Die schädigende Wirkung oxidativen Stresses und die Rolle von 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ nach Subarachnoidalblutung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der

Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Magdalena Lioba Ebert
aus Fulda

Gießen 2009

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Kommissarischer Direktor: Priv.-Doz. Dr. med. M: F. Oertel
Klinikstraße 29
35392 Gießen

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. med. R. Schäffer
Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. M. F. Oertel
Gutachter: Prof. Dr. med. M. Kaps

Tag der Disputation: 14. Dezember 2009

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Subarachnoidalblutung und cerebraler Vasospasmus 1

1.2 Stand der Forschung bezüglich der Pathomechanismen des CVS 2

1.2.1 Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur 2

1.2.2 Endothelin-1 2

1.2.3 Freie Radikale 3

1.3 Stand der Forschung bezüglich 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ 4

1.3.1 Arachidonsäure und ihre Metaboliten 4

1.3.2 Biochemie der Isoprostane und 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ 4

1.3.3 Biologische Aktivität des 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ 6

1.4 Ziel des klinischen Experiments 8

2 Materialien und Methoden 9

2.1 Patientengut 9

2.2 Zeitplan für die Datenerhebung 9

2.3 8-Isoprostan EIA Kit 10

2.3.1 Funktion des Enzymimmunoassays 10

2.3.2 Probenvorbereitung 11

2.3.3 Probenreinigung 11

2.3.4 Vorbereitung der Reagenzien 12

2.3.5 Pipettierschema 13

2.3.6 Entwicklung, Lesen und Berechnung der Platte 15

2.3.7 Bestimmung des Normalwertebereichs 15

2.4 Datenerfassung und Datenanalyse 16

2.4.1 Transkranielle Dopplersonographie 16

2.4.2 Bulbus venae jugularis-Katheter 16

2.4.3 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$-Konzentration 16

2.4.4 Statistik 17

3 Ergebnisse 18

3.1 Zeitlicher Verlauf der 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$-Konzentration 18

3.2 Bildungsort des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ 21

3.3 Cerebraler Vasospasmus 21

3.4 Akutes Lungenversagen (ARDS) 24
3.5 Arterio-jugularvenöse Sauerstoffdifferenz 26
4 Diskussion 29
4.1 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$-Konzentration und cerebraler Vasospasmus 29
4.2 ARDS und 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$-Konzentration 30
4.3 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ – ein direkter Vasokonstriktor? 31
4.4 $AvDO_2$ und Cerebraler Vasospasmus 32
4.5 Angewandte Methoden 32
4.6 Schlussfolgerung 33
5 Zusammenfassung 34
6 Summary 35
7 Literaturverzeichnis 36
Erklärung 44
Danksagung 45
Lebenslauf 46

Abkürzungsverzeichnis

8-iso $PGF_{2\alpha}$	8-Isoprostan $F_{2\alpha,}$ 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$
ajvDIso	arterio-jugularvenöse Differenz der Isoprostankonzentration
ARDS	Adult/Acute respiratory distrss syndrome
$avDO_2$	arteriovenöse Sauerstoffdifferenz
BHT	butyliertes Hydroxytoluol
Ca^{2+}	Calciumion
CEOOH	Cholesterylester-Hydroperoxid
COX	Cyclooxygenase
cvaDIso	zentralvenös-arterielle Differenz der Isoprostankonzentration
CVS	Cerebraler Vasospasmus
DIND	delayed ischemic neurological deficits, verzögert einsetzende ischämisch neurologische Defizite
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EIA	enzyme immunoassay, Enzymimmunoassay
ET_A/ ET_{B1}	Endothelin-A-/ Endothelin-B1-Rezeptor
FiO_2	inspiratorische Sauerstofffraktion
ICA	Arteria carotis interna
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MCA	Arteria cerebri media
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid
PaO_2	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PG (D,E,F,H,I)	Prostaglandin (D,E,F,H,I)
PGH_2	Prostaglandin H_2, Endoperoxid
PGI	Prostacyclin
SAB	Subarachnoidalblutung
SAH	subarachnoid hemorrhage
STABW	Standardabweichung
TCD	transcranial Doppler sonography, transkranielle Dopplersonographie
TP-Rezeptor	Thromboxan A_2/Endoperoxid (PGH_2)-Rezeptor
TXA_2	Thromboxan A_2

Meiner Mutter

1 Einleitung

1.1 Subarachnoidalblutung und cerebraler Vasospasmus

Die Subarachnoidalblutung (SAB) ist verantwortlich für 5 bis 10% aller cerebralen Insulte. Die überwiegende Ursache einer primären, atraumatischen Subarachnoidalblutung ist eine Ruptur eines Aneurysmas, welches eine abnorme Ausstülpung und Erweiterung einer Hirnarterie darstellt. Weitere, weitaus seltenere Ursachen sind unter anderem arteriovenöse Malformationen, durale arteriovenöse Fisteln, selten Kavernome.

Betroffen von der aneurysmatischen SAB sind vorwiegend Patienten im Alter von 40 bis 60 Jahren. Sie kann dennoch in jeder Altersstufe auftreten (Wardlaw und White 2000). Nahezu 12% der Patienten versterben bereits in der präklinischen Phase. Fast 40% der hospitalisierten Patienten sterben innerhalb eines Monats und mehr als ein Drittel der Überlebenden haben schwere neurologische Defizite, so dass sie Hilfe benötigen und eine starke Einschränkung ihrer Lebensqualität erfahren müssen (Wardlaw und White 2000). Das Ausmaß der initialen Blutung bestimmt maßgeblich das Outcome eines Patienten (Weir 1995). Einige der Hauptrisikofaktoren für eine SAB stellen Hypertension, Zigarettenrauchen, höheres Alter und Alkoholabusus dar (Cook 1995).

Die aneurysmatische SAB ist wegen des hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrisikos ein medizinischer Notfall. Aufgrund des hohen Nachblutungsrisikos besteht nach gesicherter Diagnose mit Computertomographie oder Lumbalpunktion und zerebraler Angiographie die Indikation zur sofortigen Therapie des Aneurysmas mittels Clipping oder Coiling. Wegen der initialen Komplikationen und Nachblutungen, stellt der cerebrale Vasospasmus (CVS) den führenden Grund für ein schlechtes Outcome bzw. den Tod eines Patienten dar (Dorsch 1995).

Ein CVS tritt im Mittel am dritten Tag nach SAB auf, hat sein Maximum am Tag 9±2 nach SAB und kann zwei bis drei Wochen andauern (Wilkins 1990). Er ist die primäre Erklärung für eine klinische Verschlechterung des physischen Zustandes in diesem Zeitraum. Durch einen CVS resultieren ein Anstieg des intracraniellen Druckes, eine Verminderung des cerebralen Blutflusses und des Perfusionsdrucks. Differentialdiagnostisch sollten aber auch Hydrozephalus, Nachblutung, Hypoxie, Hypotension und Elektrolytstörungen bedacht werden.

Obwohl bei 70% der Patienten eine angiographisch gesicherte Gefäßverengung vorliegt, manifestieren sich bei nur 20-30% motorische oder sprachliche Defizite, Verwirrtheitszustände und Bewusstseinsveränderungen (Dorsch 1995). Die neurologischen Defizite resultieren aus der Minderversorgung bzw. aus Infarkten der Hirnregion, deren versorgende Arterie vom CVS betroffen ist.

Die Entwicklung effektiver medikamentöser, präventiver und therapeutischer Maßnahmen wird erschwert durch den noch nicht endgültig erklärten Pathomechanismus und der wahrscheinlich multifaktoriellen Genese des CVS. In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Mechanismen identifiziert, die hierbei möglicherweise eine Rolle spielen.

1.2 Stand der Forschung bezüglich der Pathomechanismen des CVS

1.2.1 Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur

CVS kann betrachtet werden als eine abnorm verlängerte Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur. Hierbei spielt das intrazelluläre freie Calcium eine wichtige Rolle (Horowitz et al. 1996). Im Falle einer Calcium-abhängigen Gefäßkontraktion wird der intrazelluläre Ca^{2+}-Anstieg durch einen Ca^{2+}-Einstrom aus dem Extrazellulärraum erzeugt. Eine Rolle spielen hierbei sowohl rezeptorgesteuerte unspezifische als auch spannungsgesteuerte Kationenkanäle. Dieser Influx wird durch Blutprodukte im Subarachnoidalraum, insbesondere durch Oxyhämoglobin getriggert. Im Cytosol bindet das Ca^{2+} an cytoplasmatisches Calmodulin, welches vier Ca^{2+}-Ionen binden und einen Ca^{2+}-Calmodulin-Komplex bilden kann. Dieser Komplex aktiviert die Myosin-leichte-Ketten-Kinase, welche die Myosinköpfe der Myosin-leichte-Kette phosphoryliert. Schließlich führt die Interaktion mit Aktin zur Kontraktion (Winder et al. 1998).

Ebenso kommt es durch die Stimulation eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch Blutprodukte im Subarachnoidalraum zur Generierung von Phospholipase C, welche die Umwandlung des membranständigen Phosphatidylinositolbisphosphats in Inositoltrisphosphat und Diacylglycerol einleitet. Inositoltrisphosphat bewirkt daraufhin die Freisetzung von gespeichertem Ca^{2+} aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum in den Intrazellulärraum bzw. inhibiert Diacylglycerol über weitere Aktivierung der Proteinkinase C die Myosinphosphatase. Beide bringen somit die Gefäßmuskulatur zur Kontraktion. Auch eine Abspaltung von Arachidonsäure aus der Zellmembran durch Phospholipase A_2 führt zu einer Inhibierung von Myosinphosphatase (Tani 2002).

1.2.2 Endothelin-1

Als vasoaktive, körpereigene Substanz hat Endothelin-1 je nach Konzentration sowohl vasodilatierende als auch hauptsächlich vasokonstriktorische Eigenschaften. Vasodilatierend wirkt es über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin an ET_{B1}-Rezeptoren der Endothelzellen. Über ET_A-Rezeptoren entfaltet Endothelin-1 seine

vasokonstriktorische Wirkung. Es agiert von der Adventitia der Gefäße aus und kann auch von Astrozyten und Neuronen produziert werden (Chow et al. 2002).

Experimente zu Endothelin-1 wurden im Zusammenhang auf die Entwicklung eines CVS nach SAB mehrfach unternommen. Hier stellte sich heraus, dass Endothelin-1 im Liquor schon vor Auftreten einer klinischen Symptomatik und vor angiographischer Sicherung des CVS ansteigt. Ein Rückgang der Symptomatik wird durch Abfallen der Endothelin-1-Konzentration im Liquor angekündigt (Kaestner et al. 2005, Suzuki et al. 2000, Kessler et al. 2005).

Eine Studie zur Verwendung des ET_A-Rezeptor-Antagonisten Clazosentan zeigte zwar einen dosisabängigen Rückgang von Vasospasmen; bezüglich des weiteren Krankheitsverlaufs konnte jedoch nur ein Trend für dessen protektive Eigenschaften auf sekundäre cerebrale Infarkte und verzögert einsetzende ischämisch neurologische Defizite (DIND) ausgemacht werden (Macdonald et al. 2007).

1.2.3 Freie Radikale

Freie Radikale entstehen als Zwischenstufen bei chemischen Reaktionen, zum Beispiel bei Verbrennungsprozessen im Mitochondrium und bei äußeren Einflüssen wie oxidativem Stress, Hitze, UV-Strahlung. Aber auch eisenhaltige Bestandteile wie Hämoglobin können die Entstehung von Sauerstoffradikalen verursachen (Misra und Fridovich 1972) und ein Grund für cerebralen Vasospasmus darstellen (Fox 1979).

Oxyhämoglobin (oxidiertes Hämoglobin), das häufig für den CVS mitverantwortlich ist, unterliegt einer Autooxidation zu Methämoglobin, wobei ein Superoxidanionradikal während der Reaktion produziert wird. Hohe Konzentrationen von Oxyhämoglobin finden sich im Liquor von Patienten während des Vasospasmus (Macdonald und Weir 1991; Nishizawa und Laher 2005; Pluta 2005).

In endothelialen Zellkulturen unterstützt Oxyhämoglobin die immunreaktive Biosynthese und Freisetzung von Endothelin. Auch potenziert es die immunreaktive Endothelin-Produktion durch Thrombozyten (Ohlstein und Storer 1992).

Durch oxidative Wirkung auf biologische Membranen und der darauf folgenden Entstehung von Lipidperoxiden wird Oxyhämoglobin ebenfalls als Mitverursacher angesehen (Sano et al. 1980). Ein Vertreter der Lipidperoxide ist das Cholesterylester-Hydroperoxid (CEOOH), welches bei oxidativem Stress aus membranständigem Cholesterylester hervorgeht. Ein Experiment zur Höhe des CEOOH und dem Auftreten eines CVS zeigte, dass bei Patienten, die im Verlauf der SAB einen symptomatischen Vasospasmus entwickelten, die

CEOOH-Konzentrationen 48 Stunden nach Blutungsbeginn im Liquor signifikant erhöht waren (Kamezaki et al. 2002).

Ebenso bestätigten Experimente mit einem Hydroperoxid der Arachidonsäure als Verursacher der Lipidperoxidation, dass Lipidperoxide einen Spasmus und eine Schädigung von Arterienstrukturen erzeugen (Cook und Vollrath 1995; Sano et al. 1980). Erhöhte Werte von Lipidperoxiden (CEOOH), sowie ein Abfall des Antioxidanz Ascorbinsäure wurden im Liquor von Patienten mit CVS nachgewiesen (Polidori et al. 1997).

Antioxidantien und Radikalfänger wie Nicotinamid, das Aminosteroid Tirilazad und das die Glutathionperoxidase imitierende Ebselen haben in experimentellen Tierstudien gezeigt, dass sie antispastisch wirken und die Lipidperoxidation reduzieren (Suzuki et al. 1999).

Freie Radikale wie das Superoxidradikal und das Hydroxylradikal und nicht radikalische Derivate des Sauerstoffs wie Wasserstoffperoxid können Lipide, Proteine und Nukleinsäuren angreifen und zerstören. Das Superoxidradikal steuert seinerseits zum CVS bei, indem es Stickstoffmonoxid als Vasodilatator und Relaxans der glatten Muskulatur inaktiviert (Hanggi und Steiger 2006).

1.3 Stand der Forschung bezüglich 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$

1.3.1 Arachidonsäure und ihre Metaboliten

Als mehrfach ungesättigte Fettsäure ist Arachidonsäure ein integraler Bestandteil von Phospholipiden biologischer Membran. Durch G-Protein-gekoppelte Aktivierung der Phospholipase A_2 kann Arachidonsäure aus den Phospholipiden freigesetzt werden und über Wege der Cyclooxygenase (COX) und der Lipoxygenase in verschiedene biologisch aktive Substanzen verstoffwechselt werden.

Der COX-Weg führt schließlich zur Entstehung von Prostaglandinen, wie Thromboxan A_2 (TXA_2), Prostacyclin (PGI_2) und PGA_2, PGE_2, PGD_2, $PGF_{2\alpha}$. Als Vasokonstriktoren bekannt sind $PGF_{2\alpha}$, PGE_2 und TXA_2, während PGI_2 als potenter Vasodilatator fungiert (Cook 1995).

1.3.2 Biochemie der Isoprostane und 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$

Isomere der aus der Arachidonsäure gebildeten Prostaglandine sind die Isoprostane.

Während Prostaglandine in einer enzymatischen Reaktion durch Cyclooxygenase (COX) gebildet werden, entstehen die Isoprostane in einer durch freie Radikale induzierten Peroxidation der Arachidonsäure (Abb.1). In einer ersten Reaktion entsteht eines von drei

möglichen Arachidonyl-Radikalen. An dieses lagert sich in einer zweiten Reaktion, der Peroxidation, ein Sauerstoffmolekül an und führt zur Entstehung eines Peroxyl-Radikals. Daraufhin folgt eine Endozyklisierung zu vier bizyklischen Endoperoxid-Radikalen und die erneute Anlagerung von Sauerstoff führt zu vier bizyklischen H_2-Prostaglandin ähnlichen Endoperoxiden. Durch die Reduktion der vier intermediären Endoperoxid-Regioisomere entstehen schließlich vier F_2-Isoprostan-Regioisomere (Roberts und Morrow 1999).

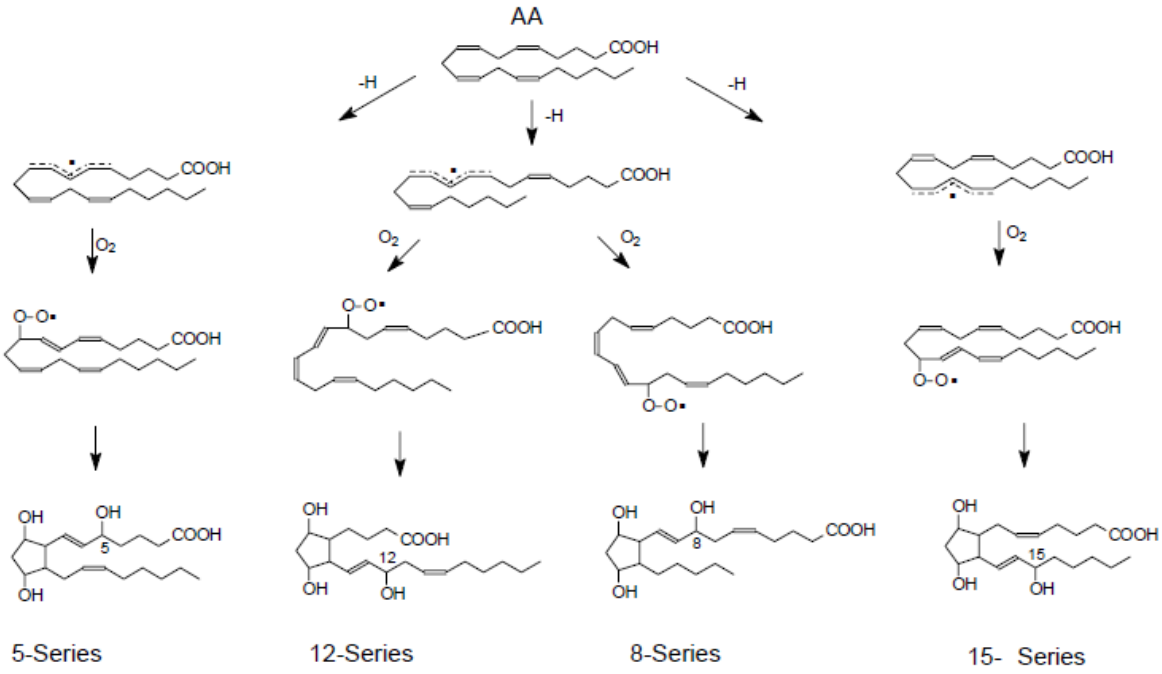


Abb.1: Entstehung der F_2-Isoprostane. AA=Arachidonsäure. (Roberts und Fessel 2004)

Die vier Regioisomere können jeweils acht razematische Diastereomere ausbilden, wodurch man schließlich 64 Verbindungen erhält. Da diese Verbindungen isometrisch zu aus Cyclooxygenase gebildetem Prostaglandin $F_{2\alpha}$ sind, wurden sie F_2-Isoprostane benannt. Das biologisch aktive und mit am häufigsten und besten untersuchte Isoprostan ist das 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ (8-iso $PGF_{2\alpha}$). Die Zahl 8 steht für die Position der Hydroxylgruppe in der Seitenkette, der Index 2 für die Anzahl der Doppelbindungen in den Seitenketten, das α für die Stellung der Hydroxylgruppen des Cyclopentan-Rings nach unten (*cis*-Stellung).

Neben der am häufigsten gebrauchten Bezeichnung 8-iso $PGF_{2\alpha}$ werden folgende Bezeichnungen synonym verwendet: 15-F_{2t}-Isoprostaglandin, 8-Epiprostaglandin $F_{2\alpha}$,

Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ Typ III und 8-Isoprostan $F_{2\alpha}$. Eine Nomenklatur erfolgte durch das Eicosanoid Nomenclature Committee der IUPAC und bezeichnet die vier Regioisomerklassen anhand der Position des Kohlenstoffs, an welchem die Hydroxylgruppe in der Seitenkette hängt.

Tierstudien zeigten, dass die Konzentration von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ bei oxidativem Stress, wie Radikalbildung, ansteigt und deren Aktivität durch Antioxidantien, wie dem Radikalfänger BN 80933 (Marin et al. 2000) geblockt werden kann. Freie Radikale entstehen im Körper bei der Zellatmung in den Mitochondrien, bei Entzündungsreaktionen und Durchblutungsstörungen und sind beispielsweise vertreten durch Stickstoffmonoxid- oder Stickstoffdioxidradikale, Hydroxylradikale, Superoxidradikal, Ozon oder molekularen Sauerstoff (Halliwell 1997).

1.3.3 Biologische Aktivität des 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$

Eine biologische Aktivität des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ wurde in mehreren Tierexperimenten nachgewiesen. Es ist beschrieben, dass 8-iso $PGF_{2\alpha}$ dosisabhängig die Adhäsivität der Thrombozyten erhöht und die antiaggregatorische und antiadhäsive Aktivität von Stickstoffmonoxid (NO) reduziert. Ebenso setzt es Calcium und Inositoltriphosphat aus intrazellulären Speichern frei und führt zur reversiblen Aggregation der Thrombozyten (Praticò et al. 1996; Morrow et al. 1992; Minuz et al. 1998; Audoly et al. 2000).

Im Tierversuch an Ratten wurde gezeigt, dass das 8-iso $PGF_{2\alpha}$ zur Vasokonstriktion der Blutgefäße der Niere führt, dabei die glomeruläre Filtrationsrate und den renalen Plasmafluss zunächst reduziert und in der Höchstdosis vollständig aufheben kann. Nahezu wirkungslos erweist sich im gleichen Versuch das isomere Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (Takahashi et al. 1992).

Eine Vasokonstriktion konnte ebenfalls an der Pulmonalarterie von Kaninchen und Ratten beobachtet werden, sowie eine Bronchokonstriktion in der Lunge der Ratte (Morrow et al. 1997; Kang et al. 1993). Ebenso beschrieben und untersucht wurde eine Vasokonstriktion an retinalen (Lehaie et al. 1998; Hou et al. 2004) und cerebralen Gefäßen von Schweinen (Hou et al. 2004).

Im Rattenversuch führte 8-iso $PGF_{2\alpha}$ an den glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta zum einen zur Induktion der Zellteilung und zur Freisetzung von Endothelin-1. In Folge führte Endothelin-1 nach seiner Freisetzung zur Vasokonstriktion. Zum anderen stimulierte 8-iso $PGF_{2\alpha}$ die Inositoltriphosphat-Produktion und DNA-Synthese in diesen Zellen (Fukunanga et al. 1993; Yura et al. 1999).

Ein Anstieg des mittleren arteriellen Druckes wurde nach intravenöser Injektion von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ bei Mäusen nachgewiesen. Der Druck ließ sich durch den Thromboxan A_2/Endoperoxid-Rezeptor-Antagonisten SQ29,548 wieder senken (Audoly et al. 2000).

Die Aktivität des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ wurde hierbei im Wesentlichen durch Wechselwirkung mit dem Thromboxan A_2 (TXA_2)/Endoperoxid (PGH_2)-Rezeptor vermittelt (Takahashi et al. 1992; Morrow et al. 1992).

In der Literatur werden Konzentrationsbereiche für 8-iso $PGF_{2\alpha}$ im Plasma gesunder Menschen mit 42±2 pg/ml und im Urin mit 126±56 pg/ml Kreatinin (Ohashi et al. 2000) beschrieben. Es eignet sich wegen seiner hohen Stabilität in vivo gut als Marker des oxidativen Stresses.

Bestimmte Lebensweisen und Krankheiten führen zu einem Anstieg der Konzentration im Urin und Plasma. So erhöht ein vermehrter Alkoholkonsum dosisabhängig die Ausscheidung des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ im Urin. Bei Patienten mit alkoholbedingter Leberzirrhose oder alkoholinduzierter Hepatitis konnte ebenfalls eine erhöhte 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration im Urin festgestellt werden (Meagher et al. 1999; Aleynik et al. 1998).

Raucher, die durch Zigarettenrauch täglich einer hohen Konzentration an freien Radikalen ausgesetzt sind, zeigen erhöhte 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Werte in Urin und Plasma, was einen Beweis für eine chronische Erhöhung der Lipidperoxidation liefert. Ob ein Zusammenhang der Werte mit dem Alter, der Dauer des Rauchens und der Anzahl der Zigaretten pro Tag besteht, wird kontrovers diskutiert (Obata et al. 2000; Reilly et al. 1996; Morrow et al. 1995).

Oxidativer Stress, der in Verbindung mit der Erhöhung von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ steht, spielt bei der Entwicklung zahlreicher Krankheiten eine entscheidende Rolle. Unter anderem wurden bei folgenden Krankheiten erhöhte 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Werte in der Literatur beschrieben: Arteriosklerose (Praticò et al. 1997), Diabetes mellitus (Davi et al. 1999; Gopaul et al. 1995), ARDS (in exhaliertem Kondensat) (Carpenter et al. 1998), familiäre Hypercholesterinämie (Reilly et al. 1998), Sklerodermie (Cracowski et al. 2002), Alzheimer-Demenz (Praticò et al. 1998) und Asthma (in exhaliertem Kondensat) (Montuschi et al. 1999).

Eine tierexperimentelle topische Applikation von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ um cerebrale Arterien von Ratten zeigte eine starke und lang anhaltende dosisabhängige Vasokonstriktion. Dieser vasokonstriktorische Effekt wurde vollständig aufgehoben durch Applikation des semiselektiven TXA_2/PGH_2-Rezeptorblockers SQ 29,548. Applikation des Isomers 8-iso PGE_2 hatte einen geringeren und des anderen Isomers $PGF_{2\alpha}$ nahezu keinen vasokonstriktorischen Effekt (Hoffman et al. 1997).

Es ist bisher unklar, ob 8-iso $PGF_{2\alpha}$ über einen eigenen Rezeptor verfügt und wirkt bzw. wie viele und welche anderen Rezeptoren es aktiviert. Ebenso unvollständig ist der Nachweis, ob 8-iso $PGF_{2\alpha}$ direkt oder indirekt über andere Stoffwechselprodukte seine Wirkung entfaltet. Hierzu gibt es viele unterschiedliche Forschungsergebnisse. Beschrieben wird seine Wirkung als Partialagonist am Thromboxan A_2/PGH_2-Rezeptor (TP-Rezeptor) der Thrombozyten, wo es möglicherweise die proaggregatorischen Effekte der TP-Rezeptor-Stimulation inhibiert (Cranshaw et al. 2001). Über die Existenz eines eigenen Rezeptors an vaskulärer glatter Muskulatur von Ratten wurde bisher alleinig 1993 von Fukunaga et al. berichtet. 8-iso $PGF_{2\alpha}$ fördert unter anderem die Freisetzung von TXA_2, PGI_2, NO und Endothelin-1 an der Endothelzelle. Die meisten Daten sprechen aber bisher für eine Wirkung über den TP-Rezeptor (Hoffmann et al. 1997; Cranshaw et al. 2001; Cracowski et al. 2001; Takahashi et al. 1992; Morrow et al. 1992; Audoly et al. 2000).

1.4 Ziel des klinischen Experiments

Messungen der 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration in vivo am Patienten mit Subarachnoidalblutung (SAB) wurden noch nicht vorgenommen. Nachdem dem 8-iso $PGF_{2\alpha}$ aber vasokonstriktorische Eigenschaften mehrfach bestätigt wurden und es eine Rolle im oxidativen Stress spielt, ist es von pathophysiologischer und therapeutischer Bedeutung, seine Rolle in der Entwicklung eines cerebralen Vasospasmus zu untersuchen.

Ungeklärt ist bisher auch, ob das 8-iso $PGF_{2\alpha}$ im Hirn durch freie Radikale entsteht oder ob es in anderen Organen gebildet wird, die ebenfalls oxidativem Stress ausgesetzt sind.

Hierzu wurden der zeitliche Verlauf der 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen über sieben Tage nach SAB in arteriellem, jugularvenösem und zentralvenösem Blut sowie im Liquor der Patienten bestimmt, der arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) gemessen, die arterio-jugularvenöse Sauerstoffdifferenz ($avDO_2$) berechnet und der inspiratorische Anteil des Sauerstoffs (FiO_2) erfasst. Zur Detektion eines CVS wurden transkranielle Doppleruntersuchungen (TCD) durchgeführt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Patientengut

Die seriellen Messungen von 8-iso $PGF_{2\alpha}$, des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes, der arteriellen Sauerstoffsättigung und den Flussgeschwindigkeiten in den Aa. cerebri mediae und den extrakraniellen Aa. carotides internae wurden an 34 Patienten durchgeführt. Einschlusskriterien waren Patienten, die an einer aneurysmatischen SAB erkrankt waren, innerhalb von 24 Stunden nach Blutungsereignis auf der neurochirurgischen Intensivstation aufgenommen wurden und bei denen neurologisch mindestens zwei Hirnstammreflexe nachzuweisen waren. Die Altersspanne belief sich von 19 bis 74 Jahre (Mittelwert 53,0±14,6); das Verhältnis Frauen zu Männern lag bei 2,8:1,0. Eingeschlossen wurden alle klinisch neurologischen Grade nach Hunt & Hess (I – V) sowie alle Blutverteilungsgrade nach Fischer (1 – 4). Ein Ventrikelkatheter, ein zentralvenöser Katheter und ein Bulbus venae jugularis-Katheter wurden angelegt.

Ausschlusskriterien waren Alter <18 und >76 Jahre, weite lichtstarre Pupillen seit mehr als 2 Stunden, frühere und bestehende neurologische Erkrankungen wie massives Schädelhirntrauma, Apoplex, Multiinfarkt-Demenz und Alzheimer-Demenz.

Als Kontrollgruppe wurden zehn gesunde, nicht rauchende, freiwillige, kaukasische Probanden rekrutiert und deren 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration im Plasma bestimmt.

Die Experimente wurden durch die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt.

2.2 Zeitplan für die Datenerhebung

Der Tag der Blutung entsprach Tag 0. Von Tag 1 bis Tag 7 nach der SAB erfolgte die tägliche Bestimmung von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ im arteriellen, jugularvenösem, zentralvenösem Blut und im Liquor, sowie die zeitgleiche Messung des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes und der arteriellen Sauerstoffsättigung mittels Blutgasanalyse. Die inspiratorische Sauerstoff-Konzentration wurde zum Zeitpunkt der Probenentnahme notiert.

Durchgeführt wurden zeitnah zur Probenentnahme transkranielle dopplersonographische Messungen der Arteriae cerebri mediae (MCA) dextrae et sinistrae, sowie der extrakraniellen Arteriae carotides internae (ICA) dextrae et sinistrae.

2.3 8-Isoprostan EIA Kit

Für die Messung der 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen fand das das 8-Isoprostane EIA Kit der Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) mit der Katalognummer 516351 Anwendung. Dieses Kit beinhaltet folgende Bestandteile:

8-Isoprostan EIA Antiserum,

8-Isoprostan AchE Tracer,

8-Isoprostan Standardlösung,

EIA Pufferkonzentrat,

Waschpufferkonzentrat,

Tween 20,

monoklonale Maus-Antikaninchen IgG-Antikörper beschichtete Lochplatte,

Plattenabdeckung,

Ellmans Reagenz.

2.3.1 Funktion des Enzymimmunoassays

Der Enzymimmunoassay (EIA) basiert auf der kompetitiven Bindung. Hierbei konkurrieren 8-Isoprostane und ein 8-Isoprostan-Acetylcholinesterase-Konjugat um eine begrenzte Anzahl an 8-Isoprostan spezifischen Bindungsstellen eines Kaninchen-Antiserums (Abb.2). Da die Konzentration des 8-Isoprostan-Tracers konstant gehalten wird, während die Konzentration von 8-Isoprostan variiert, ist die Menge des Tracers, der mit dem Antiserum bindet, antiproportional zur Konzentration der 8-Isoprostane der Probe. Dieser Kaninchen-Antiserum-8-Isoprostan-Komplex bindet an die monoklonalen Maus-Antikaninchen IgG-Antikörper, mit denen die Lochplatten beschichtet sind. Damit alle ungebundenen Reagenzien von der Lochplatte entfernt werden, muss diese gewaschen werden. Dann erfolgt die Zugabe von Ellmans Reagenz, welches aus Acetylthiocholin und 5,5-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) besteht. In Gegenwart der Acetylcholinesterase des Tracers wird das Acetylthiocholin zu Acetat und Thiocholin gespalten, welches in der mit 5,5-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) zu 5-Thio-2-nitrobenzoesäure reagiert. Das Produkt dieser enzymatischen Reaktion hat eine leicht gelbliche Farbe und absorbiert stark bei 412 nm. Die Intensität der Farbe, photospektrometrisch gemessen, ist proportional zur Anzahl der von Tracer gebundenen 8-Isoprostane der Probe und antiproportional zur Anzahl an freiem 8-Isoprostan.

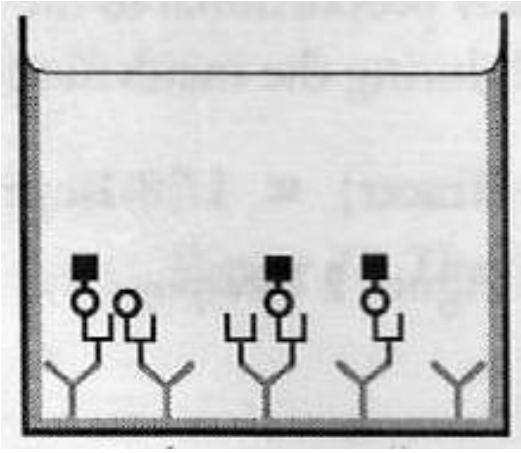


Abb.2: Bindungsschema des 8-Isoprostane EIA. = *Monoklonale Mausantikörper;* = *blockierende Proteinschicht;* = *Tracer;* = *spezifischer 8-Isoprostan-Antikörper;* = *freies 8-Isoprostan (Cayman Chemical 2000)*

2.3.2 Probenvorbereitung

Für jede Messung wurden pro Patient und Messort 10ml Blut in Röhrchen entnommen, die mit EDTA und 0,005% BHT (butyliertes Hydroxytoluol) versetzt waren. BHT sollte zusätzliche Oxidationsvorgänge z.B. durch Licht verhindern. Direkt nach Abnahme wurden die Proben 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert. Die Proben sollten möglichst sofort gemessen oder bei -80°C bis zur Messung aufbewahrt werden. Alle Patientenproben müssen frei von Partikeln und organischen Präzipitaten sein, da jegliche Kontamination mit dem Assay interferieren kann. Zur Reinigung stellt die Cayman Chemical Company eine 8-Isoprostane Affinity Column (Katalognummer 416358) zur Verfügung. Dieser Reinigungsvorgang wurde von Cayman für Plasma und Urin validiert und mit einer durchschnittlichen Erholung der Säulen von >90% und einer Varianz von <20 angegeben.

2.3.3 Probenreinigung

Weniger als die Hälfte der totalen Plasma 8-Isoprostane liegen ungebunden als freie Säuren vor, die Übrigen verestert mit Lipoproteinen (Morrow et al., 1995). Ohne Hydrolyse würde ein direkter EIA der Patientenproben nur den freien 8-Isoprostananteil messen. Eine Bestimmung der totalen Plasma 8-Isoprostane erfordert eine alkalische Hydrolyse vor dem eigentlichen EIA.

Hierbei wurde zu 1 ml Plasma entsprechend 1 ml 15%ige KOH (Kaliumhydroxid) gegeben und bei 40°C für 60 Minuten inkubiert. Zur nun verseiften Probe gaben wir 0,01% BHT enthaltendes Ethanol, mischten die Probe mittels Vortex und ließen die Lösung bei 4°C

für 5 Minuten inkubieren. Daraufhin zentrifugierten wir die Probe 10 Minuten bei 1500 U/min und entfernten die präzipitierten Proteine. Der Überstand wurde in ein sauberes Röhrchen dekantiert, das Ethanol mittels Distickstoff (N_2) verdampft.

Dann wurde die Probe mittels 1 M KH_2PO_4 (Kaliumphosphat) auf einen pH-Wert von 7,0 – 7,4 neutralisiert und anschließend 1 – 2 ml des Eicosanoid Affinity Column Buffer (Katalognummer 400220) hinzugegeben. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit der 8-Isoprostan Affinity Column (Katalognummer 516358), indem man auf die 20 ml-Säule 10 ml Column Buffer und folgend 10 ml ultrareines Wasser (UltraPure Water, Cayman Chemical, Katalognummer 400000) gab.

Eluiert wurde das 8-Isoprostan von der 20 ml-Säule durch Zugabe und Durchlaufenlassen von 5 ml Elution Solution (Katalognummer 400230). Danach musste die Elutionslösung mittels N_2-Verdampfer getrocknet werden, um alle organischen Bestandteile zu entfernen und somit eine störfreie Messung zu ermöglichen.

Wir lösten die eluierte 8-Isoprostanprobe mit 450 µl EIA Puffer und mischten beides auf dem Vortex. Diese Lösung konnte nun zur Analyse verwendet werden.

2.3.4 Vorbereitung der Reagenzien

EIA Buffer

Der Flascheninhalt des EIA Buffer Concentrate wurde mit 90 ml ultrareinem Wasser gelöst. Hierbei wurde auf vollständiges Auflösen der Bestandteile geachtet.

Wash Buffer

Das 5 ml Wash Buffer Concentrate wurde auf 2 l mit ultrareinem Wasser verdünnt und hinzu 1 ml Tween 20 gegeben.

8-Isoprostane Standard

Die Pipettenspitze wurde mehrmals mit Ethanol vorgespült, um dann 100 µl des 8-Isoprostane Standards in ein sauberes Eppendorfröhrchen zu geben. Dann wurde der Standard mit 900 µl ultrareinem Wasser verdünnt. Die erhaltene Konzentration dieser Lösung belief sich auf 5 ng/ml (sog. bulk standard). Aufbewahrt bei 4°C war die Lösung für sechs Wochen haltbar.

Acht saubere Eppendorfröhrchen wurden mit den Nummern 1 - 8 beschriftet. In Röhrchen Nummer 1 gaben wir 900 µl EIA Buffer und 100 µl des bulk standard und mischten gut durch. In die Röhrchen 2 - 8 füllten wir 500 µl EIA Buffer. Nun entnahmen wir aus

Röhrchen 1 eine Menge von 500 µl und gaben es in Röhrchen 2, gut gemischt. Dann Entnahme von 500 µl aus Röhrchen 2 und Hinzugabe dieser 500 µl in Röhrchen 3. Wir führen diesen Prozess systematisch für die Röhrchen 4 - 8 fort.

Die so erhaltene Standardverdünnungsreihe ergab folgende Dosierungen:

Standardlösung	1	2	3	4	5	6	7	8
Dosis [pg/ml]	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9

Tab.1: Standardverdünnungsreihe für 8-Isoprostan

Der Standard war 24 Stunden verwendbar und wurde somit pro Messvorgang neu hergestellt. Die jeweilige Test-Standardkurve wurde dabei mittels Berechnung der Regressionsgeraden durch das von Cayman Chemical mitgelieferte Computerprogramm erstellt.

8-Isoprostane AChE Tracer

Der Tracer wurde mit 6 ml EIA Buffer wieder hergestellt und bei 4°C für maximal vier Wochen aufbewahrt.

8-Isoprostane Antiserum

Das Antiserum wurde mit 6 ml EIA Buffer wieder hergestellt und bei 4°C für maximal vier Wochen aufbewahrt.

2.3.5 Pipettierschema

Es wurde, wie in der Anleitung des 8-Isoprostane EIA Kit beschrieben, wie folgt pipettiert:

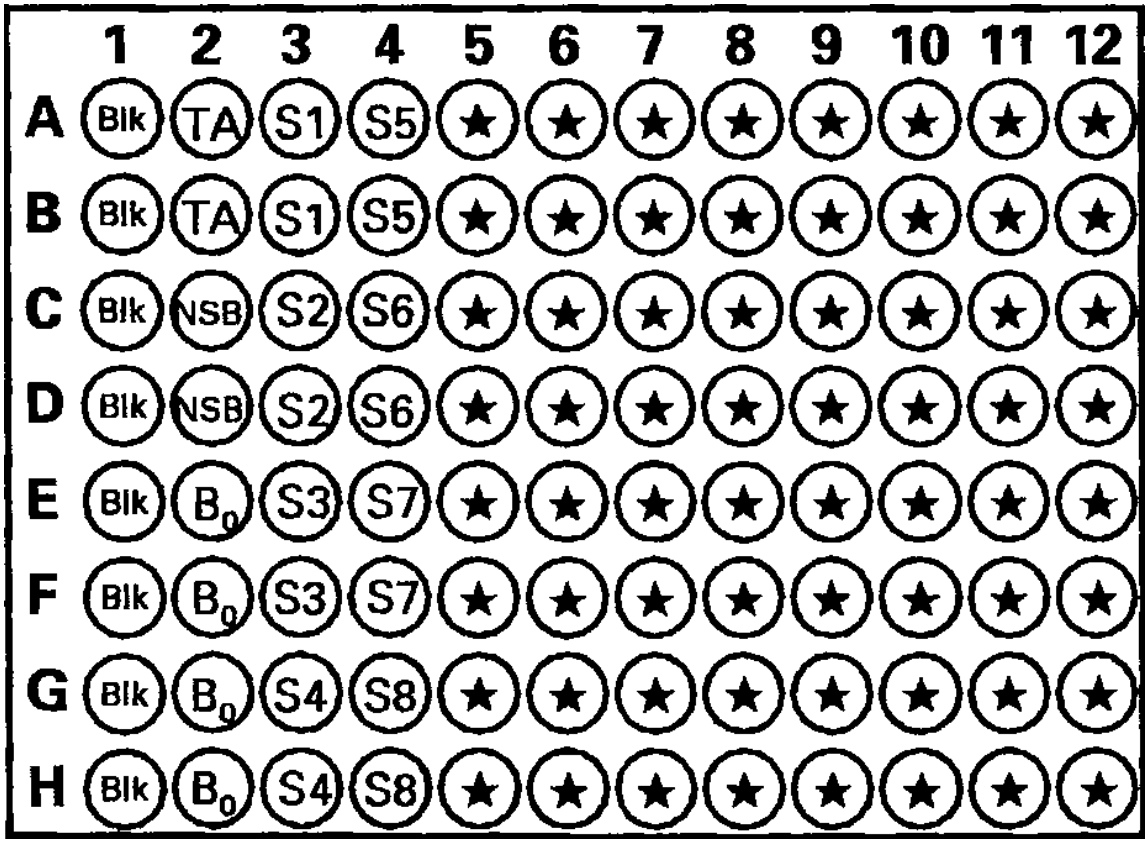


Abb.3: Pipettierschema der 96er Lochplatte. Blk = Leerprobe; TA = Totalaktivität; NSB = unpezifische Bindung; B_0 = maximale Bindung; S1-S8 = Standards 1-8; ★ = Probe (Cayman Chemical 2000).

Die mit dem Kit gelieferte Lochplatte war bereits gebrauchsfertig. Es erfolgten Doppelbestimmungen der Totalaktivität (TA), der unspezifischen Bindung (NSB), der Standards (S) und der Proben (★). Die Felder der Leerprobe (Blk) blieben frei (Abb.3).

EIA Buffer

In die Löcher zur Messung der NSB wurden jeweils 100 µl EIA Buffer gegeben, in diese für die Maximale Bindung (B_0) jeweils 50 µl EIA Buffer.

8-Isoprostane Standard

In die Löcher zur Bestimmung der Standards (S1-S8) wurden jeweils 50 µl der entsprechend vorbereiteten 8-Isoprostane Standard-Lösungen gegeben.

Proben

Jeweils 50 µl wurden in die vorgesehenen Löcher pipettiert.

8-Isoprostane AChE Tracer

Zu allen Messlöchern wurden 50 µl Tracer hinzupipettiert, mit Ausnahme der TA- und der Blk-Löcher.

8-Isoprostane Antiserum

Zu allen Messlöchern wurden 50 µl Antserum hinzupipettiert, mit Ausnahme der TA-, der NSB- und der Blk-Löcher.

Die fertig pipettierte Mikropipettierplatte wurde bei Raumtemperatur über 18 Stunden inkubiert.

2.3.6 Entwicklung, Lesen und Berechnung der Platte

Nach Verstreichen der Inkubationszeit wurde das Ellmans Reagenz mit 20 ml ultrareinem Wasser versetzt. Das Reagenz musste dunkel gelagert und am gleichen Tag verbraucht werden.

Die Lochplatte wurde geleert und fünf Mal mit Wash Buffer gewaschen. Wir fügten 200 µl Ellmans Reagenz in jedes Loch und 5 µl Tracer in die TA-Löcher. Danach wurde die Platte mit einem Plastikfilm abgedeckt und der Assay 60 - 90 Minuten auf einem Rührer im Dunkeln entwickelt.

Anschließend wurde die Platte mit dem BioTek Mikroplattenlesegerät µQuant mit einer Wellenlänge zwischen 405 und 420 ausgelesen und die Extinktionswerte über eine Geräte eigene Schnittstelle an den Computer übermittelt.

Zur Berechnung und Einlesung der Assayresultate verwendeten wir ein von der Cayman Chemical Company angebotenes Computerprogramm.

2.3.7 Bestimmung des Normalwertebereichs

Im Vorversuch wurde die 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration im Plasma einer Kontrollgruppe von zehn gesunden, nicht rauchenden, freiwilligen, kaukasischen Probanden bestimmt. Da bei diesen Probanden davon ausgegangen werden kann, dass sie keinem zusätzlichen oxidativen Stress an bestimmten Organen ausgesetzt sind, unterstellten wir gleiche Konzentrationen für arterielles, zentralvenöses und jugularvenöses Blut. Die 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration im Plasma betrug 57,23±21,73 pg/ml mit einem 2σ-Intervall von 57,23±43,46 pg/ml, sodass ein Normalwertebereich von 13,77 pg/ml bis 100,69 pg/ml angenommen werden kann.

2.4 Datenerfassung und Datenanalyse

2.4.1 Transkranielle Dopplersonographie

Sie diente der Erkennung eines CVS. Die Diagnose eines CVS lag vor, wenn die Flussgeschwindigkeit einer A. cerebri media bei $V_{MCA} \geq 120$ cm/s lag und der Lindegaard-Index ($V_{MCA}/V_{extrakranielle\ ICA}$) ≥ 3 war.

Zur Untersuchung wurden zu Beginn ein maximales Messvolumen und eine hohe Leistung eingestellt. Dann wurde der Schallkopf ungefähr mittig zwischen Epikanthus lateralis und äußerem Gehörgang kurz oberhalb des Jochbogens aufgesetzt und die MCA bzw. ICA in einer Tiefe von 52 – 58 mm aufgesucht. Die MCA zeigte dabei einen Fluss zur Sonde hin, die ICA einen Fluss von der Sonde weg.

2.4.2 Bulbus venae jugularis-Katheter

Nach Punktion der V. jugularis interna wurden ein 5 French Cordis Katheter und ein 4 French Oxymetrix Katheter der Firma Baxter Critical Care und Baxter Health Care (Deerfield, IL, USA) auf der lumenstärkeren, überwiegend rechten Seite so weit nach kranial in die V. jugularis interna vorgeschoben, bis ein Widerstand spürbar war. Die dominante Seite wurde möglichst zuvor mittels CT-Scan ermittelt. Danach wurde der Katheter 1 cm nach kaudal zurückgezogen und mit einer Naht fixiert. Eine seitliche Schädel-Übersichtsaufnahme dokumentierte die regelrechte Position des Katheters im Bulbus venae jugularis superior, der sich radiologisch hinter das Mastoid projiziert. Kalibriert wurde der Katheter alle 12 Stunden in vivo. Aus diesem zur kontinuierlichen Erfassung der jugularvenösen Sauerstoffsättigung herangezogenen Katheter, entnahmen wir unter langsamer Aspiration zwei Proben mit jeweils 1 – 2 ml jugularvenösem Blut in ein heparinisiertes Röhrchen zur Berechnung der arterio-jugularvenösen Sauerstoffdifferenz ($avDO_2$) und zur Messung der dortig herrschenden 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration. Die Berechnung der $avDO_2$ erfolgte nach der Kety-Schmidt-Methode:

$$avDO_2 = \{1{,}34 * Hb * (SaO_2[\%] - SjvO_2[\%]) : 100\}.$$

2.4.3 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$-Konzentration

Die Messung der 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration erfolgte mit dem Enzymimmnunoassay von der Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) mit der Katalognummer 516351. Das Einlesen der Messwerte wurde mittels eines Computerprogramms von Cayman und entsprechender Schnittstelle auf den Laborcomputer realisiert.

2.4.4 Statistik

Alle gemessenen Werte wurden in einer Access-Datenbank (Microsoft Office Access 2003, Microsoft Corporation, Seattle, WA, USA) erfasst.

Das Statistikprogramm Statistika Version 6 (Statsoft, Tulsa, OK, USA) wurde zur Erstellung von Häufigkeitstabellen, zur Regressionsanalyse und für die Berechnung des Chi-Quadrat-Test nach Pearson verwendet. Die kumulative Häufigkeit von cerebralen Vasospasmen wurde nach der Kaplan-Meier Methode dargestellt. Die Signifikanz wurde definiert als ein Wert $p<0,05$. Die Daten wurden ausgedrückt als Mittelwerte und deren Standardabweichungen.

3 Ergebnisse

3.1 Zeitlicher Verlauf der 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$-Konzentration

Die bei Patienten über sieben Tage gemessenen arteriellen Konzentrationen lagen im Mittel bei 88,29±84,87 pg/ml. Einen nahezu konstanten Verlauf zeigten die Werte der Tage 1 bis 3. Am vierten Tag nach SAB zeigte sich im Vergleich zum Vortag ein Anstieg der Konzentration um 26,18 pg/ml auf 106,31 pg/ml und folgend am fünften Tag ein Abfall um 26,39 pg/ml. An den Tagen 6 und 7 war nochmals ein leichter Anstieg zu verzeichnen.

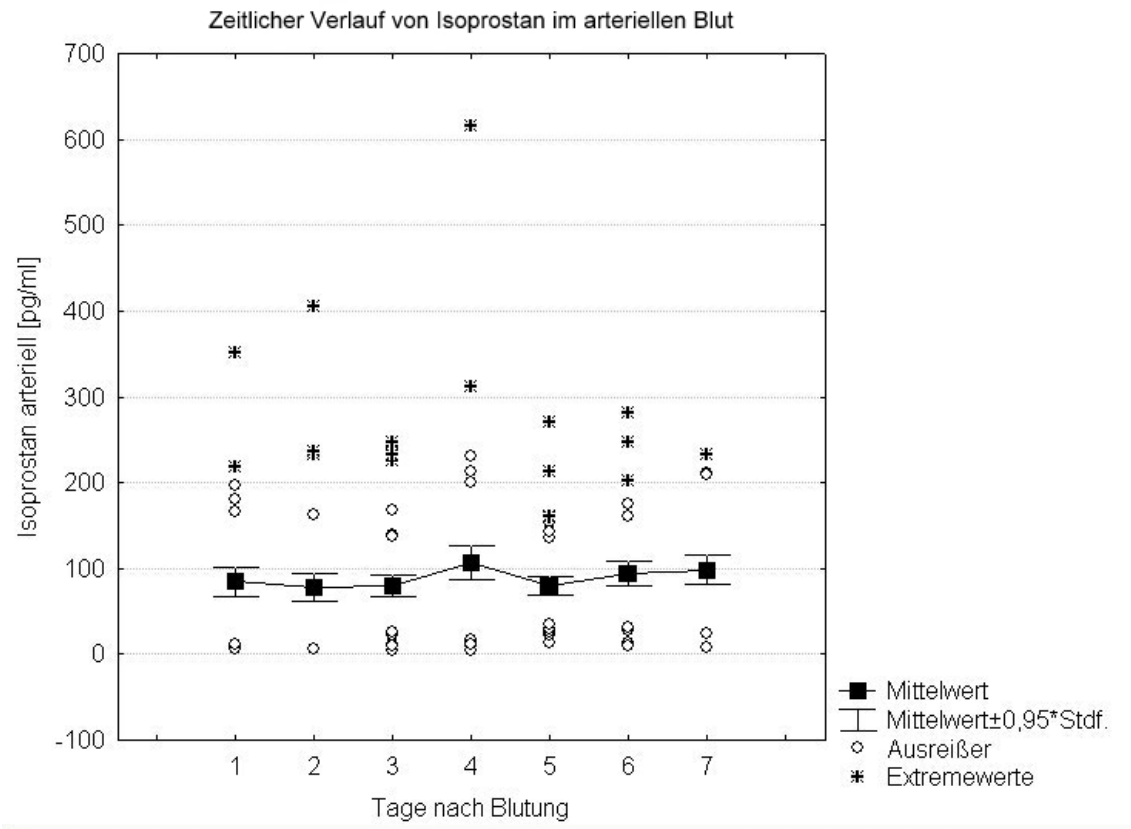
Jugularvenöse 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen lagen im Mittel bei 86,89±56,51 pg/ml. Von Tag 1 bis 3 sah man einen kontinuierlichen Abfall von 73,12 pg/ml auf 56,07 pg/ml. An den Tagen 4 und 5 stieg die Konzentration wiederum leicht an, um an den Tagen 6 und 7 nochmals gering abzufallen.

Zentralvenöse Konzentrationen waren im Mittel 45,72±50,87 pg/ml. Es zeigte sich ein Abfall der 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration von 51,53 pg/ml am Tag 2 bis auf 39,07 pg/ml am Tag 4. Danach stieg die Konzentration am Tag 6 wieder auf 56,19 pg/ml an.

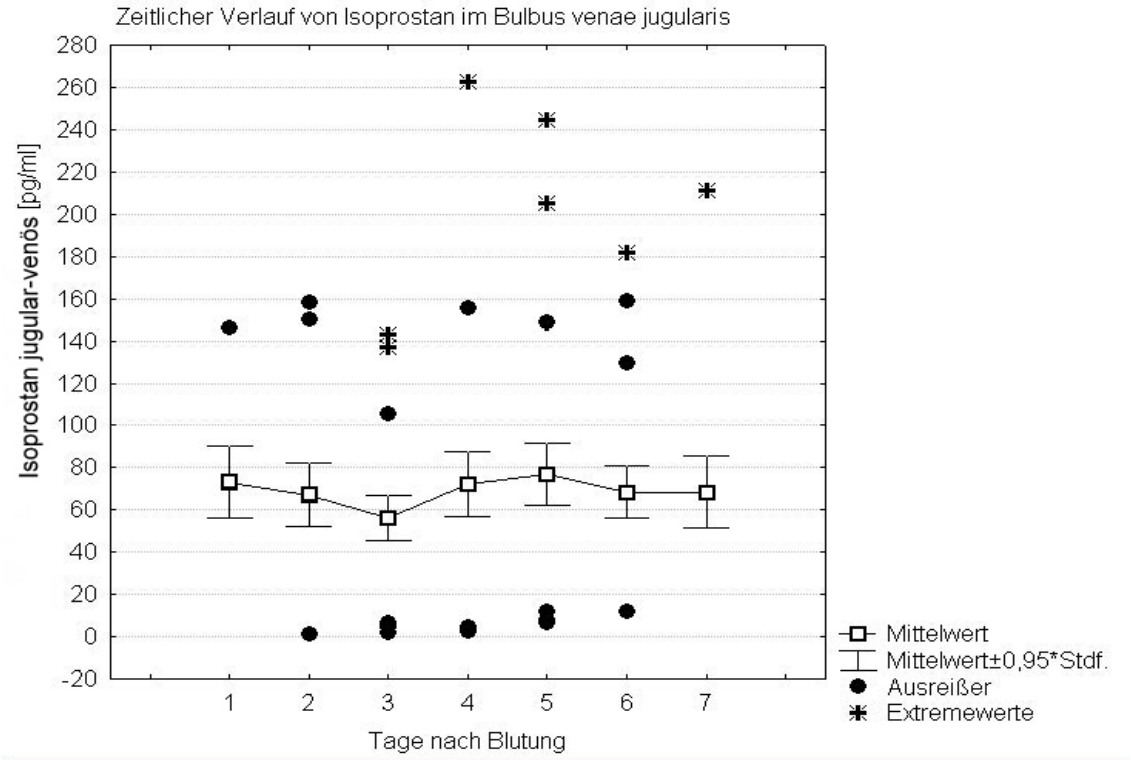
Im Liquor lagen die mittleren 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen bei 35,75±61,33 pg/ml. Von Tag 1 bis Tag 3 nach SAB fiel die Konzentration um 40,36 pg/ml auf 16,48 pg/ml und stieg anschließend langsam kontinuierlich bis Tag 7 auf 45,46 pg/ml an.

Die mittleren arteriellen 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen bei SAB-Patienten lagen um 54,3% höher als bei der Kontrollgruppe. Ebenso waren die jugularvenösen Konzentrationen im Mittel um 51,6% gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.

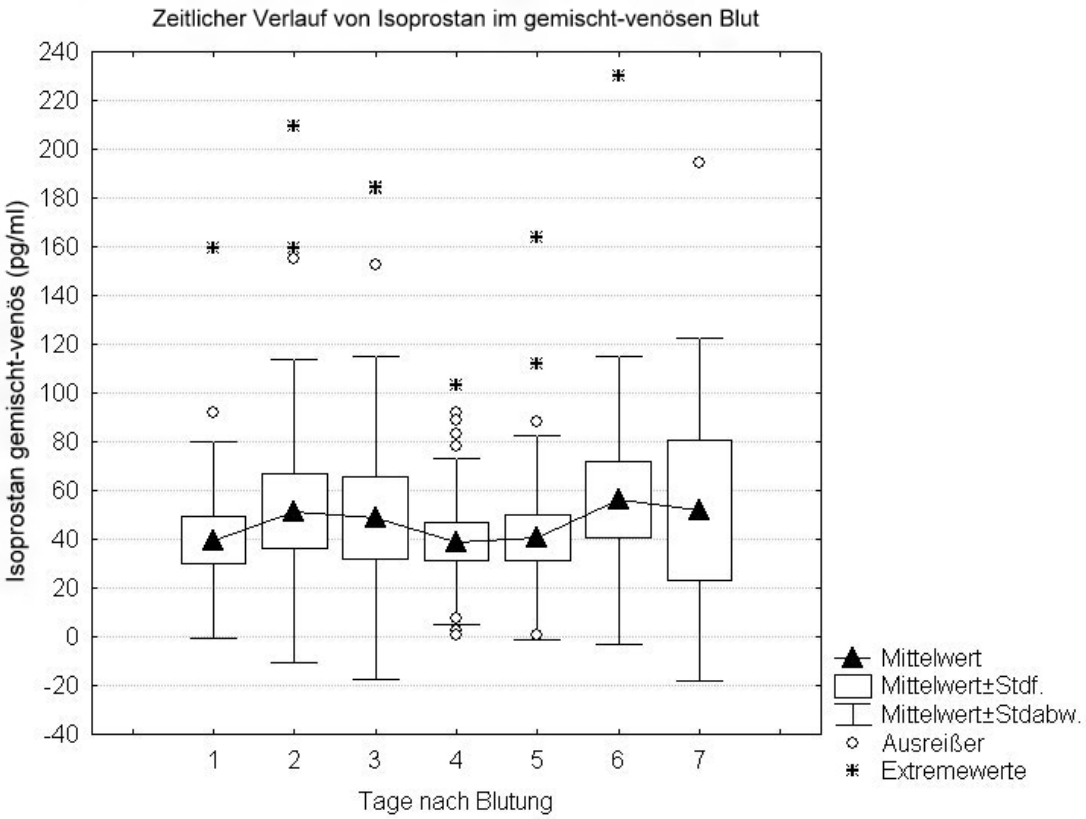
Nachdem im Vorversuch der Normwertebereich von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ im Blut ermittelt wurde, fanden sich in den Patientenproben pathologisch erhöhte 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen >100,69 pg/ml bei 56 Messungen im arteriellen, bei 23 Messungen im jugularvenösen und bei 13 Messungen im zentralvenösen Blut.



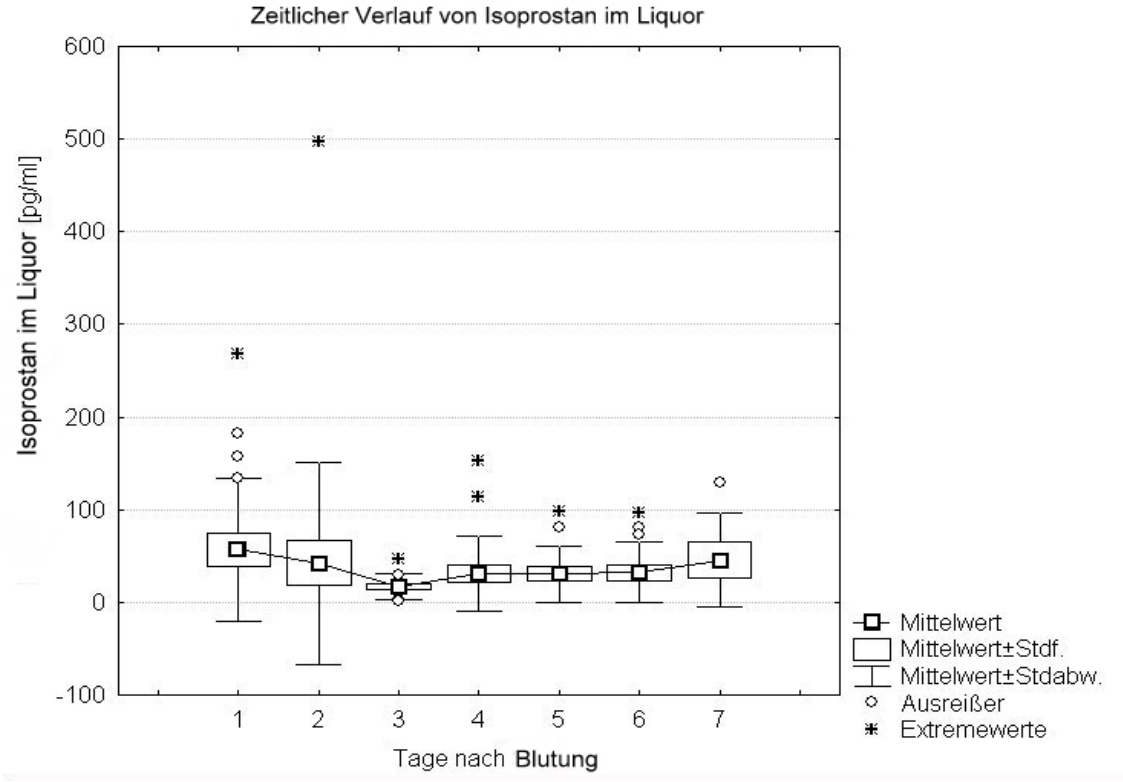
Grafik 1: Zeitlicher Verlauf von Isoprostan im arteriellen Blut



Grafik 2: Zeitlicher Verlauf von Isoprostan im jugular-venösen Blut



Grafik 3: Zeitlicher Verlauf von Isoprostan im gemischt-venösen Blut



Grafik 4: Zeitlicher Verlauf von Isoprostan im Liquor

3.2 Bildungsort des 8-iso $PGF_{2\alpha}$

Zur Eingrenzung des Produktionsortes von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ wurde zum einen die Differenz aus arteriellen und jugularvenösen Konzentrationen (ajvDIso) und die Differenz aus zentralvenöser und arterieller Konzentration (cvaDIso) gebildet. Hierbei stellten positive Werte für ajvDIso eine Aufnahme des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ ins Gehirn dar, negative Werte sprachen dagegen für eine Freisetzung aus dem Hirn. Negative Werte für cvaDIso standen für eine Freisetzung des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ aus der Lunge, positive Werte für eine sonstige Herkunft. In 77,8% der Fälle sah man eine Aufnahme ins Hirn, also positive Werte für ajvDIso. Eine Ausgabe aus der Lunge wurde in 84,3% der Fälle beobachtet, also negative Werte für cvaDIso. Somit liegt der Bildungsort des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ am häufigsten in der Lunge. Zu 66,7% wurde das in der Lunge gebildete 8-iso $PGF_{2\alpha}$ über den arteriellen Weg ins Hirn transportiert und dort aufgenommen (p=0,0166) (Tab.2).

Aufnahme Hirn	Ausgabe Lunge [%]		
	nein	ja	gesamt
nein	12,12	15,15	27,27
ja	6,06	66,67	72,73
gesamt	18,18	81,82	100,00

Tab.2: Bildungs- und Zielorgan von 8-iso $PGF_{2\alpha}$

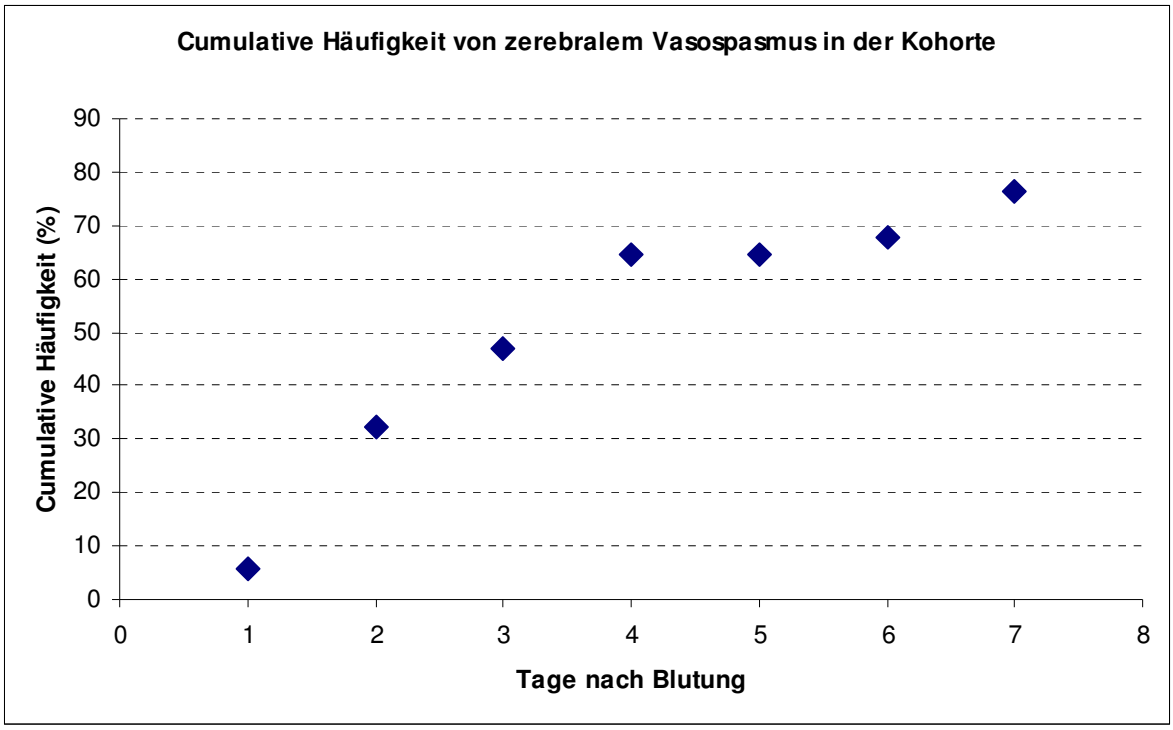
3.3 Cerebraler Vasospasmus

Mittels transkranieller Dopplersonografie (TCD) wurde der CVS nachgewiesen. Dieser definierte sich zum einen aus der Flussgeschwindigkeit in einer der beiden MCA ≥ 120 cm/s und zum anderen aus dem Lindegaard-Index ≥ 3,0.

Ab Tag vier nach SAB wurde erwartungsgemäß eine Häufung von cerebralen Vasospasmen dokumentiert (Tab.3).

Tag nach Blutung	1	2	3	4	5	6	7
Anzahl CVS	2	11	9	16	12	15	14
Anzahl der TCD-Messungen	13	19	20	25	18	19	19
% CVS	15	58	45	64	67	79	74

Tab.3: Häufigkeiten cerebraler Vasospasmen



Grafik 5: Cumulative Häufigkeit von zerebralem Vasospasmus in der Kohorte

Zwar schien ein CVS im Hinblick auf die Aufnahme von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ ins Hirn gehäuft mit diesem einherzugehen (47,6%), ein signifikanter Zusammenhang mit der Aufnahme des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ ins Hirn und der Entwicklung eines CVS lag aber nicht vor (p=0,7831).

Ein CVS trat bei 58,7% der Patienten auf, bei denen die arterielle 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration im Mittel 94,11 pg/ml betrug. Bei Patienten ohne CVS lag die arterielle Konzentration höher bei 106,14 pg/ml (p=0,5304) (Tab.4).

Beim Vorliegen eines CVS war bei 60,3% der Patienten eine jugularvenöse 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration von durchschnittlich 68,10 pg/ml zu messen, ohne CVS wurde eine Konzentration von 80,63 pg/ml gemessen (Tab.5).

58,1% der Patienten, die einen CVS entwickelten, wiesen eine 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration im Liquor von 37,77 pg/ml auf, während die Konzentration im Liquor ohne Vasospasmus bei 36,60 pg/ml lag (Tab.7).

Im zentralvenösen Blut lag bei 56,1% der Patienten mit CVS die 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration bei 47,14 pg/ml, ohne CVS betrug die Konzentration 69,08 pg/ml (Tab.6).

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines CVS und der Höhe der Konzentration von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ im arteriellen, jugularvenösen und zentralvenösen Blut sowie im Liquor bestand nicht (p=0,5304; p=0,4373; p=0,1672; p=0,9495).

Vasospasmus	8-iso $PGF_{2\alpha}$ arteriell MW ± STABW [pg/ml]	Häufigkeit [%]
nein	106,14 ± 85,18	41,3
ja	94,11 ± 102,48	58,7

Tab.4: Häufigkeit von CVS unter arteriellen Isoprostankonzentrationen

Vasospasmus	8-iso $PGF_{2\alpha}$ jugularvenös MW ± STABW [pg/ml]	Häufigkeit [%]
nein	80,63 ± 65,34	39,7
ja	68,10 ± 60,13	60,3

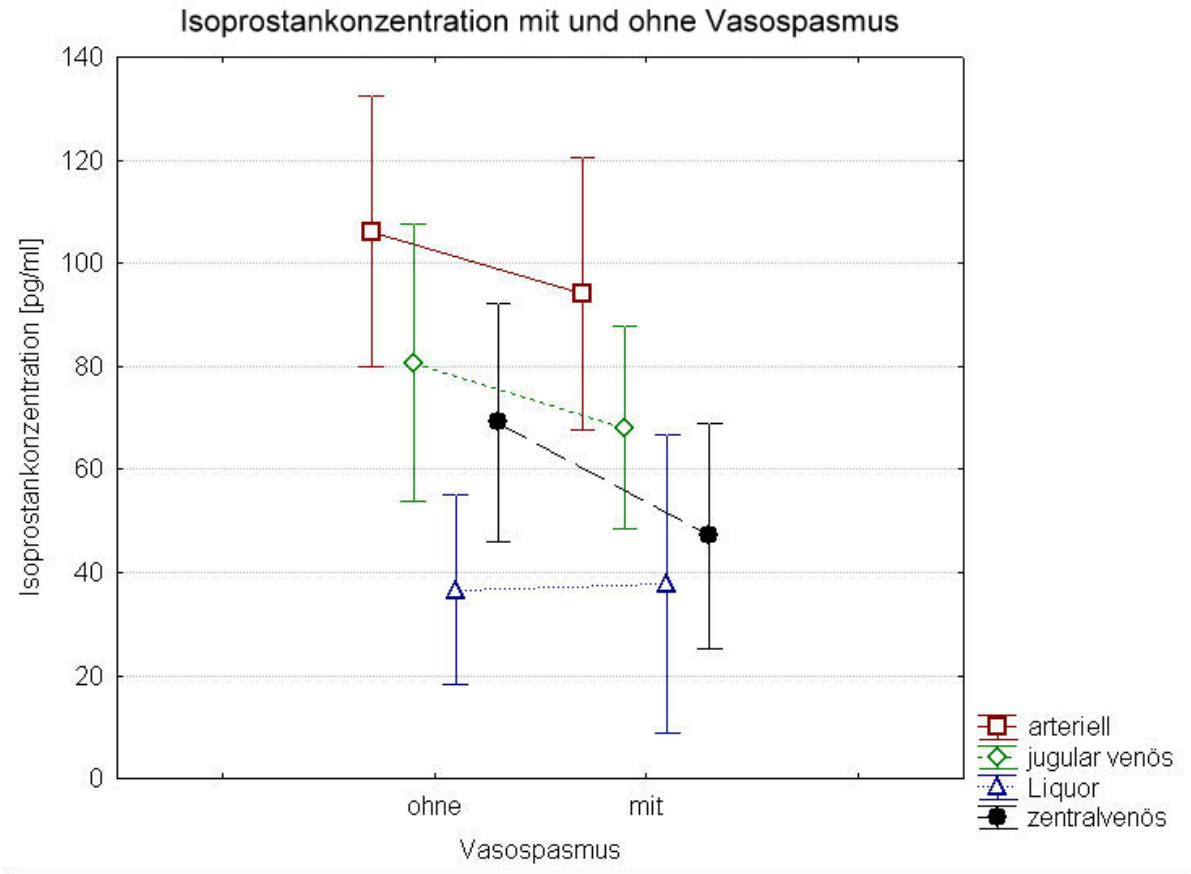
Tab.5: Häufigkeit von CVS unter jugularvenösen Isoprostankonzentrationen

Vasospasmus	8-iso $PGF_{2\alpha}$ zentralvenös MW ± STABW [pg/ml]	Häufigkeit [%]
nein	69,08 ± 55,92	43,9
ja	47,14 ± 60,82	56,1

Tab.6: Häufigkeit von CVS unter zentralvenösen Isoprostankonzentrationen

Vasospasmus	8-iso $PGF_{2\alpha}$ Liquor MW ± STABW [pg/ml]	Häufigkeit [%]
nein	36,60 ± 45,83	41,9
ja	37,77 ± 85,22	58,1

Tab.7: Häufigkeit von CVS unter Liquor-Isoprostankonzentrationen



Grafik 6: Isoprostankonzentration mit und ohne Vasospasmus

Es wurde deutlich, dass höhere 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen eher nicht zu einem CVS führten bzw. dass niedrigere Konzentrationen etwas häufiger mit CVS einhergingen.

3.4 Akutes Lungenversagen (ARDS)

Zur Diagnose eines akutes Lungenversagen (ARDS, Acute respiratory distress syndrome) wurden die Röntgenbefunde der Lungenaufnahmen und der Horowitz-Oxigenierungsindex (PaO_2/FiO_2) herangezogen. Alle Patienten mit einem Index <200 zeigten zuvor eine akute respiratorische Verschlechterung und Lungeninfiltrate. Hiernach wurde in 24,5% der Fälle ein ARDS diagnostiziert. Zu 19,4% ging das ARDS mit der Freisetzung von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ aus der Lunge einher. Die meisten Patienten (64,8%), die eine Ausgabe von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ aus der Lunge aufwiesen, entwickelten kein ARDS (Tab.12).

Bei 23,0% der Patienten mit ARDS lag eine arterielle 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration von durchschnittlich 83,65 pg/ml vor, bei denen ohne ARDS betrug die Konzentration 91,51 pg/ml (Tab.8).

Eine jugularvenöse 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration von im Mittel 85,22 pg/ml zeigten 18,9% der Patienten, die ein ARDS entwickelten. Diejenigen ohne ARDS hatten eine jugularvenöse Konzentration von 65,71 pg/ml (Tab.9).

Im Liquor zeigte sich bei 18,8% der Patienten mit ARDS eine 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration von 26,77 pg/ml, während bei denjenigen ohne ARDS die Konzentration im Liquor bei durchschnittlich 36,80 pg/ml betrug (Tab.11).

Zentralvenös war die Konzentration für 8-iso $PGF_{2\alpha}$ bei 23,1% der Patienten mit ARDS im Mittel 42,42 pg/ml, ohne ARDS im Mittel 46,72 pg/ml (Tab.10).

18,9% der Patienten, die eine Aufnahme des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ ins Hirn zeigten, hatten zudem ein ARDS (p=0,3932). Auch unter einem ARDS litten 19,4% der Patienten, die eine Ausgabe von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ aus der Lunge aufwiesen (p=0,9676).

Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines ARDS und der Höhe der arteriellen, jugularvenösen, zentralvenösen und der im Liquor gemessenen 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration (p=0,6102; p=0,2114; p=0,7126; p=0,4991).

	8-iso $PGF_{2\alpha}$ arteriell	
	MW ± STABW	Häufigkeit
ARDS	[pg/ml]	[%]
nein	91,51 ± 87,97	77,0
ja	83,65 ± 81,03	23,0

Tab.8: Häufigkeit von ARDS unter arteriellen Isoprostankonzentrationen

	8-iso $PGF_{2\alpha}$ jugularvenös	
	MW ± STABW	Häufigkeit
ARDS	[pg/ml]	[%]
nein	65,71 ± 58,37	81,1
ja	85,22 ± 53,67	18,9

Tab.9: Häufigkeit von ARDS unter jugularvenösen Isoprostankonzentrationen

ARDS	8-iso $PGF_{2\alpha}$ zentralvenös MW ± STABW [pg/ml]	Häufigkeit [%]
nein	46,72 ± 48,50	76,9
ja	42,42 ± 59,03	23,1

Tab.10: Häufigkeit von ARDS unter zentralvenösen Isoprostankonzentrationen

ARDS	8-iso $PGF_{2\alpha}$ Liquor MW ± STABW [pg/ml]	Häufigkeit [%]
nein	36,80 ± 65,87	81,2
ja	26,77 ± 31,92	18,8

Tab.11: Häufigkeit von ARDS unter Liquor-Isoprostankonzentrationen

ARDS	Ausgabe Lunge [%]		
	nein	ja	gesamt
nein	12,04	64,81	76,85
ja	3,70	19,44	23,15
gesamt	15,74	84,26	100,00

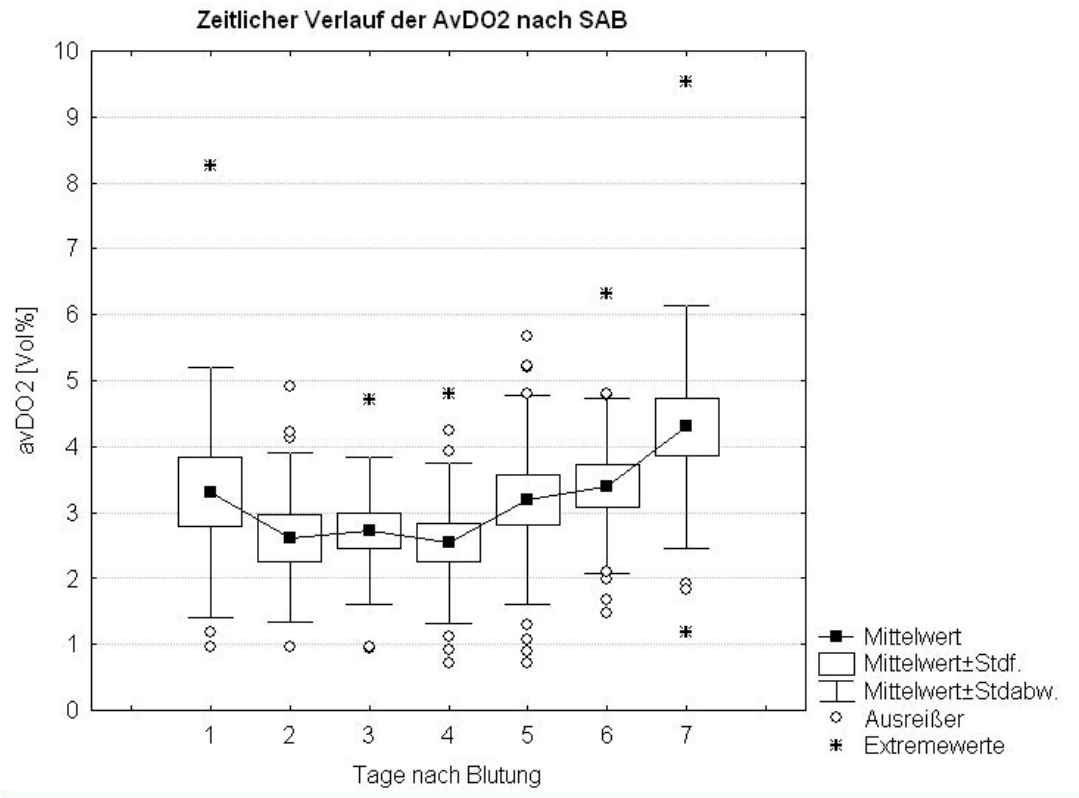
Tab.12: Häufigkeit von ARDS unter Ausgabe von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ aus der Lunge

3.5 Arterio-jugularvenöse Sauerstoffdifferenz

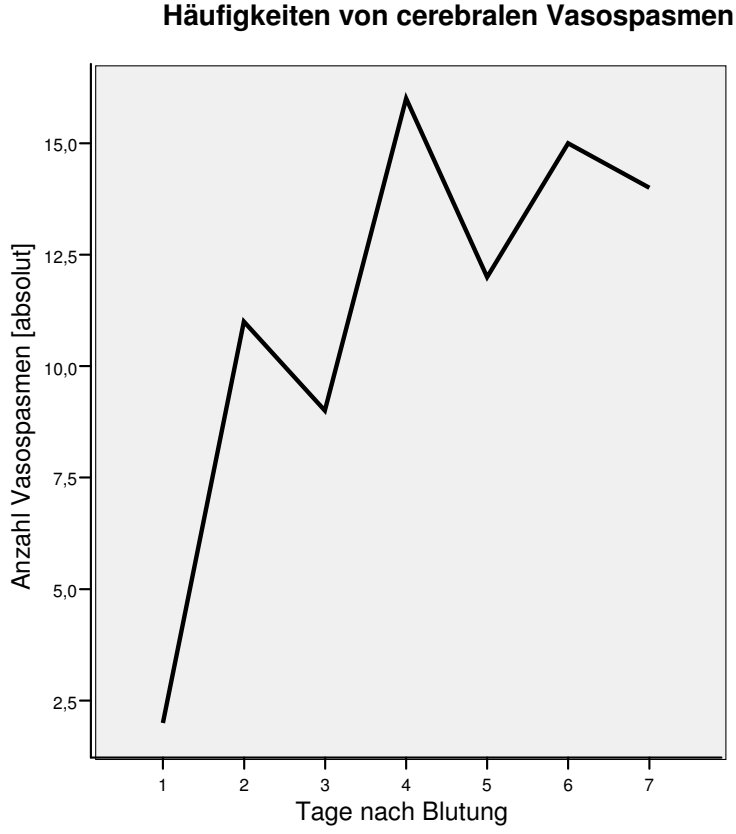
Die arterio-jugularvenöse Sauerstoffdifferenz ($avDO_2$) der SAB-Patienten war im Mittel niedriger als bei Normalpatienten. Durchschnittlich lag die $avDO_2$ bei 3,0 ± 1,6 Vol.-%. Normalwerte werden mit 6,7 ± 0,8 Vol.-% angegeben.

Zu Beginn zeigte die $avDO_2$ einen wenig alternierenden Verlauf. Ab Tag vier bis zum siebten Tag sah man dann einen Anstieg. Vergleichend mit der Graphik zur Häufigkeit von cerebralen Vasospasmen, war ein nahezu paralleler Verlauf sichtbar. Das heißt, mit steigender Rate an CVS nahm auch die $avDO_2$ zu.

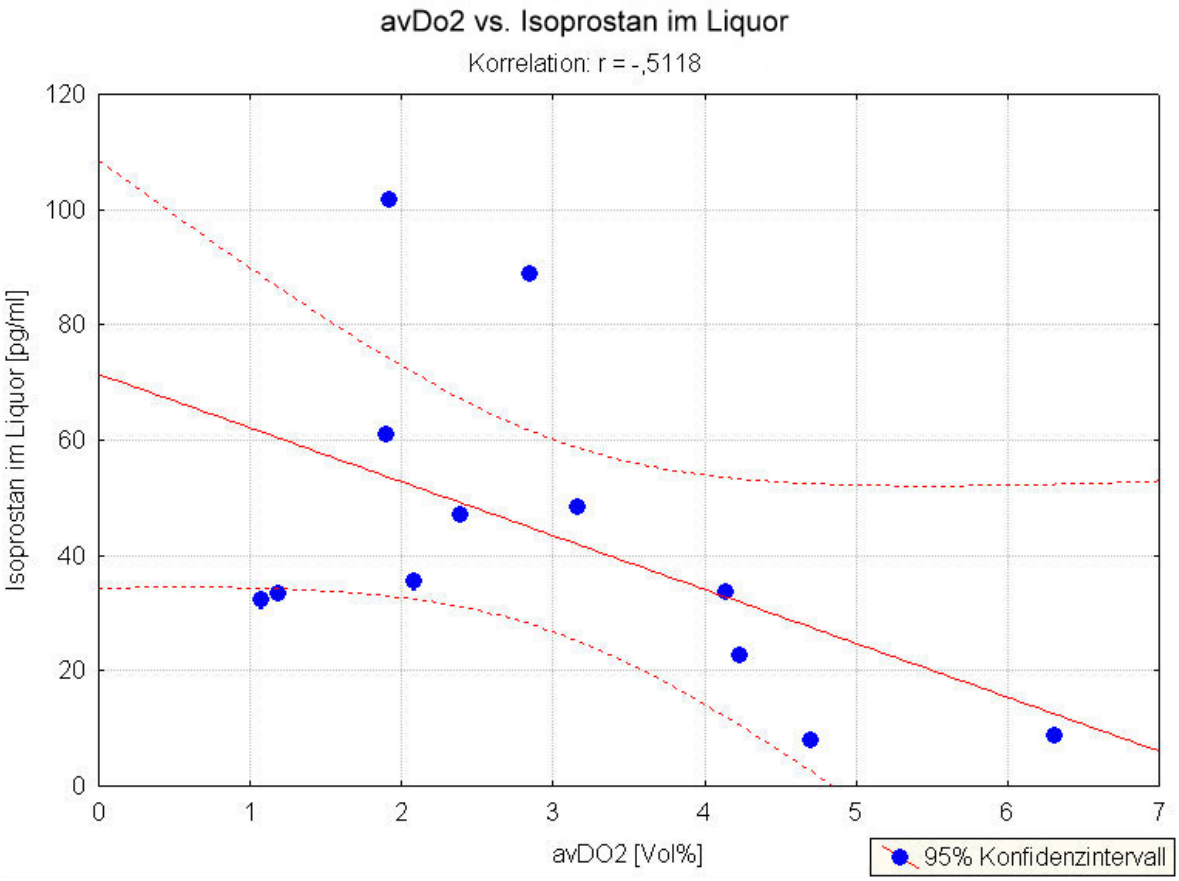
Die $avDO_2$ als globaler Marker der Sauerstoffaufnahme im Hirn und als Parameter von Ischämien zeigte keine Korrelation mit dem Auftreten erhöhter 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen im arteriellen, jugularvenösen und zentralvenösen Blut sowie im Liquor ($r=0,1197$; $r=-0,1466$; $r=-0,3649$; $r=-0,5118$). Nur 26,2% der Variabilität der $avDO_2$ sind durch die Höhe des 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Gehaltes im Liquor bedingt ($r^2=0,2619$) und konnte also hiermit nicht erklärt werden.



Grafik 7: Zeitlicher Verlauf der arterio-jugularvenösen Sauerstoffdifferenz nach Subarachnoidalblutung



Grafik 8: Häufigkeiten von cerebralen Vasospasmen



Grafik 9: Arterio-jugularvenöse Sauerstoffdifferenz versus Isoprostan im Liquor

4 Diskussion

4.1 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$-Konzentration und cerebraler Vasospasmus

Das Ziel der Studie war zum einen, die Höhe der 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration im arteriellen, jugularvenösen und zentralvenösen Blut sowie im Liquor von Patienten nach aneurysmatischer SAB zu bestimmen und zum anderen, den zeitlichen Verlauf der 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration in Bezug zum Auftreten eines cerebralen Vasospasmus nach SAB zu setzen. So sollte herausgefunden werden, ob 8-iso $PGF_{2\alpha}$, das in verschiedenen Tierversuchen in Nieren- (Takahashi et al. 1992), Lungen- (Morrow et al. 1997; Kang et al. 1993) und retinalen (Lehaie et al. 1998; Hou et al. 2004), sowie cerebralen Gefäßen von Schweinen (Hou et al. 2004) und Ratten (Hoffman et al. 1997) vasokonstriktorische Aktivität zeigt und durch oxidativen Stress entsteht, auch im menschlichen Hirn vasoaktive Wirkung entfaltet.

Alle gemessenen 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Werte der Patienten lagen im Normalwertebereich. Die mittleren arteriellen 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen bei SAB-Patienten waren um 54,3% höher als bei der Kontrollgruppe. Ebenso zeigten sich die jugularvenösen Konzentrationen im Mittel um 51,6% gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Man kann hier also aufgrund der durchschnittlich höheren Levels von einem erhöhten oxidativen Stress mit vermehrter Freisetzung von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ ausgehen.

Bei graphischer Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der arteriellen, jugularvenösen, zentralvenösen und Liquor-Konzentration von 8-iso $PGF_{2\alpha}$, erkennt man einen stark schwankenden Kurvenverlauf. Untereinander vergleichend, stellt sich ein unabhängiger Verlauf jeder Kurve von den anderen dar. Um dem 8-iso $PGF_{2\alpha}$ eine Rolle in der Provokation eines CVS nach SAB zukommen zu lassen, hätte man eine andere Entwicklung der gemessenen 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen erwartet. Es wurde zwar mit dieser klinisch experimentellen Studie eine Produktion des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ in der Lunge und eine Aufnahme desselben ins Hirn herausgefunden, jedoch konnte kein Zusammenhang mit der Entwicklung eines Vasospasmus der cerebralen Gefäße nachgewiesen werden.

Setzte man das Hirn und speziell den Subarachnoidalraum mit extravasalem Blut als Bildungsort des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ voraus, wäre eine erhöhte Konzentration im Liquor sehr wahrscheinlich. Wie in vorausgegangenen Experimenten bestätigt, gelten subarachnoidale Blutprodukte als Produzenten freier Radikale (Macdonald und Weir 1991; Nishizawa und Laher 2005; Pluta 2005), so dass man hier erhöhte Konzentrationen des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ hätte erwarten

können. Die Messergebnisse lieferten aber durchgehend niedrigere Werte als im Blut gemessene und waren unabhängig von der Entwicklung eines CVS.

Die Blutkonzentrationen von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ zeigten beim Auftreten eines CVS geringere Werte als beim Nichtauftreten eines CVS. Ohne Entwicklung eines CVS lagen die Werte im arteriellen Blut 12,8%, im jugularvenösen Blut 18,4% und im zentralvenösen Blut 46,5% höher. Im Liquor dagegen waren die 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen beim Auftreten eines CVS minimal um 3,2% höher als beim Nichtauftreten eines CVS. Ein signifikanter Zusammenhang ist aber weder für die Blut- noch für die Liquorkonzentrationen vorhanden.

4.2 ARDS und 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$-Konzentration

In der Literatur existieren bislang nur wenige Untersuchungen bezüglich des Zusammenhangs von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ und ARDS. Carpenter et al. (1998) stellten hierbei eine signifikant erhöhte Konzentration von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ im exhalierten Kondensat von ARDS-Patienten gegenüber gesunden Patienten fest. Unsere Messwerte im Blut und Liquor lagen durchschnittlich sowohl bei Patienten mit als auch ohne ARDS im Vergleich mit gesunden Probanden im Normalwertebereich. Hierbei zeigten sich zwar vom Mittelwert ausgehend um 46,2% – 48,9% erhöhte Werte im arteriellen und jugularvenösen Blut gegenüber den Blutwerten der gesunden Probanden. Allerdings war auch die mittlere arterielle Konzentration bei Patienten ohne ARDS um 59,9% gegenüber dem mittleren Normalwert erhöht. Zentralvenös lagen die 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen sowohl bei Patienten mit als auch ohne ARDS gering unterhalb des mittleren Normalwertes im Normalbereich.

Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines ARDS und der Höhe der arteriellen, jugularvenösen, zentralvenösen und der im Liquor gemessenen 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration. Die Messung der 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration im Blut ist daher als Marker oxidativen Stresses in der Lunge und damit Indikator für ein bevorstehendes oder bestehendes ARDS ungeeignet.

Betrachtet man das Verhältnis vom Bestehen eines ARDS zur Ausgabe von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ aus der Lunge, wird die Untauglichkeit als Marker zusätzlich gefestigt. Denn nur 19,4% der Patienten mit ARDS zeigten gleichzeitig eine Ausgabe von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ über den arteriellen Weg aus der Lunge.

Die Untersuchungen zum ARDS wurden auch unternommen um ausfindig zu machen, ob ein erhöhtes Sauerstoff-Angebot über die inspiratorische Sauerstoff-Konzentration (FiO_2) vermehrt zu einem Anfall von Sauerstoffradikalen und damit zu oxidativem Stress führt. Als

Folge wären durchaus stark erhöhte 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen über dem Normalwertebereich im arteriellen Blut zu erwarten gewesen.

Aus den vorliegenden Ergebnissen wird deutlich, dass kein Zusammenhang zwischen durch oxidativen Stress entstandenem 8-iso $PGF_{2\alpha}$ in der Lunge, ARDS und dem Auftreten von cerebralen Vasospasmen gegeben ist, da eine Ausgabe von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ aus der Lunge, wie bereits beschrieben, ebenfalls unabhängig vom Auftreten cerebraler Vasospasmen war.

Dass die Blutspiegel der Patienten vor allem arteriell überwiegend im oberen Normalwertebereich lagen, kann man am ehesten begründen mit einem Auftreten von mäßig oxidativen Stress in der Lunge. Dass das 8-iso $PGF_{2\alpha}$ auch in der Lunge nicht direkt zur Entwicklung eines ARDS durch pulmonale Vasokonstriktion beiträgt, könnte daran liegen, dass es, wie für den CVS vermutet, nur als Trigger fungiert. Die das ARDS begleitenden pulmonalen Vasokonstriktionen könnten unter anderem durch Endothelin-1 und durch Thromboxan A_2 hervorgerufen werden (Druml et al. 1993).

4.3 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ – ein direkter Vasokonstriktor?

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen darauf schließen, dass 8-iso $PGF_{2\alpha}$ keinen direkten Einfluss auf die cerebrale Vasokonstriktion bei SAB-Patienten hat.

Wenn man die Methodik anderer auf tierexperimenteller Basis durchgeführten Studien zum Nachweis einer Vasoaktivität von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ genauer eruiert, wird deutlich, dass das 8-iso $PGF_{2\alpha}$ als Produkt aus der Cyclooxygenase-unabhängigen, durch freie Radikale induzierten Peroxidation der Arachidonsäure von extern und hoch dosiert zugeführt wurde und nicht die körpereigene Produktion zum Beispiel im Blut gemessen wurde. Einzig stellte man hierdurch fest, dass es zu einer vasokonstriktorischen Reaktion gekommen ist, die durch TXA_2/PGH_2-Rezeptor-Blocker rückgängig war.

Ungeklärt bleibt weiterhin, über welche Rezeptoren 8-iso $PGF_{2\alpha}$ seine Wirkung generiert oder ob ein eigener Rezeptor existiert. Zwar wird in der Literatur beschrieben, dass seine vasokonstriktorischen Effekte durch TXA_2-Rezeptor-Blocker aufgehoben werden (Kang et al. 1993), es dabei aber nicht direkt an den TXA_2-Rezeptor bindet (Fukunaga et al. 1993). Die topische Applikation von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ stimuliert in Retinagefäßen von Schweinen die TXA_2- und die Endothelin-1-Synthese und führt hierdurch zur Vasokonstriktion (Lahaie et al. 1998). Auch in einem anderen Experiment an neonatalen Schweinehirnen mit topischer Applikation wirkt 8-iso $PGF_{2\alpha}$ indirekt vasokonstriktorisch über die Stimulation von TXA_2 und Ca^{2+}-Ausschüttung in Astrozyten und Endothelzellen (Hou et al. 2000), so dass ihm hier nur eine

Mitwirkung an gefäßaktiven Prozessen während des oxidativen Stresses zugesprochen werden kann und keine eigenständige Wirkung vorliegt.

Es ist davon auszugehen, dass, wie in den Tierexperimenten bereits vermutet, 8-iso $PGF_{2\alpha}$ nicht direkt vasoaktiv wirksam ist. Die Triggerung anderer vasokonstriktorisch wirkender Substanzen wie Endothelin-1 oder Thromboxan A_2 muss angenommen werden. Für Endothelin-1 wurde bereits mehrfach bestätigt, dass es als Prädiktor eines CVS im Liquor nachgewiesen werden kann (Kaestner et al. 2005, Suzuki et al. 2000, Kessler et al. 2005). Und es wurde belegt, dass 8-iso $PGF_{2\alpha}$ einen Anstieg von Endothelin-1 induziert und dieses hierüber zur Vasokonstriktion führt (Fukunanga et al. 1993, Yura et al. 1999).

Es ist also eher wahrscheinlich, dass 8-iso $PGF_{2\alpha}$ als Mediator im Vorgang einer Vasokonstriktion dienen könnte, als diese selbst zu verursachen.

4.4 $AvDO_2$ und Cerebraler Vasospasmus

Die arterio-jugularvenöse Sauerstoffdifferenz ($avDO_2$) ist ein Parameter für globale zerebrale Ischämien und zeigte eine Zunahme ab dem vierten Tag nach SAB. Parallel hierzu nahm auch die Rate an CVS zu. Die $avDO_2$ könnte somit zusätzlich zur TCD zur Bestätigung und Sicherung der Detektion von CVS herangezogen werden. Dies bestätigten Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen (Oertel et al. 2007).

Die 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen korrelierten nicht mit der $avDO_2$ und bestätigten somit die Vermutung, dass 8-iso $PGF_{2\alpha}$ zumindest kein direkter Verursacher von Ischämien bzw. CVS ist.

4.5 Angewandte Methoden

Die durchgeführten transkraniellen Dopplersonographien sind ein gängiges Verfahren, um cerebrale Vasospasmen zu diagnostizieren und werden von den Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) mit dem Empfehlungsgrad B angegeben. Der Vorteil dieser Methode ist eine schnelle und am Patientenbett durchführbare Methode, die keine invasiven Maßnahmen mit sich führt. Angenommen, 8-iso $PGF_{2\alpha}$ hätte sich als sicherer Marker und Prädiktor für CVS herausgestellt, wäre die Bestimmung dieses Parameters mit sehr hohem zeitlichen und monetären Aufwand begleitet gewesen und hätte sich im klinischen Alltag wahrscheinlich gegen den bisherigen Standard der cerebralen Angiographie nicht durchsetzen können. Somit bleibt die TCD weiterhin als validiertes und nichtinvasives Verfahren in der Diagnostik von CVS beständig.

Die Anwendung der Bulbusoxymetrie ist nicht unumstritten. In der kontinuierlichen Messung der jugularvenösen Sauerstoffsättigung ($SjvO_2$) können nur etwa 50% der Werte verwendet werden. Die Ursache liegt darin, dass die Spitze des Katheters dann nicht richtig misst, wenn der Katheter an der Gefäßwand anliegt. Da wir keine kontinuierlichen Messungen bezüglich der $SjvO_2$ für die Studie vorgenommen haben, sondern zu bestimmten Zeiten jugularvenöses Blut zur Bestimmung der $avDO_2$ und der 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration entnahmen, konnten wir hier von einer sicheren Methode ausgehen.

Das 8-Isoprostane EIA Kit der Cayman Chemical Company hat bereits in vielen Experimenten zur Bestimmung von 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen Anwendung gefunden und stellte sich im Labor als gut handhabbar heraus. Allerdings ist die Methodik sehr zeitaufwändig und für eine schnelle Bestimmung eher nicht geeignet.

4.6 Schlussfolgerung

Nach einer SAB lagen die mittleren arteriellen und jugularvenösen 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentrationen im oberen Normalwertebereich, so dass man bei Vorliegen dieser Erkrankung von begleitendem oxidativen Stress ausgehen kann. Die Produktion von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ findet nach SAB in der Mehrzahl der Patienten durch die Lunge statt. 8-iso $PGF_{2\alpha}$ wird vom Gehirn aufgenommen. Der weitere Stoffwechselweg von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ im Hirn bleibt noch offen. 8-iso $PGF_{2\alpha}$ scheint kein direkter Vasokonstriktor zerebraler Gefäße zu sein. Es bleibt zu vermuten, dass es in der Regelung des Vasotonus nur als Mediator fungiert. Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen der 8-iso $PGF_{2\alpha}$-Konzentration im Blut und des akuten Lungenversagens ausgeschlossen werden.

5 Zusammenfassung

8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ (8-iso $PGF_{2\alpha}$) ist in Tierexperimenten und einer Vielzahl von neurologischen Erkrankungen ein etablierter Marker für oxidativen Stress. Es hat in einer Reihe von Gefäßen vasokonstriktive Effekte, so auch an Hirngefäßen von Ratten und Schweinen. Der oxidative Stress nach aneurysmatischer Subarachnoidalblutung (SAB) im Menschen wurde in einer Vielzahl von Studien durch unterschiedliche Marker mit Ausnahme von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ nachgewiesen. Die vorliegende Arbeit wurde zur Klärung der Hypothese durchgeführt, dass 8-iso $PGF_{2\alpha}$ auch nach SAB als Marker oxidativen Stresses verwendet werden kann und eine Verbindung zur Entstehung des cerebralen Vasospasmus hat.

Insgesamt 34 Patienten nach SAB (mittleres Alter 53,0 ± 14,6 Jahren, männlich:weiblich=1:2,8) aller Hunt&Hess- und Fisher-Grade wurden untersucht. Die folgenden Parameter wurden täglich aufgezeichnet: die 8-iso $PGF_{2\alpha}$ Konzentrationen des arteriellen, zentralvenösen und jugularvenösen Blutes sowie des Liquors, der arterielle Partialdruck für Sauerstoff (PaO_2), der Anteil des inspiratorischen Sauerstoffgehalts (FiO_2), die Blutflussgeschwindigkeiten beider mittleren Hirnarterien und der korrespondierenden Arteriae carotides internae, sowie die arterio-jugularvenöse Differenz für Sauerstoff ($avDO_2$). Zur Bestimmung der Produktionsstätte von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ wurde die arteriovenöse Differenz über Hirn und Lunge berechnet. In Kontrollexperimenten wurde die Konzentration von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ im venösen Blut von gesunden, nichtrauchenden Kaukasiern bestimmt.

Insgesamt war 8-iso $PGF_{2\alpha}$ bei SAB Patienten im Vergleich zu gesunden Kaukasiern leicht erhöht, jedoch nicht signifikant und im Rahmen der normalen Schwankungsbreite. In den meisten Patienten und Messungen wurde 8-iso $PGF_{2\alpha}$ in den Lungen produziert und vom Gehirn aufgenommen. Es gab keine Beziehung zwischen 8-iso $PGF_{2\alpha}$ und erhöhten Blutflussgeschwindigkeiten im TCD, welche zerebralen Vasospasmus anzeigen würden. Es gab keine Korrelation zwischen der $avDO_2$ und 8-iso $PGF_{2\alpha}$. Die pulmonale Produktion von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ stand in keinem Zusammenhang mit dem gleichzeitigen Auftreten von ARDS oder erhöhtem FiO_2.

Nach SAB gibt es wahrscheinlich keinen Zusammenhang zwischen 8-iso $PGF_{2\alpha}$ und zerebralen Vasospasmus. 8-iso $PGF_{2\alpha}$ wird vorwiegend in den Lungen produziert und vom Hirn aufgenommen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die biochemische Rolle von 8-iso $PGF_{2\alpha}$ im Hirnmetabolismus zu klären.

6 Summary

8-iso $PGF_{2\alpha}$ is a well known and established marker of oxidative stress in animal experiments. In addition, it has vasoconstrictive properties in a variety of vessels including cerebral arteries of pigs and rats. Oxidative stress after aneurysmal subarachnoid hemorrhage (SAH) in humans has been proven in numerous investigations by a variety of markers except 8-iso $PGF_{2\alpha}$. This study was conducted to test the hypothesis that 8-iso $PGF_{2\alpha}$ is a marker of oxidative stress and related to cerebral vasospasm after SAH in humans.

A total of 34 SAH patients (mean age 53,0 ± 14,6 years, male:female=1:2,8) of all Hunt&Hess and Fisher Grades were included into the study. The following parameters were recorded daily: arterial, central venous, jugular venous and cerebrospinal fluid concentrations of 8-iso $PGF_{2\alpha}$, arterial partial pressure of oxygen (PaO_2), inspiratory fraction of oxygen (FiO_2), blood flow velocity of the medial cerebral arteries and the internal carotid arteries and the arterio-jugular venous differences of oxygen ($avDO_2$). To determine the production site of 8-iso $PGF_{2\alpha}$ arteriovenous differences were calculated for the brain and the lungs. In control experiments, 8-iso $PGF_{2\alpha}$ concentrations of healthy caucasian volunteers were measured.

Overall 8-iso $PGF_{2\alpha}$ was slightly increased but within normal ranges in arterial blood of patients after SAH compared with healthy persons. In most of the patients 8-iso $PGF_{2\alpha}$ was produced in the lungs and taken up by the brain. There was no relationship with 8-iso $PGF_{2\alpha}$ and elevated TCD blood flow velocities that indicate cerebral vasospasm (CVS). There was no correlation between $avDO_2$ and 8-iso $PGF_{2\alpha}$. The pulmonary production of 8-iso $PGF_{2\alpha}$ was not related to the presence of ARDS or elevated FiO_2.

After SAH, 8-iso $PGF_{2\alpha}$ is not directly related to CVS. 8-iso $PGF_{2\alpha}$ is primarily produced by the lungs and there is an uptake of 8-iso $PGF_{2\alpha}$ into the brain. Further studies are warranted to clarify the biochemical role of 8-iso $PGF_{2\alpha}$ within the brain metabolism.

7 Literaturverzeichnis

Aleynik SI, Leo MA, Aleynik MK, Lieber CS. Increased circulating products of lipid peroxidation in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:192-196.

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)-Leitlinien-Register, Nr. 030/073. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie; 4. überarbeitete Auflage 2008, S. 654 ff, ISBN 978-3-13-132414-6; Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Audoly LP, Rocca B, Fabre JE, Koller BH, Thomas D, Loeb AL, Coffman TM, FitzGerald GA. Cardiovascular Responses to the Isoprostanes $iPF_{2\alpha}$-III and iPE_2-III Are Mediated via the Thromboxane A_2 Receptor In Vivo. *Circulation* 2000;101:2833-2840.

Carpenter CT, Price PV, Christman BW. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patiens with acute lung injury and ARDS. *Chest* 1998;114:1652-1659.

Cayman Chemical Company. 8-Isoprostane EIA Kit (2000). Catalog No. 516351. 1180 E. Ellsworth Rd., Ann Arbor, MI 48108, USA.

Chow M, Dumont AS, Kassell NF. Endothelin receptor antagonists and cerebral vasospasm: an update. *Neurosurg* 2002;51:1333-1341.

Clark JF, Sharp FR. Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:1223-1233.

Cook DA. Mechanisms of cerebral vasospasm in subarachnoid haemorrhage. *Pharmacol Ther* 1995;66:259-284.

Cook DA, Vollrath B. Free radicals and intracellular events associated with cerebrovascular spasm. *Cardiovasc Res* 1995;30:493-500.

Cracowski JL, Devillier P, Durand T, Stanke-Labesque F, Bessard G. Vascular Biology of the Isoprostanes. *J Vasc Res* 2001;38:93-103.

Cracowski JL, Carpentier PH, Imbert B, et al. Increased urinary F_2-isoprostanes in systemic sclerosis but not in primary Raynaud's phenomenon. Effect of a cold exposure. *Arthritis Rheum* 2002;46:1319-1323.

Cracowski JL. Isoprostanes: an emerging role in vascular physiology and disease? *Chem Phys Lip* 2004;128:75-83.

Cranshaw JH, Evans TW, Mitchell JA, Characterization of the effects of isoprostanes on platelet aggregation in human whole blood. *Br J Pharmacol* 2001;132:1699-1706.

Davi G, Ciabattoni G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, et al. In vivo formation of 8-isoprstaglandin $F_{2\alpha}$ and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999;99:224-229.

Dorsch NW. Cerebral arterial spasm – a clinical review. *Br J Neurosurg* 1995;9:403-412.

Fox JL. Intracranial vasospasm: A study with iron compounds. *Surg Neurol* 1979;11:363-368.

Fukunaga M, Makita N, Roberts II LJ, Morrow JD, Takahashi K, Badr KF. Evidence for the existance of F_2-isoprostane receptors on rat vascluar smooth muscle cells. *Am J Cell Pysiol* 1993;264:C1619-C1624

Gopaul NK, Änggård EE, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, Nourooz-Zadeh J. Plasma 8-epi-PGF2a levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Letters* 1995;368:225-229.

Halliwell B, Gutteridge MC. Free radicals in biology and medicine. *New York: Oxford University Press* 1999; p. 27.

Hanggi D, Steiger HJ. Nitric oxide in subarachnoid haemorrhage and ist therapeutics implications. *Acta Neurochir Suppl* 2006;148:605-613.

Hoffman SW, Moore S, Ellis EF. Isoprostanes: Free Radical-Generated Prostaglandins With Constrictor Effects on Cerebral Arterioles. *Stroke* 1997;28:844-849.

Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KF. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Pysiol Rev* 1996;76:967-1003.

Hou X, Roberts II LJ, Gobeil Jr F, Taber DF, Kanai K, Abran D, Brault S, Checchin D, Sennlaub F, Lachapelle P, Varma DR, Cemtob S. Isomer-specific contractile effects of a series of synthetic F_2-ioprostanes on retinal and cerebral microvasculature. *Free Radic Biol Med* 2004;36:163-172.

Hou X, Gobeil Jr F, Peri K, Speranza G, Marrache AM, Lachapelle P, Roberts II LJ, Varma DR, Chemtob S, Ellis Earl F. Augmented Vasoconstriction and Thromboxane Formation by 15-F2t-Isoprostane (8-Iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$) in Immature Pig Periventricular Brain Microvessels. *Stroke* 2000;31:516-524.

Kästner S, Oertel MF, Scharbrodt W, Krause M, Böker DK, Deinsberger W. Endothelin-1 in plasma, cisternal CSF and microdialysate following aneurysmal SAH. *Acta Neurochir (Wien)* 2005;147:1271-1279.

Kamezaki T, Yanaka D, Nagase S, et al. Increased levels of lipid peroxides as predictive of symptomatic vasospasm and poor outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 2002;97:1302-1305.

Kang KH, Morrow JD, Roberts II LJ, Newman JH, Banerjee M. Airway and vascular effects of 8-epi-prostaglandin F2 alpha in isolated perfused rat lung. *J Appl Physiol* 1993;74:460-465.

Kessler IM, Pacheco YG, Lozzi SP, de Araújo AS Jr, Onishi FJ, de Mello PA. Endothelin-1 levels in plasma and cerebrospinal fluid of patients with cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol* 2005;64:2-5.

Khurana VG, Besser M. Pathophysiological basis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *J Clin Neurosci* 1997;4(2):122-131.

Kolias AG, Sen J, Belli A. Pathogenesis of cerebral vasospasm following aneurysmal aubarachnoid hemmorhage: putative mechanisms and novel approaches. *J Neurosc Res* 2009;87:1-11.

Lahaie E, Hardy P, Hou X, Hasséssian H, Asselin P, Lachapelle P, Almazan G, Varma DR, Morrow JD, Roberts II LJ, Chemtob S. A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ on retinal vessels. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1998;274:1406-1416.

Macdonald RL, Weir BK. A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* 1991;22:971-982.

Macdonald RL, Kassell N, Mayer S, Ruefenacht D, Schmiedek P, Weidauer S, Frey A, Roux S, Pasqualin A, CONSCIOUS-1 Investigators. Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial. *Stroke* 2008;39(11):3015-3021.

Marin JG, Cornet S, Spinnewyn B, Demerlé-Pallardy C, Auguet M, Chabrier PE. BN 80933 inhibits F_2-isoprostane elevation in focal cerebral ischaemia and hypoxic neuronal cultures. *Neuroreport* 2000;11(6):1357-1360.

Meagher EA, Barry OP, Burke A, Lucey MR, Lawson JA, Rokach J, Fitzgerald GA. Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans. *J Clin Invest* 1999;104:805-813.

Minuz P, Andrioli G, Degan M, Gaino S, Ortolani R, Tommasoli R, Zuliani V, Lechi A, Lechi C. The F_2-Isoprostane 8-Epiprostaglandin F_{2a} Increases Platelet Adhesion an Reduces the Antiadhesive and Antiaggregatory Effects of NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1248-1256.

Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of haemoglobin. *J Biol Chem* 1972;247:6960-6962.

Montuschi P, Corradi M, Ciabattoni G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-Isoprostane, a Marker of Oxidative Stress, in Exhaled Condensate of Asthma Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:216-220.

Moore KP, Darley-Usmar V, Morrow JD, Roberts II LJ. Formation of F_2-Isoprostanes During Oxidation of Human Low-Density Lipoprotein and Plasma by Peroxynitrite. *Circulation Research* 1995;77:335-341.

Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts II LJ. Increase in circulation products of lipid peroxidation (F_2-isoprostanes) in smokers. *N Engl J Med* 1995;332:1198-1203.

Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts II LJ. Non-cyclooxygenase derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10721-10725.

Morrow JD, Minton TA, Roberts II LJ. The F_2-isoprostane, 8-epiprostaglandin F_2 alpha, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins* 1992;44:155-163.

Morrow JD, Harris TM, Roberts II LJ. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: Analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal Biochem* 1990;184:1-10.

Nishizawa S, Laher I. Signaling mechanisms in cerebral vasospasm. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15:24-34.

Obata T, Tomaru K, Nagakura T, Izumi Y, Kawamoto T. Smoking and oxidant stress: assay of isoprostane in human urine by gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;746:11-15.

Oertel MF, Scharbrodt W, Wachter D, Stein M, Schmidinger A, Böker DK. Arteriovenous differences of oxygen and transcranial Doppler sonography in the management of aneurysmatic subarachnoid hemorrhage. *J Clin Neurosci* 2008;15(6):630-6.

Ohashi N, Yoshikawa M. Rapid and sensitive quantification of 8-isoprostaglandine $F_{2\alpha}$ in human plasma and urine by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;746:17-24.

Ohlstein EH, Storer BL. Oxyhemoglobin stimulation of endothelin production in cultured endothelial cells. *J Neurosurg* 1992;77:274-278.

Pluta RM. Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide: review, new hypothesis, and proposed treatment. *Pharmacol Ther* 2005;105:23-56.

Polidori MC, Frei B, Rordorf G, Ogilvy CS, Koroshetz WJ, Beal MF. Increased levels of plasma cholesteryl ester hydroperoxides in patients with subarachnoid hemorrhage. *Free Radic Biol Med* 1997;23:762-767.

Praticò D, Iuliano L, Mauriello A, Spagnoli L, Lawson JA, Maclouf J, Violi F, Fitzgerald GA. Localization of distinct F_2-isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997;100:2028-2034.

Praticò D, Lee MY, Trojanowski JQ, Rokach J, FitzGerald GA. Increased F_2-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB J* 1998;12:1777-1783.

Reilly MP, Praticò D, Delanty N, DiMinno G, Tremoli E, Rader D, Kapoor S, Rokach J, Lawson J, FitzGerald GA. Increased formation of distinct F_2-isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:2822-2828.

Reilly MP, Delanty N, Lawson JA, FitzGerald GA. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation* 1996;94:19-25.

Rice TW, Wheeler AP, Bernard GR, Hayden DL, Schoenfeld DA, Ware LB. Comparison of the SpO_2/FiO_2 Ratio and the PaO_2/FiO_2 Ratio in Patients With Acute Lung Injury or ARDS. *Chest* 2007;132:410-417.

Roberts II LJ, Morrow JD. Measurement of F_2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000;4:505-513.

Sano K, Asano T, Tanishima T, et al. Lipid peroxidation as a cause of cerebral vasospasm. *Neurol Res* 1980;2:253-272.

Suzuki H, Kanamaru K, Kuroki M, Sun H, Waga S, Miyazawa T. Effects of tiralazad mesylate on vasospasm and phospholipid hydroperoxides in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 1999;30:450-455.

Suzuki K, Meguro K, Sakurai T, Saitoh Y, Takeuchi S, Nose T. Endothelin-1 concentration increases in the cerebrospinal fluid in cerebral vasospasm caused by subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol* 2000;53:131-135.

Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts II LJ, Badr KJ. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-postaglandin $F_{2\alpha}$, in the rat: evidence for interaction with thromboxane A_2 receptors. *J Clin Invest* 1992;90:136-141.

Tani E. Molecular mechanisms involved in development of cerebral vasospasm. *Neurosurg Focus* 2002;12:ECP1.

Taber DF, Morrow JD, Roberts II LJ. A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandines* 1997;53:63-67.

Wardlaw JM, White PM. The detection and management of unruptured intracranial aneurysms. *Brain* 2000;123:205-221.

Weir B, Macdonald RL, Stoodley M. Etiology of cerebral vasospasm. *Acta Neurochir Suppl* 1999;72:27-46.

Wilkins RH. Cerebral vasospasm. *Crit Rev Neurobiol* 1990;6:51-77.

Winder SJ, Allen BG, Clément-Chomienne O, Walsh MP. Regulation of smooth muscle actin-myosin interaction and force by calponin. *Acta Physiol Scand* 1998;164:415-426.

Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen 2009 Magdalena Ebert

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Priv. Doz. Dr. med. M.F. Oertel, der mir dieses spannende Thema überlassen, mich bei der Bearbeitung gut unterstützt und die Arbeit Korrektur gelesen hat.

Frau Dabelow und dem neurochirurgisch wissenschaftlichen Labor vielen Dank für die Unterstützung bei der TCD- und Labordiagnostik.

Ohne entsprechenden Ort zum Arbeiten und Erholen hätte diese Arbeit nicht so zeitnah fertig gestellt werden können. Ein herzliches Dankeschön hierfür an Herrn Prof. Dr. med. G. Alzen und Frau Dr. M. Lüdemann.

Herrn Prof. Dr. jur. can. L. Wächter danke ich herzlichst für das Korrekturlesen meiner „etwas anderen" medizinischen Dissertation.

Vielen Dank meiner Schwester Regina und meinem Bruder Sebastian für Korrekturen und Hilfe beim Formatieren.