

---

# Charakterisierung des fokalen Schlaganfalls in der Maus und Einsatz von Bilobalid als Neuroprotektivum

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang Goethe - Universität in Frankfurt am Main

von

Dorothee Lang  
aus Pforzheim

Frankfurt 2011

(D30)

vom Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

1. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Klein

2. Gutachter: Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz

Datum der Disputation: 16.09.2011

Nothing can keep you away from reaching your goals.

Do it!

Glückskeks, Amarillo, Texas, September 2007

## Inhaltsverzeichnis

<b><u>1</u></b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b><u>3</u></b>
2.1	Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls	9
2.1.1	Exzitotoxizität und Ungleichgewicht der Ionen	10
2.1.2	Kortikale Streudepolarisation und Peri-Infarkt Depolarisation	12
2.1.3	Oxidativer und nitrosativer Stress	13
2.1.4	Erhöhung der Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität während des ischämischen Schlaganfalls	14
2.1.5	Entzündung des ischämischen Gewebes	15
2.1.6	Apoptose	16
2.2	Therapie des ischämischen Schlaganfalls	17
2.2.1	rtPA — die einzige derzeit zugelassene Substanz	17
2.2.2	Präklinische Studien und mögliche Therapieansätze des ischämischen Schlaganfalls	17
2.3	Bilobalid — Ein Inhaltsstoff von Ginkgo biloba	21
2.3.1	Allgemeines	21
2.3.2	Pharmakokinetik und Mutagenität	24
2.3.3	Therapeutisches Potential von EGb 761 und Bilobalid	25
2.3.3.1	Ischämie	25
2.3.3.2	Morbus Alzheimer	26
2.3.3.3	Antagonismus des Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)	27
2.3.3.4	Radikalfänger	28
2.3.4	Wirkmechanismus von Bilobalid	28
<b><u>3</u></b>	<b><u>Zielsetzung</u></b>	<b><u>30</u></b>
<b><u>4</u></b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b><u>31</u></b>
4.1	Material	31
4.1.1	Geräte und Software	31
4.1.2	Hilfsmaterialien	33
4.1.3	Chemikalien	34
4.1.4	Verwendete Puffer und Lösungen	35
4.1.4.1	Mikrodialyse	35
4.1.4.2	Färbungen	35
4.1.4.3	Mobile Phase	35
4.1.5	Bilobalid	36
4.1.6	Tiere	36
4.2	Methoden	37

4.2.1 Verschluss der Arteria cerebri media.....	
(MCAO; middle cerebral artery occlusion).....	37
4.2.1.1 Prinzip.....	37
4.2.1.2 Durchführung MCAO .....	38
4.2.1.3 Auswertung der Schlaganfallfläche mittels TTC-Färbung .....	39
4.2.2 Verhaltenstests.....	40
4.2.2.1 Corner-Test.....	41
4.2.2.2 Chimney-Test .....	42
4.2.2.3 Rotarod-Test.....	43
4.2.3 Technik der Mikrodialyse .....	44
4.2.3.1 Prinzip.....	44
4.2.3.2 Bau der Mikrodialysesonden.....	44
4.2.3.3 Test der Mikrodialysesonden .....	46
4.2.3.4 Implantation der Mikrodialysesonden .....	46
4.2.4 Kombination der Mikrodialysetechnik mit der MCAO.....	47
4.2.4.1 Vermessung von Glukose, Laktat & Glutamat .....	49
4.2.4.2 Detektion von Bilobalid über die Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung .....	50
4.2.5 Blutgasanalyse .....	51
4.2.5.1 venöse Blutabnahme .....	53
4.2.5.2 arterielle Blutabnahme.....	53
4.2.6 Bestimmung der Enzymaktivität der Glutaminase .....	54
4.2.6.1 Prinzip.....	54
4.2.6.2 Präparation der Hirnhomogenate.....	54
4.2.6.3 Durchführung Enzymassay.....	55
4.2.7 Bestimmung der Enzymaktivität der N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamat peptidase (NAAG-peptidase).....	56
4.2.7.1 Prinzip.....	56
4.2.7.2 Durchführung Enzymassay.....	56
4.2.7.3 Durchführung Dünnschichtchromatographie.....	57
4.2.8 Statistik.....	58

## **5 ERGEBNISSE .....** **59**

5.1 Einfluss von Ringerlaktat-Lösung auf die Blutgaswerte zu verschiedenen Zeitpunkten der Ischämie .....	59
5.1.1 Arterielle Blutgase mit und ohne Ringerlaktat-Applikation .....	60
5.1.2 Venöse Blutgase mit und ohne Ringerlaktat-Applikation .....	64
5.2 Validierung des Schlaganfallmodells.....	68
5.2.1 Charakterisierung des ischämischen Schadens im Gehirn durch einen permanenten Schlaganfall.....	68
5.2.1.1 Berechnung der Schlaganfallgröße .....	68
5.2.1.2 Beeinflussung der permanenten Ischämie auf motorische und kognitive Fähigkeiten .....	70
5.2.1.3 Metabolische Veränderung im Gehirn durch einen Schlaganfall	73

---

5.2.2	Charakterisierung des ischämischen Schadens im Gehirn durch einen transienten Schlaganfall .....	77
5.2.2.1	Berechnung der Schlaganfallgröße .....	77
5.2.2.2	Beeinflussung der transienten Ischämie auf motorische und kognitive Fähigkeiten .....	79
5.3	Detektion von Bilobalid im Mikrodialysedialysat mit Hilfe der LC-MS .....	82
5.3.1	Wiederfindungsrate von Bilobalid .....	82
5.3.2	Extrazelluläre Konzentration von Bilobalid im gesunden Maushirn .....	83
5.3.3	Extrazelluläre Konzentration von Bilobalid im ischämischen Gewebe ..	84
5.4	Einsatz von Neuroprotektiva bei einem Schlaganfall am Beispiel von Bilobalid .....	87
5.4.1	Beeinflussung der Schlaganfallgröße nach einer permanenten Ischämie durch Bilobalid .....	87
5.4.1.1	Dosisabhängigkeit der neuroprotektiven Effekte von Bilobalid ..	90
5.4.1.2	Korrelation der Neuroprotektion von Bilobalid und der zeitabhängigen Applikation .....	92
5.4.2	Wirkung von Bilobalid auf metabolische Veränderungen im Gehirn nach einem permanenten Schlaganfall .....	94
5.4.2.1	Einfluss von Bilobalid auf die Glukosereduktion nach einem Schlaganfall .....	94
5.4.2.2	Einfluss von Bilobalid auf die Glutamatfreisetzung nach einer Ischämie .....	97
5.4.2.3	Einfluss von Bilobalid auf die Laktatspiegel nach einem Schlaganfall .....	99
5.4.3	Einfluss von Bilobalid auf die kognitiven und motorischen Fähigkeiten nach einem Schlaganfall .....	101
5.4.3.1	Wirkung von Bilobalid auf das Verhalten im permanenten Schlaganfall-Modell .....	101
5.4.3.2	Wirkung von Bilobalid auf das Verhalten im transienten Modell	104
5.5	Untersuchungen zur mechanistischen Erklärung der Glutamatreduktion durch Bilobalid .....	108
5.5.1	Inhibition der Glutaminase durch Bilobalid .....	108
5.5.2	Inhibition der NAAG-peptidase durch Bilobalid.....	110
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>112</b>
6.1	Methodische Vorarbeiten.....	112
6.1.1	Wahl der Versuchstiere .....	112
6.1.2	Wahl des experimentellen Schlaganfall-Modells .....	113
6.1.3	Vorversuche zur Applikation von Ringerlaktat-Lösung nach einer Schlaganfallinduktion.....	114
6.2	Mit welchen Methoden kann man die pathophysiologischen Veränderungen nach einer Ischämie in der Maus quantifizieren?.....	116
6.2.1	Berechnung des Infarktolumens .....	116
6.2.2	Verhaltenstests.....	116

---

6.2.3	Mikrodialyse.....	118
6.3	Einsatz von Bilobalid als Neuroprotektivum.....	121
6.3.1	In welchem Ausmaß überwindet Bilobalid vor und nach einem Schlaganfall die Blut-Hirn-Schranke? .....	121
6.3.2	In welcher Dosis und in welchem Zeitfenster reduziert Bilobalid einen fokalen ischämischen Infarkt? .....	122
6.3.3	Verbessert Bilobalid die sensomotorischen Defizite der Maus nach einem Schlaganfall? .....	125
6.3.4	Beeinflusst Bilobalid <i>in vivo</i> die Ischämie-induzierten metabolischen Veränderungen im Gehirn? .....	127
6.3.5	Welcher Mechanismus vermittelt den Schutz von Bilobalid vor der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität? .....	128
6.4	Schlussfolgerung & Ausblick .....	131
<b>7</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b> .....	<b>132</b>
<b>8</b>	<b><u>ANHANG</u></b> .....	<b>151</b>

---

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

aCSF	artificial cerebrospinal fluid, künstliche Cerebrospinalflüssigkeit
acc.	accelerierend, beschleunigend
AD	Außendurchmesser
ADP	Adenosindiphosphat
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AP	anterior- posterior
APCI	Atmospheric-Pressure-Chemical-Ionisation
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Bilo	Bilobalid
CCA	common carotic artery; Arteria carotis communis
CSD	cortical spreading depressions
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxide
DON	6-Diazo-5-oxo-L-norleucin
DV	dorsal- ventral
ECA	external carotid artery; Arteria carotis externa
EGb 761	Extraktum Ginkgo bilobae 761
ESI	Elektrospray-Ionenquelle
GABA	$\gamma$ -Amino-Buttersäure
h	Stunde
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
ID	Innendurchmesser
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
ICA	internal carotid artery; Arteria carotis interna
ICAM	intercellular adhesion molecules (interzelluläre Adhäsionsmoleküle)
L	lateral
MCA	middle cerebral artery; Arteria cerebri media
MCAO	middle cerebral artery occlusion; Verschluss der Arteria cerebri media
mGlu	metabotrope Glutamat-Rezeptoren
min	Minute(n)
MRT	Magnetresonanztomographie
MMP	Matrix-Metalloproteasen
LC-MS	liquid chromatography mass spectrometry
NAAG	N-Acetyl-aspartat-glutamat



---

<sup>3</sup> H-NAAG	N-Acetyl-aspartat-glutamat Tritium markiert
NAAG-peptidase	N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamat-peptidase; Glutamat-Carboxypeptidase II (GCPII)
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthetase
ns	nicht signifikant
OP	Operation
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBS	phosphate buffered saline; phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PMPA	2-(Phosphonomethyl)pentane-1,5-dioic acid; 2-(Phosphonomethyl)-1,5-Pentadinsäure
p.o.	peroral
ppm	parts per million; Teile pro Millionen
RL	Ringelaktat-Lösung
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
rtPA	recombinant tissue plasmonigen activator; rekombinanter Gewebe-Plasminogenaktivator
tPA	tissue plasmonigen activator; Gewebe-Plasminogenaktivator
TIA	transistorische ischämische Attacken
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
SD	Standardabweichung
SEM	Standardabweichung vom Mittelwert
TGF	Transforming growth factor; transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
VCAM	vascular cell adhesion molecule; vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
vs.	versus
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Der ischämische Schlaganfall ist ein Ereignis, das zu gravierenden Langzeitschäden im Gehirn führen kann und für das es keine ausreichende Therapie gibt. Der Schlaganfall und seine Folgen sind Hauptursachen für die Behinderung und Pflegebedürftigkeit im Alter. Eine cerebrale Ischämie führt zu pathophysiologischen Veränderungen, wie z.B. einer Störung in der Energieversorgung und einem veränderten Metabolismus im Gehirn. Die hierbei beobachtbaren stark erhöhten Glutamatspiegel ergeben sich u.a. aus der Depolarisation der neuronalen Plasmamembran und der Umkehr des  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glutamattransporters. Die massive Freisetzung von Glutamat spielt eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie des Schlaganfalls und ist ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Methode des fokalen cerebralen Schlaganfalls in der Maus etabliert. Hierbei ist u.a. der Nutzen einer Ringerlaktat-Gabe nach der Schlaganfallinduktion belegt worden. Anschließend wurde der Einfluss einer cerebralen Ischämie in Bezug auf die Infarktgröße, die motorische Funktion der Tiere und den Energiestoffwechsel des Gehirns untersucht.

Das Ausmaß des fokalen cerebralen Schlaganfalls der Maus wurde durch die Auswertung der Infarktfläche 24 Stunden nach einer permanenten oder transienten Okklusion der Arteria cerebri media berechnet. Die daraus folgenden sensomotorischen Defizite der Tiere wurden mit verschiedenen Verhaltenstests bewertet. Eine Verkürzung der Okklusionszeit der Arteria cerebri media führt nicht nur zu einer Reduktion der Infarktfläche, sondern auch zu einem besseren Ergebnis in den neurologischen Tests.

Zur Messung des cerebralen Metabolismus ist die Mikrodialysetechnik mit dem Schlaganfallmodell kombiniert worden. Die Analyse der Dialysatproben zeigt, dass durch die Ischämie Glutamat innerhalb von 15-30 Minuten toxische Konzentrationen erreicht, wohingegen die Glukosekonzentration stark abfällt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das Infarktvolumen, die Glutamat-induzierte Exzitotoxizität im Gehirn und die motorischen Defizite durch die Gabe von Bilobalid moduliert werden können.

Bilobalid ist ein Inhaltsstoff des Ginkgo biloba Extraktes EGb 761 und zeigte bereits in *in vitro*-Studien ein antiischämisches Potential.

Da die Pharmakokinetik von Bilobalid im Gehirn völlig unbekannt war, ist zuerst untersucht worden, ob Bilobalid nach einer intraperitonealen Gabe in ausreichender Konzentration im gesunden und ischämischen Hirngewebe vorliegt. Die Proben wurden über die Mikrodialyse gewonnen. Die Analyse ergab, dass Bilobalid sowohl im gesunden, als auch im ischämischen Gehirn in ausreichender Konzentration (ca. 1  $\mu\text{M}$ ) vorliegt, um eine neuroprotektive Wirkung auszuüben. Eine Gabe von Bilobalid nach der Schlaganfallinduktion führt dagegen nur zu einer geringen Konzentration im ischämischen Gewebe (0,08  $\mu\text{M}$ ).

Die Studie zum Einfluss von Bilobalid (0,3-10 mg/kg) auf das Infarktvolumen zeigt, dass in den Konzentrationen 3 und 10 mg/kg die Schlaganfallfläche im Striatum markant reduziert wird. Für die Dosis 10 mg/kg ist diese Wirkung zusätzlich auch bei einer Applikation erst nach der Schlaganfallinduktion zu sehen.

Die Wirkung von Bilobalid auf die metabolischen Veränderungen nach einem Schlaganfall wurde ebenfalls mittels Mikrodialyse untersucht. Die Ischämie-bedingten toxischen Glutamatkonzentrationen werden hierbei dosisabhängig durch Bilobalid reduziert, wohingegen die Substanz keinen Einfluss auf die Reduktion der Glukosespiegel zeigt.

Abschließend wurde eine Untersuchung zum Verhalten der Bilobalid-behandelten Tiere nach einer permanenten oder transienten Okklusion durchgeführt. Die Bilobalid-Tiere wiesen hierbei, besonders im transienten Schlaganfallmodell, eine bessere Motorik und Koordination als unbehandelte Tiere auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein fokaler Schlaganfall zu einer massiven Erhöhung der Glutamatkonzentration im Gehirn führt und die Tiere eine starke Beeinträchtigung in der Motorik und Koordination haben. Bilobalid reduziert *in vivo* dosisabhängig das Ausmaß eines Schlaganfalls und senkt die daraus resultierenden toxischen Glutamatkonzentrationen. Gleichzeitig zeigen die mit Bilobalid-behandelten gegenüber den unbehandelten Tieren eine Verbesserung in den neurologischen Tests. Sowohl eine Anreicherung der Substanz in einem Ginkgo biloba Extrakt, als auch die Einnahme der Reinsubstanz könnte positive Auswirkungen auf einen humanen Schlaganfall haben.

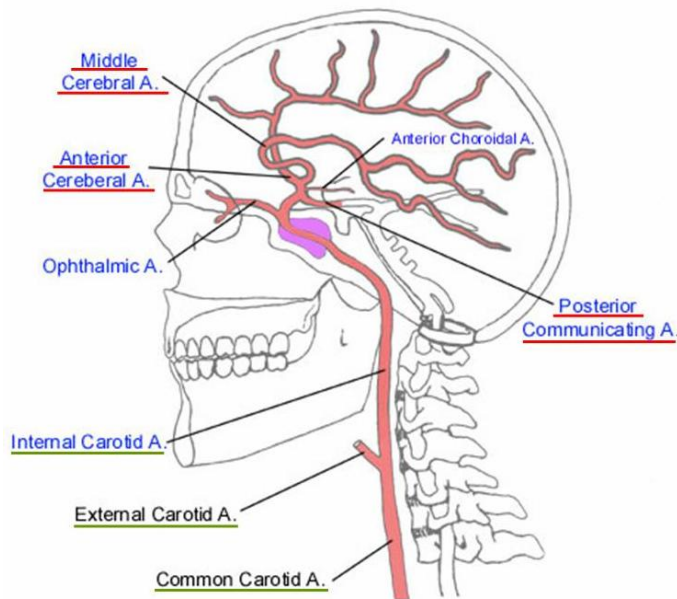
## 2 EINLEITUNG

Der Schlaganfall war im Jahre 2009 nach der „International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems“ (ICD-10) mit 25425 Sterbefällen auf Platz 6 der 10 häufigsten Todesursachen in Deutschland (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2009). Die jährliche Inzidenz eines Schlaganfalls liegt nach Daten des Erlanger Schlaganfallregisters für Deutschland bei 1,74/ 1000 Einwohnern. 19,4 % der Patienten sterben innerhalb der ersten 28 Tage, 28,5 % innerhalb der ersten 3 Monate und 37 % innerhalb der ersten 12 Monate (Kolominsky-Rabas et al. 1998). Damit ist der Schlaganfall eines der häufigeren Krankheitsbilder in der hausärztlichen Praxis (Danninger 1997).

Die Definition der WHO für einen Schlaganfall ist ein sich rasch entwickelndes Zeichen einer fokalen oder globalen Störung der cerebralen Funktion ohne erkennbare Ursachen, woran sich Symptome (siehe Tabelle 1) anschließen, die 24 Stunden oder länger andauern oder gar zum Tode führen (Bonita 1992).

Von einer transitorischen ischämischen Attacke (TIA) wird gesprochen, wenn die klinischen Ausfallerscheinungen (Hemiparese der Gesichts- und Armmuskulatur) sich definitionsgemäß spätestens nach 24 Stunden zurückgebildet haben. TIA machen etwa 25 % aller akuten cerebrovaskulären Erkrankungen aus (Weimer und Diener 2003). Eine TIA-Symptomatik hat eine Chance von fast 50 %, sich innerhalb von 24 Stunden zurückzubilden (Mumenthaler und Mattle 1997). Patienten nach einer TIA haben den folgenden 5 Jahren ein Schlaganfallrisiko von 25-29 % (Streifler et al. 1995). Weitere Risiken für einen Schlaganfall sind das metabolische Syndrom, ein erhöhter Bluthochdruck, Diabetes, Rauchen und das Alter. So erhöht sich zum Beispiel das Risiko für einen Schlaganfall mit jedem Lebensjahr um 9 % bei Männern und um 10 % bei Frauen (Asplund et al. 2009).

Ursachen für einen Schlaganfall können ischämisch oder hämorrhagisch bedingt sein. Mit einer Prävalenz von 80 % ist der ischämische Infarkt viermal häufiger als ein hämorrhagischer (Mergenthaler et al. 2004). Eine genaue Diagnose ist allerdings erst über bildgebende Verfahren, wie MRT oder CT möglich. In 60 % der Fälle zeichnet sich der ischämische Schlaganfall durch einen Verschluss einer terminale Hirnarterie aus (siehe Abbildung 1) (Moustafa und Baron 2008).



**Abbildung 1: Übersicht über die peripheren Arterien und die drei terminalen Hirnarterien mit ihren Verzweigungen.** Die peripheren Arterien sind grün und die terminalen Hirnarterien rot markiert (Loyola University Chicago 1999).

Je nach Infarktareal kommt es zu unterschiedlichen Symptomen. Die Befunde der neurologischen Untersuchung erlauben bereits frühzeitig, einen Verdacht auf den Ort des Verschlusses zu äußern (Gross et al. 1994). In Tabelle 1 ist, nach den Gefäßgebieten geordnet, ein Überblick der möglichen Symptome wiedergegeben.

**Tabelle 1 Schlaganfallsymptome, nach dem Versorgungsgebiet der Hirnarterien sortiert** (nach Gross et al. 1994)

<p><b>Arteria cerebri media</b></p> <p>contralaterale Mono- oder armbetonte Hemiparese</p> <p>Hemihypästhesie</p> <p>seitenabhängige Aphasie</p> <p>Rechen-, Schreib- und Lesestörung</p> <p>halbseitiger Gesichtsfeldausfall zur Gegenseite</p>
<p><b>Arteria cerebri posterior</b></p> <p>halbseitiger Gesichtsfeldausfall zur Gegenseite</p> <p>beidseitige Rindenblindheit</p> <p>Amnesie</p> <p>Thalamussymptome</p>

**Arteria cerebri anterior**

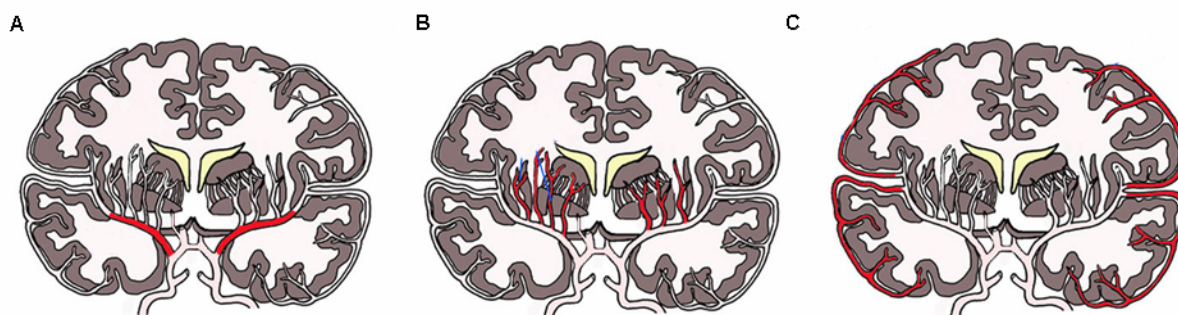
Parese und Reflexsteigerung des contralateralen Beins

Verwirrtheit

Aspontaneität

Orientierungsstörung

Durch zahlreiche CT-Aufnahmen von Schlaganfallpatienten wurden mehr als die Hälfte der Infarkte in der linken Hemisphäre festgestellt. Davon waren insgesamt 27 % in der Arteria cerebri media, 12 % in der Arteria cerebri posterior und nur 2 % in der Arteria cerebri anterior (Zülch 1985). Die mittlere cerebrale Arterie (MCA), mit ihren weiten Verzweigungen und als Hauptversorgungsgefäß der corticalen Bereiche und des Striatums, spielt somit eine wichtige Rolle innerhalb der ischämischen Infarkte. In Abbildung 2 ist das Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media schematisch dargestellt.



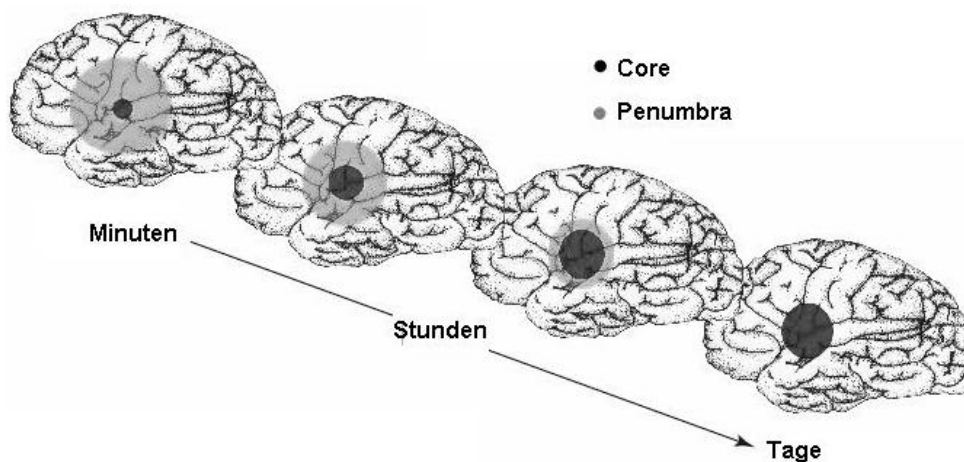
**Abbildung 2: Übersicht der Versorgungsgebiete der Arteria cerebri media.** In (A) ist das horizontale Segment, in (B) die seitlichen lentikulostriatalen Arterien und in (C) das corticale Segment abgebildet. Nach Loyola University Chicago 1999.

Ein kompletter Infarkt der von der MCA versorgten Gebiete hat nicht immer einen Verschluss der Arterie als Ursache. So kommt es auf Grund einer akuten Okklusion der Arteria carotis interna am Hals in zwei Drittel der Fälle zu einem Infarkt im kompletten oder zumindest im zentralen Gebiet (siehe Abbildung 2 B) der MCA. Ein Verschluss derselben Arterie kann also zu in der Größe und Lokalisation unterschiedlichen Infarkten führen (Zülch 1985).

Grundsätzlich kann man bei einem Infarkt zwischen einem Kerngebiet (Core) und einem Randgebiet (Penumbra) unterscheiden. Der direkte Ort der Okklusion in der Arterie wird als Kerngebiet der Ischämie bezeichnet (Astrup et al. 1981; Donnan et al. 2008; Fisher und Garcia 1996; Hossmann 1994). Dieser Bereich liegt auf Grund der stark ausgeprägten Minderdurchblutung und den massiven, schnell

eintretenden pathophysiologischen Veränderungen außerhalb der therapeutischen Möglichkeiten. Die Penumbra hingegen steht im Fokus möglicher Therapien, da hier noch eine Durchblutung gegenwärtig ist und dadurch potentielle Arzneistoffe in das Zielgebiet transportiert werden können (Lo 2008; Moustafa und Baron 2008).

Wie man in Abbildung 3 sieht, sind Core und Penumbra allerdings von Beginn der fokalen Minderdurchblutung an dynamisch in Raum und Zeit. Das bedeutet, dass mit Fortschreiten der Ischämie, Zonen der Penumbra immer mehr absterben und Eigenschaften des Kerngebietes annehmen (Astrup et al. 1981; Ginsberg et al. 1999; Lo 2008). Auf die pathophysiologischen Veränderungen wird im Kapitel 2.1 näher eingegangen.



**Abbildung 3: Core und Penumbra eines fokalen ischämischen Infarktes.** Der dunkle Punkt stellt das Kerngebiet (Core) und die graue Fläche die Penumbra dar. Nach Dirnagl et al. 1999.

Um einen humanen Infarkt nachzuahmen, wurden verschiedene experimentelle Schlaganfallmodelle entwickelt. Die drei Hauptklassen der *in vivo*-Modelle sind (1) der globale Infarkt, (2) die fokale Ischämie und (3) die Hypoxie-Ischämie. Das letzte Modell wird fast ausschließlich in jungen Tieren durchgeführt (Ginet et al. 2009; Uchiyama et al. 2008). Die globale Ischämie wird durch einen Verschluss von zwei oder vier Arterien herbeigeführt und hauptsächlich bei Ratten und bei mongolischen Wüstenrennmäusen angewendet (Herrmann et al. 2004; McBean und Kelly 1998). Bei fokalen Schlaganfallmodellen, egal ob in größeren Säugetieren wie Hund, Katze oder nicht-menschlichen Primaten oder Nagern, wird die Arteria cerebri media distal oder proximal verschlossen (Koizumi et al. 1986; Lipton 1999).

Im distalen Modell erfolgt die Okklusion über eine Craniotomie. Hierbei wird der *Musculus temporalis* durchtrennt, 2-3 mm rostral von der Fusion des *Os zygomaticum* und *squamosum* ein Loch gebohrt und die MCA direkt an ihrem Ursprung abgebunden (Woodruff et al. 2011). Der proximale Verschluss der MCA ist das am häufigsten angewendete Modell (O'Collins 2006). Ein durch Hitze oder Silikon verdickter Faden (Filament) wird hierbei in die *Arteria carotis interna* (ICA) eingeführt und bis zur Verzweigung der MCA im Gehirn geschoben (Howells et al. 2010). Ein detaillierter Versuchsablauf des proximalen Modells ist in Kapitel 4.2.1 zu finden. Vorteil beider fokalen Ischämie-Methoden ist, dass die Okklusion sowohl transient (Okklusion < drei Stunden), als auch permanent (Okklusion > drei Stunden bis zu mehreren Tagen) erfolgen kann (Woodruff et al. 2011).

In zwei Punkten unterscheidet sich die fokale Ischämie wesentlich von der globalen Ischämie: (1) im Kerngebiet des Infarktes bleibt hier ein verminderter Blutfluss erhalten und (2) es kommt zu einer markanten Abstufung der Ischämie vom Kerngebiet der Läsionen bis hin zur Penumbra und damit verbunden auch zu verschiedenen metabolischen Veränderungen in den betroffenen Arealen. Die fokale Ischämie ist wegen ihrer Dauer und Heterogenität viel komplexer als die globale Ischämie und dadurch auch das realistischere Modell für den menschlichen Schlaganfall (Lipton 1999).

Weitere experimentelle fokale Schlaganfallmodelle sind das embolische Modell der fokalen Ischämie oder der distale photothrombotische Verschluss der MCA (Arumugam und Mattson 2006; Woodruff et al. 2011). Eine Übersicht über die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Methoden der fokalen Ischämie ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

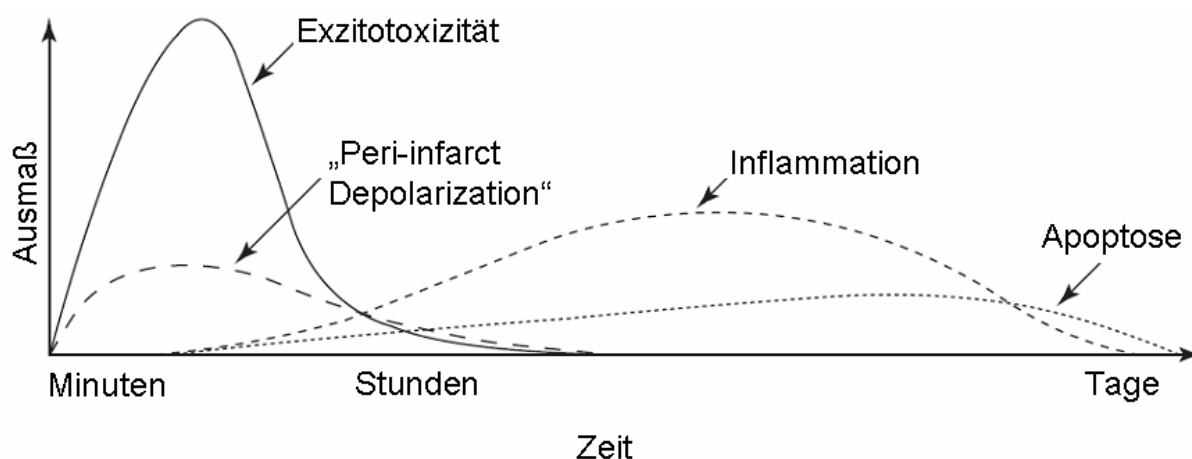


**Tabelle 2 Übersicht der Vor- und Nachteile der gängigen fokalen Ischämie-Modellen nach Howells et al. 2010**

<b>Modell Häufigkeit [%]</b>	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
<b>Fadenmodell (proximal)</b>	kein Öffnen des Schädels keine Verletzung des Gehirns permanente und transiente Okklusion möglich <b>Ausbildung einer Penumbra ermöglicht Studien zur Neuroprotektion</b> hohe Erfolgsrate bei erfahrener Durchführung	erfordert eine erhebliche Halschirurgie mit peri-operativer Morbidität Läsions-Volumen/Variabilität stark abhängig von der Anatomie des Circulus willisii und Grad und Dauer der Okklusion
Hitze-behandelte Fäden [51 %]	heute kaum noch verwendet, im Wesentlichen von historischem Interesse	uneinheitliche Okklusion
Hitze-/Poly-L-Lysin behandelte Fäden [7 %]	effektive Okklusion, hohe Reproduzierbarkeit für permanente MCAO	festes Verankern im Endothel führt bei Reperfusion zu einer Blutung
Silikonfäden [42 %]	sehr effektive Okklusion, niedrige Sterblichkeit, gute Reproduzierbarkeit	die Beschichtung kann sich ablösen und sekundäre Ursache für eine Okklusion sein
<b>Craniotomie (distal)</b>	durchführbar in allen Spezies, besonders in großen Tieren hohe Erfolgsquote gut reproduzierbare Daten in Infarktgröße und im Verhalten relativ wenig chirurgische Komorbidität	erhebliche Traumata Schädel wird geöffnet, Dura verletzt und CSF freigesetzt
<b>Thrombolischer Verschluss</b>	entspricht dem humanen Schlaganfall Thrombolysestudien sind möglich	niedrige Erfolgsrate hoch variable Ergebnisse in Histologie und Verhalten Zeit der Reperfusion abhängig von der Thrombolyse 10mal mehr tPA in Nagern erforderlich als im Menschen

## 2.1 Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls

Die pathophysiologischen Veränderungen des Schlaganfalls sind komplex und zahlreiche Prozesse sind darin involviert. Ein zellulärer Energieverlust, eine Störung in der Zellionenhomöostase (Jayakumar und Norenberg 2010), das Auftreten von Peri-Infarkt Depolarisationen (PIDs) (Nakamura et al. 2010), erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel, sowie eine Exzitotoxizität und das Ausbilden einer Nekrose, zählen zu den ersten Veränderungen im ischämischen Kerngebiet (Woodruff et al. 2010) (siehe Abbildung 4). Spätere pathophysiologische Veränderungen, die sich auch in der Penumbra zeigen, sind eine durch freie Radikale verursachte Toxizität, die Unterbrechung der Blut-Hirn-Schranke, eine Entzündung (Dirnagl et al. 1999; Doyle et al. 2008) und letztendlich der programmierte Zelltod (Broughton et al. 2009; Dirnagl et al. 1999; Doyle et al. 2008; Mattson et al. 2000). Die einzelnen Pathomechanismen werden in den folgenden Abschnitten detaillierter erläutert.

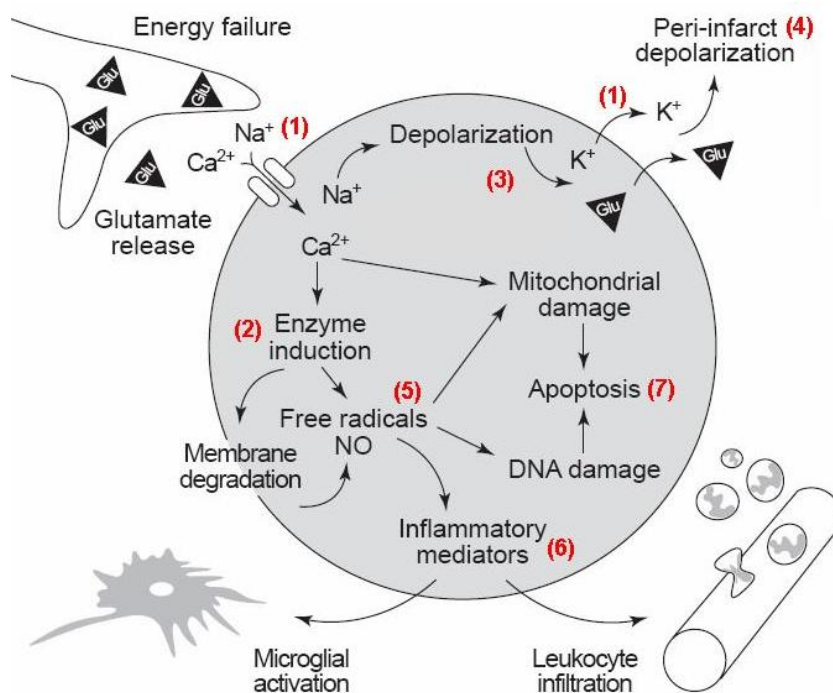


**Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf pathophysiologischer Ereignisse nach einer fokalen cerebralen Ischämie.** Nach Dirnagl et al 1999.

### 2.1.1 Exzitotoxizität und Ungleichgewicht der Ionen

Das Gehirn benötigt 20 % des gesamten Sauerstoffverbrauchs des Körpers, um genügend ATP für das Ausbilden und Aufrechterhalten von Ionengradienten zu haben. Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, die an der Plasmamembran von Neuronen zu finden ist, verbraucht 70 % der Energie, die an das Gehirn geliefert wird (Edvisson und Krause 2002).

Durch einen Schlaganfall wird die mitochondriale ATP-Synthese gehemmt und das vorhandene ATP innerhalb kürzester Zeit (zwei Minuten) verbraucht. Dies verursacht eine Freisetzung von  $\text{K}^+$  in den Extrazellulärraum und den Einlass von  $\text{Na}^+$  in die Zellen (Caplan 2000) (Abbildung 5, [1]). Der Energieverlust führt auch zu einer Störung, der in der Plasmamembran vorkommenden  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, so dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf 50-100  $\mu\text{M}$  in der Zelle ansteigt und calciumabhängige Proteasen, Lipasen und DNasen aktiviert werden (Abbildung 5, [2]) (Edvisson und Krause 2002; Lipton 1999). Diese katabolen Enzyme verursachen eine Nekrose, da eine Neu-Synthese essentieller zellulärer Bestandteile auf Grund des ATP-Mangels nicht möglich ist (Doyle et al. 2008).



**Abbildung 5: Überblick der pathophysiologischen Mechanismen nach einer fokalen Ischämie.** Nach Dirnagl et al. 1999.

Ein weitere wichtige Konsequenz des ATP-Mangels ist die daraus resultierende Depolarisation der neuronalen Plasmamembran, die zur Neurotransmitterfreisetzung, vor allem von Glutamat, dem wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter im Gehirn, führt (Doyle et al. 2008, Woodruff et al. 2010). Glutamat nimmt daher eine entscheidende Rolle bei den ischämischen Veränderungen ein (Arundine und Tymianski 2004).

Im Gehirn findet man eine ungewöhnlich hohe Konzentrationen an Glutamat (5-15 mmol/kg) (Danbolt 2001). Während die Konzentration in der Synapse im mikromolaren Bereich ist, liegt die Konzentration im neuronalen Zytoplasma glutaminerger Neurone bei 5-10 mM und ist damit auch deutlich höher als die Konzentration anderer Aminosäuren und in anderen Gewebearten (Bramham et al. 1990; Danbolt 2001; Osen et al. 1995; Ottersen et al. 1990; Ottersen et al. 1992). Im Gegensatz zu den Zellkörpern und den Dendriten ist die Glutamatkonzentration in den neuronalen Axonenden zwei- bis dreimal höher (Ottersen 1989). Dies bedeutet, dass Axonenden die Glutamatfreisetzung begrenzen, oder (eher wahrscheinlicher) Glutamat synthetisieren und lokal verbrauchen. Grund hierfür ist das Vorkommen von Glutaminasen in den Axonenden, die für die Synthese von neuronalem Glutamat verantwortlich sind (Marquez et al. 2009).

Die Membrandepolarisierung und die Akkumulation von  $\text{Na}^+$  in der Zelle führt zu einer Umkehr der  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glutamattransporter. Hierzu gehören z.B. der L-Glutamat-L-Aspartat Transporters (GLAST, auch als exzitatorische Aminosäure-Transporter 1 (EAAT1) bekannt), der Glutamat-Transporter 1 (GLT-1, auch als EAAT2 bezeichnet), der exzitatorischen Aminosäure-Träger 1 (EAAC1, auch genannt EAAT3), EAAT4, sowie EAAT5. Dadurch kann Glutamat gegen den Konzentrationsgradienten die Zelle verlassen (Doyle et al. 2008; Gonzalez und Robinson 2004).

Die Erhöhung der Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt führt zur Aktivierung von NMDA- und AMPA-Rezeptoren. NMDA-Rezeptoren sind Calcium-permeabel und das Öffnen dieser Kanäle führt zu einer weiteren Membrandepolarisation und einem größeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx, der die intrazelluläre Calciumüberlastung noch verschärft. Dies wird auch Exzitotoxizität genannt (Olney und Sharpe 1969).

Neben ionotropen Rezeptoren sind auch die metabotropen glutamaterger Rezeptoren (mGlu) an der Exzitotoxizität beteiligt. mGlu-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die die exzitatorische synaptische Transmission regulieren. Insgesamt gibt es drei Gruppen. Die Gruppe I (mGlu1 und 5) ist vorwiegend an der postsynaptischen Membran glutamaterger Synapsen zu finden, wo sie die neuronale Erregbarkeit durch Modulation von NMDA- und AMPA-Rezeptoren erhöhen (Landucci et al. 2009; Scartabelli et al. 2008). Die Gruppen II (mGlu2 und mGlu3) und III (mGlu4 und mGlu6-8) der metabotropen glutamatergen Rezeptoren sind vorwiegend an präsynaptischen Endigungen zu finden, wo sie die Glutamatfreisetzung hemmen (Doyle et al. 2008).

### 2.1.2 Kortikale Streudepolarisation und Peri-Infarkt Depolarisation

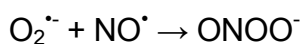
Die kortikale Streudepolarisation (cortical spreading depression (CSD)) ist eine sich selbst ausbreitende Welle (2-3 mm/min) elektrochemischer Aktivität, die in der Umgebung sich frisch entwickelnder Hirnläsionen auftritt (Nakamura et al. 2010), aber auch an der Pathogenese der Migräne im gesunden Gehirn beteiligt ist (Senior 2002). Eine CSD verursacht eine zelluläre Depolarisation, unterdrückt elektrochemische Aktivität, erhöht die Glutamatfreisetzung und den Verlust von Membranionengradienten (Doyle et al. 2008).

Die Peri-Infarkt Depolarisation (PID) hingegen ist eine spontane Depolarisationswelle mit den gleichen Eigenschaften wie die CSD in der Penumbra nach einem Schlaganfall (Strong et al. 2007). Sie kann durch die Freisetzung von  $K^+$  und exzitatorischen Aminosäuren, wie Glutamat, aus dem Kerngebiet des Schlaganfalls (Core) ausgelöst werden (Abbildung 5, [4]) (Dirnagl et al. 1999; Hossmann 1996; Strong et al. 2007). Obwohl die CSD im normal perfundierten Gehirn nicht zu einem Zelltod führt, stehen immer wiederkehrende PIDs im ischämischen Gehirn in Zusammenhang mit dem zunehmenden Ausmaß des ischämischen Schadens (Mies et al. 1993). Eine wiederholte Depolarisation in der Penumbra führt zu einer Akkumulation von Calcium in den Neuronen. Auf Grund der beeinträchtigten Energieversorgung im Gewebe kann der Calciumgrenzwert durch PIDs erreicht werden und das Gewebe schädigen (Doyle et al. 2008).

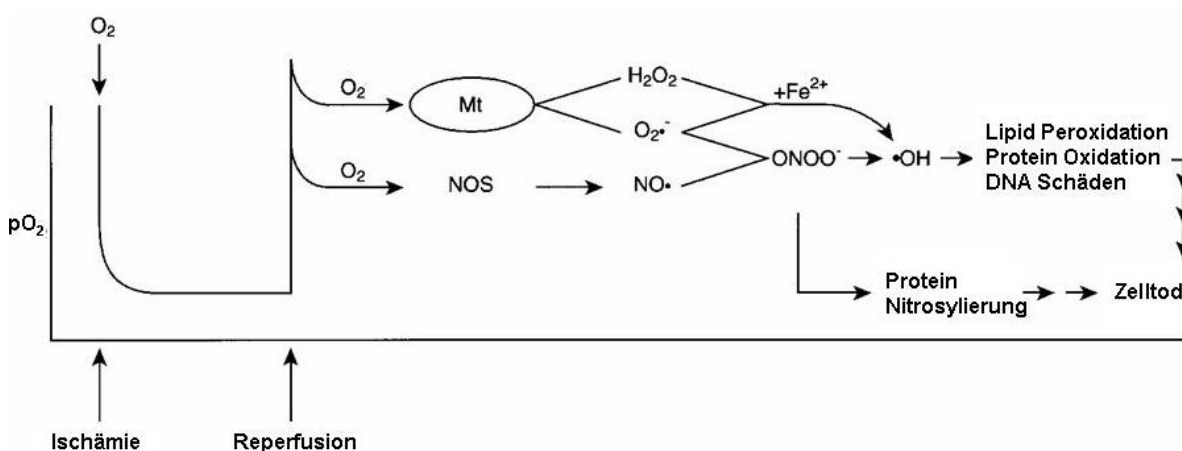
### 2.1.3 Oxidativer und nitrosativer Stress

Auf Grund der Tatsache, dass Neuronen relativ niedrige Spiegel an endogenen Antioxidantien besitzen, ist das Gehirn im Gegensatz zu den anderen Organen sehr anfällig für Schäden von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Coyle und Puttfarcken 1993). Durch eine auf Grund der Ischämie verursachte Exzitotoxizität und Reduktion der ATP-Spiegel reichern sich hohe Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  und ADP intrazellulär an. Die daraus resultierende Störung der mitochondrialen Funktion führt zu toxischen Spiegeln an ROS. Diese hohen Konzentrationen an ROS führen zum einem zur Zerstörung von zellulären Makromolekülen und zum anderen sind sie zusätzlich Teil apoptotischer Signalmechanismen (siehe Abbildung 5, [5]) (Halliwell 1994; Sugawara und Chan 2003).

Neben der Entstehung von ROS wird durch eine Ischämie auch die Stickstoffmonoxid-Synthetase (NOS) aktiviert und die Bildung von radikalem Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}^\bullet$ ) erhöht (Iadecola et al. 1995; Zhang et al. 1994).  $\text{NO}^\bullet$  ist relativ stabil, bildet aber zusammen mit Superoxidradikalanionen ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) Peroxynitrit, ein sehr potentes Oxidans nach folgender Reaktion (Beckman 1994):



Das Zusammenspiel von oxidativem und nitrosativem Stress während einer cerebralen Ischämie und anschließender Reperfusion ist in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6: Rolle der Sauerstoff- und Stickstoffmonoxidradikale in der cerebralen Ischämie und im Reperfusionsschaden.** NOS=Stickstoffmonoxidsynthetase;  $\text{O}_2^{\bullet-}$ = Superoxidradikal; Mt= Mitochondrien;  $\text{NO}^\bullet$ = Stickstoffmonoxidradikal;  $\bullet\text{OH}$ = Hydroxylradikal;  $\text{ONOO}^-$ = Peroxynitrit;  $\text{H}_2\text{O}_2$ = Wasserstoffperoxid,  $\text{Fe}^{2+}$ = Eisen $^{2+}$ -Ion. Nach Chan 1998.

Durch die Induktion einer Reperfusion und dem daraus resultierenden Anstieg in der Gewebesauerstoffkonzentration, kommt es nach einer Ischämie zu einer erneuten Produktion von Superoxidradikalen, Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit (Abbildung 6) (Chan 1998). Diese Radikalbildung in der Umgebung von Blutgefäßen spielt eine entscheidende Rolle im Reperfusion-induzierten Schaden; hierbei werden durch die Radikale Matrix-Metalloproteasen (MMPs) aktiviert, die die Blut-Hirn-Schrankenpermeabilität erhöhen (siehe Kap. 2.1.4) (Doyle et al. 2008). Oxidativer und nitrosativer Stress sind auch für das Rekrutieren und die Migration von Neutrophilen und anderen Leukozyten in die cerebralen Blutgefäße verantwortlich (siehe Kap. 2.1.5) (Crack und Taylor 2005).

#### **2.1.4 Erhöhung der Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität während des ischämischen Schlaganfalls**

Das Ausmaß der Blut-Hirn-Schrankenunterbrechung ist an den Schweregrad und die Dauer des ischämischen Ereignisses gekoppelt. Eine milde bis moderate Öffnung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist teilweise reversibel und ermöglicht es Plasmabestandteilen in das Gehirn zu gelangen und eventuell Zellen zu schädigen. Im Gegensatz dazu ist eine schwerwiegende Zerstörung der BHS nach einem ischämischen Schlaganfall nahezu irreversibel und hat eine Extravasation von potentiell schädlichen Plasmabestandteilen zur Folge (Chen et al. 2009).

Der molekulare Mechanismus, der der Öffnung der BHS unterliegt, sowie die daraus resultierenden Konsequenzen des ischämischen Schlaganfalls sind nicht vollständig geklärt (Sandoval und Witt 2008). Verschiedene Matrix-Metalloproteasen (MMP), vor allem MMP-2 und MMP-9, werden in Zusammenhang mit der Regulation der Permeabilität und Funktion der BHS während eines ischämischen Schlaganfalls gebracht (Jin et al. 2010).

### 2.1.5 Entzündung des ischämischen Gewebes

#### Die zelluläre inflammatorische Antwort

Ein Schlaganfall verursacht Neutrophilie, Lymphozytopenie und einen Anstieg der Anzahl zirkulierender Monozyten. Obwohl die Zunahme der Neutrophilen- und Monozytenanzahl wahrscheinlich am ischämischen Schaden beteiligt sind, spielt wohl eher das Einströmen dieser in das Gehirn eine Schlüsselrolle (Ross et al. 2007). Zelladhäsionsmoleküle wie Integrine, Selektine und Immunglobuline sind für das Rekrutieren, Aktivieren und Anheften von Neutrophilen an das Endothel im ischämischen Gewebe verantwortlich (Huang et al. 2006; Justicia et al. 2003). Nachdem Neutrophile an den cerebralen Blutgefäßwänden anheften, wandern sie in das cerebrale Parenchym ein. Dieser Prozess wird durch eine Ruptur der BHS unterstützt (Huang et al. 2006). Dort angelangt, setzen sie freie Radikale und proteolytische Enzyme im ischämischen Gewebe frei (Chou et al. 2004).

Obwohl Lymphozyten nicht im ZNS vorkommen, sind sie innerhalb von 24 Stunden im postischämischen Gehirn zu finden (Schroeter et al. 1994). Während der genaue Mechanismus, wie sie in das Gehirn infiltrieren können, unklar ist, geht man davon aus, dass die Ruptur der BHS eine Hauptrolle hierbei einnimmt (Hurn et al. 2007).

#### Die Zytokinausschüttung

Während eines Schlaganfalls werden Zytokine, wie IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ , von einer Reihe aktivierter Zelltypen gebildet. Hierzu zählen u.a. die Endothelzellen, Mikroglia, Neurone, Leukozyten und Fibroblasten (Armstead et al. 1993; Bevilacqua et al. 1985; Bevilacqua et al. 1986). Die Produktion von IL-1 zum Beispiel ist nach einem permanenten oder transienten Schlaganfall in Mikroglia, Astrozyten und Neuronen erhöht (Buttini et al. 1994; Tuttolomondo et al. 2008; Wang et al. 1995; Zhang et al. 1998). Obwohl mögliche schädliche Effekte von IL-1, wie die NMDA-vermittelte Exzitotoxizität oder die Stimulation der NO-Synthese bekannt sind, ist die genaue Rolle von IL-1 in der Gewebsschädigung weiterhin unklar (Huang et al. 2006).



Eine weitere Rolle von IL-1 könnte das Rekrutieren und Anheften von neutrophilen Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1) an cerebralen Endothelzellen sein (Rodriguez-Yanez und Castillo 2008; Yoshimoto et al. 1997; Zhang et al. 1995). Dies würde erklären, warum erhöhte IL-1 Spiegel nach einer Ischämie das Infiltrieren von Neutrophilen steigert (Huang et al. 2006; Yamasaki et al. 1997).

### **2.1.6 Apoptose**

Durch exzessive Glutamatrezeptoraktivierung,  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung, ROS-vermittelte Schäden, wie zellulärer Antioxidantienverbrauch, Mitochondrien- oder DNA-Schäden, können Zellen entweder durch Nekrose oder Apoptose absterben (Dirnagl et al. 1999). Die Entscheidung, ob es zum nekrotischen oder apoptotischen Zelltod kommt, ist abhängig von der Art und Intensität des Stimulus (Kato und Kogure 1999), dem Zelltyp und des zellulären Entwicklungsstadiums (Abbildung 5 [7]) (Leist und Nicotera 1998).

Nach einer akuten, permanenten vaskulären Okklusion spielt die Nekrose eine wichtige Rolle, während im Gegensatz dazu bei mildereren Verletzungen der programmierte Zelltod von Bedeutung ist. Da in der Penumbra eine mildere Ischämie ausgebildet ist und ATP noch vorhanden ist, gehen hier die Zellen besonders häufig einen apoptotischen Zelltod ein (Ferrer und Planas 2003; Kato und Kogure 1999; Kerr 1965; Kerr et al. 1972).

## **2.2 Therapie des ischämischen Schlaganfalls**

### **2.2.1 rtPA — die einzige derzeit zugelassene Substanz**

Die Therapie des ischämischen Schlaganfalls erfolgt über die intravenöse Gabe des rekombinanten gewebespezifischen Plasminogenaktivators (rtPA), das erste und einzige zugelassene Mittel für die Therapie des akuten ischämischen Schlaganfalls (Eckert 2009). tPA ist eine Serinprotease, die Plasminogen in Plasmin umwandelt, welches dann Fibrin spaltet und so zur Lyse des Thrombus führt. Im Jahre 1996 wurde rtPA für die Behandlung des akuten ischämischen Schlaganfalls zugelassen. Das Zeitfenster der thrombolytischen Therapie liegt allerdings nur zwischen 0-4 Stunden nach dem Infarkt. Grund hierfür ist, dass es bei einem späteren Lysezeitpunkt zu einem starken Anstieg von freien Radikalen kommt, welche eine zweite Welle oxidativen und nitrosativen Stresses mit sich bringt (Abbildung 6) und dadurch das Risiko einer irreversiblen Gehirnblutung und einer Ödemausbildung erhöht wird (Crack und Taylor 2005; Doyle et al. 2008).

### **2.2.2 Präklinische Studien und mögliche Therapieansätze des ischämischen Schlaganfalls**

Abbildung 7 stellt eine Zusammenfassung der pathophysiologischen Veränderungen nach einem Schlaganfall dar (siehe auch Kapitel 2.1) und zeigt mögliche Therapieansätze auf. Auf die wichtigsten Therapieansatzpunkte wird in den nächsten Abschnitten näher eingegangen.



großen Effekt in experimentellen Schlaganfall-Modellen, in klinischen Studien jedoch blieb der gewünschte Erfolg aus (Danton und Dietrich 2004). Hierfür sind zwei Gründe zu nennen. Zum einen können NMDA-Rezeptor-Antagonisten dosisabhängig Phencyclidin-ähnliche psychotische Nebenwirkungen hervor rufen und zum anderen sind die in den Patienten erreichten Substanzspiegel häufig unterhalb der Konzentration, die im Tiermodell neuroprotektive Eigenschaften zeigten (Kermer et al. 1999; Zivin 1998). Ein weiteres Problem ist die mögliche Ausbildung von so genannten Olney's Läsionen, welche bereits bei moderaten Dosen vorkommen können und in hohen Dosen zur nekrotischen Neurotoxizität durch verstärkte Vakuolenbildung führen (Olney et al. 1989). Es wird allerdings kontrovers diskutiert, ob diese seltenen toxischen Nebenwirkungen auch im Menschen vorkommen (Zivin 1998).

Nicht-NMDA-Rezeptor-Antagonisten wurden ebenfalls für den Einsatz bei einem Schlaganfall entwickelt und untersucht. Der AMPA-Antagonist Zonampanel erreichte die Phase II der klinischen Prüfung. Die Studie wurde bereits 2006 beendet, die Ergebnisse wurden allerdings bisher noch nicht veröffentlicht (Woodruff et al. 2011). Inhibitoren spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (z.B. Nimodipin und Flunarizin), erwiesen sich im Tiermodell als erfolgreich (Inzitari und Poggesi 2005), zeigten aber in klinischen Studien unterschiedliche Erfolge (Cohan 1990; Danton und Dietrich 2004; Zhang et al. 1993).

Die pharmakologische Blockade der metabotrope Glutamat-Rezeptoren der Gruppe I zeigte *in vitro* und *in vivo* neuroprotektive Eigenschaften (Bruno et al. 2001). mGlu1-Rezeptoren werden in GABAergen Neuronen exprimiert, wo ihre Aktivierung die GABA-Freisetzung unterdrückt. Daher könnten mGlu1-Antagonisten, in dem sie die Freisetzung von GABA fördern, neuroprotektiv sein (Landucci et al. 2009; Scartabelli et al. 2008). mGlu5-Rezeptoren sind physikalisch und funktionell mit den NMDA-Rezeptoren verbunden. Ein antagonistischer Effekt an diesen Rezeptoren könnte eine Exzitotoxizität mindern, indem die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren reduziert wird (Pellegrini-Giampietro 2003). Agonisten der Gruppe II und III der mGlu-Rezeptoren weisen durch das Begrenzen der exzitotoxischen Induktion und durch die Produktionssteigerung neurotropher Faktoren (TGF- $\beta$ , Nervenwachstumsfaktoren) einen neuroprotektiven Schutzeffekt auf (Bruno et al. 2001).

### Anti-inflammatorische Therapiemöglichkeiten

Zelladhäsionsmoleküle wie Selektine, Integrine und ICAMs ermöglichen eine Wechselwirkung zwischen Endothel und Entzündungsmediatoren. Anti-Selektin Antikörper oder Anti-ICAM-1 Antikörper wären somit eine Möglichkeit die inflammatorischen Prozesse zu inhibieren. Enlimomab, ein muriner Anti-ICAM-1 Antikörper, zeigte in einer klinischen Studie jedoch eine Verschlechterung in den neurologischen Parametern und eine erhöhte Mortalität der Patienten (Furuya et al. 2001; Schneider et al. 1998). Weitere Antikörper, die inflammatorische Proteine als Target haben, wurden in experimentellen Schlaganfallmodellen getestet. Jedoch gibt es bis heute keine erfolgreiche klinische Studie mit diesen anti-inflammatorischen Substanzen (Woodruff et al. 2011).

### Antioxidantien

Viele Substanzen, die die freie Radikalproduktion oder –aktivierung inhibieren, sind in experimentellen Schlaganfallmodellen effektiv, zeigen jedoch nach einem akuten ischämischen Schlaganfall in klinische Studien nur limitierte Erfolge (Iwashita et al. 2003; Legos et al. 2002; Sydserff et al. 2002; Woodruff et al. 2011; Yu et al. 1998). Der Ginkgo biloba Extrakt EGb 761 (Tanakan®) wurde in einer Studie der Phase III als freier Radikalfänger eingesetzt. Diese Studie wurde erst kürzlich beendet, die Analyse der Daten steht aber noch aus (Woodruff et al. 2011).

## 2.3 Bilobalid — Ein Inhaltsstoff von *Ginkgo biloba*

### 2.3.1 Allgemeines

Kennzeichnend für den *Ginkgo biloba* Baum ist nicht nur, dass er unter den hölzernen Samenpflanzen die älteste Existenz nachweisen kann, sondern auch, dass er heute der einzige Vertreter der Familie der Ginkgoaceae, die während der Jurazeit weit verbreitet war, ist. Charles Darwin bezeichnete ihn daher als lebendes Fossil (DeFeudis 1998; Major 1967). Seine Morphologie hat sich seit der Zeit der Dinosaurier nur wenig verändert (Zhou und Zheng 2003). Der Name *Ginkgo* leitet sich vom japanischen Wort *gin-kyo* ab und bedeutet Silber-Aprikose, was sich auf die unreifen Früchte des Baumes bezieht. Kaempfer hatte 1712 die falsche Schreibweise publiziert, und von Linné hat diese dann 1771 als botanischen Gattungsnamen eingeführt (Mägdefrau 1968). Der Zusatz *biloba* bedeutet zweilappig (lat. *bi*= zweifach und griech. *lobós*= Lappen) und deutet auf die Blattspreite hin (Müller 1992; Zündorf 2009).

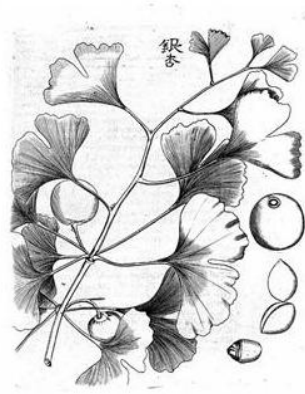
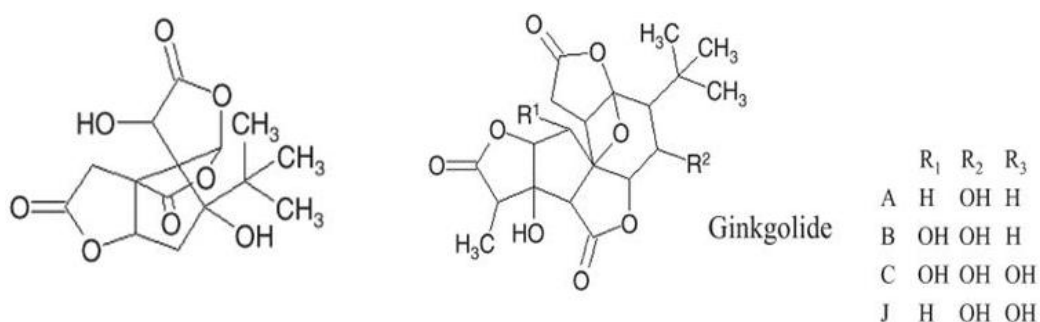


Abbildung 8: *Ginkgo biloba*. Skizze nach Kaempfer 1712.

Die Anwendung von *Ginkgo biloba* in der traditionellen chinesischen Medizin reicht bis ins 16. Jahrhundert zurück (Drieu und Jaggy 2000). Heutzutage werden die Ginkgonüsse in der japanischen und chinesischen Küche jedoch eher gegrillt oder gekocht (Stromgaard und Nakanishi 2004).

Eine ungewöhnliche Eigenschaft des Baumes ist, dass er besonders resistent gegen Insekten, Mikroorganismen und Umweltgifte der modernen Zivilisation, wie Autoabgase oder Streusalz ist (Stromgaard und Nakanishi 2004). Grund hierfür sind die Flavonoide, die als freie Radikalfänger bekannt sind und als so genannte Phytoalexine den Baum vor schädlichen Noxen schützen (Schmid und Schmoll 1994).

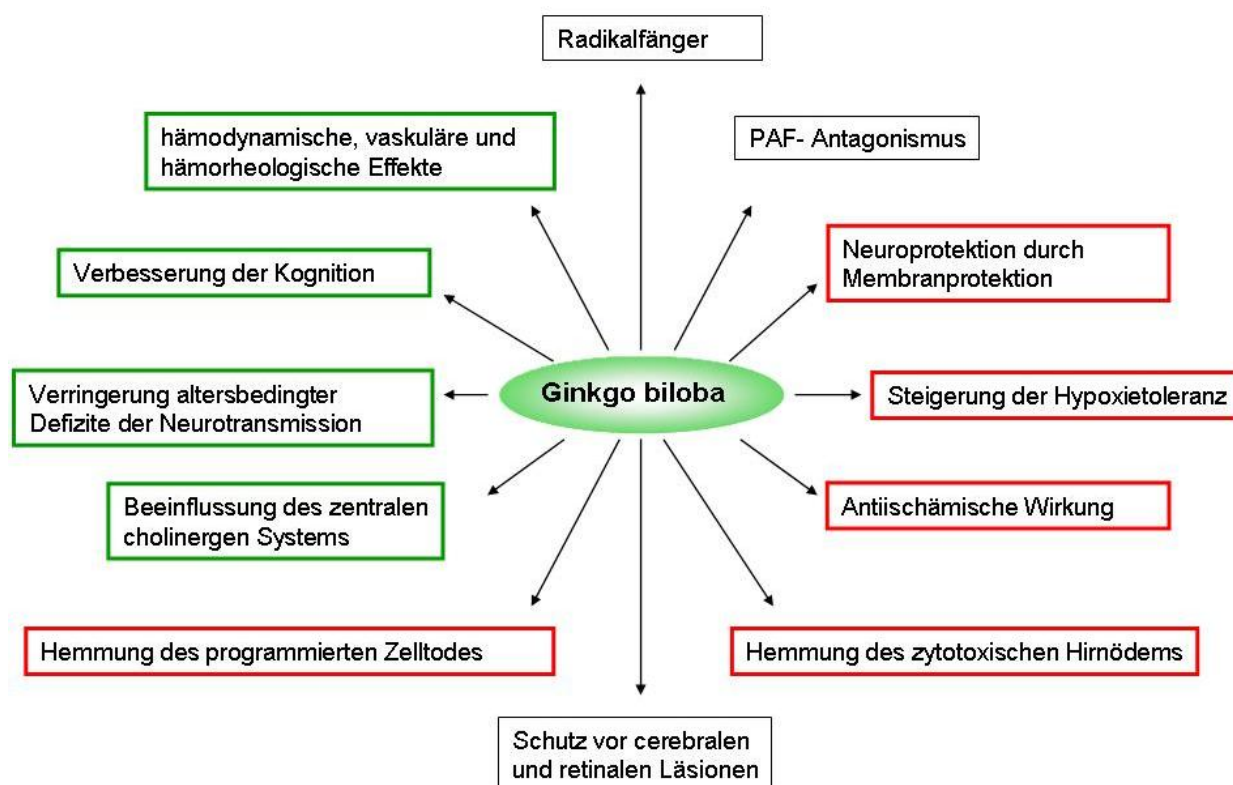
Die Inhaltsstoffe wie die Gruppe der Ginkgolide und Bilobalid sind mit ihren chemischen Strukturen (siehe Abbildung 9) einzigartig in der Natur (Barquet 1988; Barquet 1989; Krieglstein 1995).



**Abbildung 9: Strukturformel der Terpenlaktone.** Links ist Bilobalid und rechts die Gruppe der Ginkgolide dargestellt.

In zahlreichen pharmakologischen Untersuchungen zeigten die Ginkgolide und Bilobalid neuroprotektive Eigenschaften (Barquet 1989; Krieglstein 1995). Die pharmakologische und therapeutische Nutzung der Ginkgoblätter startete 1965 durch die Firma Dr. Willmar Schwabe (Drieu 2000). Eine Kooperation mit der Firma Beaufour-Ipsen führte zur Entwicklung des standardisierten Extraktes EGb 761® (McKenna et al. 2001). Dieser enthält 6 % Terpenlaktone (davon sind 3,1 % Ginkgolide und 2,9 % Bilobalid) und 24 % Flavonoide (Stromgaard und Nakanishi 2004). Der Gehalt an Ginkgolsäuren muss auf Grund ihres potentiell allergenen, zytotoxischen, mutagenen und tumorpromovierenden Potentials gering gehalten werden. Ein Gehalt unter 5 ppm im Extrakt EGb 761 ist als Qualitätsmerkmal anzusehen (Ahlemeyer et al. 2001; Baron-Ruppert und

Luepke 2001; Hecker et al. 2002). Auf dem Markt gibt es mittlerweile unzählige Präparate und der Ginkgo biloba Extrakt ist einer der meist verkauften pflanzlichen Arzneimittelanwendungen weltweit (Stromgaard und Nakanishi 2004). EGb 761 wird hauptsächlich für die wissenschaftliche Untersuchung der pharmakologischen Effekte von Ginkgo biloba benutzt (Kumar und Chatterjee 2008). Zahlreiche Publikationen haben in den letzten Jahren die Wirksamkeit des Extraktes in der Peripherie und im ZNS beschrieben (DeFeudis und Drieu 2000; Luo 2001). Eine Zusammenfassung der oft nur im experimentellen System gezeigten Eigenschaften von EGb 761 ist in der folgenden Abbildung wiedergegeben.



**Abbildung 10: Überblick einiger Effekte des Ginkgo biloba Extraktes.** Nach Müller et al. 1999, grüne Markierung = Demenztherapie, rote Markierung = antiischämische Wirkung.

In Deutschland wird EGb 761 hauptsächlich als Nootropikum zur Therapie Demenz-bedingter Symptome wie Gedächtnisdefizite, Konzentrationsschwäche, Depressionen (siehe auch Abbildung 10 grüne Markierung), sowie bei Schwindel, Tinnitus und Kopfschmerzen eingesetzt (Birks und Grimley 2009; Blumenthal 1998).

Im Folgenden soll auf die Pharmakokinetik und auf einige Wirkungen von Ginkgo biloba und seinen Bestandteilen noch einmal genauer eingegangen werden.



### 2.3.2 Pharmakokinetik und Mutagenität

Generell ist es schwierig eine Aussage über die pharmakokinetischen Eigenschaften von pflanzlichen Extrakten zu machen, da sie eine Vielzahl von möglichen aktiven Komponenten enthalten (Chavez et al. 2006; Shord et al. 2009). Dennoch gibt es zahlreiche Studien zur Pharmakokinetik von EGb 761.

In Ratten ist nach oraler Applikation eines <sup>14</sup>C-markierten Extraktes eine Resorption von 60 % ermittelt worden. Die maximale Plasmakonzentration wurde nach 1,5 Stunden festgestellt und die Halbwertszeit lag bei 4,5 Stunden (Moreau et al. 1986). In einer anderen Studie wurden verschiedene Dosen von EGb 761 an Ratten verfüttert und die Konzentrationen der Ginkgolide und Bilobalid mittels GC/MS-Analytik ausgewertet. Die maximale Plasmakonzentration lag hier in allen drei getesteten Konzentrationen zwischen 0,5 und 1 Stunde und die Halbwertszeit bei 1,7-2,2 Stunden (Biber und Koch 1999). Studien zur Bioverfügbarkeit der EGb 761 Komponenten im Gehirn zeigten, dass sowohl Bilobalid, als auch die Ginkgolide die Blut-Hirn-Schranke überwinden und im Hirnhomogenat detektierbar sind (Rossi et al. 2009; Ude et al. 2011).

In humanen Studien wurde nach oraler Applikation für die Terpenlaktone eine Bioverfügbarkeit von 80 % ermittelt. Maximale Plasmaspiegel lagen nach einmaliger Gabe von 120 mg EGb 761 zwischen 18,8 und 33,3 ng/ml. Die Halbwertszeiten betragen für die Ginkgolide 4,5-10,5 Stunden und für Bilobalid 3,2 Stunden. Die pharmakokinetischen Parameter erwiesen sich als dosis-linear und die Bioverfügbarkeit wurde durch die Nahrungsaufnahme nicht beeinflusst (Biber 2003; Fourtillan et al. 1995).

Eine Studie zur Untersuchung der Effekte der Ginkgolide und Bilobalid auf das Cytochrom P450 System in humanen Lebermikrosomen zeigte keine oder eine sehr schwache Inhibition durch die einzelnen Komponenten (von Moltke et al. 2004).

In Mutagenitätstest wurde kein mutagenes Risiko für EGb 761 festgestellt und in Kanzerogenitätstests ergaben sich keine kanzerogenen Effekte (Spiess und Juretzek 1993).

### **2.3.3 Therapeutisches Potential von EGb 761 und Bilobalid**

#### **2.3.3.1 Ischämie**

Wie bereits in Kapitel 2.1 erwähnt, kommt es während einer Ischämie zu zahlreichen pathophysiologischen Veränderungen. Für den Ginkgo biloba Extrakt und auch für die verschiedenen Terpenlaktone sind in zahlreichen Studien neuroprotektive Eigenschaften beschrieben worden (Defeudis 2002). Im neuronalen Zellkulturmodell schützten EGb 761 und Bilobalid dosisabhängig vor einem ischämischen Schaden und Glutamat-induzierter Exzitotoxizität (Chandrasekaran et al. 2002; Chandrasekaran et al. 2003; Krieglstein 1995), durch Staurosporin oder Serumentzug induzierter Apoptose (Ahlemeyer et al. 1999; Shi et al. 2010a) und oxidativem Stress (Zhou und Zhu 2000).

In Wüstenrennmäusen zeigte eine Vorbehandlung mit dem Extrakt EGb 761 (einmalig 100 mg/kg p.o. oder 10 mg/kg i.p. für 7 Tage) nach halbseitiger globaler Ischämie der rechten Hirnhemisphäre ein geringeres Ausmaß neurologischer Störungen und eine schwächere Hirnödementwicklung. Auch wurde in dieser Studie eine protektive Wirkung auf die Mitochondrienfunktion festgestellt (Spinnewyn et al. 1986). In Ratten wirkte der Extrakt (30-100 mg/kg p.o.) und auch Bilobalid (5-10 mg/kg p.o.) protektiv gegenüber zytotoxischen Hirnödemen, die durch Triethylzinn oder Bromethalin ausgelöst wurden (Dorman et al. 1992; Otani et al. 1986).

Im Modell der fokalen cerebralen Ischämie der Maus reduzierte eine Gabe von 5-20 mg/kg Bilobalid die Infarktgröße und bei der Ratte wurde die Infarktgröße durch die Applikation von 10 mg/kg Bilobalid s.c 60 Minuten vor der Ischämie oder unmittelbar nach der Ischämie ebenfalls reduziert (Krieglstein 1995; Mdzinarishvili et al. 2007).

### 2.3.3.2 Morbus Alzheimer

#### Allgemeines:

Wesentliche pathophysiologische Merkmale einer Alzheimerdemenz sind das Ausbilden von aus  $\beta$ -Amyloid bestehenden Plaques (extrazellulär), die Akkumulation von hyperphosphoryliertem Tau-Protein in Neurofibrillenbündeln (intrazellulär) und der synaptische und neuronale Funktionsverlust in bestimmten Hirnarealen (Gotz und Ittner 2008; Lee et al. 2001). Vorstufen der Plaques sind Oligomere, die zusammen mit den oben genannten pathophysiologischen Veränderungen zu einer mitochondrialen Dysfunktion führen (Ahmed et al. 2010). Gekennzeichnet ist diese durch eine Reduktion der Aktivität in den Atmungskettenkomplexen, was als Folge ein verringertes mitochondriales Membranpotential, reduzierte ATP-Spiegel und eine erhöhte Produktion von ROS hat (Müller et al. 2009). Final kommt es folglich zu einer Zerstörung der neuronalen Membran und zu einem massiven Zelluntergang in verschiedenen Hirnarealen (Baloyannis 2009; Hauptmann et al. 2009).

#### Einfluss von EGb 761 auf die Demenzerkrankung:

Erste Hinweise, dass EGb 761 die mitochondriale Funktion verbessert, wurde an isolierten Mitochondrien der Rattenleber gezeigt (Janssens et al. 1995; Janssens et al. 1999). Bestätigt wurde dieses Erkenntnis durch Untersuchungen an Rattenhirnen (Sastre et al. 2002). Sowohl der Extrakt, als auch die einzelnen Komponenten verbesserten die mitochondriale Funktion nach nitrosativem Stress (Abdel-Kader et al. 2007; Eckert et al. 2005). Die Ginkgolide und Bilobalid zeigten in der Untersuchung von Abdel-Kader et al. einen stärkeren Effekt als die Flavonoide, allerdings gab es auch innerhalb der Ginkgolide deutliche Unterschiede. Im zellulären Modell konnte gezeigt werden, dass auch die mitochondriale Dysfunktion, bzw. der programmierte Zelltod durch die Terpenlaktone reduziert werden kann (Bastianetto et al. 2000a). Als alternativer oder additiver Mechanismus wird ein Zusammenspiel mit Chloridkanälen beschrieben (Chatterjee et al. 2003; Klein et al. 2003).

Klinischen Studien zeigten recht unterschiedliche Daten über den Nutzen von EGb bei einer Demenzerkrankung. Bei einer Cochrane Metaanalyse konnte keine Evidenz gefunden werden, dass Ginkgo biloba bei einer Demenz effektiv ist (Birks und Grimley 2009).

Eine Metaanalyse des IQWiQ belegte dagegen die Effektivität von EGb 761 bei einer Demenzerkrankung (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen 2007). Die Differenzen der einzelnen Studien sind durch die unterschiedlichen Einschlusskriterien, Dosierungen und Studienmodelle zu erklären. 11 weitere Studien belegen die Wirksamkeit von EGb 761 in Bezug auf kognitive Leistungen, Alltagsaktivität und Lebensqualität. Eine Effektivität von Ginkgo biloba bei einer Demenzerkrankung kann daher als weitgehend gesichert angesehen werden (Kasper et al. 2009).

### **2.3.3.3 Antagonismus des Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)**

#### Allgemeines:

PAF ist ein Alkylphospholipid und wird in zahlreichen Zellen des Körpers gebildet. Durch die Aktivierung seines Rezeptors wird über die Phospholipase C, die Phospholipase A<sub>2</sub> und die Phospholipase D der Umsatz an Polyphosphoinositiden stimuliert. Inositoltriphosphat wird generiert und bewirkt eine Mobilisierung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> (MacLennan et al. 2002). Dadurch bewirkt PAF u.a. Thrombozytenaggregation, erhöhte Gefäßpermeabilität, Vasokonstriktion, intrazelluläre K<sup>+</sup>-Ionen-Akkumulation, Ödembildung und Leukozytenaktivierung. Eine Beteiligung von PAF an postischämischen Schäden ist daher naheliegend (Müller 1999).

#### PAF-Antagonismus durch Ginkgolide:

Ginkgolide zeigten in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen eine Inhibition von PAF, wobei sich das Ginkgolid B als wirksamste PAF-inhibierende Komponente herausstellte (Panetta et al. 1987; Spinnewyn et al. 1987; Yue et al. 1991). In klinischen Studien konnte eine PAF-induzierte Plättchenaggregation mit Ginkgolid B als Reinsubstanz oder in Kombination mit anderen Ginkgoliden reduziert werden (Chung et al. 1987; Koch 2005; Nunez et al. 1986).

#### 2.3.3.4 Radikalfänger

Der Extrakt EGb 761 besitzt mehrere antioxidative Inhaltsstoffe, die vor oxidativem Stress schützen. Der antioxidative Effekt wird vermutlich über direkte Minderung an ROS im Gewebe (DeFeudis und Drieu 2000; Smith und Luo 2003), Chelatbildung mit prooxidativen Metallionen, Bildung von antioxidativen Proteinen, wie der Superoxiddismutase und Erhöhung antioxidativer Metabolite, wie Glutathion (Gohil und Packer 2002) erzielt. EGb 761 unterdrückt u.a. die Bildung von NO *in vitro* und inhibiert direkt die Stickstoffmonoxid-Synthetase (Bastianetto et al. 2000b; Kobuchi et al. 1997; Marcocci et al. 1994). Bei der Detoxifizierung von Hydroxylradikalen hat die Flavonoidfraktion des Extraktes eine stärkere Wirkung als die Terpenlaktone (Bastianetto et al. 2000a; Ni et al. 1996; Zimmermann et al. 2002)

#### 2.3.4 Wirkmechanismus von Bilobalid

Bilobalid zeigte *in vitro* und *in vivo* neuroprotektive Effekte, wobei der Wirkmechanismus der Substanz noch nicht geklärt ist. Mögliche protektive Eigenschaften sind die Erhaltung der mitochondrialen ATP-Synthese durch den Schutz der Komplexe I und III (Janssens et al. 2000; Kapitel 2.3.3.1) und antiapoptotische Effekte (Ahlemeyer und Krieglstein 2003; DeFeudis, 2002; Kapitel 2.3.3.1). Auch gibt es Studien über die Interferenz von Bilobalid mit der glutamatergen und GABAergen Neurotransmission. In *in vivo* und *in vitro* Versuchen zeigte Bilobalid einen inhibitorischen Effekt auf den glutamatergen exzitotoxischen Membranuntergang. Eine Eigenschaft, die man sich bei der Behandlung der Hypoxie im Gehirn und/ oder bei der neuronalen Hyperaktivität zu Nutze machen könnte (Weichel 1999).

Elektrophysiologische Versuche an Hippocampuschnitten der Ratte zeigten eine schwache Hemmung der NMDA-gesteuerten Ströme um ca. 20 % (Chatterjee et al. 2003). Weitere Studien belegen eine Erhöhung der GABA Konzentration durch eine Verbesserung der Aktivität der Glutaminsäuredecarboxylase durch Bilobalid (Sasaki et al. 1999; Sasaki et al. 2000).

Gleichzeitig konnte auch gezeigt werden, dass Bilobalid (2 und 5 mg/kg i.p.) die durch Barbiturate induzierte Schlafzeit in Mäusen verkürzt, was eine Interaktion von Bilobalid mit GABA-regulierten Chloridkanälen nahe legt (Brochet et al. 1999). Zusätzlich weist Bilobalid auch strukturelle Ähnlichkeiten mit dem GABA<sub>A</sub> Chloridkanalblocker Picrotoxin auf (Chatterjee et al. 2003; Hawthorne und Lynch 2005). Mit Patch-Clamp-Untersuchungen in embryonalen Cortexschnitten wurde Bilobalid als ein nicht-kompetitiver Antagonist an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Ivic et al. 2003) und an rekombinanten GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub> Rezeptoren identifiziert (Huang et al. 2006).

In *ex vivo* Experimenten inhibierte Bilobalid in den Konzentrationen von 2-20 mg/kg p.o. eine Stunde vor der hippocampalen Hirnschnittpräparation, eine durch Hypoxie induzierte Cholinfreisetzung. Ein halb-maximaler Effekt wurde für die Dosis 6 mg/kg festgestellt und ein ähnlicher Effekt wurde bei einer Gabe von 200 mg/kg p.o. des Extraktes EGb 761 beobachtet (Klein et al. 1997). Ebenfalls in Hippocampusschnitten schützte Bilobalid mit einem IC<sub>50</sub> = 2,3 µM vor einer NMDA-induzierten Cholinfreisetzung. Dieser Effekt erwies sich dabei als direkt proportional von der extrazellulären Chloridkonzentration (Klein et al. 2003). Darüber hinaus wirkte die Zugabe von GABA und Glycin der protektiven Wirkung von Bilobalid entgegen (Kiewert et al. 2007; Kiewert et al. 2008).

Ein aktueller Überblick über die Wirkmechanismen von Bilobalid in Bezug auf eine Neuroprotektion nach einer Ischämie sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3: Überblick der neuroprotektiven Wirkmechanismen von Bilobalid nach einer Ischämie.**

<b>Glycin<sub>A</sub> Rezeptor</b>	<b>+</b>	Ivic et al. 2003
<b>Glycin<sub>B</sub> Rezeptor</b>	<b>-</b>	Kiewert et al. 2008
<b>GABA<sub>A</sub> Rezeptor</b>	dosisabhängige Inhibition des Cl <sup>-</sup> -Inluxes	Kiewert et al. 2007
	Antagonist	Ivic et al. 2003
	nicht-kompetitiver Antagonist	Huang et al. 2006
<b>GABA<sub>C</sub> Rezeptor</b>	Antagonist	Huang et al. 2006
<b>Akt Pathway</b>	<b>+</b>	Shi et al. 2010a
<b>Mitochondrien Komplex I und III</b>	<b>+</b>	Janssens et al. 2000

### 3 ZIELSETZUNG

Unter der Annahme, dass die Glutamat-induzierte Exzitotoxizität eine erhebliche Bedeutung bei der Entstehung von Hirnläsionen nach einem Schlaganfall zukommt, ist es wichtig, Substanzen zu finden, die die Glutamatspiegel senken. Bisherige potentielle Neuroprotektiva erwiesen sich im experimentellen Schlaganfallmodell als effektiv, erzielten in klinischen Studien aber keinen Nutzen.

Das Ziel im ersten Teil dieser Arbeit war, die Veränderungen auf Grund eines fokalen cerebralen Schlaganfalls im Gehirn der Maus zu charakterisieren. Neben dem Infarkt volumen sollte hierbei vor allem der cerebrale Metabolismus im Vordergrund stehen. Zusätzlich sollte die Auswirkung eines Schlaganfalls auf Motorik und Koordination der Tiere beobachtet werden. Im Verlauf der Arbeit sollten außerdem weitere methodische Fragestellungen, wie der Einfluss einer Ischämie auf die Blutgaswerte, überprüft werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte *in vivo* die Wirkung von Bilobalid als Neuroprotektivum bei einer cerebralen Ischämie untersucht werden. Der Einfluss auf das Infarkt volumen und die metabolischen Veränderungen im Gehirn sollte mit verschiedenen Bilobalidkonzentrationen überprüft werden. Anschließend sollte das Applikationszeitfenster von Bilobalid erweitert und ebenfalls die Wirkung auf das Infarkt volumen analysiert werden. Das Verhalten der Bilobalid-behandelten gegenüber den unbehandelten Tieren nach einem Infarkt sollte in verschiedenen neurologischen Tests bewertet werden. Zusätzlich sollte die Pharmakokinetik von Bilobalid im gesunden und ischämischen Gehirn der Maus untersucht werden.

Abschließende Untersuchungen sollten zeigen, durch welchen Mechanismus Bilobalid eine mögliche Protektion vor einer Glutamat-induzierten Exzitotoxizität und Ischämie-bedingten Läsionen vermitteln könnte. Im Vordergrund sollten hierbei vor allem Enzyme stehen, die an der Regulation der Glutamatspiegel im Gehirn eine Rolle spielen.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte und Software

Anästhesieeinheit	Kent Scientific Corporation, Toorington, CT, USA Univentor 400 Anaesthesia Unit, TSE, Bad Homburg
Blutgasanalysator CMA 600	Nova Biomedical GmbH, Rödermark Axel Semrau, Sprockhövel
DC-Kammer	Carl Roth, Karlsruhe
Elektrokoagulator	Bovie Aaron Medical, Vertrieb Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Fraktionssammler	BIO-RAD Model 2110, Fraktionssammler, Hercules, CA, USA
Fused Silica	Polymicro Technologies, Vertrieb Optronis, Kehl
Gewebeschnneider	Mcllwain, Redding, CA, USA
Graph Pad Prism®	Graph Pad; La Jolla, CA, USA
Heizpad mit Rektalsonde	Harvard Instrument, Vertrieb Hugo Sachs, March- Hugstetten
Heizplatte mit Rührer	IKA Combimag RCT, Staufen
Kaltlichtbeleuchtung PL 2000	Optech, Vertrieb Carl Roth, Karlsruhe
Laser Doppler	Moor Instruments, Devon, UK
Massenspektrometer	MicrOTOF-QII, Bruker Daltronik, Bremen
Mausadapter	Spezialanfertigung von Reinhold Stutz, Institut für Pharmakologie, Werkstatt, Mainz
Mikrometerskalierung	Pyser- SGI Limited, Edenbridge, Kent, UK
Milliporeanlage	Millipore, Schwalbach
Peristaltikpumpe	Desaga Schlauchpumpe 101900, Heidelberg
pH-Elektrode	WTW Inolab, VWR, Darmstadt
pH-Meter	Mettler Toledo, VWR, Darmstadt
Pipetten	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe	Hartenstein, Würzburg
Plastikkäfig	Torquato AG, Geesthacht
Potter S	B. Braun, Vertrieb neolab
Potterzubehör	B. Braun, Vertrieb neolab



---

Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg Hartenstein, Würzburg Carl Roth, Karlsruhe
Präzisionsspritze 1 ml	Hamilton Gastight® Syringes, Hamilton Company, NV, USA
Präzisionsspritzenpumpe	Havard Apparatus Syringe Infusionspumpe Harvard Instrument, Vertrieb Hugo Sachs, March- Hugstetten World Precision Instruments, Vertrieb Harry Fein, Berlin KDSscientific, Vertrieb novodirect, Kehl
Szintillations-Counter	Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter
Rotarod	Havard Instruments, Vertrieb Hugo Sachs, March- Hugstetten
Rührer	IKA big- squid, Staufen
Schüttler	IKA-Vibrax-VXR electronic, Staufen
Sprühfinger	Carl Roth, Karlsruhe
Stahlbohrer (RF 104018)	Firma Hager & Meisinger
Stereomikroskop Omano (OM99-V15)	Vertrieb The Microscope Store, Wirtz, VA, USA
Stereotakt	Stoelting, Chicago, IL, USA
Ultra-Turraxstab	Janke& Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
Vortexer	IKA MS2 Minishaker, Staufen Labdancer, Vertrieb novodirect, Kehl Labline Instruments, Supermixer, Melrose Park, Illinois, USA Vortex- Genie 2™ Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waagen	Denver Instrument SI- 2002 Mettler AT 261 Delta Range, Gießen
Wasserbad bis 150°C	B. Braun Thermomix 1441, Melsungen
Wasserbad mit Ultraschall	Elma S 30 H elmasonic, Vertrieb Roth, Karlsruhe
Xenox Motorhandstück MHX (E)	Proxxon, Vertrieb Carl Roth, Karlsruhe
Zentrifuge	Sigma 1-14 Mikrozentrifuge, Vertrieb novodirect, Kehl Heraeus Sepatech Biofuge 13, Thermo Fisher

#### 4.1.2 Hilfsmaterialien

Alkoholtupfer	B. Braun, Melsungen
Augensalbe Bepanthen	Bayer Vital, Leverkusen
Calibrator CMA 600	Axel Semrau, Sprockhövel
Cyanacrylatkleber	UHU alles Sekundenkleber, Bühl
Dental Zement	Ivoclar Vivadent, Multilink Automix, Schaan, Liechtenstein
Dialyseschlauch	Visking®, Carl Roth, Karlsruhe
Einmalpipetten, unsteril	Hartenstein, Würzburg
Einwegmischpipetten	Hartenstein, Würzburg
Einwegspritzen	Omnifix-F 1 ml, B. Braun, Melsungen
Eppendorfgefäße	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filament 5.0	Harvard Instruments, Vertrieb Hugo Sachs
Filament 6.0	Doccol Corporation, Redlands, CA, USA
Glaskapillaren 100 x 0,9 mm	Nova Biomedical GmbH, Rödermark
Guillotine groß	Harvard Instruments, Vertrieb Hugo Sachs, March-Hugstetten
Hospal Dialysemembran AN69 HF	Hospal Industrie, Meyzieu, Frankreich
Kanülen	Sterican grau 27G x $\frac{3}{4}$ ", B. Braun, Melsungen, Terumo Neolus 27G, Henry Schein
Klemmen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kompresse unsteril	Sovaline, Lohmann & Rauscher
Kreppband	Tesa AG, Hamburg
Lanzette	Goldenrod, 4mm point length, Medipoint Inc., Mineola, NY, USA
Metallhülsen	Sterican orange 25G x $1\frac{1}{2}$ ", B. Braun, Melsungen
Miniatürkühlfäschchen	Zinsser Analytic, Frankfurt
PE-Schläuche:	
(0,28mm ID, 0,61mm AD)	Hartenstein, Würzburg
(0,38mm ID, 0,91mm Wall Tygon)	VWR, Darmstadt
(0,76mm ID, 0,86mm Wall Tygon)	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
(ID min. 2mm)	Hartenstein, Würzburg
Primer	Ivoclar Vivadent, Multilink Automix, Schaan, Liechtenstein
Reagenzien CMA 600	Axel Semrau, Sprockhövel
Ringerlaktat-Lösung nach Hartmann	Apotheke

Rinsing Fluid	Axel Semrau, Sprockhövel
Seidenfaden 6.0	Fine Science Tools, Heidelberg
Sekundenkleber mit Aktivator	Pattex, Henkel, Düsseldorf
Silikonkleber	IBF Chemotechnik Elektronik, IBF-Ferotherm 5-n
Skalpell	Carl Roth, Karlsruhe
Skalpellklingen	Carl Roth, Karlsruhe
Wägeschalen	Hartenstein, Würzburg; Carl Roth, Karlsruhe
Wattestäbchen	ebelin, dm- Markt, Karlsruhe; Lacura, aldi-Süd, Mülheim an der Ruhr

### 4.1.3 Chemikalien

Ameisensäure 98-100%	Merck, Darmstadt
Bilobalid	Dr. Willmar Schwabe, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
$\text{CoCl}_2$	Sigma Aldrich, Steinheim
DMSO	Merck, Darmstadt
DON	Sigma Aldrich, Steinheim
Egb 761	Dr. Willmar Schwabe, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Glukose	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutaminsäure $\times \text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, Steinheim
Lumasafe Plus	Perkin Elmer, Rodgau
Methanol gradient grade LiChrosolv	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Na-Citrat Dihydrat	Sigma Aldrich, Steinheim
$\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, Steinheim
Na-L-Laktat	Sigma Aldrich, Steinheim
N-Acetyl-L-aspartat	Fluka, Steinheim
N-Acetyl-L-aspartat-glutamat- $^3\text{H}$	Perkin Elmer, Rodgau

NaCl	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Ninhydrin	Merck, Darmstadt
PMPA	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eiching
Tris	Merck, Darmstadt
TTC	Sigma Aldrich, Steinheim

#### 4.1.4 Verwendete Puffer und Lösungen

##### 4.1.4.1 Mikrodialyse

aCSF	147 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	1,2 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
	1,2 mM CaCl <sub>2</sub> X 2 H <sub>2</sub> O

##### 4.1.4.2 Färbungen

PBS	pH 7,5	137 mM NaCl
		2,7 mM KCl
		6,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		0,9 mM CaCl <sub>2</sub>
		0,9 mM MgCl <sub>2</sub>

##### 4.1.4.3 Mobile Phase

Methanol : Ameisensäure : Chloroform  
30 : 5 : 65

#### 4.1.5 Bilobalid

Die Substanz Bilobalid wurde mit einer Reinheit von 99 % für die vorliegende Arbeit von der Firma Dr. Willmar Schwabe aus Karlsruhe zur Verfügung gestellt. Verwendet wurden zwei Chargen: R6/26.09.07 und SR04-125-A.

Für die *in vitro* Versuche wurde Bilobalid in DMSO gelöst. Kontrolllösungen enthielten die gleiche Menge an DMSO (0,1 %). Für die systemische Applikation (i.p.) wurde Bilobalid in 10 % DMSO/PBS gelöst und Kontrollen erhielten eine entsprechende Menge Vehikel.

#### 4.1.6 Tiere

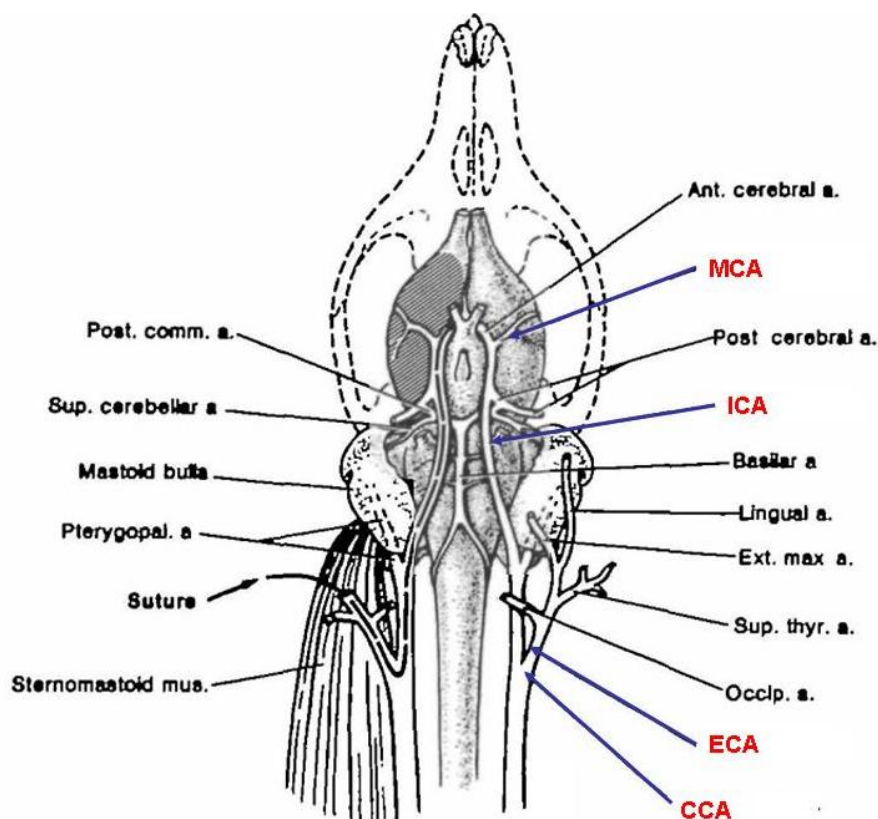
Weibliche CD-1 Mäuse wurden im Alter von 6-8 Wochen bei der Firma Charles River, Sulzfeld gekauft und in den Räumen des Pharmakologischen Instituts für Naturwissenschaftler im Tierstall des Campus Riedberg gehalten. Die Bedingungen für diese Räume entsprachen einer offenen Tierhaltung, mit einem 12 h Tag-/ Nacht-Rhythmus, einer Raumtemperatur  $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-70 %. Um die Tiere an die menschliche Stimme zu gewöhnen, lief in den Räumen ein Radio in geringer Lautstärke. Die routinemäßige Pflege der Tiere erfolgte durch die Tierpflegerin des Pharmakologischen Instituts für Naturwissenschaftler. Einen Tag vor den Versuchen wurde die dafür benötigte Anzahl der Tiere in das Versuchstierlabor des AK Kleins gebracht, um sich an die neue Umgebung und die speziellen Käfige zu gewöhnen. Die Haltung und alle durchgeführten Tierversuche (Genehmigungsnummern F8/17 und F8/13) erfolgten nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Verschluss der Arteria cerebri media (MCAO; middle cerebral artery occlusion)

#### 4.2.1.1 Prinzip

Durch die Okklusion der Arteria cerebri media (MCA) wird im Tier versucht, einen humanen ischämischen Schlaganfall nachzuahmen. Hierbei gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten die Arterie zu verschließen. Bei der distalen MCAO, auch Craniotomie genannt, wird die Arterie direkt an ihrem Ursprung verschlossen, wogegen im proximalen Modell die Blutversorgung der MCA, von der Arteria carotis communis (CCA) kommend, mit einem Faden unterbrochen wird (Abbildung 11). Beide Modelle bieten die Möglichkeit einer permanenten oder transienten Okklusion. In den anschließenden Experimenten wurde die MCA, wie in Kapitel 4.2.1.2. erklärt, proximal verschlossen.

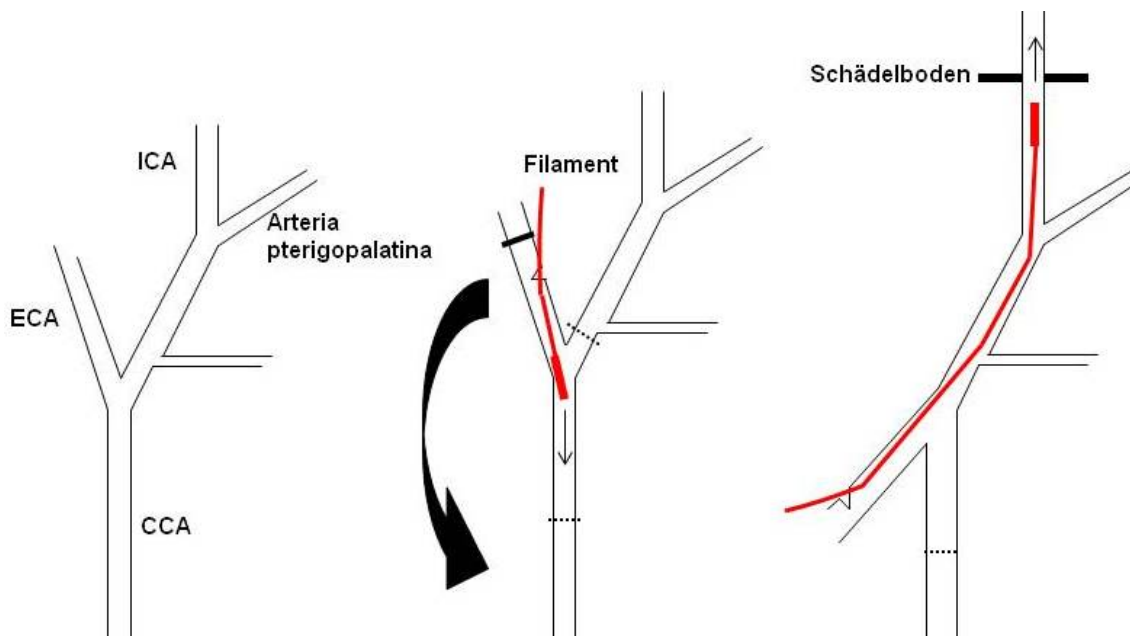


**Abbildung 11: Darstellung der cerebralen Anatomie und des Circulus willisii der Ratte.** Die Arteria carotis communis (CCA), die Arteria cerebri externa (ECA) und die Arteria cerebri interna (ICA) sind mit ihren Verzweigungen abgebildet, sowie die Arteria cerebri media (MCA). Nach Longa et al. 1989.

#### 4.2.1.2 Durchführung MCAO

Die CD-1 Mäuse werden mit einer Initialdosis von 4 % und einer Erhaltungsdosis von 1-1,5 % Isofluran in einem N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> (70/30 %) Gas-Gemisch narkotisiert. Die Körpertemperatur wird mit Hilfe eines Heizpads und einer Rektalsonde während der Operation bei 37°C ± 0,5°C gehalten. Um den lokalen cerebralen Blutfluss zu messen, wird der Schädelknochen freipräpariert und von Bregma (Abbildung 18) aus 3 mm lateral und 1 mm posterior eine Markierung gesetzt. An dieser Stelle wird der mit dem Laser Doppler ermittelte Blutfluss als Basalwert genommen. In Höhe des Kehlkopfes wird das Fell mit Alkohol desinfiziert und ein medialer Einschnitt gemacht. Der darunter liegende Muskel wird stumpf auseinander gezogen, die CCA vorsichtig freipräpariert und mit einem temporären Faden abgebunden (Abbildung 12). Anschließend wird die Bifurkation zwischen ECA und ICA freigelegt, die von der ECA abgehende A. thyroidea superior koaguliert und die ECA mit einem permanenten Faden abgebunden. Die ICA wird durch einen transienten Faden ebenfalls verschlossen. Der Blutfluss in den Arterien ist nun unterbrochen und die ECA kann vorsichtig angeschnitten werden, ohne dass starke Blutungen auftreten. Das Filament wird in die ECA eingeführt und mit einem Faden fixiert. Die ECA wird durchtrennt und nach unten geklappt. Der transiente Faden an der ICA wird gelöst, so dass das Filament jetzt in die ICA eingeführt und 0,9-1,1 cm weit zum Ursprung der MCA hochgeschoben werden kann. Mit dem Laser Doppler wird erneut der Blutfluss gemessen, dieser sollte jetzt bei 10-20 % vom Basalwert liegen; ist dies nicht der Fall, wird die Position des Filaments korrigiert und erneut überprüft. Anschließend wird die Wunde verschlossen und 1 ml 37°C Ringerlaktat-Lösung i.p. appliziert. Danach wird die Maus in ihren Käfig zurück gebracht. Bei Anzeichen starker Schmerzen kann gegebenenfalls Buprenorphin (0,1 mg/kg s.c.) direkt und 6 Stunden nach der Operation i.p. appliziert werden.

Bei der transienten MCAO wird die MCA für 90 min verschlossen und das Filament anschließend wieder komplett entfernt, so dass eine Reperfusion ermöglicht wird. Die Mäuse sind innerhalb dieser 90 Minuten wach und befinden sich in ihrem Käfig mit Futter und Wasser ad libitum.



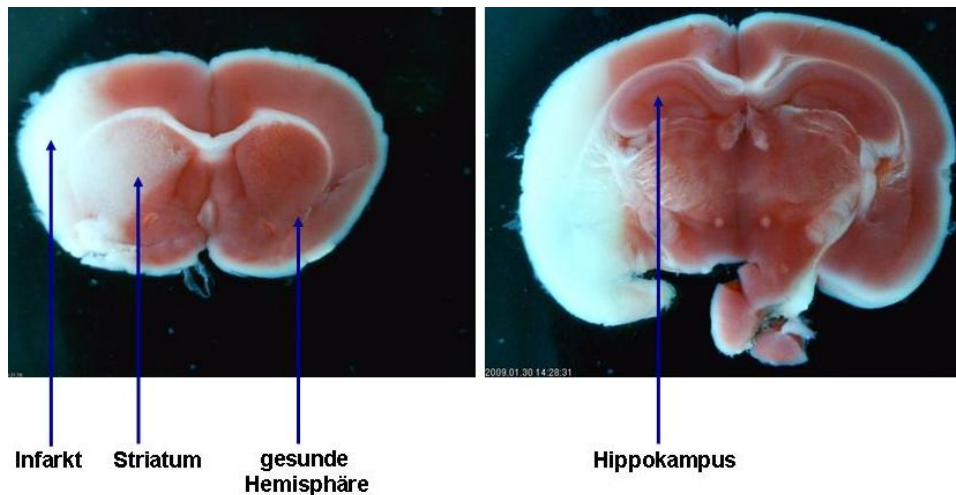
**Abbildung 12: schematische Darstellung des Fadenmodells.** CCA, Arteria carotis communis; ECA, Arteria cerebri externa; ICA, Arteria cerebri interna.— permanente, ... transiente Ligatur

#### 4.2.1.3 Auswertung der Schlaganfallfläche mittels TTC-Färbung

2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) ist ein Redoxfarbstoff mit einer quartären Ammoniumverbindung. Das wasserlösliche farblose TTC wird unter Aufnahme von zwei Elektronen und einem Proton zum wasserunlöslichen roten Farbstoff 1,3,5-Triphenylformazan reduziert. In Mitochondrien wird das Tetrazolium-Kation von Dehydrogenasen der Atmungskette (vornehmlich vom Komplex I) zu Formazan reduziert (Altman 1976; Ogur et al. 1957; Rich et al. 2001). Nach einer Ischämie sterben Mitochondrien ab; der Farbstoff wird folglich nicht reduziert und das Infarktgebiet erscheint weiß.

24 Stunden nach der Schlaganfallinduktion werden die Mäuse kurz mit Isofluran narkotisiert, der Blutfluss mittels Laser Doppler nochmals ermittelt und die Maus anschließend dekapitiert. Das Gehirn wird entnommen und mit einem Gewebeschnaider in 1 mm dicke Schnitte geschnitten. Diese werden mit der TTC-Lösung für 10 min in ein Wasserbad bei 37°C gestellt. Um die Farbreaktion zu stoppen, werden die Schnitte anschließend in PBS-Puffer überführt und von jedem Schnitt ein Bild mit Hilfe der Dino-Lite Kamera gemacht (siehe Abbildung 13).



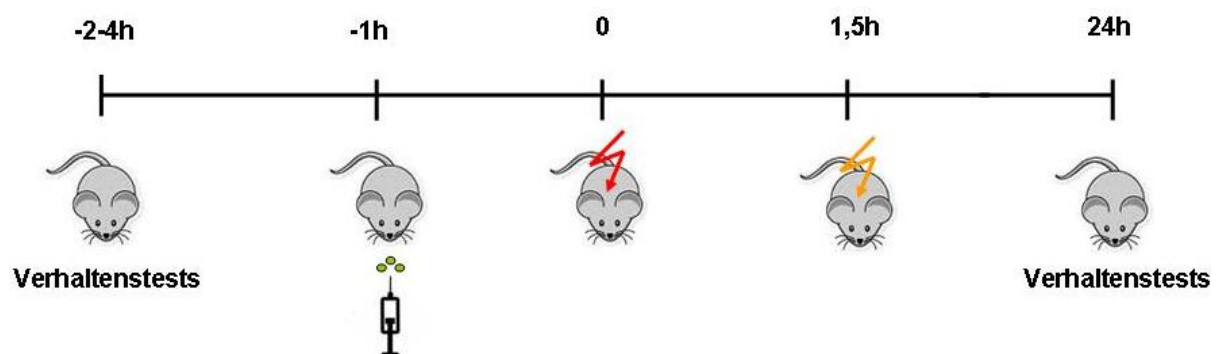


**Abbildung 13:** Fotos der Hirnschnitte mit Striatum (links) und Hippokampus (rechts) angefärbt mit TTC 24 Stunden nach der MCAO. Der ischämische Bereich ist weiß dargestellt, die gesunden Bereiche rot.

Von jedem Schnitt wird die Fläche beider Hemisphären und des Infarktgebietes mit Image J berechnet und die daraus ermittelte Schlaganfallfläche in Prozent angegeben (Elliott und Jasper 1949; Kinouchi et al. 1991; Sydserff et al. 1996).

#### 4.2.2 Verhaltenstests

Alle Verhaltenstests wurden am Tag der Operation und einen Tag nach dem Schlaganfalleingriff durchgeführt (siehe Abbildung 14). Der Rotarod-, sowie der Chimney-Test wurde jeweils mit drei Wiederholungen durchgeführt; der Corner Test nur einfach.



**Abbildung 14:** Skizze des Zeitplans für einen Schlaganfall in Kombination mit Verhaltenstests. Eine Stunde vor dem Schlaganfalleingriff wird Bilobalid 10 mg/kg oder Kontrolllösung gespritzt. Der rote Blitz stellt den Schlaganfall da, der orangefarbene den Zeitpunkt der teilweise durchgeführten Reperfusion.

#### 4.2.2.1 Corner-Test

Prinzip:

Der Corner Test wurde ursprünglich von Schallert et al. (1982) für Ratten entwickelt und von Zhang et al. (2002) für Mäuse übernommen. Er eignet sich um sensomotorische und posturale Asymmetrien zu erfassen.

Durchführung:

Die Apparatur hat auf jeder Seite einen 30° Winkel. Die Maus wird vor einen Winkel gesetzt und läuft darauf zu. Wenn die Maus den Keil der Ecke erreicht, werden beide Körperseiten simultan erregt (Abbildung 15 A und B). Dies äußert sich besonders durch die Vibrissenbewegungen. Eine gesunde Maus dreht sich mit einer 50:50 Chance entweder rechts- oder linksherum aus der Ecke heraus, eine Schlaganfall-Maus jedoch vermehrt zur ipsilateralen Seite. Jede Maus wird für maximal 120 s im Corner-Test gelassen und die Anzahl der Drehungen pro Seite gezählt (Abbildung 15 C und D). Bewegt sich die Maus ohne Aufrichten aus der Ecke heraus, wird dies nicht als Drehung gewertet.

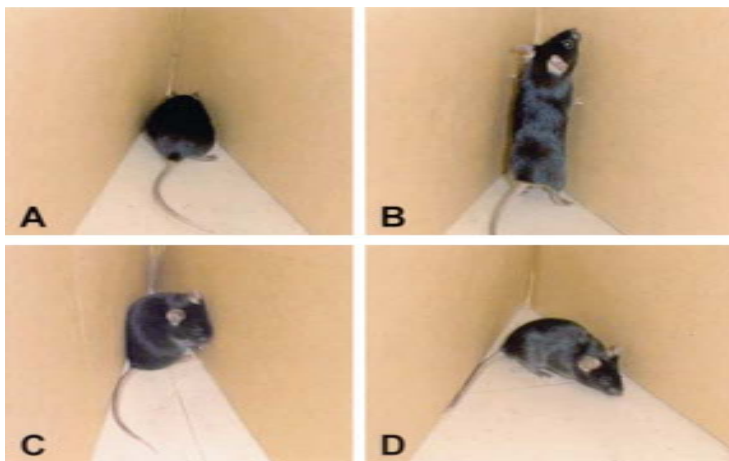


Abbildung 15: Darstellung des Corner-Tests. Zhang et al. 2002.

Auswertung:

Der Laterali tätsindex (LI) wird wie folgt berechnet (Bouet et al. 2007):

$$LI = \frac{\text{Anzahl Drehungen links} - \text{Anzahl Drehungen rechts}}{\text{Anzahl Drehungen total}}$$

Der normalisierte Lateralitätsindex (nLI) lässt sich dann daraus berechnen:

$$nLI = \frac{LI_{\text{nach Stroke}} + 2}{LI_{\text{vor Stroke}} + 2}$$

Ein Wert von:

0 = mehr Drehungen zur contralateralen Seite

1 = kein verändertes Verhalten

2 = mehr Drehungen zur ipsilateralen Seite

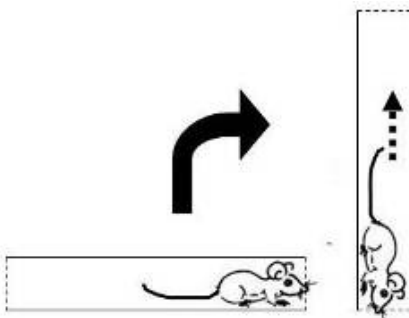
#### 4.2.2.2 Chimney-Test

Prinzip:

Der Chimney-Test (Heinecke 1987) eignet sich, um die motorische Koordination der Maus zu überprüfen. Hierfür lässt man die Maus in eine 20 cm lange Röhre laufen. Sobald sie am anderen Ende erscheint, wird die Röhre senkrecht hingestellt, so dass die Maus rückwärts herausklettern muss.

Durchführung:

Die Maus wird kopfvoraus vor eine 20 cm lange und 2 cm breite Röhre gesetzt. Wenn die Maus das andere Ende der Röhre erreicht, wird diese in die vertikale Position gestellt (Abbildung 16). Die Zeit, die sie braucht, um hinaus zu klettern, wird erfasst.



**Abbildung 16: schematische Darstellung des Chimney-Tests.** Eine gesunde normale Maus reagiert mit schnellem Rückwärtslaufen. Die maximale Zeit für den Versuch beträgt 120 s.

#### 4.2.2.3 Rotarod-Test

Prinzip:

Der Rotarod Test (Jones und Roberts 1968) wird benutzt, um die motorische Koordination und Balanceveränderungen nach traumatischen (Hamm et al. 1994) oder ischämischen (Rogers et al. 1997) Hirnverletzungen in Nagern zu beurteilen.



Abbildung 17: Foto der Rotarod-Apparatur.

Durchführung:

Die Mäuse werden bei konstanten 4 rpm auf das Rotarod gesetzt. Sobald die Maus anfängt sich umzudrehen oder runterfällt, wird der Versuch abgebrochen. Nur Mäuse, die im gesunden Zustand 120 s lang auf dem Rotarod bleiben, werden für den Versuch genommen.

Nach einer 10 min Ruhepause werden dieselben Mäuse erneut auf das Rotarod gesetzt. Diesmal beschleunigt die Apparatur jedoch von 4-40 rpm in 120 s. Die Zeit, die die Maus auf dem Rotarod läuft, bevor sie runter fällt, wird gemessen. Passive Rotationen, d.h. die Maus läuft nicht, sondern krallt sich am Rotarod fest und dreht mit, werden als Sturz gewertet. Nach dem Schlaganfall wird der Test unter den gleichen Bedingungen durchgeführt und die Zeit, die die Maus auf dem Rotarod bleibt, vermerkt.

### 4.2.3 Technik der Mikrodialyse

#### 4.2.3.1 Prinzip

Die Methode der Mikrodialyse ist eine besondere Technik, um die Zusammensetzung des extrazellulären Raumes im lebenden Gewebe zu untersuchen. In der Grundlagenforschung wird sie hauptsächlich als Verfahren zur *in vivo*-Bestimmung von endogenen Kompartimentänderungen, zur Pharmakotherapie, Bioverfügbarkeit und Bioäquivalenz genutzt.

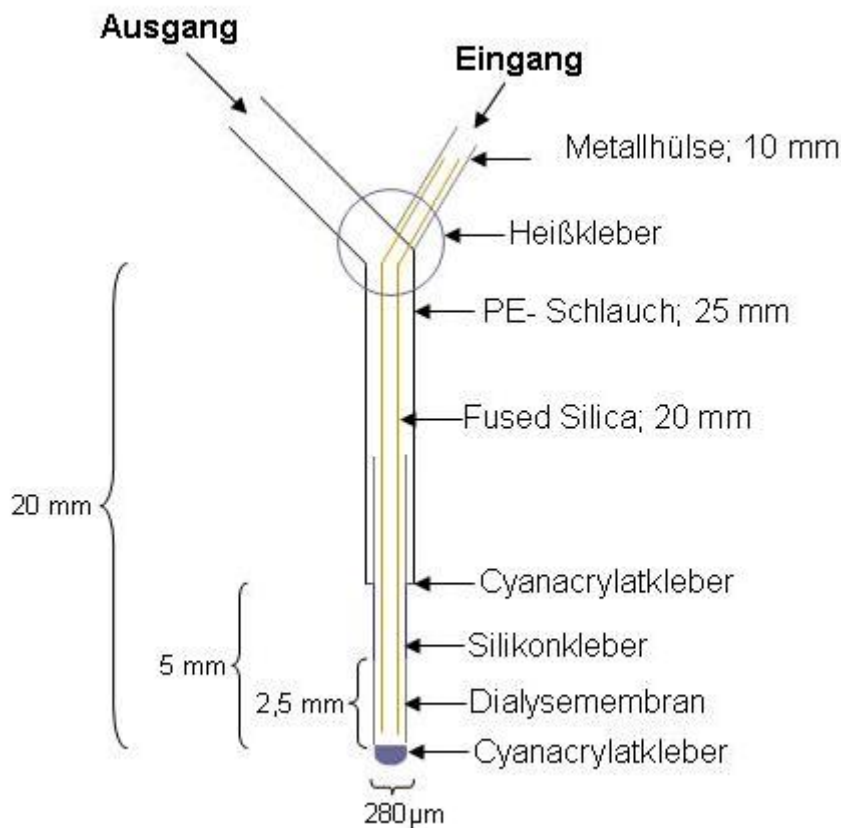
Die Mikrodialysesonde ahmt hierbei eine Blutkapillare nach und besitzt eine semipermeable Membran, durch die, wenn sie mit physiologischen Salzlösungen perfundiert wird, ein Austausch von Molekülen aus einem Kompartiment höherer Konzentration in ein Kompartiment mit niedriger Konzentration stattfindet. Die dadurch gewonnenen Proben aus der Extrazellularflüssigkeit können gesammelt und analysiert werden. Durch die selbstgebauten Sonden können Moleküle bis zu einer Größe von 20 kDa erfasst werden. Der Molekülaustausch durch die Dialysemembran ist in beide Richtungen möglich. Daher kann diese Technik genutzt werden, um kontinuierliche Veränderungen von Metaboliten während eines Schlaganfalls im Gehirn aufzuzeichnen, als auch zur lokalen Gabe von Substanzen (CMA Microdialysis AB 2009; Horn und Engelmann 2001).

#### 4.2.3.2 Bau der Mikrodialysesonden

Die Mikrodialysesonden werden mit geringen Modifikationen, wie bei Santiago und Westerink (1990) beschrieben, hergestellt. Eine schematische Skizze ist in Abbildung 18 dargestellt.

Ein 2,5 cm langes Stück von einem PE-Schlauch (0,38 mm ID, 1,09 mm AD) wird abgeschnitten und eine Kanüle vorsichtig 0,5 cm eingeführt. Durch das Umbiegen des Schlauches wird dieser dann mit der Kanüle durchstoßen. Ein 2 cm langes Stück Fused Silica wird durch die Kanüle in den Schlauch gelegt. Die Enden von Schlauch und Fused Silica werden festgehalten und die Kanüle entfernt. Es resultiert ein Y-förmiges Gebilde.

Die Metallhülse wird auf das Ende der Fused Silica geschoben, der Aktivator wird aufgetragen und einwirken gelassen. Anschließend wird die Hülse mit Cyanacrylatkleber am Schlauch fixiert.



**Abbildung 18: Schematische Skizze einer selbstgebauten Mikrodialysesonde.**

Nach dem Aushärten des Klebers wird die Dialysemembran von unten auf die Fused Silica geschoben. Ein kleiner Abstand zwischen den beiden Bauelementen wird belassen, um die Membran mit Cyanacrylatkleber zukleben zu können, ohne dass sie mit der Fused Silica verklebt. Nach dem Austrocknen des Klebers wird ebenfalls Cyanacrylatkleber zwischen PE-Schlauch und Membran geklebt. Als Letztes wird dann von unten her die Austauschfläche von 2,5 mm abgemessen und markiert. Über den Cyanacrylatkleber am PE-Schlauch bis zur Markierung wird Silikonkleber gestrichen und für 24 Stunden trocknen gelassen. Um die Sonde zu stabilisieren, wird um Metallhülse und Schlauch Heißkleber geklebt.

#### 4.2.3.3 Test der Mikrodialysesonden

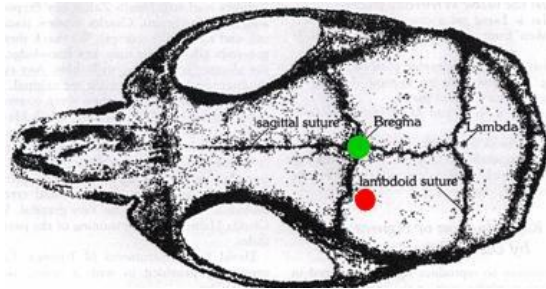
Die Permeabilität jeder Sonde wurde unmittelbar vor der Implantation überprüft. Von jeder Charge wurden Sonden für die *in vitro* Kalibration zurückgehalten. Diese wurden dann in eine Lösung mit bekannter Konzentration von Glutamat, Glukose und Laktat gehängt und mit künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) perfundiert. Für die Wiederfindungsrate von Bilobalid im Kapitel 5.3.1 wurde Bilobalid (10 µM) zu aCSF mit oder ohne 0,5 M Albumin-Lösung oder Vollblut gegeben. Das Verhältnis der Analytkonzentration im Dialysat zur eingesetzten Konzentration ist die *in vitro* Wiederfindung in Prozent.

#### 4.2.3.4 Implantation der Mikrodialysesonden

Die CD-1 Mäuse werden mit einer Initialdosis von 4 % und einer Erhaltungsdosis von 1-1,5 % Isofluran in einem N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> (70/30 %) Gas-Gemisch narkotisiert. Die Narkosetiefe wird während der Operation mehrmals überprüft (Atmung, Reflexe) und gegebenenfalls korrigiert.

Die Maus wird in den Mausadapter des Stereotakten eingespannt und die Augen mit Bepanthensalbe vor dem Austrocknen geschützt. Das Fell auf dem Schädel wird mit einem Alkoholpad desinfiziert, mit einer Schere sagittal eingeschnitten und mit Hilfe von Bulldog-Klemmen zur Seite gezogen. Nach dem Freipräparieren des Schädelknochens werden folgende Koordinaten von Bregma (Abbildung 19) für die Implantation der Sonde im Striatum eingestellt: AP +0,5 mm, L +2,2 mm, DV -3,8 mm und mit einem Stift markiert. An dieser Stelle wird mit dem Bohrer ein kleines Loch gebohrt und vorsichtig die Dura mater mit einer Nadel durchstoßen. Die getestete Sonde wird in die Halterung des Stereotakten eingespannt, über dem Bohrloch platziert und langsam auf die gewünschte Tiefe herabgesenkt. Anschließend wird das Loch mit dem Dentalzement gefüllt und die Sonde mit Zement auf dem Schädel fixiert. Das Licht der Kaltlichtquelle beschleunigt das Aushärten des Zements. Nachdem der Zement hart ist, wird vorsichtig die Fixierung der Sonde am Stereotakten gelöst. Die Narkose wird beendet, die Wunde verschlossen und die Maus ausgespannt.

1 ml 37°C warme Ringerlaktat-Lösung wird direkt nach der Operation der Maus i.p. gespritzt und gegebenenfalls die Kopfwunde mit etwas Lidocaingel betäubt. Nachdem die Maus sich von der Narkose erholt hat, wird der Zellstoff aus dem Käfig entfernt, damit die Sonde sich nicht damit verheddert.



**Abbildung 19: Dorsale Ansicht eines Mausschädels.** Nach Franklin und Paxinos (1997). Der grüne Punkt stellt Bregma dar und der rote die Position der Sonde (Striatum).

#### 4.2.4 Kombination der Mikrodialysetechnik mit der MCAO

24 Stunden nach der Implantation wird die Mikrodialyse gestartet. Diese Zeitspanne ermöglicht dem Gewebe und der Blut-Hirn-Schranke, sich von dem durch die Implantation entstandenen Schaden zu erholen (de Lange et al. 1997; Morgan et al. 1996; Sumbria et al. 2011; Westerink 1995).

Eine 1 ml große Präzisionsspritze wird mit aCSF aufgezogen und der Ein- und Ausgangsschlauch gefüllt. Anschließend werden die Schläuche an der Sonde angeschlossen. Hierfür wird die Maus aus dem Käfig geholt und leicht am Schwanz fixiert. Danach wird die Maus zurück in den Dialysekäfig gesetzt, die Schläuche mit Tesa<sup>®</sup> am Käfig festgeklebt und die Pumpe mit einer Flussrate von 1-2  $\mu\text{l}/\text{min}$  gestartet. Das Ende des Ausgangsschlauches wird in den Fraktionssammler gehängt und dieser auf 15 min Intervalle programmiert (Abbildung 20).





**Abbildung 20: Aufbau der Mikrodialyseversuche.** Dargestellt ist die Probengewinnung im wachen Zustand der Maus (Mitte). Auf der linken Seite befindet sich die Pumpe mit der Spritze und rechts der Fraktionssammler.

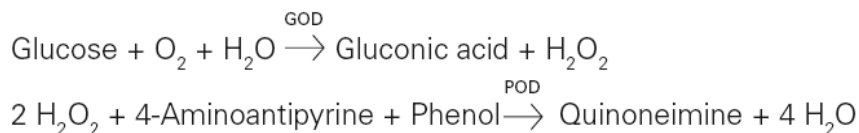
Die Probensammlung wird 60 min vor der Schlaganfallinduktion gestartet und während der OP weitergeführt (Abbildung 21). Die Maus wird nach der OP wieder in den Dialysekäfig zurückgebracht und die Dialyse im wachen Zustand für weitere 120 Minuten laufen gelassen.



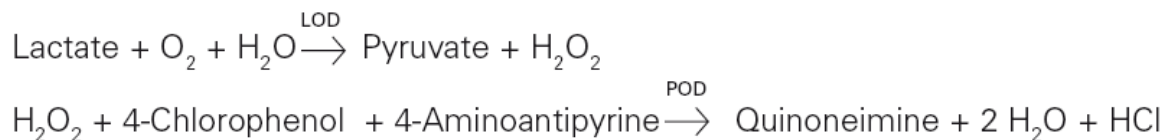
**Abbildung 21. Aufbau der Mikrodialyseversuche während der Schlaganfalloperation.** Die Maus liegt narkotisiert in dorsaler Position auf dem Heizpad (Mitte). Die Pumpe ist rechts hinten im Bild und der Fraktionssammler, auf einen Transportwagen gestellt, links vorne angeordnet.

#### 4.2.4.1 Vermessung von Glukose, Laktat & Glutamat

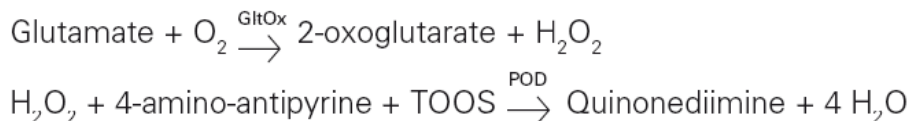
Glukose, Glutamat und Laktat werden zusammen aus jeder Probe mit Hilfe des CMA 600 Mikroanalysators vermessen. Dieses Gerät wurde für die klinische Chemie entwickelt und ermöglicht kleine Volumina zu vermessen. Die Quantifizierung der Analyte erfolgt photometrisch:



(Barham und Trinder 1972)



(Shimojo et al. 1989)



(Bohmer et al. 1989)

Der Messbereich für Glukose liegt bei 0,02-6 mM, für Laktat bei 0,02-2,5 mM und für Glutamat bei 1-150 µM.

#### 4.2.4.2 Detektion von Bilobalid über die Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung

Nach Aufreinigung der Plasmaproben mittels HPLC wurde für die Detektion von Bilobalid im Dialysat und im Plasma ein MicrOTOF-QII-Massenspektrometer mit APCI-Ionen-Quelle benutzt.

Prinzip der Atmospheric-Pressure-Chemical-Ionisation (APCI):

Hierbei handelt es sich um ein Ionisationsverfahren, bei dem unter Atmosphärendruck Ionen erzeugt werden.

Eine Lösung des Analyten wird durch eine Kapillare in einem Stickstoffstrom zerstäubt, wobei ein Spray entsteht (Abbildung 22). Das Spray wird durch eine beheizte Keramik (300-400°C) geführt, wo das Lösungsmittel vollständig verdampft wird. Der austretende Dampf wird durch Anlegen einer Hochspannung (ca. 5 kV) über eine nadelartige Elektrode in ein Plasma überführt.

In dem Plasma werden zunächst aus dem Lösungsmittel und zugesetztem Puffer Ionen gebildet. Die ionisierten Lösungsmittelmoleküle wiederum ionisieren die Analytmoleküle, die dann ins Vakuum überführt werden.

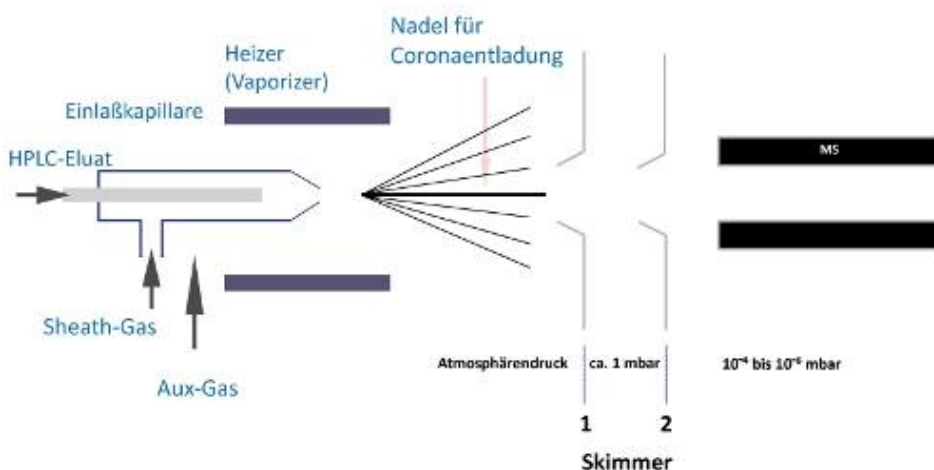


Abbildung 22: Schematische Darstellung einer APCI-Ionen-Quelle von Bruker Daltonics.

Prinzip der Flugzeit-Massenspektrometrie:

Die Time-of-Flight Massenspektrometrie (TOF-MS) ist eine Unterklasse der Massenspektrometrie.

Die Bestimmung von Masse/Ladung erfolgt hier über die Messung der Flugzeit. Dazu werden die Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt und durchlaufen anschließend eine so genannte Flugstrecke. Wegen des Zusammenhangs  $E = \frac{1}{2}mv^2$  verhalten sich die Flugzeiten in quadratischer Abhängigkeit zum Verhältnis Masse/Ladung:  $tof \propto \sqrt{m/q}$ . Die Messung der Flugzeit der Ionen wird durch moderne Elektronik ermöglicht (de Hoffmann und Stroobant 2009; Ude 2010).

#### 4.2.5 Blutgasanalyse

Für die Blutgasanalyse werden folgende Parameter bestimmt:

pH-Wert, Kohlendioxid- und Sauerstoffpartialdruck ( $pCO_2$  und  $pO_2$ ), Sauerstoffsättigung ( $sO_2$ ), Hämoglobin (Hb) und Hämatokrit (Hkt).

Prinzip der pH-Messung:

Der pH-Wert wird mit Hilfe einer wasserstoffionenselektiven Glasmembran gemessen. Auf der einen Seite der Glasmembran befindet sich eine Lösung mit konstantem pH, auf der anderen Seite eine Lösung mit unbekanntem pH (Blut). Die Spannungsänderung, die sich entwickelt, ist proportional zur pH-Differenz zwischen den beiden Lösungen. Diese Änderung wird mit der Referenzelektrode mit konstanter Spannung verglichen. Die Größe dieser Differenz ist dann ein Maß für den pH der unbekanntes Lösung.

Prinzip der Kohlendioxidpartialdruck-Messung ( $pCO_2$ ):

Der  $pCO_2$ -Wert wird mit einer modifizierten pH-Elektrode gemessen. Das  $CO_2$  in der unbekanntes Lösung kommt mit einer gasdurchlässigen Membran auf einer kombinierten Mess-/Referenzelektrode in Berührung.

Als Reaktion auf die Partialdruckdifferenz diffundiert  $\text{CO}_2$  durch die Membran in eine dünne Elektrolytlösungsschicht. Diese Lösung wird dann ins Gleichgewicht mit dem externen Gasdruck gebracht. Das  $\text{CO}_2$  in der Lösung wird wie folgt hydriert:



Die entstandene Kohlensäure führt zu einer veränderten Wasserstoffionenaktivität. Die Elektrolytlösung hinter der Membran berührt eine wasserstoffionenselektive Glaselektrode. Die veränderte Wasserstoffionenaktivität in der Elektrolytlösung erzeugt eine Spannung, die mit der internen Fülllösung verglichen wird. Diese Spannungsänderung wird mit der konstanten Spannung der Referenzelektroden-Halbzelle verglichen und in einen logarithmischen Zusammenhang mit dem  $\text{pCO}_2$  der unbekannt Probe gebracht.

Prinzip der Sauerstoffpartialdruck-Messung ( $\text{pO}_2$ ):

Der  $\text{pO}_2$ -Wert wird amperometrisch bestimmt. Der Elektrodenfluss wird an der Elektrode gemessen und ist direkt proportional zum Sauerstoff-Partialdruck.

Prinzip der Hämatokrit-Messung:

Der Hämatokritwert wird als Volumen-Prozentsatz der Erythrozyten am gesamten Blutvolumen definiert und kann über die Messung des elektrischen Widerstandes einer Blutprobe bestimmt werden. Die Hämatokritelektrode wird mit zwei Standardlösungen kalibriert. Zur Berechnung des Hämatokritwertes wird der elektrische Widerstand der Blutprobe gemessen und der Wert in Abhängigkeit von der Natriumionenkonzentration korrigiert.

Prinzip der Hämoglobin-Messung:

Hämoglobin wird durch eine kombinierte Leitfähigkeits- und Photometriemessung bestimmt. Diese Kombination liefert ein Maß für die Hämoglobinkonzentration. Diese wird durch eine  $\text{sO}_2$ -Messung präzisiert. Dadurch wird die Hämoglobin-Konzentration um die Effekte der morphologischen Veränderung der Erythrozyten bei Sättigung und die Begleiteffekte auf das Verhältnis von Probenleitfähigkeit und Erythrozytenvolumen in der Blutprobe korrigiert.

Prinzip der Sauerstoffsättigung (sO<sub>2</sub>):

Die Sauerstoffsättigung gibt den Prozentsatz des an Sauerstoff gebundenen Hämoglobins an. Veränderungen des sO<sub>2</sub> %-Wertes führen zu Veränderungen der Vollblutfarbe. Gemessen wird das Reflektionsvermögen von Vollblut mit einem Reflektometer. Die Probe wird unter Verwendung eines mehrfach verzweigten Glasfaserbündels mit verschiedenen Wellenlängen bestrahlt. Ein Teil jeder Lichtwellenlänge wird auf die Glasfaserbündel und so auf einen Photozellendetektor reflektiert. Durch den Vergleich des festgestellten Signals mit bekannten Standards wird die Farbe der Blutprobe gemessen und der Grad der Sauerstoffsättigung bestimmt.

(nach der Bedienungsanleitung des Blutgasanalysators pHox<sup>®</sup> nova biomedical 2010)

#### **4.2.5.1 venöse Blutabnahme**

Die Maus wird kurz mit Isofluran narkotisiert. Eine heparinisierte 100 µl Glaskapillare wird hinter das Auge geführt und der Venenplexus angestochen. Die Kapillare ist für die Messung bis zur Markierung zu füllen. Anschließend wird mit einer Kompresse Druck auf das Auge ausgeübt, um die Blutung zu stillen.

#### **4.2.5.2 arterielle Blutabnahme**

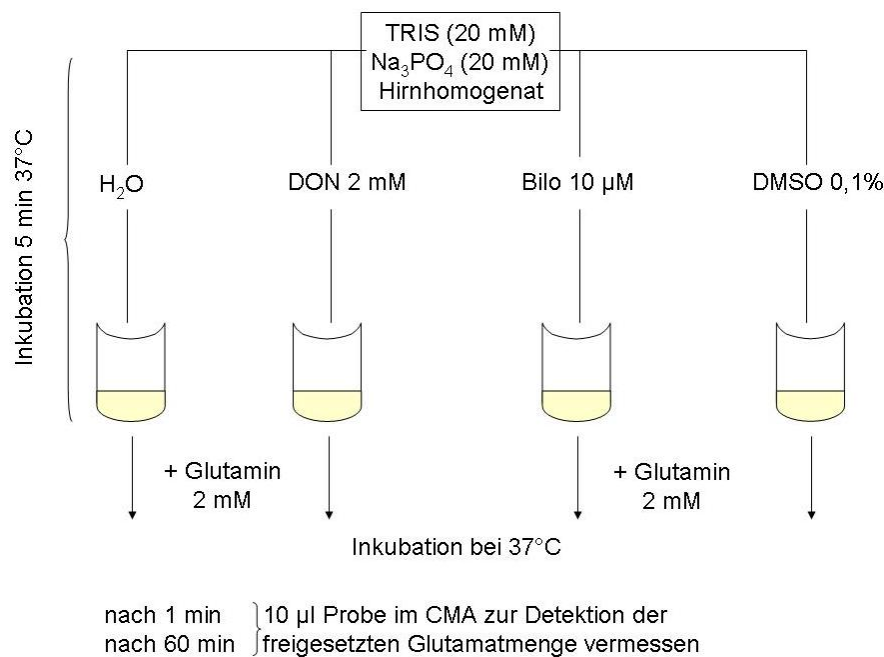
Ein Vorteil von arteriellen Blutproben ist, dass die Messergebnisse, unabhängig von der Entnahmestelle, immer repräsentativ sind (Monnig 2002).

Hierbei wird die Maus mit einer Initialdosis von 4 % und einer Erhaltungsdosis von 1-1,5 % Isofluran in einem N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> (70/30%) Gas-Gemisch narkotisiert und dorsal unter das Mikroskop gelegt. Die Brustkorb wird geöffnet und die Arteria carotis communis wird vorsichtig angestochen. Das ausströmende arterielle Blut wird mit einer heparinisierten Spritze aufgezogen und für die Messung in ein heparinisiertes Eppendorfvial überführt. Diese Blutabnahme versteht sich als finale Abnahme.



### 4.2.6.3 Durchführung Enzymassay

Für den Enzymassay werden Aliquots des Hirnhomogenates, der Enzyminhibitor DON und das Substrat auf Eis aufgetaut. Der CMA 600 wird für Glutamat kalibriert und die 4 Ansätze wie folgt hergestellt:



**Abbildung 25: Schematische Darstellung des Glutaminaseassays.** Angegeben sind Endkonzentrationen bei einem Endvolumen von 250  $\mu\text{l}$ . Nach Newcomb et al. 1997

Nach einer Minute und am Ende des Versuches (60 min) werden jeweils 10  $\mu\text{l}$  aus jedem Ansatz im CMA 600 vermessen und die Glutamatfreisetzung so bestimmt. Angegeben wird die Glutamatkonzentration als Umsatz des Substrates von 1 mg Protein in 60 Minuten.



## 4.2.7 Bestimmung der Enzymaktivität der N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamat peptidase (NAAG-peptidase)

### 4.2.7.1 Prinzip

#### NAAG-peptidase:

Die NAAG-peptidase, auch Carboxypeptidase II genannt, ist ein Zink- Metalloenzym, das sowohl in der Membran, als auch in Extrazellulärraum des Gehirns vorkommt. Es katalysiert die Hydrolyse von N-Acetyl-aspartyl-glutamat (NAAG) zu Glutamat (GLU) und N-Acetyl-aspartat (NAA) wie folgt:

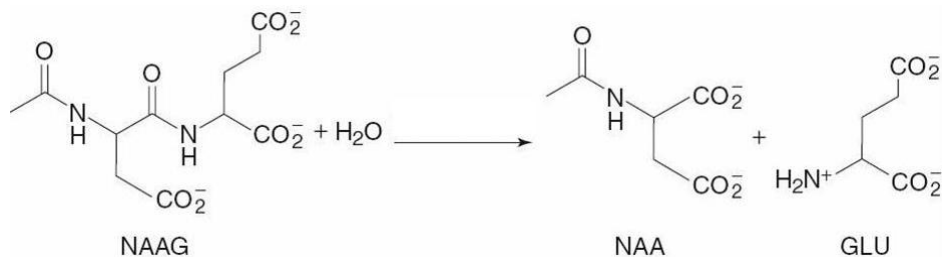


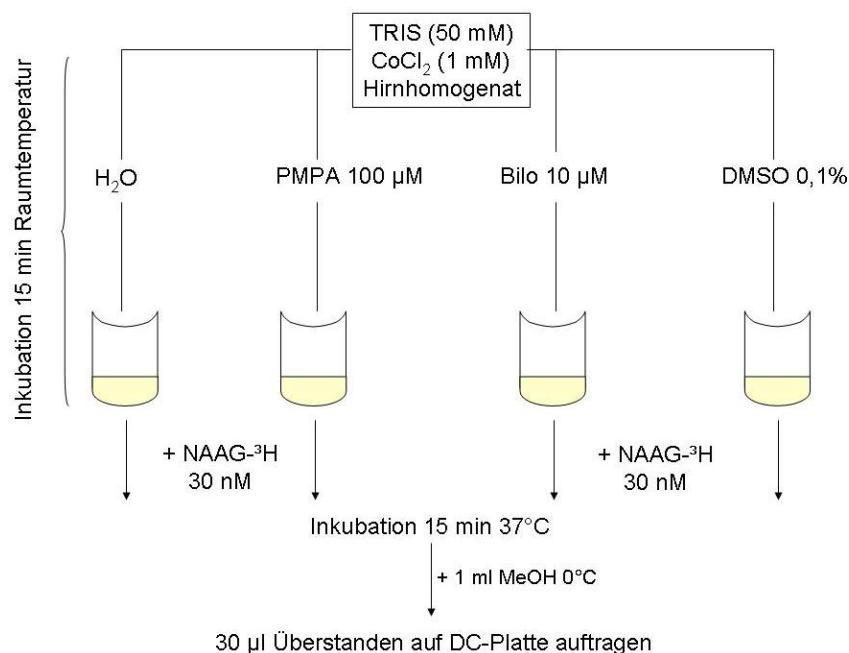
Abbildung 26: Reaktionsmechanismus der NAAG-peptidase. Tiffany und Slusher 2001.

#### 2-(Phosphonomethyl)-1,5-Pentadinsäure (PMPA):

2-PMPA ist der erste und selektive Inhibitor der NAAG-peptidasen. Studien über die zwei Enantiomere von PMPA zeigten, dass die Hemmung der Carboxypeptidase II spezifisch für (S)-2-PMPA ist, welches eine absolut entsprechende Konfiguration zu L-Glutamat hat (Zhou 2005).

### 4.2.7.2 Durchführung Enzymassay

Die Hirnhomogenate werden wie in Kapitel 4.2.6.2. beschrieben hergestellt und für diesen Enzymassay ebenfalls auf Eis aufgetaut. Die Ansätze sind wie folgt:



**Abbildung 27: Schematische Darstellung des NAAG-peptidaseassays.** Angegeben sind Endkonzentrationen bei einem Endvolumen von 1000 µl. Nach Tiffany und Slusher 2001.

#### 4.2.7.3 Durchführung Dünnschichtchromatographie

Die DC-Kammer wird mit der mobilen Phase gesättigt, 30 µl Überstand von jedem Ansatz werden auf die DC-Platte aufgetragen und mit dem Fön getrocknet. Als Kontrollen werden Glutamat, NAA und kaltes NAAG ebenfalls aufgetragen. Anschließend wird die DC-Platte in die Kammer gestellt und laufen gelassen, bis die Fließmittelfront 10 cm (90 Minuten) erreicht hat. Danach wird die Front markiert und die DC-Platte für 15 min im Trockenschrank bei 90°C getrocknet. Anschließend wird sie mit 2 % Ninhydrin besprüht und nochmals kurz in den Trockenschrank gelegt. Der Startpunkt und die entstandenen lila-farbenen Flecken auf Höhe der Glutamatkontrolle werden markiert, ausgekratzt, mit Lumasafe angelöst und über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag werden die Probenfläschchen in den Counter gestellt und das freigewordene  $^3\text{H}$ -Glutamat als cpm bestimmt. Die gemessenen cpm-Werte für  $^3\text{H}$ -Glutamat werden als Umsatz des Substrates von 1 mg Protein in 90 Minuten angegeben.

#### 4.2.8 Statistik

Die statistischen Auswertungen in dieser Arbeit wurden mit der Software Graph Instat<sup>®</sup> und GraphPad Prism 5.0<sup>®</sup> berechnet.

Zum Vergleich zwischen zwei Mittelwerten wurde der parametrische Student's t-Test durchgeführt. Die Analyse erfolgte jeweils mit einem ungepaarten, zweiseitigen Test mit einer Welch's-Korrektur für die Annahme von ungleichen Varianzen. Für eine nicht-parametrische Verteilung der Daten wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt und für den Vergleich mehrerer Gruppen der Ein-Wege ANOVA- bzw. für den Vergleich von mehreren Faktoren (Zeitkurven, Behandlung) der Zwei-Wege ANOVA-Test angewendet.

Es wurden folgende Stufen der Signifikanz verwendet:

(\*)  $p < 0,05$  statistisch signifikant

(\*\*)  $p < 0,01$  statistisch sehr signifikant

(\*\*\*)  $p < 0,001$  statistisch hoch signifikant

## 5 ERGEBNISSE

Im ersten Teil der Arbeit sollten methodische Untersuchungen zur Charakterisierung des fokalen cerebralen Schlaganfallmodells durchgeführt werden. Im Einzelnen sollte hierbei die Beeinflussung der Blutgaswerte durch eine Applikation von Ringerlaktat-Lösung analysiert (Kapitel 5.1) und das Schlaganfallmodell validiert werden (Kapitel 5.2).

Diese methodischen Untersuchungen dienten zur Vorbereitung der Versuche mit Bilobalid (Kapitel 5.3 und 5.4).

### 5.1 Einfluss von Ringerlaktat-Lösung auf die Blutgaswerte zu verschiedenen Zeitpunkten der Ischämie

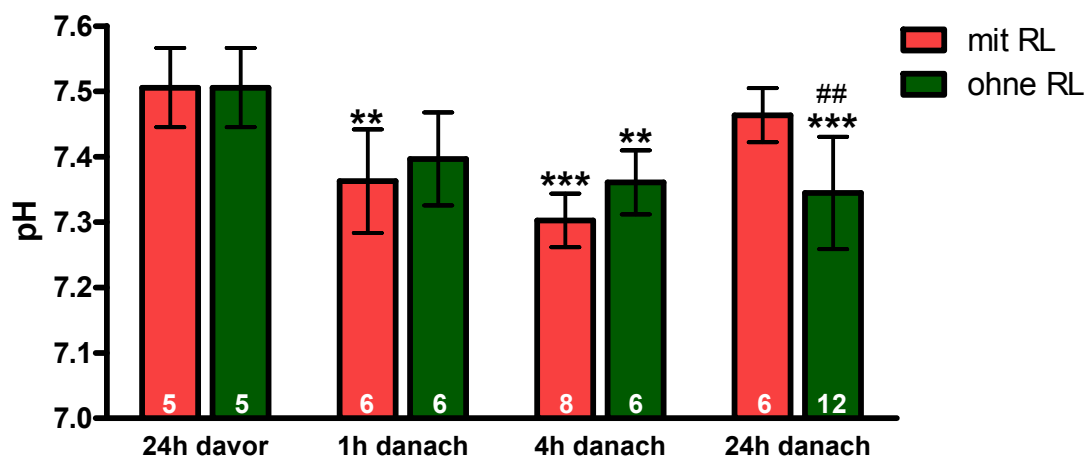
Im diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit eine Applikation von Ringerlaktat (RL) (1 ml, 37 °C) direkt nach der Schlaganfallinduktion eine Azidose ( $\text{pH} < 7,35$ ) verhindert und die daran gekoppelten Parameter, wie den Kohlendioxid- und Sauerstoffpartialdruck beeinflusst. Dazu wurden zuerst die Normwerte für das venöse und arterielle Blut der Maus mit Hilfe eines Blutgasanalysators bestimmt (siehe Kapitel 4.2.5). Die Werte sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

**Tabelle 4: Normwerte der gemessenen Blutgasparameter.**  $\text{pCO}_2$ = Kohlendioxidpartialdruck,  $\text{pO}_2$ = Sauerstoffpartialdruck,  $\text{sO}_2$ = prozentuale Sauerstoffsättigung, Hkt= Hämatokrit, Hb= Hämoglobin. Mittelwert  $\pm$  SD.

Parameter	Arteriell	n=	Venös	n=
pH-Wert	7,51 $\pm$ 0,06	5	7,39 $\pm$ 0,03	18
$\text{pCO}_2$ [mmHg]	34,5 $\pm$ 9,4	5	43,7 $\pm$ 4,8	18
$\text{pO}_2$ [mmHg]	114,6 $\pm$ 7,7	5	49,9 $\pm$ 7,3	16
$\text{sO}_2$ [%]	97,0 $\pm$ 2,2	5	82,6 $\pm$ 6,3	13
Hkt [%]	11,9 $\pm$ 0,4	5	13,1 $\pm$ 0,8	14
Hb [g/dl]	35,9 $\pm$ 1,1	5	39,9 $\pm$ 2,1	14

### 5.1.1 Arterielle Blutgase mit und ohne Ringerlaktat-Applikation

Im folgenden Kapitel wurde den Mäusen 24 vor und eine Stunde, 4 oder 24 Stunden nach dem Schlaganfall aus der Arteria carotis communis Blut entnommen und analysiert. Abbildung 28 zeigt den arteriellen pH-Wert mit und ohne Ringerlaktat-Gabe (RL).

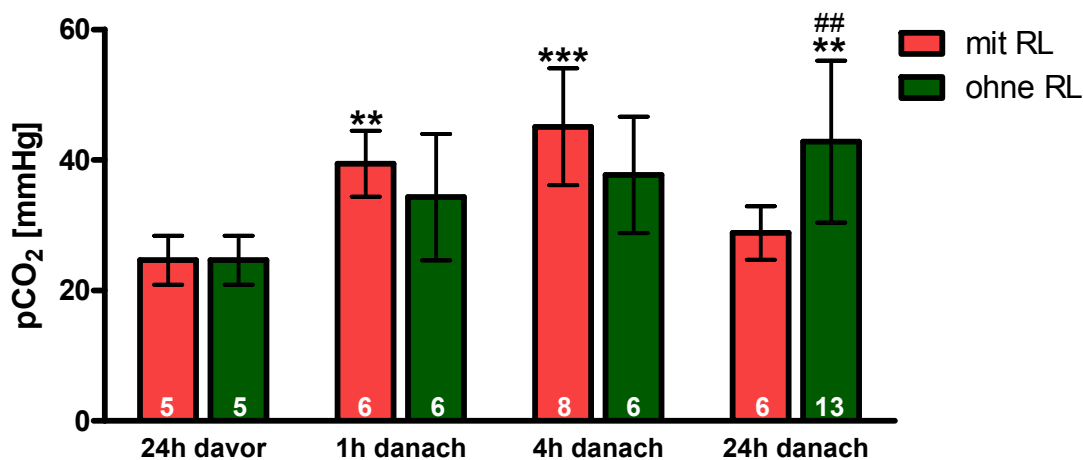


**Abbildung 28: pH-Werte im arteriellen Blut von Mäusen vor und nach Schlaganfall mit und ohne Ringerlaktat-Gabe.** Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Tiere in diesem Versuch an. Die statistische Signifikanz innerhalb der Gruppe ist mit Ein-Wege ANOVA und Dunnett's post-Test und für den Vergleich unter den Gruppen als Zwei-Wege ANOVA und Bonferroni post-Test angegeben. Mittelwert  $\pm$  SD. \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$  vs. den „24h davor“ Werten der jeweiligen Gruppe; ##  $p < 0,01$  vs. „24h danach“ Wert mit RL.

In der Gruppe mit Ringerlaktat sinkt der pH-Wert von 7,50 (24h davor) innerhalb der ersten Stunde nach der MCAO auf einen pH-Wert von 7,36 ( $p < 0,01$ ). Nach weiteren drei Stunden liegt der pH-Wert bei 7,30 und die Tiere weisen eine Azidose auf. Diese bildet sich in den nächsten 20 Stunden wieder zurück und die Tiere zeigen mit einem pH-Wert von 7,46 keinen Unterschied zum pH-Wert vor der Operation ( $p < 0,05$ ). Die Gruppe ohne Ringerlaktat-Gabe zeigt einen ähnlichen Verlauf in den pH-Werten wie die Gruppe mit Ringerlaktat-Lösung. Im Verlauf der ersten vier Stunden nach der Schlaganfallinduktion sinkt der pH-Wert auf einen Wert von 7,36 ( $p < 0,01$ ). Im Gegensatz zur RL-Gruppe weisen die Tiere 24 Stunden nach der Operation (pH-Wert von 7,34) immer noch eine Azidose auf und der pH-Wert unterschieden sich deutlich vom pH-Wert vor der MCAO ( $p < 0,001$ ).

Vergleicht man die pH-Werte beider Gruppen am Ende der Studie (24h danach), so ergibt sich eine Differenz von 0,12, das entspricht einer statistischen Signifikanz von  $p < 0,01$ .

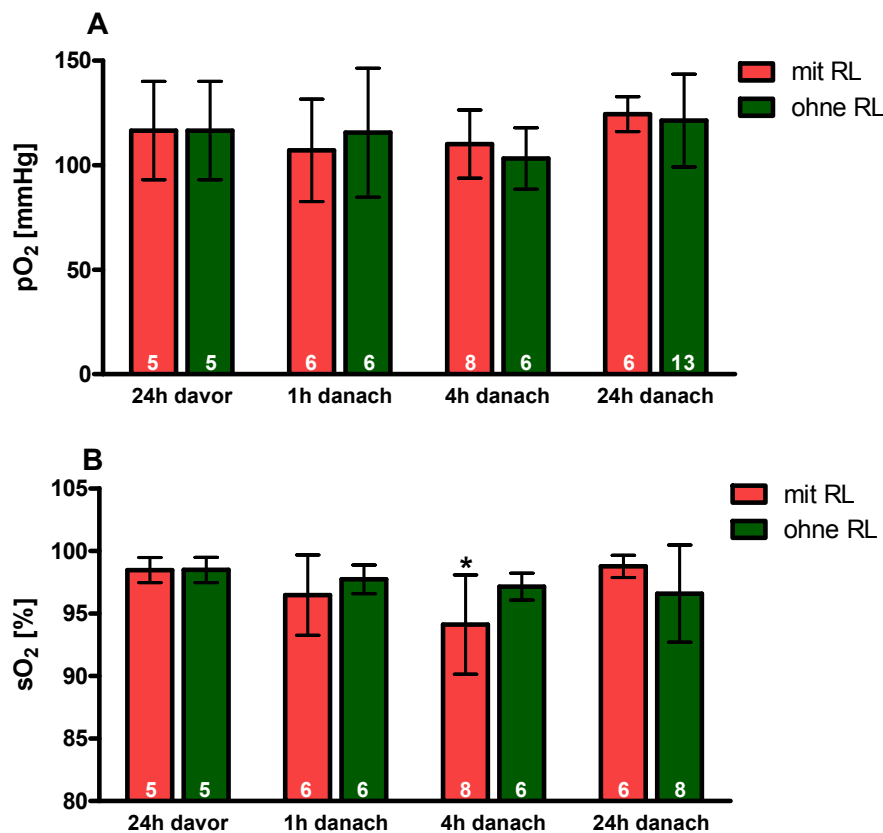
Der pH-Wert und der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck des Blutes stehen in direktem Zusammenhang: mit der Zunahme des  $\text{CO}_2$ -Partialdruckes im Blut, sinkt der pH-Wert. Abbildung 29 gibt die gemessenen  $\text{pCO}_2$ -Werte wieder.



**Abbildung 29: Vergleich des Kohlendioxidpartialdruckes im arteriellen Blut der Maus mit und ohne Ringerlaktat-Gabe.** Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Tiere in diesem Versuch an. Die statistische Signifikanz innerhalb der Gruppe ist mit Ein-Wege ANOVA und Dunnett's post-Test und für den Vergleich unter den Gruppen als Zwei-Wege ANOVA und Bonferroni post-Test angegeben. Mittelwert  $\pm$  SD. \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$  vs. den „24h davor“ Werten der jeweiligen Gruppe; ##  $p < 0,01$  vs „24h danach“ Wert mit RL.

Man sieht, dass in der RL-Gruppe der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck des Blutes eine Stunde nach dem Infarkt von 26,6 mmHg auf einen Wert von 39,4 mmHg ansteigt. Im weiteren Verlauf der Ischämie kommt es zu einer weiteren Erhöhung des  $\text{CO}_2$ -Partialdruckes auf 45,2 mmHg ( $p < 0,001$ ) und am Ende der Studie (24 h nach Schlaganfallinduktion) sinkt der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck fast wieder auf den Ausgangswert. Ohne RL-Gabe kommt es hingegen bis zum letzten Messzeitpunkt zu einem leichten kontinuierlichen Anstieg im  $\text{CO}_2$ -Partialdruck, der allerdings bis vier Stunden nach der Ischämie nicht signifikant erhöht ist. Erst nach weiteren 20 Stunden ist der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck deutlich um 73 % gegenüber dem Ausgangswert erhöht ( $p < 0,01$ ) und unterscheidet sich zusätzlich sehr signifikant vom Wert des  $\text{CO}_2$ -Partialdruckes zur gleichen Messzeit von der Gruppe mit Ringerlaktat ( $p < 0,01$ ).

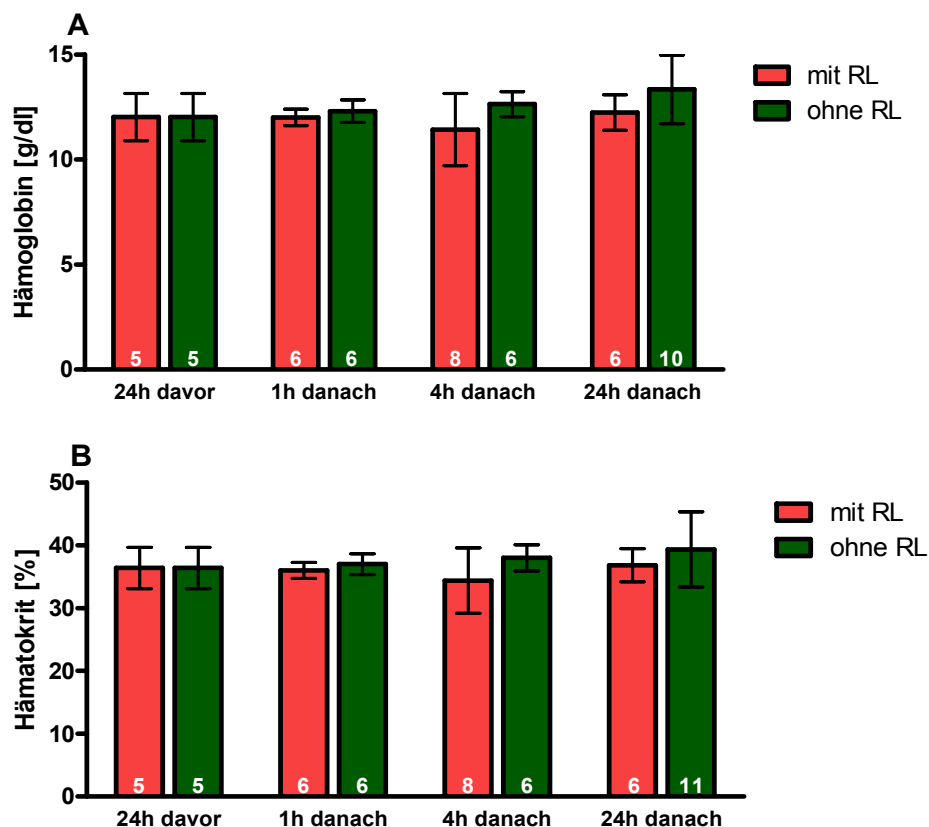
In den folgenden Abbildungen sind die gemessenen Daten bezüglich des Sauerstoffpartialdruckes und der prozentualen Sauerstoffsättigung dargestellt.



**Abbildung 30: Werte des Sauerstoffpartialdruckes und des Sauerstoffgehaltes im arteriellen Blut von Mäusen vor und nach Schlaganfallinduktion mit und ohne Ringerlaktat-Gabe.** (A) Vergleich der Sauerstoffpartialdruck-Werte und (B) sO<sub>2</sub>-Gehalt mit und ohne RL-Gabe. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Tiere in diesem Versuch an. Die statistische Signifikanz ist mit Ein-Wege ANOVA und Dunnett's post-Test angegeben. Mittelwert  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$  vs. den „24h davor“ Werten der jeweiligen Gruppe.

Man sieht in Abbildung 30 A, dass es beim Sauerstoffpartialdruck in beiden Gruppen nur sehr wenige Veränderungen im Verlauf der Ischämie gibt. Eine leicht abnehmende Tendenz ist vier Stunden nach der Schlaganfallinduktion in beiden Gruppen festzustellen. Dies ist allerdings nicht signifikant. 24 Stunden nach der MCAO sind die Werte im Vergleich zu Beginn der Studie erhöht. Ebenso wie der Sauerstoffpartialdruck unterliegt der prozentuale Sauerstoffgehalt (Abbildung 30 B) im arteriellen Blut keinen starken Schwankungen. In den Mäusen mit RL-Gabe zeichnet sich lediglich 4 Stunden nach der MCAO eine Reduktion des sO<sub>2</sub>-Gehaltes ab ( $p < 0,05$ ). In den Tieren ohne RL-Gabe ist keine signifikante Veränderung im Verlauf der Ischämie zu sehen. Auch ist kein Unterschied zwischen den Gruppen mit und ohne Applikation von RL zu erkennen.

In Abbildung 31 sind die Hämoglobin- und Hämatokrit-Werte zusammengefasst. Beide Werte sind nach 4 Stunden in der RL-Gruppe leicht erniedrigt. Ohne RL-Gabe zeichnet sich eine leicht steigende Tendenz in beiden Werten ab, die allerdings nicht signifikant ist. Während der ganzen Studie lagen sowohl der Hämoglobin-, als auch der Hämatokrit-Wert im Normbereich (siehe Tabelle 4), ein Einfluss von Ringerlaktat auf diese Parameter kann daher ausgeschlossen werden.



**Abbildung 31: Hämoglobin- und Hämatokrit-Werte im arteriellen Blut von Mäusen vor und nach Schlaganfallinduktion mit und ohne Ringerlaktat-Gabe.** Vergleich der (A) Hämoglobin- und (B) der Hämatokrit-Werte mit und ohne RL-Gabe. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Tiere in diesem Versuch an. Mittelwert  $\pm$  SD.

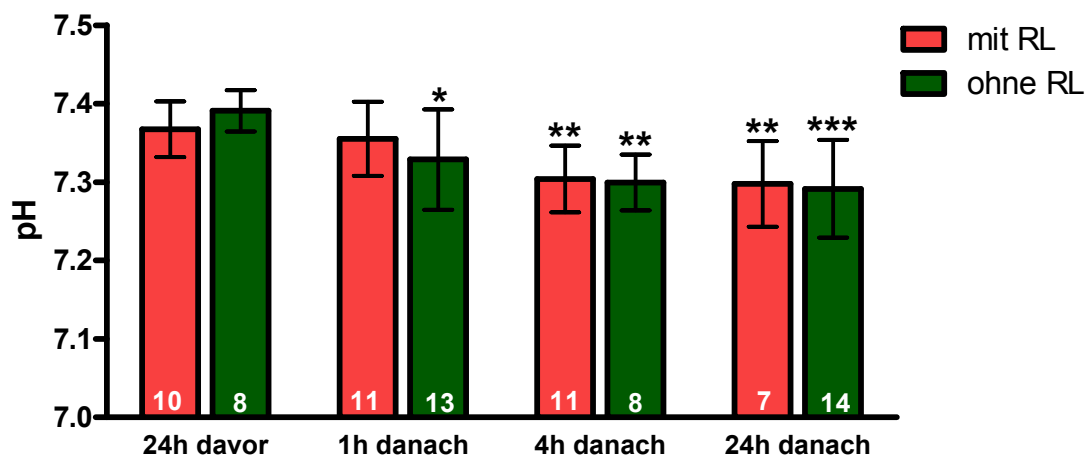
Zusammenfassend ergibt sich für die arteriellen Blutgaswerte, dass die Ringerlaktat-Applikation eine Azidose verzögert und 24 Stunden nach der Operation sich die Blutwerte normalisieren. Die Ringerlaktat-Lösung hat keinen Einfluss auf den Hämatokrit- und Hämoglobin-Wert.



### 5.1.2 Venöse Blutgase mit und ohne Ringerlaktat-Applikation

In den folgenden Experimenten wurden den Mäusen auch 24 vor, eine Stunde, 4 oder 24 Stunden nach der MCAO Blut abgenommen, im Gegensatz zu Kapitel 5.1.1 diesmal allerdings venös, aus dem hinteren Venenplexus am Auge.

In Abbildung 32 ist der pH-Wert mit und ohne Ringerlaktat-Applikation dargestellt.

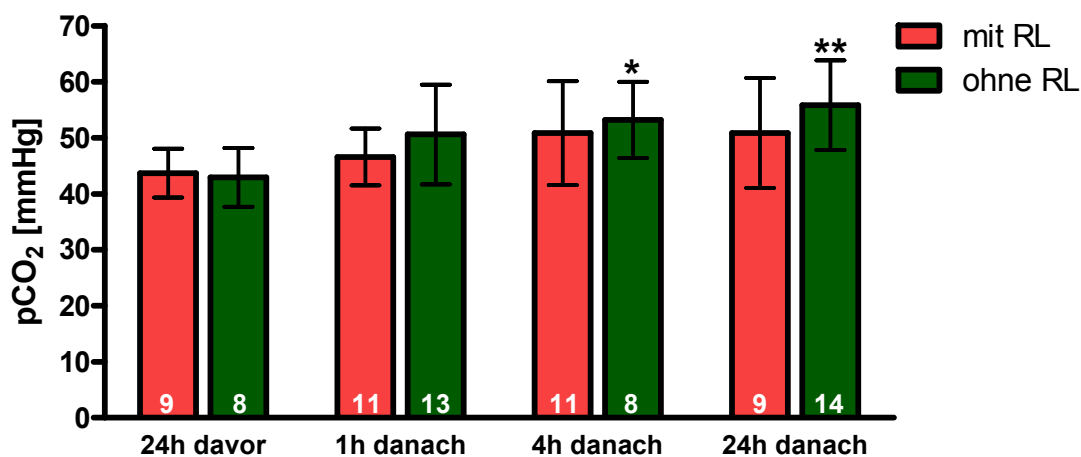


**Abbildung 32: pH-Werte im venösen Blut von Mäusen vor und nach Schlaganfall mit und ohne Ringerlaktat-Gabe.** Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Tiere in diesem Versuch an. Als statistische Signifikanz ist der Ein-Wege ANOVA mit Dunnett's post-Test angegeben. Mittelwert  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$  vs. den „24h davor Werten“ der jeweiligen Gruppe.

Man sieht, dass durch die Applikation der Ringerlaktat-Lösung in der ersten Stunde nach der Schlaganfallinduktion eine Azidose verhindert werden kann. Nach 4 Stunden tritt dann verzögert eine Azidose ein ( $pH = 7,30$ ) und 24 Stunden nach dem Schlaganfall bleibt der pH-Wert unverändert erniedrigt ( $p < 0,01$ ). Das Unterlassen der Ringerlaktat-Applikation führt bereits nach einer Stunde zu einer Azidose ( $pH = 7,33$ ), die sich im Verlauf der Ischämie weiter verstärkt, so dass am Ende der Studie der pH-Wert mit  $7,29$  hoch signifikant gegenüber dem Ausgangswert erniedrigt ist.

Wie bereits im Kapitel 5.1.1 erwähnt, stehen der pH-Wert und der Kohlendioxidpartialdruck in direktem Zusammenhang. Mit der Zunahme des CO<sub>2</sub>-Partialdruckes im Blut, sinkt der pH-Wert.

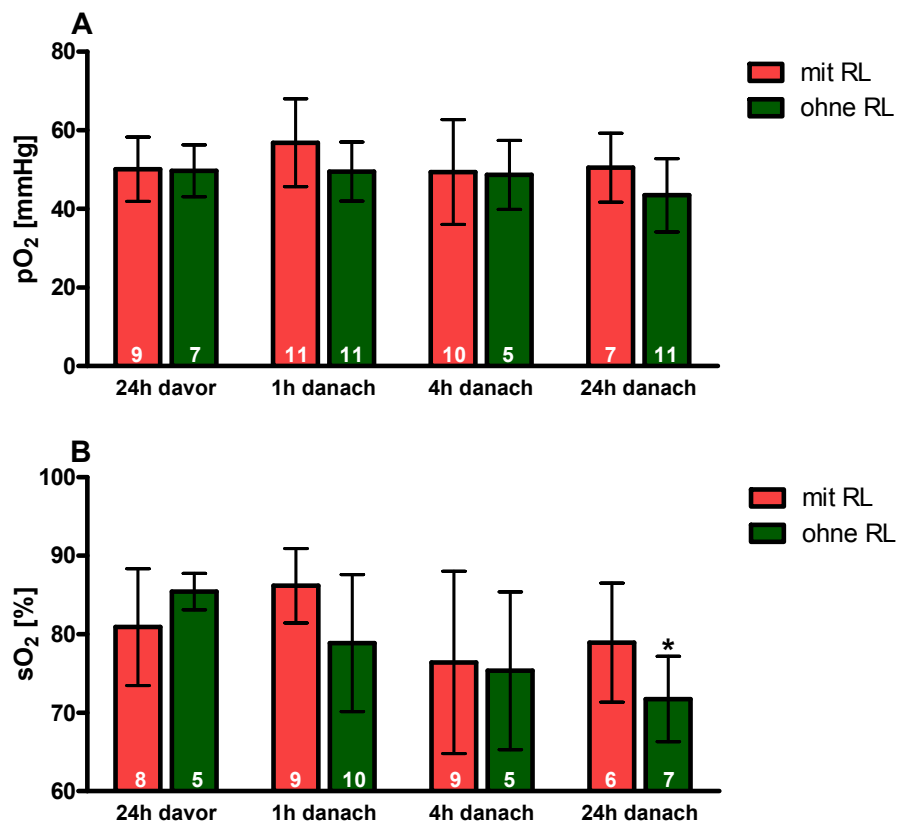
Abbildung 33 gibt die gemessenen pCO<sub>2</sub>-Werte wieder.



**Abbildung 33: Gehalt des Kohlendioxidpartialdruckes im venösen Blut von Mäusen vor und nach Schlaganfall mit und ohne Ringerlaktat-Gabe.** Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Tiere in diesem Versuch an. Die statistische Signifikanz ist mit Ein-Wege ANOVA und Dunnett's post-Test angegeben. Mittelwert  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  vs. den „24h davor Werten“ der jeweiligen Gruppe.

Die Tiere, die kein Ringerlaktat erhalten haben, zeigen einen stärkeren Anstieg in den CO<sub>2</sub>-Partialdruck-Werten, als die behandelten Mäuse. Nach 4 Stunden liegt hier der CO<sub>2</sub>-Partialdruck bei 53,2 mmHg ( $p < 0,05$ ) und innerhalb der nächsten 20 Stunden steigt er weiter auf einen Wert von 55,8 mmHg an. Das entspricht einem Anstieg von 30 % gegenüber dem Ausgangswert ( $p < 0,01$ ). Mit der Ringerlaktat-Applikation kommt es zu einer leichten Tendenz im Anstieg der CO<sub>2</sub>-Partialdruck-Werte, die statistisch nicht signifikant ist. Beide Gruppen weisen allerdings nach der Schlaganfallinduktion eine respiratorische Azidose ( $pH < 7,35$  und  $pCO_2 > 45$  mmHg) auf.

In Abbildung 34 sind die Ergebnisse des Sauerstoffpartialdruckes (A) und der partiellen Sauerstoffsättigung (B) wiedergegeben.



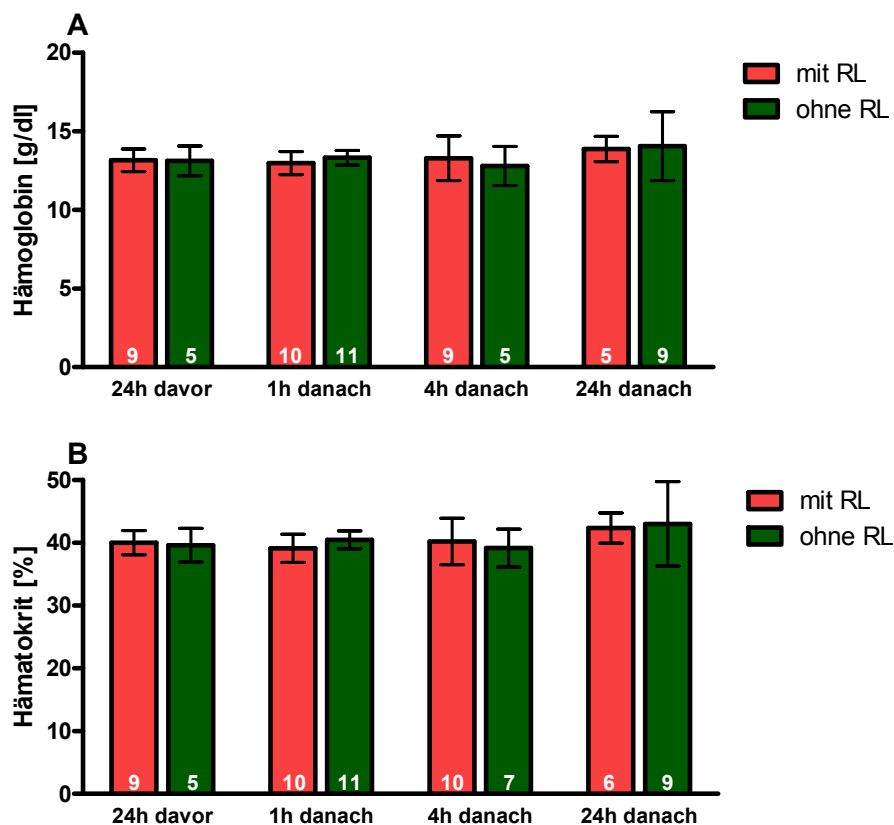
**Abbildung 34: Gehalt des Sauerstoffpartialdruckes und der Sauerstoffsättigung im venösen Blut von Mäusen vor und nach Schlaganfall mit und ohne Ringerlaktat-Gabe.** Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Tiere in diesem Versuch an. Die statistische Signifikanz ist mit Ein-Wege ANOVA und Dunnett's post-Test angegeben. Mittelwert  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  vs. den „24h davor Werten“ der jeweiligen Gruppe.

In beiden Gruppen kommt es zu keinen besonders ausgeprägten Veränderungen im Sauerstoffpartialdruck. Lediglich eine Stunde nach der MCAO kommt es in der Ringerlaktat-Gruppe zu einer Erhöhung des pO<sub>2</sub>-Wertes gegenüber dem Ausgangswert um 13 %, die sich im Verlauf der nächsten 23 Stunden wieder verliert. Ohne Ringerlaktat-Gabe kommt es nach der Schlaganfallinduktion zu einer minimalen Erniedrigung im Sauerstoffpartialdruck von 49,7 (24h davor) auf 43,4 (24h danach).

Die Werte der prozentualen Sauerstoffsättigung (Abbildung 34 B) unterliegen in beiden Gruppen starken Schwankungen. In der Ringerlaktat-Gruppe zeichnet sich eine Stunde nach MCAO eine Erhöhung in den prozentualen Sauerstoffsättigungswerten ab ( $p > 0,05$ ), die sich im Verlauf der Ischämie wieder normalisiert.

In der Gruppe ohne Ringerlaktat-Gabe ist eine Stunde nach der Schlaganfallinduktion die prozentuale Sauerstoffsättigung erniedrigt und fällt innerhalb der nächsten 20 Stunden weiter auf einen Wert von 71,7 %. Sie ist damit gegenüber dem Ausgangswert stark erniedrigt ( $p < 0,05$ ).

Abbildung 35 fasst die Ergebnisse zu den Hämoglobin- und der Hämatokrit-Werten zusammen.



**Abbildung 35: Hämoglobin- und Hämatokrit-Werte im venösen Blut von Mäusen vor und nach Schlaganfall mit und ohne Ringerlaktat-Gabe.** Vergleich (A) der Hämoglobin- und (B) der Hämatokrit-Werte mit und ohne RL-Gabe. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Tiere in diesem Versuch an. Mittelwert  $\pm$  SD.

Auch in dieser Studie unterliegen der Hämoglobin- und der Hämatokrit-Wert keinen starken Schwankungen und befinden sich im Normbereich. Ein Einfluss von Ringerlaktat auf diese Parameter kann hier ebenfalls ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse der venösen Blutgasanalyse zeigen, dass die Gabe von Ringerlaktat das Ausbilden einer Azidose verzögert und sich das venöse Blut nicht eignet, um Parameter wie den  $pO_2$ -Gehalt oder die  $sO_2$ -Sättigung zu bestimmen

## 5.2 Validierung des Schlaganfallmodells

In den nachfolgenden Experimenten sollte zunächst das proximale Schlaganfallmodell permanent und transient untersucht werden. Hierfür wurden verschiedene Parameter, wie die Größe des Schlaganfalls oder die metabolischen Veränderungen im Gehirn nach einer Ischämie untersucht. In einem weiteren Teil wurde die Beeinträchtigung der Tiere in Motorik und Kognition durch verschiedene Verhaltenstests untersucht.

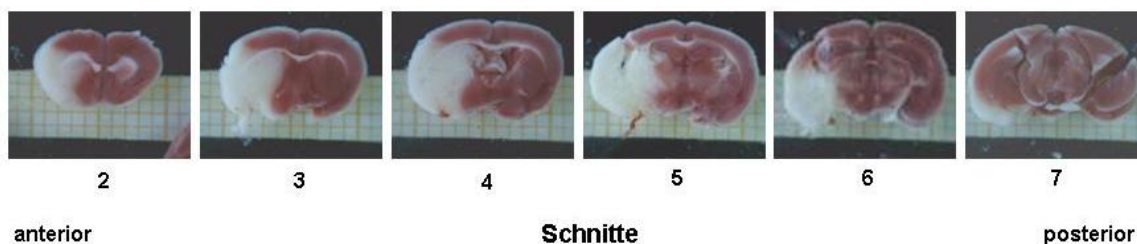
Mäuse, bei denen die mittlere cerebrale Arterie nicht verschlossen wurde und die beim Anfärben der Schnitte daher keinen Schlaganfall zeigten, sind in den Kapiteln 5.2.1.2 und 5.2.1.3 mit Schein-OP (scheinoperiert) bezeichnet.

### 5.2.1 Charakterisierung des ischämischen Schadens im Gehirn durch einen permanenten Schlaganfall

#### 5.2.1.1 Berechnung der Schlaganfallgröße

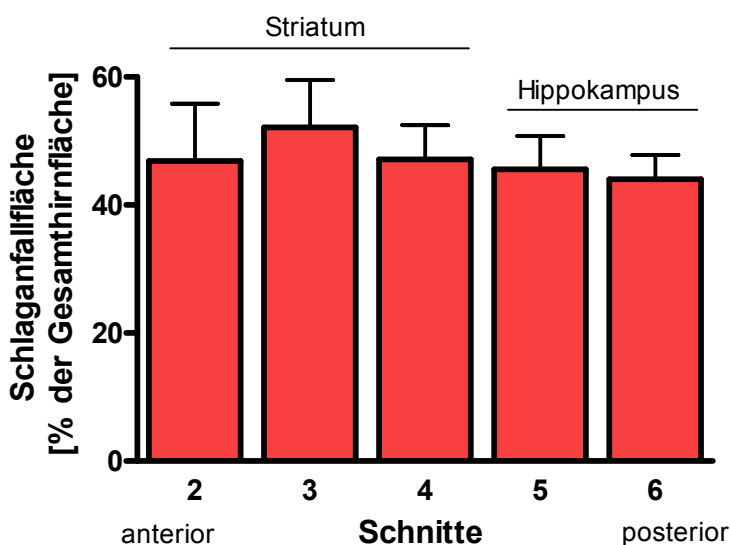
Bereits drei Stunden nach Okklusion der MCA kann man von einer permanenten Ischämie ausgehen (Woodruff et al. 2011). Der Infarkt ist gekennzeichnet durch ein klares Kerngebiet (core) und eine sich entwickelnde Penumbra. In den folgenden Versuchen konnten nach 24 Stunden deutlich das Striatum als Core und der Hippokampus als Penumbra mittels TTC-Färbung ausgewertet werden (siehe Kapitel 4.2.1.3).

In Abbildung 36 sind Fotos der Hirnschnitte einer Maus exemplarisch für alle Tiere mit permanenter Ischämie abgebildet.



**Abbildung 36: Darstellung der permanenten Ischämie anhand von Hirnschnitten 24 Stunden nach der Induktion mittels TTC-Färbung.** Von links nach rechts sind die Hirnschnitte 2-7 abgebildet. Die Schnitte 2-4 geben den Bereich des Striatums wieder, die Schnitte 5 und 6 den Hippokampus.

Abbildung 36 zeigt, dass durch die TTC-Färbung der Infarkt als weiße Fläche ungefärbt bleibt, wohingegen die gesunde Hemisphäre, mit den noch aktiven Mitochondrien, rot gefärbt wird. Abbildung 37 gibt die Berechnung der Infarktfläche wieder.



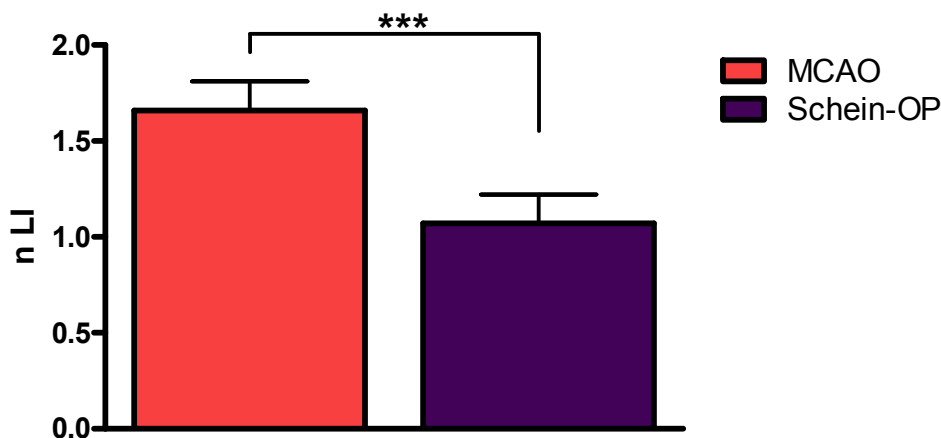
**Abbildung 37: Berechnung der Schlaganfallfläche pro Hirnschnitt.** n=7, Mittelwert  $\pm$  SD.

Man sieht, dass durch einen permanenten Schlaganfall ca. 44-52 % des Gesamthirns ischämisch ist. Der Infarkt erstreckt sich vom Striatum (Schnitte 2-4) bis hin zum Hippokampus (Schnitte 5 und 6) und es gibt keine Unterschiede zwischen den beiden Hirnregionen.

### 5.2.1.2 Beeinflussung der permanenten Ischämie auf motorische und kognitive Fähigkeiten

Durch einen permanenten Schlaganfall zeigen Mäuse nach 24 Stunden optisch ein deutlich anderes Verhalten als gesunde oder scheinoperierte Mäuse. Gekennzeichnet ist dies vor allem durch eine schiefe Haltung zur linken Seite hin, durch einen starken Gewichtsverlust von 4-6 Gramm und ein struppiges Fell. Um diese subjektiven Eindrücke quantitativ zu dokumentieren, wurden verschiedene Verhaltenstest durchgeführt.

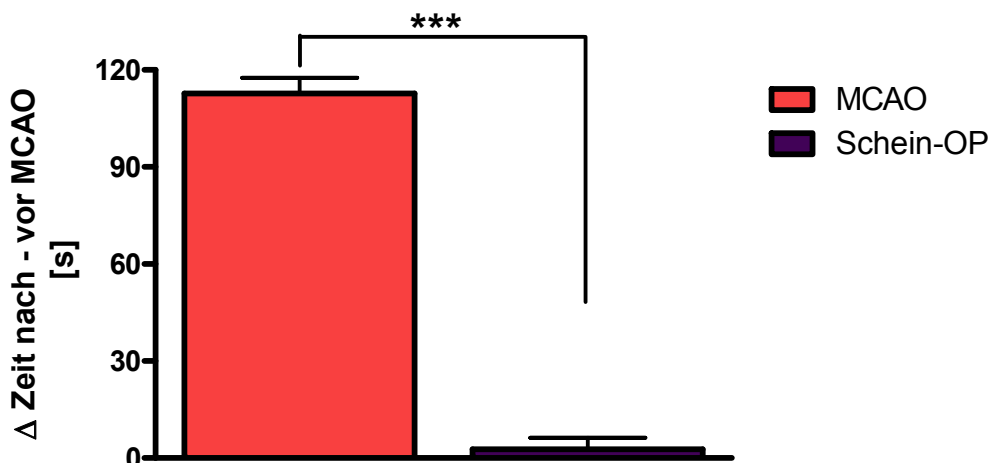
Sensomotorische Asymmetrien nach einem Schlaganfall werden mit dem Corner-Test erfasst (siehe Kapitel 4.2.2.1). In Abbildung 38 sind die Ergebnisse mit dem normalisierten Lateralitätsindex (nLI) wiedergegeben. Dieser wurde aus der Anzahl der Drehungen pro Seite vor und nach der MCAO berechnet.



**Abbildung 38: Ergebnisse des Corner-Tests im permanenten Schlaganfallmodell für MCAO- und scheinoperierte Tiere.** Der normalisierte Lateralitätsindex (nLI) wurde aus dem Lateralitätsindex vor und nach der MCAO berechnet. Die statistische Signifikanz ist als zweiseitiger, ungepaarter t-Test mit Welch's-Korrektur angegeben. MCAO n=5 und Schein-OP n=7, Mittelwert ± SD. \*\*\*p<0,001 vs. Schein-OP.

Man sieht, dass nach einem permanenten Schlaganfall die Mäuse sich stark zur ipsilateralen Seite drehen (nLI= 1,7 ± 0,2), wohingegen scheinoperierte Tiere nach dem Eingriff keine Prävalenz zu einer Seite hin zeigen (nLI= 1,1 ± 0,1).

Die motorische Fähigkeit der Maus, rückwärts aus einer Röhre heraus zu klettern, wird im so genannten Chimney-Test überprüft (siehe Kapitel 4.2.2.2). Die Daten sind in Abbildung 39 als Differenz der benötigten Zeit nach zu vor der MCAO dargestellt.



**Abbildung 39: Benötigte Zeit für den Chimney-Test nach einem permanenten Schlaganfall für die MCAO- und Schein-OP-Gruppe.** Die Zeit ist als Differenz zwischen den Werten nach zu vor der MCAO wiedergegeben. Die maximale Zeit für diesen Versuch betrug 120 s. Als statistische Signifikanz ist der zweiseitige, ungepaarte t-Test mit Welch's-Korrektur angegeben.  $n=4$ , Mittelwert  $\pm$  SD, \*\*\* $p<0,001$  vs. Schein-OP.

Abbildung 39 zeigt, dass Mäuse mit einem permanenten Verschluss der MCA sich sehr markant im Chimney-Test verschlechtern. Einige Schlaganfall-Tiere waren nicht mehr fähig rückwärts aus der Röhre herauszuklettern. Scheinoperierte Tiere brauchten durchschnittlich  $2,7 \pm 3,5$  s, um aus der Röhre hinaus zu klettern. Ein Unterschied in der hierfür benötigten Zeit vor zu nach der MCAO besteht nicht.

Die Balance und Koordination einer Maus kann durch den Rotarod-Test unter normalen und beschleunigenden Bedingungen getestet werden (siehe Kapitel 4.2.2.3). In Abbildung 40 sind die Ergebnisse als Differenz der Zeit nach zu vor dem Schlaganfall wiedergegeben.



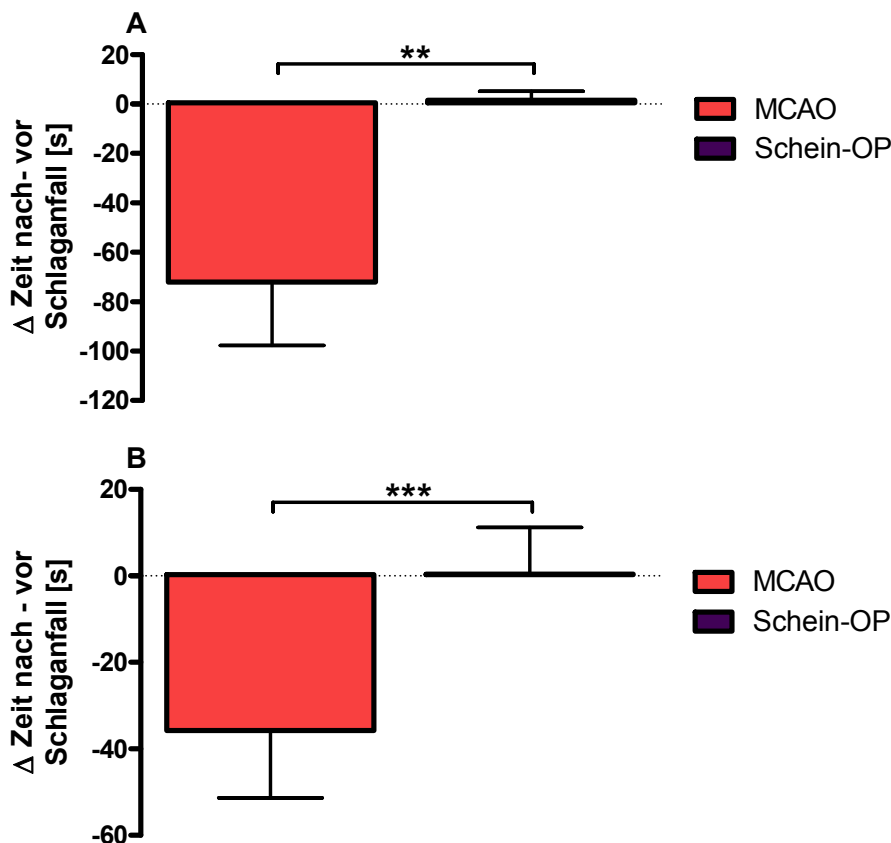


Abbildung 40: Differenz der Zeit nach zu vor dem permanenten Schlaganfall auf dem Rotarod unter normalen (A) und beschleunigenden (B) Bedingungen für MCAO- und Schein-OP-Tiere. Als statistische Signifikanz ist der zweiseitige, ungepaarte t-Test mit Welch's-Korrektur angegeben.  $n=6$ , Mittelwert  $\pm$  SD,  $**p<0,01$ ,  $***p<0,001$  vs. Schein-OP.

Abbildung 39 A veranschaulicht, dass ein permanenter Schlaganfall die Zeit auf dem Rotarod unter normalen Bedingungen deutlich von  $88 \pm 12$  s auf  $16 \pm 6$  s verkürzt. Das entspricht einer Differenz von  $-72 \pm 26$  s, während scheinoperierte Tiere keine Beeinflussung in Koordination und Motorik nach der Operation zeigen. Ein Vergleich zwischen beiden Gruppen nach der MCAO weist eine statistisch hohe Signifikanz auf. In Abbildung 39 B ist zu sehen, dass sich die Zeit auf dem beschleunigenden Rotarod in der MCAO-Gruppe mit einer Differenz der Zeit nach zu vor der MCAO von  $-38 \pm 16$  s verkürzt und scheinoperierte Tiere keinen Unterschied im Verhalten nach der Operation zeigen. Auch hier zeichnet sich nach dem Schlaganfall ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen ab ( $p<0,001$ ).

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine permanente Okklusion der Arteria cerebri media zu einer markant veränderten Koordination und Motorik in der Maus, wie mit dem Corner-, Chimney- und Rotarod-Test gezeigt, führt.

### 5.2.1.3 Metabolische Veränderung im Gehirn durch einen Schlaganfall

Durch eine Ischämie kommt es im Gehirn zu einer Unterbrechung der Energieversorgung und zu einem enormen Anstieg von Glutamat (siehe Kapitel 2.1). Um die „Schlaganfall-Parameter“, wie Glukose und Glutamat, extrazellulär im Verlauf eines Schlaganfalls zu dokumentieren, wurde in den folgenden Versuchen die Mikrodialysetechnik kombiniert mit der MCAO eingesetzt. Die Dialysatproben wurden anschließend, wie im Kapitel 4.2.4.1 beschrieben, analysiert.

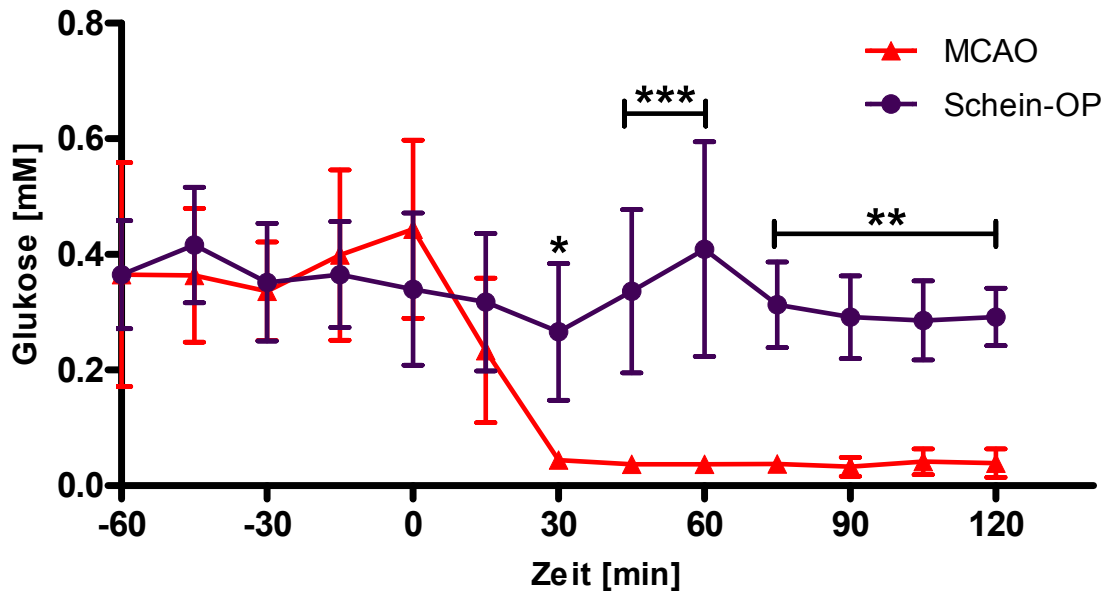
Die Mikrodialyse wurde 60 Minuten vor der Schlaganfallinduktion gestartet und lief während der Operation weiter. Anschließend wurden die Tiere zurück in ihren Käfig gebracht und die Messung für weitere 120 Minuten fortgesetzt. Scheinoperierte Tiere (Schein-OP) durchliefen die gleiche Prozedur, allerdings wurde die MCA nicht verschlossen.

Basalwerte für die Dialyseproben vor der MCAO, sowie die durchschnittliche Wiederfindungsrate der selbstgebauten Sonden für Glukose, Laktat und Glutamat sind in Tabelle 5 aufgeführt. Unterschiede in den Basalwerten sind auf die Varianzen in den selbstgebauten Sonden zurückzuführen.

**Tabelle 5. Basalwerte und mit der Wiederfindungsrate der Dialyseproben korrigierte Konzentrationen im Extrazellulärraum des Gehirns.** Für die Wiederfindungsrate wurde eine Testlösung mit 6 mM Glukose, 2,5 mM Laktat und 150  $\mu$ M Glutamat eingesetzt. Für die korrigierten Konzentrationen sind die entsprechenden Basalwerte mit der Wiederfindungsrate verrechnet worden. Mittelwert  $\pm$  SD.

	<b>Basalwert</b>	<b>n=</b>	<b>Wiederfindungsrate [%]</b>	<b>n=</b>	<b>korrigierte Konzentration</b>
Glukose	0,39 $\pm$ 0,03 mM	52	23,5	6	1,6 mM
Laktat	0,36 $\pm$ 0,07 mM	16	25,0	6	1,4 mM
Glutamat	4,40 $\pm$ 1,11 $\mu$ M	32	34,9	5	12 $\mu$ M

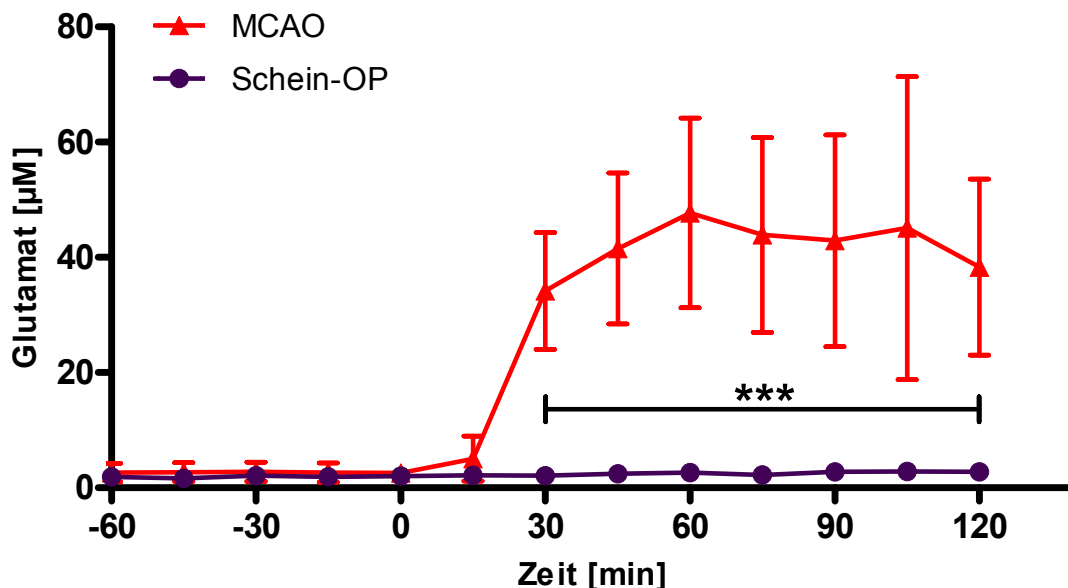
Abbildung 41 gibt den Zeitverlauf der Glukosekonzentrationen wieder.



**Abbildung 41: Zeitlicher Verlauf der Glukosekonzentration während eines Schlaganfalls.** Die Dialyse wurde 60 Minuten vor der Schlaganfallinduktion (Zeitpunkt 0) gestartet und danach für weitere 120 Minuten fortgeführt. Die statistische Signifikanz ist mit Zwei-Wege ANOVA und Bonferroni post-Test angegeben.  $n=4-6$ , Mittelwert  $\pm$  SD, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs. Schein-OP.

Bereits 30 Minuten nach der MCAO (Zeitpunkt 0) ist bei den MCAO-Tieren die Glukosekonzentration im Kerngebiet des Schlaganfalls auf 10 % der gemessenen Basalwerte (Zeitpunkt -60 bis 0 min) gesunken. Im weiteren Verlauf der Ischämie (Zeitpunkt 30-120 min) bleiben die Glukosewerte bei  $0,04 \pm 0,004$  mM unverändert erniedrigt und unterscheiden sich markant von den Glukosewerten der scheinoperierten Tiere ( $p < 0,001$ ). Nach 120 min, am Ende der Studie, zeigt sich in den Kontrollen keine Verbesserung in den Glukosespiegeln ( $p < 0,001$ ). Die geringe Reduktion der Glukosekonzentration (0-30 Minuten) in der Schein-OP-Gruppe ist auf die Operation und auf die anschließende Aufwachphase zurückzuführen. Im Verlauf der Dialyse normalisieren sich, im Gegensatz zur MCAO-Gruppe, die Glukosewerte ( $0,31 \pm 0,01$  mM) hier wieder.

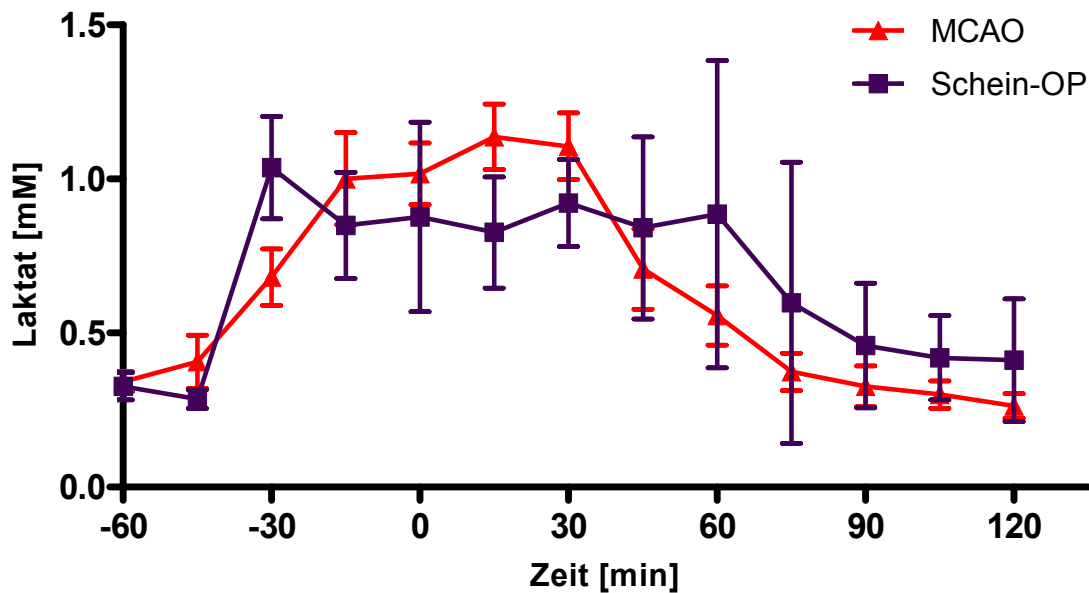
Abbildung 42 zeigt die Änderungen der Glutamatspiegel nach der MCAO.



**Abbildung 42: Veränderungen der Glutamatkonzentration im Verlauf einer MCAO.** Glutamat wurde zusammen mit Glukose aus den Dialysatproben detektiert. Die Dialyse wurde 60 Minuten vor der MCAO (Zeitpunkt 0) gestartet und für weitere 120 Minuten fortgesetzt. Die statistische Signifikanz ist angegeben mit Zwei-Wege ANOVA und Bonferroni post-Test.  $n=3-6$ , Mittelwert  $\pm$  SD,  $***p<0,001$  vs. Schein-OP.

Analog zur Glukosereduktion (Abbildung 41) steigt die Glutamatkonzentration im Kerngebiet der Ischämie 30 Minuten nach dem Verschluss der MCA rapide auf  $34,2 \pm 5,1$   $\mu\text{M}$  an. Im Verlauf der weiteren Dialyse verbleibt der Glutamatspiegel bei einem Durchschnittswert von  $41,9 \pm 1,7$   $\mu\text{M}$ . Dies entspricht einer 16 fachen Erhöhung der Glutamatkonzentration gegenüber den Basalwerten (Zeitpunkt -60 bis 0 min). In der Schein-OP-Gruppe ist die Glutamatkonzentration während der gemessen Zeit konstant niedrig, so dass sich die beiden Gruppen nach der MCAO hoch signifikant ( $p<0,001$ ) unterscheiden.

Abbildung 43 zeigt den zeitlichen Verlauf der Laktatkonzentration.



**Abbildung 43: Zeitlicher Verlauf der Laktatkonzentration während einer Ischämie.**  
MCAO n= 16 und Schein-OP n=3, Mittelwert ± SEM.

Bereits 30 Minuten vor der MCAO, zu Beginn der Narkose (Isofluran mit N<sub>2</sub>O/ O<sub>2</sub> Gas-Gemisch) und der Gefäßpräparation, steigen die Laktatkonzentrationen insgesamt um das 2 fache an. Für beide Gruppen ergibt sich eine durchschnittliche Konzentration von  $0,7 \pm 0,1$  mM. Nach der Operation (Zeitpunkt 0-120 min) ist im Dialysat nur ein langsamer Abfall der Laktatspiegel zu beobachten. Erst nach 120 min sind die Werte für die MCAO- ( $0,3 \pm 0,04$  mM) und die Schein-OP-Gruppe ( $0,4 \pm 0,03$  mM) vergleichbar mit den jeweiligen Basalwerten ( $0,3 \pm 0,02$  und  $0,4 \pm 0,04$ ).

## 5.2.2 Charakterisierung des ischämischen Schadens im Gehirn durch einen transienten Schlaganfall

### 5.2.2.1 Berechnung der Schlaganfallgröße

Bei einer transienten Ischämie von 90 Minuten und anschließender Reperfusion ist zu erwarten, dass der Infarkt deutlich kleiner ausfällt, als im permanenten Modell (5.2.1.1). Auch hier sind Tiere, bei denen die mittlere cerebrale Arterie nicht verschlossen wurde und die beim Anfärben der Schnitte daher keinen Schlaganfall zeigten, als Schein-OP (scheinoperiert) bezeichnet.

Der Infarkt entsteht hier vor allem im Versorgungsgebiet der MCA (Core) und breitet sich stark individuell von dort aus (Penumbra). Die Ergebnisse hierzu sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

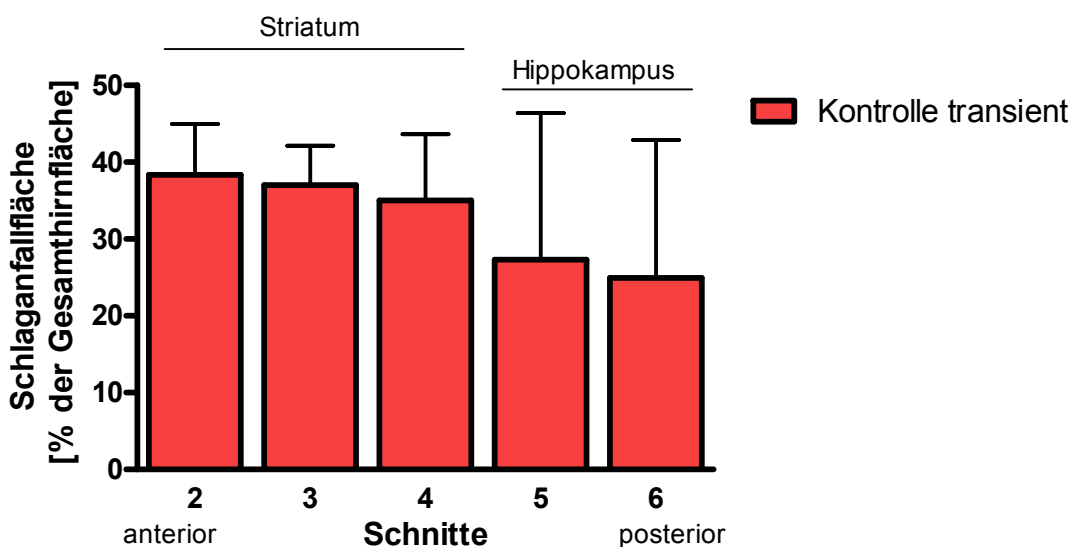


Abbildung 44: Schlaganfallfläche nach einer transienten Ischämie. n=7, Mittelwert  $\pm$  SD.

Abbildung 44 zeigt, dass durch eine transiente Ischämie zwischen 19 und 38 % des Vorderhirns geschädigt sind. Der Schlaganfall zieht sich vom Striatum bis in den Hippokampus und ist besonders im vorderen Teil des Striatums stark ausgeprägt, wohingegen der Hippokampus stark variabel involviert ist.

Vergleicht man die Schlaganfallfläche der permanenten mit der transienten Ischämie (siehe Abbildung 45), so sieht man, dass durch eine 90 minütige Okklusion der MCA die Infarktgröße im Striatum zwischen 10 und 20 % reduziert ist (Abbildung 45 A). Im Hippokampus, der zur so genannten Penumbra gehört, ist trotz der Variabilität der Schlaganfallfläche im transienten Modell, eine Reduktion im Ausmaß des Schlaganfalls um 40 % im Vergleich zum permanenten Modell zu sehen (Abbildung 45 B).

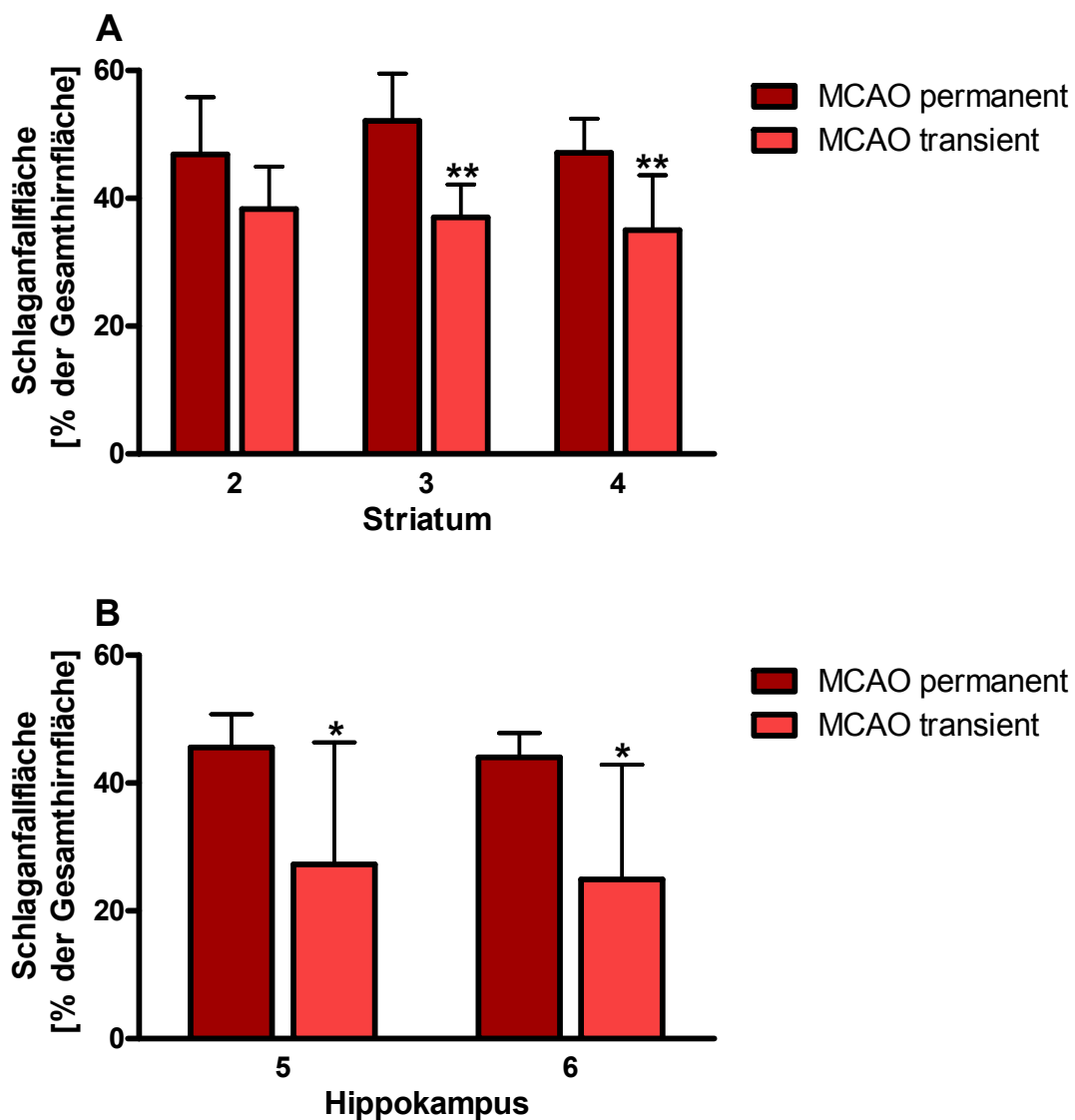
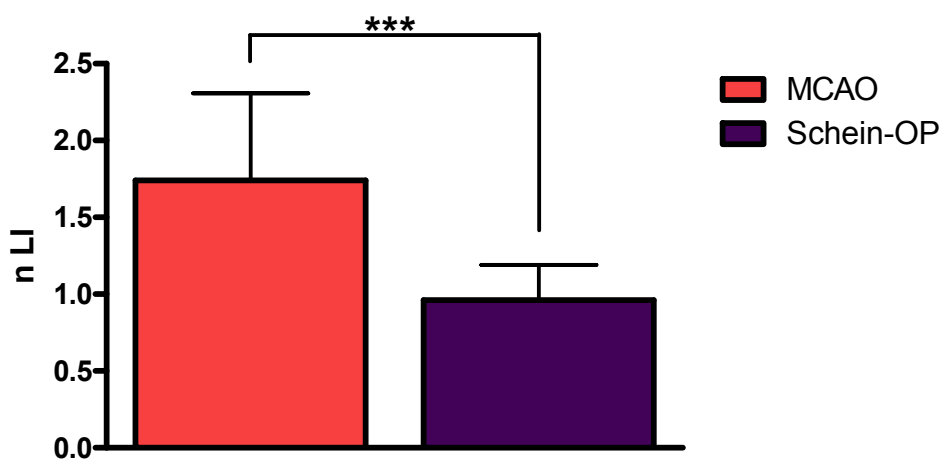


Abbildung 45: Vergleich der Schlaganfallfläche im Striatum (A) und Hippokampus (B) nach einer permanenten und transienten Ischämie. Die statistische Signifikanz ist mit Zwei-Wege ANOVA und Bonferroni post-Test angegeben. n=7, Mittelwert  $\pm$  SD.

### 5.2.2.2 Beeinflussung der transienten Ischämie auf motorische und kognitive Fähigkeiten

Um die kognitiven und motorischen Defizite nach der transienten Ischämie zu charakterisieren, wurden die Verhaltenstests unter den gleichen Bedingungen wie im permanenten Schlaganfallmodell (5.2.1.2) durchgeführt.

Abbildung 46 zeigt die Ergebnisse des Corner-Tests, der die posturalen Asymmetrien nach einem Schlaganfall veranschaulicht. Der normalisierte Lateralitätsindex (nLI) wurde aus der Anzahl der Drehungen pro Seite vor und nach der MCAO berechnet (siehe Kapitel 4.2.2.1).

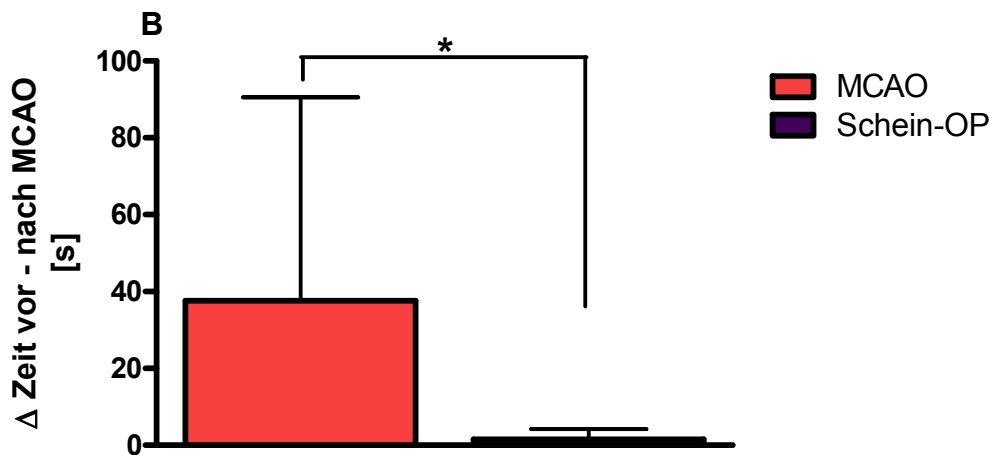


**Abbildung 46: Ergebnisse des Corner-Tests für die MCAO- und Schein-OP-Gruppe im transienten Schlaganfall-Modell.** Der normalisierte Lateralitätsindex (nLI) wurde aus dem Lateralitätsindex vor und nach der MCAO berechnet. Die statistische Signifikanz ist als zweiseitiger, ungepaarter t-Test mit Welch's-Korrektur angegeben. MCAO n=15 und Schein-OP n=18, Mittelwert ± SD, \*\*\*p<0,001 vs. Schein-OP.

Man sieht, dass auch bei der transienten Okklusion der MCA die Tiere eine hohe Tendenz ( $nLI = 1,7 \pm 0,6$ ) zur ipsilateralen Seite aufweisen, während die scheinoperierte Gruppe keine Veränderung zeigt ( $nLI = 0,8 \pm 0,2$ ).



In Abbildung 47 ist die benötigte Zeit für den Chimney-Test als Differenz der Zeit nach zu vor dem Schlaganfall aufgetragen:

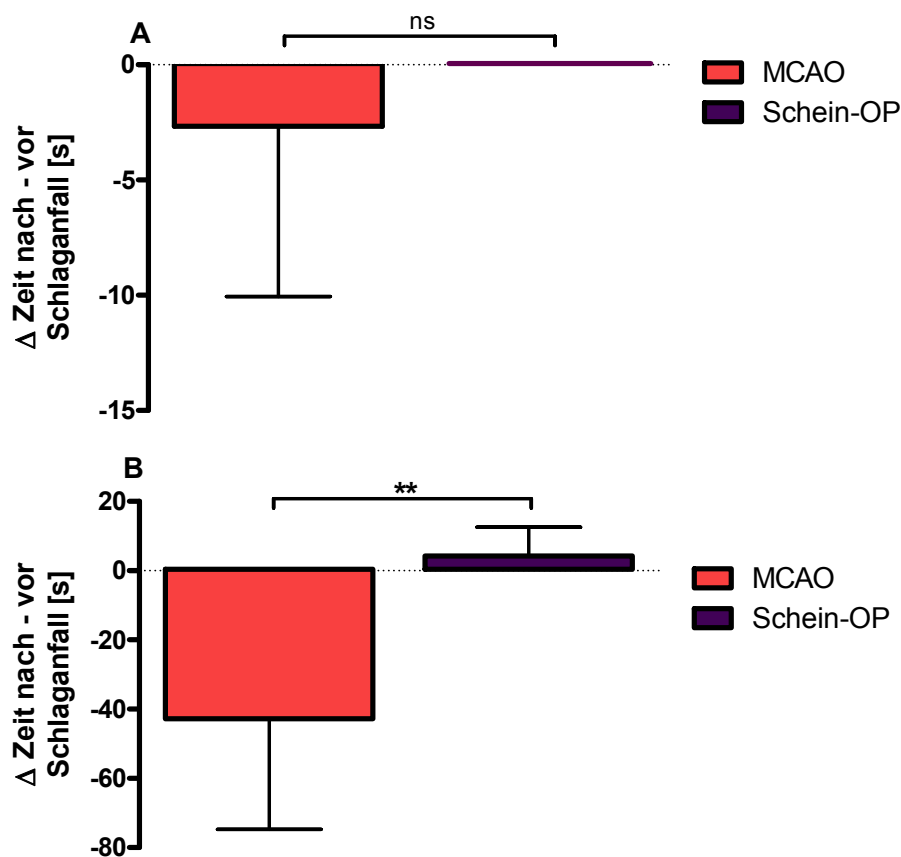


**Abbildung 47: Differenz der Zeit im Chimney-Test für die Schlaganfall- und Schein-OP-Tiere im transienten Schlaganfall-Modell.** Die Zeit ist als Differenz zwischen den Werten nach zu vor der MCAO wiedergegeben. Die maximale Zeit für diesen Versuch betrug 120 s. Als statistische Signifikanz ist der zweiseitige, ungepaarte t-Test mit Welch's-Korrektur angegeben. MCAO n=10, Schein-OP n=11, Mittelwert  $\pm$  SD, \*p < 0,05.

Der Chimney-Test zeigt, dass die Tiere der MCAO-Gruppe  $37,6 \pm 53$  s benötigten, um aus der Röhre heraus zu klettern. 30 % der Tiere waren nicht in der Lage in der vorgegebenen Zeit von 120 s aus der Röhre zu kommen. Die Tiere der scheinoperierten Gruppe zeigen nach der Operation keinen Unterschied in der benötigten Zeit.

Die Motorik und die Koordination wurden auch im transienten Modell mit dem Rotarod-Test untersucht (siehe Kapitel 4.2.2.3). Abbildung 48 (A) zeigt die Ergebnisse unter normalen (4 rpm) und Abbildung 48 (B) unter beschleunigenden (4-40 rpm) Bedingungen.

In Abbildung 48 A sieht man, dass die MCAO-Tiere sich auf dem Rotarod unter normalen Bedingungen durch den Infarkt nur minimal verschlechtern (Differenz von nach zu vor dem Schlaganfall  $-2,7 \pm 7,4$  s). Scheinoperierte Tiere dagegen erreichen sowohl vor, als auch nach der Operation die Maximalzeit von 120 s, daraus ergibt sich eine Differenz von null. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen nach dem Schlaganfall ist gering ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 48: Differenz der Zeit nach zu vor dem transienten Schlaganfall auf dem Rotarod unter normalen (A) und beschleunigenden (B) Bedingungen für die MCAO- und Schein-OP-Gruppe.** Als statistische Signifikanz ist für den Rotarod-Test unter normalen Bedingungen der Mann-Whitney Test und für den Test unter beschleunigenden Bedingungen der ungepaarten zweiseitigen t-Test mit Welch's Korrektur angegeben. MCAO n=10 und Schein-OP n=6, Mittelwert  $\pm$  SD, ns= nicht signifikant, \*\*p 0,01< vs. Schein-OP.

Führt man den Rotarod-Test unter beschleunigenden Bedingungen durch (Abbildung 48 B), so kommt es in der MCAO-Gruppe nach dem Schlaganfall zu einer Verkürzung der Zeit von  $-43 \pm 32$  s auf dem Rotarod im Vergleich zum gesunden Zustand. Die Scheinoperierten Tiere hingegen weisen eine leichte Verbesserung im zweiten Versuch auf, was wahrscheinlich auf einen Lerneffekt beruht. Dadurch unterscheiden sich die MCAO- und die Schein-OP-Gruppe nach dem Schlaganfall deutlich ( $p < 0,01$ ).

Zusammenfassend kann man sagen, dass auch im transienten Modell sich die Schlaganfall-Tiere gegenüber den scheinoperierten Tieren deutlich verschlechtern, aber die Motorik und Koordination hier (siehe Abbildung 47 und Abbildung 48 A) nicht so stark beeinträchtigt ist, wie im permanenten Modell (siehe Kapitel 5.2.1.2).

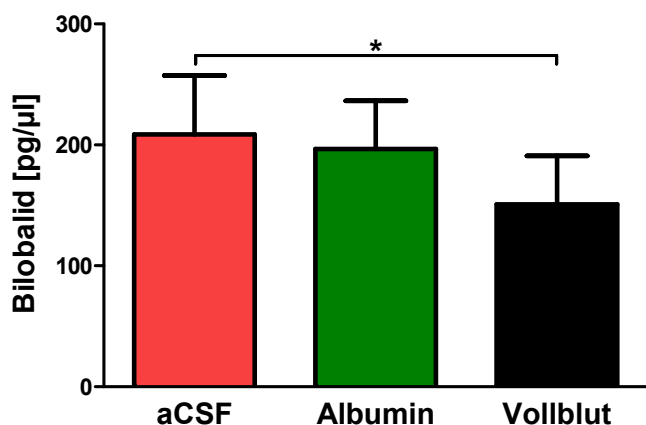
### 5.3 Detektion von Bilobalid im Mikrodialysedialysat mit Hilfe der LC-MS

Dieser Teil der Arbeit ist eine Kooperation mit dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavec, Pharmazeutische Chemie, Goethe Universität Frankfurt am Main. Die Vermessung und analytische Auswertung der Dialysatproben erfolgte durch Herrn Mag.pharm Dr. Mario Wurglics und Herrn Apotheker Dr. Christian Ude.

Da Bilobalid in zahlreichen Studien neuroprotektive Eigenschaften aufwies (siehe Kapitel 2.3.3.1), sollte nun zuerst untersucht werden, in welcher Konzentration Bilobalid durch eine Applikation von 10 mg/kg i.p. im gesunden Striatum von Mäusen ankommt und inwieweit sich die Hirnspiegel der Substanz durch einen Schlaganfall ändern. Für diese Versuche wurden als erstes die Wiederfindungsrate von Bilobalid in künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) bestimmt und anschließend die Proben über die Technik der Mikrodialyse gewonnen und mittels LC-MS ausgewertet.

#### 5.3.1 Wiederfindungsrate von Bilobalid

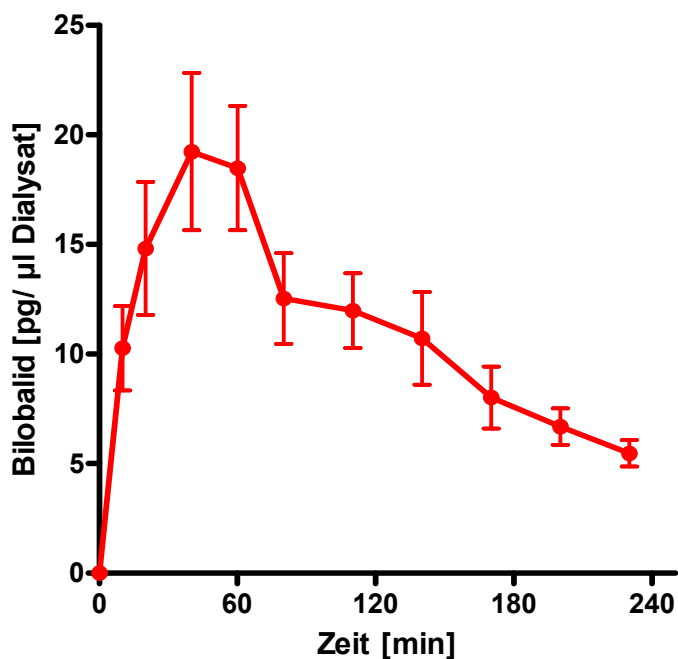
Um die Wiederfindungsrate von Bilobalid zu quantifizieren, wurden die Sonden in eine 10 µM Bilobalidlösung mit und ohne 0,5 mM Albumin gestellt und mit aCSF perfundiert. Nach zwei Stunden Perfusion liegt die durchschnittliche Konzentration von Bilobalid in aCSF bei  $209 \pm 49$  pg/µl, dies entspricht einer Wiederfindungsrate von 6,4 % für Bilobalid (Molekulargewicht 326,3 g/mol) (siehe Abbildung 49). Durch das Hinzufügen von Albumin liegt die durchschnittliche Konzentration von Bilobalid im Dialysat bei  $197 \pm 40$  pg/µl, dies bedeutet eine Wiederfindungsrate von 6,0 %. Die Zugabe von Albumin als Protein hatte also keinen Effekt auf die detektierte Bilobalidkonzentration. Eine weitere Testlösung besteht aus frischgewonnenem murinen Vollblut, das mit Citrat im Verhältnis 1:9 versetzt wurde, um die Blutgerinnung zu verhindern. Die Wiederfindungsrate von  $151 \pm 40$  pg/µl ( $\approx 4,6$  %) ist hier im Vergleich zur aCSF-Lösung signifikant erniedrigt.



**Abbildung 49: Wiederfindungsrate von Bilobalid (10 µM) in künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF), mit und ohne 0,5 mM Albumin, sowie in Vollblut.** Als statistische Signifikanz ist Ein-Wege ANOVA mit Bonferroni post-Test angegeben. n=6, Mittelwert ± SD, \*p < 0,05 vs. aCSF.

### 5.3.2 Extrazelluläre Konzentration von Bilobalid im gesunden Maushirn

Um die Permeabilität und Bioverfügbarkeit von Bilobalid in der Extrazellulärflüssigkeit des Gehirns zu analysieren, wurden gesunden Mäusen 10 mg/kg i.p. appliziert. In Abbildung 50 sind die unkorrigierten Dialysatkonzentrationen von Bilobalid zu sehen.



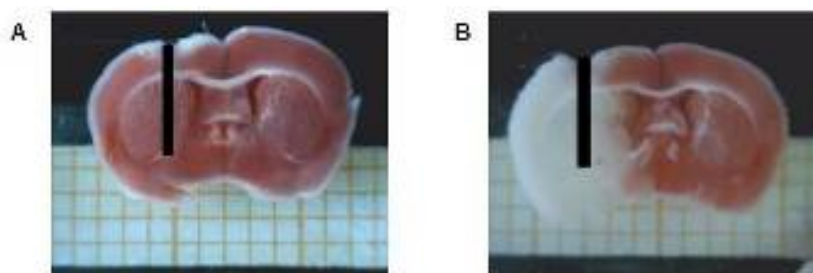
**Abbildung 50: Extrazelluläre Konzentration von Bilobalid im Striatum der Maus.** Der Zeitpunkt 0 steht für die Injektion von Bilobalid (10 mg/kg i.p.). n=6, Mittelwert ± SEM.

Bereits 10 Minuten nach der Applikation ist Bilobalid im Dialysat detektierbar und erreicht nach 40 min eine maximale Konzentration von  $19,2 \pm 3,6$  pg/ $\mu$ l. Nach 4 Stunden fällt die Konzentration auf  $5,5 \pm 0,6$  pg/ $\mu$ l. Korrigiert man die experimentell bestimmten Werte mit der *in vitro* gemessenen Wiederfindung (6,4 %, siehe Kapitel 5.3.1), sind die Dialysatspiegel äquivalent zu einer extrazellulären Konzentration im Gehirn von  $0,92$   $\mu$ M 40 Minuten nach Injektion und am Ende des Versuches von  $0,26$   $\mu$ M.

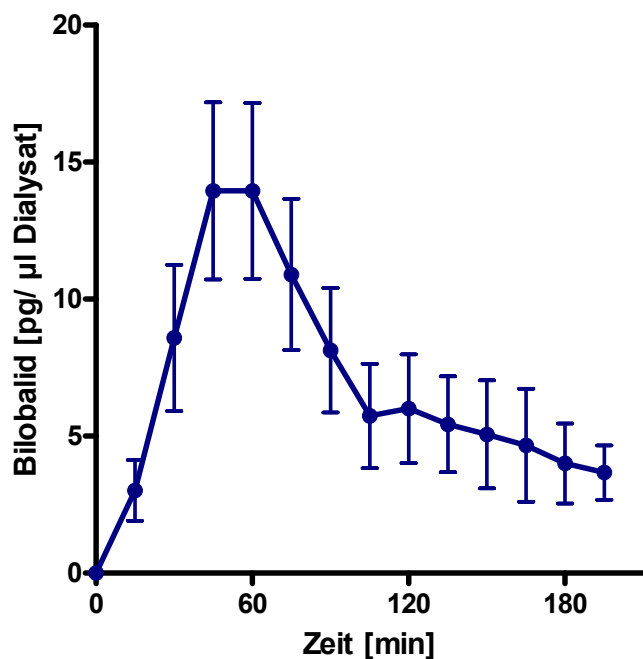
Geht man von einer Kinetik erster Ordnung aus, so kann eine Halbwertszeit für Bilobalid von ungefähr 87 Minuten berechnet werden (Daten nicht gezeigt). Der Plasmaspiegel von Bilobalid beträgt 60 Minuten nach der Applikation  $1,92$  mg/l. Daraus lässt sich ein Plasma-Extrazellulärflüssigkeit-Verhältnis von 6,4:1 berechnen.

### 5.3.3 Extrazelluläre Konzentration von Bilobalid im ischämischen Gewebe

Nachdem die Konzentration von Bilobalid im gesunden Gehirn bestimmt wurde, war das Ziel der nächsten Versuche zu analysieren, wie viel Bilobalid bei einem Schlaganfall im ischämischen Gewebe ankommt. Hierfür wurden in einer ersten Versuchsreihe  $10$  mg/kg Bilobalid i.p. eine Stunde vor der MCAO appliziert. Abbildung 51 zeigt schematisch die Position der Mikrodialysesonde im gesunden (A) und im ischämischen Striatum (B) und Abbildung 52 die unkorrigierten gemessenen Bilobalidkonzentrationen vor und nach der MCAO.



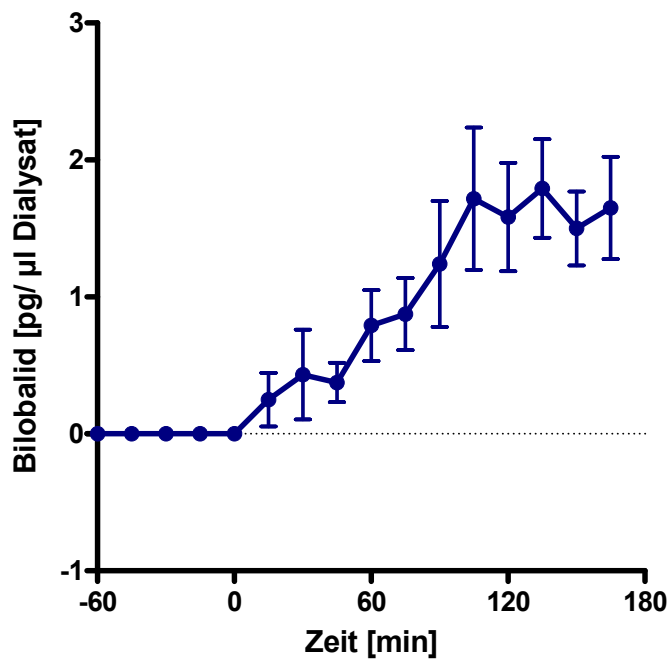
**Abbildung 51: Position der Mikrodialysesonde im Gehirn der Maus.** Die Hirnschnitte sind mit TTC angefärbt. (A) repräsentiert einen gesunden und (B) einen ischämischen Hirnschnitt 24 h nach dem Schlaganfall. Der schwarze Balken stellt die Position der Mikrodialysesonde dar.



**Abbildung 52: Konzentration von Bilobalid im Striatum während des Schlaganfalls.** Bilobalid (10 mg/kg) wurde zum Zeitpunkt 0 i.p. gegeben. 60 min nach der Applikation wurde die Arteria cerebri media verschlossen und die Dialyse weitergeführt. n=6, Mittelwert  $\pm$  SEM.

Die erste Phase der Dialysekurve ist ähnlich wie in gesunden Mäusen (vgl. Abbildung 50). Die maximale Konzentration von Bilobalid wird 60 Minuten nach Applikation mit  $14,0 \pm 3$  pg/ $\mu$ l erreicht, das entspricht  $0,67 \mu$ M (korrigiert mit der *in vitro* Wiederfindungsrate, siehe Kapitel 5.3.1) zum Zeitpunkt der Schlaganfallinduktion im Gehirn. Drei Stunden nach dem Schlaganfall kann Bilobalid weiterhin mit einer Konzentration von  $0,19 \mu$ M detektiert werden. Die gemessenen Gehirnspiegel von Bilobalid sind gegenüber denen in gesunden Mäusen (vgl. Abbildung 50) nicht signifikant erniedrigt (Zwei-Wege ANOVA mit Bonferroni post-Test,  $p > 0,05$ ).

In einer zweiten Versuchsreihe wurden 10 mg/kg Bilobalid eine Stunde nach der Induktion eines Schlaganfalls i.p. appliziert, um den Influx der Substanz in das ischämische Gewebe zu bestimmen. Abbildung 53 zeigt, dass das Anfluten von Bilobalid in das Striatum nach einem Schlaganfall erfolgt, aber die Bilobalidkonzentration niedriger als im gesunden Gewebe ist.



**Abbildung 53: Influx von Bilobalid in das ischämische Striatum.** Die Arteria cerebri media wurde zum Zeitpunkt -60 Minuten verschlossen und Bilobalid (10 mg/kg) 60 Minuten später, zum Zeitpunkt 0, appliziert. n=6, Mittelwert  $\pm$  SEM.

Bereits 15 Minuten nach der Applikation (Zeitpunkt 0) ist auch hier Bilobalid mit einer Konzentration von  $0,01 \mu\text{M}$  im Dialysat detektierbar. Trotz des Verschlusses der Arteria cerebri media steigt die Konzentration während der nächsten 120 Minuten im Dialysat auf ein Maximum von  $1,8 \pm 0,1 \text{ pg}/\mu\text{l}$  ( $0,08 \mu\text{M}$ , siehe Kapitel 5.3.1) und bleibt auf einem Plateau bis zum Ende der Messung nach 180 Minuten.

## **5.4 Einsatz von Neuroprotektiva bei einem Schlaganfall am Beispiel von Bilobalid**

Zahlreiche Studien belegen für Bilobalid *in vitro* eine neuroprotektive Eigenschaft (siehe Kapitel 2.3.3.1). Im vorhergehenden Kapitel konnte gezeigt werden, dass Bilobalid nach einer i.p. Applikation die Blut-Hirn-Schranke relativ schnell überwindet und sowohl im gesunden, wie auch im ischämischen Gehirn detektierbar ist. Weitere Untersuchungen mit Bilobalid zur Beeinflussung des ischämischen Infarktes sollten daher im Folgenden durchgeführt werden.

### **5.4.1 Beeinflussung der Schlaganfallgröße nach einer permanenten Ischämie durch Bilobalid**

Zunächst sollte die Dosis von Bilobalid gefunden werden, welche bei einer i.p. Applikation eine Stunde vor Schlaganfall in der Maus noch einen neuroprotektiven Effekt im Gehirn zeigt (siehe Kapitel 5.4.1.1). Anschließend wurde das Applikationszeitfenster erweitert, um zu untersuchen, ob Bilobalid bei optimaler Dosis, auch nach einem Schlaganfall noch Einfluss auf die Infarktgröße hat (siehe Kapitel 5.4.1.2).

In Abbildung 54 ist eine Übersicht der eingesetzten Dosen mit der Applikation eine Stunde vor MCAO wiedergegeben.



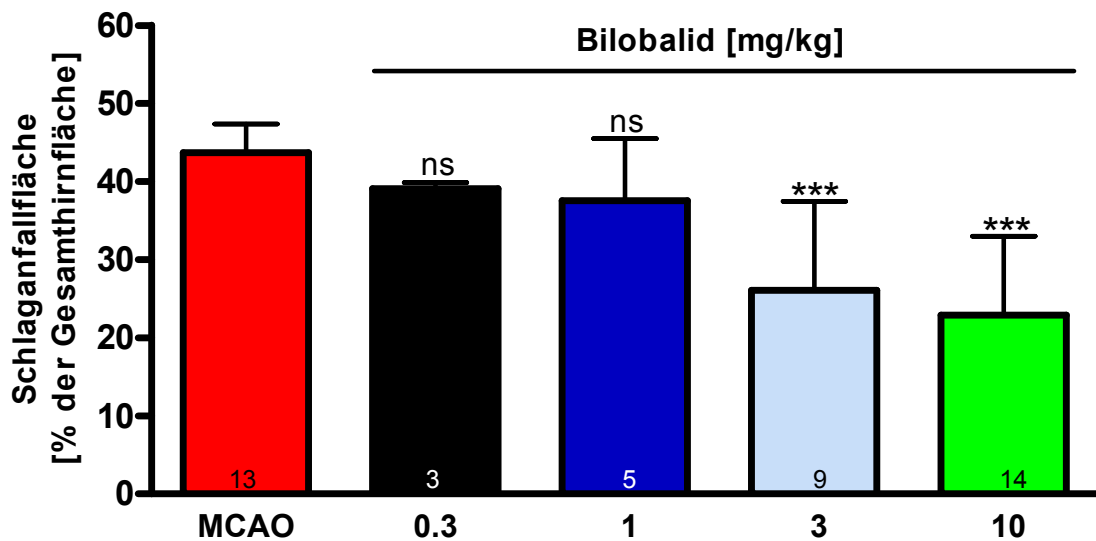
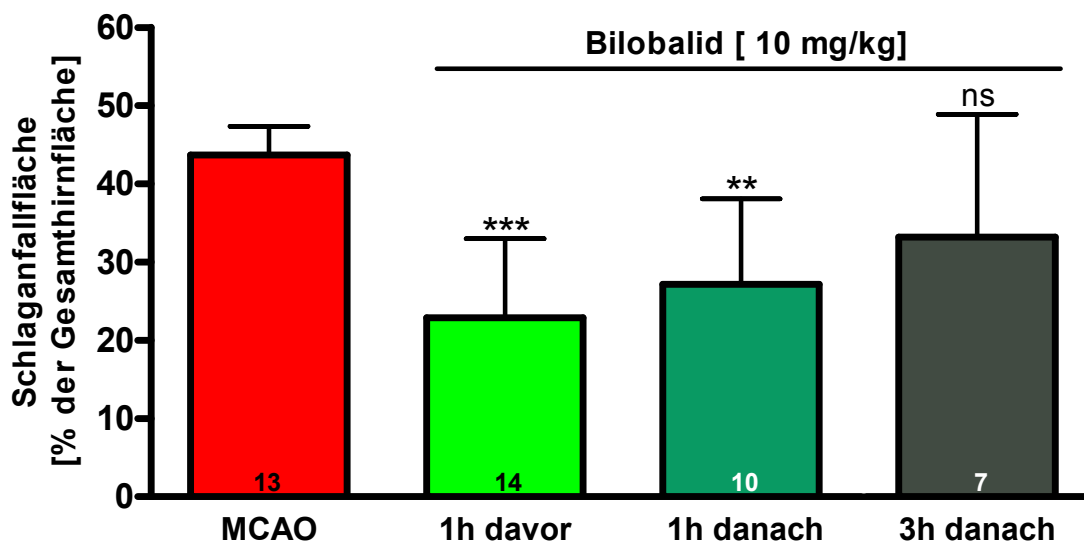


Abbildung 54: Schlaganfallfläche pro Maus bezogen auf Gesamtfläche des Vorderhirns für die Dosen 0,3-10 mg/kg Bilobalid, appliziert eine Stunde vor dem Schlaganfall und der MCAO-Gruppe. Die Nummern in den Balken geben die Anzahl der eingesetzten Tiere pro Gruppe an. Mittelwert der Schlaganfallfläche pro Maus  $\pm$  SD. Die statistische Signifikanz ist als Ein-Wege ANOVA mit Dunnett's post-Test angegeben. ns= nicht signifikant, \*\* $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$  vs. MCAO.

Die höchste eingesetzte Dosis von 10 mg/kg Bilobalid zeigt eine Reduktion des Infarkts von 48 % gegenüber den unbehandelten Tieren ( $p < 0,001$ ). Die mittlere Dosis (3 mg/kg) reduziert die Schlaganfallfläche gegenüber der MCAO-Gruppe um 40 % und zeigt somit auch eine starke neuroprotektive Wirkung ( $p < 0,001$ ). Eine weitere Senkung der Dosis auf 1 und 0,3 mg/kg erweist sich hingegen als nicht effektiv, um die Schlaganfallfläche zu verringern.

In dem getesteten Dosisintervall sind somit 10 mg/kg Bilobalid die optimale Dosis, um in einem weiteren Versuchsmodell zu überprüfen, ob eine Applikation der Substanz nach dem Schlaganfall, ebenfalls zu einer Reduktion der Infarktfläche führt. In Abbildung 55 sind die dazugehörigen Ergebnisse dargestellt.



**Abbildung 55: Schlaganfallfläche pro Maus bezogen auf Gesamtfläche des Vorderhirns für die Dosis 10 mg/kg Bilobalid, appliziert zu verschiedenen Zeitpunkten und der MCAO-Gruppe.** Die Nummern in den Balken geben die Anzahl der eingesetzten Tiere pro Gruppe an. Mittelwert der Schlaganfallfläche pro Maus  $\pm$  SD. Die statistische Signifikanz ist als Ein-Wege ANOVA mit Dunnett's post-Test angegeben. ns= nicht signifikant, \*\* $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$  vs. MCAO.

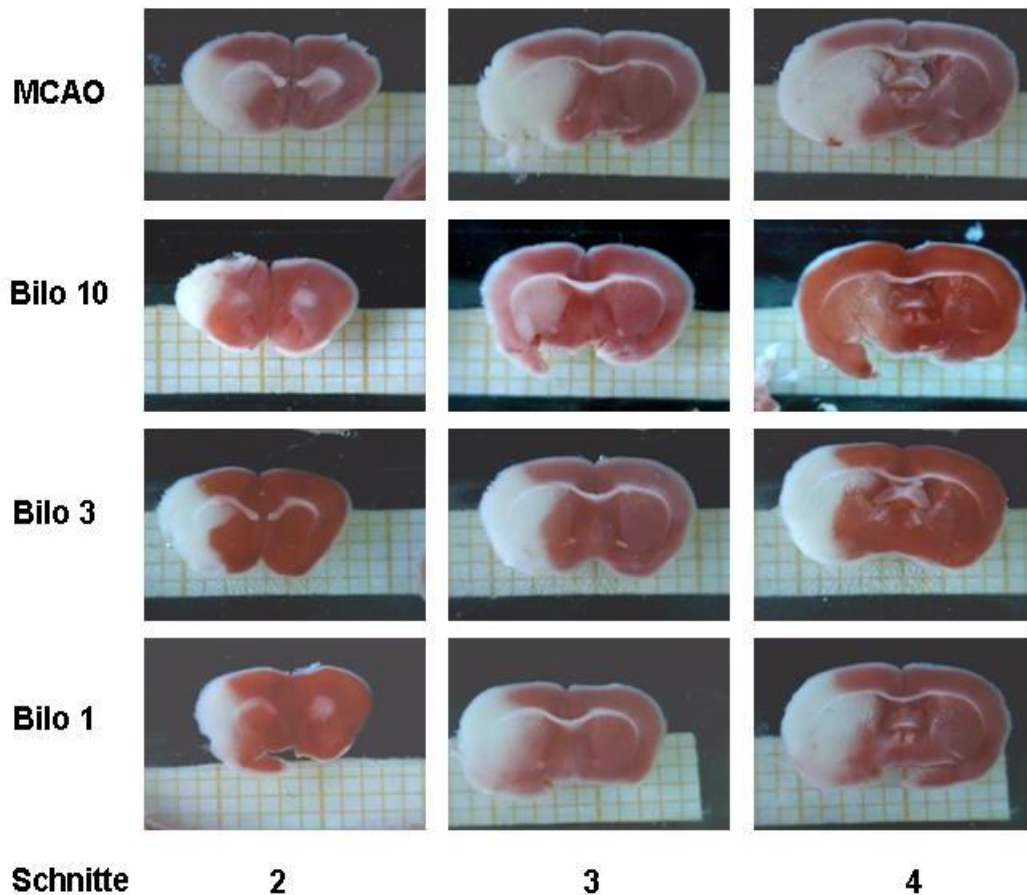
Man sieht, dass auch die Gabe von 10 mg/kg Bilobalid eine Stunde nach der MCAO, die Infarktfläche gegenüber der reinen Schlaganfall-Gruppe verringert ( $27 \pm 11$  vs.  $44 \pm 4$  %). Erweitert man den Zeitpunkt der Applikation auf drei Stunden nach der Schlaganfallinduktion, so erzielt man lediglich eine Reduktion der Schlaganfallfläche um 14 % ( $p > 0,05$ ), die vergleichbar stark wie bei der Applikation der Dosen 0,3-1 mg/kg eine Stunde vor der MCAO (Abbildung 54) ausgeprägt ist.

Es lässt sich also deutlich erkennen, dass Bilobalid das Gehirngewebe vor dem Ischämie-induzierten Zelltod zu schützen vermag. Dieser Schutz wird durch eine i.p. Applikation von 3-10 mg/kg Bilobalid eine Stunde vor, sowie durch die Gabe von 10 mg/kg bis zu einer Stunde nach Schlaganfall, erreicht.

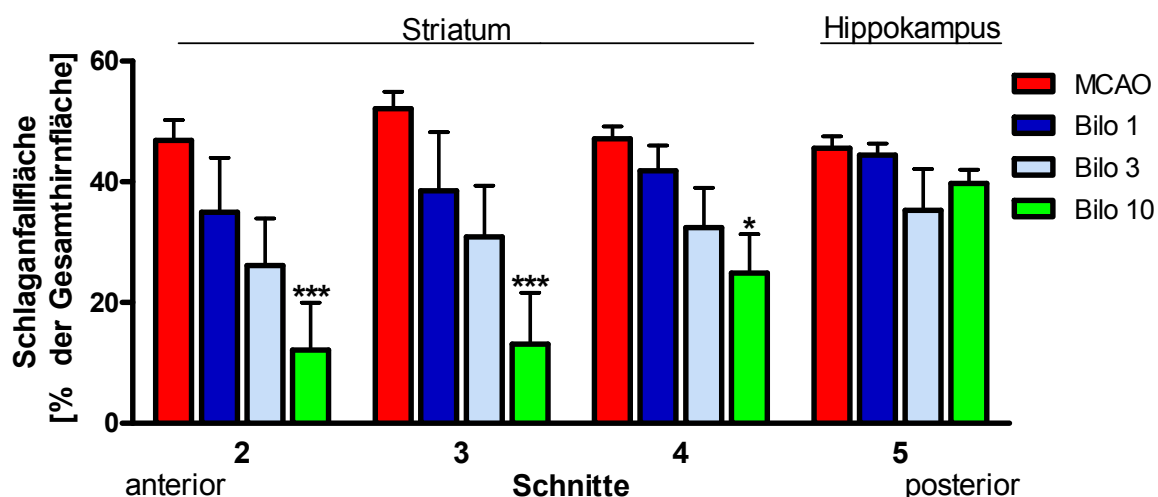
Um eine detailliertere Information über die genaue Lokalisation des Schutzeffektes von Bilobalid im Gehirngewebe zu erhalten, sind in den anschließenden Kapiteln die einzelnen Schlaganfallflächen getrennt für das Striatum (Schnitte 2-4) und den Hippokampus (Schnitte 5+6) dargestellt und berechnet.

#### 5.4.1.1 Dosisabhängigkeit der neuroprotektiven Effekte von Bilobalid

Abbildung 55 repräsentiert typische striatale Hirnschnitte der Schlaganfall-Gruppe und der Bilobalid-Gruppen mit den Dosen 1-10 mg/kg. Aus diesen, mit TTC angefärbten Schnitten, wurde die Infarktfläche berechnet, die in Abbildung 57 zu sehen ist.



**Abbildung 56: Repräsentative striatale Hirnschnitte der MCAO- und Bilobalid-Tiere mit den Dosen 1-10 mg/kg, appliziert eine Stunde vor der Schlaganfallinduktion.** Die Schnitte sind 24 h nach der MCAO mit TTC angefärbt worden. Die weiße Fläche stellt das Infarktgebiet und die rote Fläche das gesunde Areal dar. Auf der Skalierung entspricht ein Kästchen 1 mm<sup>2</sup>.



**Abbildung 57: Schlaganfallfläche pro Hirnschnitt, der eine Stunde vor Schlaganfall applizierten Bilobalid-Dosen 1-10 mg/kg, sowie der unbehandelten Tiere.** Die statistische Signifikanz ist mit Zwei-Wege ANOVA und Bonferroni post-Test angegeben.  $n=5-7$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  und \*\*\*  $p < 0,001$  vs. MCAO.

Durch eine Applikation von 10 mg/kg Bilobalid i.p. reduziert sich die Schlaganfallfläche im vorderen Teil des Striatums (Schnitt 2 und 3) drastisch gegenüber der MCAO-Gruppe um ca. 75 %. Für diese Region ergibt sich somit eine Infarktfläche von  $12 \pm 8$  %, bezogen auf die Gesamthirnfläche. Im posterioren Verlauf der Hirnschnitte zeigt sich eine Reduktion des Infarktes um 47 % (Schnitt 4,  $p < 0,05$ ), während im Hippokampus nur eine tendenzielle Minimierung des Infarkts zu sehen ist. Die mittlere Dosis von 3 mg/kg zeigt einen ähnlichen Verlauf. Im anterioren Teil des Striatums (Schnitt 2) wird die Schlaganfallfläche um 45 % auf  $26 \pm 8$  % der Gesamthirnfläche reduziert und eine Tendenz, das Ausmaß eines Infarktes zu reduzieren, zieht sich über den weiteren Verlauf der Hirnschnitte hinweg. Im Bereich des Hippokampus liegt dann eine Reduktion der Schlaganfallfläche von nur noch um 24 % gegenüber den unbehandelten Tieren vor. Auch die Dosis mit 1 mg/kg zeigt im vorderen Teil des Striatums (Schnitte 2 und 3) eine Tendenz (25 %), die Größe des Infarktes zu reduzieren, wohingegen im Hippokampus die Schlaganfallfläche vergleichbar mit denen der Tiere ohne Behandlung ist.

### 5.4.1.2 Korrelation der Neuroprotektion von Bilobalid und der zeitabhängigen Applikation

In der vorhergehenden Dosisfindungsstudie zeigte sich die Dosis 10 mg/kg am effektivsten, die Größe des Schlaganfalls zu reduzieren. Im nachstehenden Experiment wurde daher diese Dosis gewählt, um das Zeitfenster in dem Bilobalid noch die Infarktgröße minimiert, zu untersuchen.

Abbildung 58 gibt die mit TTC gefärbten Hirnschnitte der Schlaganfall-Tiere und der Bilobalid-Tiere, welche mit der Dosis 10 mg/kg zu den verschiedenen Zeitpunkten behandelt wurden, wieder. Das daraus berechnete Infarktgebiet ist in Abbildung 59 wiedergegeben.

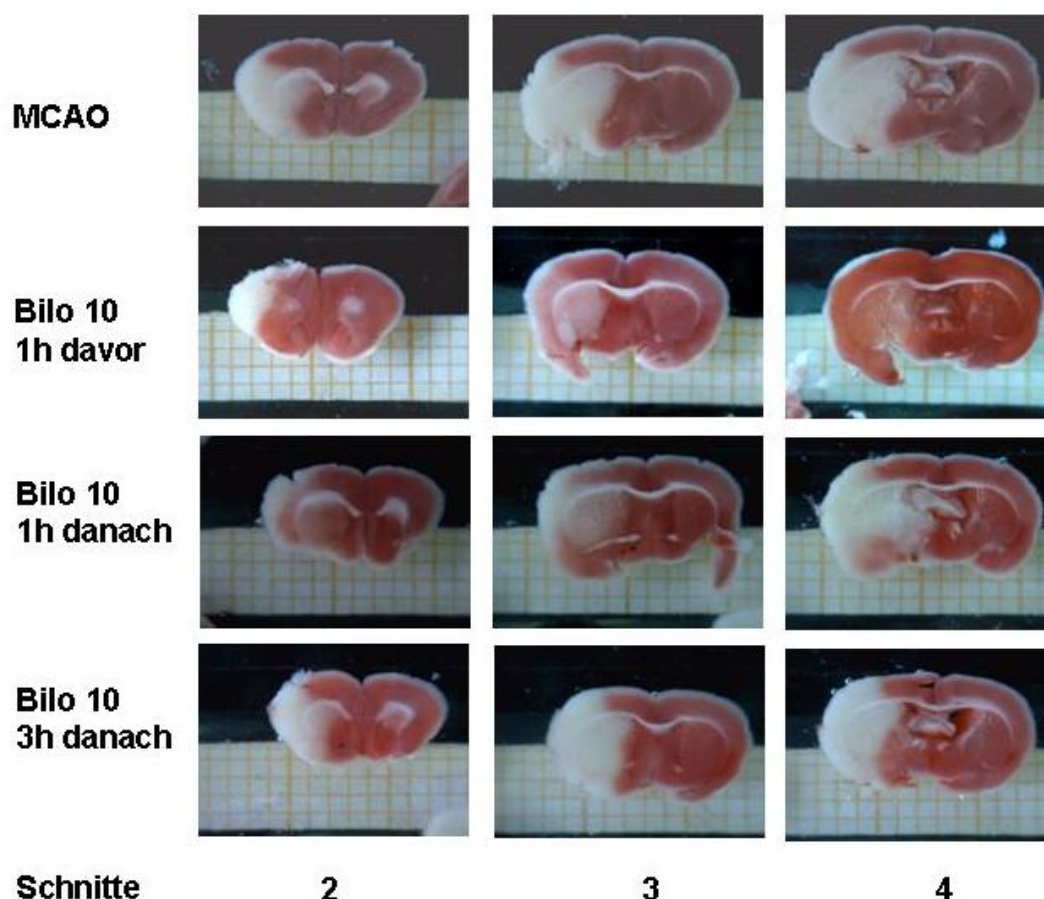
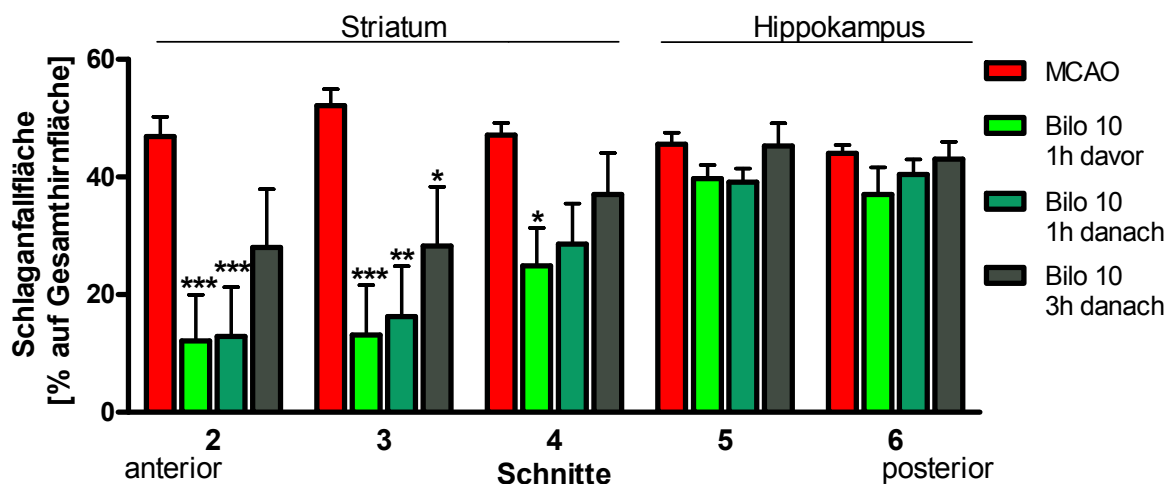


Abbildung 58: Repräsentative striatale Hirnschnitte der MCAO- und Bilobalid-Gruppe mit der Dosis 10 mg/kg für die Behandlung zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die Schnitte sind 24 h nach der MCAO mit TTC angefärbt worden. Die weiße Fläche stellt das Infarktgebiet und die rote Fläche das gesunde Areal dar. Auf der Skalierung entspricht ein Kästchen 1 mm<sup>2</sup>.



**Abbildung 59: Schlaganfallfläche pro Schnitt der Bilobalid Dosis 10 mg/kg, appliziert i.p. vor oder nach der MCAO und den unbehandelten Tieren.** Angegeben ist die statistische Signifikanz mit Zwei-Wege ANOVA und Bonferroni post-Test.  $n=7$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$  vs. MCAO.

Abbildung 59 zeigt, dass die Applikation der Substanz eine Stunde nach dem Schlaganfall die Infarktgröße im anterioren Teil des Striatums (Schnitt 2 und 3) um 68-73 % reduziert. Im posterioren Teil des Striatums (Schnitt 4) ist die Infarktfläche mit  $29 \pm 7$  % gegenüber den entsprechenden MCAO-Schnitten ( $47 \pm 2$  %) tendenziell erniedrigt. Im Hippokampus ist nur eine minimale Reduktion der Infarktgröße zu sehen und dieser Verlauf der Reduktion der Schlaganfallfläche ist ähnlich wie bei der Gabe von Bilobalid (10 mg/kg) eine Stunde vor Schlaganfall (siehe auch Abbildung 57). Erweitert man das Zeitfenster um weitere zwei Stunden, so kommt es ebenfalls zu einer Reduktion des Infarktgebietes im Striatum. Während diese Reduktion in den Schnitten 2 und 4 nur tendenziell zu sehen ist, kommt es im mittleren Teil des Striatums (Schnitt 3) zu einer signifikanten Reduktion der Infarktfläche um 46 %. Im posterioren Verlauf der Schnitte (Hippokampus) verliert sich dieser Effekt und die Infarktgröße ist vergleichbar zu den entsprechenden Infarktflächen in der MCAO-Gruppe ( $44 \pm 1$  %).

Zusammenfassend lässt sich für die Kapitel 5.4.1.1 und 5.4.1.2 schlussfolgern, dass eine Bilobalid-Gabe von 3-10 mg/kg die Ischämie im Striatum reduzieren kann und für die Dosis 10 mg/kg Bilobalid diese Protektion am deutlichsten ausgeprägt ist, je früher die Applikation der Substanz erfolgt. Im Hippokampus ist hingegen kein Schutz bei den getesteten Dosen und Zeitpunkten zu erkennen

## **5.4.2 Wirkung von Bilobalid auf metabolische Veränderungen im Gehirn nach einem permanenten Schlaganfall**

Durch einen Schlaganfall kommt es, wie in Kapitel 5.2.1.3 gezeigt, zu einem hoch signifikanten Anstieg von Glutamat. Die daraus resultierende Exzitotoxizität führt zu einer Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^{+}$ -Konzentration im Intrazellulärraum und letztendlich zu einem Zelluntergang (vgl. Kapitel 2.1). Wie in Kapitel 5.4 beschreiben, zeigt Bilobalid einen dosisabhängigen Schutzeffekt in der Ausbreitung einer Ischämie.

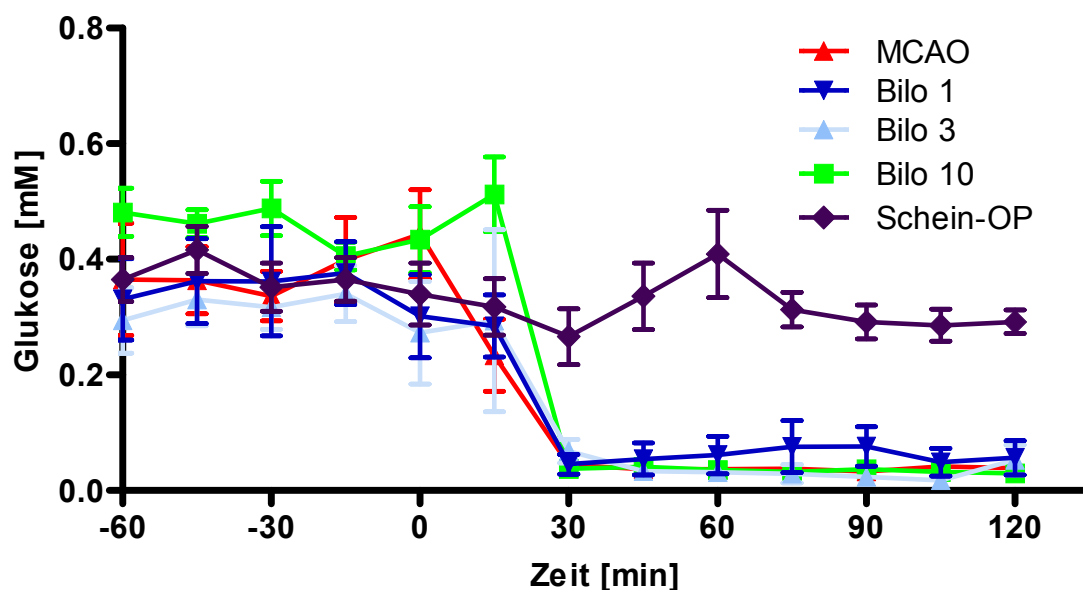
In weitergehenden Experimenten sollte daher der Einfluss von Bilobalid auf den Energieverlust (Glukose) und die Exzitotoxizität (Glutamat) untersucht werden.

Unter der Bezeichnung Schein-OP sind in diesem Kapitel Tiere zu verstehen, bei denen die MCA nicht verschlossen wurde und die daher auch in der TTC-Färbung keinen Infarkt aufwiesen.

### **5.4.2.1 Einfluss von Bilobalid auf die Glukosereduktion nach einem Schlaganfall**

Abbildung 60 gibt den zeitlichen Verlauf der Glukosekonzentration im Extrazellulärraum vor und nach der MCAO wieder.

Man sieht, dass 30 Minuten nach der Schlaganfallinduktion die Glukosewerte sowohl in der MCAO-, als auch in den verschiedenen Bilobalid-Gruppen drastisch abnehmen.



**Abbildung 60: Zeitlicher Verlauf der gemessenen Glukosekonzentration bei einer MCAO von Bilobalid-behandelten und unbehandelten Mäusen.** Bilobalid ist in der Konzentration 1-10 mg/kg eine Stunde vor der Schlaganfallinduktion i.p. appliziert worden. Die Dialyse wurde 60 Minuten vor der MCAO (Zeitpunkt 0) gestartet und anschließend für 120 Minuten weitergeführt. n= 2-8, Mittelwert  $\pm$  SEM.

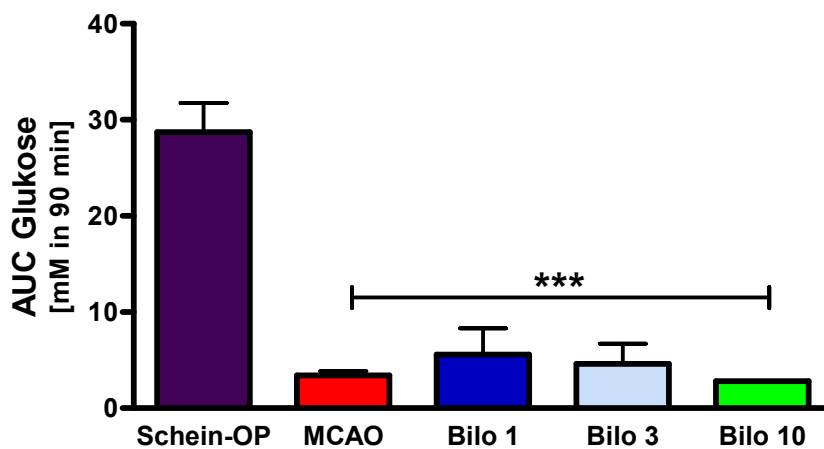
Wie bereits in Kapitel 5.2.1.3 beschrieben, sinkt in der Schlaganfall-Gruppe die Glukosekonzentration nach der MCAO auf 10 % der Basalwerte (Zeitpunkt -60 bis 0) (siehe auch Abbildung 41) und bleibt gegenüber den scheinoperierten Mäusen während der ganzen Dialyse statistisch signifikant erniedrigt.

Durch die Behandlung der Mäuse mit 10 mg/kg Bilobalid, eine Stunde vor der Schlaganfalloperation, kommt es auch zu einer Reduktion in der Glukosekonzentration auf  $0,04 \pm 0,004$  mM. Das sind 9 % der gemessenen Basalwerte. Bei der Dosis 3 mg/kg fällt die Konzentration nach der MCAO auf  $0,03 \pm 0,01$  mM (10 % der gemessenen Basalwerte). Die niedrigste Dosis, 1 mg/kg, zeigt einen ähnlichen Zeitverlauf in den Glukosekonzentrationen nach der MCAO, wie die unbehandelte Gruppe. Auch hier sinkt die Glukose auf 16 % der vorher gemessenen Basalwerte, das entspricht  $0,06 \pm 0,01$  mM.



Innerhalb der gewählten Behandlungen ist in den Glukosekonzentration nach der MCAO kein statistischer Unterschied zu sehen (Zwei-Wege ANOVA mit Bonferroni post-Test;  $p > 0,05$ ).

In Abbildung 61 ist der Zeitverlauf der Glukosekonzentration (mM) als „Area under the Curve“ (AUC) vom Zeitpunkt 30-120 Minuten (siehe Abbildung 60) nach der MCAO dargestellt.

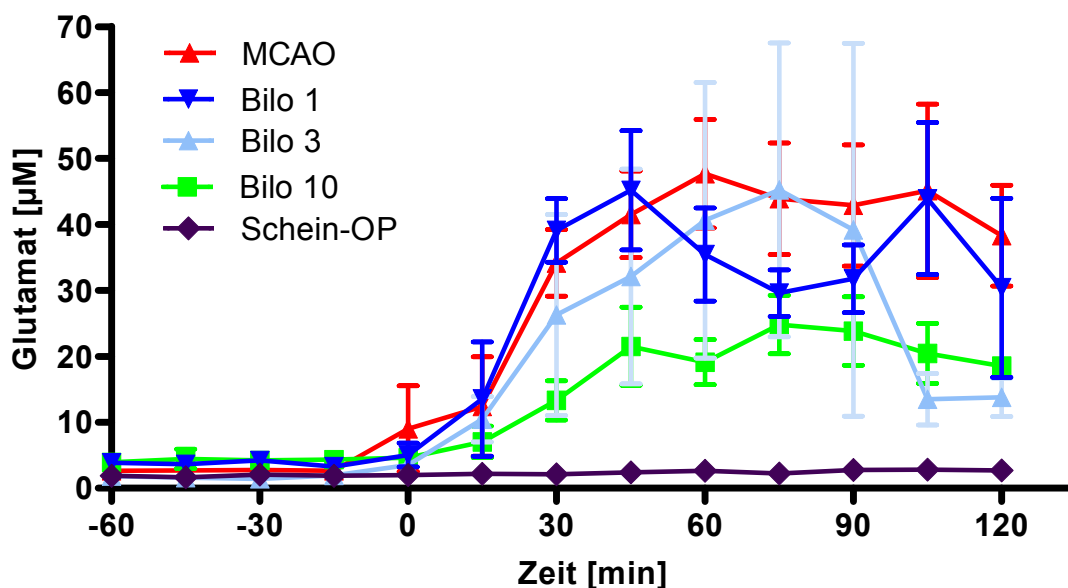


**Abbildung 61: Einfluss von 1-10 mg/kg Bilobalid auf die AUC der Glukosekonzentration nach einem permanenten Schlaganfall.** Die AUC wurde für die Zeitpunkte 30-120 Minuten aus Abbildung 60 berechnet. Die statistische Signifikanz ist mit Ein-Wege ANOVA und Dunnett's post-Test angegeben.  $n = 1-6$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, \*\*\* $p < 0,001$  vs. Schein-OP.

In der MCAO-Gruppe sinkt die AUC auf  $3,4 \pm 0,4$ . Das entspricht gegenüber der Schein-OP-Gruppe mit  $28,7 \pm 3$  einer Reduktion auf 12 %. In den Bilobalid-Gruppen beträgt die AUC zwischen 2,8 und 5,6. Obwohl in den Bilobalid-Gruppen 1 mg/kg und 3 mg/kg die AUC tendenziell größer gegenüber den unbehandelten und mit 10 mg/kg behandelten Tieren ist, besteht keine statistische Signifikanz zwischen den Gruppen.

### 5.4.2.2 Einfluss von Bilobalid auf die Glutamatfreisetzung nach einer Ischämie

In Kapitel 5.2.1.3 wurde bereits die Veränderung der Glutamatspiegel durch eine Ischämie gezeigt. In Abbildung 61 ist der Zeitverlauf der gemessenen Glutamatkonzentrationen von Bilobalid-behandelten Tieren den Schlaganfall-Tieren gegenüber gestellt.



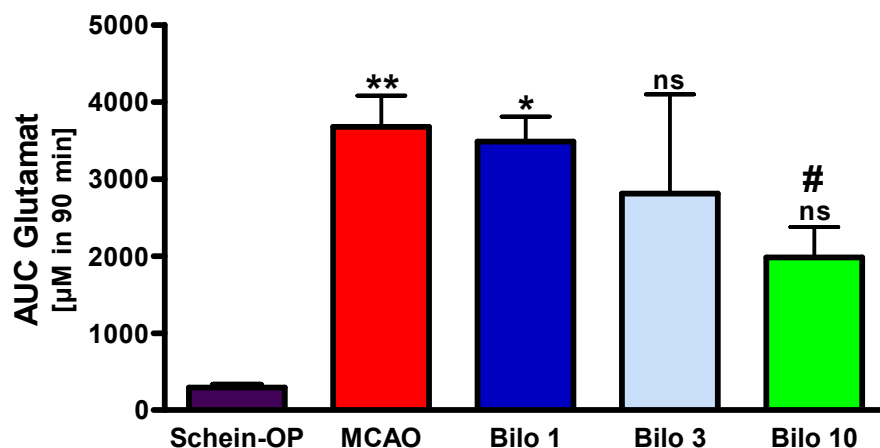
**Abbildung 62: Zeitlicher Verlauf der gemessenen Glutamatkonzentration nach einem permanenten Schlaganfall von Bilobalid-behandelten und unbehandelten Mäusen.** Bilobalid wurden den Mäusen eine Stunde vor Schlaganfall in einer Konzentration von 1-10 mg/kg i.p. appliziert. Die Dialyse wurde 60 Minuten vor der MCAO (Zeitpunkt 0) gestartet und für weitere 120 Minuten anschließend laufengelassen. Die statistische Signifikanz ist mit Zwei-Wege ANOVA und Bonferroni post-Test berechnet worden. n= 3-6, Mittelwert  $\pm$  SEM.

Parallel zur Glukosereduktion (siehe Abbildung 60) steigen die Glutamatspiegel 15-30 Minuten nach der MCAO in allen Gruppen an. In den MCAO-Tieren kommt es, ausgehend vom Basalwert ( $2,6 \pm 0,04 \mu\text{M}$ ), zu einem Anstieg der Glutamatkonzentration auf 1573 %. Bei der eingesetzten Höchstdosis von Bilobalid (10 mg/kg) steigen die Glutamatspiegel nur auf 419 % gegenüber den Basalwerten. Dies entspricht für die Zeit nach dem Schlaganfall einer durchschnittlichen Glutamatkonzentration von  $18,3 \pm 2,3 \mu\text{M}$ .

Nach der Gabe von 3 mg/kg Bilobalid steigen die Glutamatspiegel auf 1341 % (durchschnittlich  $27,7 \pm 4,9 \mu\text{M}$ ) an. Die weitere Reduktion der Bilobalidkonzentration auf 1 mg/kg führt zu einem Anstieg der Glutamatwerte auf durchschnittlich  $33,6 \pm 3,6 \mu\text{M}$ ; das entspricht einer Erhöhung von 908 % gegenüber den Basalwerten.

Vergleicht man nun die Gruppen mit einem Zwei-Wege ANOVA-Test in Bezug auf die Glutamatkonzentrationen nach der MCAO (Zeitpunkt 30-120 Minuten), so ergibt sich ein hoch signifikanter Unterschied ( $***p < 0,001$ ) für die Bilobalid-Dosis 10 mg/kg und der MCAO-Gruppe.

Abbildung 63 gibt die Berechnung des Zeitverlaufs der Glutamatkonzentration ( $\mu\text{M}$ ) 30-120 Minuten nach der MCAO aus Abbildung 62 als „Area under the Curve“ (AUC) wieder.



**Abbildung 63: Einfluss von Bilobalid auf die AUC der Glutamatspiegel nach einem permanenten Schlaganfall.** Die AUC wurde aus den Zeitpunkten 30-120 Minuten aus Abbildung 62 berechnet. Bilobalid wurden den Mäusen eine Stunde vor Schlaganfall in einer Konzentration von 1-10 mg/kg i.p. appliziert. Die statistische Signifikanz ist mit Ein-Wege ANOVA und Dunnett's post-Test angegeben.  $n = 2-6$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, ns,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  vs. Schein-OP und  $\#p < 0,05$  vs. MCAO.

Die MCAO-Gruppe, mit einer AUC von  $3676 \pm 405$ , unterscheidet sich eindeutig ( $p < 0,01$ ) von der Schein-OP-Gruppe (AUC von  $294 \pm 39$ ). Auch die Tiere, die mit 1 mg/kg Bilobalid behandelt wurden, weisen eine ähnliche AUC wie die unbehandelten Mäuse ( $3485 \pm 324$ ) auf. Gegenüber den scheinoperierten Tieren entspricht dies einer Vergrößerung der AUC von 1185 % ( $p < 0,05$ ).

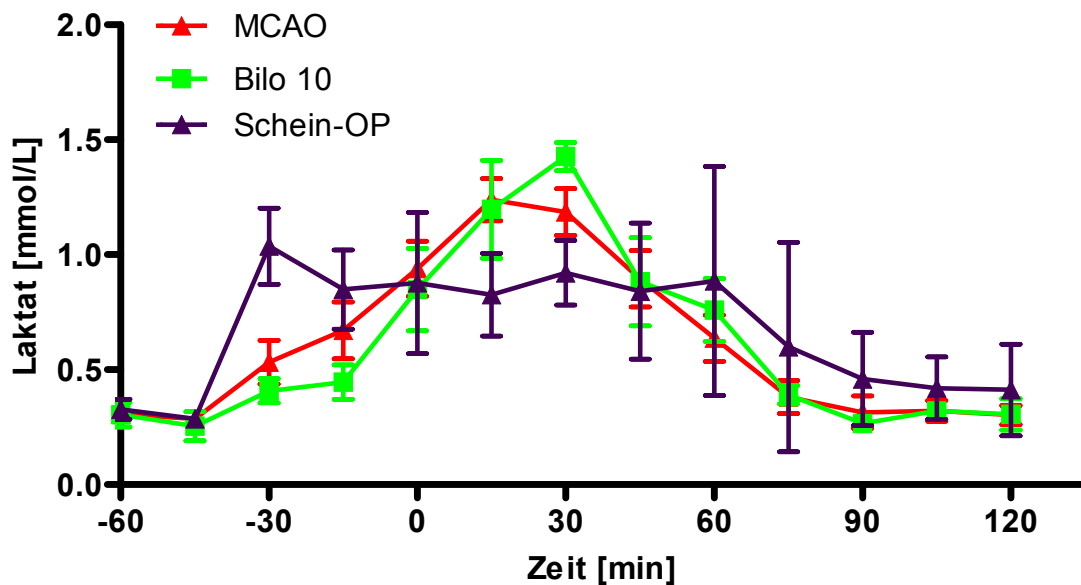
Die Gruppe mit 3 mg/kg Bilobalid zeigt eine tendenziell kleinere AUC ( $2812 \pm 1284$ ), als die MCAO-Gruppe und die Gruppe mit 1 mg/kg Bilobalid. Eine Behandlung der Mäuse mit 10 mg/kg führt zu einer 54 % igen Reduktion der AUC gegenüber der MCAO-Gruppe. Mit einer AUC von  $1983 \pm 392$  unterscheidet sich diese Bilobalid-Gruppe somit signifikant von der unbehandelten Gruppe ( $p < 0,05$ ).

Die Auswertung der AUC für die Zeit 30-120 Minuten nach der MCAO bestätigt die im Zeitverlauf sichtbare Reduktion der Glutamatkonzentration für die Dosis 10 mg/kg und weist auf einen ebenfalls positiven Effekt der Substanz in der Konzentration 3 mg/kg hin.

#### **5.4.2.3 Einfluss von Bilobalid auf die Laktatspiegel nach einem Schlaganfall**

In Abbildung 64 sind die Laktatkonzentrationen vor und nach der Schlaganfalloperation von Mäusen mit und ohne Bilobalid-Behandlung (10 mg/kg), sowie von scheinoperierten Tieren wiedergegeben

Bei den mit 10 mg/kg Bilobalid-behandelten Mäusen kommt es 15-30 Minuten vor der eigentlichen Okklusion der MCA insgesamt zu einem 2 fachen Anstieg in den Laktatspiegeln auf  $0,6 \pm 0,4$  mM. Dies entspricht auch den Ergebnissen für Laktat für die MCAO- und Schein-OP-Tiere aus Kapitel 5.2.1.3. Nach der Operation zeigt die Bilobalid-Gruppe einen ähnlich abfallenden Verlauf in den Laktatkonzentrationen, wie die Schlaganfall-Gruppe. In beiden Gruppen wird erst 90-120 Minuten nach der MCAO wieder das Niveau der Ausgangswerte erreicht.



**Abbildung 64: Einfluss von Bilobalid auf die Laktatkonzentration bei einer MCAO.** Bilobalid wurde den Mäusen eine Stunde vor der MCAO in einer Konzentration von 10 mg/kg i.p. appliziert. MCAO n=14, Bilo 10 n=5 und Schein-OP n=3, Mittelwert  $\pm$  SEM.

Da Bilobalid in der eingesetzten Höchstdosis keine Veränderung in den Laktatspiegeln zeigt und diese mit den Daten der unbehandelten Tieren vergleichbar ist, wurden bei den niedrigeren Dosen (1 und 3 mg/kg) Laktat nicht weiter mit dem Mikroanalysator vermessen.

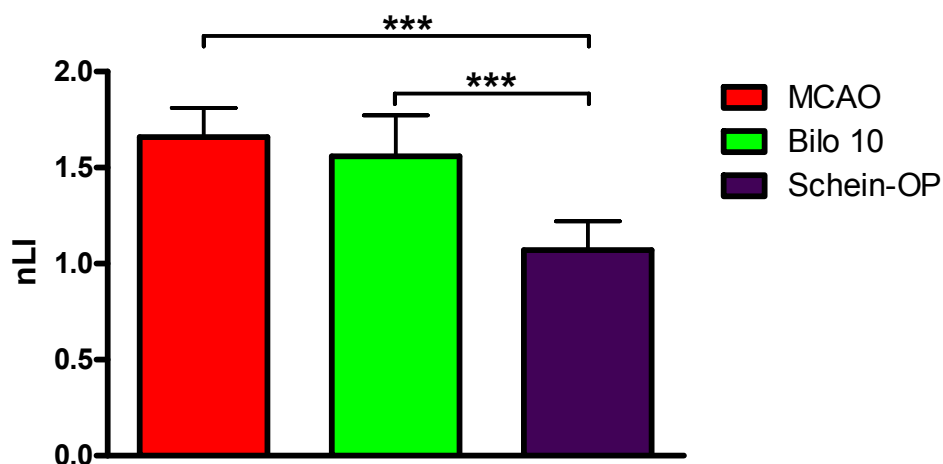
Zusammenfassend kann man für die Wirkung von Bilobalid auf die metabolische Veränderung im ischämischen Gehirn sagen, dass Bilobalid die Energieversorgung nach einem Infarkt nicht verbessert, aber die Freisetzung von toxischen Glutamatkonzentrationen deutlich reduziert.

### 5.4.3 Einfluss von Bilobalid auf die kognitiven und motorischen Fähigkeiten nach einem Schlaganfall

Bilobalid, in der Dosis 10 mg/kg eine Stunde vor Schlaganfall i.p. appliziert, zeigte einen hohen Schutzeffekt vor der Ausbreitung eines Infarktes (siehe Kapitel 5.4.1.1 und 5.4.2.2). Um zu untersuchen, ob diese protektive Eigenschaft der Substanz auch im Verhalten der Tiere nachweisbar ist, wurden dieselben Verhaltenstests wie in Kapitel 5.2.1.2 erst im permanenten und dann im transienten Schlaganfallmodell durchgeführt. Tiere, bei denen die MCA nicht verschlossen wurde und daher keinen Infarkt aufwiesen, sind als Schein-OP (scheinoperiert) bezeichnet.

#### 5.4.3.1 Wirkung von Bilobalid auf das Verhalten im permanenten Schlaganfall-Modell

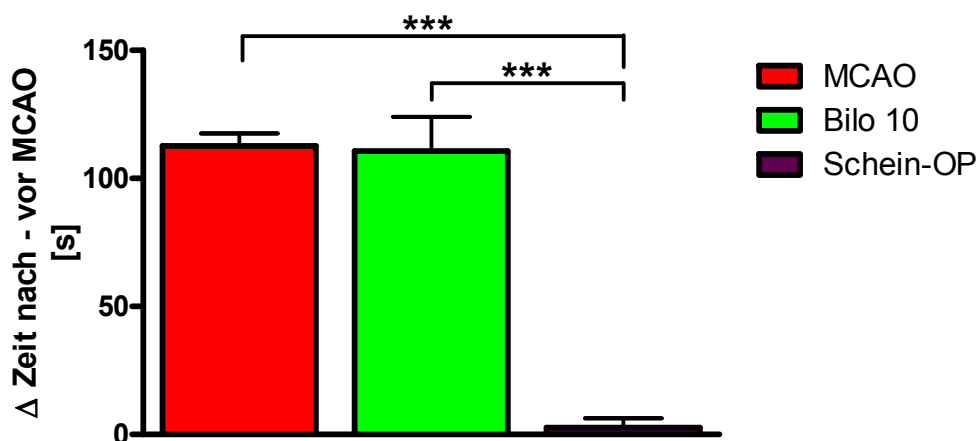
Das asymmetrische Verhalten der Tiere nach einem Schlaganfall ist mit dem Corner-Test untersucht worden. In Abbildung 65 sind die Ergebnisse hierzu gezeigt. Der normalisierte Lateralitätsindex (nLI) wurde aus der Anzahl der Drehungen pro Seite vor und nach der MCAO berechnet (siehe Kapitel 4.2.2.1).



**Abbildung 65: Ergebnisse des Corner-Tests mit permanentem Schlaganfall von Bilobalid-behandelten und unbehandelten Mäusen.** Bilobalid wurde in der Konzentration 10 mg/kg i.p. eine Stunde vor der MCAO gegeben. Der normalisierte Lateralitätsindex (nLI) wurde aus dem Lateralitätsindex vor und nach der MCAO berechnet. Die statistische Signifikanz ist als Ein-Wege ANOVA mit Bonferroni post-Test angegeben. MCAO n=5, Bilo n=10 und Schein-OP n=7, Mittelwert ± SD, \*\*\*p<0,001 vs. Schein-OP.

Man sieht in Abbildung 65, dass Bilobalid in diesem Test keinen Einfluss auf das Verhalten nach dem permanenten Schlaganfall hat. Die behandelten Tiere drehen sich ebenfalls mit einem nLI=  $1,6 \pm 0,2$  wie die MCAO-Tiere (nLI=  $1,7 \pm 0,2$ ) zur ipsilateralen Seite hin aus der Ecke heraus. Scheinoperierte Tiere zeigen hingegen nach der Operation keine Präferenz.

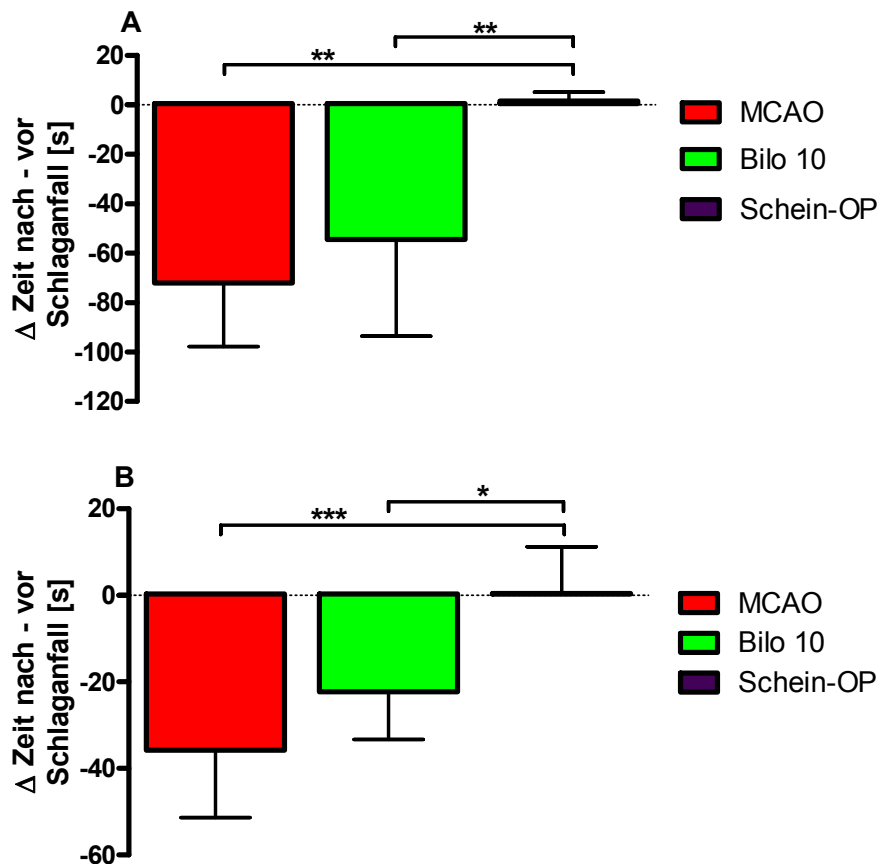
Im Chimney-Test, Abbildung 66, zeigt sich in den mit Bilobalid behandelten Mäusen ebenfalls keine Verbesserung in der motorischen Fähigkeit, rückwärts aus einer Röhre heraus zu klettern. Die Daten sind als Differenz der benötigten Zeit nach zu vor der MCAO dargestellt.



**Abbildung 66: Differenz der Zeit nach zu vor dem permanenten Schlaganfall im Chimney-Test für Bilobalid-behandelte und unbehandelte Mäuse.** Bilobalid, 10 mg/kg i.p., wurde eine Stunde vor der MCAO appliziert. Die maximale Zeit für diesen Versuch betrug 120 s. Die statistische Signifikanz ist als Ein-Wege ANOVA mit Bonferroni post-Test angegeben. MCAO n=4, Bilo n=9 und Schein-OP n=4, Mittelwert  $\pm$  SD, \*\*\* $p < 0,001$  vs. Schein-OP.

Im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren verschlechtern sich beide Gruppen sehr eindeutig nach der Schlaganfallinduktion. Der Versuch wurde nach 120 s abgebrochen; MCAO-Tiere waren nach dem Schlaganfall nicht mehr in der Lage rückwärts aus der Röhre herauszuklettern, während die Bilobalid-Tiere teilweise vor Ablauf der maximalen Zeit den Test bestanden (Differenz der Zeit nach zu vor MCAO  $113 \pm 5$  s vs.  $111 \pm 13$  s).

Im Rotarod-Test wurde die Balance und Koordination der Tiere unter normalen (4 rpm) und beschleunigenden (4-40 rpm) Bedingungen untersucht (siehe Kapitel 4.2.2.3). Die Daten hierzu sind in Abbildung 67 A und B wiedergegeben.



**Abbildung 67: Differenz der Zeit nach zu vor dem permanenten Schlaganfall auf dem Rotarod unter normalen (A) und beschleunigenden (B) Bedingungen für Bilobalid-behandelte und unbehandelte Tiere.** Bilobalid wurde eine Stunde vor der Schlaganfallinduktion in der Konzentration 10 mg/kg i.p. gegeben. Die statistische Signifikanz ist als Ein-Wege ANOVA mit Bonferroni post-Test angegeben. MCAO n=6, Bilo n=8 und Schein-OP n=6, Mittelwert ± SD, \*p<0,05, \*\*p<0,01\*\*\*p<0,001 vs. Schein-OP.

Abbildung 67 A zeigt, dass MCAO-Tiere nach dem Schlaganfall nur noch  $16 \pm 16$  s auf dem Rotarod laufen. Das entspricht einer Differenz zu der Zeit vor dem Schlaganfall von  $-72 \pm 26$  s. Tiere, welche mit Bilobalid behandelt wurden, verschlechtern sich vergleichbar wie die MCAO-Tiere nach dem Schlaganfall auf dem Rotarod (Differenz der Zeit nach zu vor der MCAO  $-55 \pm 39$  s). Scheinoperierte Mäuse zeigen eine leichte Verbesserung beim wiederholten Durchführen des Rotarod-Tests. Dies beruht wahrscheinlich auf einem gewissen Lerneffekt in diesem Verhaltenstest.



Vergleicht man die MCAO- und Bilobalid-Gruppe gegen die Schein-OP-Gruppe, so sind beide Gruppen nach einem Schlaganfall gleich stark beeinträchtigt und unterscheiden sich sehr signifikant von den scheinoperierten Tieren.

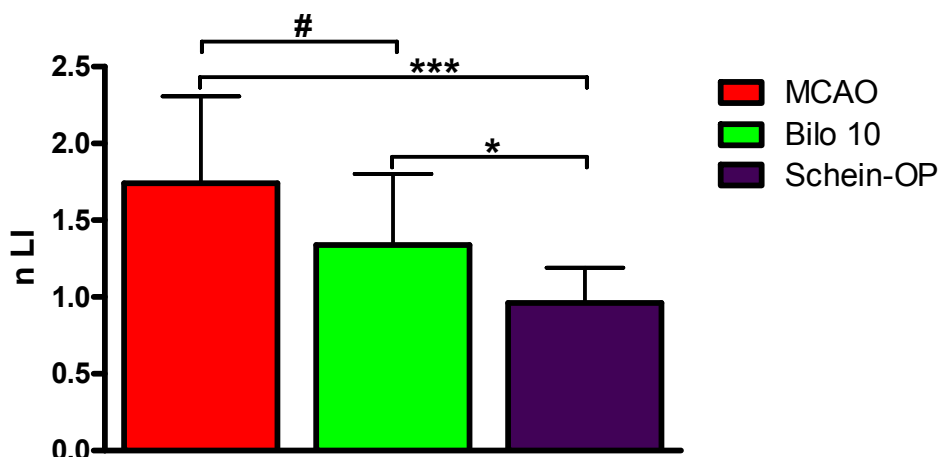
Im beschleunigenden Rotarod (Abbildung 67 B) verschlechtern sich die Bilobalid-behandelten Tiere nur leicht (Differenz der Zeit nach zu vor dem Schlaganfall  $-22 \pm 11$  s) gegenüber den unbehandelten Tieren (Differenz der Zeit nach zu vor dem Schlaganfall  $-36 \pm 6$ ). Eine statistische Signifikanz zwischen den beiden Gruppen besteht allerdings nicht. Vergleicht man beide Gruppen mit den Schein-OP-Tieren, so weisen Bilobalid-behandelte Tiere einen geringeren Unterschied dazu auf, als die unbehandelten Tiere.

Fasst man die Daten der Verhaltenstests im permanenten Schlaganfall-Modell zusammen, so kann man sagen, dass in diesem Modell die mit Bilobalid behandelten Mäuse keine Verbesserung in Motorik und Koordination gegenüber den unbehandelten Tieren haben; die einzige Ausnahme bildet hier der Test auf dem beschleunigenden Rotarod.

#### **5.4.3.2 Wirkung von Bilobalid auf das Verhalten im transienten Modell**

Die Ergebnisse aus Kapitel 5.4.3.1 zeigen, dass Bilobalid im permanenten proximalen Schlaganfallmodell nur einen geringen positiven Effekt auf das Verhalten der Mäuse hat. Daher wurde in den folgenden Experimenten die Arteria cerebri media nur transient (90 Minuten) verschlossen (siehe Kapitel 5.2.2.2).

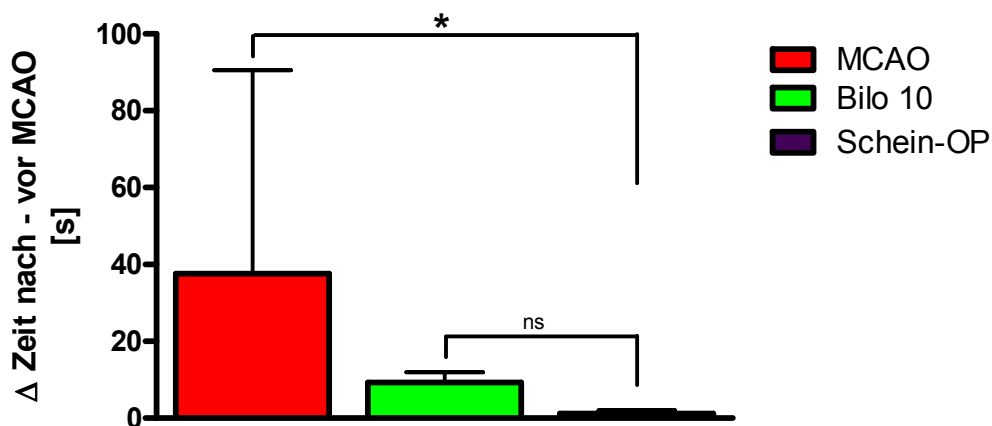
Die sensomotorischen Defizite im Corner-Test sind auch für die Abbildung 68 als normalisierter Lateralitätsindex (nLI) angegeben. Dieser wurde aus der Anzahl der Drehungen pro Seite vor und nach der MCAO berechnet (siehe Kapitel 4.2.2.1).



**Abbildung 68: Ergebnisse des Corner-Tests im transienten Modell, dargestellt mit dem normalisierten Lateralitätsindex (nLI) für Bilobalid-behandelte und unbehandelte Mäuse.** Der normalisierte Lateralitätsindex (nLI) wurde aus dem Lateralitätsindex vor und nach der MCAO berechnet. Die statistische Signifikanz ist als Ein-Wege ANOVA mit Bonferroni post-Test angegeben. MCAO n=15, Bilo n=21 und Schein-OP n= 18, Mittelwert ± SD, \*p<0,05, \*\*\*p<0,001 vs. Schein-OP; # p<0,05 vs. Bilo 10.

Man sieht, dass durch die Gabe von Bilobalid 10 mg/kg die Tiere nach dem Schlaganfall nur eine geringe Tendenz zur ipsilateralen Seite hin aufweisen (nLI= 1,3 ± 0,5). Mit einem nLI= 1,6 ± 0,6 in der MCAO-Gruppe besteht zu der Bilobalid-Gruppe ein statistisch signifikanter Unterschied (p<0,05). Auch im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren verschlechtern sich die behandelten Tiere weniger stark, als die unbehandelten Tiere.

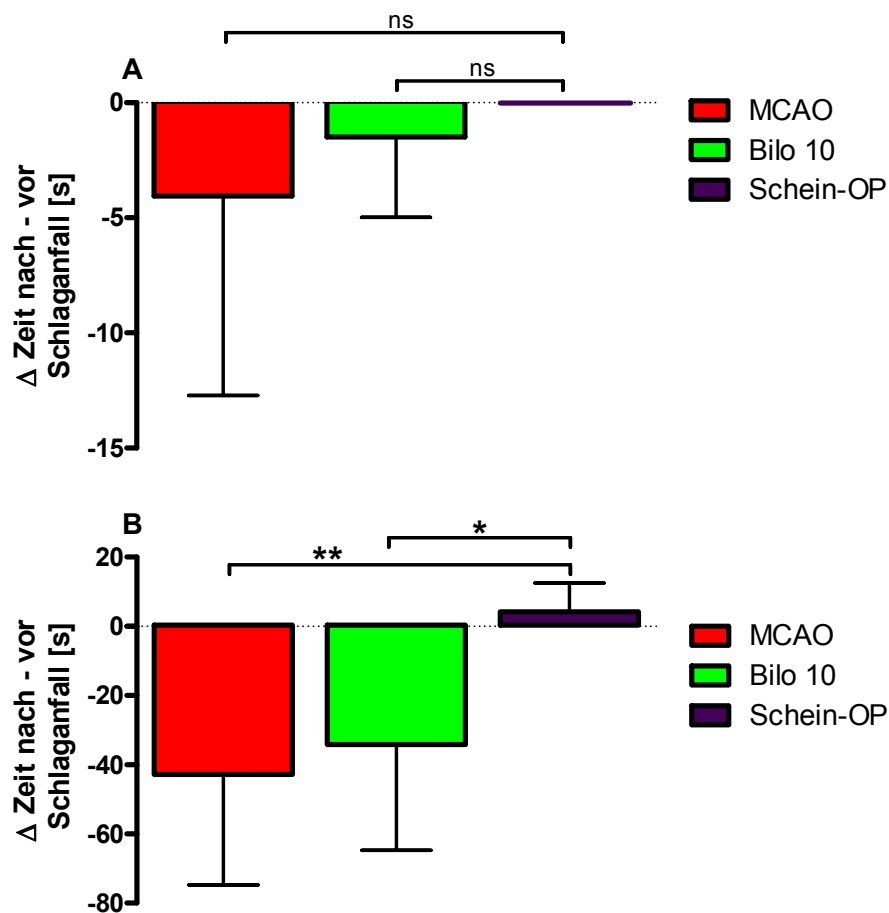
Für die Testung der motorischen Fähigkeiten ist weiterhin der Chimney-Test durchgeführt worden. Die Ergebnisse im transienten Ischämie-Modell sind in Abbildung 69 wiedergegeben.



**Abbildung 69: Differenz der Zeit nach zu vor dem transienten Schlaganfall für Bilobalid- und Vehikel-behandelte Mäuse im Chimney-Test.** Die maximale Zeit für diesen Versuch betrug 120 s. Die statistische Signifikanz ist als Ein-Wege ANOVA mit Bonferroni post-Test angegeben. n=10, Mittelwert ± SD, \*p<0,05 vs. Schein-OP.

Abbildung 69 zeigt, dass die Schlaganfall-Tiere nach der MCAO länger brauchen ( $38 \pm 53$  s) als Bilobalid- und Schein-OP-Tiere, um aus der Röhre heraus zu kommen. Bilobalid-behandelte Tiere benötigen nur  $9,3 \pm 8,6$  s für diesen Test und unterschieden sich nicht signifikant von den scheinoperierten Tieren mit  $1,2 \pm 2,5$  s. Auf Grund der starken Schwankungen in der MCAO-Gruppe ist es nicht möglich eine statistisch abgesicherte Aussage zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren zu machen. Bilobalid, in der Dosis 10 mg/kg, zeigt im Vergleich zu den unbehandelten Tieren aber eindeutig eine Verbesserung in der Motorik.

Für die Testung der Koordination und Balance der Maus nach einem Schlaganfall ist der Rotarod-Test unter normalen (Abbildung 70 A) und unter beschleunigenden Bedingungen (Abbildung 70 B) durchgeführt worden.



**Abbildung 70: Differenz der Zeit nach zu vor dem transienten Schlaganfall auf dem Rotarod unter normalen (A) und beschleunigenden (B) Bedingungen für.** Die statistische Signifikanz ist mit Ein-Wege ANOVA und Bonferroni post-Test angegeben. MCAO n=10, Bilobalid n=13 und Schein-OP n=6, Mittelwert  $\pm$  SD, \*p<0,05, \*\* p <0,01 vs. Schein-OP.

Man sieht, dass die MCAO-Gruppe sich nach der Schlaganfallinduktion tendenziell etwas stärker (Differenz der Zeit nach zu vor der MCAO  $-4,1 \pm 8,7$  s), als die Bilobalid-Gruppe, auf dem Rotarod unter normalen Bedingungen verschlechtert (Differenz der Zeit nach zu vor der MCAO  $-1,5 \pm 3,5$  s). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen und auch jeweils zu den scheinoperierten Tieren besteht allerdings nicht.

Die Ergebnisse im beschleunigenden Rotarod-Test, siehe Abbildung 70 B, zeigen auch keine Verbesserung in den mit Bilobalid-behandelten Tieren (Differenz der Zeit nach zu vor der MCAO  $-34 \pm 31$  s) gegenüber den unbehandelten (Differenz der Zeit nach zu vor der MCAO  $-43 \pm 32$  s).

Scheinoperierte Tiere zeigen auch hier eine Verbesserung in der Motorik und Koordination nach erneuter Durchführung des Rotarod-Test am darauf folgenden Tag (Differenz der Zeit nach zu vor der Operation  $4,2 \pm 8,3$  s).

Abschließend kann man sagen, dass im transienten Ischämie-Modell eine Behandlung mit 10 mg/kg Bilobalid eine Stunde vor der MCAO zu einer deutlichen Verbesserung in der Motorik und der Koordination der Tiere führt.

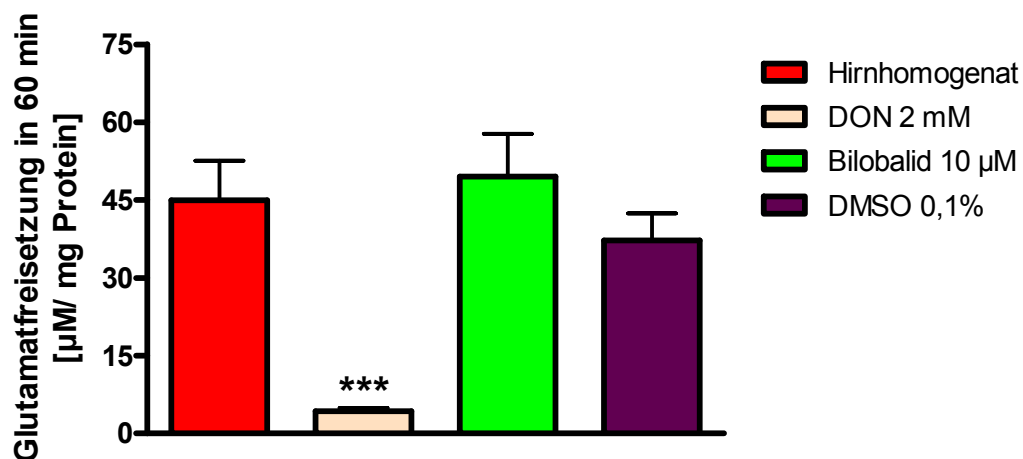
## **5.5 Untersuchungen zur mechanistischen Erklärung der Glutamatreduktion durch Bilobalid**

Durch eine Ischämie kommt es zu einem enormen Anstieg von extrazellulärem Glutamat (siehe 5.2.1.3). Bilobalid, in der Dosis 10 mg/kg, reduziert diesen Anstieg gegenüber den MCAO-Tieren um 74 % (siehe Kapitel 5.2.1.3 und 5.4.2.2). Wie Bilobalid auf Glutamat wirkt ist unbekannt. Daher soll in den nächsten Kapiteln der Einfluss von Bilobalid auf zwei Enzyme, die an der Bereitstellung von Glutamat im ZNS beteiligt sind, näher betrachtet werden. Eine Beeinflussung dieser Enzyme könnte die Glutamatreduktion durch Bilobalid nach einem Schlaganfall erklären.

### **5.5.1 Inhibition der Glutaminase durch Bilobalid**

Eine Möglichkeit, wodurch die Glutamatspiegel im ischämischen Gewebe reduziert werden könnten, ist die Hemmung der Glutaminase (Takeuchi et al. 2008). Bilobalid reduziert deutlich die Glutamatfreisetzung nach einer Ischämie (siehe Kapitel 5.4.2.2). Um nun eine mögliche Inhibition der Glutaminase durch Bilobalid zu untersuchen, wurde Bilobalid in der Konzentration 10  $\mu$ M zu einem Hirnhomogenat zugefügt und die Glutamatbildung zu Beginn und am Ende (60 Minuten) des Enzymassays vermessen. Als Positivkontrolle diente der Inhibitor 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin (DON 2 mM) und als Negativkontrolle eine 0,1 %ige DMSO-Lösung (siehe Kapitel 4.2.6.3).

In Abbildung 71 sind die Ergebnisse zur Inhibition der Glutaminase wiedergegeben. Die entstandenen Glutamatkonzentrationen sind mit Hilfe des Mikroanalysators (siehe Kapitel 4.2.4.1) vermessen worden.



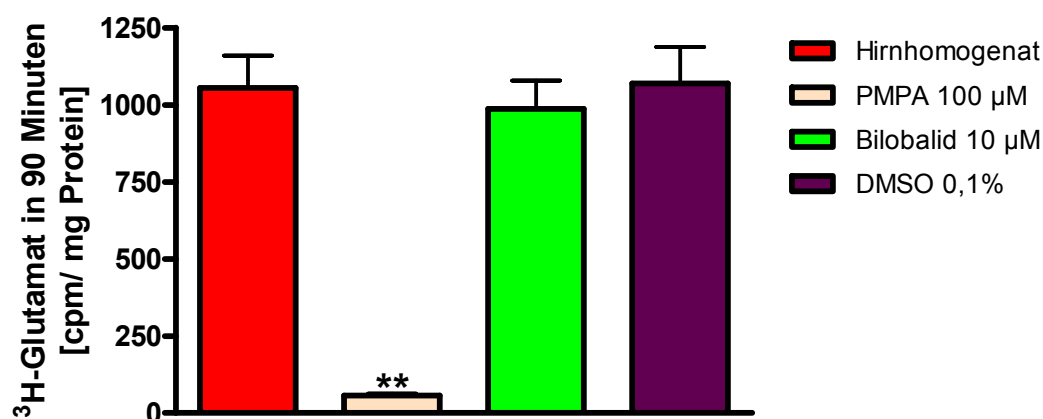
**Abbildung 71: Einfluss von Bilobalid auf die Glutaminase im Hirnhomogenat.** Gemessen wurde das aus 20 mM Glutamin entstandene Glutamat nach einer Minute und nach 60 Minuten mittels Mikroanalysator. Die Glutamatkonzentration pro Ansatz ist bezogen auf den Umsatz des Substrates von 1 mg Protein in 60 Minuten. Angegeben ist die statistische Signifikanz mit Ein-Wege ANOVA und Bonferroni post-Test.  $n=5$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, \*\*\* $p < 0,001$  vs. Hirnhomogenat.

Die Abbildung 71 zeigt, dass DON, als bekannter Glutaminase-Inhibitor, die freigesetzte Glutamatkonzentration mit  $4,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$  gegenüber dem Hirnhomogenat und der Lösungsmittelkontrolle deutlich reduziert. Der Ansatz mit Bilobalid 10  $\mu\text{M}$  weist hingegen vergleichbare Glutamatkonzentrationen zu dem Ansatz mit reinem Hirnhomogenat ( $49,5 \pm 8,3 \mu\text{M}$  vs.  $44,9 \pm 7,6 \mu\text{M}$ ) auf. Einen statistischen Unterschied zwischen dem Hirnhomogenat-, Bilobalid- und dem DMSO-Ansatz besteht nicht und eine Hemmung der Glutaminase durch Bilobalid 10  $\mu\text{M}$  kann ausgeschlossen werden.

### 5.5.2 Inhibition der NAAG-peptidase durch Bilobalid

Zur weiteren mechanistischen Untersuchung wurde als nächstes die NAAG-peptidase in Betracht gezogen. Für den bekannten Inhibitor 2-(Phosphonomethyl)-Pentadinsäure (PMPA) sind vergleichbare Eigenschaften für die Hemmung der Glutamatfreisetzung *in vivo* nach einer Ischämie bekannt (Slusher et al. 1999), wie in Kapitel 5.4.2.2 für Bilobalid beschrieben. Um jetzt eine mögliche Inhibition der NAAG-peptidase durch Bilobalid zu untersuchen, wurde die Substanz in der Konzentration 10  $\mu\text{M}$  zu einem Hirnhomogenat zugegeben und PMPA (100  $\mu\text{M}$ ) als Positivkontrolle und eine 0,1 %ige DMSO-Lösung wiederum als Negativkontrolle eingesetzt (siehe Kapitel 4.2.7.3).

Abbildung 72 gibt die Daten zur Inhibition der NAAG-peptidase wieder. Das aus  $^3\text{H}$ -NAAG hydrolysierte  $^3\text{H}$ -Glutamat wurde mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und mit dem Szintillations-Counter gemessen.



**Abbildung 72: Einfluss von Bilobalid auf die NAAG-peptidase.** Im Counter wurde das durch die Hydrolyse von 30 nM  $^3\text{H}$ -NAAG entstandene  $^3\text{H}$ -Glutamat als cpm-Werte gezählt und auf den Umsatz des Substrates von 1 mg Protein in 90 Minuten bezogen. Angegeben ist die statistische Signifikanz mit Ein-Wege ANOVA und Bonferroni post-Test.  $n=7$ , Mittelwert  $\pm$  SEM,  $***p < 0,001$  vs. Hirnhomogenat.

PMPA, als bekannter Inhibitor der NAAG-peptidase, zeigt in Abbildung 72 eine deutliche Reduktion in der Bildung von  $^3\text{H}$ -Glutamat gegenüber dem reinen Hirnhomogenat ( $1054 \pm 105$  cpm). Das Lösungsmittel (0,1% DMSO) hat keinen Einfluss auf die Aktivität der NAAG-peptidase. Im Bilobalid-Ansatz ist die Glutamatmenge mit  $987 \pm 92$  cpm gegenüber dem Hirnhomogenat erniedrigt, aber dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant. Auch hier kann eine Hemmung der NAAG-peptidase durch Bilobalid ( $10 \mu\text{M}$ ) nahezu ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wirkung von Bilobalid auf die Glutamat-Exzitotoxizität nach einer Ischämie, nicht auf eine Inhibition der Glutamat-regulierenden Enzyme Glutaminase und NAAG-peptidase erfolgt und der Wirkmechanismus weiterhin unbekannt ist.



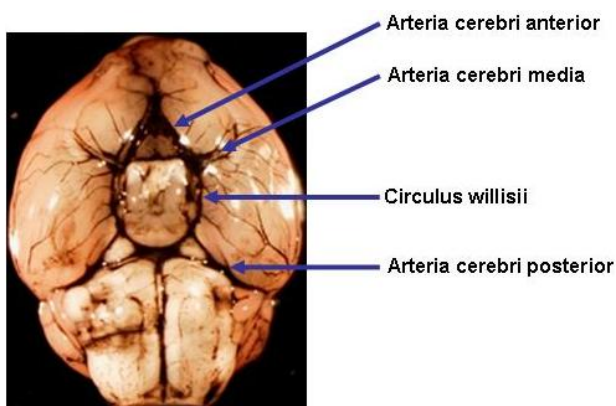
## 6 DISKUSSION

### 6.1 Methodische Vorarbeiten

Zu Beginn der Diskussion sollen einige methodische Parameter, wie die Verwendung von weiblichen CD-1 Mäusen, das Fadenmodell als fokales Ischämie-Modell und die Applikation von Ringerlaktat-Lösung nach einem Schlaganfall, näher betrachtet werden. Anschließend werden die Ergebnisse zur Quantifizierung des fokalen Schlaganfalls in der Maus (siehe Kapitel 6.2) und der Einsatz von Bilobalid als Neuroprotektivum (siehe Kapitel 6.3) diskutiert.

#### 6.1.1 Wahl der Versuchstiere

Die Blutversorgung des Gehirns wird hauptsächlich durch die terminalen Arterien gewährleistet. Diese sind durch Verzweigungen und Anastomosen miteinander verbunden. Der daraus resultierende „Kreislauf“ wird Circulus willisii (C. willisii) genannt und ist in Abbildung 73 beispielhaft wiedergegeben.



**Abbildung 73:** Darstellung des Circulus willisii mit den terminalen Arterien einer CD-1 Maus nach Li und Zuo 2010.

Alle Säugetiere bilden diesen Kreislauf aus (Edvinsson et al. 1993), aber vor allem im humanen Gehirn kommt es zu einer individuellen Ausprägung der blutversorgenden Gefäßen und des C. willisii (Hillen et al. 1991; van der Zwan et al. 1992). Daher war es wichtig einen Mausstamm zu verwenden, der einen intakten C. willisii besitzt und der Individualität des Menschen nahe kommt.

CD-1 Mäuse eigneten sich daher am besten, da sie zu einem Auszuchtstamm gehören und, im Gegensatz zu häufig verwendeten Inzuchtstämmen, wie SV-129, Balb/C oder C57Bl/6 oder anderen Spezies, wie die mongolische Wüstenrennmaus, einen relativ intakten *Circulus willisii* aufweisen (Fujii et al. 1997; Li und Zuo 2010; Majid et al. 2000; Small und Buchan 2000). Weibliche Tiere wurden auf Grund ihrer mäßigen Gewichtszunahme im Alter genommen, um das Präparieren nicht durch die Verfettung des Gewebes und der Arterien zu erschweren. Weibliche Mäuse stimmen ihren Hormonzyklus in der Gruppe aufeinander ab, daher wurden, um den Schutzeffekt von Estrogen bei einer Ischämie oder eine Beeinflussung in den Verhaltenstests (Culmsee et al. 1999; Gibson et al. 2006) zu minimalisieren, Kontroll- und Bilobalid-behandelte Tiere immer am selben Tag getestet und operiert.

### **6.1.2 Wahl des experimentellen Schlaganfall-Modells**

Um eine fokale Ischämie in der Maus auszulösen, gibt es mehrere Möglichkeiten (siehe Kapitel 2, Tabelle 2). Wichtig ist, dass eine Okklusion sowohl permanent, als auch transient möglich ist. Die Craniotomie und das Fadenmodell erfüllen beide diese Anforderung. Gegen die Craniotomie spricht die Durchführung der Methode und, dass eine Kombination mit der Mikrodialysetechnik, auf Grund des Platzmangels am Schädel der Maus, nur erschwert machbar ist. Hinzu kommt auch, dass sich bei der distalen MCAO das Kerngebiet des Infarktes nicht im Striatum, sondern im Cortex ausbildet. Für die Verwendung des Fadenmodells spricht folglich das Vorhandensein des Infarktes im Striatum und das Ausbilden einer Penumbra relativ schnell nach der Okklusion, was eine Untersuchung neuroprotektiver Substanzen wie Bilobalid möglich macht (Howells et al. 2010).

### 6.1.3 Vorversuche zur Applikation von Ringerlaktat-Lösung nach einer Schlaganfallinduktion

Für die Untersuchung, ob die Applikation von Ringerlaktat-Lösung direkt nach der Schlaganfallinduktion eine Azidose verhindern kann, wurde den Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten (siehe Kapitel 5.1) arterielles oder venöses Blut abgenommen und mit Hilfe eines Blutgasanalysators vermessen (siehe Kapitel 4.2.5). Ein Vergleich der ermittelten Normwerte in dieser Arbeit zu Werten aus der Literatur zeigt, dass die gemessenen Werte den in der Literatur (Hoyt et al. 2007) genannten entsprachen. Im Schlaganfallmodell zeigt sich, dass sich sowohl im arteriellen (Abbildung 28 und Abbildung 29), als auch im venösen Blut (Abbildung 32 und Abbildung 33) durch die Gabe von Ringerlaktat-Lösung eine Azidose ( $\text{pH} < 7,35$ ), im Gegensatz zu den unbehandelten Tieren, erst 4 Stunden nach der MCAO ausbildet. Besonders 24 Stunden nach der Schlaganfallinduktion besteht zwischen den beiden Gruppen ein markanter Unterschied. Im arteriellen Blut normalisiert sich der pH-Wert zu diesem Zeitpunkt in der Gruppe mit Ringerlaktat-Gabe, im Gegensatz zu der Gruppe ohne Ringerlaktat-Gabe (Abbildung 28,  $p < 0,001$ ), wieder auf den Ausgangswert. Entsprechend dem Verlauf der pH-Werte ändert sich auch der Kohlendioxidpartialdruck im arteriellen und venösen Blut (siehe Abbildung 29 und Abbildung 33). Tiere ohne Ringerlaktat-Gabe haben in den arteriellen Blutwerten 24 Stunden nach der MCAO einen Kohlendioxidpartialdruck von 42,6 mmHg, wohingegen Tiere mit Ringerlaktat-Applikation einen normalisierten  $\text{pCO}_2$ -Gehalt von 28,8 mmHg aufweisen (Abbildung 29,  $p < 0,01$ ). In den venösen  $\text{pCO}_2$ -Werten ist ein kontinuierlicher Anstieg in beiden Gruppen zu sehen, aber auch hier weisen die Mäuse ohne Ringerlaktat-Gabe einen deutlich höheren  $\text{pCO}_2$ -Gehalt nach 24 Stunden auf, als die Mäuse mit Ringerlaktat (Abbildung 33). Die Applikation von Ringerlaktat kann folglich nach einem Schlaganfall eine direkte Azidose im Blut verhindern und die Tiere erholen sich innerhalb von 24 Stunden nach der Operation deutlich besser, als Tiere ohne Ringerlaktat-Gabe.

Scheinoperierte Tiere mit Ringerlaktat-Gabe (siehe Kapitel 5.2) zeigten in der Blutgasanalyse ebenfalls eine Reduktion des pH-Wertes von 7,38 (24 h vor OP) auf 7,33 (4 h nach OP) ( $p < 0,05$ , Daten nicht gezeigt).

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass nicht nur die Induktion eines Schlaganfalls für die Entstehung einer Azidose ausschlaggebend ist, sondern auch die Narkose mit Isofluran an sich. Eine Studie zur Langzeitanästhesie mit Isofluran und N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub>, sowie konstanter Gabe von isotonischer Kochsalzlösung zeigte, dass die verwendeten Mäuse eine moderate Azidose entwickelten (Szczeny et al. 2004). Studien in anderen Spezies zeigten, dass es unter Isofluran-Narkose zu einer respiratorischen Depression mit erhöhten pCO<sub>2</sub>- und erniedrigten pH-Werten kommt (Galloway et al. 2004; Grosenbaugh und Muir 1998). Ebenfalls ist aus Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits bekannt, dass Isofluran die Laktatspiegel im Blut erhöht (Horn und Klein 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Applikation von Ringerlaktat nach der Schlaganfallinduktion die Ausbildung einer Azidose verzögert und diese Tiere nach 24 Stunden normale Blutgaswerte aufweisen. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass bereits durch eine Narkose mit Isofluran eine leichte Azidose induziert wird. Volatile Anästhetika sind, im Gegensatz zu Injektionsnarkotika, besonders gut zu steuern (Henry und Casto 1989) und Isofluran ist gegenüber anderen Inhalationsnarkotika, wie Sevofluran oder Desfluran, besonders kostengünstig (Breck und Gaynor 2003). Daher wurde an diesem Narkosemittel festgehalten und vorbeugend nach jedem operativem Eingriff 1 ml Ringerlaktat-Lösung appliziert.

## **6.2 Mit welchen Methoden kann man die pathophysiologischen Veränderungen nach einer Ischämie in der Maus quantifizieren?**

### **6.2.1 Berechnung des Infarktvolumens**

Zuerst wurden die pathophysiologischen Veränderungen im Gehirn der Maus durch einen Schlaganfall ermittelt. Hierfür wurde die Infarktgröße 24 Stunden nach der MCAO mit Hilfe der TTC-Färbung ausgewertet (4.2.1.3).

Durch den proximalen Verschluss der MCA ist in den Mäusen ein permanenter oder transienter Schlaganfall ausgelöst worden. Im permanenten Modell beträgt die Infarktfläche zwischen 44-52 % der Gesamthirnfläche und durchzieht sowohl das Striatum, als auch den Hippokampus (Abbildung 37). Im transienten Modell liegt die Infarktfläche dagegen bei 19-38 % der Gesamthirnfläche und ist besonders stark im Striatum, dem so genannten „Core“-gebiet der Ischämie ausgeprägt (Abbildung 44). Ein Vergleich beider Modelle zeigt, dass vor allem die Infarktfläche im Striatum durch eine Reperfusion nach 90 Minuten um bis zu 20 % reduziert werden kann (Abbildung 45).

Das Ausmaß des Infarktes ist folglich abhängig von der Dauer der Okklusion und die Ergebnisse bestätigen die bereits in Ratten und C57BL/6 Mäusen publizierten Daten in Bezug auf den Unterschied in der Infarktfläche zwischen permanenter und transienter Ischämie (Belayev et al. 1999; Chu et al. 2008; Rogers et al. 1997).

### **6.2.2 Verhaltenstests**

Ein Vergleich der Symptome nach einer fokalen Ischämie im Tiermodell mit denen, die Schlaganfallpatienten nach einem Verschluss der Arteria cerebri media aufweisen (siehe Tabelle 1), offenbart einige Gemeinsamkeiten und Unterschiede. So kommt es in beiden Fällen zu sensomotorischen Defiziten auf der kontralateralen Infarktseite (van der Staay 2000). Jedoch sind die im Tiermodell auftretenden Beschwerden im Vergleich zum Menschen, je nach Schlaganfallmethode, eher mild und verbessern sich innerhalb einiger Wochen (Gonzalez und Kolb 2003; Markgraf et al. 1992; Yamamoto et al. 1988), wohingegen Patienten unter persistierenden neurologischen Beeinträchtigungen leiden (Gorelick 1995).

Um die sensomotorischen Störungen nach einem ischämischen Infarkt im Tiermodell zu untersuchen, bieten sich zahlreiche Verhaltenstests an. Die Mehrzahl dieser Tests ist allerdings für Ratten entwickelt worden und nur begrenzt auf die Maus übertragbar. Daher sind für diese Arbeit Verhaltenstests ausgewählt worden, die sich einfach und reproduktiv an der Maus durchführen lassen und die Motorik und Koordination der Maus fordern (siehe Kapitel 4.2.2). Der Corner-Test wurde zunächst als eine empfindliche und objektive Methode für die Bewertung langfristiger funktionaler Defizite im embolischen Schlaganfall-Modell beschrieben (Zhang et al. 2002), kann aber im transienten Ischämie-Modell (60 min oder 90 min) bei Mäusen ebenso erfolgreich eingesetzt werden (Bouet et al. 2007; Hao et al. 2008; Li et al. 2004). In einer Studie zur motorischen und somatosensorischen Beeinträchtigungen der Ratte konnte gezeigt werden, dass eine Minderung der Okklusionszeit eine Verbesserung in den Verhaltenstests mit sich bringt (Zhang et al. 2000). Daher sind in dieser Arbeit die verwendeten Verhaltenstests sowohl bei einer permanenten, als auch bei einer transienten MCAO durchgeführt worden (Abbildung 14).

Im Corner-Test zeigt sich im Vergleich zur permanenten MCAO bei den Mäusen mit einer transienten Okklusion der Arteria cerebri media (Abbildung 46) keine Verbesserung in der Motorik (Abbildung 38). Im Chimney-Test dagegen führt die Verkürzung der Okklusionszeit zu einer deutlichen Verbesserung der Fähigkeit der Maus, rückwärts aus einer Röhre heraus zu klettern ( $p < 0,001$ , Ein-Wege ANOVA). Lediglich 30 % der Tiere waren im transienten Modell nicht mehr in der Lage, aus der Röhre zu kommen (Abbildung 47), wohingegen im permanenten Modell 100 % der Mäuse nicht mehr rückwärts aus der Röhre klettern konnten (Abbildung 39). Ein ebenso statistisch signifikanter Unterschied wurde im Rotarod-Test unter normalen Bedingungen beobachtet. Nach einer permanenten Okklusion der Arteria cerebri media zeigen die Mäuse eine Differenz der Zeit nach zu vor der MCAO von  $-72 \pm 26$  s (Abbildung 40). Im transienten Modell dagegen kommt es nur zu einer Differenz der Zeit nach zu vor der MCAO von  $-2,7 \pm 7,4$  s (Abbildung 48).

Im Rotarod-Test unter beschleunigenden Bedingungen ist kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen permanenter und transientser Okklusion zu sehen ( $p > 0,05$ , Ein-Wege ANOVA).

Fasst man die Daten zusammen, so kann man sagen, dass eine Verkürzung der Okklusionszeit der Arteria cerebri media, wie im Chimney- und Rotarod-Test unter normalen Bedingungen gezeigt, zu einer besseren Motorik und Koordination der Tiere führt. Während im permanenten Modell die Daten der Verhaltenstest sehr homogen sind (siehe Kapitel 5.2.1.2), kommt es in den Verhaltenstest mit einer transienten Ischämie zu großen Abweichungen zwischen den einzelnen Tieren. Eine Reduktion der Infarktfläche (Abbildung 45) führt nicht immer, wie im Corner-Test (Abbildung 38 und Abbildung 46) und auf dem beschleunigenden Rotarod (Abbildung 40 und Abbildung 48) gezeigt, zu einer neurologischen Verbesserung der Tiere.

Ähnliche Befunde sind auch aus der Klinik bekannt. Eine Humanstudie zeigte, dass die Beziehung zwischen den ischämischen Läsionen und dem funktionellen Status des Patienten von der Größe des Infarktes abhängig ist. So konnte bei großen Läsionen eine mäßige bis starke Beziehung zum funktionellen Status des Patienten gezogen werden, während kleine Läsionen keine Korrelation der beiden Messpunkte zuließen (Schiemanck et al. 2005).

### 6.2.3 Mikrodialyse

Die metabolischen Veränderungen nach einer Ischämie im Extrazellulärraum des Gehirns der Maus sind mit der Mikrodialysetechnik bestimmt worden (siehe Kapitel 4.2.3 und 4.2.4).

Hierfür wurde den Tieren 24 Stunden vor der MCAO eine Dialysesonde im Striatum implantiert und die Dialyse 60 Minuten vor dem Schlaganfall gestartet.

Die extrazelluläre, basale Glukosekonzentration im Gehirn liegt bei 1,6 mM (vgl. Tabelle 5, Basalwert korrigiert mit der Wiederfindungsrate), dies ist im Bereich der extrazellulären Glukosekonzentrationen im humanen Gehirn von 0,35-3,3 mM (McNay und Gold 1999).

Bereits 30 Minuten nach der MCAO sinkt die Glukosekonzentration rapide auf 10 % der gemessenen Basalwerte ab und bleibt unverändert in der weiteren Dialysezeit bei 0,04 mM (Abbildung 41).

Vergleichbare Glukosespiegel nach einer Ischämie sind von unserer Arbeitsgruppe bereits in verschiedenen Studien beschrieben worden (Kiewert et al. 2010; Sumbria et al. 2011).

Die in diesem Versuch detektierten extrazellulären Glutamat-Basalwerte von  $8,5 \mu\text{M}$  (Abbildung 42, Basalwert korrigiert mit der Wiederfindungsrate, Tabelle 5) liegen etwas höher als die extrazellulären Spiegel ( $2,4 - 6,9 \mu\text{M}$ ) anderer Arbeitsgruppen (Homola et al. 2006; Zoremba et al. 2007). Diese Abweichung lässt sich zum einen durch die Individualität der selbstgebauten Sonden und der Mikrodialysetechnik an sich, zum anderen auch durch die unterschiedlichen Implantationsorte der Sonden im Gehirn erklären (Lipton 1999).

Eine auf Grund der Sondenimplantation induzierte Ruptur der Blut-Hirn-Schranke und eine daraus resultierende Erhöhung der Glutamatspiegel lassen sich ausschließen. Die Blut-Hirn-Schranke ist bereits 1,5 Stunden nach der Implantation wieder verschlossen und die Glutamatkonzentration im Gehirn hat sich 24 Stunden später wieder normalisiert (Sumbria et al. 2011).

Parallel zur Reduktion der Glukosekonzentration steigt die extrazelluläre Glutamatkonzentration innerhalb von 15-30 Minuten nach der Schlaganfallinduktion rapide auf das 16 fache an (Abbildung 42). Die durchschnittliche Glutamatkonzentration im Kerngebiet des Schlaganfalls liegt für die Dialysezeit von 120 Minuten durchschnittlich bei  $120 \mu\text{M}$  (siehe Tabelle 5, Basalwert korrigiert mit der Wiederfindungsrate).

Ein Vergleich zur Literatur zeigt, dass die Ergebnisse im Einklang mit Daten anderer Arbeitsgruppen stehen. Beim transienten Ischämie-Modell der Ratte wurde ein starker Anstieg von Glutamat gezeigt (Benveniste et al. 1984; Benveniste 2009). Auch in anderen Versuchen mit verschiedenen Spezies stiegen bereits 15-30 Minuten nach der Ischämie die Glutamatkonzentrationen auf das 10-15 fache an (Baker et al. 1991; Mitani und Kataoka 1991). Im fokalen Ischämie Modell der Ratte (Wahl et al. 1994) und der Maus (Kiewert et al. 2010; McNay und Gold 1999; Shimizu-Sasamata et al. 1998) wurden ähnliche Veränderungen in den Glutamatkonzentrationen gezeigt.



Generell kann gesagt werden, dass es im striatalen Kerngebiet der Ischämie zu einem enormen Glutamatanstieg kommt und die Glukosespiegel drastisch reduziert werden (Lipton 1999).

In Bezug auf die Änderungen in den Laktatwerten während der Ischämie fällt auf, dass sowohl in der Kontroll-, als auch in der scheinoperierten Gruppe bereits zu Beginn der Isofluran-Narkose die Laktatwerte um das 4-6 fache ansteigen und sich erst über mehrere Stunden hinweg wieder normalisieren (Abbildung 43). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit bereits veröffentlichten Daten aus unserer Arbeitsgruppe. In diesen Studien, in denen ebenfalls Isofluran verwendet wurde, ist auch ein Anstieg von 200-600 % in den Laktatwerten bereits zu Beginn der Isofluran-Narkose beschrieben (Kiewert et al. 2010, Sumbria et al. 2011). Eine Mikrodialysestudie über den Einfluss verschiedener Anästhetika auf die Glukose- und Laktatkonzentrationen im Gehirn der Maus zeigte, dass volatile Narkotika wie Isofluran, aber auch Chloralhydrat dosisabhängig die extrazelluläre Laktatkonzentration erhöhen (Horn und Klein 2010). In Experimenten, in denen Urethan als Narkotikum verwendet wurde, ist ebenfalls eine Erhöhung der Laktatkonzentration beobachtet worden (Homola et al. 2006; Zoremba et al. 2007).

Eine Ischämie kann demnach zu einem Anstieg in den Laktatkonzentrationen führen und ein dosisabhängiger additiver Effekt von Isofluran liegt nahe.

### 6.3 Einsatz von Bilobalid als Neuroprotektivum

Wie in der Einleitung ausführlich dargelegt, hat Bilobalid neuroprotektive Eigenschaften, die in verschiedenen *in vitro*-Experimenten gezeigt wurden. In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits berichtet, dass Bilobalid das Infarktvolumen eines fokalen cerebralen Schlaganfalls in der Maus verringert (Mdzinarishvili et al. 2007). Die Pharmakokinetik von Bilobalid im Gehirn war völlig unbekannt, daher ist in der vorliegenden Arbeit erstmalig eine Studie darüber *in vivo* durchgeführt worden.

#### 6.3.1 In welchem Ausmaß überwindet Bilobalid vor und nach einem Schlaganfall die Blut-Hirn-Schranke?

Damit eine Substanz neuroprotektive Effekte im Gehirn ausüben kann, muss sie die Blut-Hirn-Schranke überwinden und in ausreichender Konzentration im Gehirn vorliegen. Ziel einer ersten Studie zum Einsatz von Bilobalid als Neuroprotektivum war somit, die Permeabilität und Bioverfügbarkeit der Substanz im gesunden und ischämischen Hirngewebe mittels der Mikrodialyse- und LC/MS-Technik zu untersuchen (siehe Kapitel 5.3).

In der vorliegenden Arbeit wurde für Bilobalid 30-40 Minuten nach einer intraperitonealen Applikation von 10 mg/kg eine Konzentration von ca. 1  $\mu\text{M}$  im striatalen Gewebe detektiert (Abbildung 50). Die Plasmaspiegel von Bilobalid liegen 60 Minuten nach der Applikation bei 5,9  $\mu\text{M}$  (Daten nicht gezeigt) und sind vergleichbar mit den gemessenen Plasmaspiegeln nach oraler Gabe (Mauri et al. 2003; Ude et al. 2011).

Bilobalid zeigt keine Albuminbindung (Abbildung 49) und erreicht innerhalb von 40-60 Minuten im Extrazellulärraum des Gehirns 1/6 der gemessenen Plasmawerte (siehe Kapitel 5.3.2). Auf Grund dieser Daten lässt sich darauf schließen, dass Bilobalid schnell und in beträchtlichem Ausmaß die Blut-Hirn-Schranke überwindet. Diese Annahme bestätigt die bereits im *in vitro*-Modell gezeigte Polarität und Löslichkeit von Bilobalid (Madgula et al. 2010; van Beek 2005).

Erstmalig konnte auch gezeigt werden, dass Bilobalid (10 mg/kg), eine Stunde vor der MCAO gegeben, im ischämischen Hirngewebe über längere Zeit und auch nach Unterbrechung der cerebralen Blutversorgung detektiert werden kann (Abbildung 52). Dies begünstigt vor allem den Einsatz der Substanz als Neuroprotektivum in der Prävention. Im Gegensatz dazu erreicht Bilobalid (10 mg/kg), appliziert eine Stunde nach der Schlaganfallinduktion, nur eine sehr geringe Konzentration (0,08 µM, Abbildung 53) im Gehirn. Die mangelnde Durchblutung im ischämischen Gewebe beschränkt offenbar den Transport von Bilobalid vom Plasma in das Gehirn.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass Bilobalid sowohl im gesunden, als auch im ischämischen Gewebe in ausreichender Konzentration im Extrazellulärraum vorliegt, um als Neuroprotektivum eingesetzt zu werden. Die Untersuchungen hierzu werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

### **6.3.2 In welcher Dosis und in welchem Zeitfenster reduziert Bilobalid einen fokalen ischämischen Infarkt?**

In unserem Labor konnte die in der Literatur für 10 mg/kg Bilobalid aufgeführte Eigenschaft, den durch eine fokale cerebrale Ischämie entstandenen Infarkt zu reduzieren (siehe Kapitel 2.3.3.1), bestätigt werden (Abbildung 54). Es war nun von Interesse, die Dosis zu reduzieren und näher an eine im Menschen einsetzbare Dosis zu gelangen, denn Bilobalid ist derzeit nicht als Reinsubstanz im Handel und ist nur zu 3 % im standardisierten EGb 761 Extrakt (z.B. Tebonin<sup>®</sup> konzent<sup>®</sup> 240 mg pro Tablette) enthalten.

In Abbildung 56 und Abbildung 57 kann man sehen, dass Bilobalid dosisabhängig die Schlaganfallfläche reduziert. Abbildung 57 zeigt, dass der Effekt der Dosis 10 mg/kg besonders stark im Striatum ausgeprägt ist ( $p < 0,001$ ). Für diese Gehirnregion wurde in der oben genannten Studie zur Permeabilität von Bilobalid in das Gehirn (siehe auch Kapitel 5.3.2) eine maximale Konzentration von ca. 1  $\mu\text{M}$  30-40 Minuten nach der Applikation detektiert. Im Hippokampus konnte dagegen nur eine Maximalkonzentration von 0,4  $\mu\text{M}$  90 Minuten nach Applikation festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte eine Erklärung für die deutlich abgeschwächte Reduktion der Infarktfläche in dieser Gehirnregion sein (Abbildung 57 und Abbildung 59).

Für die Dosis 3 mg/kg konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch in dieser Konzentration eine Reduktion der Schlaganfallfläche im striatalen Gebiet vorliegt (Abbildung 54 und Abbildung 57), wohingegen die Dosen 0,3-1 mg/kg nur eine sehr schwache Reduktion in der Infarktfläche bewirken (Abbildung 56 und Abbildung 57).

Dieser Einfluss auf die Infarktfläche wurde bereits für einige andere antiexzitatorisch wirkende Substanzen gezeigt. So reduzierte der nicht-kompetitive NMDA-Rezeptor Antagonist MK-801 dosisabhängig die Infarktfläche um bis zu 75 % gegenüber unbehandelten Tieren (Boast et al. 1988; Perez-Pinzon et al. 1995). Für Selfotel, als kompetitiver NMDA-Rezeptor Antagonist, sind vergleichbare dosisabhängige Effekte berichtet worden (Danton und Dietrich 2004). Im experimentellen Ischämie-Modell wurde für die eingesetzte Maximaldosis von 40 mg/kg keine Nebenwirkungen beobachtet, wobei in einer klinischen Phase II a Studie bereits bei 1,5 mg/kg die Grenze der sicheren Dosis erreicht wurde. In einer klinischen Phase III Studie stieg die Mortalität unter Selfotel-Behandlung sogar an (Davis et al. 2000).

In unserer Studie zur Dosis-Wirkungs-Beziehung von Bilobalid bei einem permanenten Schlaganfall und in den bisherigen veröffentlichten experimentellen Studien mit 10 mg/kg Bilobalid, bzw. mit dem Extrakt (Kriegelstein et al. 1995; Mdzinarishvili et al. 2007), wurden keine derartigen Nebenwirkungen dokumentiert. Auch aus klinischen Studien sind keine gravierende Nebenwirkungen bekannt und das Auftreten von unerwarteten und schweren Blutungsereignissen ist nach wie vor nicht sicher belegt (Chan et al. 2007; Kloft und Kellermann 2009).

Eine chronische Einnahme des Extraktes erfolgt bereits bei vielen älteren Patienten zur Verbesserung der Gedächtnisleistung. Eine Anreicherung von Bilobalid im Extrakt, oder die Entwicklung der Substanz als kommerziell erhältliches Präparat könnte als präventive Einnahme zur Reduktion des Schlaganfallrisikos in Erwägung gezogen werden.

Nachdem die Behandlung mit einer Dosis von 10 mg/kg Bilobalid zu einer markanten Reduktion des Infarktgebietes führte, sollte im Weiteren untersucht werden, wie sich eine Gabe der Substanz nach der Schlaganfallinduktion auf das Ausmaß der Schlaganfallfläche auswirkt. In den getesteten Zeitfenstern ist in Abbildung 59 eine Reduktion der Infarktvolumina eindeutig für den Zeitpunkt eine Stunde nach der MCAO zu sehen. Besonders im vorderen Teil des Striatums ist diese Reduzierung des Infarktes vergleichbar mit der Applikation von Bilobalid vor dem Schlaganfall (Abbildung 57, Abbildung 58 und Abbildung 59). Die Erweiterung des Applikationszeitfensters auf 3 Stunden nach der MCAO führt tendenziell zu einer Infarktreduktion im Striatum. Im Hippokampus ist dagegen kein zeitabhängiger Effekt zu sehen (Abbildung 58 und Abbildung 59).

Eine Studie zur Rolle der Hämoxxygenase I im permanenten Schlaganfallmodell zeigt, dass eine perorale Applikation von 6 mg/kg Bilobalid 4 Stunden nach der distalen Okklusion der Arteria cerebri media (siehe hierfür Kapitel 3, Seite 6) zu einer Reduktion des corticalen Infarktvolumen auf  $29 \pm 3,9$  % führt (Shah et al. 2011). Ein direkter Vergleich dieser Daten mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann aber aus folgenden Gründen nicht gezogen werden: (1) Auswertung der Infarktfläche nach 7 Tagen, (2) Verwendung eines anderen Mausstammes (siehe Kapitel 6) und (3) Verwendung des distalen Schlaganfallmodells (siehe Kapitel 3 und Kapitel 6.1.2).

Abschließend kann man sagen, dass in dieser Arbeit erstmalig gezeigt wurde, dass Bilobalid dosisabhängig das Infarktvolumen reduziert und eine Applikation der Dosis 10 mg/kg nach einem Schlaganfall ebenfalls einen neuroprotektiven Effekt vermittelt.

### **6.3.3 Verbessert Bilobalid die sensomotorischen Defizite der Maus nach einem Schlaganfall?**

Verhaltenstests mit Bilobalid sind in der Literatur selten zu finden. Bisherige Tests wurden nur im experimentellen Modell für Gedächtnis- (Zhang et al. 2009) und Angststörungen (Kuribara et al. 2003) durchgeführt.

Bilobalid zeigte in den Kapiteln 5.4.1 und 5.4.2 einen markanten neuroprotektiven Effekt auf die Infarktfläche und die Glutamat-induzierte Exzitotoxizität. Um erstmalig den Einfluss von Bilobalid auf die sensomotorischen Defizite der Maus nach einer Ischämie zu untersuchen, wurden 10 mg/kg Bilobalid eine Stunde vor der MCAO (permanent oder transient) i.p. appliziert und die Verhaltenstests, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, durchgeführt.

Im permanenten Schlaganfallmodell konnte im Corner- und Chimney-Test keine Verbesserung der Bilobalid-behandelten gegenüber den unbehandelten Tieren festgestellt werden. Beide Gruppen verschlechtern sich auf Grund des Schlaganfalls hoch signifikant im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren (Abbildung 65 und Abbildung 66). Im beschleunigenden Rotarod Versuch zeigen Bilobalid-behandelte Mäuse eine etwas bessere Leistung gegenüber den scheinoperierten Tieren, als die MCAO-Gruppe. Allerdings besteht auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Bilobalid- und der MCAO-Gruppe (Abbildung 67).

Eine Korrelation des Infarktvolumens (Abbildung 57) zum Schweregrad der sensomotorischen Dysfunktionen (Abbildung 65 bis Abbildung 67) konnte für die Bilobalid-Gruppe im permanenten Schlaganfallmodell nicht gefunden werden. Berichte über diesen Zusammenhang sind in der Literatur widersprüchlich. Ein ähnliches Ergebnis wurde von Wahl et al. (1992) im MCAO-Modell in Ratten beschrieben, wohingegen andere Arbeitsgruppen eine Korrelation zwischen den beiden Parametern gefunden haben (Bederson et al. 1986; Markgraf et al. 1994).

Verhaltenstests mit MK-801 (Auer et al. 1996), NGP-1-01 (Hao et al. 2008) und anderen potentiellen Neuroprotektiva, wie Pravastatin (Trinkl et al. 2006) und  $\alpha$ -Linolensäure (Blondeau et al. 2009), wurden immer im transienten Ischämie-Modell durchgeführt.

Daher war es von besonderem Interesse, ob auch Bilobalid unter diesen Bedingungen eine Verbesserung in Motorik und Koordination gegenüber den unbehandelten Tieren bewirkt.

Im Corner-Test der vorliegenden Arbeit zeigen die Bilobalid-behandelten Tiere (Abbildung 68) einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zu den unbehandelten Tieren und verschlechtern sich im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren nicht so stark wie die MCAO-Gruppe. Ähnliche Ergebnisse wurden im Chimney-Test erzielt (Abbildung 69). Unbehandelte Tiere benötigen hier im Durchschnitt viermal so lange ( $37,6 \pm 53$  s) wie Bilobalid-behandelte, um aus der Röhre herauszuklettern. Letztere unterscheiden sich zudem nach der MCAO nicht signifikant von den scheinoperierten Tieren. Im Rotarod-Test unter beschleunigenden Bedingungen zeigt sich im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren nur ein tendenziell besseres Ergebnis für die Bilobalid-behandelten Tiere (Abbildung 70). Wurde der Rotarod-Test unter normalen Bedingungen durchgeführt, so ist in beiden Gruppen keine signifikante Verschlechterung zu den scheinoperierten Tieren zu sehen.

Die Daten zum Rotarod-Test, vor allem unter normalen Bedingungen (Abbildung 70), lassen vermuten, dass dieser Test nicht geeignet ist, um die Beeinträchtigung der Tiere nach einem Schlaganfall wider zu geben. Andere Arbeitsgruppen, die sich mit der Charakterisierung der motorischen Defizite nach einem Infarkt beschäftigt haben, zeigten ähnliche Ergebnisse (Freret et al. 2009; Vandeputte et al. 2010). In der Literatur findet man häufig, dass der Rotarod-Test erfolgreich zur Charakterisierung der Beeinträchtigungen der Balance und Motorik für andere neurodegenerative Erkrankungen, wie Morbus Parkinson oder Chorea Huntington, eingesetzt wird (Vernon et al. 2011). Diese Tiere sind auch in ihrer Motorik und Koordination beeinträchtigt, doch sind die neurologischen Veränderungen im Gehirn milder und nicht vergleichbar mit einem Schlaganfall.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass 10 mg/kg Bilobalid nur im transienten Schlaganfallmodell das neurologische Defizit der Tiere nach dem Infarkt deutlich verbessert.

#### **6.3.4 Beeinflusst Bilobalid *in vivo* die Ischämie-induzierten metabolischen Veränderungen im Gehirn?**

Für Bilobalid konnte eine dosisabhängige Reduktion des ischämischen Gewebes nach einem Schlaganfall gezeigt werden (siehe Kapitel 5.4.1.1) Um eine Korrelation zwischen der Infarktgröße und der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität zu untersuchen, wurde der Einfluss von Bilobalid auf die metabolischen Veränderungen nach einem Schlaganfall mit Hilfe der Mikrodialysetechnik gemessen (siehe Kapitel 4.2.3 und 4.2.4).

Ähnlich wie in der MCAO-Gruppe (siehe Kapitel 6.2) lagen für die Bilobalid-Gruppen die Basalwerte für Glukose zwischen 1,3 und 2 mM (vgl. Tabelle 5, Basalwert korrigiert mit der Wiederfindungsrate) und entsprachen damit auch den extrazellulären Glukosekonzentrationen im humanen Gehirn (McNay und Gold 1999). In den Bilobalid-Gruppen ist, wie in der MCAO-Gruppe, 30 Minuten nach der Okklusion der Arteria cerebri media ein starke Reduktion in den Glukosespiegel auf 9 bis 16 % der gemessenen Basalspiegel zu beobachten (Abbildung 60 und Abbildung 61). Nach der Schlaganfallinduktion bleiben die Glukosespiegel bei 0,03-0,06 mM. Bilobalid hatte folglich keinen Einfluss auf den abrupten Energieverlust, bzw. auf den Blutfluss, bei einer Ischämie.

Die Analyse der gemessenen Glutamatkonzentrationen in den Bilobalid-Gruppen zeigt, dass Bilobalid dosisabhängig die Glutamatspiegel im ischämischen Gehirn beeinflusst (Abbildung 62 und Abbildung 63). Während sich in der Schlaganfall-Gruppe die Glutamatkonzentration 15-30 Minuten nach der MCAO auf 1573 % erhöht (Abbildung 42), kann für 10 mg/kg Bilobalid nur ein Anstieg auf 419 % beobachtet werden (Abbildung 62). Dies ist vergleichbar mit der Reduzierung der Infarktfläche um ca. 50-75 % im Striatum bei der gleichen Dosis (Abbildung 62). Die Dosen 1 und 3 mg/kg zeigen in der Auswertung der Infarktflächen nur eine Tendenz, das Ausmaß einer Ischämie im Striatum zu reduzieren (Abbildung 62). Dies korreliert mit den gemessenen Glutamatkonzentrationen nach der Schlaganfallinduktion. Die Glutamatspiegel steigen hier zwischen 908 und 1341 % gegenüber den Basalwerten an (Abbildung 62).



Ein Vergleich zwischen der Messung der metabolischen Veränderungen nach einer Ischämie und der Infarktfläche zeigt also, dass der Einfluss von Bilobalid nicht nur durch eine histochemische Färbung der Hirnareale, sondern auch durch die extrazelluläre Messung der Glutamatkonzentration wiedergegeben werden kann (Abbildung 56 und Abbildung 62).

In der vorliegenden Arbeit ist somit erstmalig gezeigt worden, dass Bilobalid *in vivo* vor einer Glutamat-induzierten Exzitotoxizität schützt und diese Wirkung dosisabhängig ist.

### **6.3.5 Welcher Mechanismus vermittelt den Schutz von Bilobalid vor der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität?**

Bilobalid zeigte eine deutliche Reduktion der auf Grund einer Ischämie entstehenden, akuten hohen Glutamatkonzentrationen im Gehirn (Abbildung 62 und Abbildung 63). Einige direkte und indirekte Angriffpunkte von Bilobalid, die sich auf die Glutamatkonzentrationen im ischämischen Gehirn auswirken, konnten bereits ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 2.3.4). Um einen Einfluss von Bilobalid auf die Genexpression zu zeigen, müsste die Substanz chronisch gegeben werden (Chandrasekaran et al. 2001; Defeudis 2002; Shi et al. 2010b). In den hier durchgeführten Versuchen wurde Bilobalid allerdings nur einmalig eine Stunde vor Okklusion der Arteria cerebri media appliziert. Eine Veränderung der Genexpression durch Bilobalid konnte in diesem Versuchsmodell somit nicht in Betracht gezogen werden. Im Vordergrund der mechanistischen Untersuchung zu Bilobalid standen daher Enzyme, die an der Bereitstellung von Glutamat im Gehirn verantwortlich sind.

Die Glutaminase generiert aus Glutamin Glutamat und Ammoniak (Abbildung 23) und besitzt gewebespezifische Isoenzyme. Die Glutaminase kommt im ZNS (Szeliga et al. 2005), dem Dünndarm und der Niere vor (Modi et al. 1991), wohingegen die Phosphat-aktivierte mitochondriale Glutaminase in der Leber zu finden ist (Melino et al. 2010).

In einer Studie mit dem Glutamin-Antagonisten 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin (DON) konnte gezeigt werden, dass die Glutamatfreisetzung aus Mikrogliazellen und die anschließende exzitotoxische Neurodegeneration *in vitro* und *in vivo* reduziert werden kann (Takeuchi et al. 2008). In der Kombination des fokalen cerebralen Ischämie Modells mit der Mikrodialysetechnik wurde gezeigt, dass die mitochondriale Glutaminaseaktivität in der Peripherie der ischämischen Läsion erhalten bleibt und dort direkt zur Erhöhung des extrazellulären Glutamats beiträgt (Newcomb et al. 1998).

Um die potentielle Wirkung von Bilobalid auf die Glutaminase im Enzymassay zu untersuchen, wurde DON als Positivkontrolle eingesetzt und der Umsatz des Substrates (Glutamin) von 1 mg Protein pro Stunde mit dem Mikroanalysator vermessen (siehe Kapitel 4.2.4.1 und Kapitel 4.2.6). DON reduziert die Glutamatfreisetzung gegenüber dem Hirnhomogenat um 90 %, wohingegen Bilobalid keinen Einfluss auf die Glutaminaseaktivität zeigt (Abbildung 71). Daraus kann geschlossen werden, dass die Bilobalid-induzierte Reduktion der Ischämie-bedingten Glutamatkonzentrationen im Extrazellulärraum nicht durch die Inhibition der Glutaminase zustande kommt.

Als weiteres Enzym sollte die N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamat-Peptidase (NAAG-peptidase) betrachtet werden. Sie hydrolysiert im Extrazellulärraum N-acetyl-L-aspartyl-glutamat (NAAG) in Glutamat und N-acetyl-L-aspartat (NAA) (Abbildung 26).

N-Acetyl-aspartyl-glutamat (NAAG) ist ein Neuropeptid und liegt im Gehirn im millimolaren Bereich vor. Lokalisiert ist es in glutamatergen, cholinergen, GABAergen und noradrenergen Neuronen (Coyle 1997). NAAG wird durch Depolarisation, auf Grund eines  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Prozesses, freigegeben und ist ein Agonist an mGlu3 Rezeptoren auf Neuronen und Gliazellen (Coyle 1997; Zhou et al. 2005a).

Eine Hemmung der NAAG-peptidase, z.B. durch 2-(Phosphonomethyl)-Pentadinsäure (PMPA), reduziert zum einen die Inaktivierung von NAAG zu NAA/Glutamat und führt zum anderen, auf Grund der erhöhten NAAG-Spiegel, zu einer Aktivierung präsynaptischer mGlu3-Rezeptoren. Diese hemmen wiederum die Glutamatfreisetzung (Neale et al. 2000; Sanabria et al. 2004; Zhou et al. 2005).

Für PMPA sind die gleichen Eigenschaften im fokalen Ischämie-Modell beschrieben, wie in der vorliegenden Arbeit mit Bilobalid (Abbildung 57 und Abbildung 62) gezeigt. Die Gabe des Inhibitors PMPA 30 Minuten vor der MCAO führte dosisabhängig zu einer Reduktion der Schlaganfallfläche und schwächte den Ischämie-induzierten Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration ab (Slusher et al. 1999).

PMPA wurde im Enzymassay in dieser Arbeit als Positivkontrolle eingesetzt, um den Mechanismus von Bilobalid auf die NAAG-peptidase zu untersuchen. Der Umsatz des Substrates ( $^3\text{H}$ -NAAG) von 1 mg Protein pro 90 Minuten ist mit Hilfe eines Szintillationscounters vermessen worden (siehe Kapitel 4.2.6). PMPA reduziert die Bildung von  $^3\text{H}$ -Glutamat um 95 % gegenüber dem reinen Hirnhomogenat. Bilobalid zeigt eine Reduktion von 20 % gegenüber dem Hirnhomogenat, die allerdings nicht signifikant ist (Abbildung 72). Auch hier konnte auf Grund der Daten eine Inhibition der NAAG-peptidase durch Bilobalid (10  $\mu\text{M}$ ) ausgeschlossen werden.

## 6.4 Schlussfolgerung & Ausblick

Abschließend kann man aus allen Ergebnissen zusammenfassend sagen, dass intraperitoneal verabreichtes Bilobalid, abhängig von der eingesetzten Dosis und des Applikationszeitpunktes, die Infarktfläche nach einem Schlaganfall reduziert. Insbesondere reduziert Bilobalid markant die Glutamat-induzierte Exzitotoxizität und behandelte Tiere weisen eine bessere Motorik und Koordination nach einem transienten Schlaganfall auf.

Bilobalid ist derzeit nicht als Reinsubstanz im Handel, sondern nur als Bestandteil im Ginkgo biloba Extrakt EGb 761. Viele ältere Patienten nehmen chronisch Ginkgo biloba Präparate ein (siehe Kapitel 2.3.3.2). In klinischen Studien (retrospektiv und prospektiv) könnten Untersuchungen zum Einfluss von EGb 761 auf den humanen Schlaganfall gemacht werden. Zusätzlich könnte eine Anreicherung von Bilobalid im Extrakt überlegt werden. Eine zukünftige tierexperimentelle Studie zu Bilobalid und dem Extrakt EGb 761 könnten u.a. eine Langzeitfütterung (1-3 Monate) sein, um herauszufinden, ob die Reinsubstanz im Vergleich zum Extrakt nach chronischer Gabe Einfluss auf das Infarktvolumen und die neurologische Defizite nach einem Schlaganfall hat. Zusätzlich könnten weitere Studien zum Wirkmechanismus von Bilobalid angestrebt werden. So könnte z.B. eine Untersuchung an Mitochondrien, isoliert aus behandelten und unbehandelten Tieren nach dem Infarkt, mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode in Betracht gezogen werden, um den Wirkmechanismus von Bilobalid noch besser zu charakterisieren.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdel-Kader,R., S.Hauptmann, U.Keil, I.Scherping, K.Leuner, A.Eckert, and W.E.Müller. 2007. "Stabilization of mitochondrial function by Ginkgo biloba extract (EGb 761)." *Pharmacol.Res.* 56:493-502.
- Ahlemeyer,B. and J.Krieglstein. 2003. "Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract." *Cell Mol.Life Sci.* 60:1779-1792.
- Ahlemeyer,B., A.Mowes, and J.Krieglstein. 1999. "Inhibition of serum deprivation- and staurosporine-induced neuronal apoptosis by Ginkgo biloba extract and some of its constituents." *Eur.J.Pharmacol.* 367:423-430.
- Ahlemeyer,B., D.Selke, C.Schaper, S.Klumpp, and J.Krieglstein. 2001. "Ginkgolic acids induce neuronal death and activate protein phosphatase type-2C." *Eur.J.Pharmacol.* 430:1-7.
- Ahmed,M., J.Davis, D.Aucoin, T.Sato, S.Ahuja, S.Aimoto, J.I.Elliott, W.E.van Nostrand, and S.O.Smith. 2010. "Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils." *Nat.Struct.Mol.Biol.* 17:561-567.
- Altman,F.P. 1976. "Tetrazolium salts and formazans." *Prog.Histochem.Cytochem.* 9:1-56.
- Armstead,W.M., R.Mirro, S.L.Zuckerman, M.Shibata, and C.W.Leffler. 1993. "Transforming growth factor-beta attenuates ischemia-induced alterations in cerebrovascular responses." *Am.J.Physiol.* 264:H381-H385.
- Arumugam,T. and M.P. Mattson. Models for the Study of Stroke. In P.R. Conn Hrsg. Handbook of Models for Human Aging. 1. Auflage.: Academic Press; 2006: 947-960
- Arundine,M. and M.Tymianski. 2004. "Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury." *Cell Mol.Life Sci.* 61:657-668.
- Asplund,K., J.Karvanen, S.Giampaoli, P.Jousilahti, M.Niemela, G.Broda, G.Cesana, J.Dallongeville, P.Ducimetriere, A.Evans, J.Ferrieres, B.Haas, T.Jorgensen, A.Tamosiunas, D.Vanuzzo, P.G.Wiklund, J.Yarnell, K.Kuulasmaa, and S.Kulathinal. 2009. "Relative risks for stroke by age, sex, and population based on follow-up of 18 European populations in the MORGAM Project." *Stroke.* 40:2319-2326.
- Astrup,J., B.K.Siesjo, and L.Symon. 1981. "Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra." *Stroke.* 12:723-725.
- Auer,R.N., S.G.Coupland, G.W.Jason, D.P.Archer, J.Payne, A.J.Belzberg, M.Ohtaki, and B.I.Tranmer. 1996. "Postischemic therapy with MK-801 (dizocilpine) in a primate model of transient focal brain ischemia." *Mol.Chem.Neuropathol.* 29:193-210.
- Baker,A.J., M.H.Zornow, M.S.Scheller, T.L.Yaksh, S.R.Skilling, D.H.Smullin, A.A.Larson, and R.Kuczenski. 1991. "Changes in extracellular concentrations of glutamate, aspartate, glycine, dopamine, serotonin, and dopamine metabolites after transient global ischemia in the rabbit brain." *J.Neurochem.* 57:1370-1379.
- Baloyannis,S.J. 2009. "Dendritic pathology in Alzheimer's disease." *J.Neurol.Sci.* 283:153-157.

- Barham,D. and P.Trinder. 1972. "An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system." *Analyst*. 97:142-145.
- Baron-Ruppert,G. and N.P.Luepke. 2001. "Evidence for toxic effects of alkylphenols from Ginkgo biloba in the hen's egg test (HET)." *Phytomedicine*. 8:133-138.
- Barquet P. Hrsg. Ginkgolides. Chemistry, Biology and Clinical Perspectives. Vol 1  
Barcelona: JR Prous Science; 1988.
- Barquet P. Hrsg. Ginkgolides. Chemistry, Biology and Clinical Perspectives. Vol 1  
Barcelona: JR Prous Science; 1989.
- Bastianetto,S., C.Ramassamy, S.Dore, Y.Christen, J.Poirier, and R.Quirion. 2000a. "The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid." *Eur.J.Neurosci*. 12:1882-1890.
- Bastianetto,S., W.H.Zheng, and R.Quirion. 2000b. "The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C." *J.Neurochem*. 74:2268-2277.
- Beckman,J.S. 1994. "Peroxynitrite versus hydroxyl radical: the role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury." *Ann.N.Y.Acad.Sci*. 738:69-75.
- Bederson,J.B., L.H.Pitts, M.Tsuji, M.C.Nishimura, R.L.Davis, and H.Bartkowski. 1986. "Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination." *Stroke*. 17:472-476.
- Belayev,L., R.Busto, W.Zhao, G.Fernandez, and M.D.Ginsberg. 1999. "Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation." *Brain Res*. 833:181-190.
- Benveniste,H. 2009. "Glutamate, microdialysis, and cerebral ischemia: lost in translation?" *Anesthesiology*. 110:422-425.
- Benveniste,H., J.Drejer, A.Schousboe, and N.H.Diemer. 1984. "Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis." *J.Neurochem*. 43:1369-1374.
- Bevilacqua,M.P., J.S.Pober, G.R.Majeau, W.Fiers, R.S.Cotran, and M.A.Gimbrone. 1986. "Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 83:4533-4537.
- Bevilacqua,M.P., J.S.Pober, M.E.Wheeler, R.S.Cotran, and M.A.Gimbrone. 1985. "Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion." *Am.J.Pathol*. 121:394-403.
- Biber,A. 2003. "Pharmacokinetics of Ginkgo biloba extracts." *Pharmacopsychiatry*. 36 Suppl 1:S32-S37.
- Biber,A. and E.Koch. 1999. "Bioavailability of ginkgolides and bilobalide from extracts of ginkgo biloba using GC/MS." *Planta Med*. 65:192-193.
- Birks,J. and E.J.Grimley. 2009. "Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia." *Cochrane.Database.Syst.Rev*. CD003120.

- Blondeau,N., C.Nguemeni, D.N.Debruyne, M.Piens, X.Wu, H.Pan, X.Hu, C.Gandin, R.H.Lipsky, J.C.Plumier, A.M.Marini, and C.Heurteaux. 2009. "Subchronic alpha-linolenic acid treatment enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: a versatile potential therapy for stroke." *Neuropsychopharmacology*. 34:2548-2559.
- Blumenthal M. The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. American Botanical Council. Austin: 1998: 685.
- Boast,C.A., S.C.Gerhardt, G.Pastor, J.Lehmann, P.E.Etienne, and J.M.Liebman. 1988. "The N-methyl-D-aspartate antagonists CGS 19755 and CPP reduce ischemic brain damage in gerbils." *Brain Res*. 442:345-348.
- Bohmer,A., A.Muller, M.Passarge, P.Liebs, H.Honeck, and H.G.Muller. 1989. "A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus*. Purification and properties." *Eur.J.Biochem*. 182:327-332.
- Boissier,J., J.Tardy., J.Diverres.1960. "Une nouvelle méthode simple pour explorer l'action "tranquillisante": le test de la cheminée". *Med. Exp*. 3, 81–84.
- Bonita,R. 1992. "Epidemiology of stroke." *Lancet*. 339:342-344.
- Bouet,V., T.Freret, J.Toutain, D.Divoux, M.Boulouard, and P.Schumann-Bard. 2007. "Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse." *Exp.Neurol*. 203:555-567.
- Bramham,C.R., R.Torp, N.Zhang, J.Storm-Mathisen, and O.P.Ottersen. 1990. "Distribution of glutamate-like immunoreactivity in excitatory hippocampal pathways: a semiquantitative electron microscopic study in rats." *Neuroscience*. 39:405-417.
- Breck,S.W. and J.S.Gaynor. 2003. "Comparison of isoflurane and sevoflurane for anesthesia in beaver." *J.Wildl.Dis*. 39:387-392.
- Brochet,D., R.Chermat, F.V.DeFeudis, and K.Drieu. 1999. "Effects of single intraperitoneal injections of an extract of *Ginkgo biloba* (EGb 761) and its terpene trilactone constituents on barbital-induced narcosis in the mouse." *Gen.Pharmacol*. 33:249-256.
- Broughton,B.R., D.C.Reutens, and C.G.Sobey. 2009. "Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia." *Stroke*. 40:e331-e339.
- Bruno,V., G.Battaglia, A.Copani, M.D'Onofrio, P.Di Iorio, A.De Blasi, D.Melchiorri, P.J.Flor, and F.Nicoletti. 2001. "Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs." *J.Cereb.Blood Flow Metab*. 21:1013-1033.
- Buttini,M., A.Sauter, and H.W.Boddeke. 1994. "Induction of interleukin-1 beta mRNA after focal cerebral ischaemia in the rat." *Brain Res.Mol.Brain Res*. 23:126-134.
- Caplan,LR. Hrsg. Caplan's Stroke: A Clinical Approach. 3. Auflage. Boston: Butterworth Heinemann; 2000
- Chan,P. Oxygen Radical Mechanisms in Cerebral Ischemia and Reperfusion. In C.Y. Hsu Hrsg. Ischemic Stroke: From Basic Mechanisms to New Drug Development. Monogr Clin Neurosci. Vol 16 Basel: Karger; 1998: 14–27.
- Chan,P.C., Q.Xia, and P.P.Fu. 2007. "Ginkgo biloba leave extract: biological, medicinal, and toxicological effects." *J.Environ.Sci.Health C.Environ.Carcinog.Ecotoxicol.Rev*. 25:211-244.

- Chandrasekaran,K., Z.Mehrabian, B.Spinnewyn, C.Chinopoulos, K.Drieu, and G.Fiskum. 2002. "Bilobalide, a component of the Ginkgo biloba extract (EGb 761), protects against neuronal death in global brain ischemia and in glutamate-induced excitotoxicity." *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)*. 48:663-669.
- Chandrasekaran,K., Z.Mehrabian, B.Spinnewyn, C.Chinopoulos, K.Drieu, and G.Fiskum. 2003. "Neuroprotective effects of bilobalide, a component of Ginkgo biloba extract (EGb 761) in global brain ischemia and in excitotoxicity-induced neuronal death." *Pharmacopsychiatry*. 36 Suppl 1:S89-S94.
- Chandrasekaran,K., Z.Mehrabian, B.Spinnewyn, K.Drieu, and G.Fiskum. 2001. "Neuroprotective effects of bilobalide, a component of the Ginkgo biloba extract (EGb 761), in gerbil global brain ischemia." *Brain Res*. 922:282-292.
- Chatterjee,S.S., E.L.Kondratskaya, and O.A.Krishtal. 2003. "Structure-activity studies with Ginkgo biloba extract constituents as receptor-gated chloride channel blockers and modulators." *Pharmacopsychiatry*. 36 Suppl 1:S68-S77.
- Chavez,M.L., M.A.Jordan, and P.I.Chavez. 2006. "Evidence-based drug--herbal interactions." *Life Sci*. 78:2146-2157.
- Chen,B., B.Friedman, Q.Cheng, P.Tsai, E.Schim, D.Kleinfeld, and P.D.Lyden. 2009. "Severe blood-brain barrier disruption and surrounding tissue injury." *Stroke*. 40:e666-e674.
- Choi,D.W. and D.M.Hartley. 1993. "Calcium and glutamate-induced cortical neuronal death." *Res.Publ.Assoc.Res.Nerv.Ment.Dis*. 71:23-34.
- Chou,W.H., D.S.Choi, H.Zhang, D.Mu, T.McMahon, V.N.Kharazia, C.A.Lowell, D.M.Ferriero, and R.O.Messing. 2004. "Neutrophil protein kinase Cdelta as a mediator of stroke-reperfusion injury." *J.Clin.Invest*. 114:49-56.
- Chu,X., C.Qi, L.Zou, and X.Fu. 2008. "Intraluminal suture occlusion and ligation of the distal branch of internal carotid artery: an improved rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion." *J.Neurosci.Methods*. 168:1-7.
- Chung,K.F., G.Dent, M.McCusker, P.Guinot, C.P.Page, and P.J.Barnes. 1987. "Effect of a ginkgolide mixture (BN 52063) in antagonising skin and platelet responses to platelet activating factor in man." *Lancet*. 1:248-251.
- CMA, Microdialysis in Basic Research, The Principle, the System and the Application [pdf]. CMA Microdialysis AB 2009.
- Cohan,S.L. 1990. "Pharmacology of calcium antagonists: clinical relevance in neurology." *Eur.Neurol*. 30 Suppl 2:28-30.
- Coyle,J.T. 1997. "The nagging question of the function of N-acetylaspartylglutamate." *Neurobiol.Dis*. 4:231-238.
- Coyle,J.T. and P.Puttfarcken. 1993. "Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders." *Science*. 262:689-695.
- Crack,P.J. and J.M.Taylor. 2005. "Reactive oxygen species and the modulation of stroke." *Free Radic.Biol.Med*. 38:1433-1444.



- Culmsee,C., H.Vedder, A.Ravati, V.Junker, D.Otto, B.Ahlemeyer, J.C.Krieg, and J.Kriegstein. 1999. "Neuroprotection by estrogens in a mouse model of focal cerebral ischemia and in cultured neurons: evidence for a receptor-independent antioxidative mechanism." *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 19:1263-1269.
- Danbolt,N.C. 2001. "Glutamate uptake." *Prog.Neurobiol.* 65:1-105.
- Danninger,H. Fälleverteilung in der Allgemeinmedizin. *Der Allgemeinarzt* 1997: 1800-1810.
- Danton,G.H. and W.D.Dietrich. 2004. "The search for neuroprotective strategies in stroke." *AJNR Am.J.Neuroradiol.* 25:181-194.
- Davis,S.M., K.R.Lees, G.W.Albers, H.C.Diener, S.Markabi, G.Karlsson, and J.Norris. 2000. "Selfotel in acute ischemic stroke : possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist." *Stroke.* 31:347-354.
- de Hoffmann,E. and V. Stroobant. *Mass spectrometry: Principles and applications*, 3.Auflage Chichester: Wiley; 2009.
- de Lange,E.C., M.Danhof, A.G.De Boer, and D.D.Breimer. 1997. "Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies on drug transport across the blood-brain barrier." *Brain Res.Brain Res.Rev.* 25:27-49.
- DeFeudis,F.V. 2002. "Bilobalide and neuroprotection." *Pharmacol.Res.* 46:565-568.
- DeFeudis,F.V. and K.Drieu. 2000. "Ginkgo biloba extract (EGb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications." *Curr.Drug Targets.* 1:25-58.
- DeFeudis,F.V. *Ginkgo Biloba Extract (EGb 761): From Chemistry to the Clinic*. Wiesbaden: Ullstein Medical;1998: 401.
- Dirnagl,U., C.Iadecola, and M.A.Moskowitz. 1999. "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." *Trends Neurosci.* 22:391-397.
- Donnan,G.A., M.Fisher, M.Macleod, and S.M.Davis. 2008. "Stroke." *Lancet.* 371:1612-1623.
- Dorman,D.C., L.M.Cote, and W.B.Buck. 1992. "Effects of an extract of Ginkgo biloba on bromethalin-induced cerebral lipid peroxidation and edema in rats." *Am.J.Vet.Res.* 53:138-142.
- Drieu,K., Jaggy H. Ginkgo Biloba. In T. A. van Beek Hrsg. *Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles*. Vol. 12 Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000: 267.
- Doyle,K.P., R.P.Simon, and M.P.Stenzel-Poore. 2008. "Mechanisms of ischemic brain damage." *Neuropharmacology.* 55(3):310-8.
- Eckert,A., U.Keil, I.Scherping, S.Hauptmann, and W.E.Müller. 2005. "Stabilization of mitochondrial membrane potential and improvement of neuronal energy metabolism by Ginkgo biloba extract EGb 761." *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1056:474-485.
- Eckert,B. 2009. "Acute stroke therapy 1981-2009." *Klin.Neuroradiol.* 19:8-19.
- Edvinsson,L. and E.T. MacKenzie, J. McCulloch: *Cerebral blood flow and metabolism*. Raven, New York 1993.
- Elliott,K.A. and H.Jasper. 1949. "Measurement of experimentally induced brain swelling and shrinkage." *Am.J.Physiol.* 157:122-129.

- Ferrer, I. and A.M.Planas. 2003. "Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra." *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 62:329-339.
- Fisher, M. and J.H.Garcia. 1996. "Evolving stroke and the ischemic penumbra." *Neurology.* 47:884-888.
- Fourtillan, J.B., A.M.Brisson, J.Girault, I.Ingrand, J.P.Decourt, K.Drieu, P.Jouenne, and A.Biber. 1995. "[Pharmacokinetic properties of Bilobalide and Ginkgolides A and B in healthy subjects after intravenous and oral administration of Ginkgo biloba extract (EGb 761)]." *Therapie.* 50:137-144.
- Franklin, K.B.J. and G. Paxinos. The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA: Academic Press; 1997.
- Freret, T., V.Bouet, C.Leconte, S.Roussel, L.Chazalviel, D.Divoux, P.Schumann-Bard, and M.Boulouard. 2009. "Behavioral deficits after distal focal cerebral ischemia in mice: Usefulness of adhesive removal test." *Behav.Neurosci.* 123:224-230.
- Fujii, M., H.Hara, W.Meng, J.P.Vonsattel, Z.Huang, and M.A.Moskowitz. 1997. "Strain-related differences in susceptibility to transient forebrain ischemia in SV-129 and C57black/6 mice." *Stroke.* 28:1805-1810.
- Furuya, K., H.Takeda, S.Azhar, R.M.McCarron, Y.Chen, C.A.Ruetzler, K.M.Wolcott, T.J.DeGraba, R.Rothlein, T.E.Hugli, G.J.del Zoppo, and J.M.Hallenbeck. 2001. "Examination of several potential mechanisms for the negative outcome in a clinical stroke trial of enlimomab, a murine anti-human intercellular adhesion molecule-1 antibody: a bedside-to-bench study." *Stroke.* 32:2665-2674.
- Galloway, D.S., J.C.Ko, H.F.Reaugh, R.E.Mandsager, M.E.Payton, T.Inoue, and E.Portillo. 2004. "Anesthetic indices of sevoflurane and isoflurane in unpremedicated dogs." *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 225:700-704.
- Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2009. Aktualisiert am 27.10.2010 [zitiert am 18.03.2011]. URL: [http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/\\_XWD\\_PROC?\\_XWD\\_206/2/xs\\_standard\\_neu/F.I ND517](http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_PROC?_XWD_206/2/xs_standard_neu/F.I ND517)
- Gibson, C.L., L.J.Gray, S.P.Murphy, and P.M.Bath. 2006. "Estrogens and experimental ischemic stroke: a systematic review." *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 26:1103-1113.
- Ginet, V., J.Puyal, P.G.Clarke, and A.C.Truttmann. 2009. "Enhancement of autophagic flux after neonatal cerebral hypoxia-ischemia and its region-specific relationship to apoptotic mechanisms." *Am.J.Pathol.* 175:1962-1974.
- Ginsberg, M.D., L.Belayev, W.Zhao, P.W.Huh, and R.Busto. 1999. "The acute ischemic penumbra: topography, life span, and therapeutic response." *Acta Neurochir.Suppl.* 73:45-50.
- Gohil, K. and L.Packer. 2002. "Global gene expression analysis identifies cell and tissue specific actions of Ginkgo biloba extract, EGb 761." *Cell Mol.Biol.(Noisy-le-grand).* 48:625-631.
- Gonzalez, C.L. and B.Kolb. 2003. "A comparison of different models of stroke on behaviour and brain morphology." *Eur.J.Neurosci.* 18:1950-1962.

- Gonzalez, M.I. and M.B. Robinson. 2004. "Protein kinase C-dependent remodeling of glutamate transporter function." *Mol. Interv.* 4:48-58.
- Gorelick, P.B., Epidemiology and trials. In L.R. Caplan Hrsg. Brain ischemia. Basic concepts and clinical relevance. London: Springer Verlag; 1995: 343-353.
- Gotz, J. and L.M. Ittner. 2008. "Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia." *Nat. Rev. Neurosci.* 9:532-544.
- Grosenbaugh, D.A. and W.W. Muir. 1998. "Cardiorespiratory effects of sevoflurane, isoflurane, and halothane anesthesia in horses." *Am. J. Vet. Res.* 59:101-106.
- Gross, Schölmerich und Gerok. Die Innere Medizin. Schattauer 8. Auflage: 1994: 1184-1191.
- Halliwell, B. 1994. "Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?" *Lancet.* 344:721-724.
- Hamm, R.J., B.R. Pike, D.M. O'Dell, B.G. Lyeth, and L.W. Jenkins. 1994. "The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury." *J. Neurotrauma.* 11:187-196.
- Hao, J., A. Mdzinarishvili, T.J. Abbruscato, J. Klein, W.J. Geldenhuys, C.J. Van der Schyf, and U. Bickel. 2008. "Neuroprotection in mice by NGP1-01 after transient focal brain ischemia." *Brain Res.* 1196:113-120.
- Hauptmann, S., I. Scherping, S. Drose, U. Brandt, K.L. Schulz, M. Jendrach, K. Leuner, A. Eckert, and W.E. Müller. 2009. "Mitochondrial dysfunction: an early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice." *Neurobiol. Aging.* 30:1574-1586.
- Hawthorne, R. and J.W. Lynch. 2005. "A picrotoxin-specific conformational change in the glycine receptor M2-M3 loop." *J. Biol. Chem.* 280:35836-35843.
- Hecker, H., R. Johannisson, E. Koch, and C.P. Siegers. 2002. "In vitro evaluation of the cytotoxic potential of alkylphenols from Ginkgo biloba L." *Toxicology.* 177:167-177.
- Heinecke, H. 1987. "A comparison of two variants of the chimney behaviour test in mice." *Z. Versuchstierkd.* 29:145-148.
- Henry, R.T. and R. Casto. 1989. "Simple and inexpensive delivery of halogenated inhalation anesthetics to rodents." *Am. J. Physiol.* 257:R668-R671.
- Herrmann, M., M. Stern, F. Vollenweider, and C. Nitsch. 2004. "Effect of inherent epileptic seizures on brain injury after transient cerebral ischemia in Mongolian gerbils." *Exp. Brain Res.* 154:176-182.
- Hillen, B., H.W. Hoogstraten, J.J. van Overbeeke, and A. van der Zwan. 1991. "Functional anatomy of the circulus arteriosus cerebri (WillisII)." *Bull. Assoc. Anat. (Nancy).* 75:123-126.
- Hillered, L., A. Hallstrom, S. Segersvard, L. Persson, and U. Ungerstedt. 1989. "Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis." *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9:607-616.
- Homola, A., N. Zoremba, K. Slais, R. Kuhlen, and E. Sykova. 2006. "Changes in diffusion parameters, energy-related metabolites and glutamate in the rat cortex after transient hypoxia/ischemia." *Neurosci. Lett.* 404:137-142.

- Horn, T. and J. Klein. 2010. "Lactate levels in the brain are elevated upon exposure to volatile anesthetics: A microdialysis study." *Neurochem.Int.* 57:940-947.
- Horn, T.F. and M. Engelmann. 2001. "In vivo microdialysis for nonapeptides in rat brain--a practical guide." *Methods.* 23:41-53.
- Hossmann, K.A. 1994. "Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia." *Ann.Neurol.* 36:557-565.
- Hossmann, K.A. 1996. "Periinfarct depolarizations." *Cerebrovasc.Brain Metab Rev.* 8:195-208.
- Hossmann, K.A. 2006. "Pathophysiology and therapy of experimental stroke." *Cell Mol.Neurol.* 26:1057-1083.
- Howells, D.W., M.J.Porritt, S.S.Rewell, V.O'Collins, E.S.Sena, H.B.van der Worp, R.J.Traystman, and M.R.Macleod. 2010. "Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia." *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 30:1412-1431.
- Hoy, R.F. Mouse Physiology. In J.G. Fox Hrsg. The Mouse in biomedical research. Burlington, San Diego, London: American College of Laboratory Animal Medicine Series; 2007.
- Huang, J., U.M.Upadhyay, and R.J.Tamargo. 2006. "Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia." *Surg.Neurol.* 66:232-245.
- Hurn, P.D., S.Subramanian, S.M.Parker, M.E.Afentoulis, L.J.Kaler, A.A.Vandenbark, and H.Offner. 2007. "T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation." *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 27:1798-1805.
- Iadecola, C., X.Xu, F.Zhang, E.E.el Fakahany, and M.E.Ross. 1995. "Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia." *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 15:52-59.
- Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen Hrsg. Dokumentation und Würdigung der Stellungnahmen zum BP A05-19B Ginkgohaltige Präparate bei Alzheimer Demenz. 1. Version. 2007.
- Inzitari, D. and A.Poggesi. 2005. "Calcium channel blockers and stroke." *Aging Clin.Exp.Res.* 17:16-30.
- Iwashita, A., T.Maemoto, H.Nakada, I.Shima, N.Matsuoka, and H.Hisajima. 2003. "A novel potent radical scavenger, 8-(4-fluorophenyl)-2-((2E)-3-phenyl-2-propenoyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrazol o[5,1-c] [1,2,4]triazine (FR210575), prevents neuronal cell death in cultured primary neurons and attenuates brain injury after focal ischemia in rats." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 307:961-968.
- Janssens, D., E.Delaive, J.Remacle, and C.Michiels. 2000. "Protection by bilobalide of the ischaemia-induced alterations of the mitochondrial respiratory activity." *Fundam.Clin.Pharmacol.* 14:193-201.
- Janssens, D., C.Michiels, E.Delaive, F.Eliaers, K.Drieu, and J.Remacle. 1995. "Protection of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells by ginkgo biloba extract and bilobalide." *Biochem.Pharmacol.* 50:991-999.

- Janssens,D., J.Remacle, K.Drieu, and C.Michiels. 1999. "Protection of mitochondrial respiration activity by bilobalide." *Biochem.Pharmacol.* 58:109-119.
- Jayakumar,A.R. and M.D.Norenberg. 2010. "The Na-K-Cl Co-transporter in astrocyte swelling." *Metab Brain Dis.* 25:31-38.
- Jin,R., G.Yang, and G.Li. 2010. "Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator." *Neurobiol.Dis.* 38:376-385.
- Johns,L., A.J.Sinclair, and J.A.Davies. 2002. "Effects of bilobalide on hypoxia/hypoglycemia-stimulated glutamate efflux from rat cortical brain slices." *Neurochem.Res.* 27:369-371.
- Jones,B.J. and D.J.Roberts. 1968. "The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod." *J.Pharm.Pharmacol.* 20:302-304.
- Justicia,C., J.Panes, S.Sole, A.Cervera, R.Deulofeu, A.Chamorro, and A.M.Planas. 2003. "Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats." *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 23:1430-1440.
- Kaempfer,E. *Amoenitatum Exoticarum, Politico-Physico-Medicarum, Fasciculi V.*, Lemgo 1712, S. 813.
- Kasper,S., D.Winkler, and A.Kutzelnigg. 2009. "[Significance of Ginkgo biloba extract in dementia]." *Pharm.Unserer Zeit.* 38:424-430.
- Kato,H. and K.Kogure. 1999. "Biochemical and molecular characteristics of the brain with developing cerebral infarction." *Cell Mol.Neurobiol.* 19:93-108.
- Kermer,P., N.Klocker, and M.Bahr. 1999. "Neuronal death after brain injury. Models, mechanisms, and therapeutic strategies in vivo." *Cell Tissue Res.* 298:383-395.
- Kerr,J.F. 1965. "A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes." *J.Pathol.Bacteriol.* 90:419-435.
- Kerr,J.F., A.H.Wyllie, and A.R.Currie. 1972. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br.J.Cancer.* 26:239-257.
- Kiewert,C., V.Kumar, O.Hildmann, J.Hartmann, M.Hillert, and J.Klein. 2008. "Role of glycine receptors and glycine release for the neuroprotective activity of bilobalide." *Brain Res.* 1201:143-150.
- Kiewert,C., V.Kumar, O.Hildmann, M.Rueda, J.Hartmann, R.S.Naik, and J.Klein. 2007. "Role of GABAergic antagonism in the neuroprotective effects of bilobalide." *Brain Res.* 1128:70-78.
- Kiewert,C., A.Mdzinarishvili, J.Hartmann, U.Bickel, and J.Klein. 2010. "Metabolic and transmitter changes in core and penumbra after middle cerebral artery occlusion in mice." *Brain Res.* 1312:101-107.
- Kinouchi,H., C.J.Epstein, T.Mizui, E.Carlson, S.F.Chen, and P.H.Chan. 1991. "Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:11158-11162.

- Klein,J., S.S.Chatterjee, and K.Loffelholz. 1997. "Phospholipid breakdown and choline release under hypoxic conditions: inhibition by bilobalide, a constituent of Ginkgo biloba." *Brain Res.* 755:347-350.
- Klein,J., O.Weichel, M.Hilgert, J.Rupp, S.S.Chatterjee, and H.Nawrath. 2003. "Excitotoxic hippocampal membrane breakdown and its inhibition by bilobalide: role of chloride fluxes." *Pharmacopsychiatry.* 36 Suppl 1:S78-S83.
- Kloft,C. and A.Kellermann. 2009. "[Bleeding caused by Ginkgo biloba extract?]." *Pharm.Unserer Zeit.* 38:440-446.
- Kobuchi,H., M.T.Droy-Lefaix, Y.Christen, and L.Packer. 1997. "Ginkgo biloba extract (EGb 761): inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7." *Biochem.Pharmacol.* 53:897-903.
- Koch,E. 2005. "Inhibition of platelet activating factor (PAF)-induced aggregation of human thrombocytes by ginkgolides: considerations on possible bleeding complications after oral intake of Ginkgo biloba extracts." *Phytomedicine.* 12:10-16.
- Koizumi,J., Y.Yoshida, T.Nakazawa, G.Ooneda. 1986. "Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area". *Jpn J Stroke.* 8: 1-8.
- Kolominsky-Rabas,P.L., C.Sarti, P.U.Heuschmann, C.Graf, S.Siemonsen, B.Neundoerfer, A.Katalinic, E.Lang, K.G.Gassmann, and T.R.von Stockert. 1998. "A prospective community-based study of stroke in Germany--the Erlangen Stroke Project (ESPro): incidence and case fatality at 1, 3, and 12 months." *Stroke.* 29:2501-2506.
- Krieglstein,J., F.Ausmeier, H.El-Abhar, K. Lippert, M.Welsch, K.Ruppalla and P.Henrich-Noack. 1995. "Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* constituents." *Eur J Pharm Sci.* 3: 39-48
- Kumar,V. Ethnopharmacology and rational evaluation of herbal remedies. In M. Eddouks Hrsg. Handbook of Ethnopharmacology; 2008: 25-50.
- Kuribara,H., S.T.Weintraub, T.Yoshihama, and Y.Maruyama. 2003. "An anxiolytic-like effect of Ginkgo biloba extract and its constituent, ginkgolide-A, in mice." *J.Nat.Prod.* 66:1333-1337.
- Landucci,E., F.Boscia, E.Gerace, T.Scartabelli, A.Cozzi, F.Moroni, G.Mannaioni, and D.E.Pellegrini-Giampietro. 2009. "Involvement of endocannabinoid signaling in the neuroprotective effects of subtype 1 metabotropic glutamate receptor antagonists in models of cerebral ischemia." *Int.Rev.Neurobiol.* 85:337-350.
- Lee,V.M., M.Goedert, and J.Q.Trojanowski. 2001. "Neurodegenerative tauopathies." *Annu.Rev.Neurosci.* 24:1121-1159.
- Legos,J.J., R.F.Tuma, and F.C.Barone. 2002. "Pharmacological interventions for stroke: failures and future." *Expert.Opin.Investig.Drugs.* 11:603-614.
- Leist,M. and P.Nicotera. 1998. "Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology." *Exp.Cell Res.* 239:183-201.
- Li,L. and Z.Zuo. 2010. "Glutamate transporter type 3 knockout reduces brain tolerance to focal brain ischemia in mice." *J.Cereb.Blood Flow Metab.* In print.

- Li,X., K.K.Blizzard, Z.Zeng, A.C.DeVries, P.D.Hurn, and L.D.McCullough. 2004. "Chronic behavioral testing after focal ischemia in the mouse: functional recovery and the effects of gender." *Exp.Neurol.* 187:94-104.
- Lipton,P. 1999. "Ischemic cell death in brain neurons." *Physiol Rev.* 79:1431-1568.
- Lo,E.H. 2008. "A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke." *Nat.Med.* 14:497-500.
- Longa,E.Z., P.R.Weinstein, S.Carlson, and R.Cummins. 1989. "Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats." *Stroke.* 20:84-91.
- Loyola University Chicago, Stritch School of Medicine, Neurovascular Tutorial, Neuroscience Course. Internal Carotid System. Letztes update 06.05.1999 [zitiert am 14.03.2011]. URL: <http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/neuro/neurovasc/navigation/ica.htm>
- Luo,Y. 2001. "Ginkgo biloba neuroprotection: Therapeutic implications in Alzheimer's disease." *J.Alzheimers.Dis.* 3:401-407.
- MacIennan,K.M., C.L.Darlington, and P.F.Smith. 2002. "The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and ginkgolide B." *Prog.Neurobiol.* 67:235-257.
- Madgula,V.L., B.Avula, Y.B.Yu, Y.H.Wang, F.Tchantchou, S.Fisher, Y.Luo, I.A.Khan, and S.I.Khan. 2010. "Intestinal and blood-brain barrier permeability of ginkgolides and bilobalide: in vitro and in vivo approaches." *Planta Med.* 76:599-606.
- Majid,A., Y.Y.He, J.M.Gidday, S.S.Kaplan, E.R.Gonzales, T.S.Park, J.D.Fenstermacher, L.Weil, D.W.Choi, and C.Y.Hsu. 2000. "Differences in vulnerability to permanent focal cerebral ischemia among 3 common mouse strains." *Stroke.* 31:2707-2714.
- Major,R.T. 1967. "The ginkgo, the most ancient living tree. The resistance of Ginkgo biloba L. to pests accounts in part for the longevity of this species." *Science.* 157:1270-1273.
- Marcocci,L., J.J.Maguire, M.T.Droy-Lefaix, and L.Packer. 1994. "The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 201:748-755.
- Markgraf,C.G., E.J.Green, B.E.Hurwitz, E.Morikawa, W.D.Dietrich, P.M.McCabe, M.D.Ginsberg, and N.Schneiderman. 1992. "Sensorimotor and cognitive consequences of middle cerebral artery occlusion in rats." *Brain Res.* 575:238-246.
- Markgraf,C.G., E.J.Green, B.Watson, P.M.McCabe, N.Schneiderman, W.D.Dietrich, and M.D.Ginsberg. 1994. "Recovery of sensorimotor function after distal middle cerebral artery photothrombotic occlusion in rats." *Stroke.* 25:153-159.
- Marquez,J., M.Tosina, I.R.de, V, J.A.Segura, F.J.Alonso, J.M.Mates, and J.A.Campos-Sandoval. 2009. "New insights into brain glutaminases: beyond their role on glutamatergic transmission." *Neurochem.Int.* 55:64-70.
- Mattson,M.P., C.Culmsee, and Z.F.Yu. 2000. "Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke." *Cell Tissue Res.* 301:173-187.
- Mauri,P., M.Minoggio, L.Iemoli, G.Rossoni, P.Morazzoni, E.Bombardelli, and P.Pietta. 2003. "Liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization ion trap mass spectrometry of terpene lactones in plasma of animals." *J.Pharm.Biomed.Anal.* 32:633-639.

- Mägdefrau, K. Paläobiologie der Pflanzen, 4. neubearbeitete Auflage Stuttgart: Fischer; 1968: 549.
- McBean, D.E. and P.A.Kelly. 1998. "Rodent models of global cerebral ischemia: a comparison of two-vessel occlusion and four-vessel occlusion." *Gen.Pharmacol.* 30:431-434.
- McKenna, D.J., K.Jones, and K.Hughes. 2001. "Efficacy, safety, and use of ginkgo biloba in clinical and preclinical applications." *Altern.Ther.Health Med.* 7:70-90.
- McNay, E.C. and P.E.Gold. 1999a. "Extracellular glucose concentrations in the rat hippocampus measured by zero-net-flux: effects of microdialysis flow rate, strain, and age." *J.Neurochem.* 72:785-790.
- Mdzinarishvili, A., C.Kiewert, V.Kumar, M.Hillert, and J.Klein. 2007. "Bilobalide prevents ischemia-induced edema formation in vitro and in vivo." *Neuroscience.* 144:217-222.
- Melino, G. 2010. "Journal club. A cancer biologist weighs up p53, metabolism and cancer." *Nature.* 466:905.
- Mergenthaler, P., U.Dirnagl, and A.Meisel. 2004. "Pathophysiology of stroke: lessons from animal models." *Metab Brain Dis.* 19:151-167.
- Mies, G., T.Iijima, and K.A.Hossmann. 1993. "Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat." *Neuroreport.* 4:709-711.
- Mitani, A. and K.Kataoka. 1991. "Critical levels of extracellular glutamate mediating gerbil hippocampal delayed neuronal death during hypothermia: brain microdialysis study." *Neuroscience.* 42:661-670.
- Modi, W.S., D.D.Pollock, B.A.Mock, C.Banner, J.C.Renauld, and J.Van Snick. 1991. "Regional localization of the human glutaminase (GLS) and interleukin-9 (IL9) genes by in situ hybridization." *Cytogenet.Cell Genet.* 57:114-116.
- Monnig, M., *Intensiv* 2002; 10: 48-59; 100-107.
- Moreau, J.P., C.R.Eck, J.McCabe, and S.Skinner. 1986. "[Absorption, distribution and elimination of a labelled extract of Ginkgo biloba leaves in the rat]." *Presse Med.* 15:1458-1461.
- Morgan, M.E., D.Singhal, and B.D.Anderson. 1996. "Quantitative assessment of blood-brain barrier damage during microdialysis." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 277:1167-1176.
- Moustafa, R.R. and J.C.Baron. 2008. "Pathophysiology of ischaemic stroke: insights from imaging, and implications for therapy and drug discovery." *Br.J.Pharmacol.* 153 Suppl 1:S44-S54.
- Mueller, C. 2008. "A phase IIa study of PEGylated glutaminase (PEG-PGA) plus 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) in patients with advanced refractory solid tumors." *Journal of Clinical Oncology*, ASCO Annual Meeting Proceedings Vol 26, No 15S (May 20 Supplement): 2533
- Müller, I. 1992. "[The importance of Ginkgo biloba in European botany and pharmacy]." *Pharm.Unserer Zeit.* 21:201-205.
- Müller, W.E., R.Abdel-Kader, C.J.Fehske, and K.Leuner. 2009. "[Fundamentals of therapeutic application of EGb 761]." *Pharm.Unserer Zeit.* 38:408-416.



- Müller,W.E. and W.Juretzek. Ginkgo biloba. In P. Riederer, G. Laux, W. Pödingner Hrsg. Neuro-Psychopharmaka. Bd. 5, 2. Auflage. Wien: Springer-Verlag; 1999.
- Mumenthaler,M. and H. Mattle. Neurologie. 10. Auflage. Thieme Verlag: 1997: 218-260
- Nakamura,H., A.J.Strong, C.Dohmen, O.W.Sakowitz, S.Vollmar, M.Sue, L.Kracht, P.Hashemi, R.Bhatia, T.Yoshimine, J.P.Dreier, A.K.Dunn, and R.Graf. 2010. "Spreading depolarizations cycle around and enlarge focal ischaemic brain lesions." *Brain*. 133:1994-2006.
- Neale,J.H., T.Bzdega, and B.Wroblewska. 2000. "N-Acetylaspartylglutamate: the most abundant peptide neurotransmitter in the mammalian central nervous system." *J.Neurochem*. 75:443-452.
- Newcomb,R., A.R.Pierce, T.Kano, W.Meng, P.Bosque-Hamilton, L.Taylor, N.Curthoys, and E.H.Lo. 1998. "Characterization of mitochondrial glutaminase and amino acids at prolonged times after experimental focal cerebral ischemia." *Brain Res*. 813:103-111.
- Newcomb,R., X.Sun, L.Taylor, N.Curthoys, and R.G.Giffard. 1997. "Increased production of extracellular glutamate by the mitochondrial glutaminase following neuronal death." *J.Biol.Chem*. 272:11276-11282.
- Ni,Y., B.Zhao, J.Hou, and W.Xin. 1996. "Preventive effect of Ginkgo biloba extract on apoptosis in rat cerebellar neuronal cells induced by hydroxyl radicals." *Neurosci.Lett*. 214:115-118.
- Nunez,D., M.Chignard, R.Korth, J.P.Le Couedic, X.Norel, B.Spinnewyn, P.Braquet, and J.Benveniste. 1986. "Specific inhibition of PAF-acether-induced platelet activation by BN 52021 and comparison with the PAF-acether inhibitors kadsurenone and CV 3988." *Eur.J.Pharmacol*. 123:197-205.
- O'Collins,V.E., M.R.Macleod, G.A.Donnan, L.L.Horky, B.H.van der Worp, and D.W.Howells. 2006. "1,026 experimental treatments in acute stroke." *Ann.Neurol*. 59:467-477.
- Ogur,M., R.ST.John, and S.Nagai. 1957. "Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast." *Science*. 125:928-929.
- Olney,J.W., J.Labruyere, and M.T.Price. 1989. "Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs." *Science*. 244:1360-1362.
- Olney,J.W. and L.G.Sharpe. 1969. "Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate." *Science*. 166:386-388.
- Osen,K.K., J.Storm-Mathisen, O.P.Ottersen, and B.Dihle. 1995. "Glutamate is concentrated in and released from parallel fiber terminals in the dorsal cochlear nucleus: a quantitative immunocytochemical analysis in guinea pig." *J.Comp Neurol*. 357:482-500.
- Otani,M., S.S.Chatterjee, B.Gabard, and G.W.Kreutzberg. 1986. "Effect of an extract of Ginkgo biloba on triethyltin-induced cerebral edema." *Acta Neuropathol*. 69:54-65.
- Ottersen,O.P. 1989. "Quantitative electron microscopic immunocytochemistry of neuroactive amino acids." *Anat.Embryol.(Berl)*. 180:1-15.

- Ottersen, O.P., J. Storm-Mathisen, C. Bramham, R. Torp, J. Laake, and V. Gundersen. 1990. "A quantitative electron microscopic immunocytochemical study of the distribution and synaptic handling of glutamate in rat hippocampus." *Prog. Brain Res.* 83:99-114.
- Ottersen, O.P., N. Zhang, and F. Walberg. 1992. "Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum." *Neuroscience.* 46:519-534.
- Panetta, T., V.L. Marcheselli, P. Braquet, B. Spinnewyn, and N.G. Bazan. 1987. "Effects of a platelet activating factor antagonist (BN 52021) on free fatty acids, diacylglycerols, polyphosphoinositides and blood flow in the gerbil brain: inhibition of ischemia-reperfusion induced cerebral injury." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149:580-587.
- Pellegrini-Giampietro, D.E. 2003. "The distinct role of mGlu1 receptors in post-ischemic neuronal death." *Trends Pharmacol. Sci.* 24:461-470.
- Perez-Pinzon, M.A., C.M. Maier, E.J. Yoon, G.H. Sun, R.G. Giffard, and G.K. Steinberg. 1995. "Correlation of CGS 19755 neuroprotection against in vitro excitotoxicity and focal cerebral ischemia." *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15:865-876.
- Rich, P.R., L.A. Mischis, S. Purton, and J.T. Wiskich. 2001. "The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains." *FEMS Microbiol. Lett.* 202:181-187.
- Rodriguez-Yanez, M. and J. Castillo. 2008. "Role of inflammatory markers in brain ischemia." *Curr. Opin. Neurol.* 21:353-357.
- Rogers, D.C., C.A. Campbell, J.L. Stretton, and K.B. Mackay. 1997. "Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat." *Stroke.* 28:2060-2065.
- Ross, A.M., P. Hurn, N. Perrin, L. Wood, W. Carlini, and K. Potempa. 2007. "Evidence of the peripheral inflammatory response in patients with transient ischemic attack." *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 16:203-207.
- Rossi, R., F. Basilico, G. Rossoni, A. Riva, P. Morazzoni, and P.L. Mauri. 2009. "Liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization ion trap mass spectrometry of bilobalide in plasma and brain of rats after oral administration of its phospholipidic complex." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50:224-227.
- Sanabria, E.R., K.M. Wozniak, B.S. Slusher, and A. Keller. 2004. "GCP II (NAALADase) inhibition suppresses mossy fiber-CA3 synaptic neurotransmission by a presynaptic mechanism." *J. Neurophysiol.* 91:182-193.
- Sandoval, K.E. and K.A. Witt. 2008. "Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke." *Neurobiol. Dis.* 32:200-219.
- Santiago, M. and B.H. Westerink. 1990. "Characterization of the in vivo release of dopamine as recorded by different types of intracerebral microdialysis probes." *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 342:407-414.
- Sasaki, K., S. Hatta, K. Wada, H. Ohshika, and M. Haga. 2000. "Bilobalide prevents reduction of gamma-aminobutyric acid levels and glutamic acid decarboxylase activity induced by 4-O-methylpyridoxine in mouse hippocampus." *Life Sci.* 67:709-715.

- Sasaki,K., I.Oota, K.Wada, K.Inomata, H.Ohshika, and M.Haga. 1999. "Effects of bilobalide, a sesquiterpene in Ginkgo biloba leaves, on population spikes in rat hippocampal slices." *Comp Biochem.Physiol C.Pharmacol.Toxicol.Endocrinol.* 124:315-321.
- Sastre,J., A.Lloret, C.Borras, J.Pereda, D.Garcia-Sala, M.T.Droy-Lefaix, F.V.Pallardo, and J.Vina. 2002. "Ginkgo biloba extract EGb 761 protects against mitochondrial aging in the brain and in the liver." *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand).* 48:685-692.
- Scartabelli,T., E.Gerace, E.Landucci, F.Moroni, and D.E.Pellegrini-Giampietro. 2008. "Neuroprotection by group I mGlu receptors in a rat hippocampal slice model of cerebral ischemia is associated with the PI3K-Akt signaling pathway: a novel postconditioning strategy?" *Neuropharmacology.* 55:509-516.
- Schallert,T., M.Upchurch, N.Lobaugh, S.B.Farrar, W.W.Spiriduso, P.Gilliam, D.Vaughn, and R.E.Wilcox. 1982. "Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage." *Pharmacol.Biochem.Behav.* 16:455-462.
- Schiemanck,S.K., M.W.Post, T.D.Witkamp, L.J.Kappelle, and A.J.Prevo. 2005. "Relationship between ischemic lesion volume and functional status in the 2nd week after middle cerebral artery stroke." *Neurorehabil.Neural Repair.* 19:133-138.
- Schmid,M. und H. Schmoll gen. Eisenwerth. Ginkgo: Ur-Baum und Arzneipflanze; Mythos, Dichtung und Kunst. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges; 1994
- Schneider,D., J.Berrouschot, T.Brandt, W.Hacke, A.Ferbert, S.H.Norris, S.H.Polmar, and E.Schafer. 1998. "Safety, pharmacokinetics and biological activity of enlimomab (anti-ICAM-1 antibody): an open-label, dose escalation study in patients hospitalized for acute stroke." *Eur.Neurol.* 40:78-83.
- Schroeter,M., S.Jander, O.W.Witte, and G.Stoll. 1994. "Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion." *J.Neuroimmunol.* 55:195-203.
- Schurr,A. 2004. "Neuroprotection against ischemic/hypoxic brain damage: blockers of ionotropic glutamate receptor and voltage sensitive calcium channels." *Curr.Drug Targets.* 5:603-618.
- Senior,K. 2002. "New understanding into the mechanics of migraine." *Lancet.* 359:500.
- Shah,Z.A., S.E.Nada, and S.Dore. 2011. "Heme oxygenase 1, beneficial role in permanent ischemic stroke and in Ginkgo biloba (EGb 761) neuroprotection." *Neuroscience.* 180:248-255.
- Shi,C., F.Wu, D.T.Yew, J.Xu, and Y.Zhu. 2010a. "Bilobalide prevents apoptosis through activation of the PI3K/Akt pathway in SH-SY5Y cells." *Apoptosis.* 15:715-727.
- Shi,C., J.Zou, G.Li, Z.Ge, Z.Yao, and J.Xu. 2010b. "Bilobalide Protects Mitochondrial Function in Ovariectomized Rats by Up-regulation of mRNA and Protein Expression of Cytochrome c Oxidase Subunit I." *J.Mol.Neurosci.*
- Shimizu-Sasamata,M., P.Bosque-Hamilton, P.L.Huang, M.A.Moskowitz, and E.H.Lo. 1998. "Attenuated neurotransmitter release and spreading depression-like depolarizations after focal ischemia in mutant mice with disrupted type I nitric oxide synthase gene." *J.Neurosci.* 18:9564-9571.
- Shimojo,N., K.Naka, C.Nakajima, C.Yoshikawa, K.Okuda, and K.Okada. 1989. "Test-strip method for measuring lactate in whole blood." *Clin.Chem.* 35:1992-1994.

- Shord,S.S., K.Shah, and A.Lukose. 2009. "Drug-botanical interactions: a review of the laboratory, animal, and human data for 8 common botanicals." *Integr.Cancer Ther.* 8:208-227.
- Slusher,B.S., J.J.Vornov, A.G.Thomas, P.D.Hurn, I.Harukuni, A.Bhardwaj, R.J.Traystman, M.B.Robinson, P.Britton, X.C.Lu, F.C.Tortella, K.M.Wozniak, M.Yudkoff, B.M.Potter, and P.F.Jackson. 1999. "Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury." *Nat.Med.* 5:1396-1402.
- Small,D.L. and A.M.Buchan. 2000. "Animal models." *Br.Med.Bull.* 56:307-317.
- Smith,J.V. and Y.Luo. 2003. "Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761." *J.Alzheimers.Dis.* 5:287-300.
- Spieß,E. und W. Juretzek. Ginkgo. In R. Hänsel Hrsg. Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Band 5. Berlin Heidelberg New York: Springer; 1993: 269-292.
- Spinnewyn,B., N.Blavet, and F.Clostre. 1986. "[Effects of Ginkgo biloba extract on a cerebral ischemia model in gerbils]." *Presse Med.* 15:1511-1515.
- Spinnewyn,B., N.Blavet, F.Clostre, N.Bazan, and P.Braquet. 1987. "Involvement of platelet-activating factor (PAF) in cerebral post-ischemic phase in Mongolian gerbils." *Prostaglandins.* 34:337-349.
- Streifler,J.Y., M.Eliasziw, O.R.Benavente, J.W.Harbson, V.C.Hachinski, H.J.Barnett, and D.Simard. 1995. "The risk of stroke in patients with first-ever retinal vs hemispheric transient ischemic attacks and high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial." *Arch.Neurol.* 52:246-249.
- Stromgaard,K. and K.Nakanishi. 2004. "Chemistry and biology of terpene trilactones from Ginkgo biloba." *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* 43:1640-1658.
- Strong,A.J., P.J.Anderson, H.R.Watts, D.J.Virley, A.Lloyd, E.A.Irving, T.Nagafuji, M.Ninomiya, H.Nakamura, A.K.Dunn, and R.Graf. 2007. "Peri-infarct depolarizations lead to loss of perfusion in ischaemic gyrencephalic cerebral cortex." *Brain.* 130:995-1008.
- Sugawara,T. and P.H.Chan. 2003. "Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia." *Antioxid.Redox.Signal.* 5:597-607.
- Sumbria,R.K., J.Klein, and U.Bickel. 2011. "Acute depression of energy metabolism after microdialysis probe implantation is distinct from ischemia-induced changes in mouse brain." *Neurochem.Res.* 36:109-116.
- Sydserff,S.G., A.R.Borelli, A.R.Green, and A.J.Cross. 2002. "Effect of NXY-059 on infarct volume after transient or permanent middle cerebral artery occlusion in the rat; studies on dose, plasma concentration and therapeutic time window." *Br.J.Pharmacol.* 135:103-112.
- Sydserff,S.G., A.R.Green, and A.J.Cross. 1996. "The effect of oedema and tissue swelling on the measurement of neuroprotection; a study using chlormethiazole and permanent middle cerebral artery occlusion in rats." *Neurodegeneration.* 5:81-85.

- Szczesny,G., A.Veihelmann, S.Massberg, D.Nolte, and K.Messmer. 2004. "Long-term anaesthesia using inhalatory isoflurane in different strains of mice-the haemodynamic effects." *Lab Anim.* 38:64-69.
- Szeliga,M., M.Sidoryk, E.Matyja, P.Kowalczyk, and J.Albrecht. 2005. "Lack of expression of the liver-type glutaminase (LGA) mRNA in human malignant gliomas." *Neurosci.Lett.* 374:171-173.
- Takeuchi,H., S.Jin, H.Suzuki, Y.Doi, J.Liang, J.Kawanokuchi, T.Mizuno, M.Sawada, and A.Suzumura. 2008. "Blockade of microglial glutamate release protects against ischemic brain injury." *Exp.Neurol.* 214:144-146.
- Tiffany,C.W. and B.S.Slusher. 2001 *Current Protocols in Pharmacology.* 3.10.1-3.10.12.
- Trinkl,A., M.R.Vosko, N.Wunderlich, M.Dichgans, and G.F.Hamann. 2006. "Pravastatin reduces microvascular basal lamina damage following focal cerebral ischemia and reperfusion." *Eur.J.Neurosci.* 24:520-526.
- Tuttolomondo,A., D.Di Raimondo, R.di Sciacca, A.Pinto, and G.Licata. 2008. "Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke." *Curr.Pharm.Des.* 14:3574-3589.
- Uchiyama,Y., M.Koike, and M.Shibata. 2008. "Autophagic neuron death in neonatal brain ischemia/hypoxia." *Autophagy.* 4:404-408.
- Ude,C., Pharmakokinetische Charakterisierung der Terpenlaktone aus *Ginkgo biloba* im ZNS am Tiermodell [Dissertation], Frankfurt, Goethe-Universität, FB 14, 2010.
- Ude,C., A.Paulke, M.Noldner, M.Schubert-Zsilavec, and M.Wurglics. 2011. "Plasma and brain levels of terpene trilactones in rats after an oral single dose of standardized Ginkgo biloba extract EGb 761(R)." *Planta Med.* 77:259-264.
- van Beek,T.A. 2005. "Ginkgolides and bilobalide: their physical, chromatographic and spectroscopic properties." *Bioorg.Med.Chem.* 13:5001-5012.
- van der Zwan,A., B.Hillen, C.A.Tulleken, M.Dujovny, and L.Dragovic. 1992. "Variability of the territories of the major cerebral arteries." *J.Neurosurg.* 77:927-940.
- van der Staay,J., The study of behavioral dysfunction: an evaluation of selected animal models. Graduate School of Behavioral and Cognitive Neurosciences (BCN), University Groningen, Niederlande; 2000.
- Vandeputte,C., J.M.Taymans, C.Casteels, F.Coun, Y.Ni, K.Van Laere, and V.Baekelandt. 2010. "Automated quantitative gait analysis in animal models of movement disorders." *BMC.Neurosci.* 11:92.
- Vernon,A.C., W.R.Crum, S.M.Johansson, and M.Modo. 2011. "Evolution of extra-nigral damage predicts behavioural deficits in a rat proteasome inhibitor model of Parkinson's disease." *PLoS.One.* 6:e17269.
- von Moltke,L.L., J.L.Weemhoff, E.Bedir, I.A.Khan, J.S.Harmatz, P.Goldman, and D.J.Greenblatt. 2004. "Inhibition of human cytochromes P450 by components of Ginkgo biloba." *J.Pharm.Pharmacol.* 56:1039-1044.
- Wahl,F., M.Allix, M.Plotkine, and R.G.Boulu. 1992. "Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats." *Stroke.* 23:267-272.

- Wahl,F., T.P.Obrenovitch, A.M.Hardy, M.Plotkine, R.Boulou, and L.Symon. 1994. "Extracellular glutamate during focal cerebral ischaemia in rats: time course and calcium dependency." *J.Neurochem.* 63:1003-1011.
- Wang,X., T.L.Yue, R.F.White, F.C.Barone, and G.Z.Feuerstein. 1995. "Transforming growth factor-beta 1 exhibits delayed gene expression following focal cerebral ischemia." *Brain Res.Bull.* 36:607-609.
- Weimer,C. und H-C. Diener. 2003. "Diagnose und Therapie der Schlaganfallbehandlung in Deutschland." *Deutsches Ärzteblatt* 40:2022-2026.
- Westerink,B.H. 1995. "Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour." *Behav.Brain Res.* 70:103-124.
- Woodruff,T.M., J.Thundyil, S.C.Tang, C.G.Sobey, S.M.Taylor, and T.V.Arumugam. 2011. "Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke." *Mol.Neurodegener.* 6:11.
- Wroblewska,B., I.N.Wegorzewska, T.Bzdega, R.T.Olszewski, and J.H.Neale. 2006. "Differential negative coupling of type 3 metabotropic glutamate receptor to cyclic GMP levels in neurons and astrocytes." *J.Neurochem.* 96:1071-1077.
- Yam,P.S., L.T.Dunn, D.I.Graham, D.Dewar, and J.McCulloch. 2000. "NMDA receptor blockade fails to alter axonal injury in focal cerebral ischemia." *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 20:772-779.
- Yamamoto,M., A.Tamura, T.Kirino, M.Shimizu, and K.Sano. 1988. "Behavioral changes after focal cerebral ischemia by left middle cerebral artery occlusion in rats." *Brain Res.* 452:323-328.
- Yamasaki,Y., Y.Matsuo, J.Zagorski, N.Matsuura, H.Onodera, Y.Itoyama, and K.Kogure. 1997. "New therapeutic possibility of blocking cytokine-induced neutrophil chemoattractant on transient ischemic brain damage in rats." *Brain Res.* 759:103-111.
- Yoshimoto,T., K.Houkin, M.Tada, and H.Abe. 1997. "Induction of cytokines, chemokines and adhesion molecule mRNA in a rat forebrain reperfusion model." *Acta Neuropathol.* 93:154-158.
- Yoshioka,K., H.Takehara, A.Okada, and N.Komi. 1992. "Glutamine antagonist with diet deficient in glutamine and aspartate reduce tumor growth." *Tokushima J.Exp.Med.* 39:69-76.
- Yu,Z.F., A.J.Bruce-Keller, Y.Goodman, and M.P.Mattson. 1998. "Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo." *J.Neurosci.Res.* 53:613-625.
- Yue,T.L., M.M.Gleason, J.Hallenbeck, and G.Feuerstein. 1991. "Characterization of platelet-activating factor-induced elevation of cytosolic free-calcium level in neurohybrid NCB-20 cells." *Neuroscience.* 41:177-185.
- Zhang,L., Y.Andou, S.Masuda, A.Mitani, and K.Kataoka. 1993. "Dantrolene protects against ischemic, delayed neuronal death in gerbil brain." *Neurosci.Lett.* 158:105-108.
- Zhang,L., T.Schallert, Z.G.Zhang, Q.Jiang, P.Arnego, Q.Li, M.Lu, and M.Chopp. 2002. "A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia." *J.Neurosci.Methods.* 117:207-214.

- Zhang,L., J.Q.Xu, S.Rong, B.J.Xie, Z.D.Sun, Y.J.Zhang, and L.G.Liu. 2009. "The mixture of procyanidins extracted from the lotus seed pod and bilobalide ameliorates scopolamine-induced memory impairment in mice." *Neurosci.Bull.* 25:203-208.
- Zhang,R.L., M.Chopp, N.Jiang, W.X.Tang, J.Prostak, A.M.Manning, and D.C.Anderson. 1995. "Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat." *Stroke.* 26:1438-1442.
- Zhang,Z., M.Chopp, A.Goussev, and C.Powers. 1998. "Cerebral vessels express interleukin 1beta after focal cerebral ischemia." *Brain Res.* 784:210-217.
- Zhang,Z.G., M.Chopp, S.Gautam, C.Zaloga, R.L.Zhang, H.H.Schmidt, J.S.Pollock, and U.Forstermann. 1994. "Upregulation of neuronal nitric oxide synthase and mRNA, and selective sparing of nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rat." *Brain Res.* 654:85-95.
- Zhou,J., J.H.Neale, M.G.Pomper, and A.P.Kozikowski. 2005. "NAAG peptidase inhibitors and their potential for diagnosis and therapy." *Nat.Rev.Drug Discov.* 4:1015-1026.
- Zhou,L.J. and X.Z.Zhu. 2000. "Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 293:982-988.
- Zhou,Z. and S.Zheng. 2003. "The missing link in Ginkgo evolution." *Nature.* 423:821-822.
- Zimmermann,M., F.Colciaghi, F.Cattabeni, and M.Di Luca. 2002. "Ginkgo biloba extract: from molecular mechanisms to the treatment of Alzheimer's disease." *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand).* 48:613-623.
- Zivin,J. Current Status of New Drug Development for Ischemic Stroke. In C.Y. Hsu Hrsg. Ischemic Stroke: From Basic Mechanisms to New Drug Development. Monogr Clin Neurosci. Vol 16 Basel: Karger; 1998: 14–27.
- Zoremba,N., A.Homola, R.Rossaint, and E.Sykova. 2007. "Brain metabolism and extracellular space diffusion parameters during and after transient global hypoxia in the rat cortex." *Exp.Neurol.* 203:34-41.
- Zündorf,I. 2009. "[The biology of Ginkgo biloba]." *Pharm.Unserer Zeit.* 38:417.
- Zülch KJ. The Cerebral Infarct. Pathology, Pathogenesis and Computed Tomography. Berlin Heidelberg New York: Springer; 1985

## 8 ANHANG

### PUBLIKATIONEN

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

**Lang D.**, Kiewert C., Mdzinarishvili A., Sumbria R., Schwarzkopf T.M., Hartmann J., Klein J.; *Bilobalide, a neuroprotectant that reduces ischemia-induced glutamate release in vivo.*  
under consideration

**Lang D.**, Ude C., Wurglics M., Schubert-Zsilavec M., Klein J.; *Brain permeability of bilobalide as probed by microdialysis before and after middle cerebral artery occlusion in mice.* Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (2010) 13(4) 607 – 614.

#### Publikationen (nicht in der Arbeit enthalten)

Mdzinarishvili A., Sumbria S., **Lang D.**, Klein J.; *Ginkgo extract EGb761 confers neuroprotection by reduction of glutamate release in ischemic brain.*  
under consideration

Burkhardt U., **Lang D.**, Mohr F., Schwarzkopf T.M., Zimmermann M.; *Literature and Science: A Different Look inside Neurodegeneration.*  
under consideration

#### Vortrag:

ICNF Young Investigator's Colloquium, Frankfurt 2011

"In vivo protection against cerebral ischemic stroke by bilobalide"



**Posterpräsentation bei Fachtagungen:**

Healthy Brain Conference: Healthy Brain: Aging and Brain Disease, Oslo, Juni 2011

**Lang D.**, Kiewert C., Mdzinarishvili A., Schwarzkopf T., Klein J.; *Metabolic effects of bilobalide in ischemic brain*

77. Jahrestagung der Pharmakologischen und Toxikologischen Gesellschaft, Frankfurt, März 2011

**Lang D.** und Klein J.; *Metabolic changes in the brain after stroke: neuroprotective effect of bilobalide*

6th International Symposium: Neuroprotection and Neurorepair, Warnemünde, Oktober 2010

**Lang D.** und Klein J.; *Bilobalide's neuroprotective effects in middle cerebral artery occlusion is dose- and time-dependant*

51. Jahrestagung der Pharmakologischen und Toxikologischen Gesellschaft, Mainz, März 2010

**Lang D.**, Ude C., Wurglics M., Schubert- Zsilavec M., Klein J.; *Brain permeability and neuroprotective effects of bilobalide*

50. Jahrestagung der Pharmakologischen und Toxikologischen Gesellschaft, Mainz, März 2009

**Lang D.** und Klein J.; *Neuroprotective effects of bilobalide in brain ischemia*

5th International Symposium: Neuroprotection and Neurorepair: Cerebral Ischemia and Stroke, Magdeburg, Mai 2008

Kiewert C., **Lang D.**, Mdzinarishvili A., Hartmann J., Klein J.; *Monitoring of metabolism and excitotoxicity after middle cerebral artery occlusion in mice*

**ERKLÄRUNG**

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt, den 18.05.2011

(Dorothee Lang)

**EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

**Charakterisierung des fokalen Schlaganfalls in der Maus und Einsatz von Bilobalid als Neuroprotektivum**

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben

Frankfurt, den 18.05.2011

(Dorothee Lang)