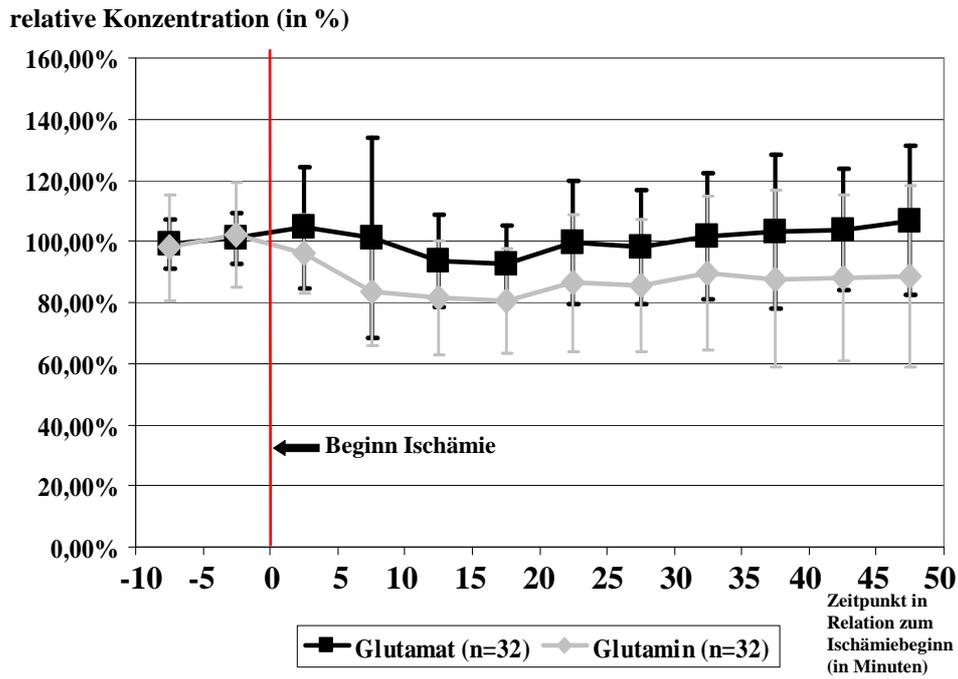


Abb.23: Darstellung der Verlaufskurven der Konzentrationen von Glutamat und Glutamin mit entsprechenden Standardabweichungen.

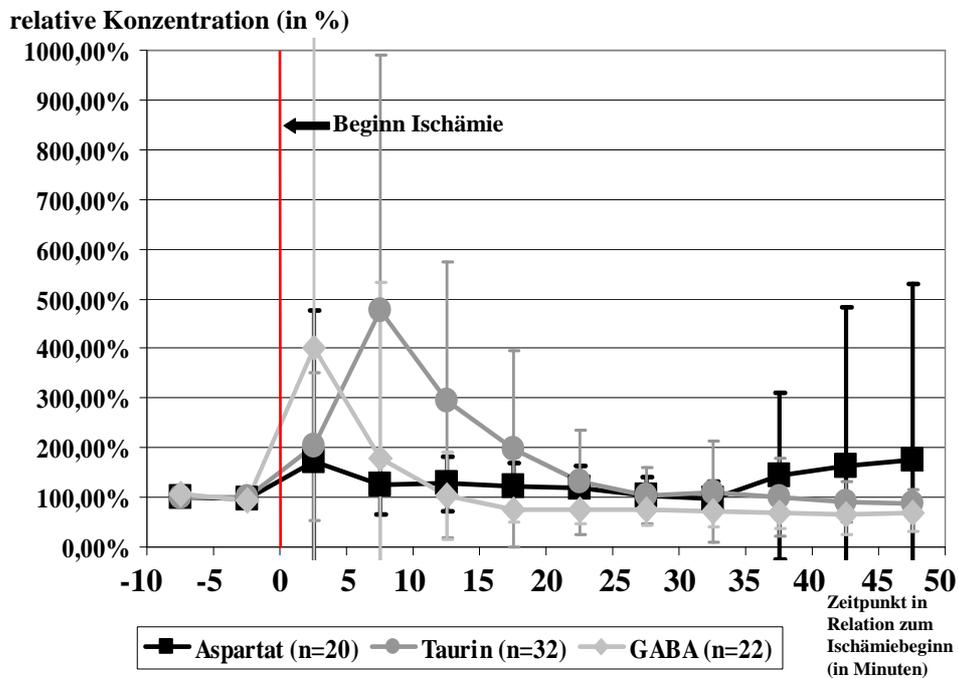


Abb.24: Die Grafik zeigt den Verlauf der Konzentrationen von Aspartat, Taurin und GABA und entspricht in der Darstellungsweise der Abbildung 25.

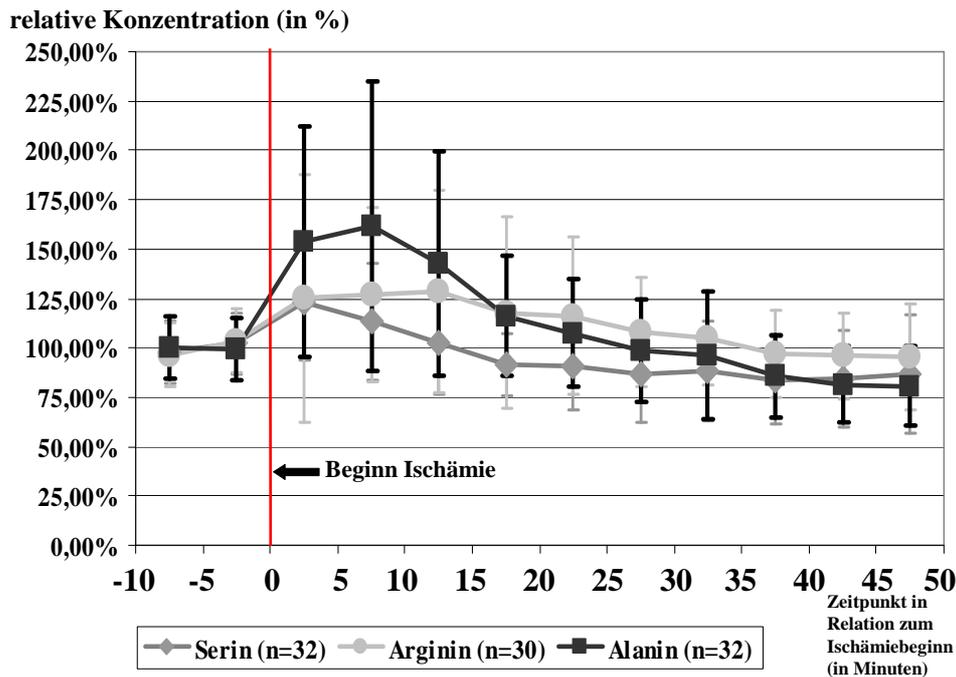


Abb.25: Die Grafik zeigt den Verlauf der Konzentrationen von Serin, Arginin und Alanin und entspricht in der Darstellungsweise der Abbildung 25.

Die weitergehende statistische Untersuchung prüft, ob die durch eine Ischämie unter Kontrollbedingungen hervorgerufenen Änderungen der Aminosäurekonzentrationen im Dialysat überhaupt Signifikanz erreichen. Dafür werden zum einen die Ergebnisse in Probe 2 mit denen in Probe 3 verglichen. Probe 2 wird unmittelbar vor Beginn der Ischämie gewonnen, während Probe 3 in den ersten fünf Minuten nach Start der Ischämie gesammelt wird. Somit entspricht das Zeitfenster von Probe 3 in etwa dem Zeitraum, in dem die anoxische Terminalnegativierung durchlaufen wird. Eine genaue Zuordnung lässt sich allerdings nicht durchführen, weil die ATN-Latenz in den Versuchen variiert. So lässt sich eine Aussage treffen über die kurzfristigen Veränderungen der Konzentrationen im Hirnschnittgewebe während ischämischer Verhältnisse. Als nächstes wird Probe 2 mit Probe 12 verglichen. Probe 12 wird im Zeitraum von 45 Minuten bis 50 Minuten nach Ischämiebeginn gewonnen und enthält das am Versuchsende gesammelte Dialysat. Beide beschriebenen Vergleiche werden mit dem gepaarten t-Test statistisch untersucht. Zur weiteren Beschreibung des Verlaufs der Aminosäure-Konzentrationen werden die Proben mit der maximalen und minimalen relativen mittleren Konzentration nach Ischämiebeginn bestimmt. Die erhobenen

Versuchsdaten dieser Proben werden ebenfalls mit den Ergebnissen der Probe 2 verglichen. Zusätzlich wird eine Gegenüberstellung der Daten der Probe mit maximaler mittlerer Konzentration mit der Probe mit minimaler mittlerer Konzentration durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse für die einzelnen Aminosäuren aufgeführt.

Glutamat

Probe 2 - Probe 3	gepaarter t-Test	p=0,294
Probe 2 - Probe 12	gepaarter t-Test	p=0,159

Maximum Probe 12 **Minimum** Probe 6

Probe 2 - Probe Maximum	gepaarter t-Test	p=0,159
Probe 2 - Probe Minimum	gepaarter t-Test	p<0,001
Probe Maximum - Probe Minimum	gepaarter t-Test	p=0,001

Bei Glutamat ergibt sich weder direkt nach Beginn der Ischämie noch am Versuchsende ein statistisch signifikanter Unterschied im Bezug zur präischämischen Situation. Dabei wird die maximale mittlere Konzentration am Schluss des Versuchs (Probe 12) erreicht und das Minimum 15-20 Minuten nach Ischämiebeginn (Probe 6). Die Probe mit der minimalen mittleren Konzentration weist sowohl im Vergleich mit der präischämischen Situation als auch mit der Probe mit maximaler mittlerer Konzentration einen statistisch signifikanten Unterschied auf.

Glutamin

Probe 2 - Probe 3	gepaarter t-Test	p<0,001
Probe 2 - Probe 12	gepaarter t-Test	p=0,012

Maximum Probe 3 **Minimum** Probe 6

Probe 2 - Probe Maximum	gepaarter t-Test	p<0,001
Probe 2 - Probe Minimum	gepaarter t-Test	p<0,001
Probe Maximum - Probe Minimum	gepaarter t-Test	p<0,001

Die statistische Auswertung des Verlaufs der Konzentration von Glutamin ergibt sowohl unmittelbar nach Einsetzen der Ischämie als auch am Versuchsende einen signifikanten Unterschied beim statistischen Vergleich mit den präischämischen

Werten. Das Maximum wird in den ersten fünf Minuten (Probe 3) nach Beginn der Ischämie erreicht. Das Minimum ist 15-20 Minuten (Probe 6) nach Start der Ischämie zu finden. Beim Vergleich der Probe mit der minimalen mittleren Konzentration sowohl mit dem präischämischen Ausgangswert als auch mit der Probe mit maximaler mittlerer Konzentration errechnet sich ein signifikanter Unterschied beim gepaarten t-Test.

Aspartat

Probe 2 - Probe 3	gepaarter t-Test	p=0,281
Probe 2 - Probe 12	gepaarter t-Test	p=0,338

Maximum Probe 12 **Minimum** Probe 9

Probe 2 - Probe Maximum	gepaarter t-Test	p=0,338
Probe 2 - Probe Minimum	gepaarter t-Test	p=0,995
Probe Maximum - Probe Minimum	gepaarter t-Test	p=0,358

Der Verlauf der Aspartat-Konzentration weist weder direkt nach Beginn der Ischämie noch zum Ende des Versuchs einen signifikanten Unterschied zu den präischämischen Konzentrationen auf. Die maximale mittlere Konzentration liegt 45-50 Minuten nach Start der Ischämie (Probe 12) am Versuchsende vor. Das Minimum ist 30-35 Minuten nach Ischämiebeginn (Probe 9) erreicht. Die statistische Analyse zeigt keine signifikanten Unterschiede bei den weiteren gepaarten t-Tests. Auch zwischen maximaler mittlerer Konzentration und minimaler mittlere Konzentration ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Taurin

Probe 2 - Probe 3	gepaarter t-Test	p<0,001
Probe 2 - Probe 12	gepaarter t-Test	p=0,111

Maximum Probe 4 **Minimum** Probe 12

Probe 2 - Probe Maximum	gepaarter t-Test	p<0,001
Probe 2 - Probe Minimum	gepaarter t-Test	p=0,111
Probe Maximum - Probe Minimum	gepaarter t-Test	p<0,001

Die Konzentration von Taurin verändert sich unmittelbar nach Ischämiebeginn in statistisch signifikantem Ausmaß. Jedoch ist die Konzentration am Ende des Versuchs

im Vergleich zu der präischämischen Konzentration nicht mehr signifikant verändert. Die maximale mittlere Konzentration wird 5-10 Minuten nach Start der Ischämie (Probe 4) erreicht und die minimale mittlere Konzentration 45-50 Minuten nach Beginn der Ischämie (Probe 12). Beim Vergleich der Probe mit maximaler mittlerer Konzentration sowohl mit der präischämischen Probe als auch mit der Probe mit minimaler mittlerer Konzentration lassen sich signifikante Unterschiede feststellen.

GABA

	Probe 2 - Probe 3	gepaarter t-Test	p=0,055
	Probe 2 - Probe 12	gepaarter t-Test	p<0,001
Maximum	Probe 3	Minimum	Probe 11
	Probe 2 - Probe Maximum	gepaarter t-Test	p=0,055
	Probe 2 - Probe Minimum	gepaarter t-Test	p=0,003
	Probe Maximum - Probe Minimum	gepaarter t-Test	p=0,040

Die Konzentration von GABA verändert sich unmittelbar nach Beginn der Ischämie nicht signifikant, jedoch ergibt sich zum Schluss des Versuchs eine signifikante Veränderung im Bezug auf die präischämischen Verhältnisse. In den ersten fünf Minuten nach Ischämiebeginn (Probe 3) steigt die GABA-Konzentration auf den maximalen mittleren Wert. Sie fällt im Zeitraum von 40-45 Minuten nach Ischämiebeginn (Probe 11) auf ihr Minimum. Der Vergleich der Probe mit der minimalen mittleren Konzentration mit den präischämischen Werten ergibt eine signifikante Veränderung im Konzentrationsverlauf. Weiterhin zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Minimum und Maximum.

Serin

	Probe 2 - Probe 3	gepaarter t-Test	p<0,001
	Probe 2 - Probe 12	gepaarter t-Test	p<0,001
Maximum	Probe 3	Minimum	Probe 10
	Probe 2 - Probe Maximum	gepaarter t-Test	p<0,001
	Probe 2 - Probe Minimum	gepaarter t-Test	p<0,001
	Probe Maximum - Probe Minimum	gepaarter t-Test	p<0,001

Die Aminosäure Serin zeigt sowohl unmittelbar nach Start der Ischämie als auch am Ende des Versuchs eine signifikante Veränderung der Konzentration im Dialysat im Bezug auf die präischämische Ausgangslage. Die maximale Konzentration findet sich in den ersten fünf Minuten nach Start der Ischämie (Probe 3). Das Minimum wird 35-40 Minuten nach Ischämiebeginn (Probe 10) erreicht. Sowohl die maximale mittlere Konzentration als auch die minimale mittlere Konzentration unterscheiden sich signifikant von den Ausgangswerten vor Ischämie. Darüber hinaus errechnet sich auch bei der Gegenüberstellung von Maximum und Minimum ein signifikanter Unterschied.

Arginin

	Probe 2 - Probe 3	gepaarter t-Test	p=0,071
	Probe 2 - Probe 12	gepaarter t-Test	p=0,058
Maximum	Probe 5	Minimum	Probe 12
	Probe 2 - Probe Maximum	gepaarter t-Test	p=0,012
	Probe 2 - Probe Minimum	gepaarter t-Test	p=0,058
	Probe Maximum - Probe Minimum	gepaarter t-Test	p=0,002

Bei der Aminosäure Arginin lässt sich weder unmittelbar nach Start der Ischämie noch am Versuchsende ein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf den präischämischen Ausgangswert nachweisen. Die maximale mittlere Konzentration wird 10-15 Minuten nach Ischämiebeginn (Probe 5) und die minimale mittlere Konzentration 45-50 Minuten nach Ischämiebeginn (Probe 12) gemessen. Bei der Probe 5 mit maximaler mittlerer Konzentration zeigt sich im Vergleich zu der präischämischen Konzentration ein signifikanter Unterschied. Auch beim statistischen Test der Probe mit maximaler mittlerer Konzentration mit der Probe mit minimaler mittlerer Konzentration erhält man eine statistisch signifikante Differenz.

Alanin

Probe 2 - Probe 3		gepaarter t-Test	p<0,001
Probe 2 - Probe 12		gepaarter t-Test	P<0,001
Maximum Probe 4	Minimum	Probe 12	
Probe 2 - Probe Maximum		gepaarter t-Test	P<0,001
Probe 2 - Probe Minimum		gepaarter t-Test	P<0,001
Probe Maximum - Probe Minimum		gepaarter t-Test	P<0,001

Die Konzentration von Alanin weist direkt nach Beginn der Ischämie eine statistisch signifikante Veränderung auf. Auch zum Schluss des Versuchs lässt sich in Bezug auf die präischämische Konzentration eine signifikante Differenz feststellen. Das Maximum wird 5-10 Minuten nach Start der Ischämie (Probe 4) und das Minimum 45-50 Minuten nach Ischämiebeginn (Probe 12) erreicht. Die Probe mit maximaler mittlerer Konzentration weist im Vergleich sowohl mit den präischämischen Werten als auch mit der Probe mit minimaler mittlerer Konzentration einen Unterschied auf, der statistisch signifikant ist.

3.2.1.1. Zusammenfassung der Veränderungen der Aminosäure-Konzentrationen bei Ischämie

Bei Glutamin, Taurin, Serin und Alanin kommt es unmittelbar nach Beginn der Ischämie zu einer signifikanten Veränderung der gemessenen Konzentration. Während Taurin, Serin und Alanin einen signifikanten Anstieg der Konzentration aufweisen, lässt sich bei Glutamin ein signifikanter Abfall erkennen. Glutamat, Aspartat, GABA und Arginin zeigen direkt nach Start der Ischämie keine statistisch signifikante Veränderung der Konzentration. Das Maximum der mittleren Konzentration wird bei allen Aminosäuren bis auf Glutamat und Aspartat in dem Zeitintervall vom Start der Ischämie bis 15 Minuten nach Ischämiebeginn erreicht. Dabei zeigt sich bei Taurin, Serin, Arginin und Alanin ein signifikanter Anstieg in der Probe mit maximaler mittlerer Konzentration in Bezug zu den Ausgangswerten vor Ischämie. Bei Glutamat und Aspartat kommt es nach einem zwischenzeitlichen Minimum zu einem Anstieg der Konzentration zum Schluss des Versuchs. Das Maximum wird bei diesen Aminosäuren

in der letzten gesammelten Probe gemessen, jedoch ohne eine signifikante Differenz in Bezug auf die präischämischen Werte zu ergeben. Die Konzentration von Glutamin bleibt nach dem signifikanten Absinken unmittelbar nach Beginn der Ischämie im weiteren Verlauf konstant unter der präischämischen Konzentration. Am Ende des Versuches unterscheiden sich Glutamin, Taurin, GABA, Serin, Arginin und Alanin statistisch signifikant von den Ausgangswerten vor Ischämie.

Zusammenfassend haben Glutamat und Aspartat einen ähnlichen Verlauf ihrer mittleren Konzentrationen. Nach Beginn der Ischämie kommt es zu einem Anstieg der nicht signifikant ist, und dem nach Beendigung der Ischämie ein Absinken der Konzentration folgt. Nach Erreichen der minimalen mittleren Konzentration steigt die Konzentration bei beiden Aminosäuren bis zum Ende des Versuchs auf ihr Maximum, das ebenfalls in Bezug auf die präischämischen Konzentrationen keine Signifikanz aufweist. Somit kann kein signifikanter Einfluss der Ischämie auf Glutamat und Aspartat nachgewiesen werden. Bei Glutamin führt die Ischämie zu einer Reduktion der Freisetzung. Die Konzentrationen bleiben dann im weiteren Verlauf unter der Ausgangskonzentration. Die weiteren Aminosäuren Taurin, GABA, Serin, Arginin und Alanin haben prinzipiell einen ähnlichen Verlauf. Ihre Konzentrationen steigen während bzw. kurz nach Ischämie auf ihren maximalen Wert und sinken danach wieder auf ihr Ausgangsniveau. Dabei fallen die Konzentrationen zum Ende des Versuches sogar unter die Ausgangswerte vor Ischämie. Bei diesen Aminosäuren ergeben sich bei den meisten Proben signifikante Differenzen im Vergleich zu den präischämischen Verhältnissen. Somit kann von einem signifikanten Einfluss der Ischämie auf die Konzentrationen einiger Aminosäuren im Dialysat ausgegangen werden.

3.2.2. Wirkung von Methohexital auf die gemessenen Aminosäuren-Konzentration während und nach Ischämie

Den Hippocampus-Schnitten wird Methohexital in drei unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. In den Abbildungen 28-51 ist der Verlauf der mittleren relativen Konzentration der Methohexitalgruppe und der gepaarten Kontrollgruppe für alle erfassten Aminosäuren jeweils in den drei verwendeten Konzentrationen dargestellt.

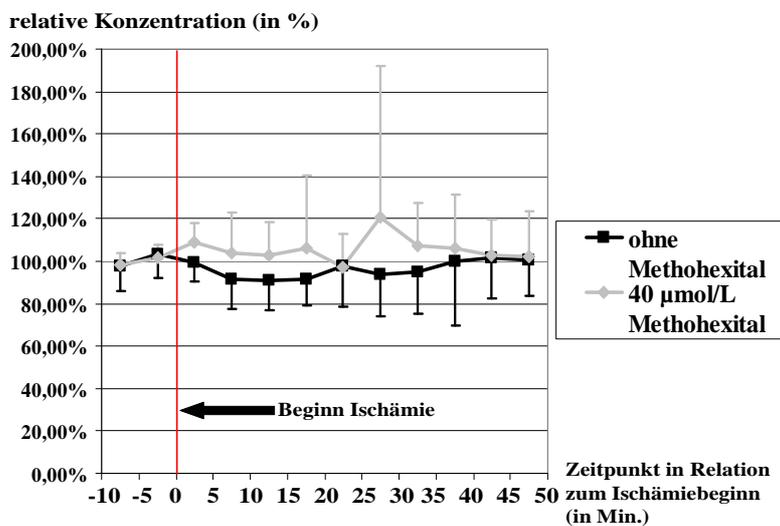


Abb.26: 40 µmol/L Methohexital, Glutamat

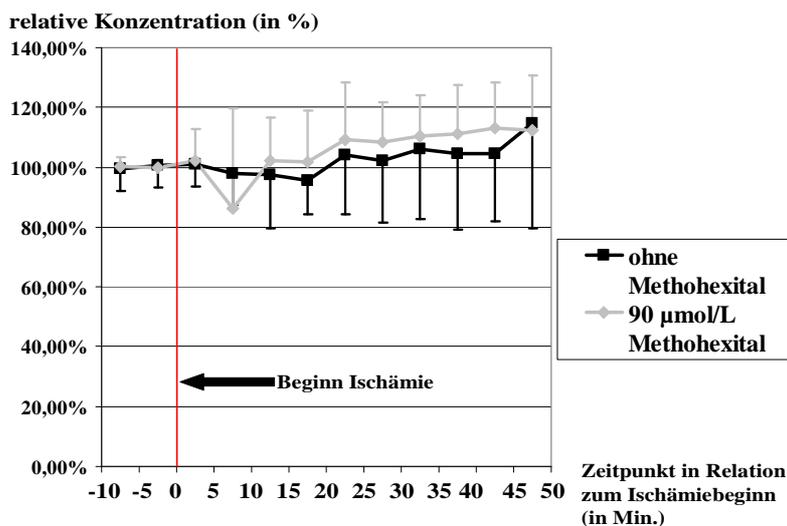


Abb.27: 90 µmol/L Methohexital, Glutamat

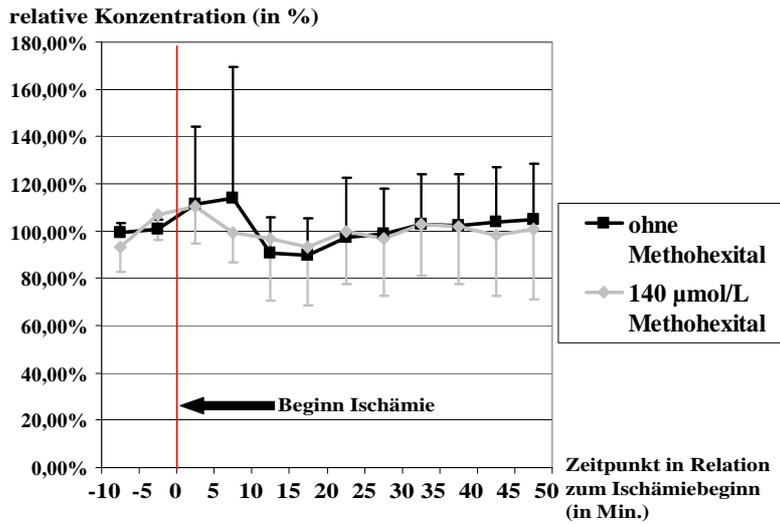


Abb.28: 140 µmol/L Methohexital, Glutamat

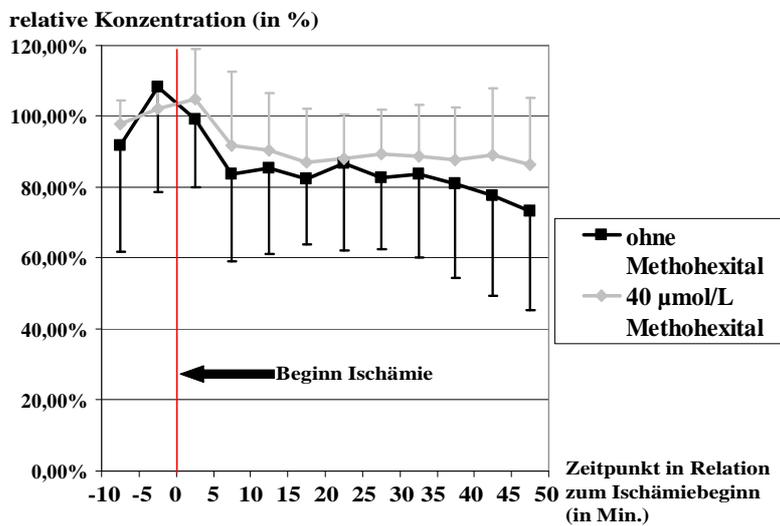


Abb.29: 40 µmol/L Methohexital, Glutamin

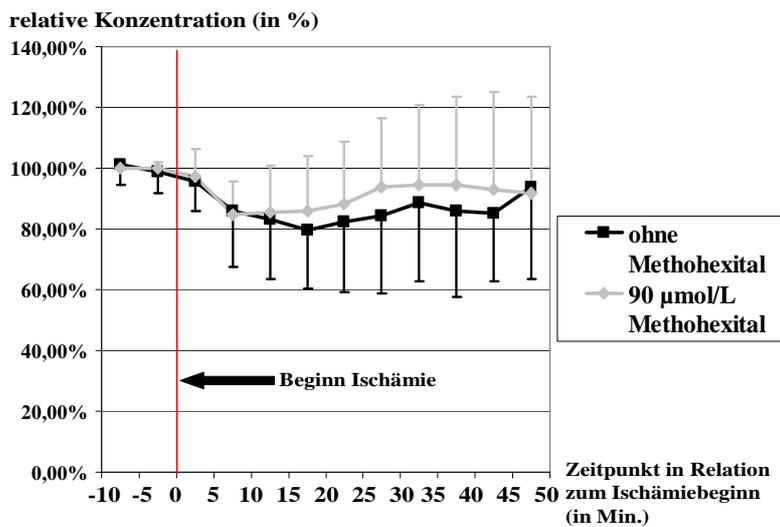


Abb.30: 90 µmol/L Methohexital, Glutamin

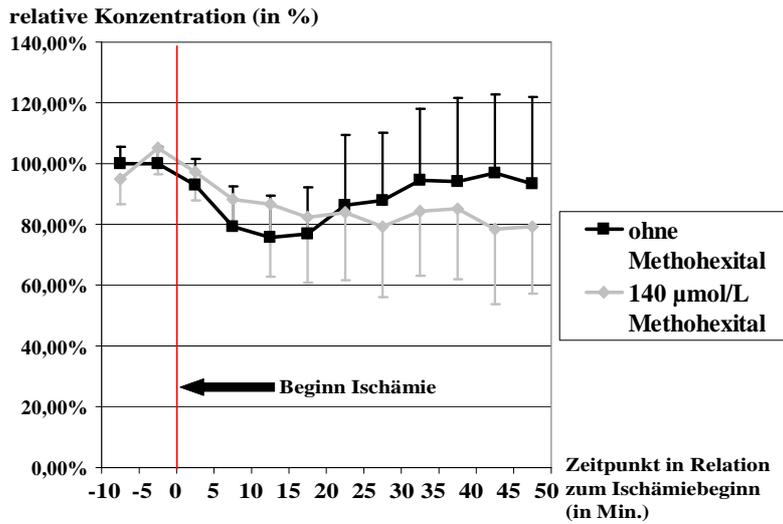


Abb.31: 140 µmol/L Methohexital, Glutamin

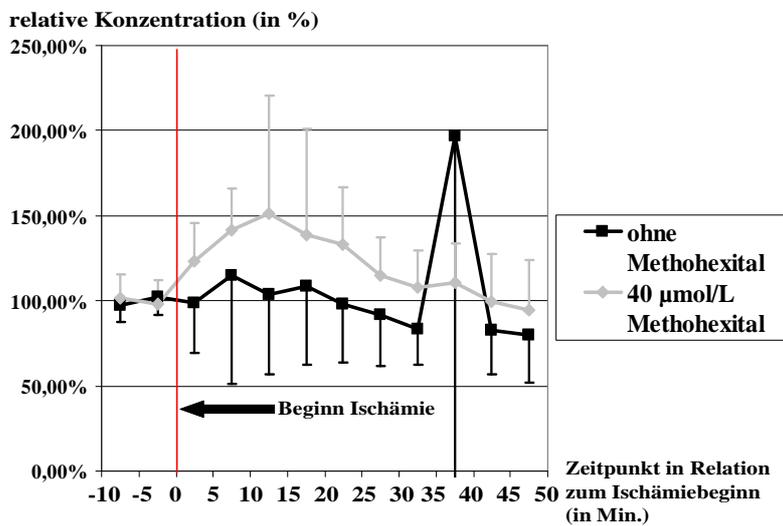


Abb.32: 40 µmol/L Methohexital, Aspartat

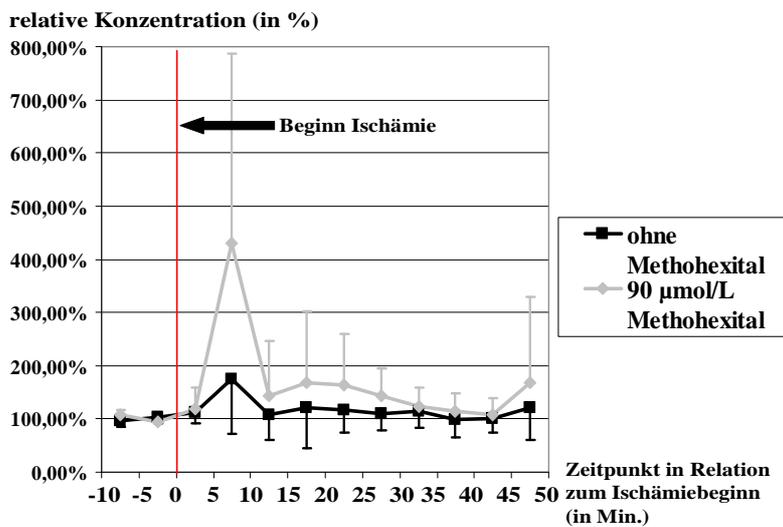


Abb.33: 90 µmol/L Methohexital, Aspartat

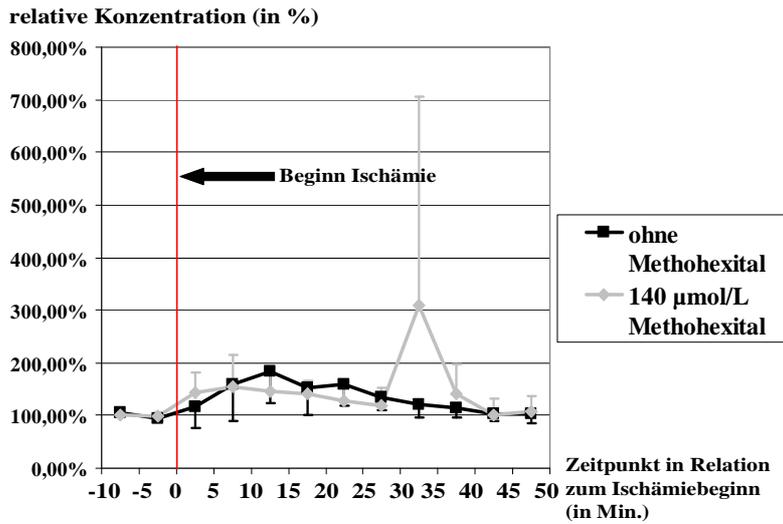


Abb.34: 140 µmol/L Methohexital, Aspartat

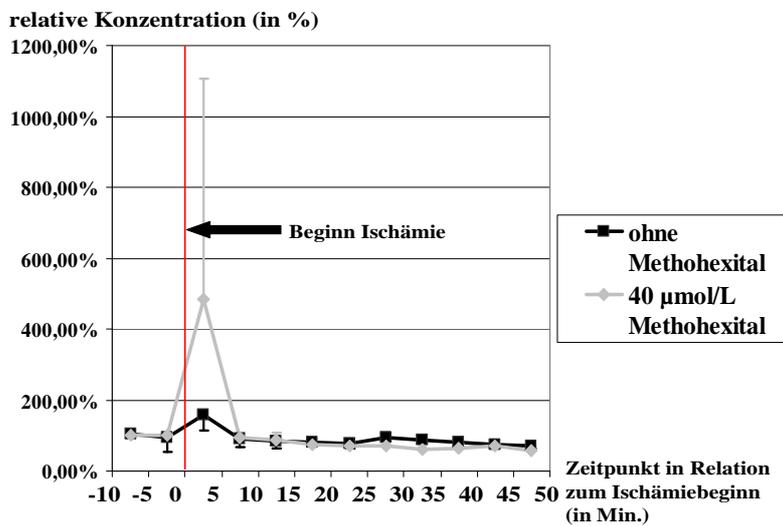


Abb.35: 40 µmol/L Methohexital, GABA

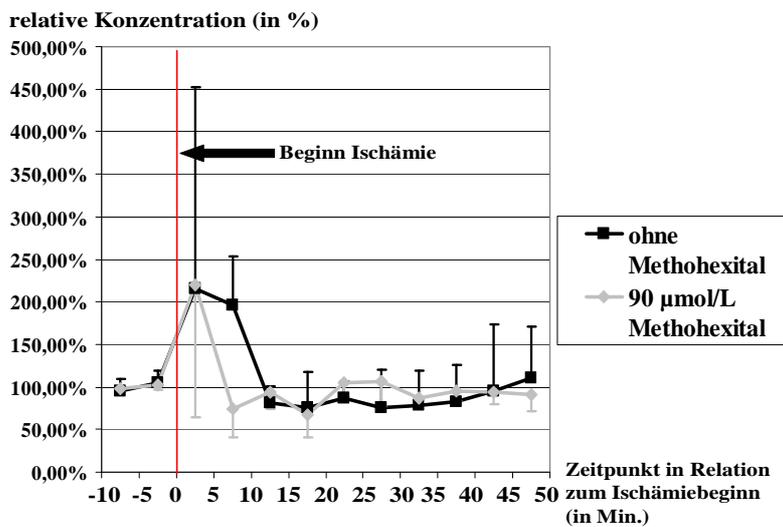


Abb.36: 90 µmol/L Methohexital, GABA

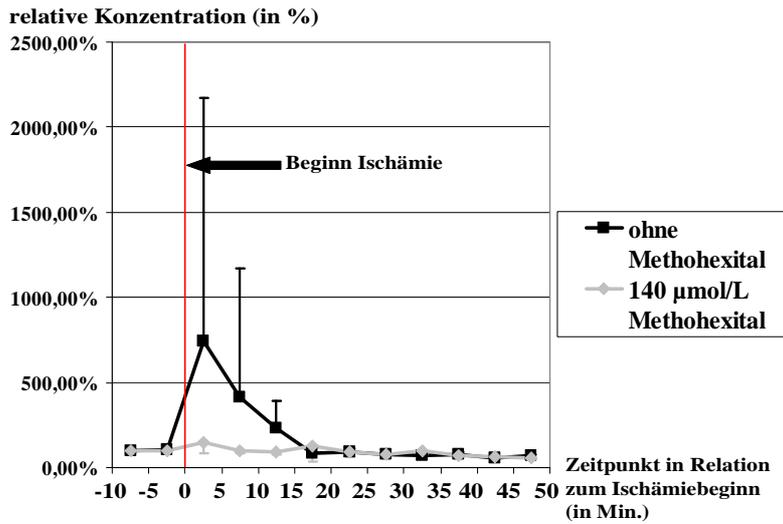


Abb.37: 140 µmol/L Methohexital, GABA

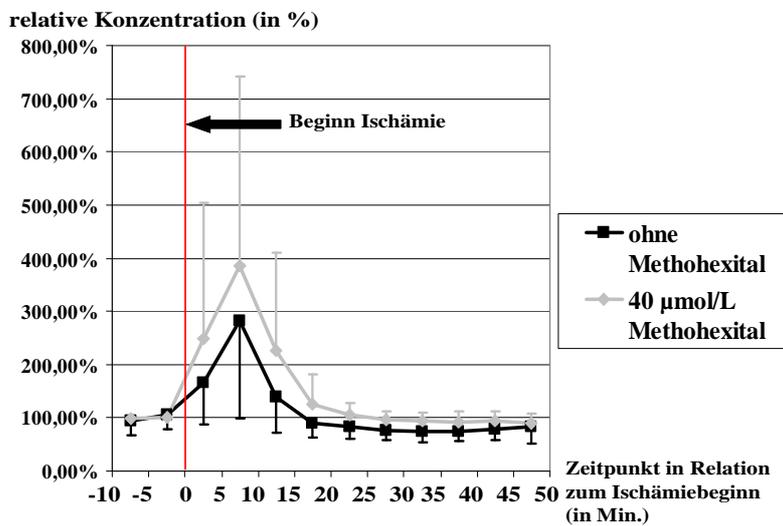


Abb.38: 40 µmol/L Methohexital, Taurin

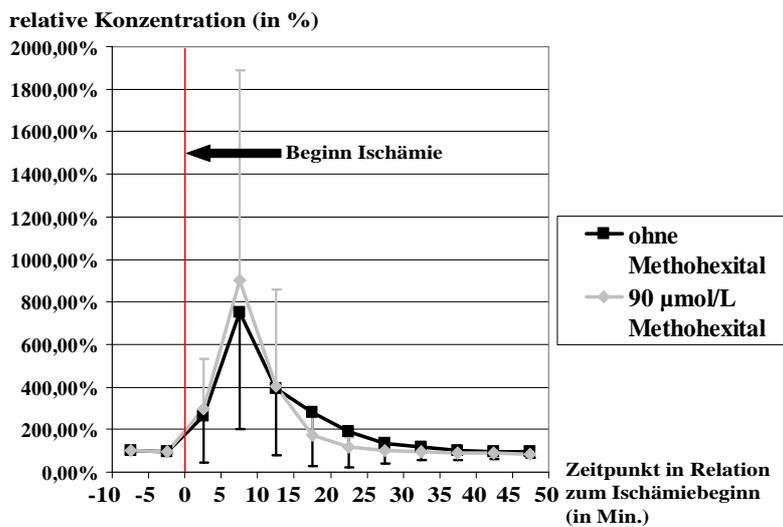


Abb.39: 90 µmol/L Methohexital, Taurin

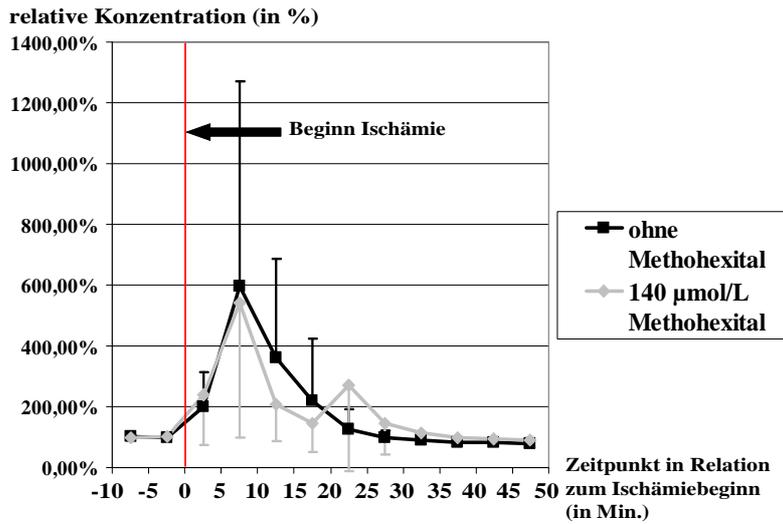


Abb.40: 140 µmol/L Methohexital, Taurin

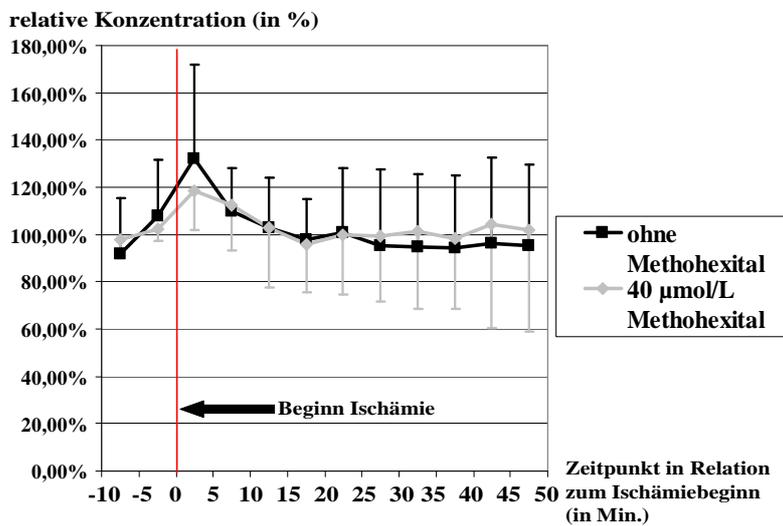


Abb.41: 40 µmol/L Methohexital, Serin

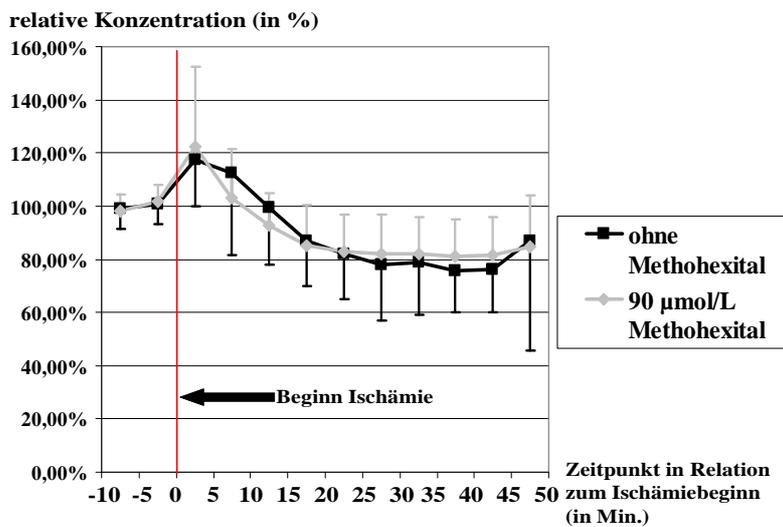


Abb.42: 90 µmol/L Methohexital, Serin

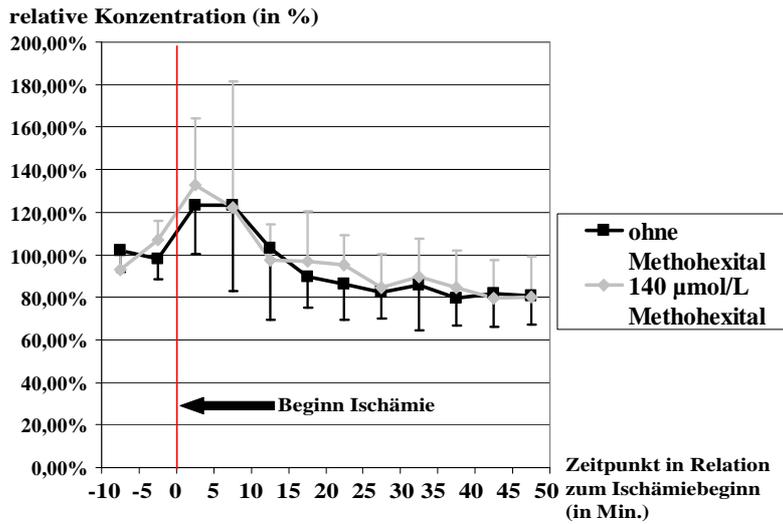


Abb.43: 140 µmol/L Methohexital, Serin

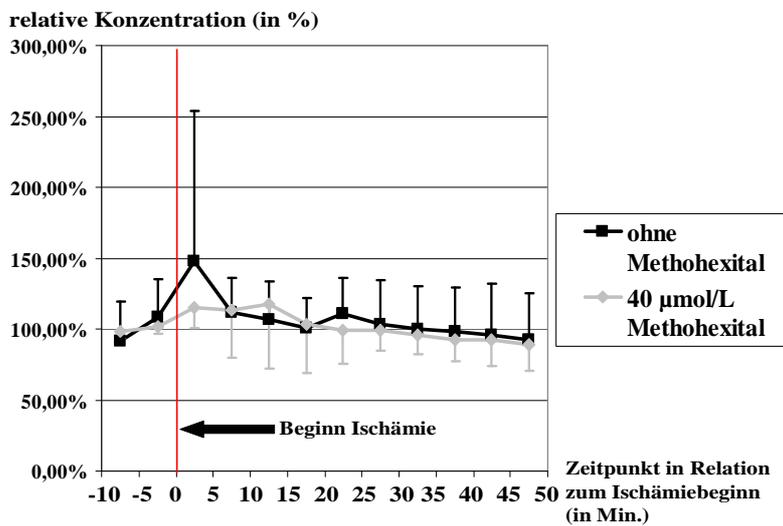


Abb.44: 40 µmol/L Methohexital, Arginin

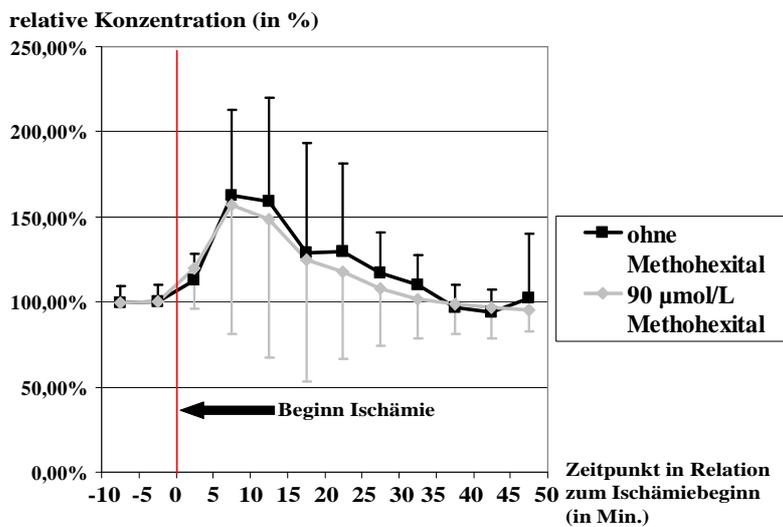


Abb.45: 90 µmol/L Methohexital, Arginin

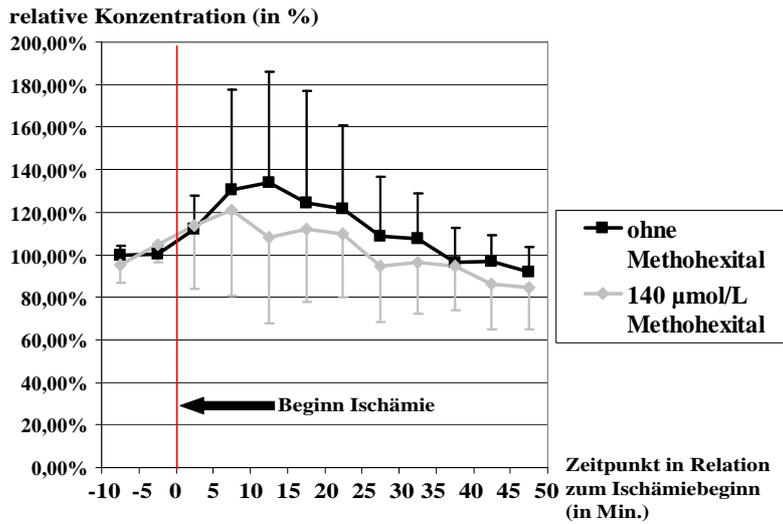


Abb.46: 140 µmol/L Methohexital, Arginin

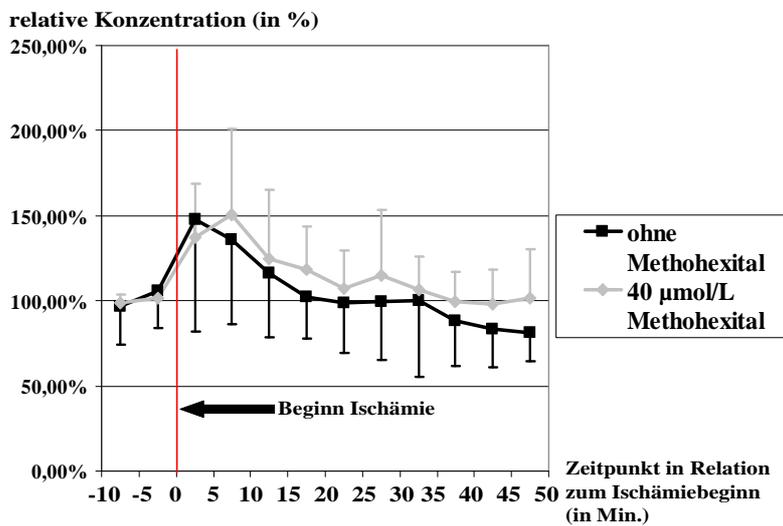


Abb.47: 40 µmol/L Methohexital, Alanin

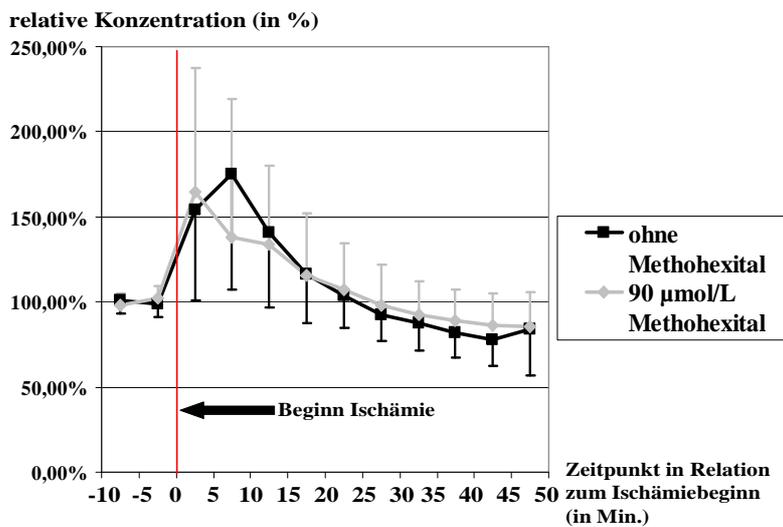


Abb.48: 90 µmol/L Methohexital, Alanin

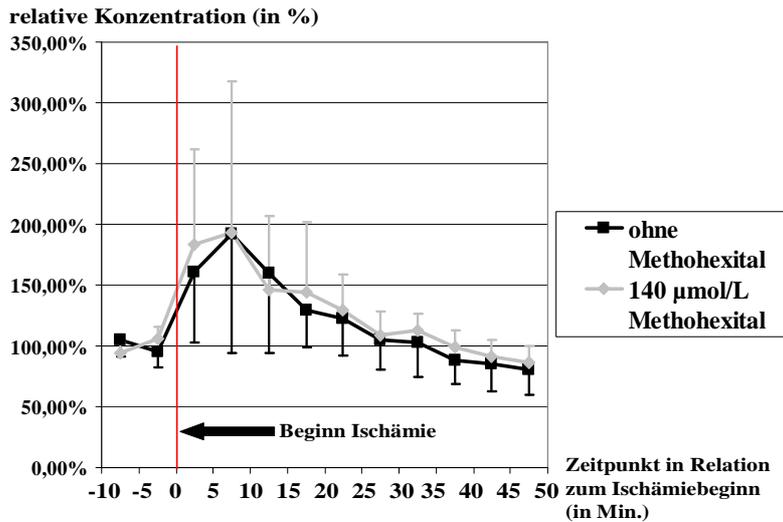


Abb.49: 140 µmol/L Methohexital, Alanin

Für jeden Probenzeitraum werden die gemessenen Konzentrationen bei Gabe von Methohexital mit denen in der Kontrollgruppe verglichen. Die ersten beiden Proben, die vor Ischämiebeginn gesammelt wurden, werden in die statistische Auswertung nicht einbezogen, weil sie als Referenzwert für die Bestimmung der relativen Konzentrationen dienen. Folglich wird für jede der zehn Proben, die nach Ischämiebeginn gesammelt wurden, eine Überprüfung auf einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Medikamentengruppe durchgeführt. Dadurch kann die Wirkung der Gabe von Methohexital auf die Konzentrationen der jeweiligen Aminosäuren zu den verschiedenen Zeitpunkten während des Versuches bewertet werden. Die statistischen Tests werden für jede Aminosäure und weiterhin für jede der drei Methohexital-Konzentrationen getrennt durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt zur besseren Übersicht in tabellarischer Form. Bei einem Testergebnis von $p < 0,05$ wird ein statistisch signifikanter Unterschied angenommen.

Glutamat

Zeit nach Ischämie	40 µmol/L Methohexital (n=11)	90 µmol/L Methohexital (n=10)	140 µmol/L Methohexital (n=10)
0-5 min (Probe 3)	0,019	0,767	0,953
5-10 min (Probe 4)	0,136	0,360	0,425
10-15 min (Probe 5)	0,184	0,522	0,333
15-20 min (Probe 6)	0,215	0,306	0,505
20-25 min (Probe 7)	0,915	0,505	0,526
25-30 min (Probe 8)	0,232	0,225	0,646
30-35 min (Probe 9)	0,099	0,516	0,974
35-40 min (Probe 10)	0,643	0,447	0,944
40-45 min (Probe 11)	0,850	0,236	0,353
45-50 min (Probe 12)	0,851	0,830	0,590

Abb.50: Die Tabelle gibt die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Wirkung von Methohexital während und nach Ischämie auf die Konzentration von Glutamat wieder.

Glutamin

Zeit nach Ischämie	40 µmol/L Methohexital (n=10)	90 µmol/L Methohexital (n=10)	140 µmol/L Methohexital (n=10)
0-5 min (Probe 3)	0,086	0,679	0,041
5-10 min (Probe 4)	0,222	0,904	0,048
10-15 min (Probe 5)	0,607	0,794	0,168
15-20 min (Probe 6)	0,548	0,375	0,398
20-25 min (Probe 7)	0,875	0,485	0,788
25-30 min (Probe 8)	0,342	0,304	0,244
30-35 min (Probe 9)	0,478	0,498	0,270
35-40 min (Probe 10)	0,413	0,375	0,352
40-45 min (Probe 11)	0,045	0,377	0,061
45-50 min (Probe 12)	0,027	0,889	0,168

Abb.51: Die Tabelle gibt die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Wirkung von Methohexital während und nach Ischämie auf die Konzentration von Glutamin wieder.

Aspartat

Zeit nach Ischämie	40 µmol/L Methohexital (n=6)	90 µmol/L Methohexital (n=5)	140 µmol/L Methohexital (n=5)
0-5 min (Probe 3)	0,041	0,678	0,153
5-10 min (Probe 4)	0,222	0,577	0,932
10-15 min (Probe 5)	0,016	0,563	0,424
15-20 min (Probe 6)	0,311	0,682	0,537
20-25 min (Probe 7)	0,005	0,617	0,019
25-30 min (Probe 8)	0,029	0,305	0,273
30-35 min (Probe 9)	0,086	0,671	0,365
35-40 min (Probe 10)	0,505	0,494	0,220
40-45 min (Probe 11)	0,412	0,715	0,860
45-50 min (Probe 12)	0,505	0,524	0,837

Abb.52: Die Tabelle gibt die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Wirkung von Methohexital während und nach Ischämie auf die Konzentration von Aspartat wieder.

GABA

Zeit nach Ischämie	40 µmol/L Methohexital (n=3)	90 µmol/L Methohexital (n=5)	140 µmol/L Methohexital (n=5)
0-5 min (Probe 3)	0,478	0,942	0,405
5-10 min (Probe 4)	0,611	0,146	0,393
10-15 min (Probe 5)	0,653	0,211	0,127
15-20 min (Probe 6)	0,663	0,730	0,314
20-25 min (Probe 7)	0,619	0,282	0,741
25-30 min (Probe 8)	0,094	0,260	0,639
30-35 min (Probe 9)	0,043	0,719	0,074
35-40 min (Probe 10)	0,262	0,582	0,688
40-45 min (Probe 11)	0,748	0,983	0,267
45-50 min (Probe 12)	0,052	0,498	0,319

Abb.53: Die Tabelle gibt die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Wirkung von Methohexital während und nach Ischämie auf die Konzentration von GABA wieder.

Taurin

Zeit nach Ischämie	40 µmol/L Methohexital (n=11)	90 µmol/L Methohexital (n=10)	140 µmol/L Methohexital (n=10)
0-5 min (Probe 3)	0,228	0,722	0,305
5-10 min (Probe 4)	0,223	0,656	0,828
10-15 min (Probe 5)	0,122	0,948	0,186
15-20 min (Probe 6)	0,032	0,339	0,120
20-25 min (Probe 7)	0,021	0,289	0,126
25-30 min (Probe 8)	<0,001	0,399	0,123
30-35 min (Probe 9)	0,002	0,476	0,064
35-40 min (Probe 10)	0,022	0,616	0,090
40-45 min (Probe 11)	0,136	0,767	0,208
45-50 min (Probe 12)	0,565	0,513	0,200

Abb.54: Die Tabelle gibt die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Wirkung von Methohexital während und nach Ischämie auf die Konzentration von Taurin wieder.

Serin

Zeit nach Ischämie	40 µmol/L Methohexital (n=11)	90 µmol/L Methohexital (n=10)	140 µmol/L Methohexital (n=10)
0-5 min (Probe 3)	0,312	0,408	0,280
5-10 min (Probe 4)	0,740	0,520	0,909
10-15 min (Probe 5)	0,997	0,495	0,679
15-20 min (Probe 6)	0,794	0,849	0,410
20-25 min (Probe 7)	0,902	0,887	0,247
25-30 min (Probe 8)	0,514	0,663	0,704
30-35 min (Probe 9)	0,208	0,705	0,701
35-40 min (Probe 10)	0,395	0,406	0,463
40-45 min (Probe 11)	0,241	0,506	0,795
45-50 min (Probe 12)	0,354	0,881	0,911

Abb.55: Die Tabelle gibt die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Wirkung von Methohexital während und nach Ischämie auf die Konzentration von Serin wieder.

Arginin

Zeit nach Ischämie	40 µmol/L Methohexital (n=10)	90 µmol/L Methohexital (n=10)	140 µmol/L Methohexital (n=10)
0-5 min (Probe 3)	0,367	0,262	0,841
5-10 min (Probe 4)	0,785	0,846	0,502
10-15 min (Probe 5)	0,596	0,706	0,038
15-20 min (Probe 6)	0,877	0,825	0,379
20-25 min (Probe 7)	0,133	0,411	0,264
25-30 min (Probe 8)	0,682	0,207	0,090
30-35 min (Probe 9)	0,650	0,234	0,182
35-40 min (Probe 10)	0,461	0,690	0,812
40-45 min (Probe 11)	0,693	0,770	0,139
45-50 min (Probe 12)	0,560	0,663	0,304

Abb.56: Die Tabelle gibt die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Wirkung von Methohexital während und nach Ischämie auf die Konzentration von Arginin wieder.

Alanin

Zeit nach Ischämie	40 µmol/L Methohexital (n=12)	90 µmol/L Methohexital (n=10)	140 µmol/L Methohexital (n=9)
0-5 min (Probe 3)	0,560	0,601	0,444
5-10 min (Probe 4)	0,369	0,267	0,999
10-15 min (Probe 5)	0,486	0,777	0,714
15-20 min (Probe 6)	0,109	0,982	0,545
20-25 min (Probe 7)	0,331	0,744	0,571
25-30 min (Probe 8)	0,192	0,544	0,662
30-35 min (Probe 9)	0,554	0,511	0,341
35-40 min (Probe 10)	0,164	0,406	0,169
40-45 min (Probe 11)	0,006	0,361	0,464
45-50 min (Probe 12)	0,055	0,720	0,441

Abb.57: Die Tabelle gibt die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Wirkung von Methohexital während und nach Ischämie auf die Konzentration von Alanin wieder.

3.2.2.1. Zusammenfassung der Auswirkungen von Methohexital auf die Aminosäure-Konzentrationen bei Ischämie

Bei der Auswertung der Ergebnisse der statistischen Analyse zeigt keine der mittels Mikrodialyse erfassten Aminosäuren über den gesamten Versuchszeitraum nach Ischämiebeginn eine signifikante Auswirkung von Methohexital auf die Konzentration im gesammelten Dialysat. Bei keiner der untersuchten Aminosäure zeigt sich durchgehend bei allen drei Methohexital-Konzentrationen im selben Zeitraum ein signifikanter Einfluss durch die Methohexital-Gabe. Es ergeben sich lediglich in einzelnen Proben signifikante Differenzen zwischen Methohexitalgruppe und Kontrollgruppe. Lediglich Aspartat und Taurin weisen jeweils bei Gabe von 40 µmol/L Methohexital in mehr als 2 Proben im Versuchsverlauf signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe auf.

Bei Aspartat und GABA ist die Zahl der Versuchsergebnisse, die in die statistische Analyse eingehen, begrenzt. Dieses ist durch ihre niedrige Konzentration im Dialysat begründet. Die Folge ist, dass durch Abzug der gemessenen Verunreinigungen in der Dialyseflüssigkeit die Konzentrationen teilweise negative Werte erhalten. Somit lässt sich nur etwa die Hälfte der Versuche für die Auswertung von GABA und Aspartat hinzuziehen. Die Folge ist eine eingeschränkte Aussagekraft der ermittelten Ergebnisse bei diesen beiden Aminosäuren.

4 Diskussion

4.1. Diskussion der Methodik

Zunächst sollen die eingesetzten Methoden kritisch betrachtet und ihre Grenzen aufgezeigt werden. Als erstes wird das Ischämie-Modell unter die Lupe genommen und die Gründe für die Auswahl des *in vitro*-Modells erläutert. Danach werden der Einsatz der Mikrodialyse und die Beschränkungen dieser Methode diskutiert. Als letzter Punkt werden die Probleme der statistischen Auswertung aufgezeigt, bevor die Diskussion sich den Ergebnissen der Untersuchung zuwendet.

4.1.1. In vitro-Schnittmodell des Hippocampus

Obwohl viele Studien zum Thema der Neuroprotektion an Tiermodellen *in vivo* durchgeführt werden, haben wir uns für das *in vitro*-Modell mit Hippocampusschnitten entschieden. Die Hippocampusschnitte sind aufgrund ihrer Struktur für die Präparation gut geeignet und elektrophysiologischen Messungen gut zugänglich^{58,135}. Obwohl sich der Metabolismus der Hippocampusschnitte von den Verhältnissen *in vivo* unterscheidet, zeigen sich dennoch bei beiden vergleichbare Auswirkungen auf ischämische Bedingungen¹⁶⁹. Dabei erlauben die *in vitro*-Untersuchungen die Versuchsdurchführung unter standardisierten und wiederholbaren Bedingungen. Somit ist es möglich, bekannte Einflussgrößen zu definieren und dann zu kontrollieren, so dass ihr Einfluss auf die Messergebnisse konstant ist⁷². Insbesondere entfällt durch die Arbeit an den Schnittpräparaten das vaskuläre System als Einflussfaktor auf den Metabolismus. *In vivo* kommt es durch die Ischämie zu Veränderungen des Gefäßsystems³⁰, die Einfluss auf den Hirnmetabolismus haben. Ebenfalls ist zu berücksichtigen, dass die potentiell neuroprotektiven Substanzen, die untersucht werden sollen, auch Wirkungen auf die Gefäße ausüben. Diese Wirkungen auf das vaskuläre System sind bei den Barbituraten gegeben. Sie führen zu einer Vasokonstriktion und zu Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke. Da diese vaskuläre Komponente der neuroprotektiven Wirkung der Barbiturate bereits untersucht wurde^{16,34,36,148}, soll sie

durch die Verwendung der Hirnschnitte ausgeblendet werden. Dadurch kann isoliert die Auswirkung von Methohexital auf den Metabolismus der Nervenzellen und den extrazellulären Raum während Ischämie untersucht werden. Weiterhin ist durch die Verwendung von Hippocampusschnitten die Möglichkeit gegeben, das Hirngewebe derselben Ratte sowohl für einen Versuch mit Methohexital als auch für einen entsprechenden Kontrollversuch zu verwenden. Durch diese Versuchspaarung lässt sich der Einfluss reduzieren, den die interindividuellen Unterschiede der verwendeten Versuchstiere auf die Ergebnisse haben. Während bei in vivo Versuchen ein Versuchstier entweder der Kontroll- oder der Medikamentengruppe zugeordnet wird, können wir also bei in vitro-Modellen am Gewebe desselben Versuchstieres sowohl Kontroll- wie auch Medikamentenversuch durchführen. Darüber hinaus ist damit auch ein ökonomischerer Umgang mit den Versuchstieren gegeben.

Es ist aber zu berücksichtigen, dass das in vitro-Modell eine starke Vereinfachung darstellt. Durch Elimination von Einflussgrößen, wie eben das Gefäßsystem bei den Hirnschnitten, werden pathophysiologische Vorgänge, die in vivo Bedeutung haben, ausgeblendet. Weiterhin werden die Auswirkungen des Hirnödems durch das Fehlen des knöchernen Schädels reduziert und die Akkumulation von Stoffwechselprodukten wird durch den kontinuierlichen Fluss des künstlichen Liquors verhindert. Die Folge ist, dass sich die Ergebnisse aus in vitro-Versuchen nicht direkt auf die Situation in vivo und darüber hinaus auf die Wirkung beim Menschen übertragen lassen⁴⁴. Zusätzlich ist der Zeitrahmen der Untersuchung in vitro geringer, weil die Vitalität der Schnittpräparate begrenzt ist, wodurch keine Langzeit-Veränderungen nach Ischämie erfasst werden können. Es wurde gezeigt, dass nach einem ischämischen Ereignis es in vivo mehrere Wochen dauerte bis sich neurologisch und histologisch ein endgültiger Status ergab¹⁶⁰.

Ein weiterer Kritikpunkt ist, dass bei in vitro-Experimenten Parameter als Zielgrößen erfasst werden, die keine Aussage über die klinischen Erfolgskriterien liefern. Dies trifft aber auch auf die meisten bisherigen Experimente mit in vivo-Tiermodellen zu¹⁶¹. Damit eine Aussage über die neuroprotektive Wirksamkeit einer Substanz getroffen werden kann, werden Ergebnisse bezüglich der Morbidität und Mortalität benötigt. Dazu sind in vivo-Untersuchungen notwendig, weil so neurologische Defizite der Versuchstiere und die Mortalität durch die Ischämie erfasst werden können. Da die

vorliegende Untersuchung aber primär den Einfluss von Methohexital auf elektrophysiologische Messgrößen und die Aminosäure-Freisetzung während und kurz nach Ischämie nachweisen will, ist hier das in vitro-Modell gewählt worden. Damit soll das Wissen über die möglichen Wirkmechanismen der Neuroprotektion der Barbiturate erweitert werden. Die Untersuchung hat nicht den Anspruch eine Verbesserung hinsichtlich Morbidität und Mortalität bei Ischämie durch Methohexital zu erfassen. Es sollen zunächst grundlegende Mechanismen einer möglichen neuroprotektiven Wirkung von Methohexital überprüft werden und die Ergebnisse als Grundlage für eventuelle weitere Experimente dienen.

4.1.2. Mikrodialyse zur Erfassung der extrazellulären Aminosäuren

Die Konzentrationen der Aminosäuren werden bei den Experimenten mit Mikrodialyse und darauf folgender Analyse durch HPLC bestimmt. Die Mikrodialyse ist darauf ausgelegt, die Aminosäuren zu erfassen, die sich im extrazellulären Raum befinden. Der extrazelluläre Raum lässt sich im neuronalen Gewebe weiter in ein synaptisches Kompartiment und ein extrasynaptisches Kompartiment unterteilen. Das synaptische Kompartiment entspricht dem synaptischen Spalt, in den die Neurotransmitter freigesetzt werden. Die Mikrodialyse-Sonde erfasst jedoch das extrasynaptische Kompartiment und kann nur indirekt Veränderungen im synaptischen Spalt messen. Bei den Aminosäuren, die auch eine Funktion als Neurotransmitter übernehmen, stellt sich die Frage, in welchem Ausmaß die Freisetzung in das synaptische Kompartiment erfasst werden kann. Die Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt ist dabei nur messbar, wenn es zu einem Übertritt in das extrasynaptische Kompartiment kommt. Die unter physiologischen Bedingungen gemessenen Konzentrationen der Aminosäuren im extrasynaptischen Kompartiment sind nachweislich größtenteils nicht synaptischen Ursprungs. Folglich findet unter physiologischen Bedingungen kein messbarer Übertritt von Aminosäuren, die als Neurotransmitter freigesetzt werden, aus dem synaptischen Spalt statt. Die Ursache liegt in der schnellen Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt und einer eingeschränkten Diffusion in das extrasynaptische Kompartiment. Erst die Freisetzung großer Mengen an Neurotransmittern zeigt sich durch Übertritt in das

extrasynaptische Kompartiment in den Ergebnissen der Mikrodialyse³³. Eine Erhöhung der Aminosäure-Konzentrationen im Dialysat bedeutet aber nicht, dass eine vermehrte Freisetzung als Neurotransmitter an der präsynaptischen Membran vorliegt. Es ist an weitere Mechanismen zu denken, die zu Veränderungen der Aminosäure-Konzentration im extrazellulären Raum führen können. Zum einen sind die Aminosäuren Bestandteile des Stoffwechsels zwischen Nervenzellen und Gliazellen, wie z.B. im Glutamat-Glutamin-Zyklus (Abschnitt 1.3.3.), und Bausteine der Proteinsynthese. Zum anderen kann in bestimmten Situationen eine Blockade oder Umkehrung der Transportfunktion der Trägerproteine, die die Wiederaufnahme der Aminosäuren vermitteln, die extrazellulären Konzentrationen beeinflussen. Weiterhin sind Volumen-abhängige Kanäle bekannt, die auch zum Ausstrom von Aminosäuren in den extrazellulären Raum beitragen (Abschnitt 1.2.3.3.). Während einer Ischämie können alle diese Systeme beeinträchtigt werden und somit Auswirkungen auf die extrazelluläre Konzentration der Aminosäuren haben. Mit der Mikrodialyse ist es aber nicht möglich zu erkennen, welchen Ursprung die extrazellulären Aminosäuren haben. Deshalb kann bei einer Erhöhung der Aminosäure-Neurotransmitter Glutamat, Aspartat und GABA im Dialysat nicht automatisch von einer vermehrten exozytotischen Freisetzung in den synaptischen Spalt während Ischämie ausgegangen werden¹⁵⁵. Zur Erfassung des Ursprungs der extrazellulären Aminosäuren müsste das Versuchsmodell modifiziert werden, indem gegebenenfalls die unterschiedlichen Wege, über die die Aminosäuren in den extrazellulären Raum gelangen, blockiert werden. So ließen sich die Mechanismen eingrenzen, über die die Aminosäuren in unterschiedlichen Situationen in den extrazellulären Raum gelangen. Für die Untersuchung des Einflusses des Barbiturates Methohexital auf die extrazellulären Aminosäure-Konzentrationen ist das vorhandene Modell aber zunächst ausreichend, weil damit Veränderungen des extrazellulären Milieus während einer Ischämie erfasst und deshalb Aussagen über grundsätzliche Auswirkungen von Methohexital auf diesen extrazellulären Raum getroffen werden können.

Ein weiterer Punkt, der bei Verwendung der Mikrodialyse zur Untersuchung des extrazellulären Milieus beachtet werden sollte, ist die Schädigung des Hirngewebes durch das Einführen der Mikrodialyse-Sonde. Es konnte gezeigt werden, dass die Mikrodialyse-Sonde zu einer Traumatisierung des umgebenden Gewebes führt. Es

resultiert ein Ödem mit neuronaler Degeneration sowie axonaler Degeneration. Die weiterhin beschriebene inflammatorische Reaktion mit glialer Fibrosierung im umgebenden Gewebe sollte bei unserem in vitro-Modell mit insgesamt kurzer Versuchsdauer (die Mikrodialyse-Sonde befindet sich weniger als 2 Stunden im Hirnschnitt) keine Rolle spielen ²⁵. Auch die Position der Mikrodialyse-Sonde kann Einfluss auf die Ergebnisse haben, da sich für Glutamat eine lokal variable Freisetzung in den extrazellulären Raum nachweisen ließ ¹⁵⁸. Die Mikrodialyse-Sonde wird bei den Versuchen dicht bei den Elektroden positioniert, um die elektrophysiologischen und biochemischen Messungen in der gleichen Hippocampusregion durchzuführen. Aufgrund von anatomischen Unterschieden zwischen den Hirnschnitten und variablen Elektrodenpositionen lassen sich dabei Differenzen bei der Lage der Mikrodialyse-Sonde jedoch nicht vermeiden. Damit dieser Einfluss auf die Messergebnisse möglichst gering gehalten wird, erfolgt eine Normierung der Messwerte der Aminosäurekonzentrationen. Diese werden in Relation zu den präischämischen Werten gesetzt und somit die relativen Veränderungen bei den Aminosäurekonzentrationen erfasst, wodurch dem Einfluss der Sondenposition auf die absoluten Messwerte entgegen gewirkt wird.

4.1.3. Statistische Auswertung

Bei der Versuchsplanung ergab sich das Problem, dass in Voruntersuchungen deutliche interindividuelle Unterschiede bei den Präparaten unterschiedlicher Versuchstiere gefunden wurden. Dieses könnte zum einen durch Unterschiede bei der Ischämietoleranz der Versuchstiere verursacht sein. Zum anderen ist aber auch an äußere Faktoren, wie die Präparation der Hirnschnitte, das Einbringen der Messvorrichtungen in die Schnitte und klimatische Unterschiede, zu denken. Obwohl diese äußeren Faktoren durch standardisierte Versuchsdurchführung minimiert werden, ist es nicht möglich, sie gänzlich zu eliminieren. Damit die interindividuellen Differenzen bei der Ischämietoleranz nicht in die Versuchsergebnisse einfließen, wurden die Versuche so geplant, dass die Hippocampusschnitte derselben Ratte sowohl für den Kontrollversuch als auch für den Medikamentenversuch verwendet wurden. Es

wurden Hirnschnitte verwendet, die in situ nahe beieinander lagen, wodurch in beiden Versuchen die Präparate möglichst gleiche Voraussetzungen hatten. Durch diese Versuchsdurchführung ergeben sich gepaarte Versuchsdaten, bei denen jedem Versuch eine entsprechende Kontrolle zugeordnet werden kann. Diese gepaarten Versuche gehen nur zusammen in die Ergebnisse ein. Erfüllt einer der beiden Versuche nicht die Einschlusskriterien hinsichtlich der evozierten Potentiale oder sind die Versuchsdaten aus messtechnischen Gründen nicht verwertbar, so werden die Resultate beider Versuche ausgeschlossen. Für die statistische Auswertung kann also von zwei abhängigen Stichproben mit gleichem Stichprobenumfang ausgegangen werden. Dies erlaubt die Verwendung des gepaarten t-Tests zur Prüfung auf statistische Signifikanz der Wirkung von Methohexital bei den gegebenen Versuchsbedingungen. Als Kritikpunkt an der Verwendung des gepaarten t-Tests kann jedoch angeführt werden, dass Kontroll- und Methohexitalversuch nicht an demselben Präparat, sondern an zwei verschiedenen Hippocampusschnitten durchgeführt wurden. Diese Betrachtung würde zu dem Schluss führen, dass die Stichproben nicht abhängig sind und die Verwendung des gepaarten t-Tests nicht zulässig wäre. Der gepaarte t-Test wird in diesem Fall dennoch als zulässig angesehen, weil davon ausgegangen wird, dass die Präparate nahezu identisch sind, wenn sie von demselben Versuchstier und aus der gleichen Hippocampusregion entnommen wurden. Der Wahl des statistischen Verfahrens erfolgt unter der Voraussetzung, dass benachbarte Hirnschnitte derselben Ratte als Einheit anzusehen sind und somit die beiden Stichproben abhängig sind.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Bei der Analyse der Versuchsergebnisse werden zunächst die Auswirkungen der Ischämie-Simulation auf die erhobenen Messwerte ausgewertet. Danach sollen die Effekte der Methohexital-Gabe auf die elektrophysiologischen Messungen und die extrazellulären Aminosäure-Konzentrationen während Ischämie beurteilt werden.

4.2.1. Veränderungen der elektrophysiologischen Messwerte durch Ischämie

Durch die Ischämie-Simulation kommt es zu messbaren Veränderungen der elektrophysiologischen Messwerte im Hirnschnittmodell. Bei der bioelektrischen Messung wird durch die Ischämie die Auslösung von evozierten Potentialen eingestellt. Während der Dauer der Ischämie-Simulation bleibt dieser Zustand bestehen und ist dann nach Wiederherstellung einer regelrechten Sauerstoff- und Glukoseversorgung teilweise reversibel. Diese Erholung der Amplitude der evozierten Potentiale, auch als Recovery bezeichnet, liegt bei den Versuchen ohne Methohexital-Gabe bei einem Mittelwert von 32,3% der ursprünglich vor Ischämie vorhandenen Amplitude der evozierten Potentiale. Die Amplitude der evozierten Potentiale ist somit am Ende des Versuchs signifikant ($p < 0,001$) reduziert im Vergleich zum präischämischen Zustand. In anderen Veröffentlichungen wurde ebenfalls eine reduzierte Recovery der evozierten Potentiale nach Ischämie festgestellt ^{48,101,103}. Dabei zeigte sich auch eine Abhängigkeit der Recovery der evozierten Potentiale von der Dauer der anoxischen Depolarisation. Bereits ab einer Dauer der anoxischen Depolarisation von 1 Minute konnte eine signifikant reduzierte Recovery in Hippocampuschnitten von Ratten nachgewiesen werden ^{103,114}. Es darf davon ausgegangen werden, dass durch die gewählten Versuchsbedingungen mit einer Depolarisationsdauer von 3 Minuten eine signifikante funktionelle Schädigung des Gewebes bewirkt wird.

Beim DC-Potential zeigt sich während der Ischämie eine Reaktion in Form der anoxischen Terminalnegativierung, die jedoch nach Ende der Ischämie-Simulation vollständig reversibel ist. Die anoxische Terminalnegativierung tritt mit einer Verzögerung von wenigen Minuten nach dem Einsetzen der Ischämie ein und ist

bedingt durch den Zusammenbruch des Ionen-Gleichgewichts⁵⁴(s.o.). Obwohl das DC-Potential nach Wiederherstellung der physiologischen Bedingungen das ursprüngliche Niveau erreicht, kann bereits ein irreversibler Schaden eingetreten sein. Mit Auftreten der anoxischen terminalen Negativierung beginnen die Prozesse, die zur irreversiblen Schädigung der Nervenzellen führen^{4,103}. Aus dem Verlauf des DC-Potentials nach Beendigung der Ischämie lassen sich folglich noch keine Rückschlüsse auf die Schwere des Nervenzellschadens im Hippocampuschnitt ziehen. Jedoch lassen sich über die Latenzzeit bis zum Eintreten der anoxischen Terminalnegativierung nach Beginn der Ischämie Hinweise über die Ischämietoleranz des Gewebes gewinnen. Dabei ist ein neuroprotektiver Einfluss von Medikamenten über eine Erhöhung der Ischämietoleranz und indirekt über eine Verlängerung der Latenzzeit bis zur anoxischen Terminalnegativierung denkbar.

4.2.2. Einfluss der Ischämie auf die extrazellulären Aminosäure-Konzentrationen

Während der Versuche werden die Aminosäure-Konzentrationen mit einer zeitlichen Auflösung von 5 Minuten erfasst, damit die Veränderungen während und nach Ischämie beurteilt werden können. Dabei zeigen sich bei einigen Aminosäuren signifikante Auswirkungen der Ischämie-Simulation auf die extrazellulären Konzentrationen, die mit der Mikrodialyse bestimmt werden.

4.2.2.1. Glutamat und Aspartat

Glutamat und Aspartat, die beide exzitatorische Neurotransmitter sind, weisen vergleichbare Veränderungen während der Versuche auf. Ihre Konzentrationen steigen während Ischämie zunächst leicht an, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den präischämischen Konzentrationen zu erreichen. Glutamat erreicht 104,5% (n=32) und Aspartat 173,5% (n=20) der Ausgangskonzentration. Mit dem Ende der Ischämie fallen die Konzentrationen wieder auf das ursprüngliche Niveau, wobei sich für die Aminosäure Aspartat das Problem ergibt, dass bei einem Teil der Versuche

die Konzentrationen zu niedrig sind, um sinnvoll ausgewertet werden zu können. Dieses erklärt die Differenzen bei der Anzahl der Ergebnisse, die in die Auswertung der Aminosäuren Glutamat und Aspartat eingehen.

Vorhergehende Veröffentlichungen konnten im Gegensatz zu unseren Ergebnissen einen signifikanten Anstieg von Glutamat und Aspartat während der Ischämie zeigen. Diese Versuche verwendeten ebenfalls das Hirngewebe von Ratten und wurden sowohl an in vivo-Modellen ^{2,8,66,159}, als auch an in vitro-Modellen ^{19,175} durchgeführt. Aufgrund dieser Resultate ist die Meinung weit verbreitet, dass eine erhöhte Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren in den Extrazellulärraum während der Ischämie einen wichtigen Schritt bei der Entstehung des neuronalen Zellschadens darstellt (siehe Abschnitt 1.2.3.3). Bei den erwähnten Experimenten kam es ebenfalls nach Ende der Ischämie zu einem Abfall der Konzentration von Glutamat und Aspartat auf das präischämische Niveau. Dies deutet darauf hin, dass für die Entstehung eines Zellschadens durch die Ischämie nicht die persistierende Erhöhung der exzitatorischen Aminosäuren benötigt wird ¹⁵⁹. Vielmehr gibt es Hinweise darauf, dass der neuropathologische Schaden signifikant mit der Höhe des extrazellulären Anstiegs der exzitatorischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat während der Ischämie korreliert ^{21,80}. Diese Beobachtung wird dadurch gestützt, dass bei längerer Ischämiedauer der Anstieg von Glutamat und Aspartat stärker ist ⁶. Dennoch führte die Ischämie-Simulation in unseren Versuchen auch ohne einen signifikanten Anstieg der exzitatorischen Aminosäuren im Extrazellulärraum zu einer signifikanten Reduktion der evozierten Potentiale in der postischämischen Phase. Somit zeigte sich kein signifikanter Anstieg der exzitatorischen Aminosäuren, bei dennoch vorhandenem signifikantem funktionellem Schaden im Hippocampus-Schnitt nach der Ischämie. Trotz dieser Ergebnisse lässt sich aber nicht eine exzitotoxische Wirkung von Glutamat als Ursache für die Schädigung während Ischämie ausschließen. Mit der Mikrodialyse werden nämlich die Konzentrationen im extrazellulären Raum gemessen, die nicht direkt den Konzentrationen im synaptischen Spalt entsprechen (siehe Abschnitt 4.1.3.). Es ist davon aus zu gehen, dass ein Ungleichgewicht zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Transmittern an der Entstehung des ischämischen Hirnschadens beteiligt ist. Der „exzitotoxische Index“ als Wert für das Verhältnis zwischen exzitatorischen

und inhibitorischen Aminosäuren war während Ischämie in vulnerablen Hirnregionen signifikant erhöht ⁴⁵.

Weiterhin konnte in unseren Versuchen ein sekundärer Anstieg von Glutamat und Aspartat beobachtet werden, so dass die maximalen Konzentrationen dieser Aminosäuren am Ende des Versuches erreicht wurden. Glutamat erreichte 106,8% (n=32) und Aspartat 176,3% (n=20) der Ausgangskonzentrationen zum Ende der Versuche. Es ließ sich dennoch kein signifikanter Unterschied dieser sekundären Erhöhung im Bezug auf die präischämischen Werte nachweisen. Eine signifikante sekundäre Erhöhung von Glutamat und Aspartat wurde jedoch in anderen Studien in der Reperfusionphase beobachtet ^{2,78,152}. Bei diesen Versuchen wurde ein in vivo-Modell verwendet, bei dem die Ischämie durch die Okklusion von hirnversorgenden Gefäßen induziert wurde. Diese sekundäre Erhöhung zeigte sich dabei erst bei längeren Ischämiezeiten von 2 Stunden bei Hasen ⁷⁸ bzw. 4 Stunden bei Katzen ¹⁵² mit einer entsprechend stärkeren Infarzierung des Hirngewebes aber auch bei Messung in besonders vulnerablen Hirnregion wie CA1 des Hippocampus ². In Versuchen mit kürzerer Ischämiezeit wurde keine sekundäre Elevation der exzitatorischen Aminosäuren beobachtet ¹⁵⁹. Der erneute Anstieg der exzitatorischen Aminosäuren wird als Folge der Veränderungen durch die Ischämie in Kombination mit den Auswirkungen der Reperfusion angesehen. Es kommt dadurch zu einem Fortschreiten des Zelluntergangs der Neurone ^{91,151}. Die Interpretation des sekundären Anstiegs der exzitatorischen Aminosäuren als Zeichen für eine fortschreitende Schädigung der Hippocampus-Schnitte durch die Ischämie-Simulation in unseren Versuchen ist aber nicht zulässig. Die von uns durchgeführten Versuche waren darauf ausgelegt kurzfristige Veränderungen während Ischämie zu erfassen und nicht Auswirkungen die in einem längeren Zeitraum nach Ischämie auftreten. Deshalb ist durch die begrenzte Versuchslänge keine Bewertung der weitergehenden postischämischen Phase möglich. Außerdem war der Anstieg nicht signifikant im Bezug auf die präischämischen Werte, weshalb keine endgültige Bewertung dieser Beobachtung erfolgen kann. Dies wäre die Aufgabe entsprechend geplanter Versuchsreihen. Bezieht man diese Ergebnisse auf den klinischen Einsatz der Mikrodialyse zur Detektion eines Glutamat-Anstiegs als Zeichen einer zerebralen Gefährdung, ist damit zu rechnen, dass ein messbarer Anstieg der exzitatorischen Aminosäuren wenn überhaupt erst verspätet gemessen werden kann.

Aus den in der Literatur erwähnten Resultaten können die Rückschlüsse gezogen werden, dass die isolierte Bewertung der extrazellulären Konzentrationen der exzitatorischen Aminosäuren nicht ausreicht, um Aussagen hinsichtlich einer potentiellen Schädigung der Nervenzellen zu treffen. Dazu sind weitere Messwerte notwendig, wie z.B. die Konzentrationen inhibitorischer Aminosäuren, die in Kombination mit den exzitatorischen Aminosäuren eine bessere Korrelation zu einer neurologischen Schädigung zeigen können ^{45,127}. Damit eine solche differenziertere Bewertung möglich ist, wurden die extrazellulären Konzentrationen weiterer Aminosäuren gemessen. Zu diesen gehörten GABA, Taurin, Glutamin, Alanin, Arginin und Serin.

4.2.2.2. GABA

Die Konzentration von GABA steigt nach Beginn der Ischämie auf 401,7% (n=22) des Ausgangswertes an, ohne dabei eine signifikante Differenz zu den präischämischen Werten zu erreichen. Nach der Beendigung der Ischämie-Simulation fällt GABA zügig bis unter das präischämische Niveau. Diese Reaktionen von GABA auf die kurzzeitige Ischämie passen tendenziell zu den Ergebnissen anderer Studien, die einen signifikanten Anstieg von GABA während Ischämie und eine schnelle postischämische Reduktion nachgewiesen haben ^{2,19,62,159}. Obwohl der GABA-Anstieg in unseren Versuchen kein signifikantes Niveau erreicht, ist also davon auszugehen, dass es sich dabei nicht um ein zufälliges Ereignis handelt. Am Versuchsende ist die GABA-Konzentration mit 68,2% (n=22) der präischämischen Konzentration signifikant reduziert im Vergleich zu den Werten vor Ischämie. Allerdings muss erwähnt werden, dass die Erfassung der GABA-Konzentrationen durch die insgesamt sehr niedrigen Konzentrationen im Dialysat erschwert war. Deshalb ergaben sich nur bei einem Teil der Versuche (22 von 35) Resultate, die die Verwendung bei der Auswertung erlaubten. Probleme bei der Messung der GABA-Konzentrationen zeigten sich auch schon bei anderen Untersuchungen ⁸, während die Ergebnisse weiterer Studien sehr niedrige basale GABA-Konzentrationen bei der Messung mit der Mikrodialyse ergaben ^{2,159}. Diese

Erkenntnisse haben auch zur Folge, dass der signifikante Abfall der GABA-Konzentration nach der Ischämie mit Vorsicht bewertet werden muss.

Der Anstieg der GABA-Konzentration führt zur Aktivierung von postsynaptischen aber auch präsynaptischen GABA-Rezeptoren in Hippocampus-Neuronen ⁴⁰. Eine Aktivierung der GABA-Rezeptoren soll zur Reduktion des ischämischen Schadens am neuronalen Gewebe beitragen: Neben der Wirkung über GABA_A-Rezeptoren ergibt sich auch bei Aktivierung der GABA_B-Rezeptoren ein neuroprotektiver Effekt, wobei der größte Teil der Veröffentlichungen sich auf die GABA_A-Rezeptoren konzentriert ^{29,77,132}. Darüber hinaus ergaben Studien mit verschiedenen Medikamenten, die einen positiven Einfluss auf die GABA-vermittelte Neurotransmission haben, im Tierversuch eine neuroprotektive Wirkung ¹³². Die Aktivierung der inhibitorischen Neurotransmission über die GABA-Rezeptoren hat demnach einen neuroprotektiven Effekt während der Ischämie und reduziert den Schaden der Nervenzellen, der durch die Ischämie entsteht.

Auf neuronaler Ebene stimuliert der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat die Freisetzung von GABA ¹⁰⁷ und GABA hemmt die Freisetzung der exzitatorischen Aminosäuren über präsynaptische Rezeptoren ¹⁰⁹. Diese Mechanismen können als Instrumente zur Erhaltung des Gleichgewichtes zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmittern verstanden werden. Demnach ist es denkbar, dass der GABA-Anstieg während der Ischämie durch eine übermäßige Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter induziert wird. Dabei sollte aber beachtet werden, dass in unseren Untersuchungen weder ein signifikanter Anstieg der inhibitorischen noch der exzitatorischen Neurotransmitter beobachtet werden konnte. Jedoch weißt die bereits angeführte Literatur auf eine signifikante Freisetzung sowohl der exzitatorischen als auch der inhibitorischen Neurotransmitter während Ischämie hin. Die Bedeutung dieses Gleichgewichts wird dadurch hervorgehoben, dass Veränderungen des Verhältnisses von exzitatorischen zu inhibitorischen Neurotransmittern in den Bereichen auftreten, bei denen eine vermehrte Vulnerabilität der Nervenzellen unter ischämischen Bedingungen vorhanden ist ⁴⁵.

Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass trotz der erhöhten extrazellulären GABA-Konzentration während Ischämie eine entsprechende Erhöhung der GABA-vermittelten Neurotransmission ausbleibt. In den selektiv vulnerablen Regionen kommt es sogar zu

einer Reduktion der GABA-vermittelten Neurotransmission⁸⁷. Zum einen induziert der GABA-Anstieg eine Reduktion der GABA-Rezeptoren-Dichte und zum anderen verschiebt sich das Cl⁻-Gleichgewicht durch die Ionenströme während der Ischämie und damit die Wirkung bei Aktivierung des GABA_A-Rezeptors¹³². Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Rolle des GABA während der Hirnischämie noch nicht ausreichend aufgeklärt ist und die fehlende Signifikanz unserer Ergebnisse hinsichtlich der Veränderungen der GABA-Konzentration während der Ischämie keine weitergehenden Aussagen erlaubt.

4.2.2.3. Taurin

Eine weitere Aminosäure, der eine neuroprotektive Wirkung bescheinigt wird, ist das Taurin^{122,130}. Die Taurin-Konzentration steigt während Ischämie signifikant an, wobei jedoch die maximale Konzentration im Zeitraum von 5 bis 10 Minuten nach Beginn der Ischämie erreicht wird. Damit zeigt sich ein verzögerter Anstieg im Vergleich zu den Aminosäuren, die als Neurotransmitter eingesetzt werden. Das Maximum der Taurin-Konzentration beträgt im Mittel 476,5% (n=32) der präischämischen Konzentration und sinkt unter physiologischen Bedingungen dann wieder auf das präischämische Niveau. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten anderer veröffentlichter Untersuchungen überein. Diese Studien zeigten sowohl in vivo als auch in vitro während zerebraler Ischämie bei der Ratte einen signifikanten Anstieg der gemessenen Taurin-Konzentration^{2,19,21,56,159}. Nach Ende der Ischämie sanken die Taurin-Konzentrationen wieder, wobei sich bei einem Versuch, der eine hohe zeitliche Auflösung des Konzentrationsverlaufs aufwies, ein verzögerter Abfall der Taurin-Konzentration im Vergleich zu den Neurotransmittern Glutamat, Aspartat und GABA zeigte¹⁵⁹. Auch in unseren Versuchen erfolgte die Reduktion der extrazellulären Taurin-Konzentration ebenso wie der Anstieg verzögert, wenn man den Verlauf mit dem der als Neurotransmitter dienenden Aminosäuren vergleicht. Bei den in vivo Versuchen, in denen keine Reperfusion erfolgte, sank die Taurin-Konzentration nach Erreichen eines Maximums auch, jedoch erreichte sie nicht das präischämische Niveau und blieb weiterhin auf einem signifikant erhöhten Niveau^{21,56}. Diese Ergebnisse führen zu dem

Schluss, dass als Reaktion auf die zerebrale Ischämie und ihre Folgen vermehrt Taurin in den extrazellulären Raum gelangt und dort solange signifikant erhöht bleibt bis die Ischämie beendet wird und danach wieder auf das ursprüngliche Niveau zurückkehrt.

Auf molekularer Ebene führt die Aktivierung des NMDA-Rezeptors, über den die exzitotoxische Wirkung von Glutamat vermittelt wird, zur Taurin-Freisetzung ^{121,126}.

Darüber hinaus sollen die extrazellulär erhöhten Taurin-Konzentrationen dazu beitragen, den Anstieg der extrazellulären Glutamat-Konzentration während der Ischämie zu begrenzen ¹²⁷.

Bereits im Abschnitt 1.3.4. sind die vielfältigen Aufgaben von Taurin im Zentralen Nervensystem beschrieben. Im Zusammenhang mit der zerebralen Ischämie sind insbesondere die Aufgaben bei der Osmoregulation und die Wirkungen auf die Neurotransmission von Bedeutung ⁹⁴. Durch seine Verteilung im intrazellulären und extrazellulären Raum beeinflusst Taurin das Zellvolumen in vielen Zellen des Körpers, u.a. den Zellen im Zentralen Nervensystem. Kommt es während Ischämie zum Zellödem, wirkt die Freisetzung von Taurin dem entgegen und soll so die Folgen der Zellschwellung abschwächen. Über die Regulation des Zellvolumens hat Taurin indirekt auch Einfluss auf weitere zelluläre Prozesse, wie u.a. das Ionen-Gleichgewicht ^{61,125}. Weiterhin wirkt Taurin auch auf die Neurotransmission, indem es eine inhibitorische Funktion als Neuromodulator übernimmt ¹²².

Insgesamt kann nach dem jetzigen Stand der Forschung von einer neuroprotektiven Funktion des Taurins ausgegangen werden, wobei die signifikante Freisetzung des Taurins während der Ischämie jedoch nicht einen signifikanten funktionellen Hirnschaden in unseren Versuchen vermeiden konnte. Darüber hinaus konnte bei unseren Versuchen kein Zusammenhang zwischen einem stärkeren Anstieg der extrazellulären Taurin-Konzentration während der Ischämie und einer Reduktion des funktionellen Hirnschadens nachgewiesen werden.

Die zeitliche Verzögerung der Taurin-Freisetzung deutet darauf hin, dass Taurin als Reaktion auf die Veränderungen während der Ischämie in den extrazellulären Raum gelangt. Die detaillierte Aufklärung der Wechselwirkungen zwischen Hirnischämie und extrazellulärem Taurin erfordert aber noch weitergehende Untersuchungen.

4.2.2.4. Glutamin

Die Aminosäure Glutamin ist dagegen die einzige gemessene Aminosäure, bei der es während Ischämie zu einem signifikanten Absinken der extrazellulären Konzentrationen kommt. Auch in der postischämischen Phase bleibt die Glutamin-Konzentration signifikant reduziert. Dieser Verlauf stimmt mit den bisherigen Ergebnissen überein, die ebenfalls eine signifikante Reduktion der extrazellulären Konzentration von Glutamin zeigten^{19,159}.

Glutamin hat im Nervengewebe eine wichtige Funktion als Bestandteil des Metabolismus zwischen Astrozyten und Nervenzellen. In Abschnitt 1.3.3. sind die Stoffwechselforgänge in diesem Zyklus bereits beschrieben. Daraus ergeben sich während Ischämie zwei Möglichkeiten, über die eine Reduktion der extrazellulären Glutamin-Konzentration entsteht. Zum einen sinkt der Metabolismus in den Astrozyten und somit die Produktion von Glutamin, zum anderen wird vermehrt Glutamin als Präkursor für die Produktion von Glutamat und GABA verwendet, da diese während Ischämie in großen Mengen freigesetzt werden. Die Verringerung des Metabolismus in den Astrozyten wird in den am schwersten betroffenen Bereichen und bei länger dauernder Ischämie beobachtet. In Bereichen mit eingeschränkter Durchblutung dient Glutamin als Präkursor für die Glutamat-Synthese und unterstützt so die exzitotoxische Schädigung des Nervengewebes⁵². Weiterhin soll Glutamin unter ischämischen Bedingungen auch als Substrat zur Energieproduktion dienen^{100,105}. Aus dem Absinken der Glutamin-Konzentration in unseren Versuchen lässt sich aber nicht schließen, ob die Glutamin-Freisetzung aus den Astrozyten vermindert oder die Glutamin-Aufnahme in die Neurone gesteigert ist.

4.2.2.5. Serin, Arginin und Alanin

Die übrigen Aminosäuren, die in unseren Versuchen erfasst wurden, sind Serin, Arginin und Alanin. Bei diesen drei Aminosäuren kommt es während Ischämie zu einem signifikanten Anstieg der Konzentrationen im extrazellulären Raum. Nach Beendigung der Ischämie sinken die Konzentrationen dann bis zum Versuchsende bis unter das

präischämische Niveau. Diese Charakteristik im Konzentrationsverlauf dieser Aminosäuren wurde in vorhergehenden Untersuchungen ebenfalls beobachtet ^{2,19,21,159}. Bei Serin, Arginin und Alanin sind jedoch keine Funktionen im Zentralen Nervensystem bekannt, die im Zusammenhang mit zerebraler Ischämie stehen. Es kommt während der Ischämie also auch zu einer unspezifischen Freisetzung von Aminosäuren in den extrazellulären Raum, die keine bekannten Auswirkungen auf die Prozesse der zerebralen Ischämie haben. Es ist aber denkbar, dass in weitergehenden Untersuchungen bestimmte Funktionen dieser Aminosäuren im Zusammenhang mit zerebraler Ischämie entdeckt werden.

4.2.3. Auswirkungen von Methohexital auf die Hippocampuschnitte

Barbiturate zeigen bereits vor Beginn der Ischämie-Simulation Auswirkungen auf die elektrophysiologischen Messungen. Die Amplitude der evozierten Potentiale steigt im Versuchsverlauf stets signifikant an. Dabei zeigt sich die Tendenz, dass bei steigenden Methohexital-Konzentrationen der Anstieg der Amplitude der evozierten Potentiale geringer ausfällt (siehe Abschnitt 3.2.1.2.). In Abbildung 18 wird deutlich, dass trotz des absoluten Anstiegs der evozierten Potentiale Methohexital in Relation zu den Kontrollversuchen eine inhibitorische Wirkung auf die evozierten Potentiale ausübt. Diese inhibitorische Wirkung wird über die Beeinflussung der synaptischen Transmission vermittelt. Barbiturate verstärken die Wirkung des inhibitorischen Neurotransmitters GABA ¹⁶³. Dieser Wirkmechanismus würde den Schluss zulassen, dass Barbiturate ausschließlich eine hemmende Wirkung auf die evozierten Potentiale haben. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass bei niedrigen Barbiturat-Konzentrationen (0,04-0,1 mmol/l Pentobarbital) die Amplitude der evozierten Potentiale anstieg, während höhere Konzentrationen (0,2-1,0 mmol/l Pentobarbital) eine Reduktion der Amplitude verursachten ¹¹⁶. Als Erklärung für diese Beobachtung wird eine Hemmung inhibitorischer Neurone bei niedrigen Konzentrationen angenommen, während bei höheren Barbiturat-Konzentrationen auch die exzitatorische Neurotransmission blockiert wird. Die tatsächliche Begründung ist wohl komplexer. Darauf weist die Persistenz der Amplitudenerhöhung der evozierten Potentiale nach

dem Auswaschen niedriger Barbiturat-Konzentrationen hin, während bei höheren Konzentrationen die Depression der evozierten Potentiale nach Beendigung der Barbiturat-Gabe wieder reversibel ist.^{3,156} Die Auswertung unserer Versuchsergebnisse führt zu dem Schluss, dass alle verwendeten Methohexital-Konzentrationen in dem Bereich liegen, in dem die hemmende Wirkung der Barbiturate auf die Neurotransmission überwiegt.

Die Auswirkungen von Methohexital auf die präischämischen Aminosäure-Konzentrationen im extrazellulären Raum wurden in unserer Untersuchung nicht erfasst. In anderen Untersuchungen wurde aber kein Einfluss von Barbituraten auf die Konzentration von extrazellulären Aminosäuren beobachtet¹¹⁹.

4.2.4. Wirkung von Methohexital bei Ischämie

Die Wirkungen von Barbituraten auf die zerebrale Schädigung unter ischämischen Bedingungen wurden bereits in zahlreichen Veröffentlichungen dargestellt. Diese Untersuchungen fanden jedoch unter verschiedensten Bedingungen statt. Es wurden in vivo- und in vitro-Modelle sowie unterschiedliche Tierspezies als Versuchsobjekt genutzt. Es kamen verschiedene Barbiturate (Methohexital, Thiopental, Pentobarbital, Phenobarbital) zum Einsatz, und es gab Differenzen bei Zeitpunkt, Dauer und Konzentration der Barbituratgabe. Weiterhin wurde der Erfolg der Barbiturate anhand unterschiedlicher Kriterien festgestellt. Außerdem variierte der Zeitpunkt, an dem die zerebrale Schädigung untersucht wurde. Folglich sind die Untersuchungen zur neuroprotektiven Wirkung der Barbiturate sehr heterogen. Deshalb konzentriert sich die Diskussion unserer Ergebnisse zunächst auf den Vergleich mit Studien mit ähnlichem Versuchsmodell, also auf in vitro-Untersuchungen an Hippocampusschnitten der Ratte. In den veröffentlichten Arbeiten mit diesem Modell wurden sowohl hypoxische^{65,123,165} als auch ischämische^{22,112,177} Bedingungen simuliert. Bei den Versuchen mit hypoxischem Stress wurde der Sauerstoff für die Versorgung der Versuchspräparate durch Stickstoff ersetzt, für die Ischämie-Simulation wurde zusätzlich der Glukosegehalt in der Versuchsanordnung reduziert. Die Dauer der Hypoxie in diesen Versuchen reichte von 3 bis 10 Minuten, und die Ischämie erstreckte sich über einen

Zeitraum von 10 bis 15 Minuten. In allen Studien wurde Thiopental als Barbiturat eingesetzt. Die eingesetzten Konzentrationen lagen zwischen 100 $\mu\text{mol/L}$ und 600 $\mu\text{mol/L}$. Die Thiopental-Gabe erfolgte in allen Versuchen bereits vor dem schädigenden Ereignis. In Abhängigkeit von der Konzentration des Thiopentals und der Dauer der Hypoxie zeigten sich signifikante Effekte auf die Erholung der evozierten Potentiale^{65,165} und die Latenzzeit bis zum Einsetzen der Anoxischen Depolarisation¹²³. Auch kam es zu signifikanten Effekten auf das Ionen-Gleichgewicht. Insbesondere der Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration während Hypoxie wurde durch die Gabe von Thiopental signifikant reduziert^{65,165}. Unter ischämischen Bedingungen hatte Thiopental ebenfalls signifikanten Einfluss auf den intrazellulären Kalzium-Anstieg¹⁷⁷. Eine experimentelle Arbeit untersuchte sogar die längerfristigen Auswirkungen von Thiopental auf ischämische Schädigungen. Hierbei war der Zellschaden in den 7 Tagen nach dem ischämischen Ereignis in der Thiopental-Gruppe signifikant geringer als in der Kontroll-Gruppe²². Außerdem reduzierte Thiopental die durch Ischämie induzierte Zellschwellung signifikant¹¹². Die Resultate dieser Arbeiten führen zu dem Schluss, dass Barbiturate in diesem in vitro-Modell der Ratte neuroprotektive Effekte bei hypoxischen und ischämischen Ereignissen haben.

Diese Ergebnisse konnten in unseren Versuchen für Methohexital jedoch nicht bestätigt werden. Obwohl die Dauer der Ischämie-Simulation, die Versuchsbedingungen und die gemessenen elektrophysiologischen Parameter mit den angeführten Studien vergleichbar sind, führte die Barbiturat-Gabe zu keiner Änderung der elektrophysiologischen Parameter, die auf eine neuroprotektive Wirkung hätte schließen lassen. Die Erholung der evozierten Potentiale war bei keiner der verwendeten Methohexital-Konzentrationen signifikant größer als in der entsprechenden Kontroll-Gruppe. Auch die Latenzzeit bis zur anoxischen Depolarisation wurde durch Methohexital nicht verlängert. Die Gabe höherer Methohexital-Konzentration (90 $\mu\text{mol/L}$, 140 $\mu\text{mol/L}$) führte sogar zu einer signifikanten Verkürzung der Latenzzeit als Zeichen einer reduzierten Toleranz gegenüber den ischämischen Bedingungen.

Allerdings kam in unseren Versuchen das Barbiturat Methohexital zum Einsatz, während die angeführten Veröffentlichungen zu diesem Versuchsmodell Thiopental benutzten. Bei Methohexital sind in Versuchen mit anderen Ischämie-Modellen auch neuroprotektive Eigenschaften nachgewiesen worden^{48,74,176}. Darüber hinaus zeigte

eine Arbeit, die die neuroprotektive Wirkung verschiedener Barbiturate miteinander verglich, für Thiopental und Methohexital neuroprotektive Effekte, während Pentobarbital ineffektiv war. Wenn man diese Untersuchung analysiert, erkennt man, dass für eine ähnliche Wirkung die Methohexital-Dosis halb so groß ist wie die Thiopental-Dosis und dass zur Erzeugung der „burst-suppression“ die Methohexital-Dosis größer ist als die Thiopental-Dosis. Daraus ergibt sich, dass Differenzen bei der Wirkweise der beiden Barbiturate vorhanden sein können, weil Methohexital eine andere Dosis-Wirkungs-Beziehung hat als Thiopental²⁶. Geht man nun davon aus, dass in den in vitro-Schnittmodellen des Hippocampus der Ratte Thiopental-Konzentrationen bis 600 µmol/L eingesetzt wurden, scheinen die in unseren Versuchen verwendeten Methohexital-Konzentrationen von 40 bis 140 µmol/L niedrig ausgefallen zu sein. Allerdings reichen diese Konzentrationen aus, um ein „burst-suppression“-EEG zu erzeugen^{48,128,170}. Da davon ausgegangen wird, dass mit Erreichen eines „burst-suppression“-EEG die maximale Wirkung der Barbiturate vorhanden ist, kann also nicht mehr von einer wesentlichen Steigerung der Wirkung durch Erhöhung der Methohexital-Dosis ausgegangen werden. Hinsichtlich der neuroprotektiven Dosis zeigen neuere Untersuchungen, dass für eine maximale neuroprotektive Wirkung der Barbiturate das Erreichen der „burst-suppression“ im EEG nicht notwendig ist (siehe Abschnitt 1.4.1.).

Bei der Untersuchung der extrazellulären Aminosäure-Konzentrationen lässt sich während und nach Ischämie keine signifikante Beeinflussung durch Methohexital-Gabe erkennen. Es lassen sich nur bei vereinzelten Sammelzeiträumen des Dialysats bei einigen Aminosäuren signifikante Unterschiede zwischen Methohexital-Gruppe und Kontroll-Gruppe nachweisen. Diese vereinzelten signifikanten Effekte treten zu unterschiedlichen Zeitpunkten, bei unterschiedlichen Dosierungen und ohne erkennbaren Zusammenhang auf, so dass sie nicht als neuroprotektive Wirkung von Methohexital auf die extrazellulären Aminosäure-Konzentrationen bei Ischämie interpretiert werden können. Unsere Ergebnisse entsprechen somit den wenigen veröffentlichten Arbeiten zur Auswirkung von Barbituraten auf die Aminosäure-Freisetzung bei Ischämie. In einer Studie wurde der Einfluss von Pentobarbital auf Glutamat, Aspartat und GABA bei globaler zerebraler Ischämie untersucht. Pentobarbital wurde dabei in einer Dosis verabreicht, die ein „burst-suppression“-EEG

induzierte. Die Konzentration der exzitatorischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat während Ischämie wurde durch Pentobarbital nicht beeinflusst. Lediglich auf GABA hatte Pentobarbital einen Effekt, indem es den GABA-Anstieg während Ischämie reduzierte.⁸⁸ Auch die Wirkung von Thiopental wurde überprüft. Untersuchungen an Hirnschnitten von Ratten zeigten zwar einen signifikanten Anstieg der meisten Aminosäuren während Ischämie, jedoch konnte die Gabe von Thiopental diesen Anstieg der Aminosäure-Konzentrationen nicht beeinflussen⁷. In beiden Experimenten wurden auch weitere Barbituratwirkungen erfasst. Zum einen wurde die Latenzzeit bis zur anoxischen Depolarisation⁸⁸ und zum anderen die LDH-Freisetzung während der Reoxygenation bestimmt⁷. Beide Male bewirkte das eingesetzte Barbiturat eine signifikante Verbesserung, so dass die Wirksamkeit der verwendeten Barbiturate auf das Hirngewebe nachgewiesen werden konnte. Also konnten die Barbiturate in diesen Versuchen trotz vorhandener Wirkung auf die Versuchspräparate bei Ischämie die extrazelluläre Aminosäure-Konzentration nicht beeinflussen.

Insgesamt führt Methohexital in unserer Untersuchung zu keinem positiven Effekt auf die elektrophysiologischen Messwerte und hat ebenfalls keine Auswirkungen auf die extrazellulären Aminosäure-Konzentrationen während der Ischämie. Allerdings können die Vorkommnisse im synaptischen Spalt mit der Mikrodialyse nicht direkt gemessen werden. In Abschnitt 4.1.2. sind die Einschränkungen dieser Methode hinsichtlich der Erfassung der Konzentrationen im synaptischen Spalt bereits dargelegt. Daher lässt sich mit unseren Resultaten nicht ausschließen, dass Barbiturate die Freisetzung der Aminosäuren in den synaptischen Spalt beeinflussen und auf diesem Wege eine neuroprotektive Wirkung ausüben können.

4.3. Zusammenfassung

Unsere Versuche konnten keine signifikante Wirkung von Methohexital bei Ischämie im Hirnschnittmodell nachweisen. Weder die elektrophysiologischen Parameter noch die Aminosäure-Konzentrationen im Dialysat der Mikrodialyse wurden durch Methohexital signifikant beeinflusst.

Durch die Ischämie-Simulation kam es auch ohne einen signifikanten Glutamat-Anstieg in der Mikrodialyse zu einer signifikanten Schädigung des Hirnschnittes. Damit war zur Erzeugung eines ischämischen Zellschadens kein nachweisbarer Anstieg der exzitatorischen Aminosäuren im extrazellulären Raum nötig. Dies setzt auch ein Fragezeichen hinter den klinischen Nutzen der Glutamat-Mikrodialyse bei der Vorbeugung ischämischer Zustände in der Neurointensivmedizin.

5 Literaturverzeichnis

1. Abramson NS, Safar P, Detre K, Kelsey S, Monroe J, Reinmuth O, Snyder J, Mullie A, Headstrand U, Tammisto T, Lund I, Breivik H, Lind B, Jastremski M
Results of a randomized clinical trial of brain resuscitation with thiopental
(abstract)
Anesthesiology 1983; 59: A101
2. Andine P, Orwar O, Jacobson I, Sandberg M, Hagberg H
Changes in extracellular amino acids and spontaneous neuronal activity during
ischemia and extended reflow in the CA1 of the rat hippocampus
J Neurochem 1991; 57: 222-229
3. Archer DP, Samanani N, Roth SH
Small-dose pentobarbital enhances synaptic transmission in rat hippocampus
Anesth Analg 2000; 91: 1537-1541
4. Asai S, Kunimatsu T, Zhao H, Nagata T, Takahashi Y, Ishii Y, Kohno T,
Ishikawa K
Two distinct components of initial glutamate release synchronized with anoxic
depolarization in rat global brain ischemia
Neuroreport 2000; 11: 2947-2952
5. Astrup J, Siesjö BK, Symon L
Thresholds in cerebral ischemia – the ischemic penumbra
Stroke 1981; 12: 723-725

6. Baker AJ, Zornow MH, Scheller MS, Yaksh TL, Skilling SR, Smullin DH, Larson AA, Kuczenski R
Changes in extracellular concentrations of glutamate, aspartate, glycine, dopamine, serotonin, and dopamine metabolites after transient global ischemia in the rat brain
J Neurochem 1991; 57: 1370-1379
7. Basagan-Mogul E, Büyükuyusal RL, Korfali G
Effects of ketamine and thiopental on ischemia reoxygenation-induced LDH leakage and amino acid release from rat striatal slices
J Neurosurg Anesthesiol 2005; 17: 20-26
8. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH
Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis
J Neurochem 1984; 43: 1369-1374
9. Bickler PE, Buck LT, Feiner JR
Volatile and intravenous anesthetics decrease glutamate release from cortical brain slices during anoxia
Anesthesiology 1995; 83: 1233-1240
10. Bittner S, Win T, Gupta R
 γ -L-glutamyltaurine
Amino Acids 2005; 28: 343-356
11. Bleakman D, Jones MV, Harrison NL
The effects of four general anesthetics on intracellular Ca^{2+} in cultured rat hippocampal neurons
Neuropharmacology 1995; 34: 541-551

- 12.** Block F, Kosinski CM
Glutamatantagonisten in der Neurologie
Nervenarzt 2001; 72: 393-405
- 13.** Block G, Pulsinelli WA
N-Methyl-D-Aspartate receptor antagonists: failure to prevent ischemia-induced selective neuronal damage
In: Raichle M, Powers W (eds) Cerebrovascular Diseases. Fifteenth Princeton Conference, Raven Press, New York, 37-42
- 14.** Bradford HF, Ward HK, Thomas AJ
Glutamine – a major substrate for nerve endings
J Neurochem 1978; 30: 1453-1459
- 15.** Brain Resuscitation Clinical Trial I Study Group
Randomized clinical study of thiopental loading in comatose survivors of cardiac arrest
N Eng J Med 1986; 314: 397-403
- 16.** Branston NM, Hope DT, Symon L
Barbiturates in focal ischemia of primate cortex: effects on blood flow distribution, evoked potentials and extracellular potassium
Stroke 1979; 10: 647-653
- 17.** Bröer S, Brookes N
Transfer of glutamine between astrocytes and neurons
J Neurochem 2001; 77: 705-719
- 18.** Bruno A, Levine SR, Frankel MR, Brott TG, Lin Y, Tilley BC, Lyden PD, Broderick JP, Kwiatkowski TG, Fineberg SE; NINDS rt-PA Stroke Study Group
Admission glucose level and clinical outcomes in the NINDS rt-PA Stroke Trial
Neurology 2002; 59: 669-674

- 19.** Büyükuysal RL
Ischemia and reoxygenation-induced amino acid release and tissue damage in the slices of rat corpus striatum
Amino Acids 2004; 27: 57-67
- 20.** Bures J, Buresova O
Die anoxische Terminaldepolarisation als Indicator der Vulnerabilität der Großhirnrinde bei Anoxie und Ischämie
Pflügers Archiv 1957; 264: 325-334
- 21.** Butcher SP, Bullock R, Graham DI, McCulloch J
Correlation between amino acid release and neuropathologic outcome in rat brain following middle cerebral artery occlusion
Stroke 1990; 21: 1727-1733
- 22.** Cao H, Kass IS, Cottrell JE, Bergold PJ
Pre- or postinsult administration of lidocaine or thiopental attenuates cell death in rat hippocampal slice cultures caused by oxygen-glucose deprivation
Anesth Analg 2005; 101: 1163-1169
- 23.** Caspers H, Speckmann EJ, Lehmenkühler A
DC potentials of the cerebral cortex. Seizure activity and changes in gas pressure
Rev Physiol Biochem Pharmacol 1987; 106: 127-178
- 24.** Choi DW
Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent
Neurosci Lett 1985; 58: 293-297
- 25.** Clapp-Lilly KL, Roberts RC, Duffy LK, Irons KP, Hu Y, Drew KL
An ultrastructural analysis of tissue surrounding a microdialysis probe
J Neurosci Methods 1999; 90: 129-142

- 26.** Cole DJ, Cross LM, Drummond JC, Patel PM, Jacobsen WK
Thiopentone and methohexital, but not pentobarbitone, reduced early focal cerebral ischemic injury in rats
Can J Anesth 2001; 48: 807-814
- 27.** Collins RC, Dobkin BH, Choi DW
Selective vulnerability of the brain: new insights into the pathophysiology of stroke
Ann Int Med 1989; 110: 992-1000
- 28.** Corkill G, Sivalingam S, Reitan JA, Gilroy BA, Helphrey MG
Dose dependency of the post-insult protective effects of pentobarbital in the canine experimental stroke model
Stroke 1978; 9: 10-12
- 29.** Costa C, Leone G, Saulle E, Pisani F, Bernardi G, Calabresi P
Coactivation of GABA_A and GABA_B receptor results in neuroprotection during in vitro ischemia
Stroke 2004; 35: 596-600
- 30.** del Zoppo GJ, Mabuchi T
Cerebral microvessel responses to focal ischemia
J Cereb Blood Flow Metab 2003; 23: 879-894
- 31.** Dingledine R, Borges R, Bowie D, Traynelis SF
The glutamate receptor ion channels
Pharma Rev 1999; 51: 7-61
- 32.** Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA
Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view
Trends Neurosci 1999; 22: 391-397

- 33.** Drew KL, Pehek EA, Rasley BT, Ma YL, Green TK
Sampling glutamate and GABA with microdialysis: suggestions on how to get the dialysis membrane closer to the synapse
J Neurosci Methods 2004; 140: 127-131
- 34.** Feustel PJ, Ingvar MC
Cerebral oxygen availability and blood flow during middle cerebral artery occlusion: effects of pentobarbital
Stroke 1981; 12: 858-863
- 35.** Fischer S, Renz D, Schaper W, Karliczek G
In vitro effects of fentanyl, methohexital and thiopental on brain endothelial permeability
Anesthesiology 1995; 82: 451-458
- 36.** Fischer S, Renz D, Schaper W, Karliczek GF
Effects of barbiturates on hypoxic cultures of brain derived microvascular endothelial cells
Brain Res 1996; 707: 47-53
- 37.** Fiskum G
Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death
J Neurotrauma 2000; 17: 843-855
- 38.** Fleischer J, Tateishi A, Drummond C, Scheller M, Grafe M, Zornow M, Shearman G, Shapiro H
MK-801, an excitatory amino acid antagonist does not improve neurologic outcome following cardiac arrest in cats
J Cereb Blood Flow Metab 1989; 9: 805-811

39. Garthwaite G, Garthwaite J
Neurotoxicity of excitatory amino acid receptor agonists in rat cerebellar slices:
dependence on calcium concentration
Neurosci Lett 1986; 66: 193-198
40. Gaspary HL, Wang W, Richerson GB
Carrier-mediated GABA release activates GABA receptors on hippocampal
neurons
J Neurophysiol 1998; 80: 270-281
41. Gelmers HJ, Krämer G, Hacke W, Hennerici M
Zerebral Ischämie
Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag; 1989
42. Gill R, Foster AC, Woodruff GN
MK-801 is neuroprotective in gerbils when administered during the post-
ischaemic period
Neuroscience 1988; 25: 847-855
43. Gisvold S, Safar P, Hendrickx H, Rao G, Moossy J, Alexander H
Thiopental treatment after global brain ischemia in pigtailed monkeys
Anesthesiology 1984; 60: 88-96
44. Gladstone DJ, Black SE, Hakim AM
Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new
therapeutic directions
Stroke 2002; 33: 2123-2136

- 45.** Globus MY, Busto R, Martinez E, Valdes I, Dietrich WD, Ginsberg MD
Comparative effect of transient global ischemia on extracellular levels of glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid in vulnerable and nonvulnerable brain regions in the rat
J Neurochem 1991; 57: 470-478
- 46.** Goldberg MP, Monyer H, Choi DW
Hypoxic neuronal injury in vitro depends on extracellular glutamine
Neurosci Lett 1988; 94: 52-57
- 47.** Gorji A
Spreading depression: a review of the clinical relevance
Brain Res Rev 2001; 38: 33-60
- 48.** Greiner C, Wölfer J, Wassmann H, Köhling R, Speckmann EJ
Effects of methohexital on bioelectrical reactions in guinea pig hippocampal slices during hypoxia
Neurosci Lett 2002; 329: 227-231
- 49.** Grotta J, Clark W, Coull B, Pettigrew LC, Mackay B, Goldstein LB, Meissner I, Murphy D, LaRue L
Safety and tolerability of the glutamate antagonists CGS 19755 (Selfotel) in patients with acute ischemic stroke: results of a phase IIa randomized trial
Stroke 1995; 26: 602-605
- 50.** Grundersen CB, Umbach JA, Swartz BE
Barbiturates depress currents through human brain calcium channels studied in *Xenopus* oocytes
J Pharmacol Exp Ther 1988; 247: 824-829

- 51.** Gundersen V, Chaudry FA, Bjaalie JG, Fonnum F, Ottersen OP, Storm-Mathisen J
Synaptic vesicular localization and exocytosis of L-aspartate in excitatory nerve terminals: a quantitative immunogold analysis in rat hippocampus
J Neurosci 1998; 18: 6059-6070
- 52.** Haberg A, Qu H, Saether O, Unsgard G, Haraldseth O, Sonnewald U
Differences in neurotransmitter synthesis and intermediary metabolism between glutamatergic and GABAergic neurons during 4 hours of middle cerebral artery occlusion in the rat: the role of astrocytes in neuronal survival
J Cereb Blood Flow Metab 2001; 21: 1451-1463
- 53.** Hall R, Murdoch J
Brain protection: physiological and pharmacological considerations. Part II: the pharmacology of brain protection
Can J Anaesth 1990; 37: 762-777
- 54.** Hansen AJ
Effect of anoxia on ion distribution in the brain
Physiol Rev 1985; 65: 101-148
- 55.** Hartley DM, Choi DW
Delayed rescue of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuronal injury in cortical culture
J Pharmacol Exp Ther 1989; 250: 752-758
- 56.** Hillered L, Hallström S, Segersvärd S, Persson L, Ungerstedt U
Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis
J Cereb Blood Flow Metab 1989; 9: 607-616

- 57.** Himmelseher S, Pfenninger E
Neuroprotektion in der Neuroanästhesie: Ergebnisse einer Umfrage über die gegenwärtige Praxis in Deutschland in 1997
Anaesthesist 2000; 49: 412-419
- 58.** Holopainen IE
Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity
Neurochem Res 2005; 30: 1521-1528
- 59.** Hossmann KA
Metabolic dysfunctions
In: Bähr M (ed) Neuroprotection. Models, mechanisms and therapies; 2004, Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- 60.** Huang Y, McNamara JO
Ischemic stroke: "Acidotoxicity" is a perpetrator
Cell 2004; 118: 665-666
- 61.** Huxtable RJ
The physiological actions of taurine
Physiol Rev 1992; 72: 101-163
- 62.** Inglefield JR, Schwartz-Bloom RD
Optical imaging of hippocampal neurons with a chloride-sensitive dye: early effects of in vitro ischemia
J Neurochem 1998; 70: 2500-2509

- 63.** Kanthan R, Shuaib A, Griebel R, Miyashita H
Intracerebral human microdialysis: in vivo study of an acute focal ischemic model of the human brain
Stroke 1995; 26: 870-873
- 64.** Karlson P, Doenecke D, Koolman J
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler
14.Auflage, Georg Thieme Verlag 1994
- 65.** Kass IS, Abramowicz AE, Cottrell JE, Chambers G
The barbiturate thiopental reduces ATP levels during anoxia but improves electrophysiological recovery and ionic homeostasis in the rat hippocampal slice
Neuroscience 1992; 49: 537-543
- 66.** Kimelberg HK, Nestor NB, Feustel PJ
Inhibition of release of taurine and excitatory amino acids in ischemia and neuroprotection
Neurochem Res 2004; 29: 267-274
- 67.** Klinker R, Silbernagel S
Lehrbuch der Physiologie
Georg Thieme Verlag 2003
- 68.** Köhling R, Schmidinger A, Hülsmann S, Vanhatalo S, Lücke A, Straub H, Speckmann EJ, Tuxhorn I, Wolf P, Lahl R, Pannek H, Opperl F, Greiner C, Moskopp D, Wassmann H
Anoxic terminal negative DC-shift in human neocortical slices in vitro
Brain Res 1996; 741: 174-179

- 69.** Kogure K, Onodera H, Tsuda T, Araki T, Nishioka K
Roles of calcium-activated enzymic reactions in ischemia-induced neuronal injury
Cerebral Ischemia and Calcium
Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag; 1989: 240-244
- 70.** Koh J, Choi DW
Cultured striatal neurons containing NADPH-diaphorase or acetylcholinesterase are selectively resistant to injury by NMDA receptor agonists
Brain Res 1988; 446: 374-378
- 71.** Krishtal O
The ASICs: signalling molecule? modulators?
Trends Neurosci 2003; 26: 477-483
- 72.** Krug M
Tierexperimentelle elektrophysiologische Methoden
In: Kishka U, Wallesch CW, Wolf G (eds) Methoden der Hirnforschung, 1997,
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin
- 73.** Kuriyama K, Hashimoto T
Interrelationship between taurine and GABA
Adv Exp Med Biol 1998; 442: 329-337
- 74.** Kuroiwa T, Bonnekoh P, Hossmann KA
Therapeutic window of CA1 neuronal damage defined by an ultrashort-acting barbiturate after brain ischemia in gerbil
Stroke 1990; 21: 1489-1493

- 75.** Lipton SA; Rosenberg PA
Mechanisms of disease: excitatory amino acids as a final common pathway for neuralgic disorders
N Eng J Med 1994; 330: 613-622
- 76.** Lombardini JB
Recent studies on taurine in the central nervous system
Adv Exp Med Biol 1992; 315: 245-251
- 77.** Madden KP
Effect of gamma-aminobutyric acid modulation on neuronal ischemia in rabbits
Stroke 1994; 25: 2271-2275
- 78.** Matsumoto K, Lo EH, Pierce AR, Halpern EF, Newcomb R
Secondary elevation of extracellular neurotransmitter amino acids in the reperfusion phase following focal cerebral ischemia
J Cereb Blood Flow Metab 1996; 16: 114-124
- 79.** McDonald JW, Bhattacharyya T, Sensi SL, Lothar D, Ying HS, Canzoniero LM, Choi DW
Extracellular acidity potentiates AMPA receptor-mediated cortical neuronal death
J Neurosci 1998; 18: 6290-6299
- 80.** Melani A, Pantoni L, Corsi C, Bianchi L, Monopoli A, Bertorelli R, Pepeu G, Pedata F
Striatal outflow of adenosine, excitatory amino acids, gamma-aminobutyric acid, and taurine in awake freely moving rats after middle cerebral artery occlusion: correlation with neurological deficit and histopathological damage
Stroke 1999; 30: 2448-2454

- 81.** Meldrum BS
Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology
J Nutrition 2000; 130: 1007S-1015S
- 82.** Menson D, Summors A
Neuroprotection (including hypothermia)
Curr Opin Anaesth 1998; 11: 485-496
- 83.** Miao N, Kagao K, Lynch C
Thiopental and methohexital depress Ca^{2+} -entry into and glutamate release from cultured neurons
Anesthesiology 1998; 88: 1643-1653
- 84.** Michenfelder JD, Theye RA
Cerebral protection by thiopental during hypoxia
Anesthesiology 1973; 39: 510-517
- 85.** Michenfelder JD
The interdependency of cerebral functional and metabolic effects following massive doses of thiopental in the dog
Anesthesiology 1974; 41: 231-236
- 86.** Michenfelder JD
A valid demonstration of barbiturate-induced brain protection in man – at last
Anesthesiology 1986; 64: 142-146
- 87.** Mileson BE, Ehrmann ML, Schwartz RD
Alterations in the gamma-aminobutyric acid-gated chloride channel following transient forebrain ischemia in the gerbil
J Neurochem 1992; 58: 600-607

- 88.** Nakashima K, Todd MM
Effects of hypothermia, pentobarbital and isoflurane on postdepolarization amino acid release during complete global cerebral ischemia
Anesthesiology 1996; 85: 161-168
- 89.** Needergaard M, Hansen AJ
Spreading depression is not associated with neuronal injury in normal brain
Brain Res 1988; 449: 395-398
- 90.** Nilius B, Eggermont J, Droogmans G
The endothelial volume-regulated anion channel, VRAC
Cell Physiol Biochem 2000; 10: 313-320
- 91.** Nishizawa Y
Glutamate release and neuronal damage in ischemia
Life Sciences 2001; 69: 369-381
- 92.** Noachtar S, Binnie C, Ebersole J, Manguiere F, Sakamoto A, Westmoreland B
Glossar der meistgebrauchten Begriffe in der klinischen Elektroenzephalographie und Vorschläge für die EEG-Befunderstellung
Klein Neurophysiol 2004; 35: 5-21
- 93.** Nussmeier NA, Ralund C, Slogoff S
Neuropsychiatric complications after cardiopulmonary bypass: cerebral protection by a barbiturate
Anesthesiology 1986; 64: 165-170
- 94.** Oja SS; Saransaari P
Taurine as osmoregulator and neuromodulator in the brain
Metab Brain Res 1996; 11: 153-164

- 95.** O'Regan MH, Smith-Barbour M, Perkins LM, Phillis JW
A possible role of phospholipases in the release of neurotransmitter amino acids
from ischemic rat cerebral cortex
Neurosci Lett 1995; 185: 191-194
- 96.** Padosch SA, Vogel P, Böttiger BW
Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie
Anästhesist 2001; 50: 905-920
- 97.** Parsons MW, Barber PA, Desmond PM, Baird TA, Darby DG, Byrnes G,
Tress BM, Davis SM
Acute hyperglycaemia adversely affects stroke outcome: a magnetic resonance
imaging and spectroscopy study
Ann Neurol 2002; 52: 20-28
- 98.** Paschen W
Endoplasmatic reticulum: a primary target in various acute disorders and
degenerative diseases of the brain
Cell Calcium 2003; 34: 365-383
- 99.** Paschen W
Mechanisms of neuronal cell death: diverse roles of calcium in the various
subcellular compartments
Cell Calcium 2003; 34: 305-310
- 100.** Pascual JM, Carceller F, Roda JM, Cerdan S
Glutamate, glutamine and GABA as substrates for the neuronal and glial
compartments after focal cerebral ischemia in rats
Stroke 1998; 29: 1048-1056

- 101.** Pedersen JZ, Bernardi G, Centonze D, Pisani A, Rossi L, Rotilio G, Calabresi P
Hypoglycemia, hypoxia, and ischemia in a corticostriatal slice preparation:
electrophysiologic changes and ascorbyl radical formation
J Cereb Blood Flow Metab 1998; 18: 868-875
- 102.** Perez-Pinzon MA, Mumford PL, Carranza V, Sick TJ
Calcium influx from the extracellular space promotes NADH hyperoxidation
and electrical dysfunction after anoxia in hippocampal slices
J Cereb Blood Flow Metab 1998; 18: 215-221
- 103.** Perez-Pinzon MA, Mumford PL, Sick TJ
Prolonged anoxic depolarization exacerbates NADH hyperoxidation and
promotes poor electrical recovery after anoxia in hippocampal slices
Brain Res 1998; 786: 165-170
- 104.** Phillis JW, Smith-Barbour M, Perkins LM, O'Regan MH
Characterization of glutamate, aspartate, and GABA release from ischemic rat
cerebral cortex
Brain Res Bull 1994; 34: 457-466
- 105.** Phillis JW, Ren J, O'Regan MH
Studies on the effects of lactate inhibition, pyruvate, glucose and glutamine on
amino acid, lactate and glucose release from the ischemic rat cerebral cortex
J Neurochem 2001; 76: 247-257
- 106.** Phillis JW, O'Regan MH
Characterization of modes of release of amino acids in the ischemic/reperfused
rat cerebral cortex
Neurochem Int 2003; 43: 461-467

- 107.** Pin JP, Bockaert J
Two distinct mechanisms, differentially affected by excitatory amino acids, trigger GABA release from fetal mouse striatal neurons in primary culture
J Neurosci 1989; 9: 648-656
- 108.** Popovic R, Liniger R, Bickler PE
Anesthetics and mild hypothermia similarly prevent hippocampal neuron death in an in vitro model of cerebral ischemia
Anesthesiology 2000; 92: 1343-1349
- 109.** Potashner SJ
Baclofen: effects on amino acid release and metabolism in slices of guinea pig cerebral cortex
J Neurochem 1979; 32: 103-109
- 110.** Prough DS, Zornow MH
Why is cardiac arrest lasting more than five minutes associated with poor neurologic outcome?
Crit Care Med 1999; 27: 1398-1400
- 111.** Pulsinelli WA, Buchan A
The NMDA receptor/ion channel: its importance to in vivo ischemic injury to selectively vulnerable neurons
In: Kriegelstein J, Oberpichler H (eds.) Pharmacology of cerebral ischemia. 1990. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1990: 169-175
- 112.** Qi S, Zhan RZ, Wu C, Fujihara H, Taga K, Shimoji K
The effects of thiopental and propofol on cell swelling induced by oxygen/glucose deprivation in the CA1 pyramidal cell layer of rat hippocampal slices
Anesth Analg 2002; 94: 655-660

- 113.** Rekling JC
Neuroprotective effects of anticonvulsants in rat hippocampal slice cultures exposed to oxygen/glucose deprivation
Neurosci Lett 2003; 34: 305-310
- 114.** Roberts EL, Sick TJ
Calcium-sensitive recovery of extracellular potassium and synaptic transmission in rat hippocampal slices exposed to brief anoxia
Brain Res 1988; 456: 113-119
- 115.** Rossi DJ, Oshima T, Attwell D
Glutamate release in severe brain ischemia is mainly by reversed uptake
Nature 2000; 403: 316-321
- 116.** Roth SH, Bland BH, MacIver BM
Biphasic actions of pentobarbital on synaptic transmission
Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 1983; 7: 821-825
- 117.** Rothman SM, Thurston JH, Hauhart RE
Delayed neurotoxicity of excitatory amino acids in vitro
Neuroscience 1987; 22: 471-480
- 118.** Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncel RW
Localization of neuronal and glial glutamate transporters
Neuron 1994; 13: 713-725
- 119.** Rozza A, Masoero E, Favalli L, Lanza E, Govoni S, Rizzo V, Montalbetti L
Influence of different anaesthetics on extracellular aminoacids in rat brain
J Neurosci Methods 2000; 101: 165-169

- 120.** Sabirov RZ, Prenen J, Tomita T, Droogmans G, Nilius B
Reduction of ionic strength activates single volume-regulated anion channels (VRAC) in endothelial cells
Eur J Physiol 2000; 439: 315-320
- 121.** Saransaari P, Oja SS
Glutamate-agonist-evoked taurine release from the adult and developing mouse hippocampus in cell-damaging conditions
Amino Acids 1997; 9: 323-334
- 122.** Saransaari P, Oja SS
Taurine and neural cell damage
Amino Acids 2000; 19: 509-526
- 123.** Sasaki R, Hirota K, Roth SH, Yamazaki M
Anoxic depolarization of rat hippocampal slices is prevented by thiopental but not by propofol or isoflurane
Br J Anaesth 2005; 94: 486-491
- 124.** Sattler R, Charlton MP, Hafner M, Tymianski M
Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity
J Neurochem 1998; 71: 2349-2364
- 125.** Schaffer S, Takahashi K, Azuma J
Role of osmoregulation in the actions of taurine
Amino Acids 2000; 19: 527-546
- 126.** Scheller D, Korte M, Szathmary S, Tegtmeier F
Cerebral taurine release mechanisms in vivo: pharmacological investigations in rats using microdialysis for proof of principle
Neurochem Res 2000; 25: 801-807

- 127.** Scheller D, Szathmary S, Kolb J, Tegtmeier F
Observations on the relationship between the extracellular changes of taurine and glutamate during cortical spreading depression, during ischemia, and within the area surrounding a thrombotic infarct
Amino Acids 2000; 19: 571-583
- 128.** Schickendantz J, Funk W, Ittner KP, Gruber M, Taeger K, Kees F
Elimination of methohexitone after long-term, high dose infusion in patients with critically elevated intracranial pressure
Crit Care Med 1999; 27: 1570-1576
- 129.** Schmid-Elsaesser R, Schröder M, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ
EEG burst suppression is not necessary for maximum barbiturate protection in transient focal cerebral ischemia in the rat
J Neurol Sci 1999; 162: 14-19
- 130.** Schurr A, Tseng MT, West CA, Rigor BM
Taurine improves the recovery of neuronal function following cerebral hypoxia: an in vitro study
Life Sciences 1987; 40: 2059-2066
- 131.** Schurr A, Lipton P, West CA, Rigor BM
The role of energy metabolism and divalent cations in the neurotoxicity of excitatory amino acids in vitro
In: Kriegelstein J, Oberpichler H (eds.) Pharmacology of cerebral ischemia. 1990. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1990: 217-226
- 132.** Schwartz-Bloom RD, Sah R
Gamma-aminobutyric acid_A neurotransmission and cerebral ischemia
J Neurochem 2001; 77: 353-371

- 133.** Shanks CA, Harter DH, Brunner EA
An assessment of statistics
Anesthesiology 1986; 65: 232-233
- 134.** Shapiro HM, Galindo A, Wyte SR, et al
Rapid intraoperative reduction of intracranial pressure with thiopentone
Br J Anaesth 1973; 45: 1057-1062
- 135.** Shepherd GM
The synaptic organization of the brain, third edition
1990, Oxford University Press, New York
- 136.** Siegel GJ, Agranoff BW, Fisher SK, Albers RW, Uhler MD
Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects 6th Edition
Lippincott, Williams & Wilkins 1999
- 137.** Sieghart W
GABA_A receptors: ligand-gated Cl⁻ channels modulated by multiple drug-binding sites
Trends Pharmacol Sci 1992; 13: 446-450
- 138.** Siesjö BK, Ekholm A, Katsura K, Memezawa H, Ohta S, Smith ML
The type of ischemia determines the pathophysiology of brain lesions and the therapeutic response to calcium channel blockade
In: Kriegelstein J, Oberpichler H (eds.) Pharmacology of cerebral ischemia. 1990. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1990: 79-88
- 139.** Siesjö BK, Smith ML
The biochemical basis of ischemic brain lesions
Arzneimittelforschung 1991; 41: 288-292

- 140.** Siesjö BK
Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia Part I:
Pathophysiology
J Neurosurg 1992; 77: 169-184
- 141.** Siesjö BK
Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia Part II: Mechanisms
of damage and treatment
J Neurosurg 1992; 77: 337-354
- 142.** Siesjö BK, Katsura K, Kristian T
Acidosis-related damage
Adv Neurol 1996; 71: 209-233
- 143.** Simon RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS
Blockade of NMDA receptors may protect against ischemic damage in the brain
Science 1984; 229: 850-852
- 144.** Smith AL, Hoff JT, Nielsen SL, Larson P
Barbiturate protection in acute focal cerebral ischemia
Stroke 1974; 5: 1-7
- 145.** Smith WS
Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective
J Vasc Interv Radiol 2004; 15: S3-S12
- 146.** Somjen G
Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like
depolarization
Physiol Rev 2001; 81: 1065-1096

- 147.** Speckmann EJ
Generation of field potentials in the brain
J Clin Pharmacol 1997; 37: 8S-10S
- 148.** Steen PA, Michenfelder JD
Mechanisms of barbiturate protection
Anesthesiology 1980; 53: 183-185
- 149.** Strange K, Emma F, Jackson PS
Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels
Am J Physiol 1996; 270: C711-C730
- 150.** Swanson RA, Farrell K, Simon RP
Acidosis causes failure of astrocyte glutamate uptake during hypoxia
J Cereb Blood Flow Metab 1995; 15: 417-424
- 151.** Szatkowski M, Attwell D
Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms
Trends Neurosci 1994; 17: 359-365
- 152.** Taguchi J, Graf R, Rosner G, Heiss WD
Prolonged transient ischemia results in impaired CBF recovery and secondary glutamate accumulation in cats
J Cereb Blood Flow Metab 1996; 16: 271-279
- 153.** Tanelian DL, Kosek P, Mody I, MacIver B
The role of the GABA(A) receptor/chloride channel complex in anesthesia
Anesthesiology 1993; 78: 757-776

- 154.** Tecoma ES, Choi DW
GABAergic neocortical neurons are resistant to NMDA receptor-mediated injury
Neurology 1989; 39: 676-682
- 155.** Timmerman W, Westerink BH
Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify?
Synapse 1997; 27: 242-261
- 156.** Tohdoh Y, Narimatsu E, Kawamata M, Namiki A
The involvement of adenosine neuromodulation in pentobarbital-induced field excitatory postsynaptic potentials depression in rat hippocampal slices
Anesth Analg 2000; 91: 1537-1541
- 157.** Traystman RJ
Anesthetic mediated neuroprotection: established fact or passing fancy?
J Neurosurg Anesthesiol 2004; 16: 308-312
- 158.** Uchino S, Nakamura T, Nakamura K, Nakajima-Iijima S, Mishina M, Kohsaka S, Kudo Y
Real-time, two-dimensional visualization of ischaemia-induced glutamate release from hippocampal slices
Eur J Neurosci 2001; 13: 670-678
- 159.** Uchiyama-Tsuyuki Y, Araki H, Yae T, Otomo S
Changes in the extracellular concentrations of amino acids in the rat striatum during transient focal cerebral ischemia
J Neurochem 1994; 62: 1074-1078

- 160.** Valtysson J, Hillered L, Andine P, Hagberg H, Persson L
Neuropathological endpoints in experimental stroke pharmacotherapy: the importance of both early and late evaluation
Acta Neurochir 1994; 129: 58-63
- 161.** van der Worp HB, de Haan P, Morrema E, Kalkman CJ
Methodological quality of animal studies on neuroprotection in focal cerebral ischemia
J Neurol 2005; 252: 1108-1114
- 162.** van Gelder NM
Pathologies of the CNS and associated taurine changes
Adv Exp Med Biol 1992; 315: 253-261
- 163.** Wakasugi M, Hirota K, Roth SH, Ito Y
The effects of general anesthetics on excitatory and inhibitory synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus in vitro
Anesth Analg 1999; 88: 676-680
- 164.** Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M
A proton-gated cation channel involved in acid-sensing
Nature 1997; 386: 173-177
- 165.** Wang T, Raley-Susman KM, Wang J, Chambers G, Cottrell JE, Kass IS
Thiopental attenuates hypoxic changes of electrophysiology, biochemistry, and morphology in rat hippocampal slice CA1 pyramidal cells
Stroke 1999; 30: 2400-2407
- 166.** Ward JD, Becker DP, Miller DJ, Choy SC, Marmarou A, Wood C, Newlon PG, Keenan R
Failure of prophylactic barbiturate coma in the treatment of severe head trauma
J Neurosurg 1985; 62: 383-388

- 167.** Warner DS, Takaoka S, Wu B, Ludwig P, Pearlstein RD, Brinkhous AD, Dexter F
Electroencephalographic burst suppression is not required to elicit maximal neuroprotection from pentobarbital in a rat model of focal cerebral ischemia
Anesthesiology 1996; 84: 1475-1484
- 168.** Wassmann H, Moskopp D, Woesler B, Lucke A, Speckmann EJ, Kohling R, Straub H, Hulsmann S, Greiner C
Repetitive hypoxic exposure of brain slices and electrophysiological responses as an experimental model for investigation of cerebroprotective measurements
Neurol Res 1996; 18: 367-369
- 169.** Whittingham TS, Lust WD, Passonneau JV
An in vitro model of ischemia: metabolic and electrical alterations in the hippocampal slice
J Neurosci 1984; 4: 793-802
- 170.** Winer JW, Rosenwasser RH, Jimenez F
Electroencephalographic activity and serum and cerebrospinal fluid pentobarbital levels in determining the therapeutic end point during barbiturate coma
Neurosurgery 1991; 29: 739-741
- 171.** Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, Minami M, Hey J, Wie WL, MacDonald JF, Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ, Simon RP
Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels
Cell 2004; 118: 687-698

- 172.** Xue Q, Yu B, Wang Z, Chen H
Effects of ketamine, midazolam, thiopental, and propofol on brain ischemia injury in rat cerebral cortical slices
Acta Pharmacol Sin 2004; 25: 115-120
- 173.** Xue-Cun C, Zhi-Ling P, Dong-Sheng L, Xiaobin H
Effect of taurine on human fetal neuron cells: proliferation and differentiation
Adv Exp Med Biol 1998; 442: 397-403
- 174.** Ying W, Han SK, Miller JW, Swanson RA
Acidosis potentiates oxidative neuronal death by multiple mechanisms
J Neurochem 1999; 73: 1549-1556
- 175.** Young RS, During MJ, Donnelly DF, Aquila WJ, Perry VL, Haddad G
Effect of anoxia on excitatory amino acids in brain slices of rats and turtles: in vitro microdialysis
Am J Physiol 1993; 264: 716-719
- 176.** Zausinger S, Westermaier T, Plesnila N, Steiger J, Schmid-Elsaesser R
Neuroprotection in transient focal cerebral ischemia by combination drug therapy and mild hypothermia: comparison with customary therapeutic regimen
Stroke 2003; 34: 1526-1532
- 177.** Zhan RZ, Fujiwara N, Endoh H, Yamakura T, Taga K, Fukuda S, Shimoji K
Thiopental inhibits increases in $[Ca^{2+}]_i$ induced by membrane depolarization, NMDA receptor activation, and ischemia in rat hippocampal and cortical slices
Anesthesiology 1998; 89: 456-466
- 178.** Zhan RZ, Fujiwara N, Yamakura T, Taga K, Fukuda S, Shimoji K
Differential inhibitory effects of thiopental, thiamylal and phenobarbital on both voltage-gated calcium channels and NMDA receptors in rat hippocampal slices
Br J Anaesth 1998; 81: 932-939

- 179.** Zhu H, Cottrell JE, Kass IS
The effect of thiopental and propofol on NMDA- and AMPA-mediated glutamate excitotoxicity
Anesthesiology 1997; 87: 944-951

Lebenslauf

06.12.1979	Geburt in Köln
1986-1990	Grundschule Urbanusstraße in Gelsenkirchen
1990-1999	Max-Planck-Gymnasium in Gelsenkirchen
06/1999	Allgemeine Hochschulreife
07/1999-4/2000	Grundwehrdienst im Sanitätsdienst der Bundeswehr in Rennerod, München und Koblenz
04/2000-03/2002	Medizinstudium an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main (vorklinischer Abschnitt)
03/2002	Ärztliche Vorprüfung
04/2002-08/2006	Medizinstudium an der Westfälischen-Wilhelms-Universität in Münster (klinischer Abschnitt)
03/2003	1.Staatsexamen
03/2005	2.Staatsexamen
04/2005-03/2006	Praktisches Jahr des Medizinstudiums: - Innere Medizin in der Medizinischen Klinik B der Universitätsklinik Münster - Chirurgie im Spital Zofingen, Schweiz - Wahlfach Thorax-, Herz-, Gefäßchirurgie in der Universitätsklinik Münster
05/2006	3. Staatsexamen
06/2006	Approbation als Arzt
seit 08/2006	Assistenzarzt in der Herz- und Thoraxchirurgie der Universitätsklinik Köln

Köln, den 13.12.2007

Ingo Slottosch