

Tina Ranneberg

Dr. med.

Der Einfluß stufenweiser permanenter Gefäßverschlüsse auf den zerebralen Energiestoffwechsel und die Amyloid Precursor Protein (APP) Konzentration im Hippokampus und parietotemporalen Kortex der Ratte

Geboren am 10.09.1971 in Mainz

Reifeprüfung am 10.07.1991 in Coburg

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1992 bis WS 1998

Physikum am 07.04.1994 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 28.10.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anaesthesiologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Hubert J. Bardenheuer

Betrachtet man die Entwicklung der Altersverteilung unserer Gesellschaft, so zeigt sich eine Umformung der bisher pyramidenförmigen demographischen Altersstruktur mit Verschiebung der Basis in Richtung der höheren Altersstufen. Mit zunehmendem Anstieg des mittleren Lebensalters werden die Menschen und insbesondere auch die Medizin zunehmend mit den Eigenheiten und im Speziellen mit den Gebrechen und Krankheiten des höheren Lebensalters konfrontiert sein.

Das Alter stellt einen der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung zerebrovaskulärer Veränderungen dar und somit für das Auftreten von Hirnalterationen (Fuller et al. 1983, Kennes et al. 1993). Die Fähigkeiten des alternden Gehirns auf stressbedingte Veränderungen des Organismus zu reagieren, sind erheblich eingeschränkt. Charakteristisch sind eine Abnahme der zerebralen Durchblutung, Reduktion der metabolische Umsatzrate von Sauerstoff und Glukose mit verminderter Bildung energiereicher Phosphate (Hoyer 1995), sowie Veränderungen im Aminosäurestoffwechsel (Hoyer 1992). In neuesten Veröffentlichungen der Mortalitätsstatistik (U.S. Bureau of the Census, International

Data Base 1999) rangieren zerebrovaskuläre Erkrankungen mittlerweile auf Platz drei hinter Herz-Kreislauf- bzw. Tumorerkrankungen. Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit einem Abschnitt aus dem medizinischen Repertoire, welcher in Zukunft weiterhin in zunehmendem Maße an Interesse gewinnen wird.

Unter pathophysiologischen Bedingungen, wie z.B. im Zuge einer Minderperfusion konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, daß es zu erheblichen strukturellen und funktionellen Veränderungen im Gehirn kommt. Auf dem Gebiet der Neuropathologie und insbesondere der zerebralen Perfusion wurden bisher umfassende Untersuchungen während akuter Ischämie und Reperfusion durchgeführt (u.a. auch Nilson et al. 1975, Siesjö und Wieloch 1985, Santos et al. 1996). In vivo Tiermodelle, die den Krankheitsverlauf einer chronisch fortschreitenden zerebralen Hypoperfusion nachahmen, sind bisher jedoch kaum etabliert worden.

Grundlage der vorliegenden Studie war ein in der Literatur bisher nicht beschriebenes Modell zur permanenten, chronisch aggravierten Beeinträchtigung der zerebralen Blutversorgung. Diese wurde, in Anlehnung an das Modell von Pulsinelli (1979), durch stufenweise Unterbindung der vier für eine suffiziente zerebrale Perfusion relevanten Halsarterien induziert.

Die physiologischen Hirnfunktion ist eng gekoppelt an die ungestörte Durchblutung und damit eine suffiziente Versorgung des Hirngewebes mit essentiellen Substraten wie Sauerstoff und Glukose. Im älter werdenden Gehirn stellt sich jedoch eine progrediente Verschlechterung der Durchblutung ein. Die Reduktion des Sauerstoff- und Energiemetabolismus ist gleichzeitig Charakteristikum der chronisch progredienten Demenzen vom Alzheimer wie auch vom vaskulären Typ.

Zur Beurteilung der zerebralen Stoffwechsellage nach 2- bzw. 4-Gefäßokklusion wurden in der vorliegenden Studie die energiereichen Phosphate ATP, ADP, GTP und Kreatinphosphat mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC), sowie Laktat und Pyruvat als Ischämieindikatoren bestimmt. Letztere wurden spektrophotometrisch quantifiziert. Zusätzlich wurde, ebenfalls durch HPLC, die zerebrale Adenosin-Konzentration bestimmt. Adenosin gilt als empfindlicher Ischämieindikator. Es wird intrazellulär in enger Korrelation zur Störung der Gewebsoxygenierung vermehrt gebildet und in die Blutbahn freigesetzt (Bardenheuer et al. 1994). Auch für das Gehirn ist Adenosin ein valider Parameter zur Evaluation der zerebralen Stoffwechselverhältnisse.

Weiterhin wurden die Auswirkungen der pathologischen Perfusionssituation im Cerebrum auf APP untersucht. Das Amyloid Precursor Protein (APP) spielt in der Pathogenese der Demenzen eine wichtige Rolle. Es handelt sich um ein membrangebundenes Glykoprotein, welches in einer Vielzahl peripherer und zentraler Gewebe gebildet wird, dessen genaue physiologische Funktion jedoch bis heute noch nicht eindeutig geklärt ist. Seine Eigenschaften reichen von Proteaseinhibition, über die Förderung von Zelladhäsion und Zellwachstum bis hin zur Neuroprotektion. Nach Spaltung durch verschiedene Sekretasen entstehen Unterformen von APP, wobei insbesondere das Amyloid- β -Peptid (β A4) eine plaquebildende Potenz aufweist und bisher in allen Gehirnen von Alzheimer Patienten in besonders hohem Maße nachgewiesen werden konnte. In der vorliegenden Studie wurde APP mit Hilfe spezifischer Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Die Methode des Western Blots wurde speziell zu diesem Zweck im Labor etabliert und an die Erfordernisse der Studie adaptiert.

Grundlage des vorliegenden Versuchsmodells war eine Entität von 30 1-jährigen männlichen Wistar-Ratten, die wiederum in drei Gruppen von jeweils 10 Tieren unterteilt waren. Parallel zur Kontrollgruppe wurde bei Gruppe 2 ein 2-Gefäßverschluss sowie bei Gruppe 3 letztendlich ein 4-Gefäßverschluss durchgeführt. Dieser chronisch permanente Zustand wurde über eine, respektive zwei Wochen aufrechterhalten. Unter steady state Bedingungen wurden die Gehirne schließlich in vivo eingefroren und entsprechend biochemisch aufgearbeitet.

Im Anschluß an die vorliegende Studie wurden anhand desselben Versuchsmodells Untersuchungen zur akuten zerebralen Ischämie durch 4-Gefäßverschluss durchgeführt. Sehr deutlich zeigten sich hierdurch die gravierenden Unterschiede in den Auswirkungen zerebraler Gefäßokklusion abhängig von akuter bzw. chronischer Pathogenese. Nach akutem Verschluss der hirnersorgenden Gefäße manifestierte sich eine deutliche Einschränkung bzw. Dysregulation der Stoffwechselsituation, zunächst charakterisiert durch den signifikanten Anstieg der Ischämieindikatoren Laktat und vor allem Adenosin. Unter chronischen Versuchsbedingungen zeigte sich nach 2-Gefäßverschluss zunächst ebenfalls ein Anstieg dieser Parameter. Nach chronischem 4-Gefäßverschluss etablierte sich jedoch eher ein Regress der Konzentrationen, wobei die Ausgangssituation allerdings nicht wieder erreicht wurde. Der beschriebene Verlauf ist veranschaulicht deutlich die ausgeprägte Adaptations-

und Kompensationsfähigkeit des Organismus bei langsam fortschreitenden Krankheitsbildern.

Betrachtet man parallel hierzu die Entwicklung der APP-Konzentration, so zeigt der Verlauf nach 2-Gefäßverschluss zunächst die Schädigung des zerebralen Gewebes durch Minderperfusion, dargestellt durch einen signifikanten Abfall der APP-Konzentration. Im Verlauf und nach chronischer 4-Gefäßokklusion stellt sich jedoch das Kompensationsbestreben des Organismus in den Vordergrund, verdeutlicht durch einen überschießenden Wiederanstieg des potentiell neuroprotektiven APP.

Eine gesteigerte Bildung von APP unter den genannten Bedingungen ermöglicht jedoch in gleicher Weise die vermehrte Bildung potentiell amyloidogener Spaltprodukte, wie insbesondere des $\beta A4$, und unterstreicht somit den Zusammenhang zwischen vaskulärer Ursache und der chronisch progredienten Ausbildung einer Demenz.

Zusammengefaßt konnte in der vorliegenden Studie durch chronisch progrediente Einschränkung der zerebralen Blutversorgung ein Zusammenhang zwischen Reduktion des Angebots an Energiemetaboliten und Veränderung der APP-Konzentration im Hirngewebe der Ratte nachgewiesen werden. Der permanente chronisch aggravierte Verschuß der für die zerebrale Perfusion essentiellen Gefäße führte zu:

- einer stufenweise reduzierten Konzentration energiereicher Phosphate im zerebralen Gewebe adulter Ratten
- einem Abfall der APP-Konzentration nach permanenten 2-Gefäßverschluss – zu interpretieren als Ausdruck des schädigenden Ereignisses
- einem Wiederanstieg der APP-Konzentration im zerebralen Gewebe über die Ausgangswerte hinaus nach chronischem 4-Gefäßverschluss – Interpretation als Ausdruck ausgeprägter Kompensationsmechanismen und Betonung der neuroprotektiven Funktion des Amyloid Precursor Proteins. Gleichzeitig wachsendes Risiko der Bildung potentiell neurotoxischer Amyloidablagerungen.

Desweiteren manifestierte sich:

- eine deutlichen Diskrepanz zwischen den Veränderungen nach akutem und permanentem Gefäßverschluss. Ersteres repräsentiert die ausgeprägte Beeinträchtigung des zerebralen Energiemetabolismus nach akutem Ereignis, während unter chronisch fortschreitender Schädigung ausgedehnte Kompensationsmechanismen zur Wirkung kommen können.

Die vorliegende Studie diskutierte erstmals den Einfluß eines permanenten chronischen Verschlusses der hirnversorgenden Gefäße auf den zerebralen Energiemetabolismus und auf die APP-Konzentration anhand von Ergebnissen aus einem hierzu etablierten in vivo Tiermodell.

Die dem Amyloid Precursor Protein zugesprochene Rolle in der Pathologie der Alzheimer Demenz und der Konzentrationsverlauf unter chronischer Unterbindung der hirnversorgenden Gefäße unterstreichen weiter einen Zusammenhang zwischen der vor allem im höheren Lebensalter auftretenden Alterationen in der zerebralen Blutversorgung und der Pathogenese der sporadischen Demenz vom Alzheimer Typ. Auch aus diesem Grund werden die Demenzen vom vaskulären sowie vom Alzheimer Typ zunehmend als Einheit diskutiert.