

Aus dem Institut für Neuroradiologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Dirk Petersen

---

Über den Nachweis zerebraler Strukturproteine zur Diagnose  
eines hypoxischen Hirnschadens nach Reanimation

---

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**- Aus der Medizinischen Fakultät -**

vorgelegt von  
Fabian Holbe  
aus Berlin

Lübeck 2004

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Missler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hartmut Gehring

Tag der mündlichen Prüfung: 03. 05. 2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 03. 05. 2005

Gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

1.1	Epidemiologie	S.1
1.2	Problematik in der frühzeitigen Diagnose hypoxischer Hirnschäden	S.1
1.3	Das S-100 Protein	S.2
1.4	Entwicklung der Messmethode für S-100B	S.7
1.5	Das S-100 bei verschiedenen Krankheitsbildern	S.8
1.6	Das GFAP	S.12
1.7	Reanimationen	S.14
1.8	Diagnostik des hypoxischen Hirnschadens in der Bildgebung	S.15
1.9	Fragestellung	S.15

## 2. Material und Methoden

2.1	Patienten	S.17
2.2	Ein-/Ausschlusskriterien	S.18
2.3	Neuroradiologische Diagnostik	S.19
2.4	Probenverarbeitung	S.20
2.5	Messmethoden	
2.5.1	<i>In allen Assays angewandte Verfahren</i>	S.20
2.5.2	<i>Biotinylierung des zweiten Antikörper</i>	S.20
2.5.3	<i>Markierung des Streptavidin mit Europium</i>	S.21
2.5.4	<i>Herstellung der Enhancementlösung</i>	S.21
2.5.5	<i>Herstellung des Waschpuffers</i>	S.21
2.5.6	<i>Herstellung des TRIS/HCl/NaCl-Puffers</i>	S.22
2.6	Messmethoden für das S-100B Protein	S.22
2.7	Messmethoden für das GFAP	S.23
2.8	Statistische Methoden	S.26

## 3. Ergebnisse

3.1	Messmethoden: S-100B/GFAP	S.27
3.2	Patientenübersicht	S.27
3.3	S-100B	
3.3.1	<i>Patienten ohne hypoxischen Hirnschaden</i>	S.29
3.3.2	<i>Patienten mit hypoxischem Hirnschaden</i>	S.30
3.3.3	<i>Vergleich der S-100B Konzentrationen bei Patienten mit und ohne hypoxischen Hirnschaden</i>	S.32
3.4	GFAP	
3.4.1	<i>Patienten ohne hypoxischen Hirnschaden</i>	S.32
3.4.2	<i>Patienten mit hypoxischem Hirnschaden</i>	S.33
3.4.3	<i>Verlauf</i>	S.33
3.5	Verlaufsbeschreibung von GFAP und S-100B Konzentrationen bei Patienten mit hypoxischem Hirnschaden	S.37
3.6	Exemplarische Fallbeschreibung für einen Patienten mit hypoxischem Hirnschaden	S.38
3.7	Exemplarische Fallbeschreibung für einen Patienten ohne hypoxischen Hirnschaden	S.40

## 4. Diskussion

4.1	Patienten	S.41
4.2	Vergleich mit bildgebender Diagnostik	S.43
4.3	Methoden	S.43

## 5. Zusammenfassung

S.47

## 6. Literatur

S.48

## 7. Danksagung

S.58

## 8. Lebenslauf

S.59

## 1. Einleitung

### 1.1 Epidemiologie

Bei immer größer werdenden Patientenzahlen, deren Überleben durch die verbesserten Methoden der modernen Intensivmedizin ermöglicht wird, kommt dem neurologischen Zustand nach einer Reanimation im Rahmen eines Herz-Kreislauf-Versagens auf Grund seines Einflusses auf die Lebensqualität der Patienten eine zentrale Bedeutung zu. Die Inzidenz für Reanimationen liegt zwischen 48,33 im Raum Bonn<sup>(36)</sup> und 100 im Raum Berlin<sup>(5)</sup> (Fälle/100 000 Einwohner/Jahr).

Nach Studien aus Schottland<sup>(17)</sup>, den Vereinigten Staaten<sup>(76)</sup> und Finnland<sup>(56)</sup> mit insgesamt mehr als 2500 Patienten starben etwa 50% nach primär erfolgreicher Reanimation ohne Wiedererlangen des Bewusstseins. Zwischen 27%<sup>(76)</sup> und 45%<sup>(17)</sup> der überlebenden Patienten zeigten neurologische Einschränkungen. Bei 1%<sup>(17)</sup> bis 5%<sup>(56)</sup> Prozent handelte es sich hierbei um schwerste neurologische Folgeschäden<sup>(43)</sup>.

### 1.2 Problematik in der frühzeitigen Diagnose hypoxischer Hirnschäden

Eine besondere Schwierigkeit stellt die Diagnose und die Abschätzung des Ausmaßes von neurologischen Schäden bei Patienten in der Frühphase nach Reanimationen dar. Momentan ist hierfür der aufwendige und kostenintensive Einsatz moderner Großgeräte wie Computertomograph (CT) oder Magnet-Resonanz-Tomograph (MRT) erforderlich - was insbesondere problematisch ist, da die zu untersuchenden Patienten oft zu instabil für den Transport zum entsprechenden Gerät sind oder Gerät und Fachpersonal gerade an kleineren Krankenhäusern nicht zur Verfügung stehen.

Für den Nachweis hypoxischer Hirnschäden gibt es bislang keine Alternative zur Untersuchung mittels cerebralem Computertomogramm (cCT), da andere diagnostische Verfahren wie das Elektroenzephalogramm (EEG) in ihrer Aussage durch ihre Störanfälligkeit zu unzuverlässig sind<sup>(101)</sup>. Außerdem sind die Patienten

aufgrund der häufig notwendigen Sedierung kaum durch neurologische Begutachtung einzustufen. Dieser Mangel an diagnostischen Möglichkeiten führt dazu, dass ein frühzeitiger Beginn neurorehabilitativer Verfahren unmöglich wird. Eine für den Patienten weitaus weniger belastende Vorgehensweise wäre es, wenn der Nachweis zerebraler Strukturproteine im peripheren Blut eine Erweiterung des Spektrums neurologischer Diagnostik ermöglichte.

### 1.3 Das S-100 Protein

Der Name wurde vom Erstbeschreiber des S-100 Proteins, Moore, 1965 gewählt, da das von ihm isolierte Protein nur in 100-prozentigem Ammoniumsulfat bei neutralem pH löslich (soluble) war<sup>(65)</sup>. Heute ist bekannt, dass es sich um eine Proteinfamilie handelt, bestehend aus einer Gruppe von kalziumbindenden Proteinen. Diese enthalten jeweils 2 EF-Hand Domänen, die in der Lage sind, jeweils ein Kalziumion zu binden<sup>(40)</sup>.

Es existieren zurzeit unterschiedliche Nomenklaturen für die Beschreibung der Proteine aus der S-100 Familie. In der älteren Literatur werden das S-100a, das S-100b und das S-100a<sub>0</sub> unterschieden, von denen das S-100a und S-100b vorwiegend im ZNS, das S-100a<sub>0</sub> extrazerebral vorkommen. Diese 3 Proteine bestehen jeweils aus 2 Untereinheiten, einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, jeweils circa 10,5 kD groß. Aus den möglichen Kombinationen der Ketten entsteht das S-100a ( $\alpha\beta$ ), S-100b ( $\beta\beta$ ) und S-100a<sub>0</sub> ( $\alpha\alpha$ ). Die Nomenklatur der S-100 Proteine ist auch im Hinblick auf die monomeren bzw. dimeren Moleküle uneinheitlich. In der Mehrzahl werden mit S-100a und S-100b die Dimere bezeichnet, die die biologische aktive Form des Moleküles darstellen. S-100a ( $\alpha\beta$ ) ist in Gliazellen und Melanozyten, S-100b ( $\beta\beta$ ) in Astrozyten und Schwann-Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie in den Zellen der Adenohypophyse und den Langerhanszellen des Pankreas nachweisbar. S-100a<sub>0</sub> kommt vorwiegend extrazerebral in Herz, Niere und glattem Muskelgewebe vor<sup>(8;48)</sup>. Die physiologische Funktion dieser Proteine ist bis heute nicht vollständig geklärt<sup>(103)</sup>.

Neben dieser bisherigen Einteilung in S-100a, S-100b und S-100a<sub>0</sub> führten Heizmann *et al.* 1995 eine Einteilung ein, die die gesamte S-100 Protein-Familie erfasst. Dieser Einteilung liegt die Erkenntnis zugrunde, dass die S-100 Proteine

einen Gencluster auf dem kurzen Arm des Chromosoms 21 bilden. Zur S-100-Familie gehören insgesamt 19 Proteine, die eine unterschiedliche zell- und gewebsspezifische Expression sowie unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen, post-translationale Modifikationen, Kalzium-, Zink- und Kupferbindung zeigen. Über ca. 40 verschiedene Zielproteine wurde berichtet. Allein für S-100A1 existieren 15 Zielproteine. S-100 Proteinen wird eine funktionelle Rolle bei verschiedensten Erkrankungen wie malignen Tumoren, neurodegenerativen Erkrankungen, Kardiomyopathien, entzündlichen Erkrankungen, Diabetes mellitus und Allergien zugeschrieben (103). Trotz der sehr unterschiedlichen funktionellen Bedeutung der S-100 Proteine ist ihre molekulare Struktur ähnlich. Die dreidimensionale Struktur von S-100 A6, A7, A8, A9 und S-100B (siehe Abbildung 1) wurde in den letzten Jahren aufgeklärt<sup>(24;25;52;75;85)</sup>. Gemeinsame Grundstruktur der S-100 Proteine ist eine zentrale „Hinge region“ sowie 2 laterale  $\alpha$ -Helices. Die zentrale Domäne verändert ihre Struktur unter Einfluss von Metallionenbindung nicht, während die lateralen  $\alpha$ -Helices nach außen „geklappt“ sind, wenn sie Kalzium gebunden haben. Die Bindung an Zielproteine erfolgt im Bereich der 2 hydrophoben Regionen vor den paarigen EF-Hand Domänen.

In der Heizmann-Klassifikation werden ausschließlich Monomere erfasst. Mit S-100A1 wird die  $\alpha$ -Kette des S-100 Proteins bezeichnet, mit S-100B die  $\beta$ -Kette. Die Definition der Dimere ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\beta\beta$ ) bleibt unklar. Das in der vorgelegten Arbeit behandelte bezüglich neurologisch-neurochirurgischer Krankheitsbilder interessierende S-100 Protein ist gemäß dieser Klassifikation das S-100B. Es wird im folgenden die neuere Klassifikation von Heizmann verwendet, da sie im aktuellen Schrifttum überwiegend Verwendung findet, obwohl sie die dimeren Moleküle nicht berücksichtigt.

Messenger-RNA des Proteins wurden in vielen Organen des menschlichen Körpers nachgewiesen:

Gehirn, Aorta, Blase, Fettgewebe, Kolon, Dünndarm, Pankreas, Skelettmuskel, Hoden, Fettgewebe, Haut und Nerven<sup>(103)</sup>.

Bislang wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Proteine als Zielproteine für S-100B identifiziert.

Tabelle 1: Die S-100 Familie und ihre mögliche Funktion

Name	Synonym	cDNA	Gen	Protein	Ca <sup>++</sup> Bindg	Mögliche Funktion
S-100 A1	S-100 $\alpha$	+	+	+	+	Regeneration des Zellwachstums, Energiestoffwechsel
S-100A2	S-100L, CaN19	+	+	+	+	Unbekannt
S-100A3	S-100E		+			Unbekannt
S-100A4	CAPL, p9Ka, 42A, pEL98, mts 1, Metastasin, Calvasculin, 18A2	+	+	+	+	Regeneration des Zellwachstums, Zelldifferenzierung, Regeneration der Zellstruktur
S-100A5	S-100D		+			Unbekannt
S-100A6	CACY, 2A9, PRA, CaPB 5B10, Calcyclin	+	+	+	+	Regeneration des Zellwachstums, intrazelluläre Signalübertragung
S-100A7	PSOR1, Psoriasis	+	+	+	+	Unbekannt
S-100A8	CAGA, MRP-8, p8, MAC387, B8Ag, L1Ag, CP-10, MIF, NIF	+	+			Antwort auf Chemotaktine, Regeneration des Zellwachstums, Regeneration von Kinaseaktivitäten, Zelldifferenzierung
S-100A9	CAGB, CFAG, MRP-14, p14, MAC387, B8Ag, L1Ag, MIF, NIF		+	+		Antwort auf Chemotaktine, Regeneration des Zellwachstums, Regeneration von Kinaseaktivitäten
S-100A10	Ca[1], p11, p10, 42C, Calpactin light chain		+	+	-	Regeneration des Zellwachstums, Neurotransmitterfreisetzung, antiinflammatorisch
S-100B	NEF, S-100 $\beta$	+	+	+	+	Regeneration des Zellwachstums, Energiestoffwechsel, Kontraktion, Regeneration von Kinaseaktivitäten, Gedächtnis und Lernen, intrazelluläre Signalübertragung, Zelldifferenzierung
S-100C	S100C, Calcizzarin,	+		+	+	Unbekannt
S-100P	S100P	+		+	+	Unbekannt
CALB 3	ICaBP, Calbindin-D9k	+	+	+	+	Ca <sup>++</sup> Puffer, Regeneration der Ca <sup>++</sup> -Homöostase
S-100F-P	Profilaggrin	+	+	+	+	Regeneration der Zellstruktur
S-100F-T	Trichohyalin	+	+	+	+	Regeneration der Zellstruktur

**Tabelle 1:**  
Mitglieder der S-100 Familie<sup>(103)</sup>

Einige dieser Zielproteine reagieren nur auf bestimmte S-100 Proteine, andere auf die gesamte Gruppe. Der modulierende Effekt des S-100 hängt vom Enzymbesatz der Zielzelle ab, er kann hemmend oder stimulierend sein. S-100A1, S-100B und Calmodulin können dieselben Funktionen synergistisch oder antagonistisch beeinflussen. S-100B ist überwiegend intrazellulär lokalisiert. Es beeinflusst eine Reihe von intrazellulären Funktionen, so die Zell-Zell Kommunikation, die Zellstruktur, das Zellwachstum, den Energiestoffwechsel, die Zellkontraktion und die intrazelluläre Signaltransduktion. Dennoch gibt es Anhaltspunkte sowohl für intra- als auch für extrazelluläre Funktionen<sup>(55)</sup>: S-100B fungiert als Mitogen und stimuliert die Gliazellproliferation<sup>(86)</sup>. Die Stimulation des Zellwachstums betrifft sowohl gesunde Zellen als auch pathologische Zellen. So finden sich erhöhte Konzentrationen von S-100B in Melanomzellen<sup>(58)</sup> und in leukämisch veränderten Myelozyten<sup>(94)</sup>, sowie in Schilddrüsenkarzinomen<sup>(68)</sup>. S-100B bindet an das Microtubule Associated Protein2 (MAP2) und GFAP und inhibiert kalzium- und pH-abhängig bei pH 6,5 die Polymerisation von Mikrotubuli und Intermediärfilamenten, während es bei einem pH von 7,5 eine Depolymerisation bewirkt<sup>(11;22)</sup>. S-100B erhöht die Aktivität der Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase. Damit hat es Einfluss auf den zellulären Energiestoffwechsel<sup>(33;102)</sup>.

Eine weitere Funktion besteht in der Regulation intrazellulärer Signaltransduktionen. S-100B stimuliert kalziumabhängig die Aktivität der Adenylatzyklase<sup>(34)</sup> und ist hierbei wiederum Gegenspieler des Calmodulin. S-100B hemmt die Phosphorylierung und damit Aktivierung von p87, Neuromodulin, Neurogranin und p53, bei denen es sich um intrazelluläre Botenstoffe handelt<sup>(20)</sup>.

Tabelle 2: Mögliche Zielproteine für S-100A1 und S-100B

Funktion	mögliches Zielprotein	Isoformspezifität	
		S-100A1	S-100B
	Gap-junction Polypeptid	+	+
Zellwachstum	p53	n.d.	+
Zellform	Tubulin	+	+
	$\tau$ -Protein	n.d.	+
	MAP2	n.d.	+
	GFAP	n.d.	n.d.
	AnnexinII	n.d.	+
Energistoffwechsel	Aldolase	+	+
	Glycogenphosphorylase	+	-
Kontraktion	Caldesmon	n.d.	n.d.
	schwere Kette des Myosins	n.d.	n.d.
Signaltransduktion	Adenylatzyklase	n.d.	+
	Neuromodulin	n.d.	+
	Neurogranin	n.d.	+
	p53	n.d.	+
	p87	n.d.	+

n.d.: nicht definiert

**Tabelle 2:**  
Mögliche S-100 Zielproteine<sup>(103)</sup>

Das Gen für S-100B befindet sich auf dem Chromosom 21q22<sup>(26)</sup>. Diese Tatsache wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei Menschen mit einer Trisomie 21 (Down Syndrom) tatsächlich erhöhte S-100B Spiegel gefunden wurden<sup>(51)</sup>. S-100-Gene werden in einer Reihe von Geweben exprimiert, wobei jedes der 19 S-100 Proteine in seinem spezifischen Zelltyp exprimiert wird. Die Gewebeverteilung der S-100 Expression ist zudem deutlich unterschiedlich von Spezies zu Spezies<sup>(103)</sup>.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Untersuchungen über Erhöhungen der S-100- Konzentrationen im Liquor bei Schädigung des Zentralnervensystems durch unterschiedliche Erkrankungen publiziert. Die Referenzwerte für S-100B unter 200 gesunden Probanden lagen bei  $0,059 \pm 0,038 \mu\text{g/l}$  (MW  $\pm$  s)<sup>(97)</sup>.

#### 1.4 Entwicklung der Messmethode für S-100B

Blake W. Moore war einer der ersten, die über die Bestimmung des S-100 Proteins mit der Komplementfixationsmethode berichtete<sup>(65)</sup>. Kanefusa Kato schrieb 1982 über einen Enzymimmunoassay<sup>(50)</sup>. Etwa zur gleichen Zeit publizierte Sindic seinen „Particle Counting Immunoassay“ (PACIA)<sup>(88)</sup>, mit dem auch S-100-Messungen im Blut vorgenommen wurden<sup>(32)</sup>. 1987 berichtete Persson über die Messung des S-100 Proteins im Liquor und im Blut mit Radioimmunoassays<sup>(74)</sup>. Hårdemark aus der gleichen Arbeitsgruppe publizierte 1989 über S-100-Konzentrationen im Liquor nach Subarachnoidalblutungen<sup>(37)</sup>, gemessen mit dem gleichen RIA wie dem von Persson beschriebenen sowie im selben Jahr über S-100 - Konzentrationen im Liquor nach experimentellem Hirntrauma und fokaler Ischämie<sup>(38)</sup>. Hier wurde das S-100 Protein mit einem Sandwich Enzymimmunoassay gemessen, der 2 monoklonale Antikörper gegen die  $\beta$ -Untereinheit des S-100 Proteins nutzte. Ebenfalls 1989 veröffentlichte Ann Aurell eine Studie über einen kompetitiven Enzymimmunoassay<sup>(7)</sup>. 1995 berichteten Missler et al. über einen immunometrischen Assay, der auf dem System der zeitverzögerten Immunfluoreszenz (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluorescent Immuno Assay, DELFIA<sup>®</sup>) aufgebaut ist<sup>(61)</sup>. Ab 1996 war ein radioimmunometrischer Assay (Immuno Radiometric Assay, IRMA) der Firma Sangtec kommerziell verfügbar. Als Festphase dienten hier Polystyrolkugeln, die aus urheberrechtlichen Gründen mit 2 verschiedenen gegen die  $\beta$ -Kette des S-100 Proteins gerichteten monoklonalen Antikörpern beschichtet waren. Nach Inkubation mit der Probe wurde ein dritter monoklonaler Antikörper zugesetzt, der radioaktiv markiert war. Dieser Assay wurde mittlerweile auf eine nichtisotopische Methode (Chemilumineszenz mit beschichteten Röhrchen als Festphase und Arylhydrazid-markierten zweiten Antikörpern) umgestellt. Seit Ende 1995 gibt es eine Reihe von Berichten in der Literatur über die Messung des S-100 Proteins im Serum bei unterschiedlichen Affektionen des ZNS<sup>(15;35;45;47;95;96)</sup>. In allen diesen Arbeiten wurde der o.g. Assay von der Firma Sangtec verwendet (z.T. als immunoradiometrischer Assay, z.T. als immunoluminometrischer Assay). Dem Großteil der aktuellen Veröffentlichungen liegt der Sangtec 100 ILMA als Assay zugrunde.

## 1.5 Das S-100 bei verschiedenen Krankheitsbildern

Michetti berichtete 1980 über erhöhte S-100- Liquorkonzentrationen bei akuten Schüben der Multiplen Sklerose, bei Demenzen, der amyotrophen Lateralsklerose, akuter Enzephalitis, Rückenmarkskompression und intrakraniellen Tumoren<sup>(60)</sup>. Kato fand 1982 erhöhte S-100 Protein- Liquorspiegel bei Patienten mit Glioblastomen und Hydrozephalus<sup>(50)</sup>. 1983 publizierte Kato über das Ansteigen des S-100 Proteins im Blut von Ratten nach Katecholamingabe<sup>(49)</sup>. Sindic fand 1982 eine deutliche Erhöhung der S-100 Protein- Liquorspiegel bei Patienten mit Rückenmarkskompression, ischämischen Hirnerkrankungen, Subarachnoidalblutungen mit Hämatom und bei viralen Enzephalitiden<sup>(88)</sup>. Noppes Bericht über S-100 Protein im Liquor stammt aus dem Jahr 1986. Er fand erhöhte Werte für S-100 im Liquor von Patienten mit: zerebrovaskulären Erkrankungen, Epilepsie, Multipler Sklerose, Meningitiden, bei der Creutzfeldt-Jakob Krankheit sowie bei Tumoren des ZNS<sup>(70)</sup>. Persson konnte ebenfalls erhöhte Werte für das S-100 Protein im Liquor bei Patienten mit Schlaganfällen, Subarachnoidalblutungen, intrazerebralen Blutungen sowie Schädel-Hirn-Traumen nachweisen<sup>(74)</sup>. In dieser Arbeit findet sich auch der erste Bericht über Messungen des S-100 Proteins im Blut. Allerdings berichtet Persson lediglich über drei Messungen bei einem Patienten nach Schlaganfall. Der erste ausführlichere Bericht über S-100 Protein-Anstiege im Blut findet sich 1988 bei Fagnart und Sindic. Sie berichten über nachweisbare bzw. erhöhte Konzentrationen des S-100 im Blut von Patienten mit unterschiedlichen Hirntumoren, Schlaganfällen, intrazerebralen Blutungen und Subarachnoidalblutungen<sup>(32)</sup>. Beide Untersucherguppen konnten im Blut gesunder Probanden das S-100 Protein nicht nachweisen. Während es sich bei den zuvor zitierten Arbeiten jeweils um einzelne Messungen bei Patienten mit unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen handelte, berichtete Hårdemark 1989 erstmals über eine systematische Untersuchung des S-100 Proteins im Liquor von 32 Patienten mit einer aneurysmatischen Subarachnoidalblutung. Er konnte eine positive Korrelation der gefundenen Werte mit dem funktionellen klinischen Resultat finden<sup>(38)</sup>. Ebenfalls 1989 publizierte dieselbe Arbeitsgruppe eine systematische Untersuchung über den zeitlichen Verlauf des Anstieges der S-100 - Werte im Liquor bei

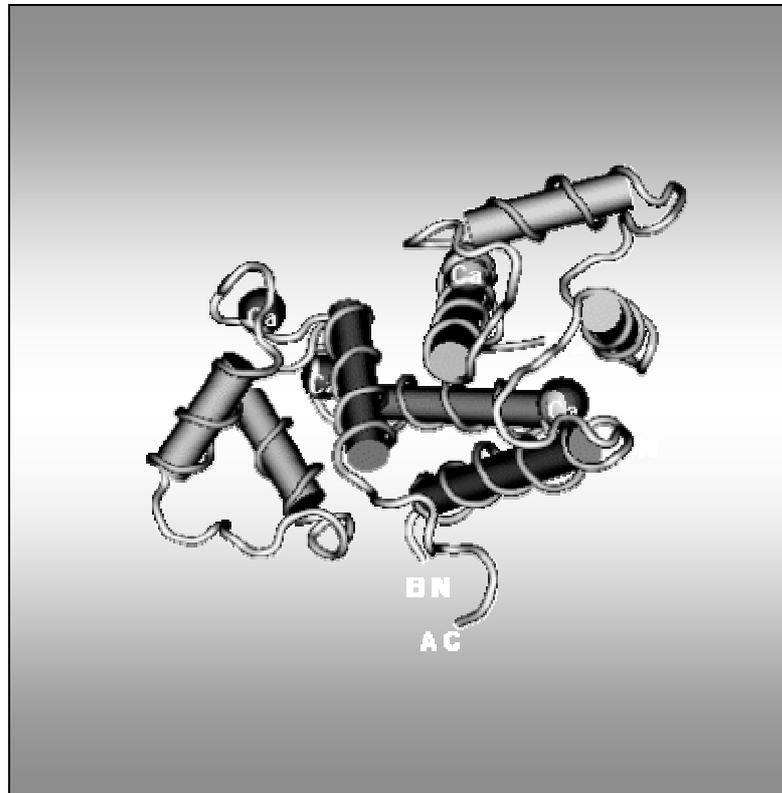
experimenteller traumatischer und fokal ischämischer Läsion des Gehirns von Ratten<sup>(38)</sup>. Eine weitere systematische Untersuchung über den Liquorspiegelverlauf des S-100 Proteins und des GFAP bei Patienten mit ischämischem Infarkt publizierte Ann Aurell 1991. Sie berichtete erstmals über die Korrelation von S-100B im Liquor und sowohl dem Infarktvolumen als auch dem funktionellen Endergebnis<sup>(6)</sup>. In den folgenden Jahren erschienen einige Arbeiten, in denen systematisch der Zusammenhang zwischen S-100B- Konzentrationen im Liquor und einzelnen neurologischen Krankheitsbildern untersucht wurde. So berichtete Mokuno 1994 über den prognostischen Aussagewert von S-100 im Liquor bei Patienten mit Guillain-Barre´-Syndrom<sup>(64)</sup>. 1995 beschrieb Nagamatsu aus der gleichen Arbeitsgruppe den gleichen Zusammenhang in Bezug auf die chronisch entzündliche demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP)<sup>(67)</sup>. Mehrere Arbeiten beschäftigten sich mit dem Anstieg des S-100 Proteins im Liquor bei Patienten mit Herzoperationen bzw. nach Herzstillstand<sup>(47;87;91;93)</sup>. In der Arbeit von Usui wurde über den vergeblichen Versuch berichtet, mit dem von Kato beschriebenen Enzymimmunoassay<sup>(50)</sup> das S-100 Protein bei diesen Patienten auch im Blut zu messen. 1996 publizierte Westaby die Messung des S-100B Proteins im Serum nach Operationen mit extrakorporalem Kreislauf<sup>(96)</sup>. Die Autoren benutzten den in diesem Jahr erstmals kommerziell erhältlichen radioimmunometrischen Assay der Firma Sangtec. Mit dieser Messmethode (bzw. der chemiluminometrischen Folgemethode 100 LIA<sup>®</sup>) sind in den vergangenen Jahren eine Reihe weiterer Untersuchungen durchgeführt worden. So berichteten Abra, Fassbender und Büttner über die positive Korrelation von Infarktgröße und klinischem Ergebnis mit dem S-100-Serumspiegel nach ischämischen zerebralem Infarkt, gemessen mit dem 100 LIA<sup>®</sup>. Mit derselben Methode wurde das S-100 Protein im Serum in den Untersuchungen von Woertgen, Ingebrigtsen und Waterloo<sup>(46;95;100)</sup>, bestimmt, die den Zusammenhang zwischen leichtem<sup>(46;95)</sup> bzw. schwerem Schädel-Hirn-Trauma<sup>(100)</sup> beschrieben. In einer weiteren Studie konnte Woertgen einen S-100 Anstieg nach Bungee-Sprüngen nachweisen<sup>(99)</sup>. Missler et al. berichteten 1997 ebenfalls über die Korrelation von Infarktgröße, klinischem Ergebnis und S-100-Werten im Plasma nach ischämischem Infarkt. Hierbei fand ein Assay Verwendung, welcher auf der in dieser Studie benutzten DELFIA-Technik basierte<sup>(61;63)</sup>. Mit der DELFIA-Technik gelang es auch, einen

Zusammenhang zwischen dem klinischen Zustand nach aneurysmatischer Subarachnoidalblutung, dem bekannten Grading nach Hunt und Hess und dem Plasmaspiegel des S-100 Proteins darzulegen<sup>(98)</sup>. Mit einer weiteren kommerziellen Messmethode von der Firma Medisera (einem Enzymimmunoassay) bestimmten Otto und Mitarbeiter 1997 die S-100 Konzentrationen im Liquor von Patienten mit Creutzfeldt-Jakob Krankheit<sup>(72)</sup>.

Nicht unerwähnt bleiben sollte in diesem Zusammenhang, dass die Bestimmung des S-100B Proteins im Blut eine Aussage über den Metastasierungsgrad von malignen Melanomen ermöglicht. Hierüber wurde mehrfach in der Literatur berichtet<sup>(57)</sup>.

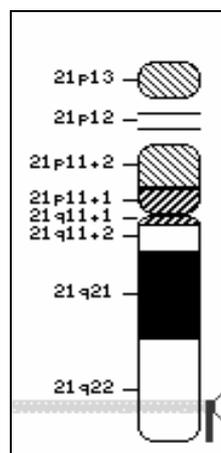
Während über die chemische Struktur des S-100 ausführliche Daten vorliegen, ist über das physiologische Verhalten nicht viel bekannt. Zwar gibt es eine Reihe von mehr oder weniger gut belegten Hypothesen über die Funktion des S-100 Proteins, insbesondere über die Kinetik in Körperflüssigkeiten weiß man jedoch nicht viel. Hårdemark berichtete 1989 über den unterschiedlich raschen Anstieg der S-100-Konzentration nach experimentellem Hirntrauma und experimenteller fokaler zerebraler Ischämie. Aurell berichtete 1989, dass das S-100 Protein im Liquor bei 4°C über mindestens 48 Stunden stabil ist, was im Widerspruch zu der von Noppe gemachten Beobachtung einer raschen Konzentrationsabnahme des S-100 im Liquor bei 4°C steht<sup>(7;70)</sup>. Blomquist berichtete 1997 im Rahmen einer Studie über Patienten nach herzchirurgischen Operationen über eine Eliminationshalbwertszeit des S-100B aus dem Blut von 2,2 Stunden<sup>(14)</sup>.

Abbildung 2: Das Modell eines S-100B Proteins mit Calcium beladen



**Abbildung 2:**  
Solution Structure Of Ca(2+) - Loaded Rat S100b (Betabeta) Nmr, 20 Structures<sup>(24)</sup>

Abbildung 3: Der Genlocus des S-100B auf Chromosom 21



**Abbildung 3:**  
Lokalisation S-100B auf Chromosom 21<sup>(39)</sup>

## 1.6 Das GFAP

Das Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) wurde erstmals 1971 isoliert<sup>(31)</sup>. Im Gegensatz zum S-100 Protein ist das GFAP ein monomeres Molekül, bestehend aus einer Polypeptidkette. Es ist wesentlicher Bestandteil des Zytoskelettes der Gliazellen des ZNS. Das Molekulargewicht des GFAP liegt nach Literaturangaben zwischen 40 und 53 kDa<sup>(81;82)</sup>. Unter physiologischen Bedingungen kommt es zu einer spontanen Polymerisation des Proteins zu fibrillären Elementen von einer Länge bis zu einem Mikrometer und einem Durchmesser von 0,8-1,06  $\mu\text{m}$ <sup>(16;28)</sup>. Die unterschiedlichen Angaben über die Größe der Peptide ergeben sich zum einen aus der Tatsache, dass das GFAP in vivo und in vitro einer Degradation unterliegt<sup>(19)</sup>. Zum anderen spielen auch die unterschiedlichen Präparationsmethoden eine Rolle (z.B. Polyacrylamidgelelektrophorese-PAGE, isoelektrische Präzipitation, Hydroxyapatit-Reinigung, Diethylaminoethyl-DEAE-Zellulose-Chromatographie). Der isoelektrische Punkt des GFAP liegt zwischen pH 5,7 und 5,8<sup>(28;29)</sup>.

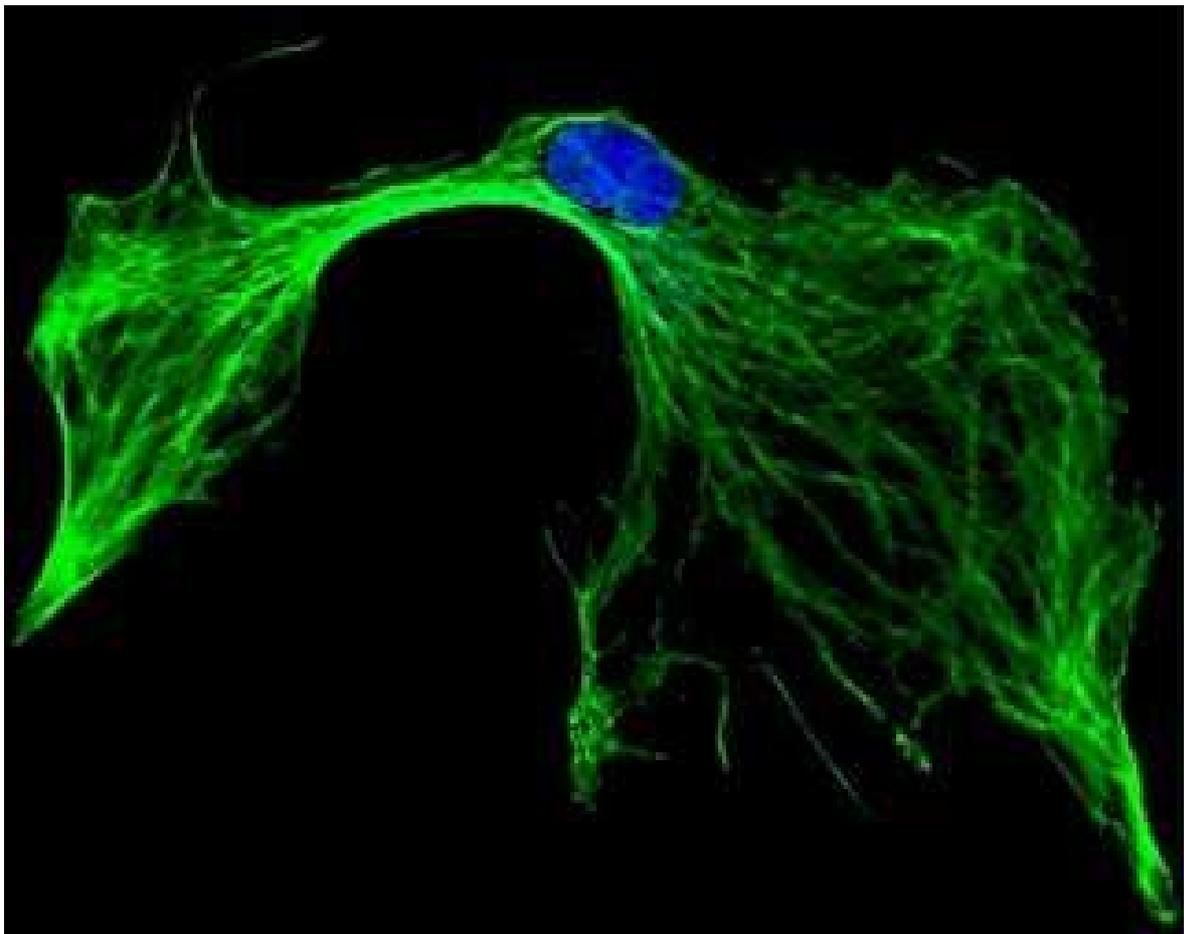
Das GFAP kommt nur in den Astrozyten des Zentralnervensystems (ZNS) vor und es fungiert hier als wesentlicher Baustein der Fibrillen des Zytoskeletts der fibrillären Astrozyten. Dies wurde in einer Vielzahl von Studien mit unterschiedlichen Markierungsmethoden berichtet<sup>(18;21;30)</sup>. Der immun-histochemische Nachweis des GFAP in Gewebeschnitten ist heute eine Routinemethode in der Neuropathologie.

Es existieren eine Reihe von Berichten über die quantitative Messung des GFAP im Liquor cerebrospinalis bei Hirninfarkten<sup>(6)</sup>, bei der hypoxisch-ischämischen zerebralen Läsion des Neugeborenen<sup>(12;13)</sup>, bei Kindern mit infantilem Autismus<sup>(77)</sup>, bei Patienten mit Multipler Sklerose<sup>(1;79)</sup>, bei Kindern mit juvenilen Enzephalopathien<sup>(27)</sup> und bei Patienten mit Lyme-Borreliose<sup>(23)</sup>. Albrechtsen berichtete 1985 über Versuche, mit einem Sandwichimmunoassay GFAP nicht nur im Liquor, sondern auch im Blut zu messen. Dies gelang jedoch aufgrund unklarer Interferenzen nicht<sup>(2)</sup>. Weitere Berichte über Messungen des GFAP im Blut liegen nicht vor. Die zitierten Arbeiten lassen bisher keine Beurteilung des klinischen Nutzens des GFAP in der neurologischen Diagnostik zu.

Zur Messung des GFAP im Liquor wurden ebenfalls unterschiedliche Messverfahren publiziert. Mori berichtete bereits 1975 über einen Radioimmunoassay<sup>(66)</sup>. Noppe publizierte 1979 über einen immunoradiometrischen Assay<sup>(71)</sup>. Albrechtsen wendete diese Technik 1985 in modifizierter Form auf die Messung des GFAP im Liquor an<sup>(2)</sup>. In diesem Assay kommen sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper zur Anwendung. Rosengren beschrieb 1985 einen kompetitiven Enzymimmunoassay, der sich eines polyklonalen Antikörpers bediente<sup>(78)</sup>. Dieser Assay wurde in modifizierter Form von Aurell nochmals 1991 beschrieben<sup>(6)</sup>. 1992 wurde von der selben Arbeitsgruppe eine neue Version eines Enzymimmunoassays publiziert, die nun als Sandwichassay mit 2 unterschiedlichen polyklonalen Antikörpern arbeitete<sup>(27;77)</sup>.

Referenzwerte für GFAP im Serum von Gesunden existieren bisher nicht.

Abbildung 4: Ein Astrozyt mit Grün angefärbtem GFAP



**Abbildung 4:**

Astrozyt mit GFAP – Färbung (GFAP: Grün; Zellkern: Blau), LabLion, Pennsylvania State University, College of Medicine

## 1.7 Reanimationen

Mit der Forschung an Tiermodellen wurde die cardiopulmonale Reanimation (CPR) um den Begriff cerebral (CPCR)<sup>(84)</sup> erweitert und die Therapie auf die Behandlung der „postresuscitation disease“ fokussiert wie sie Negovsky et al. bereits in den frühen 60ern beschrieben hat<sup>(69)</sup>. Die maximale Zeit, die ein einzelnes Neuron überleben kann, beträgt bis zu 20 Minuten<sup>(3)</sup>; in einer Studie werden sogar bis zu 60 Minuten<sup>(44)</sup> postuliert. Dennoch gilt eine Dauer von 5 Minuten<sup>(83)</sup> bis zur Wiederherstellung des Kreislaufes als Grenze für eine unbeschadete Funktionswiederaufnahme des Gehirns.

Eine sofort nach Herzstillstand begonnene Herz - Lungen – Wiederbelebung kann Herz und Gehirn für mehr als eine Stunde am Leben erhalten<sup>(90)</sup>. Bei Angabe dieser Zeitintervalle spielen allerdings beeinflussende Faktoren wie Alter, Temperatur, Hämatokrit, Grund für die Reanimation, Blutdruck, Blutgase, Blutzucker, verschiedenste Medikamenteneinflüsse und extrazerebrale Komplikationen eine große Rolle.

Schäden am Gehirn können jedoch nicht nur durch einen Mangel an Sauerstoff und Energie, sondern auch durch freie Radikale<sup>(59)</sup>, freies Eisen<sup>(83)</sup> und Toxine entstehen, die bei der Reperfusion und Reoxigenierung die Neuronen schädigen. Die Kürze der zur Verfügung stehenden Zeit stellt erhebliche Anforderungen an die Infrastruktur der Notfallversorgung.<sup>(89)</sup>

## 1.8 Diagnostik der hypoxischen Hirnschäden in der Bildgebung

Im ICD10 wird ein hypoxischer Hirnschaden als „G93.1 Anoxische Hirnschädigung, anderenorts nicht klassifiziert“ kodiert. Es existieren keine einheitlichen Diagnosekriterien. Eine Bildgebung, eine wegweisende Anamnese sowie der neurologische Status führen schließlich zur Diagnose eines hypoxischen Hirnschadens.

Im cCT (cerebrales Computer Tomogramm) wird ein solcher Hirnschaden folgenderweise sichtbar: in etwa 3-4 Tagen nach dem verursachenden Ereignis kommt es zu einer Anschwellung des Kortex mit Verkleinerung der Sulci, es kommt zu einer Hypodensität der Rinde, was eine Abgrenzung zum Mark

erschwert. Außerdem finden sich multiple hyperdense Areale insbesondere im Bereich der Falx, des Tentoriums und der basalen Cisternen<sup>(53;54;80)</sup>.

In der MRT (Magnet Resonanz Tomogramm) ist ebenfalls ein Ödem des Kortex nachzuweisen. Im kontrastmittelverstärkten (enhanced) T1 gewichteten Bild kann im frühen subakuten Stadium der Hypoxie eine Hyperintensität kortikal laminar gemessen werden, das nicht kontrastmittelangehobene T1 gewichtete Bild zeigt erst im späten subakuten Stadium die charakteristische laminare Hyperintensität<sup>(92)</sup>.

### 1.9 Fragestellung

Bisher war zur Diagnosestellung eine Bildgebung des Gehirns vonnöten. Entsprechende Geräte und gut geschultes Personal sind jedoch nicht flächendeckend vorhanden. Auch innerhalb einer gut ausgestatteten Klinik ist der Transport eines kreislaufinstabilen Patienten ein Risiko. Eine Quantifizierung zerebraler Strukturproteine aus einer Serumprobe zur Diagnosestellung eines hypoxischen Hirnschadens wäre somit für den Patienten und den Behandler eine Risikoreduktion bei der Diagnosestellung. Aus der Literatur ergaben sich Hinweise darauf, dass die Proteine S-100B und GFAP mögliche Marker dafür sein könnten. Es ergab sich somit die Frage, ob es möglich sei anhand der Serumproteinquantifizierung einen hypoxischen Hirnschaden nachzuweisen. Als Studientyp wurde eine prospektive Beobachtungsstudie gewählt.

## 2. Material und Methoden

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt und nach dem Wortlaut der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

### 2.1 Patienten

Im Zeitraum von Juli 2000 bis April 2002 wurden 217 Patienten auf den internistischen Intensivstationen (11a und 12a) und der anästhesiologischen Intensivstation (15i) des UKSH/Campus Lübeck gesehen, die im Zustand nach einer Reanimation aufgenommen worden waren. Anhand der Ein- und Ausschlusskriterien verblieben 62 Patienten, von denen Serum für diese Studie abgenommen wurde.

32 von ihnen mussten aus der laufenden Studie ausgeschlossen werden da

- Kein kraniales cCT bei unklarem neurologischen Status vorlag (n=19).
- Die Patientenakte nicht zur Überprüfung sämtlicher Ausschlusskriterien ausreichte (n=10).
- Sich im Nachhinein doch Ausschlusskriterien fanden.

Patienten im einzelnen:

- Sturz auf den Kopf aus 6m Höhe eine Woche zuvor (n=1)
- Pat. war dialysepflichtig (n=1)
- Pat. wurde während des Studienzeitraumes eine Zehe amputiert (n=1)

Die Zeitpunkte für die Blutabnahme waren direkt, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 sowie 170 Stunden nach Eintreffen auf der Intensivstation. Das Blut wurde ohne weitere Zusätze mittels Serummonovetten entnommen.

Alle Patienten wurden anhand ihres klinischen Bildes nach dem Cerebral Performance Category – Score (CPC) eingeteilt.

Tabelle 3: Die Einteilung nach der Cerebral Performance Kategorie

CPC – Score	Definition
1	Klares Bewusstsein mit normaler zerebraler Funktion oder leichter Behinderung
2	Klares Bewusstsein mit Behinderung
3	Bewusstsein mit schwerer Behinderung
4	Komatös
5	Hirntot

**Tabelle 3:**  
Die Einteilung nach dem „Cerebral Performance Kategorie Score“<sup>(4;41;42;73)</sup>.

## 2.2 Ein-/Ausschlusskriterien

Einschlusskriterium für die Patienten waren eine kardiopulmonale Reanimation mit Herzdruckmassage, Intubation und Defibrillation sowie eine erste Probenabnahme spätestens zum Zeitpunkt 24h nach Eintreffen auf der Intensivstation. Außerdem wurden wenigstens zwei Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten verlangt, deren Abnahmezeitpunkte mindestens 12 Stunden voneinander abwichen.

Die sich aus der Literatur ergebenden Ausschlusskriterien waren: Reanimation im Zusammenhang mit Operationen, neurologische, neurochirurgische und psychiatrische Erkrankungen, sowie maligne Melanome.

Als weiteres Ausschlusskriterium galt ein CPC-Score von 3 nach Ablauf des Beobachtungszeitraums von 7 Tagen wenn kein cCT zu diesem Zeitpunkt vorlag, welches einen hypoxischen Hirnschaden zeigte oder ausschloss, ein zerebrales Defizit somit nicht eindeutig auf die Reanimation zurückzuführen war.

Tabelle 4: Ein- und Ausschlusskriterien für das Patientenkollektiv

Einschluss		Ausschluss	
	Reanimation mit:	-	Neurologische, neurochirurgische oder psychiatrische Erkrankungen und
+	Defibrillation		
+	Herzdruckmassage		
+	Intubation und Beatmung	-	Erkrankungen die in Studien zu S-100B od. GFAP Anstiegen führten, z.B.:
+	erste Probe nicht älter als 24h nach Aufnahme		• Trauma
+	Wenigstens zwei Proben zu unterschiedlichen definierten Zeitpunkten mit mindestens 12h Abstand voneinander		• OP
			• Insulte
			• Melanome
		-	1. Probe zu einem späteren Zeitpunkt als 24h nach Aufnahme
		-	Alter: jünger als 16 Jahre
		-	CPC-Score 3 nach 7 Tagen und kein Nachweis eines hypoxischem Hirnschadens im cCT

**Tabelle 4:**  
Ein/Ausschlusskriterien dieser Studie

### 2.3 Neuroradiologische Diagnostik

Die für die Diagnostik notwendigen cCTs wurden von Neuroradiologen des Instituts für Neuroradiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein/Campus Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. Dirk Petersen) angefertigt und befundet. Das Studienprotokoll sah cCT - Untersuchungen 12-24 h sowie 72 h nach Reanimation vor.

Die Geräte die für die cCT - Untersuchungen zur Verfügung standen waren ein Toshiba Aquilion (Multislice Spirale CT; 120 KV, 225 mAs mit 0,5sec Umlaufzeit) und ein Siemens HiQ (135 KV, 475 mAs, 2 sec Umlaufzeit). Bei allen Aufnahmen

erfolgte eine Kippung der Gantry parallel zur deutschen Horizontalen. Die Schichtdicken betragen 4 mm infratentoriell und 8 mm supratentoriell. Die Parameter entsprachen dem Standard für cCTs zur Diagnose hypoxischer Hirnschäden.

Ein MRT war zum Zeitpunkt 24 h und einer Woche nach Reanimation geplant.

### 2.4 Probenverarbeitung

Das für die Proteinbestimmung benötigte Blut wurde durch die Pflegekräfte, behandelnden Ärzte oder durch mich mittels Serummonovetten (weiß) der Fa. Sarstedt abgenommen. Das Serum wurde innerhalb von maximal 24 Stunden, in denen die Monovetten im Kühlschrank bei 8°C lagerten, abzentrifugiert und in Eppendorf - Reaktionsgefäße zu je 500 µl aufgeteilt. Diese lagerten bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung.

Hämolytisches Probenmaterial wurde wegen möglicher Fehlbestimmungen verworfen<sup>(9)</sup>.

### 2.5 Die Messmethoden

#### *2.5.1 In allen Assays angewandte Verfahren*

Alle hier beschriebenen Messmethoden sind immunofluorometrische Sandwich-Festphasenassays, mit Flachboden-Mikrotiterplatten als Festphase. Zur Detektion wurde die zeitverzögerte Immunfluoreszenz (DELFI<sup>®</sup> =Dissociation Enhanced Lanthanide Fluorescence Immuno Assay) der Firma Wallac, Turku, Finnland verwendet. Das Messgerät war ein DELFIA 1234<sup>®</sup> Fluorometer (Wallac, Turku, Finnland). Um den Verbrauch des sehr kostspieligen DELFIA<sup>®</sup> Labelling-Reagent<sup>®</sup> (Pharmacia, Uppsala, Schweden) zu reduzieren, wurden alle zweiten Antikörper biotinyliert und als Signalträger mit Europium markiertes Streptavidin (Biomol, Hamburg, BRD) verwendet, da so ausschließlich spezifisch immunreagibles Protein mit Europium markiert wurde. Eine schematische Abbildung des Messverfahrens ist Abbildung 7 zu entnehmen.

### *2.5.2 Biotinylierung des zweiten Antikörper*

Es wurden jeweils ca. 10 mg Antikörper nach Fällung mit 20-prozentigem Polyethylenglycol (PEG) 6000 (Merck, Darmstadt, BRD) in Karbonatpuffer 0,05 mol/l, pH 9,6 (Merck) resolubilisiert und mit 1,5 mg Biotinamidocaproylester (Sigma) gelöst in 50 µl wasserfreiem Dimethylformamid über Nacht bei 4°C inkubiert. Das nicht gebundene Biotin wurde anschließend mittels Gelfiltration über eine Sephadex G100<sup>®</sup>-Säule (Pharmacia), eluiert mit TRIS/HCl 0,05 mol/l (Merck), pH 7,5 getrennt. Die den Antikörper enthaltenden Fraktionen, bestimmt mittels photometrischer Absorption bei 280 nm, wurden gepoolt und zu je 200 µl fraktioniert bei -80°C gelagert.

### *2.5.3 Markierung des Streptavidin mit Europium*

20 mg Streptavidin (Biomol, Hamburg, BRD) wurden entsprechend der Herstellervorschrift mit dem Europium Labelling-Reagent<sup>®</sup> (Pharmacia) markiert. Der nicht gebundene Europiumkomplex wurde entsprechend dem Vorgehen bei der Trennung der biotinylierten Antikörper über Sephadex G100<sup>®</sup> mit TRIS/HCl 0,05 mol/l, pH 7,5 getrennt, die Protein-enthaltenden Fraktionen gepoolt und zu je 200 µl eingefroren. Der Markierungserfolg wurde durch Messung von 10 µl einer 1:10.000-Verdünnung im Fluorometer kontrolliert.

### *2.5.4 Herstellung der Enhancementlösung*

Die Enhancementlösung wurde wie folgt hergestellt: Auf einen Liter aqua bidest wurden gegeben:

6,25 ml konzentrierte Essigsäure (Merck), 38 mg Tris-n-octylphosphinoxid (Merck), zusammen mit 222 mg Thenoyltrifluoroacetone (Sigma) in 2 ml Ethanol 100 Prozent (Merck) gelöst, 1,3 g Kaliumphthalat (Sigma), und 2 ml Triton X-100 (Sigma).

Die Lösung war unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur über mehr als ein Jahr stabil.

### 2.5.5 Herstellung des Waschpuffers

Zunächst wurde ein Konzentrat des Waschpuffers hergestellt, aus dem durch 1:50 Verdünnung die fertige Waschlösung hergestellt wurde.

Auf einen Liter aqua bidest wurden 15 g TRIS (Merck), 225 g NaCl (Merck) und 50 ml Tween 20 (Sigma) gegeben und anschließend mit HCl auf einen pH von 7,5 eingestellt:

### 2.5.6 Herstellung des TRIS/HCl/NaCl-Puffers

6 g/l TRIS, 9 g/l NaCl, 1 g/l  $\text{NaN}_3$ , 0,1 ml Tween 20, 80 mg/l DTPA (diethylen-triamin-pentaacetat) (Sigma), 10 g/l bovines Serumalbumin (Sigma) und 0,5 g/l bovines  $\gamma$ -Globulin (Sigma) wurden in einem Liter aqua bidest gelöst. Der Puffer für den S-100B Assay enthielt kein DTPA.

## 2.6 Messmethode für das S-100B Protein

Es wurden eine Reihe verschiedener Antikörperpaarungen gegen das S-100B Protein bezüglich ihrer Tauglichkeit für diese Messmethode in den möglichen Kombinationen untersucht. Auf die Darstellung aller Ergebnisse wird hier verzichtet. Als am besten geeignet erwiesen sich ein polyklonaler Antikörper vom Kaninchen gegen das S-100 Protein, der von der Firma DAKO, Hamburg, BRD vertrieben wird sowie ein monoklonaler Antikörper von der Maus gegen die  $\beta$ -Kette des S-100 Proteins (Clone SH-B4, Sigma/Deisenhofen, BRD). Als Antigen zur Immunisierung für beide Antikörper war S-100 Protein aus Rinderhirn, das entsprechend der Methode von Moore (1965) gewonnen worden war, verwendet worden (Sigma).

Als Standard diente eine Mischung aus gereinigtem S-100a (S-100 $\alpha\beta$ ) und S-100b (S-100  $\beta\beta$ ) Protein vom Rind (Sigma) im Verhältnis 1:1, verdünnt in Pferdeserum (GIBCO, Eggenstein, BRD).

Flachboden-Mikrotiterplatten (Nunc Maxisorp F96, Roskilde, Dänemark) wurden mit 400 ng/well des Antikörpers gegen die S-100  $\beta$ -Kette (Sigma) in 200  $\mu$ l Phosphatpuffer 0,05 mol/l, pH 8,6 (Merck) bei 4 °C über Nacht beschichtet.

Die beschichtete Platte wurde zweimal mit Waschpuffer (je 5 ml/well) im DELFIA® Platewasher gewaschen und mit je 300 µl Karbonatpuffer 0,05 mol/l, pH 9,6 (Merck) mit 10 g/l bovinem Serumalbumin (Sigma) nachbeschichtet. Nach einem weiteren Waschschrift wurden je 200 µl Standard, Kontrollen und Proben zusammen mit je 50 µl Pferdeserum (GIBCO) und 25 mmol/l CaCl<sub>2</sub> für 2 Stunden inkubiert (siehe Abbildung 6). Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (Heidolph, Kehlheim, BRD) mit 150 min<sup>-1</sup> durchgeführt.

Nach mehrmaligem Waschen mit Waschlösung wurden 200 µl des Säuleneluates des biotinylierten Antikörpers gegen S-100B (DAKO) in einer Verdünnung von 1:1000 in Assaypuffer ohne DTPA mit 5 mmol/l CaCl<sub>2</sub> entsprechend einer Antikörperkonzentration von etwa 2 mg/l für eine weitere Stunde inkubiert.

Nach Waschen mit Waschlösung wurde Streptavidin in Assaypuffer in einer Endverdünnung von 1:25.000 entsprechend 12 µg/l für 30 Minuten inkubiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden je 200 µl Enhancementlösung zugegeben, für 15 Minuten inkubiert und die Platte anschließend im DELFIA®-Fluorometer gemessen. Die Standardkurve wurde als Spline-Funktion mittels des Fia-Calc®-Auswerteprogrammes (Wallac®) in doppelt logarithmischer Form erstellt und an ihr die Konzentrationen der unbekanntenen Proben ermittelt. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

### 2.7 Messmethode für das GFAP

Als Festphasenantikörper diente ein Cocktail von Maus -Antikörpern gegen das GFAP der Firma Sternberger (die Klone MAb1B4, MAb2E1, Mab4A11 und SMI 21). Dieser wurde jedoch nicht direkt an die Platte gebunden, sondern die Platte wurde zunächst mit einem polyklonalen, antigenaffinitätsgereinigten Ziegenantikörper gegen Maus-ImmunglobulinG (IgG), ca. 400 ng/well in 200 µl Karbonatpuffer 0,05 mol/l, pH 9,6 über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der Antikörper gegen GFAP von der Maus in einer Konzentration von ca. 600 ng/well in 200 µl Assaypuffer über Nacht inkubiert und die Platte dann so bei 4°C gelagert.

Als zweiten markierten Antikörper verwendeten wir einen polyklonalen Kaninchenantikörper gegen GFAP von DAKO, der wie oben beschrieben biotinyliert worden war.

Zur Kalibrierung wurde hochreines GFAP von der Firma Progen, verdünnt in einem humanen Serumpool, der nach längerer Lagerung keine GFAP Reaktivität im Assay mehr zeigte, verwendet.

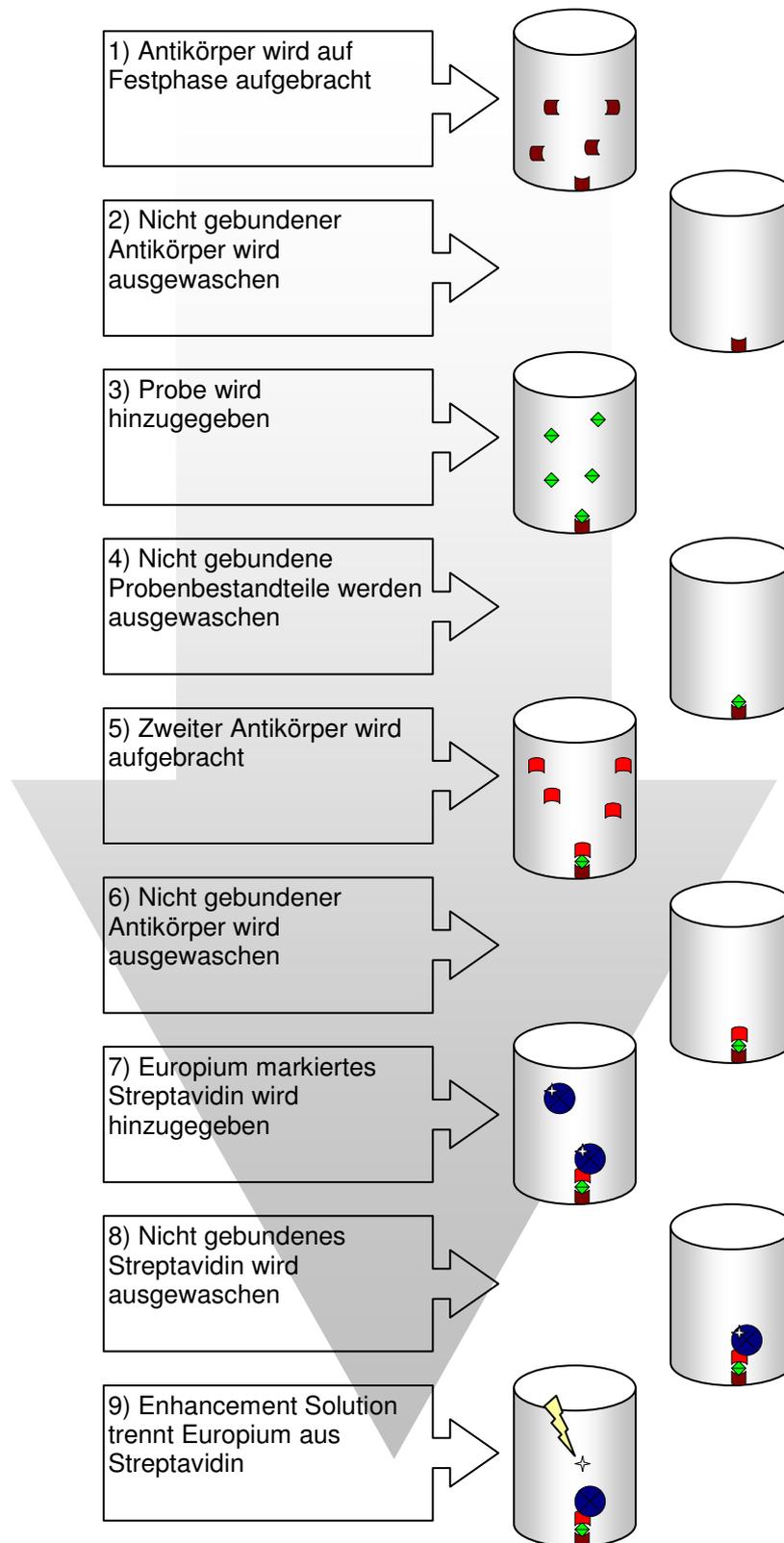
Die beschichtete Mikrotiterplatte wurde zunächst mit 200 µl/well Standards, Kontrollen und Patientenproben für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde der zweite markierte Antikörper in einer 1:1500-Verdünnung des Säuleneluates in Assaypuffer mit 50% Neugeborenen-Kälberserum (NCS), (GIBCO) für eine weitere Stunde inkubiert. Es folgten die oben bereits beschriebenen Inkubationen mit Streptavidin/Europium und Enhancementlösung. Die Messung und Auswertung der Standardkurve erfolgte ebenfalls wie zuvor beschrieben auf dem DELFIA® 1234 Fluorometer.

Abbildung 5: Das Pipetierschema beispielhaft für einen Messdurchgang

0,02 µg/l Std	0,02 µg/l Std	0,1 µg/l Std	0,1 µg/l Std	0,5 µg/l Std	0,5 µg/l Std	2,5 µg/l Std	2,5 µg/l Std	12,5 µg/l Std	12,5 µg/l Std	25 µg/l Std	25 µg/l Std
Puffer	Puffer	Pferde-Serum	Pferde-Serum	NaCl	NaCl	K1	K1	K2	K2	P1	P1
P2	P2	P3	P3	P4	P4	P5	P5	P6	P6	P7	P7
P8	P8	P9	P9	P10	P10	P11	P11	P12	P12	P13	P13
P14	P14	P15	P15	P16	P16	P17	P17	P18	P18	P19	P19
P20	P20	P21	P21	P22	P22	P23	P23	P24	P24	P25	P25
P26	P26	P27	P27	P28	P28	P29	P29	P30	P30	P31	P31
P32	P32	P33	P33	P34	P34	P35	P35	K1	K1	K2	K2

Abbildung 5:  
Pipetierschema S-100B

Abbildung 6: Die Schritte des Messverfahrens im Einzelnen



**Abbildung 6:**  
Schematische Darstellung des Messvorganges

## 2.8 Statistische Messverfahren und Abbildungen

Für die Vergleiche zwischen den Kollektiven der Patienten mit hypoxischem Hirnschaden und denen ohne hypoxischen Hirnschaden wurden als statistische Berechnungen der Korrelationskoeffizienten mittels Spearman – Rank – Test, sowie Mann-Whitney-U-Test gebildet. Die dazu verwandte Software war das Programm SPSS in der Version 9.0.

Die grafische Darstellung der Kurvenverläufe wurde mittels der Programme SigmaPlot Version 5.0 sowie Microsoft Excel Version XP berechnet, dargestellt sind Einzelverläufe oder Gruppenvergleiche veranschaulicht durch Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

Die grafischen Abbildungen wurden mit der Software PaintShop Pro Version 7.0 nachbearbeitet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Messmethoden S-100B/GFAP

Um die Spezifität der Messmethode für das S-100B zu bestimmen wurde Patientenplasma im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt. Die erhaltenen Konzentrationen lagen in der Wiederfindung zwischen 94 % und 103 %.

Die untere Nachweisgrenze wurde bestimmt indem zwanzigmal das Verdünnungsmedium (Pferdeserum) gemessen wurde. Dem Mittelwert der dabei erhaltenen Messantwort wurde die dreifache Standardabweichung addiert. Daraus ergab sich eine untere Nachweisgrenze von  $\leq 0,015 \mu\text{g/l}$ .

Die Intraassayvarianz wurde für drei Konzentrationsbereiche einzeln bestimmt. Nach zwanzigfacher Messung einer Probe mit  $0,51 \mu\text{g/l}$  lag die Varianz bei 3,2%. Für eine Probe mit einer Konzentration von  $5,97 \mu\text{g/l}$  ergab sich eine Intraassayvarianz von 2,1 % und für die 3. Probe mit einer Konzentration von  $11,4 \mu\text{g/l}$  wurde ein Variationsquotient von 2,3 % errechnet. Die Interassayvarianz, die sich aus der prozentualen Standardabweichung der an 20 verschiedenen Messtagen bestimmten Konzentrationen ergibt, lag für eine Probe mit der mittleren Konzentration von  $0,45 \mu\text{g/l}$  bei 11,5 %, für eine Probe mit  $4,79 \mu\text{g/l}$  bei 7,9 % und für einer Probe mit  $15,45 \mu\text{g/l}$  bei 7,8 %.

Die Wiederfindung im Mischversuch lag für das GFAP zwischen 100% und 107%. Die untere Nachweisgrenze betrug für das GFAP nach zwanzigfacher Messung des Verdünnungsmediums bei  $\leq 0,01 \mu\text{g/l}$ .

Der Variationsquotient der Intraassayvarianz lag bei 4,71 % für  $0,2 \mu\text{g/l}$ , bei 4,24% für  $1,95 \mu\text{g/l}$  und bei 3,52 % für  $9,58 \mu\text{g/l}$ . In der Interassayvarianz wurde ein Variationsquotient von 10,9 % für  $0,066 \mu\text{g/l}$ , von 7,3 % für  $0,7 \mu\text{g/l}$  und von 7,5 % für  $7,46 \mu\text{g/l}$  berechnet.

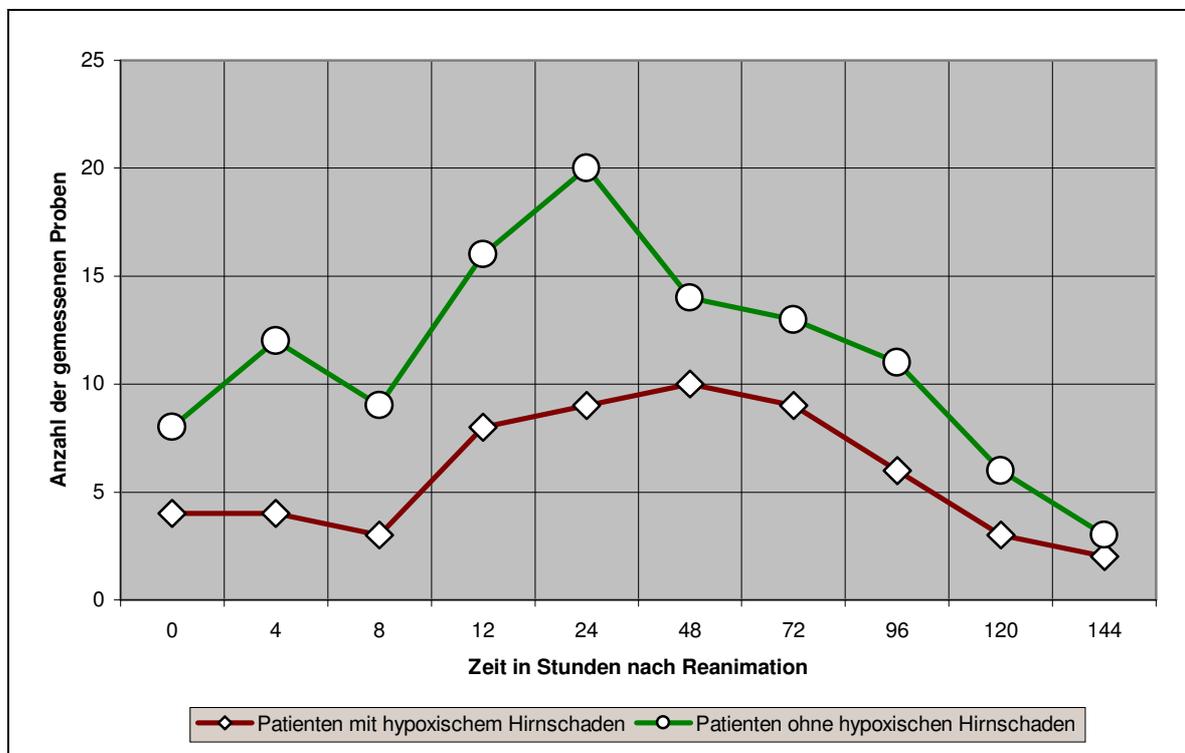
### 3.2 Patientenübersicht

Von den insgesamt 30 in die Studie aufgenommenen Patienten hatten 10 Patienten einen hypoxischen Hirnschaden (CPC-Score 4 oder innerhalb des Beobachtungszeitraumes verstorben). 20 Patienten überlebten ohne ausgeprägte nachweisbare Hirnschäden (CPC-Score 1-2).

Bei den 10 hypoxischen Patienten handelte es sich um sechs weibliche und vier männliche Patienten. Das Alter betrug zwischen 17 Jahren und 81 Jahren, im Mittel 56,4 Jahre (Standardabweichung 24,1 Jahre). Die Patienten wurden über eine Dauer von 10 Minuten bis 90 Minuten, im Mittel 40 Minuten reanimiert.

Die 20 Patienten ohne hypoxischen Hirnschaden waren zu 3/4 männlich (15 Männer und 5 Frauen). Ihr Alter reichte von 37 Jahren bis 92 Jahren, im Mittel 65 Jahre (Standardabweichung 15,6 Jahre). Die Reanimationsdauer der nicht hypoxischen Patienten betrug zwischen 5 Minuten und 60 Minuten - im Mittel 26 Minuten. Nicht von allen Patienten waren Proben zu allen vom Studienplan geforderten Zeitpunkten verfügbar. Zu den einzelnen Abnahmezeitpunkten teilen sich die 170 gewonnenen Proben der eingeschlossenen Patienten wie folgt auf:

Abbildung 7: Anzahl der Proben pro Zeiteinheit



**Abbildung 7:** Anzahl der abgenommenen Proben aufgeteilt zwischen den Patienten mit und ohne hypoxischen Hirnschaden zu den jeweiligen Messzeitpunkten

### 3.3 S-100B

#### 3.3.1 *Patienten ohne hypoxischen Hirnschaden*

Die S-100B – Serumkonzentration in der Gruppe der nicht hypoxischen Patienten lag lediglich bei zwei Patienten unmittelbar nach der stationären Aufnahme mit Werten von 0,73 µg/l und 0,77 µg/l in einem auffallend hohen Bereich. Im Verlauf sanken diese Werte innerhalb von 8 Stunden auf das Niveau der anderen reanimierten Patienten ab. Neben diesen beiden Patienten trat bei zwei weiteren eine erhöhte S-100B - Konzentration auf:

Ein Patient zeigte acht Stunden nach Reanimation eine Konzentration von 0,662 µg/l die bis auf 0,30 µg/l am 5. Tag konstant abfiel. Der Patient entwickelte im Beobachtungszeitraum ein akutes Nierenversagen. Ein weiterer Patient hatte eine S-100B – Konzentration von 1,84 µg/l zwölf Stunden nach Reanimation, die einen Tag später auf 0,32 µg/l abfiel und sich bis zum 7. Tag auf einer Konzentration um 0,34 µg/l hielt. Dieser Patient war anhand seines klinischen Bildes nicht auffällig.

Tabelle 5: Maximale S-100B Konzentrationen und Messzeitpunkte

Patient	Höchste S-100B Konzentration (in µg/l)	Zeitpunkt von der maximal gemessenen Konzentration (in Stunden nach Aufnahme)
1	0,73	0
2	0,28	120
3	0,13	12
4	0,37	72
5	0,31	4
6	0,66	8
7	0,07	8
8	0,18	4
9	0,11	24
10	0,22	0
11	1,84	12
12	0,32	4
13	0,28	72
14	0,30	96
15	0,30	24
16	0,77	0
17	0,17	0
18	0,17	0
19	0,41	0
20	0,19	4
	Mittelwert: 0,37 +/- 0,40	Mittelwert: 24,4 +/- 36,7

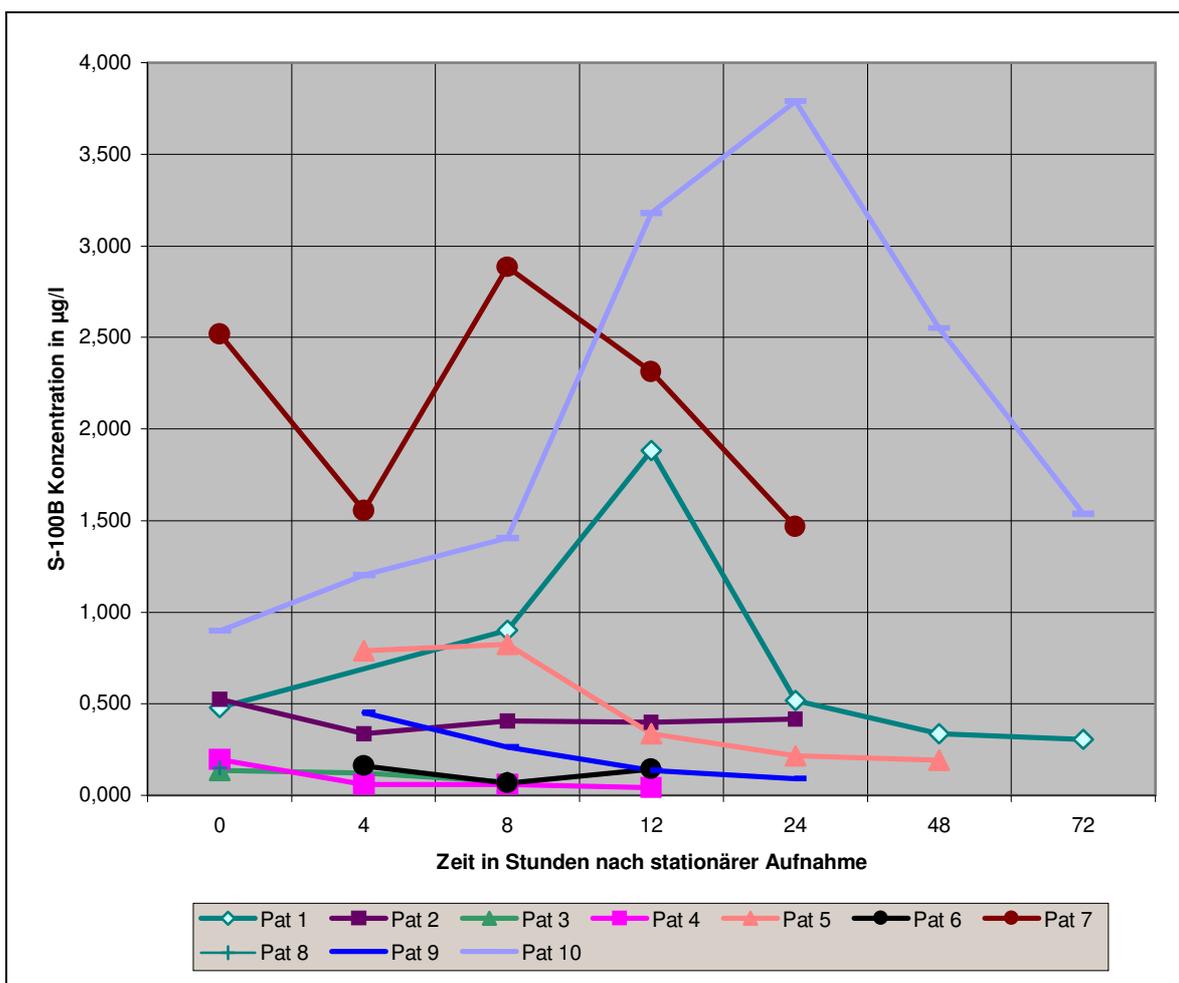
**Tabelle 5:**

Zeitpunkt der maximalen S-100B Konzentrationen bei den Patienten ohne hypoxischen Hirnschaden

### 3.3.2 Patienten mit hypoxischem Hirnschaden

Den S-100B Konzentrationsverlauf der 52 untersuchten Proben der 10 Patienten mit hypoxischem Hirnschaden stellt Abbildung 8 dar.

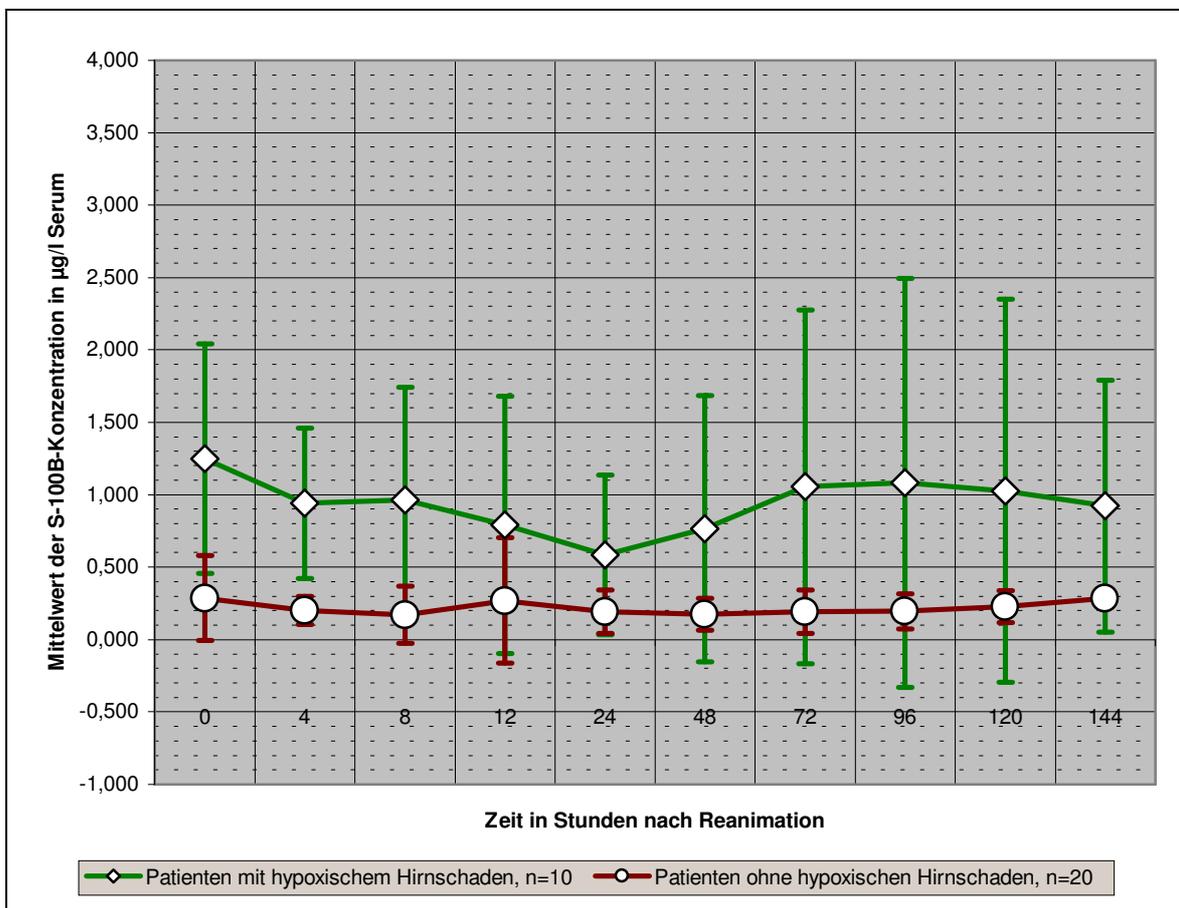
Abbildung 8: S-100B Konzentrationen im Verlauf



**Abbildung 8:**  
S-100B Konzentrationsverlauf der Patienten mit hypoxischem Hirnschaden (jede Kurve entspricht einem Patienten)

### 3.3.3 Vergleich der S-100B Konzentrationen bei Patienten mit und ohne hypoxischen Hirnschaden

Abbildung 9: Mittelwert der S-100B Konzentrationen



**Abbildung 9:** Vergleichende Darstellung des Mittelwert - Verlaufs der S-100B -Serumkonzentration bei Patienten mit und ohne hypoxischen Hirnschaden (mit Angabe der jeweiligen Standardabweichungen)

Die Abbildung 9 zeigt den Verlauf der S-100B Serumkonzentrationen. Statistisch fand sich zu den einzelnen Messpunkten kein signifikanter Unterschied (U-Test nach Mann-Whitney).

### 3.4 GFAP

#### *3.4.1 Patienten ohne hypoxischen Hirnschaden*

Innerhalb der Gruppe der Patienten ohne hypoxischen Hirnschaden konnte zu keinem Zeitpunkt ein Serumkonzentrationsanstieg für das GFAP in dem Messbereich der verwendeten Methode nachgewiesen werden.

#### *3.4.2 Patienten mit hypoxischem Hirnschaden*

Die Ergebnisse dieser Untersuchung ergaben für alle hypoxischen Patienten einen Anstieg der GFAP - Serumkonzentration im Laufe von sieben Tagen in den Messbereich auf Werte bis 0,753 µg/l.

#### *3.4.2. Verlauf*

Unter den Patienten mit hypoxischem Hirnschaden, denen unmittelbar nach Aufnahme auf die Intensivstation Blutproben abgenommen wurden, zeigten alle 4 Patienten einen GFAP-Konzentrationsanstieg; innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme konnte bei 7 der 10 Patienten GFAP nachgewiesen werden (zu den einzelnen Zeitpunkten s. Tabelle 6).

Das nachgewiesene GFAP bewegt sich in einer Größenordnung beginnend mit der unteren Nachweisgrenze der Methode bis zu 0,3 µg/l GFAP im Serum.

Der Verlauf der Proteinkonzentrationen bei den einzelnen Patienten ist in Abbildung 11 dargestellt.

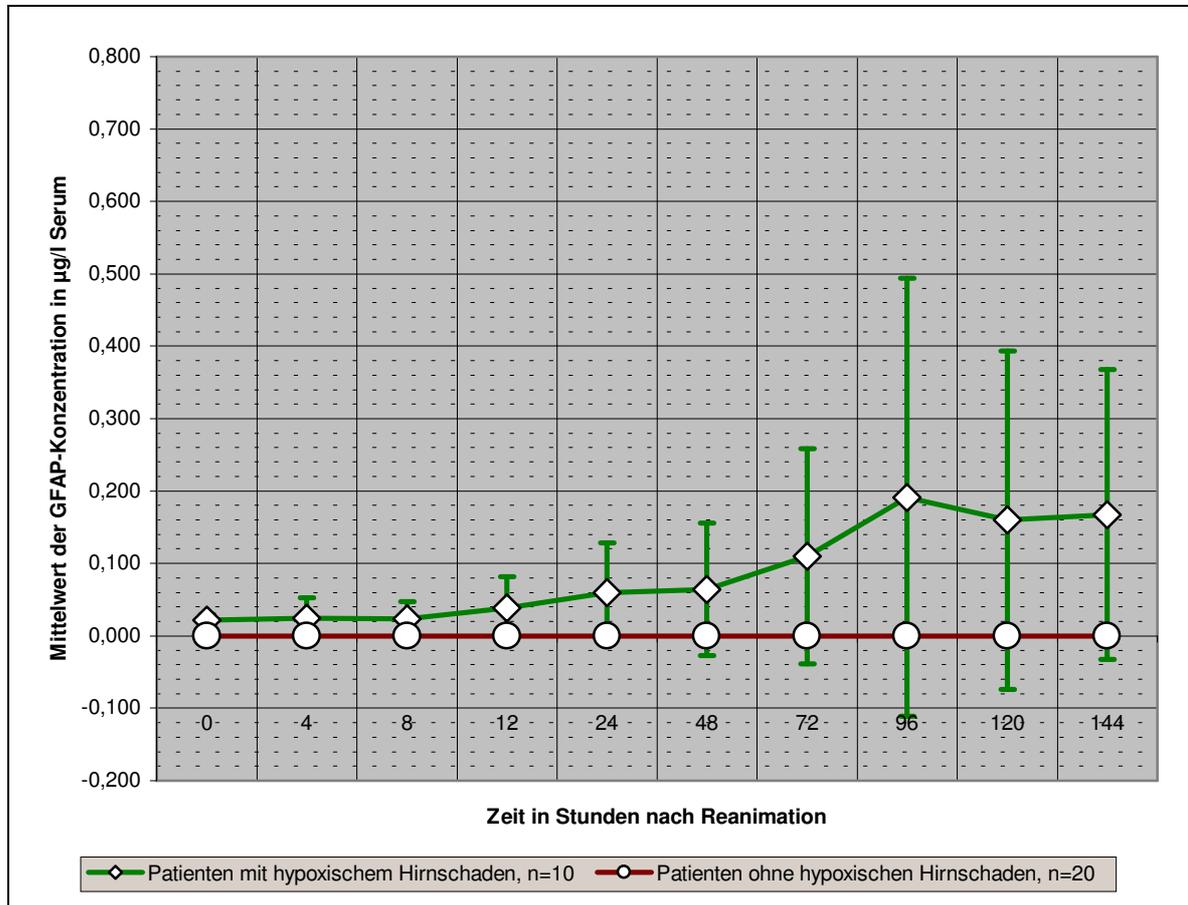
Tabelle 6: Positiver GFAP – Nachweis zu den einzelnen Messpunkten

Zeitpunkt nach Aufnahme	Zahl der Patienten mit positivem GFAP Nachweis zu diesem Zeitpunkt	Gesamtzahl der Patienten zu diesem Zeitpunkt	Zahl der bis zu diesem Zeitpunkt erfassten Patienten
0	4	4	4
4	3	4	5
8	2	3	6
12	5	8	9
24	7	9	10
48	8	10	10
72	7	9	10
96	5	6	10
120	3	3	10
144	2	2	10

**Tabelle 6:**

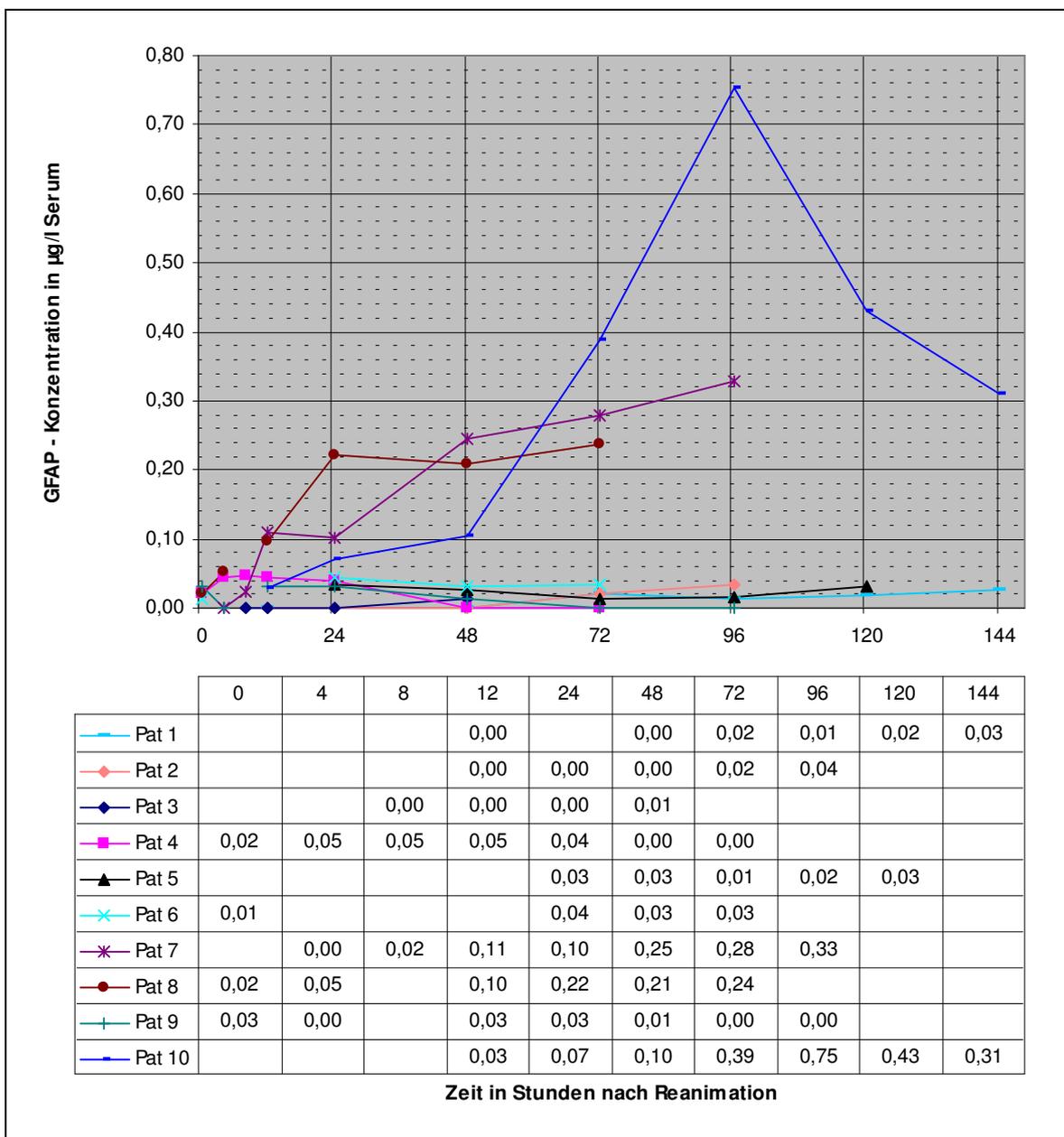
Qualitativer GFAP-Nachweis bei den Patienten mit hypoxischen Hirnschäden zu den unterschiedlichen Abnahmezeitpunkten.

Abbildung 10: Mittelwert der GFAP - Konzentrationen

**Abbildung 10:**

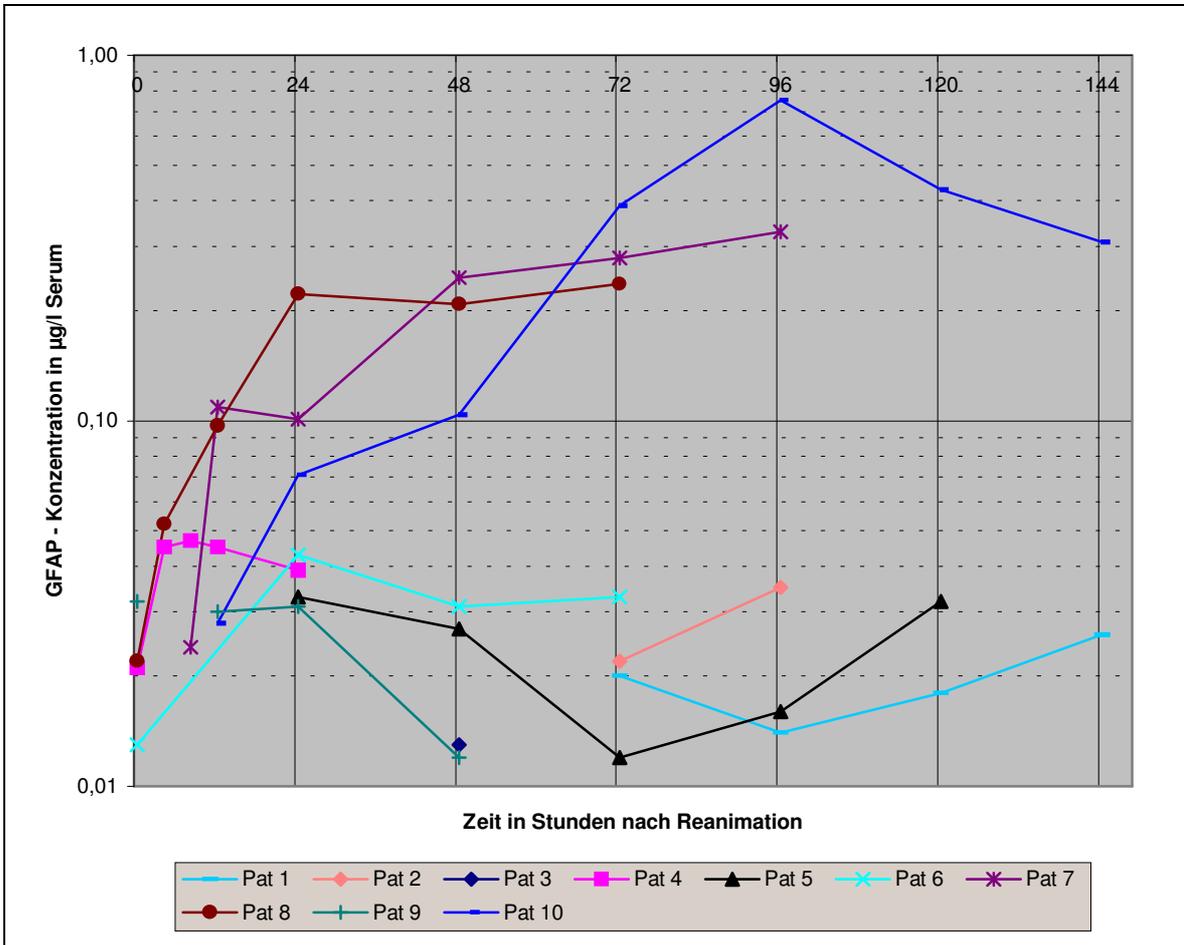
Vergleichende Darstellung des Mittelwert - Verlaufs der GFAP -Serumkonzentration bei Patienten mit und ohne hypoxischen Hirnschaden

Abbildung 11: GFAP – Konzentrationsverläufe der Patienten mit hypoxischem Hirnschaden



**Abbildung 11:** Einzelverläufe der GFAP – Konzentrationen der Patienten mit hypoxischem Hirnschaden.

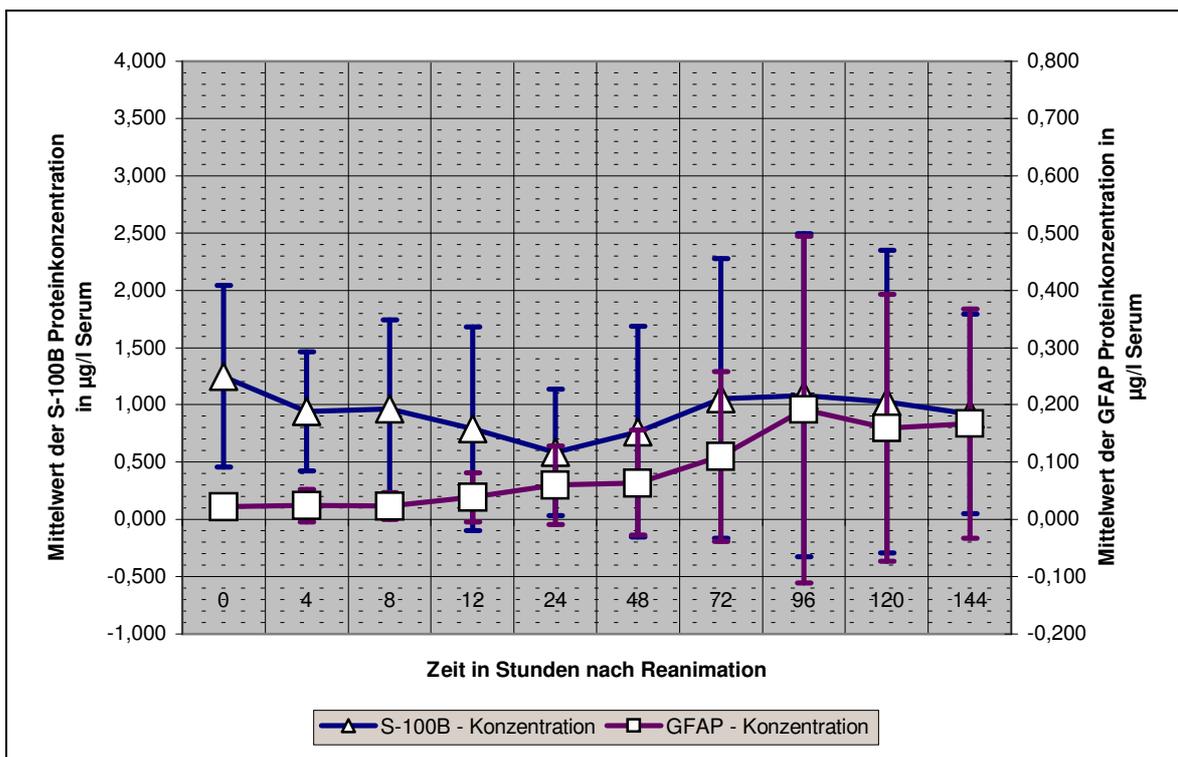
Abbildung 12: GFAP – Konzentrationsverläufe der Patienten mit hypoxischem Hirnschaden in log. Darstellung



**Abbildung 12:**  
Einzelverläufe der GFAP – Konzentrationen der Patienten mit hypoxischem Hirnschaden

### 3.5 Verlaufsbeschreibung von GFAP und S-100B Konzentrationen bei Patienten mit hypoxischem Hirnschaden

Abbildung 13: S-100B und GFAP Mittelwerte im Verlauf



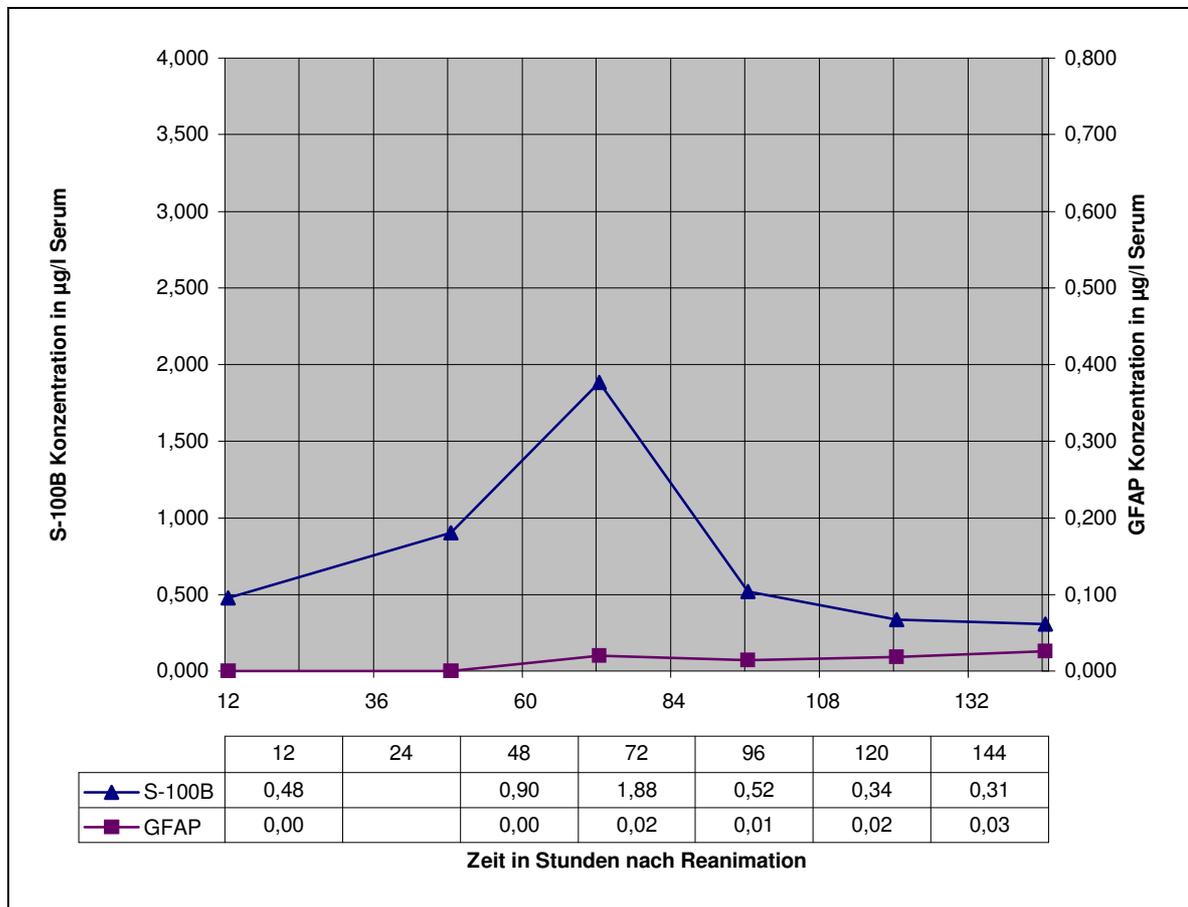
**Abbildung 13:**

S-100B und GFAP Mittelwertverlauf bei Patienten mit hypoxischem Hirnschaden

### 3.6 Exemplarische Fallbeschreibung für einen Patienten mit hypoxischem Hirnschaden

Die Patientin war 30 Jahr alt und wurde aufgrund einer anaphylaktischen Reaktion auf einen Bienenstich reanimiert. Die Dauer der Reanimation betrug 20 Minuten. Weitere Erkrankungen bestanden nicht.

Abbildung 14: Nachweis zerebraler Strukturproteine bei einer Patientin mit hypoxischem Hirnschaden



**Abbildung 14:**  
Verlauf der Proteinkonzentrationen von S-100B und GFAP bei der Patientin NH

Anfänglich (nach 12 Stunden) war kein GFAP nachzuweisen. 48 Stunden nach Reanimation war sowohl ein Anstieg von S100B als auch des GFAP zu bemerken. Die Konzentration des S-100B war nach 120 Stunden nicht mehr auffällig, wohingegen die GFAP – Konzentration weiterhin erhöht war.

7 Tage nach Reanimation war die Patientin neurologisch schwerst geschädigt (CPC 4). Die Patientin wurde nach 13 Tagen im appallischen Syndrom von der Intensivstation entlassen und in eine neurorehabilitative Behandlung überführt.

Abbildung 15: cCT der Patientin

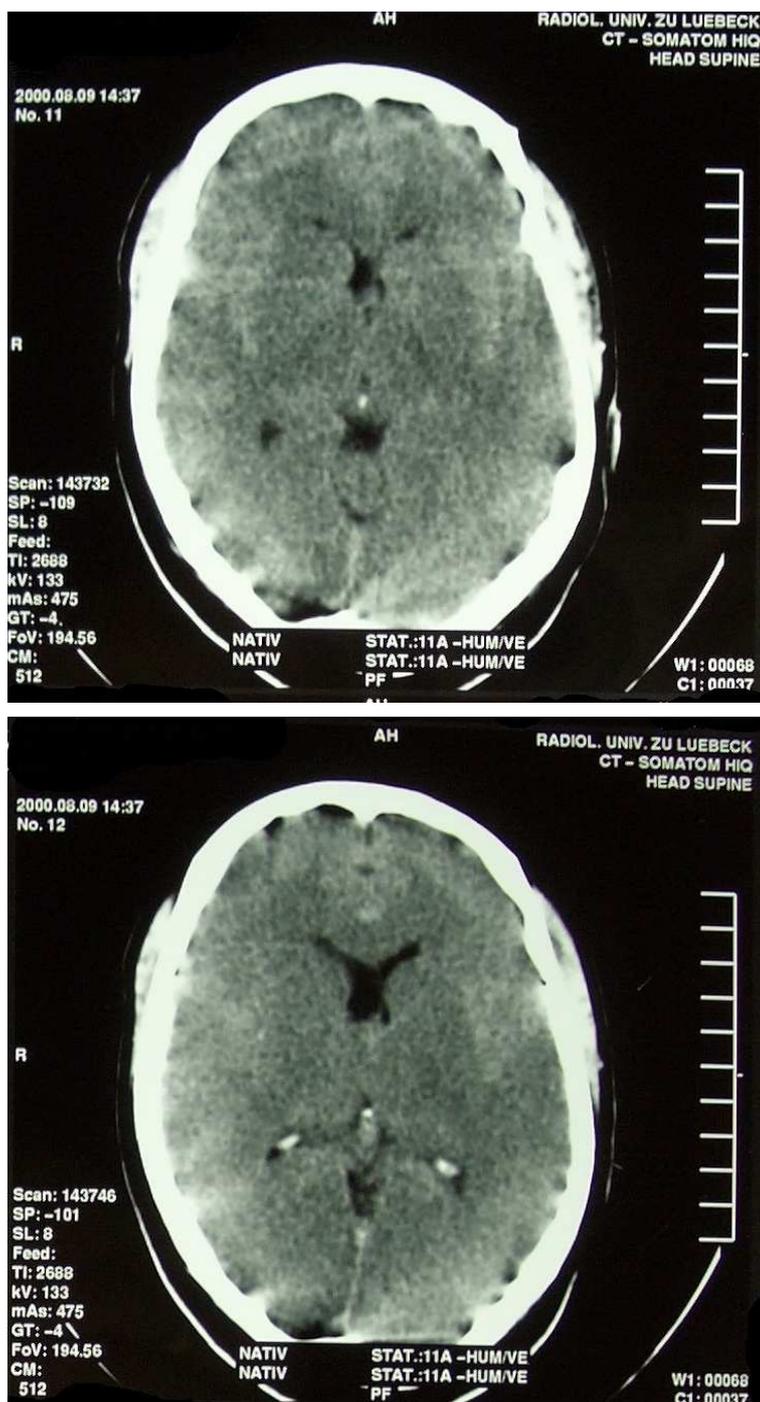
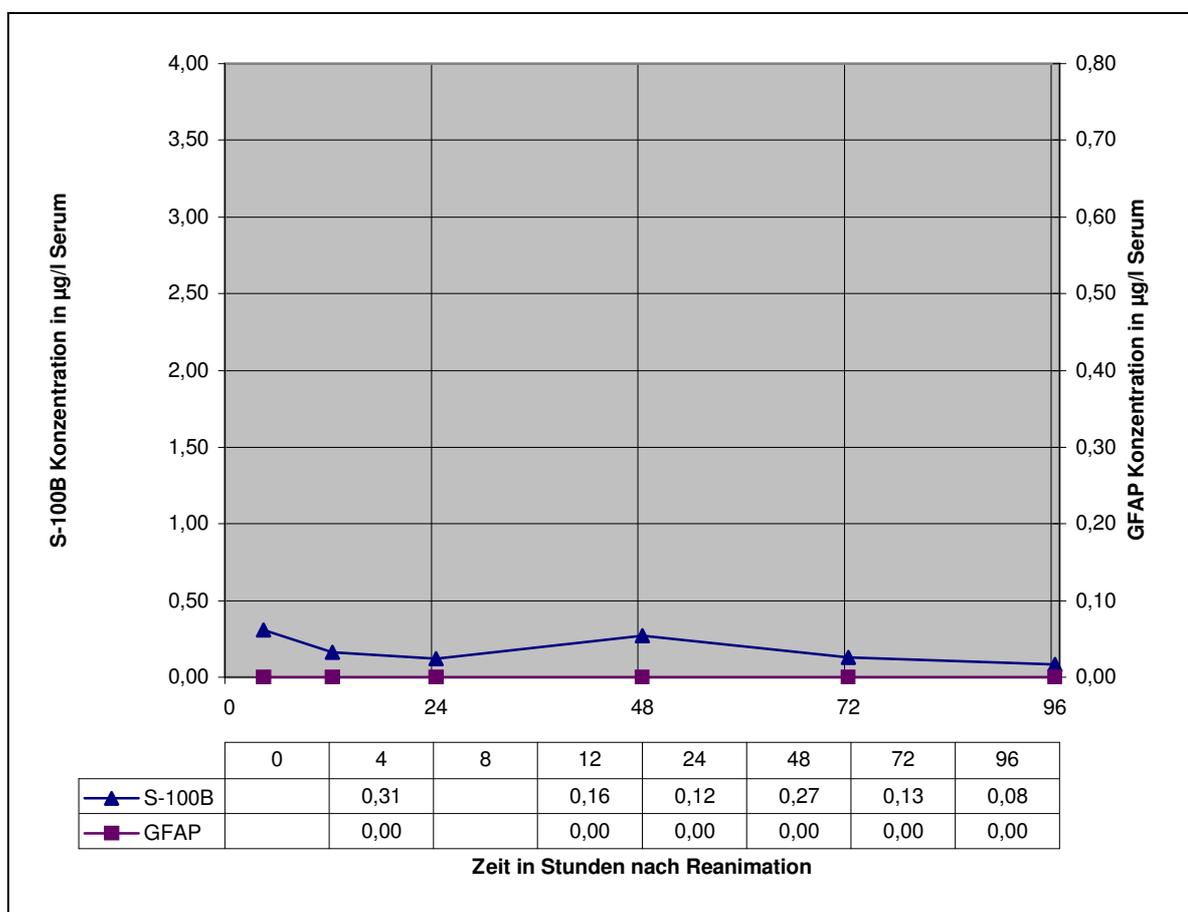


Abbildung 15:  
cCT der Patientin, vier Tage nach Reanimation

### 3.7 Exemplarische Fallbeschreibung für einen Patienten ohne hypoxischen Hirnschaden

Der Patient war 84 Jahre alt und wurde aufgrund eines Herzinfarktes reanimiert. Die Dauer der Reanimation betrug 20 Minuten.

Abbildung 16: Nachweis zerebraler Strukturproteine bei einem Patienten ohne hypoxischen Hirnschaden



**Abbildung 16:**  
Verlauf der Proteinkonzentrationen von S-100B und GFAP bei dem Patienten MR

Die Behandlung auf der Intensivstation verlief problemlos. Am 5. Tag nach Reanimation konnte der Patient wach, voll orientiert, in Aufmerksamkeit und Konzentration im Gespräch unauffällig (CPC –Score 1) auf eine periphere Station überwiesen werden

## 4. Diskussion

### 4.1 Patienten

Die Aquisition von Patienten für eine Untersuchung wie hier vorgestellt ist logistisch schwierig. Es war innerhalb von zwei Jahren trotz intensiver Bemühungen nicht möglich mehr Patienten in die Studie einzuschließen. Auch die Notfallsituation, in der die reanimierten Patienten auf den Intensivstationen aufgenommen wurden, erschwerten die Probengewinnung besonders zu den frühen Abnahmezeitpunkten. Für die Konzentrationsbestimmung wurde eine zusätzliche Serum-Probe nötig, deren Abnahme unter den Bedingungen der Notfallsituation mitunter nicht erfolgte. Nicht immer konnten alle Messzeitpunkte eingehalten werden. Innerhalb der ersten vier Stunden konnten nur bei 5 der 10 Patienten mit hypoxischem Hirnschaden und 13 der 20 Patienten ohne hypoxischen Hirnschaden Proben gewonnen werden.

Für diese Studie wurde zunächst allen Patienten Blut abgenommen, die reanimiert auf den Stationen 11a, 12a (internistische Intensivstationen) oder 15i (anästhesistische Intensivstation) des Universitätsklinikums Lübeck aufgenommen wurden und bei denen die Möglichkeit eines hypoxischen Hirnschadens nicht ausgeschlossen werden konnte.

Die Prüfung der Patienten auf mögliche Vorerkrankungen, die einen Anstieg zerebraler Strukturproteine verursachen erfolgte durch Aktenstudium und soweit möglich Befragung der Angehörigen und des Patienten selbst. Auf eine genauere Überprüfung dieser Angaben beispielsweise durch eigene Nachuntersuchungen wurde im Rahmen dieser Studie verzichtet.

Behandlungsregime und Medikation der Patienten wurden durch diese Studie nicht vorgegeben, d.h. die Patienten erhielten eine krankheitsspezifische individuelle Therapie. Bisher gibt es in der Literatur keinen beschriebenen Einfluss bestimmter Medikamente auf die Freisetzung zerebraler Strukturproteine, was uns dazu bewog keine weitere Gruppeneinteilung der Patienten nach der gegebenen Medikation durchzuführen.

Bei allen Patienten wurde im Protokoll des Rettungsdienstes eine Reanimationsdauer angegeben. Anhand dieser Zeitangabe konnten allerdings

keine weiteren Aussagen getroffen werden, da die Zeitangaben weder für die Gruppe der Patienten mit noch ohne hypoxische Hirnschädigung signifikant unterschiedlich war. In diesem Zusammenhang interessant wäre eine Angabe über die Dauer des Herz-Kreislaufstillstandes. Für eine solche Zeitangabe wäre jedoch ein Kreislaufstillstand unter Stationsbedingungen nötig. Tierversuche zeigen einen S-100B Anstieg nach iatrogenem Kreislaufstillstand – auf die Dauer des Kreislaufstillstandes und eine Abhängigkeit mit der S-100B Konzentration wurde aber bisher nicht eingegangen.

Bei einem Teil der Patienten fand vor Eintreffen des Notarztes eine Laienreanimation statt. Inwieweit die Ausbildung des Helfers einen Einfluss auf die Proteinkonzentration hat, konnte in dieser Studie nicht geklärt werden.

Im Vergleich zwischen den Patienten mit und denen ohne Hirnschädigung fällt auf, dass das Durchschnittsalter der Patienten ohne hypoxischen Hirnschaden höher ist. Möglicherweise spielen für diese Beobachtung bessere kardialen Kompensationsmechanismen der jüngeren Patienten eine Rolle, die es ihnen ermöglicht die Notfallsituation zu überstehen. Auf der anderen Seite sterben ältere Patienten infolge des Herz-Kreislaufstillstandes, bevor ein hypoxischer Hirnschaden eine Bedeutung in der weiteren Diagnostik bekommen kann.

#### 4.2 Vergleich mit bildgebender Diagnostik

Das cerebrale Computertomogramm stellt derzeit den Gold-Standard der bildgebenden Diagnose eines hypoxischen Hirnschadens dar. Es ist jedoch auch nach Ablauf einiger Tage nur bei schwersten hypoxischen Hirnschädigungen ein pathologische cCT Morphologie zu erwarten. Hierbei handelt es sich in der Regel um Patienten, die über eine lange Zeit hypoxisch waren. Die wesentlich größere Zahl an Patienten zeigt jedoch auch nach Ablauf 2-3 Tagen keine oder nur unsicher zu erfassende Veränderungen im cCT. Daher bleibt die Diagnose des hypoxischen Hirnschadens mit der cCT schwierig.

Die Messung des GFAP könnte hier zusätzliche klinische Ergebnisse liefern, die im Zusammenspiel aller zur Verfügung stehenden Diagnostika den Ausschluss eines hypoxischen Hirnschadens sicherer machen könnte.

Im Ansatz dieser Arbeit war es geplant, von jedem Patienten ein MRT anfertigen zu lassen, was die Diagnose des hypoxischen Hirnschadens hätte verbessern können. Dieses Vorhaben scheiterte jedoch daran, dass der Aufwand des Transportes und der Vorbereitung für die Untersuchung (Austausch der Zugänge in MRT-taugliches Material etc.) zu hoch war und daher von den betreuenden Ärzten nicht akzeptiert wurde.

#### 4.3 Methoden

Der Nachweis zerebraler Strukturproteine im Blut setzt eine Freisetzung aus dem Gehirn voraus. Ein möglicher Freisetzungsweg kann eine Störung der Blut – Hirn – Schranke sein, wie sie bei einem hypoxischen Hirnschaden vorkommen kann<sup>(10)</sup>. Studien dazu existieren bisher nicht.

Für die Passage auch durch eine geschädigte Blut-Hirn-Schranke sind Molekülgröße und Ladung der Proteine zu betrachten. Das mit 22 KD wesentlich kleinere S-100 passiert leichter als das 40-53 KD große GFAP.

Es gibt in der Literatur eine Vielzahl von Arbeiten vor allem in der Kardiologie und der Kardiochirurgie, die sich mit der Messung von S-100B im Blut von Patienten im Rahmen von kardiochirurgischen Operationen und auch bei Patienten mit

hypoxämischen Hirnläsionen beschäftigen. In all diesen Arbeiten wurde zwar immer wieder ein Zusammenhang zwischen S-100B - Werten und z.B. psychopathologischen Veränderungen postuliert, sie haben jedoch bisher keinen Eingang in die medizinische Diagnostik gefunden.

In den in dieser Untersuchung erhobenen Daten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den S-100 Konzentrationen im Blut der Patienten mit und ohne hypoxischer Hirnschädigung gefunden werden. Dennoch ist ein Trend erkennbar, wonach die S-100B Konzentrationen bei den Patienten mit hypoxischem Hirnschaden höher sind.

Die Erklärung für diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse unserer Arbeit und den Messergebnissen aus den kardiochirurgischen Arbeitsgruppen könnte in der Heterogenität des S-100B liegen. Mit den zu Verfügung stehenden Assays ist eine Differenzierung zwischen S-100 $\alpha\beta$  und S-100 $\beta\beta$  nicht möglich, denn die monoklonalen Antikörper sind lediglich spezifisch für die  $\beta$ -Kette des S-100, somit müssen die Antikörper sowohl die Dimere S-100 $\alpha\beta$  als auch S-100 $\beta\beta$  erfassen. Wie bereits Missler et al. (2000) nachwies erfasst sowohl die hier verwendete Nachweismethode als auch der bereits erwähnte LIA100<sup>®</sup> S-100 $\alpha\beta$  sogar in weitaus stärkerem Ausmaß als S-100 $\beta\beta$ . Es ist überdies bekannt, das S-100 $\alpha\beta$  in nahezu allen Bestandteilen des Körpers insbesondere in Herz und Muskulatur vorkommt. Daher kann schon eine geringe Verletzung dieser Organsysteme zu einer drastischen Konzentrationserhöhung des mit diesen Methoden gemessenen S-100 führen. Diese Tatsache dürfte es auch am ehesten sein, die in der Literatur so vielfach beschriebenen S-100 Konzentrationsanstiegen im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe führten. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass dieser Arbeiten keinen klinisch verwertbaren S-100 Konzentrationsanstieg demonstrieren konnten. Zwar lassen sich immer wieder z.T. auch statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen S-100B und neurologischen Störungen darstellen. Hierbei darf aber nicht vergessen werden, dass unabhängig von einer S-100 Freisetzung aus dem Gehirn ein S-100 Konzentrationsanstieg Ausdruck der Schädigung des Gesamtorganismus ist. Der Konzentrationsanstieg ist jedoch unabhängig von der Freisetzung eines hirnspezifischen Strukturproteins. Die heute zur Verfügung stehenden Nachweisverfahren sind nicht dazu in der Lage das Hirnspezifische S-100 $\beta\beta$  spezifisch nachzuweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen denn auch, dass ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen S-100B im Blut und einem Hirnschaden nach Reanimation nicht gefunden werden konnte. Es zeigt sich ein statistisch nicht signifikanter Trend, der durch den o.g. Effekt zu erklären ist: eine längerfristig kritische Unterversorgung des Organismus mit Sauerstoff führt zu einer ansteigenden Wahrscheinlichkeit einer Hirnschädigung zum andern aber unabhängig von dieser zu einem Anstieg der Freisetzung von S-100B aus Organen außerhalb des ZNS.

Aus diesem Grunde suchte unsere Arbeitsgruppe nach einem Protein, welches tatsächlich nur im zentralen Nervensystem vorkommt. In der Literatur gibt es eine Reihe von Berichten über das GFAP im Liquor als Marker für Gehirndestruktionen. Da jedoch kritisch kranken Patienten und insbesondere solchen nach einer kardiopulmonalen Reanimation kein Liquor entnommen werden kann (Z.n. Lyse, kritischer Kreislaufsituation, etc.) musste die Messung des GFAP aus einem ohne Gefährdung des Patienten entnehmbaren Körpermedium bestimmbar sein. Im Jahre 2000 gelang es unserer Arbeitsgruppe erstmals den Nachweis von GFAP aus dem Serum zu publizieren.

Die gemessene GFAP – Konzentration bewegt sich bei den hypoxischen Patienten teilweise sehr nah an der unteren Nachweisgrenze der Methode. Dennoch zeigen alle Patienten mit klinisch neurologischem Defizit nach Reanimation einen wenn auch geringen so doch messbaren GFAP-Anstieg im Blut, während keiner der neurologisch unauffälligen Patienten GFAP im Messbereich der Methode zeigte. Daher stellt GFAP aus dem Blut gemessen den geeigneten Parameter für den Nachweis von Hirnschädigungen dar.

Bei den Messergebnissen der Patienten mit hypoxischem Hirnschaden fällt Patient Nr. 10 besonders auf, da er erst zu einem späteren Zeitpunkt einen GFAP – Anstieg zeigt und in der GFAP – Konzentration höhere Werte erreicht als alle anderen Patienten. Im Vergleich zu seinem Kollektiv konnte ich aber keine Besonderheiten finden. Der Patient ist nach Kammerflimmern über 45 Minuten reanimiert worden. Als Grund für das Kammerflimmern gaben die Kardiologen eine schwere 3-Gefäßerkrankung mit sehr schlechter LV-Funktion an. Nach Ablauf

des Beobachtungszeitraums von 7 Tagen erreichte der Patient einen CPC-Score von 4. Dieser GFAP - Konzentrationsverlauf ist von uns nicht zu erklären.

Die Aussage bezüglich der GFAP Messergebnisse dieser Studie ist eindeutig: Bei allen Patienten mit einem hypoxischen Hirnschaden konnte GFAP gemessen werden wohingegen es bei keinem Patienten gelang, der im cCT keinen hypoxischen Hirnschaden hatte.

Aufgrund der relativ kleinen Stichprobenzahl und der vielfach an der unteren Nachweisgrenze der Methode befindlichen Messergebnisse für GFAP könnte es sich theoretisch bei diesem Ergebnis noch um einen Zufall handeln. Daher ist es anzustreben, eine gleiche Studie mit deutlich größerer Stichprobenzahl durchzuführen aus deren Ergebnisse dann eine deutliche Empfehlung abgeleitet werden könnte. Wie die hier vorgelegte Studie zeigt erfordert ein solches Vorhaben einen erheblichen logistischen Aufwand.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Hypoxische Hirnschäden sind bei Patienten nach Reanimation eine schwerwiegende, weil nach später Diagnosestellung wenig beeinflussbare Komplikation im Krankheitsverlauf, die den Erfolg einer Reanimation wesentlich entscheiden.

Die bisher als „Goldstandard“ zur Verfügung stehende Untersuchung mittels cCT ermöglicht erst nach frühestens drei Tagen eine mögliche Diagnose. Vielen Patienten ist jedoch aufgrund ihres kritischen Gesundheitszustandes die Untersuchung nicht zuzumuten. Dadurch verzögert sich die Diagnostik. Die Blutabnahme ist dagegen praktisch immer möglich.

Diese Untersuchung liefert Anhaltspunkte dafür, dass die Messung des GFAP im Blut die Diagnosesicherheit des hypoxischen Hirnschadens verbessern kann.

Die Ergebnisse der 30 Probanden zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten mit hypoxischem Hirnschaden (n=10) und Patienten ohne hypoxischen Hirnschaden (n=20) für die S-100B Konzentration. Hingegen gelang bei allen Patienten mit einem hypoxischen Hirnschaden ein GFAP Nachweis und bei keinem Patienten ohne eine Hypoxie.

Einen Ersatz des cCT ist aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchung noch nicht möglich, da sowohl die Kontrollgruppe, als auch die Gruppe der Patienten mit hypoxischem Hirnschaden für umfangreichere statistische Auswertungen zu klein sind.

Auch eine Aussage über die Serumspiegelhöhe und eine mögliche Korrelation zum cerebralen Schaden ist anhand der kleinen Patientenzahl nicht möglich.

Eine Konsequenz aus einer ausschließlich durch den Nachweis von cerebralen Strukturproteinen geführten Diagnose eines hypoxischen Hirnschadens ist somit derzeit noch nicht zu ziehen, jedoch ist die Bestimmung als Ergänzung zum cCT besonders im Bereich der ersten drei Tage, in denen die Bildgebung ohne Aussage bleibt, eine wertvolle Zusatzinformation.

---

## 6. Literatur

1. Albrechtsen, M. and Bock, E. Quantification of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) in Human Body Fluids by Means of ELISA Employing a Monoclonal Antibody. *J.Neuroimmunol.* 1985;8(4-6):301-9.
2. Albrechtsen, M., Massaro, A., and Bock, E. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Human Glial Fibrillary Acidic Protein Using a Mouse Monoclonal Antibody. *J.Neurochem.* 1985;44(2):560-6.
3. Ames, A., III and Nesbett, F. B. Pathophysiology of Ischemic Cell Death: I. Time of Onset of Irreversible Damage; Importance of the Different Components of the Ischemic Insult. *Stroke* 1983;14(2):219-26.
4. Andreasson, A. C., Herlitz, J., Bang, A., Ekstrom, L., Lindqvist, J., Lundstrom, G., and Holmberg, S. Characteristics and Outcome Among Patients With a Suspected in-Hospital Cardiac Arrest. Resuscitation 1998;39(1-2):23-31.
5. Arntz, H. R., Willich, S. N., Stern, R., Linderer, T., Bruggemann, T., Kelinski, K., and Schroder, R. Circadian Variation of Cardiopulmonary Disease Onset in the General Population: an Emergency Care System Perspective From Berlin. *Ann.Emerg.Med.* 1994;23(2):281-5.
6. Aurell, A., Rosengren, L. E., Karlsson, B., Olsson, J. E., Zbornikova, V., and Haglid, K. G. Determination of S-100 and Glial Fibrillary Acidic Protein Concentrations in Cerebrospinal Fluid After Brain Infarction. *Stroke* 1991;22(10):1254-8.
7. Aurell, A., Rosengren, L. E., Wikkelso, C., Nordberg, G., and Haglid, K. G. The S-100 Protein in Cerebrospinal Fluid: a Simple ELISA Method. *J.Neurol.Sci.* 1989;89(2-3):157-64.
8. Baudier, J., Mandel, P., and Gerard, D. Bovine Brain S100 Proteins: Separation and Characterization of a New S100 Protein Species. *J.Neurochem.* 1983;40(1):145-52.
9. Beaudoux, J. L., Leger, P., Dequen, L., Gandjbakhch, I., Coriat, P., and Foglietti, M. J. Influence of Hemolysis on the Measurement of S-100beta Protein and Neuron-Specific Enolase Plasma Concentrations During Coronary Artery Bypass Grafting. *Clin.Chem.* 2000;46(7):989-90.
10. Bertsch, T., Casarin, W., Kretschmar, M., Zimmer, W., Walter, S., Sommer, C., Muehlhauser, F., Ragoschke, A., Kuehl, S., Schmidt, R., Eden, B. P., Nassabi, C., Nichterlein, T., and Fassbender, K. Protein S-100B: a Serum Marker for Ischemic and Infectious Injury of Cerebral Tissue. *Clin.Chem.Lab Med.* 2001;39(4):319-23.

11. Bianchi, R., Giambanco, I., and Donato, R. S-100 Protein, but Not Calmodulin, Binds to the Glial Fibrillary Acidic Protein and Inhibits Its Polymerization in a Ca(2+)-Dependent Manner. *J.Biol.Chem.* 15-6-1993;268(17):12669-74.
12. Blennow, M., Hagberg, H., and Rosengren, L. Glial Fibrillary Acidic Protein in the Cerebrospinal Fluid: a Possible Indicator of Prognosis in Full-Term Asphyxiated Newborn Infants? *Pediatr.Res.* 1995;37(3):260-4.
13. Blennow, M., Rosengren, L., Jonsson, S., Forssberg, H., Katz-Salamon, M., Hagberg, H., Hesser, U., and Lagercrantz, H. Glial Fibrillary Acidic Protein Is Increased in the Cerebrospinal Fluid of Preterm Infants With Abnormal Neurological Findings. *Acta Paediatr.* 1996;85(4):485-9.
14. Blomquist, S., Johnsson, P., Luhrs, C., Malmkvist, G., Solem, J. O., Alling, C., and Stahl, E. The Appearance of S-100 Protein in Serum During and Immediately After Cardiopulmonary Bypass Surgery: a Possible Marker for Cerebral Injury. *J.CardiThorac.Vasc.Anesth.* 1997;11(6):699-703.
15. Buttner, T., Weyers, S., Postert, T., Sprengelmeyer, R., and Kuhn, W. S-100 Protein: Serum Marker of Focal Brain Damage After Ischemic Territorial MCA Infarction. *Stroke* 1997;28(10):1961-5.
16. Chiu, F. C., Korey, B., and Norton, W. T. Intermediate Filaments From Bovine, Rat, and Human CNS: Mapping Analysis of the Major Proteins. *J.Neurochem.* 1980;34(5):1149-59.
17. Cobbe, S. M., Dalziel, K., Ford, I., and Marsden, A. K. Survival of 1476 Patients Initially Resuscitated From Out of Hospital Cardiac Arrest. *BMJ* 29-6-1996;312(7047):1633-7.
18. Conley, F. K. The Immunocytochemical Localization of GFA Protein in Experimental Murine CNS Tumors. *Acta Neuropathol.(Berl)* 12-1-1979;45(1):9-16.
19. DeArmond, S. J., Fajardo, M., Naughton, S. A., and Eng, L. F. Degradation of Glial Fibrillary Acidic Protein by a Calcium Dependent Proteinase: an Electroblood Study. *Brain Res.* 7-3-1983;262(2):275-82.
20. Deloulme, J. C., Mbele, G. O., and Baudier, J. S100 Proteins. From Purification to Functions. *Methods Mol.Biol.* 2002;172:185-98.
21. Delpech, B., Delpech, A., Vidard, M. N., Girard, N., Tayot, J., Clement, J. C., and Creissard, P. Glial Fibrillary Acidic Protein in Tumours of the Nervous System. *Br.J.Cancer* 1978;37(1):33-40.
22. Donato, R. Perspectives in S-100 Protein Biology. Review Article. *Cell Calcium* 1991;12(10):713-26.

23. Dotevall, L., Rosengren, L. E., and Hagberg, L. Increased Cerebrospinal Fluid Levels of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) in Lyme Neuroborreliosis. *Infection* 1996;24(2):125-9.
24. Drohat, A. C., Amburgey, J. C., Abildgaard, F., Starich, M. R., Baldisseri, D., and Weber, D. J. Solution Structure of Rat Apo-S100B(Beta Beta) As Determined by NMR Spectroscopy. *Biochemistry* 10-9-1996;35(36):11577-88.
25. Drohat, A. C., Baldisseri, D. M., Rustandi, R. R., and Weber, D. J. Solution Structure of Calcium-Bound Rat S100B(Betabeta) As Determined by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biochemistry* 3-3-1998;37(9):2729-40.
26. Duncan, A. M., Higgins, J., Dunn, R. J., Allore, R., and Marks, A. Refined Sublocalization of the Human Gene Encoding the Beta Subunit of the S100 Protein (S100B) and Confirmation of a Subtle T(9;21) Translocation Using in Situ Hybridization. *Cytogenet.Cell Genet.* 1989;50(4):234-5.
27. Ehlers, S., Kyllerman, M., and Rosengren, L. Analysis of Glial Fibrillary Acidic Protein in the Cerebrospinal Fluid of Children Investigated for Encephalopathy. *Neuropediatrics* 1994;25(3):129-33.
28. Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., and Lee, Y. L. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969-2000). *Neurochem.Res.* 2000;25(9-10):1439-51.
29. Eng, L. F., Lee, Y. L., Murphy, G. M., and Yu, A. C. A RT-PCR Study of Gene Expression in a Mechanical Injury Model. *Prog.Brain Res.* 1995;105:219-29.:219-29.
30. Eng, L. F. and Rubinstein, L. J. Contribution of Immunohistochemistry to Diagnostic Problems of Human Cerebral Tumors. *J.Histochem.Cytochem.* 1978;26(7):513-22.
31. Eng, L. F., Vanderhaeghen, J. J., Bignami, A., and Gerstl, B. An Acidic Protein Isolated From Fibrous Astrocytes. *Brain Res.* 7-5-1971;28(2):351-4.
32. Fagnart, O. C., Sindic, C. J., and Laterre, C. Particle Counting Immunoassay of S100 Protein in Serum. Possible Relevance in Tumors and Ischemic Disorders of the Central Nervous System. *Clin.Chem.* 1988;34(7):1387-91.
33. Fano, G., Biocca, S., Fulle, S., Mariggio, M. A., Belia, S., and Calissano, P. The S-100: a Protein Family in Search of a Function. *Prog.Neurobiol.* 1995;46(1):71-82.

- 
34. Fano, G., Fulle, S., Della Torre G., Giambanco, I., Aisa, M. C., Donato, R., and Calissano, P. S-100b Protein Regulates the Activity of Skeletal Muscle Adenylate Cyclase in Vitro. *FEBS Lett.* 21-11-1988;240(1-2):177-80.
  35. Fassbender, K., Schmidt, R., Schreiner, A., Fatar, M., Muhlhauser, F., Daffertshofer, M., and Hennerici, M. Leakage of Brain-Originated Proteins in Peripheral Blood: Temporal Profile and Diagnostic Value in Early Ischemic Stroke. *J.Neurol.Sci.* 1-5-1997;148(1):101-5.
  36. Fischer, M., Fischer, N. J., and Schuttler, J. One-Year Survival After Out-of-Hospital Cardiac Arrest in Bonn City: Outcome Report According to the 'Utstein Style'. *Resuscitation* 1997;33(3):233-43.
  37. Hardemark, H. G., Almqvist, O., Johansson, T., Pahlman, S., and Persson, L. S-100 Protein in Cerebrospinal Fluid After Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage: Relation to Functional Outcome, Late CT and SPECT Changes, and Signs of Higher Cortical Dysfunction. *Acta Neurochir.(Wien.)* 1989;99(3-4):135-44.
  38. Hardemark, H. G., Ericsson, N., Kotwica, Z., Rundstrom, G., Mendel-Hartvig, I., Olsson, Y., Pahlman, S., and Persson, L. S-100 Protein and Neuron-Specific Enolase in CSF After Experimental Traumatic or Focal Ischemic Brain Damage. *J.Neurosurg.* 1989;71(5 Pt 1):727-31.
  39. Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T. D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H. S., Toyoda, A., Ishii, K., Totoki, Y., Choi, D. K., Soeda, E., Ohki, M., Takagi, T., Sakaki, Y., Taudien, S., Blechschmidt, K., Polley, A., Menzel, U., Delabar, J., Kumpf, K., Lehmann, R., Patterson, D., Reichwald, K., Rump, A., Schillhabel, M., Schudy, A., Zimmermann, W., Rosenthal, A., Kudoh, J., Schibuya, K., Kawasaki, K., Asakawa, S., Shintani, A., Sasaki, T., Nagamine, K., Mitsuyama, S., Antonarakis, S. E., Minoshima, S., Shimizu, N., Nordsiek, G., Hornischer, K., Brant, P., Scharfe, M., Schon, O., Desario, A., Reichelt, J., Kauer, G., Blocker, H., Ramser, J., Beck, A., Klages, S., Hennig, S., Riesselmann, L., Dagand, E., Haaf, T., Wehrmeyer, S., Borzym, K., Gardiner, K., Nizetic, D., Francis, F., Lehrach, H., Reinhardt, R., and Yaspo, M. L. The DNA Sequence of Human Chromosome 21. *Nature* 18-5-2000;405(6784):311-9.
  40. Heizmann, C. W. and Hunziker, W. Intracellular Calcium-Binding Proteins: More Sites Than Insights. *Trends Biochem.Sci.* 1991;16(3):98-103.
  41. Herlitz, J., Bang, A., Aune, S., Ekstrom, L., Lundstrom, G., and Holmberg, S. Characteristics and Outcome Among Patients Suffering in-Hospital Cardiac Arrest in Monitored and Non-Monitored Areas. *Resuscitation* 2001;48(2):125-35.
-

42. Herlitz, J., Ekstrom, L., Wennerblom, B., Axelsson, A., Bang, A., and Holmberg, S. Prognosis Among Survivors of Prehospital Cardiac Arrest. *Ann. Emerg. Med.* 1995;25(1):58-63.
43. Hershey, C. O. and Fisher, L. Why Outcome of Cardiopulmonary Resuscitation in General Wards Is Poor. *Lancet* 2-1-1982;1(8262):31-4.
44. Hossmann, K. A. and Kleihues, P. Reversibility of Ischemic Brain Damage. *Arch. Neurol.* 1973;29(6):375-84.
45. Ingebrigtsen, T. and Romner, B. Serial S-100 Protein Serum Measurements Related to Early Magnetic Resonance Imaging After Minor Head Injury. Case Report. *J. Neurosurg.* 1996;85(5):945-8.
46. Ingebrigtsen, T., Romner, B., Kongstad, P., and Langbakk, B. Increased Serum Concentrations of Protein S-100 After Minor Head Injury: a Biochemical Serum Marker With Prognostic Value? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1995;59(1):103-4.
47. Johnsson, P., Lundqvist, C., Lindgren, A., Ferencz, I., Alling, C., and Stahl, E. Cerebral Complications After Cardiac Surgery Assessed by S-100 and NSE Levels in Blood. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 1995;9(6):694-9.
48. Kato, K. and Kimura, S. S100 $\alpha$  (Alpha Alpha) Protein Is Mainly Located in the Heart and Striated Muscles. *Biochim. Biophys. Acta* 17-10-1985;842(2-3):146-50.
49. Kato, K., Kimura, S., Semba, R., Suzuki, F., and Nakajima, T. Increase in S-100 Protein Levels in Blood Plasma by Epinephrine. *J. Biochem. (Tokyo)* 1983;94(3):1009-11.
50. Kato, K., Nakayima T, Ishiguro Y, and Matsutani T. Sensitive Enzyme Immunoassay for S-100 Protein: Determination in Human Cerebrospinal Fluid. *Biomed. Res* 1982;3:24-8.
51. Kato, K., Suzuki, F., Kurobe, N., Okajima, K., Ogasawara, N., Nagaya, M., and Yamanaka, T. Enhancement of S-100 Beta Protein in Blood of Patients With Down's Syndrome. *J. Mol. Neurosci.* 1990;2(2):109-13.
52. Kilby, P. M., Van Eldik, L. J., and Roberts, G. C. The Solution Structure of the Bovine S100B Protein Dimer in the Calcium-Free State. *Structure.* 15-9-1996;4(9):1041-52.
53. Kinkel, W. R., Jacobs, L., and Kinkel, P. R. Gray Matter Enhancement: a Computerized Tomographic Sign of Cerebral Hypoxia. *Neurology* 1980;30(8):810-9.

54. Kjos, B. O., Brant-Zawadzki, M., and Young, R. G. Early CT Findings of Global Central Nervous System Hypoperfusion. *AJR Am.J.Roentgenol.* 1983;141(6):1227-32.
55. Kligman, D. and Marshak, D. R. Purification and Characterization of a Neurite Extension Factor From Bovine Brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1985;82(20):7136-9.
56. Kuisma, M. and Maatta, T. Out-of-Hospital Cardiac Arrests in Helsinki: Utstein Style Reporting. *Heart* 1996;76(1):18-23.
57. Kuzumi, E., Vuylsteke, A., Guo, X., and Menon, D. K. Serum S100 Protein As a Marker of Cerebral Damage During Cardiac Surgery. *Br.J.Anaesth.* 2000;85(6):936-7.
58. Marks, A., Petsche, D., O'Hanlon, D., Kwong, P. C., Stead, R., Dunn, R., Baumal, R., and Liao, S. K. S100 Protein Expression in Human Melanoma Cells: Comparison of Levels of Expression Among Different Cell Lines and Individual Cells in Different Phases of the Cell Cycle. *Exp.Cell Res.* 1990;187(1):59-64.
59. McCord, J. M. Oxygen-Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury. *N.Engl.J Med.* 17-1-1985;312(3):159-63.
60. Michetti, F., Massaro, A., Russo, G., and Rigon, G. The S-100 Antigen in Cerebrospinal Fluid As a Possible Index of Cell Injury in the Nervous System. *J.Neurol.Sci.* 1980;44(2-3):259-63.
61. Missler, U. and Wiesmann, M. Measurement of S-100 Protein in Human Blood and Cerebrospinal Fluid: Analytical Method and Preliminary Clinical Results. *Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 1995;33(10):743-8.
62. Missler, U., Wiesmann, M., Ehlermann, P., Tronnier, M., Notzold, A., Steinmeier, E., and Wood, W. G. Validation and Comparison of Two Solid-Phase Immunoassays for the Quantification of S-100B in Human Blood. *Clin.Chem.* 2000;46(7):993-6.
63. Missler, U., Wiesmann, M., Friedrich, C., and Kaps, M. S-100 Protein and Neuron-Specific Enolase Concentrations in Blood As Indicators of Infarction Volume and Prognosis in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 1997;28(10):1956-60.
64. Mokuno, K., Kiyosawa, K., Sugimura, K., Yasuda, T., Riku, S., Murayama, T., Yanagi, T., Takahashi, A., and Kato, K. Prognostic Value of Cerebrospinal Fluid Neuron-Specific Enolase and S-100b Protein in Guillain-Barre Syndrome. *Acta Neurol.Scand.* 1994;89(1):27-30.
65. Moore, B. W. A Soluble Protein Characteristic of the Nervous System. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 9-6-1965;19(6):739-44.

- 
66. Mori, T., Morimoto, K., Ushio, Y., Hayakawa, T., and Mogami, H. Radioimmunoassay of Astroprotein (an Astrocyte-Specific Cerebroprotein) in Cerebrospinal Fluid From Patients With Glioma. A Preliminary Study. *Neurol.Med.Chir (Tokyo)* 1975;15 pt 1:23-5.:23-5.
  67. Nagamatsu, M., Mokuno, K., Sugimura, K., Kiyosawa, K., Aoki, S., Takahashi, A., and Kato, K. Cerebrospinal Fluid Levels of S-100b Protein and Neuron-Specific Enolase in Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy. *Acta Neurol.Scand.* 1995;91(6):483-7.
  68. Nagasaka, A., Umekawa, H., Hidaka, H., Iwase, K., Nakai, A., Ariyoshi, Y., Ohyama, T., Aono, T., Nakagawa, H., Ohtani, S., and . Increase in S-100b Protein Content in Thyroid Carcinoma. *Metabolism* 1987;36(4):388-91.
  69. Negovsky, V. A. The Second Step in Resuscitation--the Treatment of the 'Post-Resuscitation Disease'. *Resuscitation* 1972;1(1):1-7.
  70. Noppe, M., Crols, R., Andries, D., and Lowenthal, A. Determination in Human Cerebrospinal Fluid of Glial Fibrillary Acidic Protein, S-100 and Myelin Basic Protein As Indices of Non-Specific or Specific Central Nervous Tissue Pathology. *Clin.Chim.Acta* 16-3-1986;155(2):143-50.
  71. Noppe, M., Lowenthal, A., Karcher, D., and Gheuens, J. A Two-Site Immunoradiometric Assay for the Determination of Alpha-Albumin. *J.Immunol.Methods* 10-5-1979;27(1):75-81.
  72. Otto, M., Stein, H., Szudra, A., Zerr, I., Bodemer, M., Gefeller, O., Poser, S., Kretschmar, H. A., Mader, M., and Weber, T. S-100 Protein Concentration in the Cerebrospinal Fluid of Patients With Creutzfeldt-Jakob Disease. *J.Neurol.* 1997;244(9):566-70.
  73. Peberdy, M. A., Kaye, W., Ornato, J. P., Larkin, G. L., Nadkarni, V., Mancini, M. E., Berg, R. A., Nichol, G., and Lane-Trullt, T. Cardiopulmonary Resuscitation of Adults in the Hospital: a Report of 14720 Cardiac Arrests From the National Registry of Cardiopulmonary Resuscitation. *Resuscitation* 2003;58(3):297-308.
  74. Persson, L., Hardemark, H. G., Gustafsson, J., Rundstrom, G., Mendel-Hartvig, I., Esscher, T., and Pahlman, S. S-100 Protein and Neuron-Specific Enolase in Cerebrospinal Fluid and Serum: Markers of Cell Damage in Human Central Nervous System. *Stroke* 1987;18(5):911-8.
  75. Potts, B. C., Smith, J., Akke, M., Macke, T. J., Okazaki, K., Hidaka, H., Case, D. A., and Chazin, W. J. The Structure of Calyculin Reveals a
-

- Novel Homodimeric Fold for S100 Ca(2+)-Binding Proteins. *Nat.Struct.Biol.* 1995;2(9):790-6.
76. Rogove, H. J., Safar, P., Sutton-Tyrrell, K., and Abramson, N. S. Old Age Does Not Negate Good Cerebral Outcome After Cardiopulmonary Resuscitation: Analyses From the Brain Resuscitation Clinical Trials. The Brain Resuscitation Clinical Trial I and II Study Groups. *Crit Care Med.* 1995;23(1):18-25.
  77. Rosengren, L. E., Ahlsen, G., Belfrage, M., Gillberg, C., Haglid, K. G., and Hamberger, A. A Sensitive ELISA for Glial Fibrillary Acidic Protein: Application in CSF of Children. *J.Neurosci.Methods* 1992;44(2-3):113-9.
  78. Rosengren, L. E., Aurell, A., Kjellstrand, P., and Haglid, K. G. Astrogliosis in the Cerebral Cortex of Gerbils After Long-Term Exposure to 1,1,1-Trichloroethane. *Scand.J.Work Environ.Health* 1985;11(6):447-55.
  79. Rosengren, L. E., Lycke, J., and Andersen, O. Glial Fibrillary Acidic Protein in CSF of Multiple Sclerosis Patients: Relation to Neurological Deficit. *J.Neurol.Sci.* 1995;133(1-2):61-5.
  80. Ross, R. T. Brain Swelling and Ventricle Size. *Can.J.Neurol.Sci.* 1983;10(2):110-3.
  81. Rueger, D. C., Dahl, D., and Bignami, A. Comparison of Bovine Glial Fibrillary Acidic Protein With Bovine Brain Tubulin. *Brain Res.* 15-9-1978;153(1):188-93.
  82. Rueger, D. C., Dahl, D., and Bignami, A. Purification of a Brain-Specific Astroglial Protein by Immunoaffinity Chromatography. *Anal.Biochem.* 1978;89(2):360-71.
  83. Safar, P. Cerebral Resuscitation After Cardiac Arrest: a Review. *Circulation* 1986;74(6 Pt 2):IV138-IV153.
  84. Safar, P.; Bircher N. Cardiopulmonary cerebral resuscitation. An introduction to resuscitation medicine. World Federation of Societies of Anesthesiologists. 3. Stavanger ed. Norway: Laerdal Publishing; 1987.
  85. Sastry, M., Ketchem, R. R., Crescenzi, O., Weber, C., Lubienski, M. J., Hidaka, H., and Chazin, W. J. The Three-Dimensional Structure of Ca(2+)-Bound Calyculin: Implications for Ca(2+)-Signal Transduction by S100 Proteins. *Structure.* 15-2-1998;6(2):223-31.
  86. Selinfreund, R. H., Barger, S. W., Pledger, W. J., and Van Eldik, L. J. Neurotrophic Protein S100 Beta Stimulates Glial Cell Proliferation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1-5-1991;88(9):3554-8.

- 
87. Sellman, M., Ivert, T., Ronquist, G., Caesarini, K., Persson, L., and Semb, B. K. Central Nervous System Damage During Cardiac Surgery Assessed by 3 Different Biochemical Markers in Cerebrospinal Fluid. *Scand.J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 1992;26(1):39-45.
  88. Sindic, C. J., Chalon, M. P., Cambiaso, C. L., Laterre, E. C., and Masson, P. L. Assessment of Damage to the Central Nervous System by Determination of S-100 Protein in the Cerebrospinal Fluid. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 1982;45(12):1130-5.
  89. So, H. Y., Buckley, T. A., and Oh, T. E. Factors Affecting Outcome Following Cardiopulmonary Resuscitation. *Anaesth.Intensive Care* 1994;22(6):647-58.
  90. Stept, W. J. and Safar, P. Cardiac Resuscitation Following Two Hours of Cardiac Massage and 42 Countershocks. *Anesthesiology* 1966;27(1):97-100.
  91. Taggart, D. P., Bhattacharya, K., Meston, N., Standing, S. J., Kay, J. D., Pillai, R., Johnsson, P., and Westaby, S. Serum S-100 Protein Concentration After Cardiac Surgery: a Randomized Trial of Arterial Line Filtration. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 1997;11(4):645-9.
  92. Takahashi, S., Higano, S., Ishii, K., Matsumoto, K., Sakamoto, K., Iwasaki, Y., and Suzuki, M. Hypoxic Brain Damage: Cortical Laminar Necrosis and Delayed Changes in White Matter at Sequential MR Imaging. *Radiology* 1993;189(2):449-56.
  93. Usui, A., Kato, K., Murase, M., Hotta, T., Tanaka, M., Takeuchi, E., and Abe, T. Neural Tissue-Related Proteins (NSE, G0 Alpha, 28-KDa Calbindin-D, S100b and CK-BB) in Serum and Cerebrospinal Fluid After Cardiac Arrest. *J.Neurol.Sci.* 1994;123(1-2):134-9.
  94. Wada, H., Shirakawa, S., Yamakado, T., Ohkubo, S., Tanaka, T., Yamamoto, T., and Hidaka, H. S-100 Antigen and Calmodulin in Human Leukemic Cells. *Leuk.Res.* 1989;13(1):65-9.
  95. Waterloo, K., Ingebrigtsen, T., and Romner, B. Neuropsychological Function in Patients With Increased Serum Levels of Protein S-100 After Minor Head Injury. *Acta Neurochir.(Wien.)* 1997;139(1):26-31.
  96. Westaby, S., Johnsson, P., Parry, A. J., Blomqvist, S., Solem, J. O., Alling, C., Pillai, R., Taggart, D. P., Grebenik, C., and Stahl, E. Serum S100 Protein: a Potential Marker for Cerebral Events During Cardiopulmonary Bypass. *Ann.Thorac.Surg.* 1996;61(1):88-92.
  97. Wiesmann, M., Missler, U., Gottmann, D., and Gehring, S. Plasma S-100b Protein Concentration in Healthy Adults Is Age- and Sex-Independent. *Clin.Chem.* 1998;44(5):1056-8.
-

98. Wiesmann, M., Missler, U., Hagenstrom, H., and Gottmann, D. S-100 Protein Plasma Levels After Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage. *Acta Neurochir.(Wien.)* 1997;139(12):1155-60.
99. Woertgen, C., Dirk, R., Rother, R., Sauer, K., and Brawanski, A. Does Bungee Jumping Release S-100B Protein? *J.Clin.Neurosci.* 2002;9(1):51-2.
100. Woertgen, C., Rother, R. D., Holzschuh, M., Metz, C., and Brawanski, A. Comparison of Serial S-100 and NSE Serum Measurements After Severe Head Injury. *Acta Neurochir.(Wien.)* 1997;139(12):1161-4.
101. Yamashita, S., Morinaga, T., Ohgo, S., Sakamoto, T., Kaku, N., Sugimoto, S., and Matsukura, S. Prognostic Value of Electroencephalogram (EEG) in Anoxic Encephalopathy After Cardiopulmonary Resuscitation: Relationship Among Anoxic Period, EEG Grading and Outcome. *Intern.Med.* 1995;34(2):71-6.
102. Zimmer, D. B., Chessher, J., Wilson, G. L., and Zimmer, W. E. S100A1 and S100B Expression and Target Proteins in Type I Diabetes. *Endocrinology* 1997;138(12):5176-83.
103. Zimmer, D. B., Cornwall, E. H., Landar, A., and Song, W. The S100 Protein Family: History, Function, and Expression. *Brain Res.Bull.* 1995;37(4):417-29.

## 7. Danksagungen

Herrn PD Dr. med. Ulrich Missler danke ich für die wissenschaftliche Ausbildung und die einsatzfreudige Unterstützung , die diese Arbeit möglich machte. Der von ihm erbrachte Arbeits- und Zeiteinsatz in Anleitung und Organisation war für mich immer Ansporn in der Bewältigung der Thematik.

Außerdem möchte ich meiner Frau Meike und meinen Eltern für ausgiebige Diskussionen, viel Geduld und Hilfestellungen danken die Sie mir zuteil werden ließen.

## 8. Lebenslauf

31. 05. 1978	Geburt in Berlin
Eltern:	Adelheid Holbe (Konrektorin der Grundschule Bad Gandersheim) Dr. med. Rolf Holbe (Facharzt für Allgemeinmedizin)
Geschwister:	Clemens Holbe (Betriebswirt (BA) / Informationsmanagement) Tilman Holbe (Auszubildender zum Rettungsassistenten)
1984-1988	Besuch der Grundschule Bad Gandersheim
1988-1990	Orientierungsstufe Bad Gandersheim
1990-1997	Roswitha-Gymnasium Bad Gandersheim In der Freizeit: Vorsitz im Stadtjugendring, Leiter einer Jugendgruppe der ev. Kirche ab 1996: Gewähltes Mitglied des Rates der Stadt Bad Gandersheim
1997	Abitur
1997/1998	Zivildienst als Pfleger im Ev. Krankenhaus Bad Gandersheim
1998	Beginn des Medizinstudiums an der Medizinischen Universität Lübeck
1999-2002	Studentische Hilfskraft am Institut für Medizinische Psychologie Entwicklung der Software „Vision Trainer Brightness“ zur Rehabilitation von corticalen Sehstörungen Veröffentlichung: „Neurovisual Rehabilitation via the Internet“ Schmielau F; Wong KW; Holbe F; in Telemedicine: medicine and communication Edited by T. M. Buzug et al., Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001
2000	Physikum und Beginn der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Missler zum Nachweis Hypoxischer Hirnschäden nach Reanimation
10.10.2000	Eheschließung mit Meike Holbe, geb. Wessel (Assistenzärztin in der Pädiatrie des Krankenhauses Wismar)
2001	Erstes Staatsexamen
2003	Zweites Staatsexamen
2003/2004	1. PJ - Tertial in der Inneren Medizin der Rheumaklinik Bad Bramstedt
2004:	2. PJ - Tertial in der Chirurgie der Asklepios Klinik Bad Oldesloe 3. PJ - Tertial in der Psychiatrie des Universitätsklinikums SH/Campus Lübeck
5.10.2004	Drittes Staatsexamen
Famulaturen:	
Februar/März 01	Innere Medizin, District General Hospital, Eastbourne, England
März/April 01	Chirurgie, Praxis Dres. Sagebiel/Busse, Lübeck
Oktober 01	Allgemeinmedizin, Praxis Kahle/Holbe/Piechnick, Kreiensen/Greene
Juli 02	Radiologie, Universitätsklinikum Lübeck
August 02	Anästhesie, Universitätsklinikum Lübeck
September 02	Innere Medizin, DRK Krankenhaus Mölln/Ratzeburg (Ratzeburg)
Februar/März 03	Chirurgie/Innere Medizin/Pädiatrie/Gynäkologie, Our Lady of Grace Hospital, Asikuma, Ghana