

TRANSIENTE CEREBRALE ISCHÄMIE

-

Neuroprotektive Effekte von Bilobalid, Triheptanoin und
Veränderungen im Alter

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

Apothekerin

Tina Maria Schwarzkopf
geboren in Frankfurt am Main

April 2013

[D30]

Die vorliegende Dissertation wurde vom Fachbereich (14) Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Thomas Prisner

1. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Klein

2. Gutachter: Prof. Dr. Walter E. Müller

Datum der Disputation:

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet.

Zusammenfassung

Der ischämische Schlaganfall zählt zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen und hinterlässt die meisten überlebenden Patienten in einer Pflegebedürftigkeit. Trotz der hohen Inzidenz und der gravierenden Folgen eines Schlaganfalls gibt es bislang keine ausreichende medikamentöse Therapie zum Schutz der Nervenzellen. Die akute Versorgung beschränkt sich auf die Lyse des Thrombus, welcher die betroffene Hirnarterie verschließt, und auf symptomatische Maßnahmen.

In der vorliegenden Dissertation wurden daher das neuroprotektiv wirkende Bilobalid, eine Substanz aus dem *Ginkgo biloba* Baum, und das anaplerotisch wirksame Triheptanoin auf ihre schützende Wirkung während eines ischämischen Schlaganfalls im Mausmodell untersucht. Zusätzlich wurden in der Bilobalid-Studie Tiere aus zwei verschiedenen Altersgruppen (6-8 Wochen gegen 18-24 Monate) verglichen. Der transiente Schlaganfall wurde in der Maus durch einstündigen Verschluss der mittleren Cerebralarterie (MCAO, *middle cerebral artery occlusion*) induziert.

Bilobalid wurde prophylaktisch eine Stunde vor Induktion des Schlaganfalls intraperitoneal (10 mg/kg) oder lokal in das betroffene Hirnareal (10 µM) verabreicht. Alle durchgeführten Experimente wiesen auf eine deutliche Neuroprotektion durch die Gabe von Bilobalid hin. Ein Tag nach MCAO war die Infarktfläche durch die Gabe von Bilobalid signifikant vermindert. In den durchgeführten motorischen Verhaltenstests schnitten die Bilobalid-behandelten Tiere wesentlich besser ab als unbehandelte Tiere. Der beobachtete Schutzeffekt von Bilobalid wurde auf mitochondriale Prozesse zurückgeführt: Die nach Ischämie beobachteten Defizite in Komplex I der mitochondrialen Atmungskette wurden durch die Gabe von Bilobalid deutlich vermindert. Bilobalid verringerte außerdem den enormen Anstieg von extrazellulärem Glutamat und das Ausmaß der mitochondrialen Schwellung während MCAO.

In der Altersstudie wurde deutlich, dass sowohl die motorische Aktivität der Tiere als auch einige zelluläre Prozesse wie die mitochondriale Atmung beeinträchtigt sind.

Nichtsdestotrotz zeigte Bilobalid auch in gealterten Tieren einen deutlichen protektiven Effekt nach Ischämie.

Das anaplerotisch wirksame Triheptanoin wurde den Mäusen in einer 14-tägigen Fütterungsstudie verabreicht (33% der Gesamt-Kalorien). Deutliche Schutzeffekte der Triheptanoin-Diät wurden nach Ischämie sowohl in TTC-gefärbten Hirnschnitten als auch in motorischen Verhaltenstests beobachtet. Durch den anaplerotischen Effekt sollte einerseits der Citratcyclus mit Acetyl-CoA und Succinyl-CoA gespeist werden, andererseits könnte Succinat in Komplex II der Atmungskette als direkter Energielieferant dienen. Dieser theoretische Ansatz wurde experimentell bestätigt: Die Fütterung mit Triheptanoin bewirkte eine signifikante Aktivitätssteigerung der mitochondrialen Komplexe II und IV nach MCAO. Die durch Ischämie gesenkten ATP-Spiegel und das Membranpotential wurden durch die anaplerotische Diät ebenfalls deutlich erhöht. Triheptanoin bewirkte zudem eine signifikante Reduktion des extrazellulären Glutamat-Anstiegs während der MCAO.

Die Auswirkungen eines Schlaganfalls wurden demnach sowohl durch die prophylaktische Gabe von Bilobalid eine Stunde vor Ischämie als auch durch die 14-tägige Triheptanoin-Diät maßgeblich vermindert. Beide Substanzen zeigten im Mausmodell bemerkenswerte neuroprotektive Effekte und könnten daher auch beim Auftreten eines humanen Schlaganfalls entscheidende Vorteile bringen. Der präventive therapeutische Einsatz von Bilobalid oder Triheptanoin sollte daher in klinischen Studien weiter verfolgt werden.

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Lang D, Kiewert C, Mdzinarishvili A, Schwarzkopf TM, Sumbria R, Hartmann J, Klein J (2011) Neuroprotective effects of bilobalide are accompanied by a reduction of ischemia-induced glutamate release in vivo. *Brain Res*, 1425:155–163.

Schwarzkopf TM, Hagl S, Eckert G, Klein J (2013a) Neuroprotection by bilobalide in ischemia: improvement of mitochondrial function. *Pharmazie*, 68:1-6.

Schwarzkopf TM, Horn T, Lang D, Klein J (2013b) Blood gases and energy metabolites in mouse blood before and after cerebral ischemia: effect of anesthetics. *Exp Med Biol*, 238(1):84–89.

Summary

Ischemic stroke is one of the leading causes of death in industrialized countries. Most surviving patients stay in medical care. In spite of the high incidence and severe outcome of stroke, there is no satisfying drug therapy for neuronal protection yet. Acute therapy is restricted to lysing the clot which is occluding the affected brain artery and symptomatic care.

In this dissertation, the neuroprotective agent bilobalide, from the *Ginkgo biloba* tree, and the anaplerotic molecule triheptanoin were tested for their protective effects after ischemic stroke in animal models. Additionally, in the bilobalide study, animals at two different ages were compared (6-8 weeks versus 18-24 month). Transient ischemic stroke was induced in mice by occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) for one hour.

Bilobalide was given one hour before stroke onset by intraperitoneal injection (10 mg/kg) or locally, directly into the affected brain region (10 μ M). All experiments revealed a distinct neuroprotective effect of bilobalide. One day after MCAO, infarct area was significantly reduced when mice were pretreated with bilobalide. Furthermore, in behavioral tests bilobalide-treated mice performed better than control animals. The protective effect of bilobalide was attributed to mitochondrial processes: ischemia-induced deficits in complex I of the mitochondrial respiratory chain were significantly lowered by bilobalide. Additionally, bilobalide strongly decreased the enormous rise of extracellular glutamate and the extent of mitochondrial swelling during MCAO .

The aging study revealed a distinct deficit in motor-behavior and cellular processes, such as the mitochondrial respiratory chain, in old animals. Nevertheless, bilobalide showed a remarkable protective effect after ischemia also in aged animals.

The anaplerotic molecule triheptanoin was administered to mice in a feeding study of 14 days (33 % of total calories). Triheptanoin showed distinct protective effects in TTC-stained brain slices and in behavioral tests after ischemia. The anaplerotic effect provided acetyl-CoA and succinyl-CoA to the citric acid cycle but also supplied succinate

directly to complex II for energy production. This hypothesis was experimentally verified: feeding with triheptanoin significantly improved the activities of complexes II and IV after MCAO. The anaplerotic diet also increased ATP levels and membrane potential after ischemia. Furthermore, triheptanoin caused a distinct reduction in the rise of extracellular glutamate during MCAO.

In summary, stroke outcome was significantly improved by prophylactic administration of bilobalide one hour before stroke as well as by feeding a triheptanoin-enriched diet. Both substances showed remarkable neuroprotective effects in mice and therefore are promising new agents for human stroke therapy. Hence, the preventive therapeutic use of bilobalide or triheptanoin should be followed up in clinical studies.

Parts of this work have already been published:

Lang D, Kiewert C, Mdzinarishvili A, Schwarzkopf TM, Sumbria R, Hartmann J, Klein J (2011) Neuroprotective effects of bilobalide are accompanied by a reduction of ischemia-induced glutamate release in vivo. *Brain Res*, 1425:155–163.

Schwarzkopf TM, Hagl S, Eckert G, Klein J (2013a) Neuroprotection by bilobalide in ischemia: improvement of mitochondrial function. *Pharmazie*, 68:1-6.

Schwarzkopf TM, Horn T, Lang D, Klein J (2013b) Blood gases and energy metabolites in mouse blood before and after cerebral ischemia: effect of anesthetics. *Exp Med Biol*, 238(1):84–89.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Schlaganfall	1
1.2	Veränderungen im Alter	3
1.3	Pathobiologie nach Schlaganfall	6
1.4	Therapieoptionen	9
1.4.1	Neuroprotektion durch Bilobalid	11
1.4.2	Anaplerotische Diät	17
1.5	Das MCAO-Modell in der Maus	24
1.6	Zielsetzung	28
2	Material & Methoden	31
2.1	Tiere	31
2.2	Neuroprotektiva	32
2.3	Blutanalyse	34
2.3.1	Materialien	35
2.3.2	Blutentnahme	35
2.3.3	Analytik	36
2.4	Ausmaß des Schlaganfalls	37
2.4.1	Materialien	37
2.4.2	TTC Färbung	38
2.4.3	Neuroprotektive Behandlung	39
2.5	Verhaltenstests	40
2.5.1	Chimney Test	40
2.5.2	Rotarod	41
2.5.3	Corner Test	42
2.5.4	Neuroprotektive Behandlung	44
2.6	Mikrodialyse	44
2.6.1	Materialien	45

2.6.2	Fertigung von Mikrodialyse-Sonden und -Schläuchen	47
2.6.3	Sondenimplantation	49
2.6.4	Wiederfindungswert	52
2.6.5	Ablauf der Mikrodialyse	53
2.6.6	Auswertung	54
2.7	Schlaganfallmodell	54
2.7.1	Materialien	55
2.7.2	Operationsverfahren MCAO	55
2.7.3	Schlaganfall und Mikrodialyse	59
2.7.4	Neuroprotektive Behandlung	59
2.8	Mitochondriale Atmung	59
2.8.1	Materialien	60
2.8.2	Die Mitochondriale Atmungskette	61
2.8.3	Isolierung der Mitochondrien	63
2.8.4	Pipettierschema zur Messung der mitochondrialen Atmung	64
2.8.5	Proteinbestimmung	66
2.8.6	Neuroprotektive Behandlung	67
2.9	Mitochondriale Schwellung	69
2.9.1	Materialien	69
2.9.2	Isolierung der Mitochondrien	70
2.9.3	Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure	72
2.9.4	Qualitätskontrolle	72
2.9.5	Absorptionsmessung	73
2.9.6	Neuroprotektive Behandlung	73
2.10	Messung von ATP und Membranpotential	74
2.10.1	Materialien	74
2.10.2	Isolation der dissoziierten Hirnzellen	75
2.10.3	ATP-Messung	76
2.10.4	Messung des Membranpotentials	77
2.10.5	Proteinbestimmung	78
2.10.6	Neuroprotektive Behandlung	78
2.11	Statistische Verfahren	79
2.12	Verwendete Chemikalien	81

3	Ergebnisse	83
3.1	Blutanalyse	83
3.2	Wiederfindungswert	86
3.3	Neuroprotektive Wirkung von Bilobalid	87
3.3.1	Ausmaß des Schlaganfalls	87
3.3.2	Verhalten	92
3.3.3	Schlaganfall und Mikrodialyse	95
3.3.4	Mitochondriale Atmung	100
3.3.5	Mitochondriale Schwellung	105
3.3.6	Zusammenfassung	110
3.4	Anaplerotische Diät - Triheptanoin	111
3.4.1	Entwicklung des Körpergewichts	111
3.4.2	Blutanalyse	113
3.4.3	Ausmaß des Schlaganfalls	113
3.4.4	Verhalten	117
3.4.5	Schlaganfall und Mikrodialyse	119
3.4.6	Mitochondriale Atmung	121
3.4.7	ATP-Gehalt und Membranpotential	124
3.4.8	Zusammenfassung	126
4	Diskussion	127
4.1	Blutanalyse	127
4.2	Neuroprotektive Wirkung von Bilobalid	130
4.2.1	Ausmaß des Schlaganfalls	131
4.2.2	Verhalten	133
4.2.3	Schlaganfall und Mikrodialyse	135
4.2.4	Mitochondriale Atmung	140
4.2.5	Mitochondriale Schwellung	146
4.2.6	Zusammenfassung	149
4.3	Anaplerotische Diät - Triheptanoin	153
4.3.1	Anaplerotische Wirkung von Triheptanoin	154
4.3.2	Entwicklung des Körpergewichts	157
4.3.3	Blutanalyse	158
4.3.4	Ausmaß des Schlaganfalls	158
4.3.5	Verhalten	159

4.3.6	Schlaganfall und Mikrodialyse	161
4.3.7	Mitochondriale Atmung	163
4.3.8	ATP-Gehalt und Membranpotential	165
4.3.9	Zusammenfassung	166
4.4	Ausblick	169
	Danksagung	171
	Literaturverzeichnis	198
	Abbildungsverzeichnis	202
	Tabellenverzeichnis	203

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss eines Neuroprotektivums, Bilobalid, und einer potentiell anaplerotischen Diät auf die Folgen eines Schlaganfalls im experimentellen Modell.

Im Folgenden sollen zunächst die verschiedenen Schlaganfallformen näher erläutert werden. Es wird auf Risikofaktoren eingegangen mit besonderem Fokus auf dem Einfluss des Alters der Schlaganfall-Patienten. Anschließend werden die metabolischen Veränderungen nach einer Ischämie im Gehirn erklärt. Die bisherigen Therapieoptionen, insbesondere der Wirkmechanismus der zwei neuen potentiellen Schlaganfall-Therapeutika, Bilobalid und Triheptanoin, werden im Detail vorgestellt. Die Beschreibung des verwendeten Schlaganfallmodells, der Induktion einer Ischämie im Mäusehirn durch Verschluss der mittleren Cerebralarterie (*middle cerebral artery occlusion*, MCAO), rundet dieses Kapitel ab.

1.1 Der Schlaganfall

Der Schlaganfall ist den vergangenen Jahrzehnten bis auf Platz 3 der häufigsten Todesursachen weltweit gestiegen. Pro Jahr gibt es fast 300.000 Fälle alleine in Deutschland. Zudem ist der Schlaganfall der häufigste Grund für eine lebenslange Pflegebedürftigkeit (Heuschmann et al. 2010, Strong et al. 2007, Lopez et al. 2006). Durch den demographischen Wandel werden sich diese Prognosen in den kommenden Jahren noch verschlechtern, wie Foerch et al. 2008 für das Bundesland Hessen aufzeigten.

Der allgemeine Begriff des „Schlaganfalls“ lässt sich untergliedern in ischämische und hämorrhagische Formen. In über 80 % der Fälle tritt ein ischämischer Schlaganfall ein (Donnan et al. 2008). Der Auslöser ist meist ein Thrombus, welcher eine Endarterie des Gehirns verstopft und somit den Blutfluss im dahinter liegenden Gewebe beeinträchtigt. Da das Blut der einzige Lieferant für Sauerstoff und Glucose ist, stirbt das betroffene

1 Einleitung

Hirngewebe ohne Bereitstellung dieser Energielieferanten ab (Doenecke et al. 2005). In den meisten Fällen ist die betroffene Endarterie die mittlere Cerebralarterie (MCA, *Arteria cerebri media*), welche dem Arterienring (*Circulus arteriosus Willisii*) entspringt (siehe Abbildung 1.1). Nach Studien von Olsen et al. 1985 konnte bei etwa 40 % aller Schlaganfallpatienten ein Verschluss der MCA nachgewiesen werden.

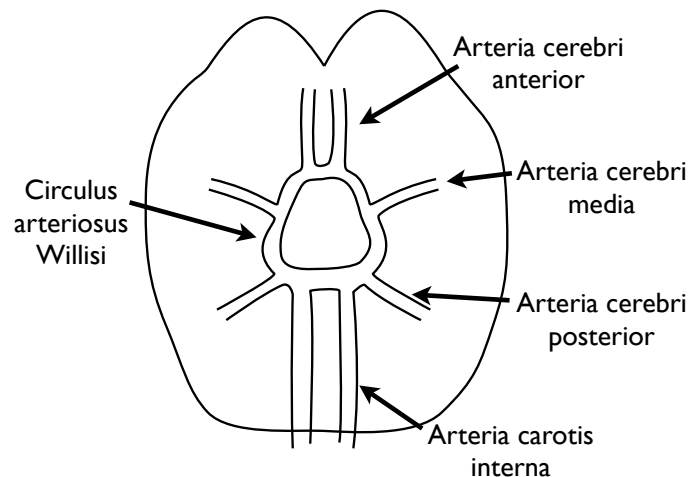


Abbildung 1.1: Hirnarterien des Menschen.

Die Ursachen für einen ischämischen Schlaganfall sind größtenteils im Krankheitsbild des „metabolischen Syndroms“ vereint: Thromben entstehen vornehmlich durch Hypertonie, Dyslipidämie, Insulinresistenz und Herzinsuffizienz. Auch unzureichende Bewegung, Fettleibigkeit, Rauchen und übermäßiger Alkoholkonsum können die Entstehung begünstigen. Der größte Risikofaktor ist jedoch nicht zu beeinflussen: das Alter.

Die INTERSTROKE Studie (O'Donnell et al. 2010) beschäftigte sich ausführlich mit den Risikofaktoren eines Schlaganfalls (siehe auch Lo et al. 2003, Baltan 2009, Carandang et al. 2006, Rothwell et al. 2004).

Hämorrhagische Schlaganfälle entstehen durch Ruption eines Blutgefäßes im Gehirn. Diese Form hat einen Anteil von 10-15 % aller Schlaganfälle, ist häufig tödlich und oft genetisch bedingt (Broderick et al. 2007). Die Ursachen sind in Störungen des Gerinnungssystems oder in Gefäßanomalien zu finden (Taylor 2008). Befindet sich eine Schwachstelle an einem Blutgefäß im Gehirn, so kann diese durch Dauerbelastung oder extreme Belastungssituationen wie Stress oder Bluthochdruck ruptieren. Daher wird diese Form des Schlaganfalls auch bereits bei jüngeren Patientengruppen beobachtet.

Die hämorrhagische Form sei hier nur zur Vollständigkeit erwähnt, da sich diese Dissertation mit der ischämischen Form des Schlagfalls beschäftigt.

1.2 Veränderungen im Alter

Im Laufe des Alterns verändern sich viele Prozesse im menschlichen Körper: Die Motilität des Magen-Darm-Traktes verschlechtert sich, wodurch Nahrung und Medikamente schlechter resorbiert werden können (Grassi et al. 2011). Außerdem findet eine Umverteilung von Muskel- zu Fettgewebe statt. Dies hat Auswirkungen auf die Verteilung und Elimination von Arzneistoffen im Körper (Shi und Klotz 2011). Zudem verändern sich Enzymaktivitäten. In der Leber wird dies besonders durch die Beeinflussung des Metabolismus von Arzneimitteln deutlich (Wauthier et al. 2007, Aymanns et al. 2010).

Jedoch ist nicht nur die Leber betroffen. Das Altern beeinflusst den Stoffwechsel aller Zellen im Körper. Die Ursachen hierfür waren bisher trotz intensiver Forschung nicht komplett aufzudecken. Eine Erklärung geben Veränderungen in der DNA. Im Laufe des Lebens entstehen in den Zellen kontinuierlich reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS). Hierzu zählen Superoxid-Anionen, Hydroxyl-Radikale, Wasserstoffperoxid, Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit-Ionen (Trifunovic und Larsson 2008, Navarro und Boveris 2007). Sie werden *in vivo* durch Stoffwechselprozesse oder durch Einflüsse von außen (wie UV-Strahlung, Toxine, ionisierende Strahlung und Entzündungen) generiert (Hegde et al. 2012). ROS können Macromoleküle wie Lipide, Proteine und die DNA oxidieren (Moran et al. 2012, Dai et al. 2012, Jena 2012). Es entstehen reaktive Lipid-Peroxide und falsch gefaltete Proteine (Anderson et al. 2012). Punktmutationen und Strangbrüche der DNA führen zur Bildung von weniger aktiven oder nicht funktionsfähigen Proteinen/Enzymen (Nakamura et al. 2012, Trifunovic und Larsson 2008).

Der Körper setzt Antioxidantien ein, um die entstandenen ROS abzufangen und unschädlich zu machen. Die wichtigsten Vertreter sind Vitamin C und E, Coenzym Q (CoQ) sowie die körpereigenen Enzyme Glutathion-Peroxidase (GPX) und Superoxid-Dismutase (SOD) (Calabrese et al. 2004, Murphy et al. 2011, Lenaz et al. 2002). Zusätzlich besitzen die Zellen Reparaturmechanismen, welche alkylierte und oxidierte Basen der DNA ausbessern (Hegde et al. 2012). Hitzeschockproteine (HSP) schützen Proteine vor Denaturierung und falscher Faltung (Calabrese et al. 2004). Das Gehirn ist durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) weitestgehend vor Einflüssen von außen geschützt. Hier dominieren daher die

1 Einleitung

endogen verursachten ROS-Schäden. Hirngewebe schützt sich weitestgehend durch die in Astrocyten exprimierte GPX und die in Neuronen exprimierte SOD (Benzi und Moretti 1995, Hegde et al. 2012, Bae et al. 2011).

Die Mitochondrien sind besonders anfällig für oxidative Schäden, da die mitochondriale Atmung zur Generierung von ROS führt. 0,1-4 % der gebildeten Elektronen entweichen aus der Atmungskette und reduzieren unter anderem Sauerstoff zu Superoxid-Anionen (Sastre et al. 2000, Moran et al. 2012). Zudem ist die mitochondriale DNA (mtDNA) für oxidative Schäden noch anfälliger als die nucleäre DNA (nDNA), da sie keine schützenden Histone besitzt (Hegde et al. 2012). Eine Beeinträchtigung der Enzyme der mitochondrialen Atmungskette endet demnach in einem Teufelskreis: Die Bildung von ROS führt zu weniger funktionsfähigen enzymatischen Komplexen, was die Bildung weiterer ROS begünstigt (siehe Abbildung 1.2). Sind die Reparaturmechanismen nicht mehr in der Lage die Schäden auszugleichen, folgt eine verminderte Energiebereitstellung durch die Mitochondrien (Lenaz et al. 2002).

Die „*Mitochondrial free radical theory of aging*“ (Theorie über die Beteiligung der mitochondrialen freien Radikale am Alterungsprozess) wurde von Harman 1956 aufgestellt. Sie besagt, dass die freien Radikale, welche durch die mitochondriale Atmung entstehen, der Hauptgrund für den Alterungsprozess darstellen.

Heute ist man immer noch der Annahme, dass die Produktion von ROS einen entscheidenden Beitrag zu altersbedingten Schäden hat (Hegde et al. 2012). Die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette verlieren im Alter an Aktivität. Dies wurde besonders in der Atmung von Komplex I und IV beobachtet. Auch das Membranpotential sinkt mit zunehmendem Alter (Navarro und Boveris 2007, Trifunovic und Larsson 2008). Jedoch liegen Studien vor, in welchen kein Zusammenhang zwischen erhöhter ROS-Produktion und Defiziten der Atmungskette erkannt werden konnte (Murphy et al. 2011). Mammucari und Rizzuto 2010 beobachteten keinen zellulären Anstieg an oxidierten Macromolekülen im Alter. Ebenso konnte bisher nicht gezeigt werden, ob im Alter mehr Mutationen in der mtDNA vorliegen (Hegde et al. 2012, Trifunovic und Larsson 2008). Zusätzlich sind weitere Mechanismen der Zellalterung entdeckt worden. Die Aktivität des Enzyms Telomerase ist entscheidend für die Zellproliferation. Telomere beeinflussen unter anderem Signale zur Zellteilung und Apoptose (Tümpel und Rudolph 2012, Sahin und DePinho 2012).

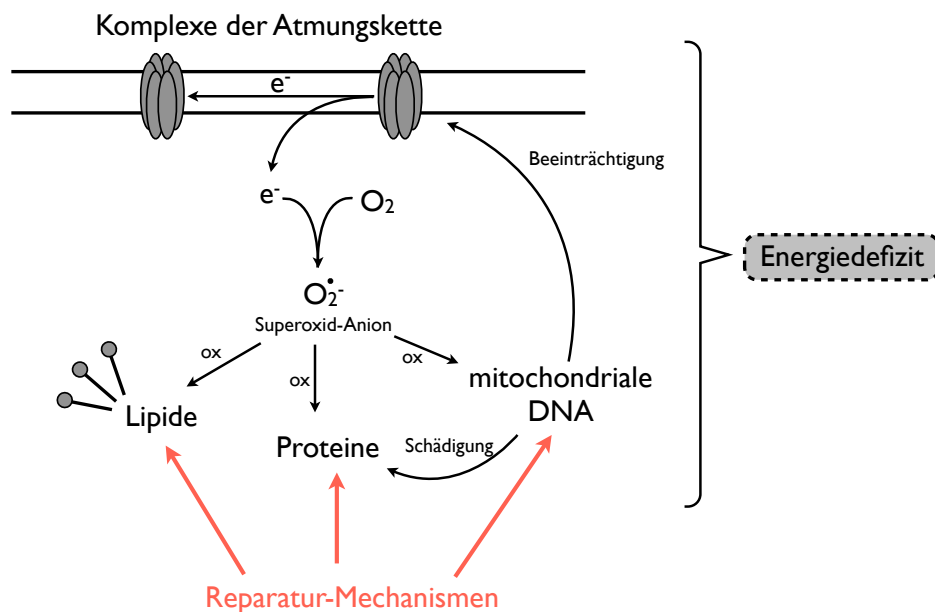


Abbildung 1.2: Teufelskreis der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Elektronen entweichen aus der mitochondrialen Atmungskette und reagieren mit Sauerstoff zu Superoxid-Anionen. Diese oxidieren Lipide, Proteine und die mitochondriale DNA. Aufgrund von Punktmutationen und Strangbrüchen entstehen durch Proteinbiosynthese aus der mtDNA keine richtig gefalteten Proteine mehr. Hiervon sind auch die Enzyme der Atmungskette betroffen. Können die zellulären Reparaturmechanismen die Schäden nicht mehr beheben, führt die oxidative Schädigung zu einem Defizit in der Energiebereitstellung.

Neben dem Gehirn ist auch das Herz durch den hohen Energieumsatz besonders empfindlich gegenüber der Bildung von ROS und mitochondrialen Schäden (Dai et al. 2012). Erleidet das Herz oxidativen Stress und versucht es diesen auszugleichen, so kann es zum „Remodelling“ und zur Hypertrophie des Herzmuskels kommen. Dies beeinträchtigt die Herzleistung. Die beschriebene altersbedingte Herzschwäche führt zu einem verlangsamten und unregelmäßigen Blutfluss und begünstigt dadurch die Bildung von Thromben.

Zusätzlich verändern sich die Gerinnungsparameter mit dem Alter. Die Gerinnungsfaktoren werden vornehmlich in der Leber produziert. Verliert diese an Enzymaktivität, gerät das Blutgerinnungssystem aus dem Gleichgewicht (Franchini 2006). Auch das Endothel verliert im Alter zunehmend an Regenerationsfähigkeit. Gerade in den kleinen Blutgefäßen ist die anti-koagulative Wirkung von Thrombomodulin im Endothel entscheidend. Nach Studien von Esmon und Esmon 2011 reagierte das Endothel alter Mäuse wesentlich

1 Einleitung

sensibler auf Entzündungen als das junger Mäuse. Im Alter treten außerdem eine erhöhte Fibrinbildung und eine geringere körpereigene fibrinolytische Aktivität auf (Gharacholou und Becker 2009).

Das Zusammenspiel aus kardiovaskulären Erkrankungen, mitochondrialen Prozessen und dem Alter begünstigt demnach die Bildung von Thromben und steigert das Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden.

1.3 Pathobiologie nach Schlaganfall

Durch einen ischämischen Schlaganfall entstehen starke metabolische Veränderungen im Gehirn (siehe Abbildung 1.3).

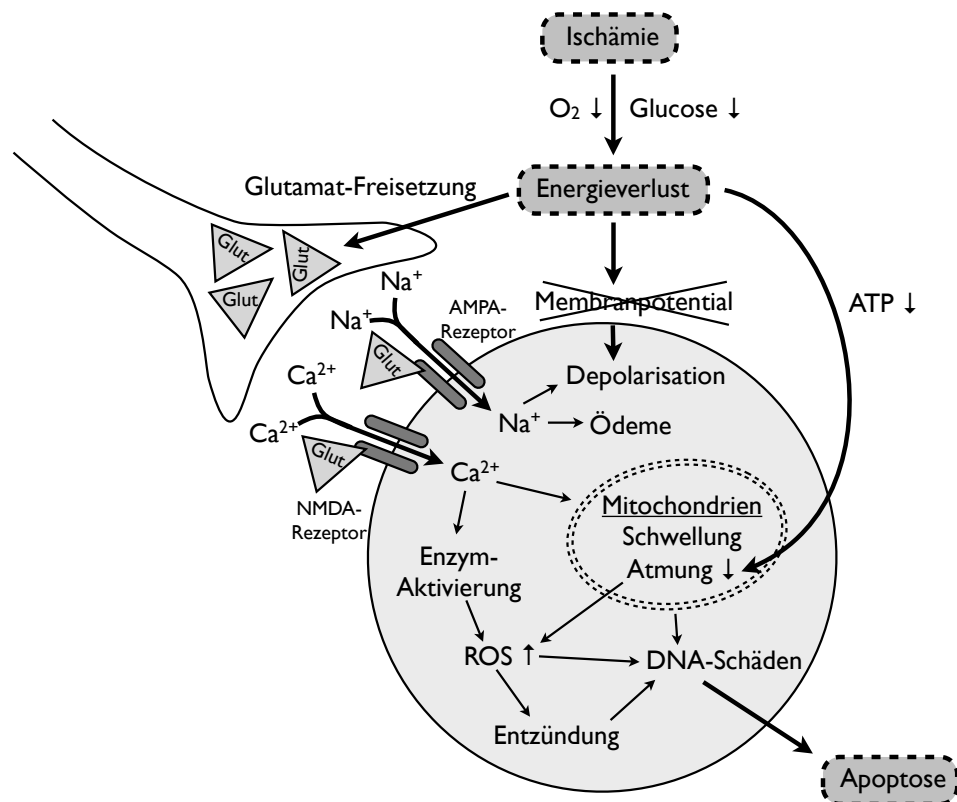


Abbildung 1.3: Pathobiologische Veränderungen im Gehirn nach Ischämie. Durch den Mangel an Sauerstoff und Glucose kommt es zum Energieverlust in den Zellen. Die Freisetzung von Glutamat, mitochondriale Prozesse und der Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen zum programmierten Zelltod, der Apoptose (frei nach Dirnagl et al. 1999).

Auslöser ist der plötzliche und gravierende Energieverlust in den Hirnzellen. Das Membranpotential der Zellen kann nicht mehr aufrecht erhalten werden, da die Natrium-Kalium-ATPasen durch den Energiemangel ihre Funktion nicht mehr vollständig ausführen können (Dirnagl et al. 1999, Lipton 1999). Die Hirnzellen depolarisieren. Hierdurch werden spannungsabhängige Calcium-Kanäle aktiviert, die intrazellulären Calcium-Spiegel steigen. Der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat liegt bei intakter Homöostase extrazellulär in nur sehr geringen Mengen vor. Durch das gestörte Ionengleichgewicht steigt die Konzentration an Glutamat im Extrazellularraum jedoch dramatisch an (siehe Abbildung 1.4 und Featherstone 2010).

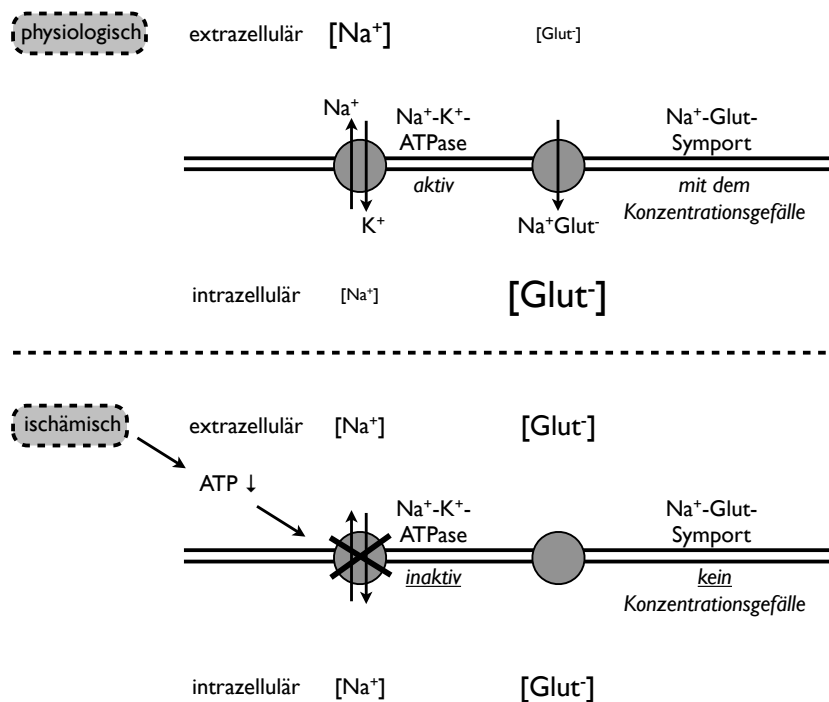


Abbildung 1.4: Physiologisches Gleichgewicht: Der Natrium-Glutamat-Symport hält die extrazellulären Glutamat-Konzentrationen gering. Durch den Energieverlust nach Ischämie können die ATPasen den Ionengradienten nicht mehr aufrecht erhalten. Eine Folge davon ist der Konzentrationsanstieg von Glutamat im Extrazellularraum (frei nach Lipton 1999).

Die übermäßige Aktivierung von NMDA-Rezeptoren durch Glutamat bewirkt einen weiteren Einstrom von Calciumionen in die Zelle (Featherstone 2010). Natriumionen strömen zum Beispiel über den ebenfalls durch Glutamat aktivierten AMPA-Rezeptor in die Zelle. Die einströmenden Natriumionen und die hohen Konzentrationen des aus-

1 Einleitung

tretenden Kaliums sorgen für eine Depolarisation der Zelle. Ist noch genügend Energie vorhanden, wie es im Randbereich der Ischämie (Penumbra) der Fall ist, so kann die Zelle erneut repolarisieren. Da Kalium durch die Ischämie extrazellulär jedoch immer noch in hohen Konzentrationen vorkommt, erfolgt eine erneute Depolarisation. Diese sogenannten Peri-Infarkt-Depolarisationen vergrößern das Ausmaß des Schlaganfalls (Dirnagl et al. 1999, Lo et al. 2003). Die einströmenden Ionen erzeugen außerdem einen osmotischen Gradienten, der zu einer vermehrten Wasseraufnahme in die Zellen führt. Eine starke Ödembildung der Hirnzellen kann Blutgefäße einengen und so den Blutfluss im Gehirn weiter beeinträchtigen. Außerdem kann der ansteigende intracraniellen Druck zu einer Verschiebung von Hirngewebe (Herniation) und den daraus folgenden Hirnstammschäden führen (Adams et al. 2007).

Durch die hohen intrazellulären Calcium-Konzentrationen werden die Mitochondrien stark geschädigt (Kristian und Siesjö 1998, Lipton 1999). Es werden proteolytische Enzyme aktiviert, die zum Beispiel das Cytoskelett abbauen. Die sonst undurchlässige innere Mitochondrienmembran wird durchlässig. Das Mitochondrium schwillt an und das Membranpotential kann nicht mehr aufrecht erhalten werden. Die mitochondriale Atmungskette ist bereits durch die fehlenden Substrate Sauerstoff und Glucose stark gehemmt (Canevari et al. 1997). Durch den Verlust des Membranpotentials entwickelt sich zusätzlich ein sekundärer Energiemangel in den Mitochondrien. Außerdem wird durch die Aktivierung unter anderem von Phospholipasen und Cyclooxygenasen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gefördert. Diese können mit den Komplexen der Atmungskette oder der DNA reagieren und die Energiegewinnung in den Mitochondrien weiter beeinträchtigen. Bei zu starker Schädigung wird Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt, ein Auslöser für den programmierten Zelltod (Charriaut-Marlangue et al. 1998, Feuerstein et al. 1998).

Durch die Hypoxie, die Aktivierung von sekundären Botenstoffen und den Anstieg von ROS werden Entzündungsprozesse in den Zellen aktiviert. Der nach der Ischämie folgende Entzündungsprozess liefert einen entscheidenden Beitrag zu dem bleibenden Hirnschaden nach einem Schlaganfall (Lo et al. 2003, Dirnagl et al. 1999).

Allgemein werden zwei Formen des Zelltods unterschieden: Die Nekrose, der Zelluntergang, und die Apoptose, der programmierte Zelltod. Im Zentrum („Core“) des Schlaganfalls finden hauptsächlich nekrotische Vorgänge statt. Hier ist die Schädigung des Gewebes so stark, dass dieses sofort zugrunde geht. In der Penumbra dahingegen sind viele Zellen zunächst leicht geschädigt. Hier kommt es vornehmlich sekundär durch Entzündungsprozesse

und Schädigung durch ROS zum Einleiten des programmierten Zelltods, der Apoptose (Smith 2004). In dieser Region wäre jedoch auch Potential für einen medikamentösen Eingriff (Dirnagl et al. 1999).

1.4 Therapieoptionen

Die bisherige Therapie eines ischämischen Schlaganfalls beruht auf der Lyse des entstandenen Thrombus. Hierfür wird ein rekombinanter Gewebsplasminogenaktivator (*recombinant tissue plasminogen activator*, rt-PA), die Alteplase, intravenös verabreicht (Hacke et al. 2008, Dyker und Lees 1998). Das Problem an dieser Therapie ist das sehr geringe Zeitfenster von 3 bis 4,5 Stunden, in welcher die Lyse stattgefunden haben muss. Allein der Transport des Patienten ins Krankenhaus kostet bereits Zeit. Zur Abklärung, welche Form des Schlaganfalls vorliegt (ischämisch oder hämorrhagisch) wird eine cranielle Computertomographie (CCT) durchgeführt. So können Hirnblutungen ausgeschlossen werden, bevor therapeutische Maßnahmen ergriffen werden (Nentwich und Veloz 2012). Zur Prophylaxe weiterer Schlaganfälle werden niedrige Dosen Acetylsalicylsäure (ASS 100 mg/d) verabreicht (Bousser 2012, Alberts 2003). Die Leitlinien zur Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) sind unter [http : //www.dsg – info.de/images/stories/DSG/PDF/Leitlinien/ll08kap_023.pdf](http://www.dsg-info.de/images/stories/DSG/PDF/Leitlinien/ll08kap_023.pdf) nachzulesen.

Leider sind alle bisherigen neuen Therapieansätze in den klinischen Studien gescheitert. Ginsberg 2008 gab hierüber einen ausführlichen Überblick. Nachfolgend sollen die bisher wichtigsten potentiellen Alternativen in der Schlaganfalltherapie zusammengefasst werden. Die Pathobiologie nach Schlaganfall ist in Kapitel 1.3 erläutert. Diese liefert den Hintergrund, um die Wirkweise der Therapeutika zu verstehen.

Calcium-Kanal-Blocker: Der Arzneistoff Nimodipin ist gut hirngängig. Durch die Blockade von L-Typ-Calcium-Kanäle wird der Eintritt von Calcium in die Neurone vermindert und eine Vasodilatation herbeigeführt (Kazda und Towart 1982, Scriabine et al. 1989). Nimodipin findet seinen klinischen Einsatz bei spontan auftretenden Vasospasmen (Ducros 2012). In der Schlaganfall-Therapie ergaben klinische Studien jedoch keinerlei Verbesserung im Vergleich zu Placebo (Cochrane meta-Analyse: Zhang et al. 2012, VENUS-Studie: Horn et al. 2001).

1 Einleitung

Glutamat-Antagonisten: Die nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor-Blocker MK-801 (Dizocilpin) und CNS-1102 (Aptiganel) binden mit hoher Affinität an den Rezeptor und sorgen dadurch für eine lang anhaltende Blockade. Sie zeigten *in vitro* und *in vivo* signifikante Verbesserungen in den Auswirkungen nach Schlaganfall (Ginsberg 1995, Minematsu et al. 1993). In klinischen Studien wurden jedoch gravierende dosis-abhängige Nebenwirkungen entdeckt: Es traten starke Übelkeit, Erbrechen, Müdigkeit, Halluzinationen, Paranoia und Katatonien auf (Olney 1994, Muir et al. 1994). Der Schweregrad dieser psychischen Nebenwirkungen ließ die klinischen Studien für die Glutamat-Antagonisten scheitern.

NMDA-Rezeptor-Antagonist an der Glycin-Bindungsstelle: Gravestinel ist ein Wirkstoff der ebenfalls am NMDA-Rezeptor angreift, jedoch an anderer Stelle als MK-801 und Aptiganel. Dadurch zeigt Gravestinel keine schweren psychischen Nebenwirkungen. Jedoch ließ die GAIN-Studie auch keinen deutlichen Nutzen nach Schlaganfall durch Einnahme des Medikamentes erkennen (GAIN-Studie: Lees et al. 2000).

Antioxidantien: Der Einsatz von Antioxidantien soll die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Infarktgebiet vermindern. Bis in präklinische oder klinische Studien gelangten die Substanzen NXY-059, Tirilazad, Ebselen und Edaravon. Alle scheiterten an mangelnder Besserung der Schlaganfall-Folgen (Ginsberg 2008).

NO-Signaltransduktions-Regulierer: Der Wirkstoff Lubeluzol regelt den durch Glutamat induzierten NO-Syntheseweg herunter (Lesage et al. 1996). Eine Cochrane meta-Analyse, die fünf Studien mit 3510 Patienten verglich, konnte nach Verabreichen von Lubeluzol keine Verbesserung in der Sterberate als Folge eines Schlaganfalls ermitteln. Vielmehr wurden Arrhythmien in Form von QT-Zeit-Verlängerung festgestellt (Cochrane meta-Analyse: Gandolfo et al. 2002).

Antikörper: Enlimomab (UK 279.276) ist ein muriner Antikörper gegen das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1). Dieses vermittelt die Leukozyten-Adhäsion, welche durch den Arzneistoff demzufolge vermindert wird. In der ASTIN-Studie wurde eine mangelnde Wirksamkeit des Antikörpers beschrieben. Sughrue und Connolly 2004 vermuteten, dass der Antikörper nur bei Ischämie mit nachfolgender Reperfusion ausreichend wirksam sei (ASTIN-Studie: Krams et al. 2003).

In einer aktuellen Zusammenfassung von Hakim 2012 wurde die „Zukunft der Thombolyse-Therapie“ näher beleuchtet. Es wurde Wert auf eine Verbesserung der Gabe von rt-PA gelegt. Diese müsse schneller erfolgen, wodurch auch eine Entwicklung der neurologischen Screeningmethoden notwendig wäre.

Unsere aktuelle Herausforderung in der Schlaganfall-Forschung ist, die leicht geschädigten Hirnzellen nach Ischämie durch Medikamenteneinsatz so weit zu stärken, dass diese nicht in den programmierten Zelltod übergehen. Diese Eigenschaft wird mit dem Begriff „neuroprotektiv“ beschrieben. Ein Neuroprotektivum schützt die Hirnzellen durch pharmakologische oder biochemische Intervention vor schädigenden Einflüssen und ist so in der Lage, den Krankheitsverlauf zu verzögern bzw. die Lebensqualität zu verbessern (Shoulson 1998).

Ein neu entwickelter, neuroprotektiver Wirkstoff müsste Blut-Hirn-Schranken-gängig sein und im Infarktgebiet wirken, bis eine Lysetherapie erfolgreich durchgeführt wurde. Im Akutfall müsste das Medikament vom Notarzt direkt verabreicht werden können, ganz gleich ob die Diagnose durch ein CCT bereits sicher gestellt wurde. Alternativ müsste dieser Arzneistoff von Risikopatienten ohne gravierende Nebenwirkungen als Dauermedikation eingenommen werden können.

Im Folgenden werden zwei Wirkansätze vorgestellt, welche in der Forschung bereits vielversprechende neuroprotektive Eigenschaften aufwiesen: Bilobalid, ein aktiver Inhaltsstoff des *Ginkgo biloba* Baumes und die „Anaplerotische Diät“, welche das Öl Triheptanoin als alternativen Energielieferanten zu Glucose verwendet.

1.4.1 Neuroprotektion durch Bilobalid

Der *Ginkgo biloba* Baum, aus der Ordnung der Ginkgoales, ist botanisch gesehen ein zweihäusiger Nacktsamer (siehe Abbildung 1.5). Dies bedeutet, dass die männlichen Samenanlagen in Form von „hängenden Kätzchen“ und die unscheinbaren weiblichen Blütenstände an unterschiedlichen Pflanzen zu finden sind. Die Blätter des Ginkgo-Baumes sind zweilappig, woher der Namenszusatz „*biloba*“ kommt (Dörken 2013, Zhou 2009).

Ursprünglich aus Ostasien stammend, ist der Ginkgo-Baum in der chinesischen Literatur erstmals durch den chinesischen Kaiser Shen Nung im Jahre 2697 v. d. Z. erwähnt (Caesar 2009). Zunächst wurden jedoch nur die Nüsse des Ginkgo-Baumes als Nahrungsmittel verwendet. Später fanden die Ginkgo-Samen in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) ihren Platz. Nach Europa kam der *Ginkgo biloba* im Jahre 1690 durch den Botaniker Engelbert Kaempfer, der 1712 sein Hauptwerk „Fünf Bücher über politische, naturkundliche und medizinische Besonderheiten in fremden Ländern“ publizierte (siehe Abbildung 1.6).

1 Einleitung



Abbildung 1.5: Die zweilappigen Blätter (links) und die Früchte (rechts) des Ginkgo-Baumes (www.fotocommunity.de).



Abbildung 1.6: *Ginkgo biloba* Skizze, angefertigt von Engelbert Kaempfer in seinem 1712 erschienenen Hauptwerk „Fünf Bücher über politische, naturkundliche und medizinische Besonderheiten in fremden Ländern“ (*British Library Manuscripts Catalogue*).

Der Franzose Emmerich Adrine Maury machte 1933 erstmalig auf das Blätterextrakt des Ginkgo-Baumes aufmerksam. Diese Studien wurden von Willmar Schwabe jun. aufgegriffen und weiterentwickelt. Im Jahre 1965 wurde in Deutschland das erste Ginkgo-Präparat „Tebonin“ (als Tropfen oder Dragees) von der Firma Dr. Willmar Schwabe,

Karlsruhe, zugelassen. In den 60er und 70er Jahren wurde der Extrakt der Ginkgo-Blätter bis zum heute gebräuchlichen Spezialextrakt EGb 761 weiterentwickelt. Der Ginkgo-Trockenextrakt erhielt 1994 eine positive Kommission E Monographie und wurde im Jahre 2000 in das Deutsche Arzneibuch aufgenommen (Caesar 2009).

Der Spezialextrakt EGb 761 enthält 22-27% Flavonglycoside, 5-7% Terpenlactone, darunter 2,8-4,3% Ginkgolide A,B,C und 2,6-3,2% Bilobalid. Außerdem dürfen nicht mehr als 5 ppm Ginkgolsäuren enthalten sein, da diese Allergien auslösen können (Kommission E Monographie, BAnz. Nr. 133 vom 19.07.1994). Eingesetzt werden Ginkgo-Präparate zur Verbesserung der Gehirnleistung bei Demenz oder zur Durchblutung des Innenohres bei Tinnitus (www.tebonin.de, Kanowski et al. 1996, Green und DeKosky 2006, Janssens et al. 2010).

Christen und Maixent 2002, DeFeudis und Drieu 2000 und Müller et al. 2009 geben einen ausführlichen Überblick über bisherige Studien und klinische Anwendungen von EGb 761. Die durchblutungsfördernde Wirkung wird durch eine bessere Verformbarkeit der Erythrocyten und eine Abnahme der Blutviskosität erklärt und wird auf die enthaltenen Ginkgolide zurückgeführt. Besonders Ginkgolid B soll durch Antagonisieren des Plättchenaktivierenden Faktors (PAF) eine „blutverdünnende“ Wirkung aufweisen. So sollen kleine, cerebrale Gefäße besser durchblutet werden (Smith et al. 1996, Kloft und Kellermann 2009, Müller und Juretzek 1999).

Zudem wurde in vielen Studien auf die Verminderung von oxidativem Stress durch die Gabe von EGb 761 geschlossen. Diese Eigenschaft wird den enthaltenen Flavonoiden zugeschrieben (Sastre et al. 1998, Eckert et al. 2003). Gerade in den Mitochondrien können durch die Atmungskette sehr viele reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen. EGb 761 weist laut einigen experimentellen Studien eine Stabilisierung der Mitochondrien und damit anti-apoptotische Eigenschaften auf (Eckert et al. 2005, Smith et al. 2002, Abdel-Kader et al. 2007). Studien von Mdzinarishvili et al. 2012 zeigten außerdem eine deutliche Reduktion der Ödembildung und Neurodegeneration nach Ischämie durch eine vorherige Behandlung mit EGb 761 in Mäusen.

Zu etwa 3% kommt der aktive Inhaltsstoff Bilobalid im EGb 761-Extrakt vor. Chemisch gesehen ist das Molekül Bilobalid ein tetracyclisches Sesquiterpenlacton mit einer für Naturstoffe seltenen tertiären Butyl-Gruppe (siehe Abbildung 1.7).

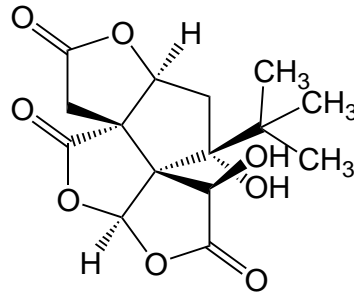


Abbildung 1.7: Strukturformel von Bilobalid.

Studien weisen darauf hin, dass Bilobalid den Großteil der neuroprotektive Eigenschaften des EGb 761-Extraktes ausmacht. Krieglstein et al. 1995 beobachteten eine Verminderung der Infarktfläche durch Bilobalid sowie ein Schutz vor ischämisch induzierter glutamaterger Neurotoxizität. Somit wurde der Wirkstoff Bilobalid auch in der Schlaganfall-Forschung interessant. Einen guten Überblick bisheriger Forschungsarbeiten geben die Zusammenfassungen von DeFeudis 2002 und Ahlemeyer und Krieglstein 2003.

Die Arbeitsgruppe um Klein beschäftigt sich seit vielen Jahren mit Bilobalid und dessen möglichem Wirkmechanismus (siehe Abbildung 1.8). Ausgangspunkt war die Beobachtung, dass Bilobalid den Abbau von Phospholipid-Membranen und damit den Phospholipase A₂ (PLA₂) aktivierten Cholin-Anstieg nach Ischämie verhindert (Klein et al. 1997, Weichel et al. 1999). Die PLA₂ wird durch Einstrom von Ca²⁺ in die Zellen aktiviert, jedoch zeigte Bilobalid keinen Einfluss auf Calcium-Ströme (Klein et al. 2003) und nur eine leichte Blockade des NMDA-Rezeptors, welcher als Ca²⁺-Kanal dient (Chatterjee et al. 2003). Dafür verringerten die Aminosäuren Glycin und GABA die Bilobalid-Wirkung signifikant und die Anwesenheit großer Mengen an Chlorid-Ionen vermochte den neurotoxischen Glutamat-Anstieg während einer Ischämie zu vermindern (Klein et al. 2003). Dies führte zu detaillierten Studien über die Interaktionen von Bilobalid mit Glycin- und GABA_A-Rezeptoren, welche Ionenkanäle für Cl⁻ sind. Keiner der genannten Rezeptoren konnte jedoch als primäres Target von Bilobalid identifiziert werden (Kiewert et al. 2007, Kiewert et al. 2008).

Die nach Ischämie in die Zelle strömenden Ca²⁺- und Cl⁻-Ionen bewirken einen osmotisch bedingten Wassereinstrom, wodurch die Zellen anschwellen. Auch dieser Prozess kann zum Abbau von Biomembranen führen. Zusätzlich steigt durch die zellulären Ödeme der intracranielle Druck.

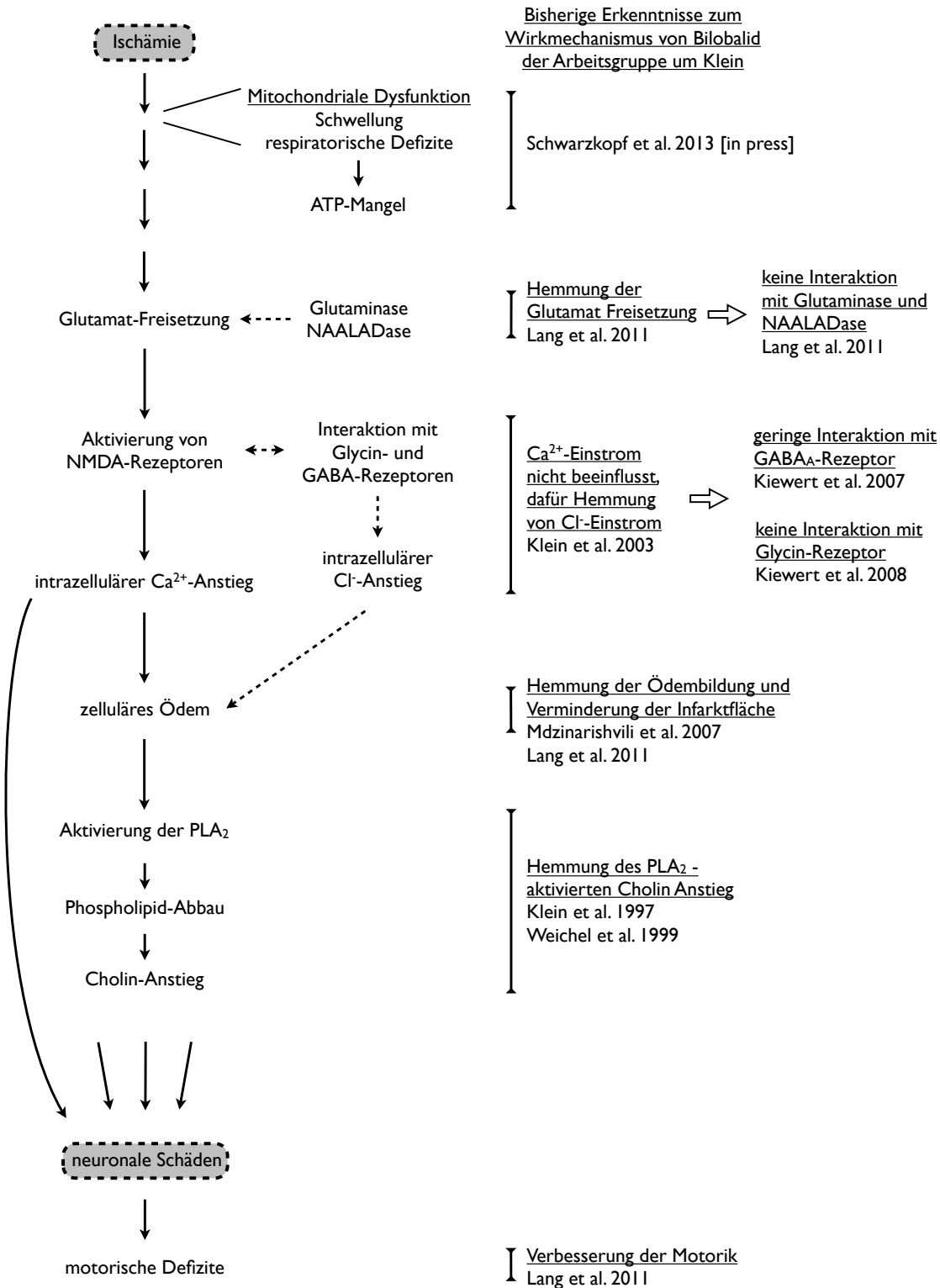


Abbildung 1.8: Auf der linken Seite ist die zelluläre Pathobiologie nach Ischämie in vereinfachter Form dargestellt. Rechts sind die bisherigen Erkenntnisse der Arbeitsgruppe um Klein zum Wirkmechanismus von Bilobalid aufgezeigt.

1 Einleitung

In Studien von Mdzinarishvili et al. 2007 zeigte Bilobalid eine Verminderung von zellulären Ödemen und eine Verringerung der Infarktfläche nach Ischämie *in vivo*. Die Arbeit von Lang et al. 2011 knüpfte an diese Beobachtungen an. Das motorische Verhalten der Versuchstiere nach permanentem Schlaganfall wurde durch Bilobalid verbessert. Zudem verminderte die Gabe von Bilobalid den extrazellulären Anstieg des neurotoxischen Transmitters Glutamat nach Ischämie signifikant. Die Untersuchung zweier Enzyme, welche an der Glutamat-Bildung beteiligt sind (Glutaminase und NAALADase) ergab kein Interaktionspotential mit Bilobalid.

Bilobalid besitzt auch eine positive Wirkung auf die mitochondriale Energiegewinnung nach Ischämie. Janssens et al. 2000 führten Fütterungsstudien mit Bilobalid (1,6 mg/Tag) an Ratten durch. Eine Ischämie wurde durch 15-minütiges Ruhen des entnommenen Gehirns induziert. Anschließend wurde in isolierten Mitochondrien die Aktivität der Enzyme der mitochondrialen Atmungskette bestimmt. Bilobalid verminderte den Abfall der respiratorischen Aktivität besonders von Komplex I und III der Atmungskette. Chandrasekaran et al. 2001 beobachteten einen Bilobalid-Schutz vor ischämie-induzierter Verminderung der mRNA von Cytochrom-c-Oxidase, dem Komplex IV der Atmungskette.

Schlussendlich ist noch eine wichtige pharmakokinetische Studie von Lang et al. 2010 zu nennen. In dieser wurde die Permeabilität von Bilobalid durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) untersucht. Es wurde gezeigt, dass eine Gabe von Bilobalid (10mg/kg i.p.) bei normaler Durchblutung innerhalb von 40 min zu wirksamen Konzentrationen von 19,2 pg/µl im Extrazellularraum des Hirnes führt. Ähnliche Konzentrationen wurden bei intraperitonealer Gabe eine Stunde vor Ischämie gemessen. Wurde Bilobalid nach Schlaganfall verabreicht, so erreichten nur etwa 1,8 pg/µl Bilobalid das Zielgewebe. Dieser Abfall auf etwa 10 % des Ausgangswertes ist durch die ischämisch bedingte Minderdurchblutung des Hirngewebe zurückzuführen. Demnach ist es nicht verwunderlich, dass die Bilobalid-Gabe in allen bisher vorgestellten Studien mindestens eine Stunde vor der Ischämie erfolgte.

Die in diesem Kapitel zusammengefassten Forschungsarbeiten zeigen deutlich, dass Bilobalid ein neuroprotektives Potential besitzt. Die Aufklärung des Wirkmechanismus könnte mögliche Targets zur Stabilisierung der geschädigten Hirnzellen identifizieren. Der Wirkstoff Bilobalid oder dessen chemisch modifizierte Weiterentwicklungen könnten neue medikamentöse Ansätze zur Prävention eines ischämischen Schlaganfalls liefern. Bilobalid ist demnach zukunftsweisend in der Schlaganfall-Therapie.

1.4.2 Anaplerotische Diät

Der Begriff Anaplerose stammt aus dem Griechischen (*anaplerosis*) und bedeutet „Ergänzung“. In der Biochemie sind mit dem Begriff Anaplerose Auffüllreaktionen verbunden. Alle cyclisch ablaufenden Stoffwechselprozesse würden zum Stillstand kommen, würden die Kreisläufe nicht durch anaplerotische Reaktionen neu „befüllt“ werden. Eine besondere Bedeutung hat dieser Vorgang im Citratcyclus (auch Krebs-Cyclus). Acetyl-CoA als Endprodukt der Glycolyse und der beta-Oxidation bringt den Kreislauf in Gang, indem es die Ausgangsreaktion von Oxalacetat zu Citrat ermöglicht (Owen et al. 2002, Doenecke et al. 2005).

Wie in Abbildung 1.9 dargestellt wird Citrat durch mehrere enzymatische Reaktionen letztendlich wieder in Oxalacetat gespalten. In diesem Kreislauf entsteht Energie in Form von $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 . Diese Reduktionsäquivalente werden über die mitochondriale Atmungskette zu ATP umgewandelt. Ohne Verlust von Intermediaten regeneriert sich der Cyclus demnach selbst.

Der Citratcyclus dient aber nicht nur der Energiegewinnung, sondern kann auch Ausgangssubstanzen für andere Stoffwechselreaktionen, wie Aminosäuresynthese, bereitstellen (Gest 1987, Owen et al. 2002). Wie in Abbildung 1.9 dargestellt, werden beispielsweise aus Oxalacetat und alpha-Ketoglutarat durch Transaminierung die Aminosäuren Glutamat und Aspartat gebildet. Dadurch gehen dem Citratcyclus Intermediate verloren, was als Kataplerose bezeichnet wird (Brunengraber und Roe 2006).

Um den durch Kataplerose entstandenen Mangel an Intermediaten auszugleichen, muss es einen Mechanismus geben, der die fehlenden Substanzen wieder zuführt und den Kreislauf weiterhin gewährleistet. Dies sind die anaplerotischen Reaktionen. Der Begriff der Anaplerose wurde erstmal von Kornberg 1965 geprägt. Das wichtigste anaplerotische Enzym ist die Pyruvat-Carboxylase. Durch Carboxylierung von Pyruvat entsteht Oxalacetat direkt im Mitochondrium. Ebenso kann durch die Umkehrung der Transaminierung aus den Aminosäuren Glutamat und Aspartat der Kreislauf anaplerotisch aufgefüllt werden (Brunengraber und Roe 2006, Abbildung 1.9).

Im Gehirn werden große Mengen der Neurotransmitter Glutamat und gamma-Aminobuttersäure (GABA) benötigt. Der Citratcyclus liefert den für die Transaminierungsreaktion benötigten Ausgangsstoff alpha-Ketoglutarat. In neuronalen Zellen würde der Citratcyclus folglich weniger alpha-Ketoglutarat besitzen. Es würde zu einer verminderten Energieproduktion und einem Mangel an ATP kommen.

1 Einleitung

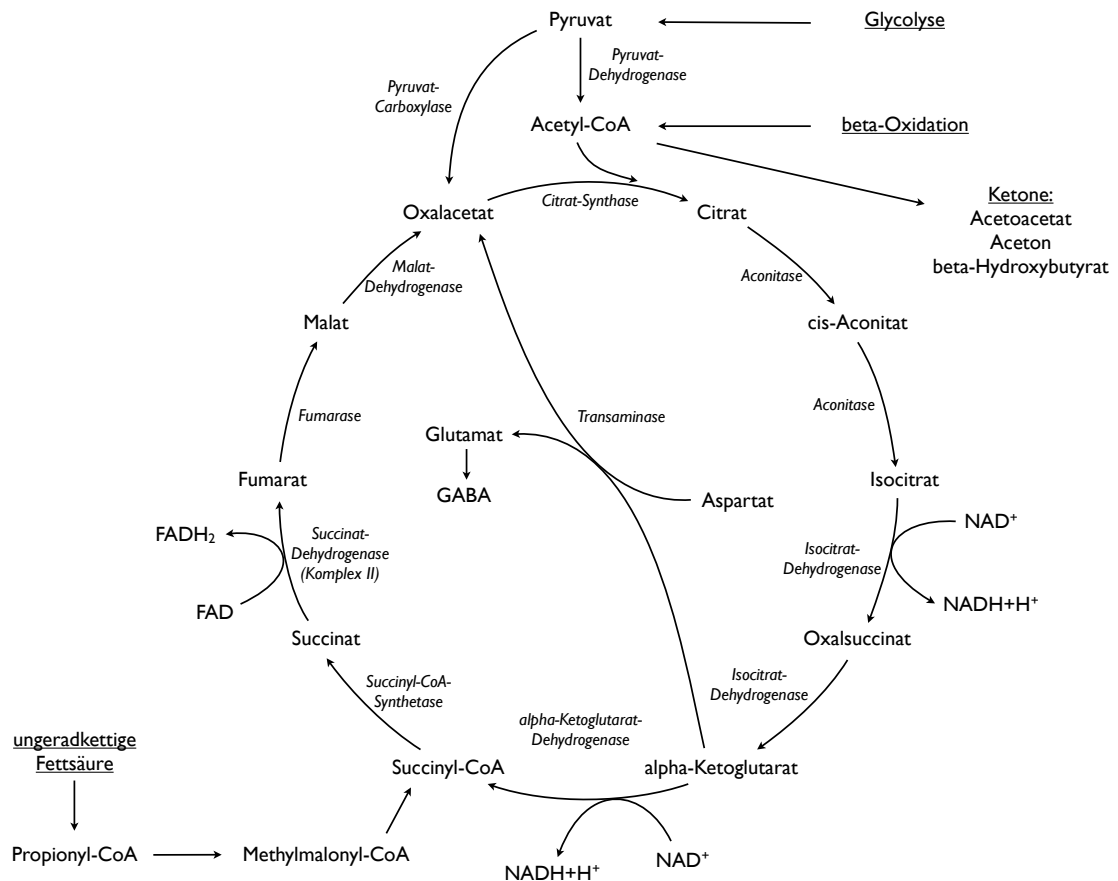


Abbildung 1.9: Der Citratcyclus. Das aus der Glycolyse stammende Pyruvat wird von der Pyruvat-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA umgewandelt. Acetyl-CoA kann außerdem durch beta-Oxidation aus Fettsäuren gewonnen werden. Zum Transport in andere Gewebe wird Acetyl-CoA zu Ketonkörpern metabolisiert. Die Citrat-Synthase bildet aus Acetyl-CoA und Oxalacetat das Schlüsselmolekül des Citratcyclus: Citrat. Durch die Umwandlung in verschiedene Intermediate wird Energie in Form von $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 gebildet. Die Intermediate des Citratcyclus können auch als Substrate dienen. So werden zum Beispiel aus Oxalacetat und alpha-Ketoglutarat Aminosäuren gebildet. Um eine Verarmung des Cyclus an Intermediaten zu verhindern, gibt es sogenannte anaplerotische (auffüllende) Reaktionen. Die Pyruvat-Carboxylase bildet Oxalacetat direkt aus Pyruvat. Succinyl-CoA kann aus dem Abbau von ungeradkettigen Fettsäuren gewonnen werden, welche dem Körper jedoch nur nach spezieller Diät ausreichend vorliegen.

Damit dies ausgeglichen wird, ist die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in Gliazellen sehr hoch. Zusätzlich wird freigesetztes Glutamat aus dem synaptischen Spalt aufgenommen

und als alpha-Ketoglutarat wieder dem Citratcyclus zugeführt. GABA wird ebenfalls zurück in den Citratcyclus geschleust, in Form von Succinyl-CoA (Hassel 2001, Sonnewald et al. 1993, McKenna et al. 1996).

Während einer Ischämie steigen die extrazellulären Konzentrationen an Glutamat so enorm an (siehe Kapitel 1.3), dass das anaplerotische System des Citratcyclus hierdurch an seine Grenzen stößt. Die neuronalen Zellen können das für die Glutamat-Produktion in großen Mengen abgeführte alpha-Ketoglutarat des Citratcyclus nicht vollständig ausgleichen. Die Folge ist ein Energiemangel. An dieser Stelle kommen anaplerotische Therapieansätze ins Spiel. Diese würden dem Citratcyclus vermehrt alternative Substrate, neben Acetyl-CoA, anbieten und so eine bessere Energiegewinnung ermöglichen (Roe und Mochel 2006). Die im Folgenden näher erläuterte anaplerotische Triheptanoin-Diät bedient sich hoher Dosen ungeradkettiger Fettsäuren als Energiequelle.

Triheptanoin

Triheptanoin, auch Glyceroltriheptanoat, ist ein Öl, das bisher in Kosmetika und zur Markierung von Fleisch verwendet wird. In der Kosmetikindustrie ist es beliebt, da es eine „nichtfettende Ölkomponente natürlichen Ursprungs, mit hohem Spreitwert, niedriger Viskosität, guter Hautsensorik und ausgezeichneter Hautverträglichkeit“ darstellt (www.dr-straetmans.de). Die Firma Dr. Straetmans Chemische Produktion GmbH (Hamburg) patentierte daher den Stoff Triheptanoin als Grundlage für Hautreinigungsöle und Sonnenschutzprodukte (Europäische Patentschrift EP 1 723 944 B1 vom 04.04.2007).

Außerdem ist Triheptanoin seit dem 1. Juli 2008 der offizielle EU-Grundstoff zur Markierung von Risikofleisch und Schlachtabfällen (Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 und 1432/2007 des Europäischen Parlaments vom 5.12.2007). Triheptanoin ist kostengünstig, farb- und geruchlos, ungiftig und nicht abwaschbar. Es wird mit einem Farbstoff angerührt (>250 mg pro kg Fett) und markiert verarbeitete Erzeugnisse, welche „einer vorherigen thermischen Behandlung zur Sterilisierung bei einer Kerntemperatur von mindestens 80 °C unterzogen wurden und anschließend vor Rekontamination geschützt werden“.

Die chemische Strukturformel von Triheptanoin ist in Abbildung 1.10 gezeigt. Es besteht aus Glycerol, an welches drei Heptansäuren (C7) gebunden sind (Kinman et al. 2006, Ataide et al. 2009).

1 Einleitung

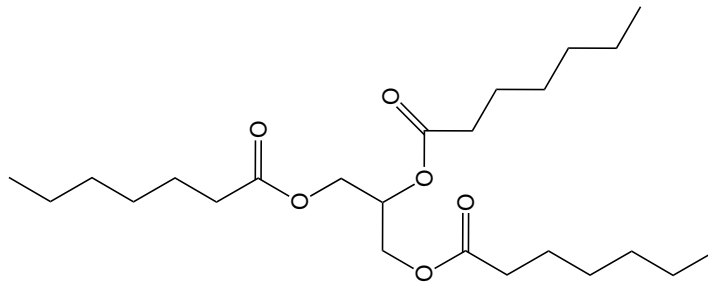


Abbildung 1.10: Die Strukturformel von Triheptanoin (Glyceroltriheptanoat).

Im Darm werden die ungeradkettigen Fettsäuren des Triheptanoins zunächst durch Lipasen von Glycerol abgespalten. Im Anschluss erfolgt in der Leber die beta-Oxidation der Fettsäuren (Doenecke et al. 2005, Lehninger et al. 1998). Hierbei werden pro Cyclus zwei C-Atome in Form von Acetyl-CoA abgespalten (Metabolismus siehe Abbildung 1.11). Aus einer Heptansäure (C7) entsteht also zunächst ein Molekül Acetyl-CoA (C2) und der Rest Pentansäure (C5). In einem weiteren Schritt der beta-Oxidation wird aus dem C5-Körper ein Moleküle Acetyl-CoA (C2) und ein Molekül Propionyl-CoA (C3) gebildet (siehe Abbildung 1.11 und Willis et al. 2010).

Zum Transport in andere Gewebe wird Acetyl-CoA in die Ketonkörper Aceton (C3), Acetoacetat (C4) oder beta-Hydroxybutyrat (C4) umgewandelt. Propionyl-CoA bildet die C5-Ketone beta-Hydroxypentanoat und beta-Ketopentanoat, welche hauptsächlich in Herz, Gehirn und Niere für die Energiegewinnung genutzt werden (Ardawi und Newsholme 1982, Deng et al. 2009, Brunengraber und Roe 2006). Aceton wird nur in geringen Mengen gebildet und abgeatmet. Die restlichen genannten Ketone werden mit dem Blut in andere Gewebe transportiert. Sie können die Blut-Hirn-Schranke (BHS) durch Monocarboxylase-Transporter überwinden. Acetyl-CoA dient als Ausgangsprodukt des Citratcyclus. Propionyl-CoA wird über Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA umgewandelt. Letzteres wird als anaplerotische Reaktion dem Citratcyclus zugeführt und dient als direktes Substrat von Komplex II der Atmungskette, der Succinat-Dehydrogenase. Succinyl-CoA trägt damit entscheidend zur Energiegewinnung bei (Abbildung 1.9, Doenecke et al. 2005, Lehninger et al. 1998).

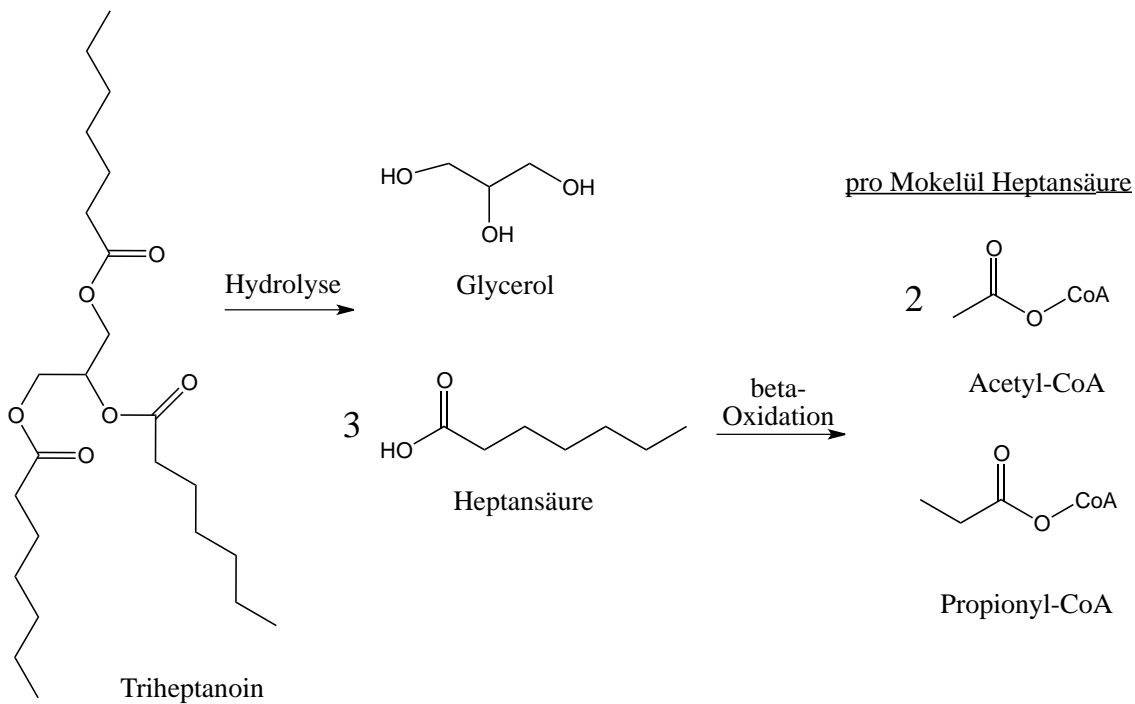


Abbildung 1.11: Im ersten Schritt des Abbaus von Triheptanoin erfolgt eine Hydrolyse: Glycerol wird von den drei Heptansäuren getrennt. Über beta-Oxidation entstehen aus einem Molekül Heptansäure zwei Moleküle Acetyl-CoA und ein Molekül Propionyl-CoA.

Therapeutische Anwendung

Viele Studien beschäftigten sich mit Triheptanoin im Zusammenhang mit Stoffwechselstörungen. So wurden durch die Gabe von Triheptanoin entscheidende Verbesserungen bei Pyruvat-Decarboxylase-Mangel Typ B (Mochel et al. 2005, Roe und Mochel 2006), Carnitin-Palmitoyltransferase-Defekt (Roe et al. 2008), adulter Polyglucosankörper-Erkrankung (Roe et al. 2010) und bei Störungen der mitochondrialen Fettsäureoxidation (Spiekerkoetter et al. 2010) erreicht. Ataide et al. 2009 bestätigten die gute Verträglichkeit von Triheptanoin: Eine chronische Einnahme ist nicht toxisch.

Jedoch gibt es nur einige wenige Studien, in denen die Beteiligung von Triheptanoin am Energiestoffwechsel des Gehirns untersucht wurde. Mochel et al. 2010 beschäftigten sich mit dem therapeutischen Einsatz von Triheptanoin bei Chorea Huntington. Einer Versuchsgruppe von 6 Huntington-Patienten wurde über 4 Tage eine Triheptanoin-reiche Diät (1 g/kg/Tag) verabreicht um den Energiestoffwechsel in Gehirn und Peripherie zu

1 Einleitung

unterstützen. Als Endpunkte dienten motorische Tests sowie der Muskel-pH-Wert, welche durch Triheptanoin bereits nach 4 Tagen signifikant verbessert wurden.

Aso et al. 2012 beobachteten eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten nach Gabe einer ketogenen Diät mit Triheptanoin-Zusatz über drei Monate. Diese Ergebnisse wurden in einem Alzheimer-Modell an APP/PS1-Mäusen gewonnen. Antientzündliche Befunde sowie eine Hochregulation der ROS-Abwehrmechanismen wurden ebenfalls dem Triheptanoin-Zusatz zugeordnet.

Von der Arbeitsgruppe um Borges wurde der Einfluss von Triheptanoin auf die Häufigkeit und den Schweregrad von epileptischen Anfällen untersucht (Willis et al. 2010, Borges und Sonnewald 2012, Thomas et al. 2012, Kim et al. 2013). Triheptanoin wurde als Diät über drei Wochen an Mäuse verfüttert (35 % der Kalorien). Die Gabe von Triheptanoin bewirkte eine deutliche Senkung der Krampfschwelle nach kontinuierlicher Stimulation durch Elektroden im Gehirn und im chronischen Status nach Pilocarpin-induzierter Epilepsie (Willis et al. 2010).

Metabolisch lässt sich der antikonvulsive Effekt von Triheptanoin laut Borges und Sonnewald 2012 mit einem Ausgleich des Ungleichgewichts an Neurotransmittern erklären. Während eines epileptischen Anfalls werden große Mengen an GABA und besonders an exzitatorischem Glutamat ausgeschüttet. Zur Synthese von Glutamat wird alpha-Ketoglutarat aus dem Citratcyclus benötigt. Wird dieses nicht ausreichend substituiert, fehlt es anschließend im Energiegewinnungsprozess (Abbildung 1.9). Triheptanoin könnte (wie bereits oben beschrieben) durch anaplerotische Reaktion das mangelnde alpha-Ketoglutarat durch Nachliefern von Succinyl-CoA ausgleichen. Außerdem könnten gebildete Keton-Körper als weitere Energielieferanten dienen.

Dieser Ansatz könnte auch auf die metabolischen Veränderungen nach ischämischem Schlaganfall übertragen werden. Haberg et al. 2001 und Haberg et al. 2009 zeigten, dass das Neurotransmitter-Gleichgewicht von Glutamat und GABA bereits nach 30-minütiger Ischämie (MCAO) gestört ist und ein Missverhältnis zwischen Verbrauch und Angebot besteht. Außerdem stellten Brunengraber und Roe 2006 fest, dass die Schäden durch eine Reperfusion nach Ischämie zunehmen. Sie führten dies auf den Verlust an Intermediaten des Citratcyclus zurück.

In Abbildung 1.12 ist die mögliche Wirkweise von Triheptanoin während eines ischämischen Schlaganfalls zusammengefasst. Durch den Abbau von Triheptanoin werden große Mengen an Succinyl-CoA bereitgestellt. Dieses kann direkt als Substrat von Komplex II

der Atmungskette eingesetzt werden. Im Citratcyclus füllt Succinyl-CoA anaplerotisch das mangelnde alpha-Ketoglutarat auf, welches zur Glutamat-Synthese verwendet wurde. Zusätzlich könnten gebildete Keton-Körper eine Quelle für Acetyl-CoA darstellen. Somit könnte das durch den Intermediaten-Verlust entstandene Energiedefizit während einer Ischämie ausgeglichen werden.

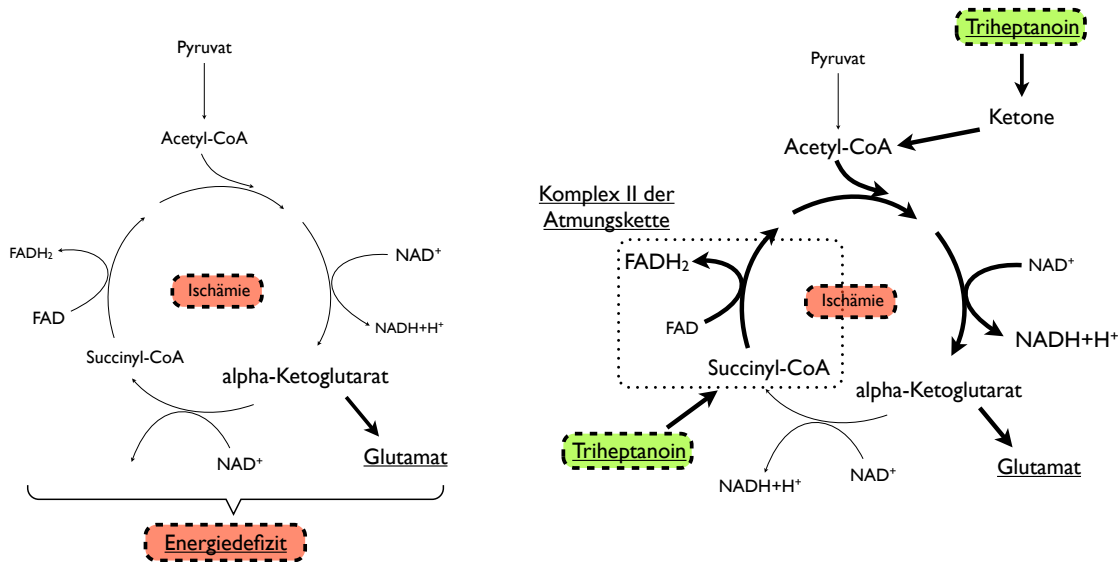


Abbildung 1.12: Anaplerotischer Wirkmechanismus von Triheptanoin. Durch eine Ischämie wird alpha-Ketoglutarat zur Bildung von Glutamat aus dem Citratcyclus abgezogen. Der Verlust von Intermediaten aus dem Citratcyclus führt zu einem Energiemangel. Triheptanoin liefert dem Citratcyclus Succinyl-CoA, was als direktes Substrat für Komplex II der Atmungskette oder zu Ausgleich des Verlustes von alpha-Ketoglutarat verwendet wird. Zusätzlich können die aus Triheptanoin gebildeten Speicher-Ketone Acetyl-CoA liefern. Auf diesem Weg wird das Energiedefizit vermindert.

Suzuki et al. 2001 führten bereits Studien zu der Wirksamkeit des Ketonkörpers beta-Hydroxybutyrat (BHB) während einer Ischämie durch. Dieser entsteht auch durch den Abbau von Triheptanoin (Kinman et al. 2006). BHB wurde als isotone Lösung 30 min vor, direkt bei oder 3 h nach Ischämie intravenös verabreicht (50 bzw. 30 mg/kg/h). Die Ischämie wurde in Mäusen durch Begasung mit Stickstoff und in Ratten durch Injektion von Kaliumcyanid induziert. Eine vorherige Behandlung mit BHB verlängerte die Überlebenszeit der Tiere nach Ischämie signifikant. In einer weiteren Versuchsreihe wurde eine globale Ischämie durch bilateralen Verschluss beider Halsschlagadern (*bilateral common carotid artery occlusion*, BCCAO) ausgelöst. Die Gabe von BHB direkt bei

1 Einleitung

BCCAO ebenso wie die Gabe von BHB 3 h nach BCCAO verminderten den cerebralen Wassergehalt und somit die Ödembildung. Außerdem wurden durch die BHB-Behandlung die ischämisch-bedingt niedrigen ATP-Spiegel signifikant erhöht. Laut den Autoren könnte eine Behandlung mit BHB das therapeutische Zeitfenster nach ischämischem Schlaganfall verlängern.

1.5 Das MCAO-Modell in der Maus

Es gibt verschiedene experimentelle Modelle für einen humanen Schlaganfall. Meist sind *in vitro*-Tests die erste Wahl. Diese sind einfach durchzuführen und benötigen keine spezielle Erlaubnis, wie es bei Tierversuchen der Fall ist. Eine Ischämie würde in Zellkultur durch Begasung mit Stickstoff (95% N₂, 5% CO₂) und dem Tausch auf ein glucosefreies Nährmediums induziert werden. Diese Methode wird als OGD (*oxygen-glucose-deprivation*) bezeichnet. Sie wurde ausführlich von Goldberg und Choi 1993 beschrieben (siehe auch Mdzinarishvili et al. 2007, Grabb et al. 2002, Ruiz-Meana et al. 2006).

Auch *in vivo* gibt es unterschiedliche Ansätze des experimentellen Schlaganfalls. Die Modelle werden zunächst unterteilt in „permanenter“ oder „transienter“ Verschluss einer Hirnarterie (Mao et al. 1999). Im permanenten Modell wird die Okklusion bis zum Ende des Versuches aufrecht erhalten. Im transienten Modell wird der Verschluss nach einer definierten Zeit wieder gelöst (je nach Versuchsziel und Tiermodell meist zwischen 30 min und 3 h). Dies erlaubt eine Reperfusion des dahinter liegenden Gewebes (Arumugam und Mattson 2006, Mao et al. 1999).

Der Vorteil des transienten Modells liegt in der großen resultierenden Penumbra (Howells et al. 2010). Die Penumbra ist das Randgebiet des ischämischen Gewebes nach Schlaganfall, in welchem die Hirnzellen nur leicht geschädigt sind. Die Penumbra ist auch das Zielgebiet für neuroprotektive Studien. Ein ideales Neuroprotektivum würde die Hirnzellen in der Penumbra stabilisieren und eine Apoptose verhindern. Die Penumbra grenzt sich ab von dem „Core“, dem Zentrum des Schlaganfalls (siehe Abbildung 1.13). Das Core ist für neuroprotektive Studien weitestgehend uninteressant. Hier ist die Schädigung der Hirnzellen so weit fortgeschritten, dass nekrotische Prozesse bereits in Gang sind (Lipton 1999). Diese können durch ein Neuroprotektivum nicht mehr stabilisiert oder

aufgehalten werden. Folglich werden Studien mit neuoprotektivem Schwerpunkt vermehrt im transiente Modell durchgeführt (Howells et al. 2010).

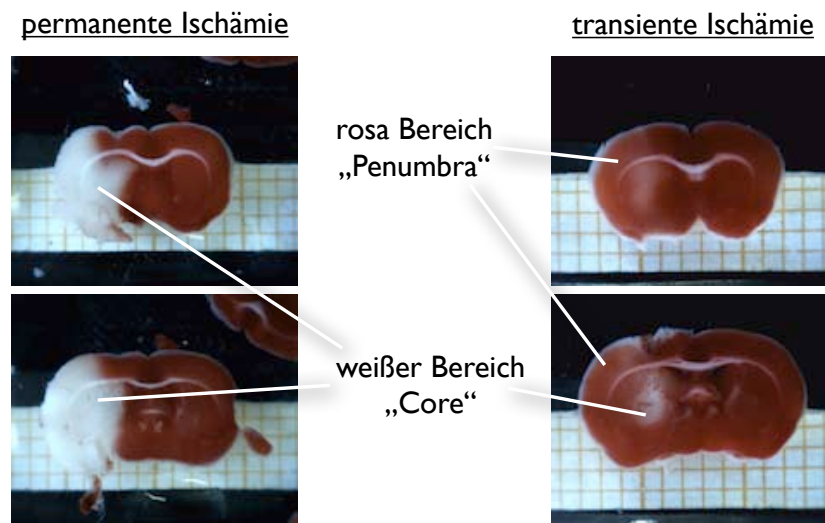


Abbildung 1.13: Unterschiedlich stark geschädigte Bereiche nach permanentem und 60-minütigem transientem Schlaganfall: Das „Core“ stellt das nekrotische Zentrum der Ischämie dar, während die Zellen in der rosa gefärbten „Penumbra“ nur leicht geschädigt sind.

Ein Schlaganfall-Modell arbeitet bei offener Schädeldecke direkt am Gehirn. Eine Hirnarterie (meist die mittlere Cerebralarterie, MCA) wird hierbei durch Kraniektomie freigelegt und mit einem Faden oder Clip verschlossen (Crowell et al. 1981, O'Brien und Waltz 1973). In diesem Fall kann sie nach definierter Zeit zur Reperfusion wieder eröffnet werden. Wird die Arterie verödet, so ist nur eine permanente Ischämie möglich (Tamura et al. 1981, Colak et al. 2011). Dieses Modell hat den Vorteil, dass die Okklusion durch das direkte Verschließen eine hohe Reproduzierbarkeit aufweist (Howells et al. 2010).

In einem anderen Modell wird die Okklusion durch ein Filament ausgelöst, welches über die Halsschlagader bis in das Gehirn geschoben wird und dort die mittlere Cerebralarterie verschließt (*middle cerebral artery occlusion*, MCAO). Die mittlere Cerebralarterie (MCA) ist eine Endarterie, welche das Striatum versorgt. Das Core nach einer MCAO liegt demnach im Striatum, die Penumbra weitet sich in Hippocampus und Cortex aus (Kiewert et al. 2010).

Die Methode wurde erstmals von Koizumi et al. 1986 beschrieben. Das Einführen des Filaments erfolgte hier noch direkt über die Halsschlagader. Operativ bedeutet dies, dass

1 Einleitung

das Filament zwar im Gehirn die MCA verschließt, die Halsschlagader (*Arteria carotis communis*, ACC) jedoch auch während der gesamten Ischämie verschlossen bleiben muss. Demnach ist die Ischämie nicht nur lokal auf das Striatum begrenzt. Vielmehr wird eine zusätzliche hemicranielle Ischämie durch den Verschluss der ACC induziert. In einer Weiterentwicklung nach Longa et al. 1989 wurde die *Arteria carotis externa* (ACE) als „Hilfsarterie“ zum Einführen des Filaments verwendet (genaue Beschreibung der Methode siehe Kapitel 2.7). Dies ermöglicht das Wiedereröffnen der ACC nach Operation und erzeugt somit einen wesentlich präziseren ischämischen Bereich. Das MCAO-Modell bietet den Vorteil, dass eine Reperfusion einfach über Zurückziehen des Fadens ermöglicht werden kann. Zudem findet der operative Eingriff nur im Bereich der Halsschlagader statt; das Schädeldach bleibt geschlossen.

Eine Übersicht über die verschiedenen MCAO-Modelle mit experimentellen Anleitungen ist von O’Neill und Clemens 2000 publiziert worden. Vor- und Nachteile der beschriebenen Methoden werden unter anderem diskutiert von Howells et al. 2010, Liu und McCullough 2011, Laing et al. 1993, Dittmar et al. 2003, Kuraoka et al. 2009 und Weinachter et al. 1990.

Ein entscheidender Faktor für das Gelingen des operativen Eingriffes der MCAO ist das Filament selbst. Der Faden ist meist aus Nylon oder Polyamid gefertigt (Abrahám et al. 2002). Beschaffenheit und Größe des „Köpfchens“ bestimmen das Ausmaß des Schlaganfalls. Wichtig ist, dass das Filament keinerlei scharfe Kanten aufweist, um beim Gleiten durch die Arterie keine Endothelschäden zu verursachen. Diese könnten eine unkontrollierte Thrombenbildung nach sich ziehen. Abhilfe schafft ein Überzug aus Silicon, welcher das Filament besser durch die Arterien gleiten lässt (Schmid-Elsaesser et al. 1998, siehe Beispielfilament der Firma Docol (MA, USA) in Abbildung 1.14).

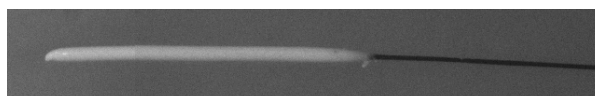


Abbildung 1.14: Nylon-Filament der Firma Docol (MA, USA) mit Silicon-Beschichtung von 2-3 mm Länge und $0,23 \pm 0,02$ mm Durchmesser.

Die mit Silicon beschichteten Fäden verschließen auch einen längeren Bereich im Arterienring des Gehirns. Besitzt das Filament dahingegen nur ein kleines Köpfchen, so muss dieses korrekt im Ursprung der MCA positioniert sein, um diese zu verschließen (siehe Abbildung 1.15). Filamente mit Überzug sind daher wesentlich einfacher zu platzieren

und sorgen für eine bessere Vergleichbarkeit der induzierten Schlaganfallfläche. In alten und multimorbiden Tieren scheinen Filamente mit Poly-L-Lysin-Beschichtung Vorteile zu bringen (Spratt et al. 2006, Belayev et al. 1996).

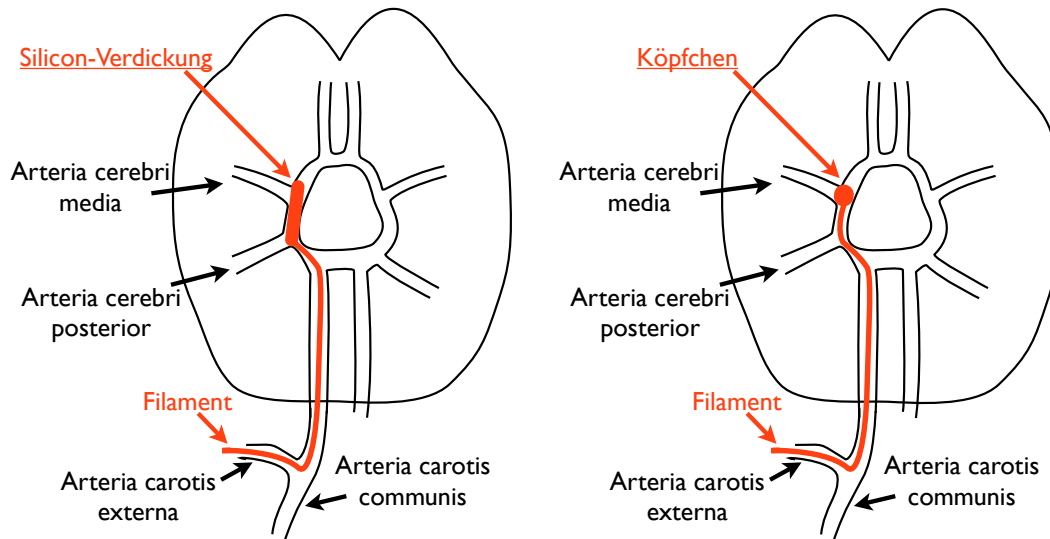


Abbildung 1.15: Schematische Darstellung des Verschlusses der mittleren Cerebralarterie (MCA). Vergleichend ist die Okklusion mit einem Silicon-beschichteten Filament (links) zu einem Filament mit kleinem Köpfchen (rechts) gezeigt.

Das dritte häufig in Studien verwendete Schlaganfall-Modell ist den tatsächlich vorkommenden Ereignissen im menschlichen Körper am ähnlichsten: Im Thrombus-Modell wird ein Blutgerinnsel künstlich erzeugt und durch den Arterienring im Gehirn in die MCA geleitet. Dieses Modell wurde erstmals von Hill et al. 1955 in Hunden beschrieben. Kudo et al. 1982 entwickelten das Modell anschließend in Ratten. Zunächst wurden die hergestellten Thromben in die ACC gespritzt. Die resultierenden Schlaganfälle waren variabel im Ausmaß und des betroffenen Hirnbereiches. Daher folgten Weiterentwicklungen in der Gerinnselgröße und dem Ort der Injektion, die zu besserer Steuerbarkeit des Thrombus führten (Dinapoli et al. 2006, Wang et al. 2001, Toomey et al. 2002). Werden die Thromben direkt über einen Katheter in die MCA verabreicht, so ist die Steuerbarkeit am besten (Zhang et al. 1997). Trotzdem bleibt das Problem der Spontanbildung neuer Thromben und die Variabilität in der Reperfusionzeit nach Gabe von rt-PA (Niessen et al. 2003).

1.6 Zielsetzung

Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, gab es bereits viele Ansätze zur medikamentösen Unterstützung von Schlaganfall-Patienten. Keine dieser neu entwickelten Therapieoptionen zeigte bisher im Menschen ausreichend neuroprotektive Wirkung um die Folgen des ischämischen Schlaganfalls zu vermindern. Aus diesem Grund ist es wichtig, den Schlaganfall und Mechanismen zur Neuroprotektion weiter zu erforschen. Ziel dieser Forschungsarbeit wäre es, weitere Therapieoptionen für Risikopatienten oder sogar für akute Notfälle zu finden.

In der folgenden Dissertation wurden zwei Substanzen, Bilobalid und Triheptanoin, auf ihre neuroprotektiven Eigenschaften im ischämischen Schlaganfallmodell untersucht, um diesem Ziel näher zu kommen.

Beide Substanzen sind bereits ausreichend auf ihre Verträglichkeit untersucht worden. Bilobalid ist in Ginkgo-Trockenextrakten enthalten, welche bereits seit dem Jahre 1965 ohne bekannte gravierende Nebenwirkungen eingesetzt werden (Caesar 2009). Auch in der Kommission E-Monographie zu dem Ginkgo-Extrakt EGb 761 (BANz. Nr. 133 vom 19.07.1994) sind keine schwerwiegenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen aufgezeigt („sehr selten: Magen-Darm-Beschwerden, Kopfschmerzen, Allergien“). Triheptanoin ist bei chronische Einnahme ebenfalls gut verträglich, was Willis et al. 2010 und Ataide et al. 2009 in Mäusen bzw. Ratten aufzeigten. Auch in Humanstudien bewirkte die Einnahme einer Triheptanoin-reichen Diät keine bedeutenden Nebenwirkungen (Roe und Mochel 2006).

Eine weitere Problematik bisheriger Therapieansätze bei Schlaganfall betrifft die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke. Viele therapeutische Ansätze scheiterten in der Klinik am Erreichen des Gehirns als Wirkort. Von Lang et al. 2010 wurde in einer ausführlichen Studie die Permeabilität von Bilobalid ins Zielgewebe untersucht und belegt. Für Triheptanoin konnte die Gruppe um Borges ebenfalls ein Anfluten des wirksamen Metaboliten beta-Hydroxybutyrat (BHB) in Hirnhomogenat nachweisen (Willis et al. 2010).

Zwei wichtige Kriterien, welche ein neues Medikament zur Schlaganfall-Therapie erfüllen müsste, sind demnach bereits ausreichend für die Stoffe Bilobalid und Triheptanoin belegt worden: die Unbedenklichkeit der Einnahme und die Penetration ins Zielgewebe. Das dritte und wichtigste Kriterium galt es in dieser Dissertation weiter zu erforschen und zu belegen: die neuroprotektive Wirksamkeit.

Bisherige Studien zu Bilobalid aus der Arbeitsgruppe um Klein sind in Abbildung 1.8, Kapitel 1.4.1 aufgezeigt. Sie belegen die neuroprotektiven Eigenschaften von Bilobalid. Das primäre Target und die Wirkweise von Bilobalid konnten jedoch bisher nicht identifiziert werden. Ausgangspunkt der Untersuchungen war der durch Bilobalid signifikant verminderte Phospholipid-Abbau und daraus folgender Cholin-Anstieg (Weichel et al. 1999). Versuche, dies über die Beeinflussung von Ionenströmen (Ca^{2+} / Cl^{-}) oder zellulären Rezeptoren (NMDA-/ Glycin-/ GABA-Rezeptor) zu erklären zeigten erneut neuroprotektive Eigenschaften aber keine direkte Interaktion von Bilobalid (Klein et al. 2003, Kiewert et al. 2007, Kiewert et al. 2008). Da die bei Ischämie stark ansteigenden extrazellulären Konzentrationen des Neurotransmitters Glutamat durch die Gabe von Bilobalid deutlich gesenkt werden (Lang et al. 2011), wurde deutlich, dass das Target von Bilobalid noch früher in der biochemisch ablaufenden Kaskade zwischen Ischämie und Apoptose liegen muss. Dieser Ansatz wurde in der vorliegenden Dissertation weiter verfolgt. Als mögliche Angriffspunkte wurden mitochondriale Prozesse untersucht. Hintergrundgedanke hierbei war, dass Bilobalid einen Schutzeffekt auf Mitochondrien ausübt, so dass die mitochondriale Energiegewinnung durch eine Ischämie weniger stark eingeschränkt wird. Dies würde sowohl die verminderte Glutamat-Freisetzung als auch alle folgenden in früheren Studien beobachteten zellulären Veränderungen erklären und somit einen entscheidenden Schritt zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Bilobalid liefern.

Bei Durchsicht vorangehender Studien über Bilobalid fiel außerdem auf, dass alle bisherigen Experimente an jungen Tieren durchgeführt wurden. Durch die in Kapitel 1.2 beschriebenen Veränderungen im Alterungsprozess wird jedoch deutlich, dass das Alter in der Schlaganfall-Forschung eine entscheidende Rollen spielen muss. In der nachfolgenden Dissertation wurde daher zusätzlich ein Vergleich zwischen jungen (6-8 Wochen) und alten (18-24 Monate) Tieren durchgeführt. Diese Versuche sollten zunächst Veränderungen durch das Altern aufdecken und anschließend die neuroprotektiven Eigenschaften von Bilobalid im gealterten Tieren prüfen.

Die Idee zur Untersuchung der neuroprotektiven Eigenschaften des bisher wenig erforschten Öls Triheptanoin entstand durch die von Willis et al. 2010 durchgeführten Epilepsie-Studien. Ähnlich wie im Epilepsie-Modell gezeigt, sollte das nach Schlaganfall entstandene Ungleichgewicht des Neurotransmitters Glutamat behoben werden. Dieses wurde auf den durch die Ischämie entstandenen ATP-Mangel zurückgeführt. Durch den Abbau von Triheptanoin werden große Mengen an Succinyl-CoA bereitgestellt, welches entweder direkt als Substrat für Komplex II der Atmungskette dient oder dem Citrat-

1 Einleitung

cyclus als Intermediat zugeführt wird (Borges und Sonnewald 2012, Lehninger et al. 1998). So könnte die anaplerotische („auffüllende“) Wirkung von Triheptanoin sowohl das Energiedefizit als auch ein biochemische Ungleichgewicht nach ischämischem Schlaganfall vermindern (siehe Kapitel 1.4.2). Der entscheidende Vorteil gegenüber anderen therapeutischen Optionen liegt bei Triheptanoin in der physiologischen Wirkweise. Der Metabolismus von Triheptanoin bedient sich der normalen, zellulären Stoffwechselwege. Allein die Umstellung zur vermehrten Verwertung von kurzkettigen Lipiden (bzw. den daraus gebildeten Ketonkörpern) statt Glucose als Energiequelle bewirkt die neuroprotektiven Effekte. Würde Glucose als Energielieferant verwendet werden, benötigten die Zellen zum Abbau (Glycolyse) initiale Energie in Form von ATP (Doenecke et al. 2005, Lehninger et al. 1998). Während einer Ischämie ist diese aber nicht mehr vorhanden. Die Umwandlung von Ketonkörpern benötigt kein ATP (Borges und Sonnewald 2012). Der zusätzliche anaplerotische Ansatz über Succinyl-CoA, welcher durch die ungeradkettigen C7-Fettsäuren erreicht wird, birgt den entscheidenden Unterschied zu einer rein „Ketogenen Diät“ (Eagles 2008). In einer Triheptanoin-reichen Diät speisen die Ketone den Citratcyclus während Succinyl-CoA über die Atmungskette direkt zur Energiegewinnung beiträgt. Triheptanoin bietet demnach durch seine gute Verträglichkeit und einfache Aufnahme als präventive Diät ein enormes Potential in der Schlaganfall-Therapie. Die neuroprotektive Wirksamkeit nach einer cerebralen Ischämie soll in dieser Dissertation belegt werden.

Zusammengefasst werden in dieser Dissertation weitere Untersuchungen bezüglich des Wirkmechanismus von Bilobalid bei Ischämie mit dem Fokus auf mitochondriale Prozesse durchgeführt. Da ischämische Schlaganfälle vermehrt im Alter auftreten, wurden außerdem altersbedingte Veränderungen untersucht. Dies soll zur Aufklärung der Wirkweise von Bilobalid beitragen und die neuroprotektiven Eigenschaften von Bilobalid im Alter belegen. Zusätzlich sollen ersten Studien des anaplerotisch wirksamen Moleküls Triheptanoin im ischämischen Schlaganfall-Modell dessen neuroprotektive Wirkung aufzeigen. All diese Ergebnisse tragen entscheidend zur Weiterentwicklung der heutigen Schlaganfall-Therapie bei.

2 Material & Methoden

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit angewandten Methoden ausführlich beschrieben und die verwendeten Materialien aufgelistet.

2.1 Tiere

Alle verwendeten Tiere waren weibliche CD-1 Mäuse, bezogen von Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Die jungen Mäuse waren 6-8 Wochen alt und hatten ein Körpergewicht von 27-30 g. Für einige Versuche wurden alte Tiere von 18-24 Monaten und 30-40 g Körpergewicht verwendet. Bis zum Versuchstag wurden die Mäuse im Tierstall des Pharmakologischen Instituts für Naturwissenschaftler des Universitäts-Campus Riedberg gehalten, welcher den Bedingungen einer offenen Tierhaltung gemäß deutschem Tierschutzgesetz nachkommt (12 h Tag-/ Nacht-Rhythmus, Raumtemperatur circa 22,5 °C, relative Luftfeuchtigkeit 50-70 % (siehe Abbildung 2.1)). Zur Gewöhnung an menschliche Stimmen und Geräusche spielte in allen Räumen 12 Stunden am Tag ein Radio in moderater Lautstärke.



Abbildung 2.1: Tierstall.

2.2 Neuroprotektiva

In dieser Dissertation wurden zwei Stoffe auf ihre neuroprotektiven Eigenschaften untersucht: das aus dem *Ginkgo biloba* Baum stammende Bilobalid und das anaplerotisch wirksame Öl Triheptanoin.

Bilobalid

Das verwendete Bilobalid wurde von der Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH (Karlsruhe, Deutschland) aufgereinigt und zur Verfügung gestellt.

Die Gewinnung erfolgte durch Extraktion der getrockneten und zerkleinerten Blätter des *Ginkgo biloba* Baumes (www.tebonin.de). Als Extraktionsmittel diente Aceton. Nach Abtrennungen der übrigen Inhaltsstoffen des Ginkgo-Extraktes wurde der Stoff Bilobalid zur stabilen Lagerung gefriergetrocknet (>99 % Reinheit, Batch No. SR04-125-A).

Bilobalid ist schwer löslich. Es wurden daher 10 mg Bilobalid in 1 ml reinem DMSO gelöst. Diese Stammlösung wurde entweder auf 1 mg/ml mit Ringer-Lactat-Lösung (für die 10 mg/kg intraperitoneale Injektion) oder auf 10 µM mit artifizieller Gehirnflüssigkeit (artifizieller Cerebrospinal-Flüssigkeit, aCSF, siehe Tabelle 2.8), für die lokale Perfusion verdünnt.

Da ischämische Schlaganfälle vermehrt im Alter auftreten, wurde der neuroprotektive Effekt von Bilobalid sowohl an jungen (6-8 Wochen) als auch an alten Mäusen (18-24 Monate) untersucht. Die beiden Altersgruppen werden im Folgenden weiterhin als „jung“ und „alt“ bezeichnet.

Triheptanoin

Das Triheptanoin-Öl, ursprünglich von der Firma Sasol (Brunsbüttel, Deutschland) produziert, wurde von der Firma B. Braun (Melsungen, Deutschland) bereitgestellt. Die Tiere wurden 14 Tage lang mit der Triheptanoin-Diät bzw. einer Kontrolldiät gefüttert (siehe Abbildung 2.2).



(a) Triheptanoin-Diät



(b) Kontroll-Diät



(c) Käfiganordnung

Abbildung 2.2: Triheptanoin-Fütterungsstudie.

Die Fütterung erfolgte verblindet mit „rotem“ bzw. „blauem“ Futter. Das heißt, erst nach Durchführung und Auswertung der ersten Versuche wurde die Information, welches Futter Kontrolle bzw. Verum darstellte, von der Herstellerfirma sniff (Soest, Deutschland) bekanntgegeben. Das blau angefärbte Futter entsprach dem Verum, mit Zusatz von 14% Triheptanoin. Dies entspricht einem kalorischen Anteil von 33%. Das rote angefärbte Futter diente zur Kontrolle und enthielt die gleiche Kalorien-Menge an Sojaöl (Futter-Zusammensetzung siehe Abbildung 2.3).

Täglich wurde das Gewicht der Tiere kontrolliert, um die Aufnahme des Futters sicherzustellen. Futter und Wasser wurde ad libitum bereitgestellt.

S0782-E010 ssniff EF R "Diet 3" = 14 % Triheptanoin
» Farbe BLAU «
Experimentalfuttermittel / Experimental diet (Nur für Versuchstiere / For laboratory animals only)

Inhaltsstoffe / Crude Nutrients	%	Zusatzstoffe / Feed Additives	per kg
Rohprotein / Crude protein	18,0	Vitamin A [IE / IU]	15,000
Rohfett / Crude fat	16,4	Vitamin D ₃ [IE / IU]	1,500
Rohfaser / Crude fiber	4,0	Vitamin E [mg]	150
Rohasche / Crude ash	5,5	Vitamin K ₃ [mg]	20
Stärke / Starch	24,7	Vitamin C [mg]	100
Zucker / Sugar	11,0	Kupfer / Copper [mg]	14

Zusammensetzung: *auf Anfrage / Composition: On request* || **MJ ME/kg**
 Batch No. / Best before date: **231 9446 / 03/2010**

Hinweis: Mindesthaltbarkeit setzt sachgemäße Lagerung voraus (insbesondere hygienisch, kühl und trocken)
 Remark: best before date requires appropriate storage (particularly hygienic, cool and dry)

Hersteller / Manufacturer:
ssniff Spezialdiäten GmbH, DE-59494 Soest, www.ssniff.de, mail@ssniff.de
 α DE NW 100249

(a) Triheptanoin Diät

S0782-E010 ssniff EF R "Diet 1" = Kontrolle (5,3 % Sojaöl)
» Farbe ROT «
Experimentalfuttermittel / Experimental diet (Nur für Versuchstiere / For laboratory animals only)

Inhaltsstoffe / Crude Nutrients	%	Zusatzstoffe / Feed Additives	per kg
Rohprotein / Crude protein	18,0	Vitamin A [IE / IU]	15,000
Rohfett / Crude fat	5,4	Vitamin D ₃ [IE / IU]	1,500
Rohfaser / Crude fiber	4,0	Vitamin E [mg]	150
Rohasche / Crude ash	5,5	Vitamin K ₃ [mg]	20
Stärke / Starch	35,4	Vitamin C [mg]	100
Zucker / Sugar	11,0	Kupfer / Copper [mg]	14

Zusammensetzung: *auf Anfrage / Composition: On request* || **MJ ME/kg**
 Batch No. / Best before date: **229 9446 / 03/2010**

Hinweis: Mindesthaltbarkeit setzt sachgemäße Lagerung voraus (insbesondere hygienisch, kühl und trocken)
 Remark: best before date requires appropriate storage (particularly hygienic, cool and dry)

Hersteller / Manufacturer:
ssniff Spezialdiäten GmbH, DE-59494 Soest, www.ssniff.de, mail@ssniff.de
 α DE NW 100249

(b) Kontrolldiät

Abbildung 2.3: Zusammensetzung der anaplerotischen Diät.

2.3 Blutanalyse

Zur Untersuchung der physiologischen Parameter während eines Schlaganfalls wurden im Blut Gaswerte und Metabolite vermessen. Die Induktion des Schlaganfalls wurde wie in

Kapitel 2.7.2 beschrieben durchgeführt. Es erfolgten Blutabnahmen vor MCAO, sowie 1 h, 3 h und 24 h nach Ischämie. In dem gewonnenen Blut wurden pH-Wert, Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidgehalt sowie Glucose- und Lactat-Konzentrationen bestimmt.

2.3.1 Materialien

Material	Hersteller
Blutgasanalysator	Nova Biomedical GmbH, Rödermark, D
CMA 600	Axel Semrau, Sprockhövel, D
Biofuge pico	Kendo laboratory products, Osterode, D
Glaskapillaren heparinisiert 100 x 0,9	Nova Biomedical GmbH, Rödermark, D
Lanzette Solofix	B. Braun, Melsungen, D
Heparin-Natrium-25.000	ratiopharm GmbH, Ulm, D
Spritze Omnifix F	B. Braun, Melsungen, D
Kanüle Neolus 27G x 3/4"	Terumo, Somerset, NJ, USA

Tabelle 2.1: Materialien zur Durchführung der Blutgasanalyse.

2.3.2 Blutentnahme

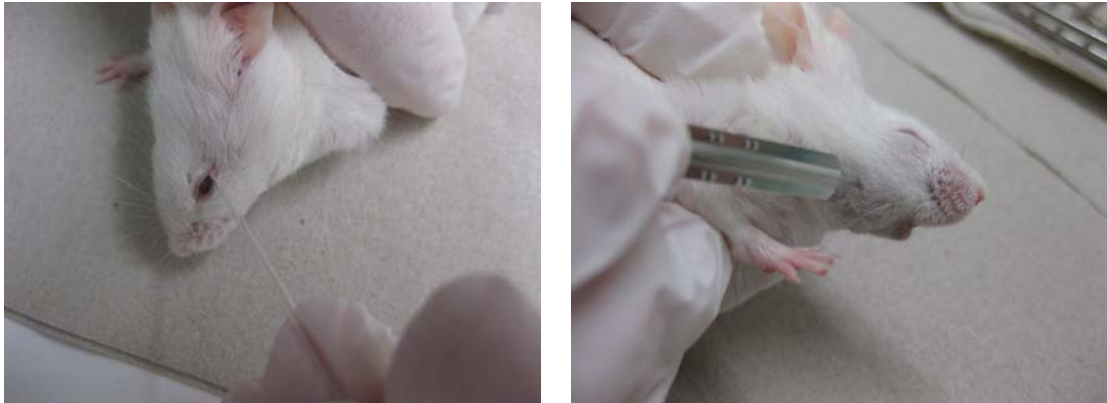
Für die Untersuchung der Blutgase wurden Blutproben vor Ischämie sowie 1 h und 24 h nach Schlaganfall durch Punktion des retrobulbären Venenplexus gewonnen (siehe Abbildung 2.4). Die Proben wurden unter möglichst kurzzeitiger Isofluran-Narkose entnommen. Eine Maus wurde hier für jeweils drei Blutentnahmen eingesetzt und nach der letzten sofort euthanasiert. Die Abnahmezeitpunkte wurden bei den unterschiedlichen Mäusen randomisiert.

Zur Evaluierung, ob eine Gabe von Ringer-Lactat-Lösung zur Volumensubstitution direkt nach der Operation sinnvoll ist, wurden einige Mäuse mit 1 ml der Lösung intraperitoneal versorgt (ausführliche Studie siehe Schwarzkopf et al. 2013b).

Die Untersuchung der Metabolite im Blut wurde sowohl für Mäuse durchgeführt, welche die Schlaganfall-Operation unter Isofluran-Narkose erfuhren, als auch für Tiere, die eine Pentobarbital-Narkose erhielten. Dies sollte bestehende Daten von Tobias Horn über die Auswirkung unterschiedlicher Narkotika und den Einfluss von Lactat auf den ischämischen Schlaganfall ergänzen (Horn und Klein 2010, Horn 2011). Die Blutentnahme

2 Material & Methoden

erfolgte an der *Vena facialis* (Unterkieferbereich, siehe Abbildung 2.4(b)) im wachen Tier. Die Entnahmezeitpunkte wurden wie folgt gewählt: vor Schlaganfall-OP, sowie 1 h und 3 h nach MCAO auf jeweils einer Kopfseite (randomisiert). Nach 24 h wurde durch Dekapitation Rumpfblood in Form von Mischblut (arteriell+venös) gewonnen.



(a) retrobulbär

(b) aus der *Vena facialis*

Abbildung 2.4: Blutentnahme bei der Maus.

Nach retrobulbärer Blutabnahme mittels heparinisierter 100 μ l Glaskapillaren wurde das Blut direkt aus den Kapillaren in den Blutgasanalysator überführt. Das Blut aus der *Vena facialis* wurde in einem mit Heparin gespülten Eppendorf-Gefäß aufgefangen, bei 11000 rpm für 30 sec zentrifugiert und das gewonnene Plasma für die weitere Analytik verwendet.

Für die Blutanalyse der Triheptanoin-Fütterungsstudie wurde nach der 14-tägigen Diät einmalig über die *Vena facialis* Blut entnommen und bei 11000 rpm für 30 sec zentrifugiert. In dem gewonnenen Plasma wurden die Konzentrationen von Glucose, Lactat und Glutamat bestimmt.

2.3.3 Analytik

Die Bestimmung der Blutgase erfolgte mit einem speziell für die klinische Anwendung entwickelten Blutgasanalysator der Firma Novo Biomedica. Das Gerät reinigt im ersten Schritt das Vollblut auf und ermittelt anschließend die darin enthaltenen Gaskonzentrationen. Bestimmt wurden pH-Wert und Kohlenstoffdioxid- sowie Sauerstoff-Partialdruck in arteriellem oder venösem Blut.

Der pH-Wert wird durch den Blutgasanalysator mit einer wasserstoffselektiven Glasmembran gemessen. Diese vergleicht die Protonen-Konzentrationen einer Referenzlösung auf der einen mit derjenigen von Blut auf der anderen Seite. Es entwickelt sich eine Spannung, welche, mit einer Referenzelektrode verglichen, zur genauen Angabe des pH-Wertes im Blut führt. Der Kohlenstoffdioxid-Partialdruck ($p\text{CO}_2$) wird gemessen, indem das im Blut vorhandene CO_2 durch eine gasdurchlässige Membran in eine Elektrolytschicht auf der Messelektrode diffundiert. Hier wird das CO_2 zu H_2CO_3 hydratisiert, was zu einer Veränderung in der Protonen-Konzentration führt, welche wiederum durch die Elektrode gemessen wird. Die Messung des Sauerstoff-Partialdrucks ($p\text{O}_2$) erfolgt amperometrisch. Der Elektronenfluss wird direkt an der Elektrode gemessen.

Die Metabolite Glucose, Lactat und Glutamat wurden mittels CMA 600 bestimmt, wie in Kapitel 2.6.6 beschrieben.

2.4 Ausmaß des Schlaganfalls

Die TTC-Färbung ist eine einfache Methode zur Quantifizierung des Schadens nach Schlaganfall. Der Farbstoff markiert den ischämischen Bereich in Hirnschnitten, so dass die Größe des Infarktgebietes abgeschätzt werden kann (Altman 1976).

2.4.1 Materialien

Material	Hersteller
Gewebeschnneider	McIlwain, Redding, CA, USA
Dino Capture Kamera	Big Catch digital products, Torrance, CA, USA
Wasserbad Thermomix 1441	B. Braun, Melsungen, D

Tabelle 2.2: Materialien für die TTC Färbung.

Inhaltsstoff	Gehalt
Natriumchlorid	137 mM
Kaliumchlorid	2,7 mM
Natriumdihydrogenphosphat	6,5 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 mM
Calciumchlorid	0,9 mM
Magnesiumchlorid	0,9 mM

Tabelle 2.3: Zusammensetzung des Phosphatpuffers (PBS).

2.4.2 TTC Färbung

TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) ist ein sogenannter Redoxfarbstoff: Unter Aufnahme von zwei Elektronen und einem Proton wird die farblose quartäre Ammoniumverbindung zum roten Formazan reduziert (siehe Abbildung 2.5).

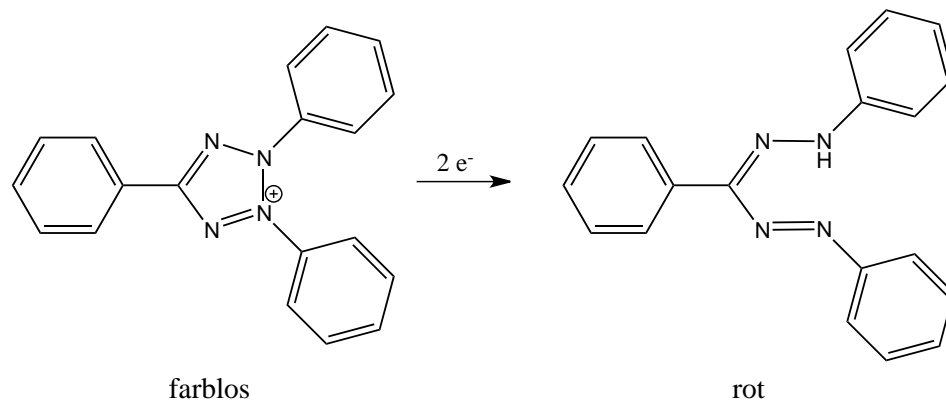
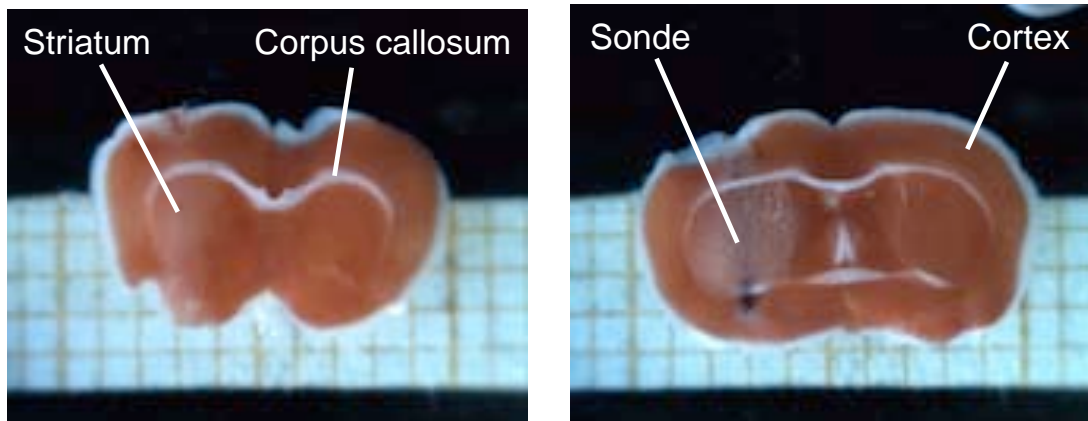


Abbildung 2.5: Redoxreaktion von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid.

In Mitochondrien wird diese Reaktion vornehmlich durch Elektronen des Komplex II der Atmungskette katalysiert, so dass eine Unterscheidung zwischen rötlich gefärbten Zellen mit aktiven Mitochondrien und weiß erscheinenden Zellen mit inaktiven Mitochondrien vorgenommen werden kann (Kun und Abood 1949).

Nach Dekapitation der Maus 24 h nach Schlaganfall wurde das Gehirn entnommen und mit Hilfe einer Rasierklinge in einem Gewebeschneider in 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Nach 10 min Inkubation in 1 %-iger TTC-Lösung im Wasserbad bei 37 °C waren die Schnitte gefärbt und wurden in PBS-Puffer überführt, um die Farbreaktion zu stoppen.

Zur weiteren Auswertung und Ansicht wurden die Schnitte mit einer Vergrößerungskamera des Herstellers Dino Light digitalisiert (Abbildung 2.6).



(a) rosa gefärbtes Striatum; *anterior* (b) rosa gefärbtes Striatum mit Sonde; *posterior*

Abbildung 2.6: Hirnschnitte nach TTC Färbung.

Das Ausmaß des Schlaganfalls wurde durch eine Flächenberechnung der ungefärbten Areale erfasst (ImageJ 1.42q, National Institutes of Health, USA).

2.4.3 Neuroprotektive Behandlung

Bilobalid

Verglichen wurde die Kontrollgruppe ohne medikamentöse Behandlung mit der Verumgruppe, deren Striatum 1 h vor Beginn der tMCAO-Operation mit Bilobalid ($10 \mu\text{M}$ in aCSF) perfundiert wurde.

Die Infarktfläche wurde sowohl für junge als auch für alte Mäuse bestimmt.

Triheptanoin

Das Ausmaß des Schlaganfalls wurde nach 14-tägiger Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät 24 h nach tMCAO bestimmt.

2.5 Verhaltenstests

In den durchgeführten Verhaltenstests wurden die motorischen Eigenschaften der Mäuse vor und nach Schlaganfall untersucht. Außerdem wurde die Auswirkung der Gabe eines Neuroprotektivums auf die Motorik untersucht.

Die im Folgenden ausgewählten Verhaltenstest sind speziell für die Schlaganfallforschung entwickelt und zielen besonders auf unmögliche oder erschwerte Bewegungen mit halbseitiger Körperlähmung ab (Bouet et al. 2007).

Allgemeine Anzeichen eines Schlaganfalls bei der Maus sind das struppige Fell, der Verschluss des linken Auges und eine Neigung zur linken Körperhälfte sowie die fast einseitige Bewegung um die linke Körperachse. Allein diese Merkmale geben schon einen Aufschluss über das Ausmaß des Infarktes (Abbildung 2.7).



Abbildung 2.7: Mäuse mit Schlaganfall.

2.5.1 Chimney Test

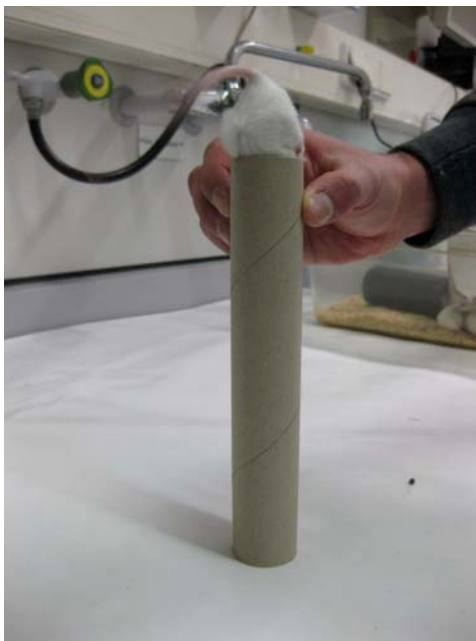
Für den sogenannten Chimney Test lief die Maus in eine 20 cm lange, 2 cm dünne Röhre. Erreichte sie das Ende, wurde die Röhre senkrecht auf die Tischoberfläche gestellt. Eine gesunde Maus vermochte nun aus der Röhre rückwärts heraus zu klettern (Abbildung 2.8). Eine motorisch eingeschränkte Maus besaß nicht mehr die nötigen koordinativen Fähigkeiten und benötigte wesentlich mehr Zeit um die Röhre zu verlassen bzw. konnte die senkrechte Wand gar nicht mehr hochklettern. Nach 120 sec wurde das Experiment in diesem Fall abgebrochen.



(a) Maus läuft in Röhre



(b) Röhre senkrecht stellen



(c) Maus krabbelt rückwärts aus Röhre



(d) Zeit stoppen

Abbildung 2.8: Chimney Test.

Alten Mäusen (18-20 Monate) war es bereits ohne Behandlung nicht möglich, eine senkrechte Röhre rückwärts zu verlassen. Der Versuch wurde für die alten Tiere demnach von 90° (senkrecht) auf 45° Neigung abgewandelt (Heinecke 1987).

2.5.2 Rotarod

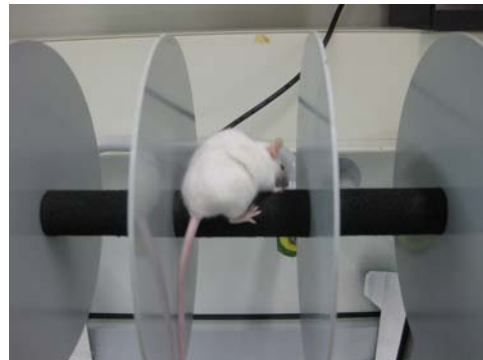
Im Rotarod-Versuch wurden die Mäuse auf eine sich drehende Achse gesetzt, um darauf zu laufen (Abbildung 2.9). Der Versuch startete mit einer Drehgeschwindigkeit der Achse

2 Material & Methoden

von 4 rpm. Es erfolgte eine kontinuierliche Beschleunigung auf 40 rpm in den folgenden 120 sec. Anschließend war das Experiment beendet. Es wurde die Zeit gemessen, welche die Maus auf der sich drehenden Achse laufen konnte, ohne herunter zu fallen. Hierbei war es einmalig erlaubt, dass die Maus sich herum drehte und für kurze Zeit rückwärts lief. Drehte sich die Maus vermehrt vor und zurück bzw. krallte sie sich im Achsenmaterial fest und wurde mitgedreht, so wurde dies nicht als Versuch gewertet (Versuchsdurchführung beschrieben bei Jones und Roberts 1968).



(a) Rotarod Apparatur



(b) Maus auf Achse

Abbildung 2.9: Rotarod Test.

2.5.3 Corner Test

Der Corner-Test ist ein Maß für die oben beschriebene Neigung zur linken Körperseite und die Drehung um die linke Achse. Wird eine einseitig eingeschränkte Maus in eine spitz zulaufende Ecke (30°) gesetzt, so wird sie sich aus dieser Ecke immer um die gleiche Seite heraus drehen. Eine gesunde Maus wird die Ecke genauso oft links wie rechts herum verlassen (Abbildung 2.10).

Im Versuch wurden 120 sec lang die Drehungen aus den Ecken nach jeweils rechts und links gezählt. Lief eine Maus nicht freiwillig im Versuchsareal, so wurde das Experiment abgebrochen und nicht bewertet.



Abbildung 2.10: Corner Test.

Die Berechnung des Lateralitätsindex (LI) erfolgte nach Bouet et al. 2007 gemäß folgender Formel:

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

Der LI gibt also die Tendenz an, in welche Richtung sich die Maus bevorzugt dreht. Der Erwartungswert bei gesunden Tieren liegt bei 0, da diese sich zu gleichen Teilen in beide Richtungen drehen. Dreht sich ein Tier nur um die linke Achse, würde dies einem $LI = -1$ entsprechen. Alleinige Rechtsdrehungen hätten einen $LI = +1$ zur Folge (siehe auch Schallert et al. 1982).

2.5.4 Neuroprotektive Behandlung

Bilobalid

Verhaltenstests für junge Mäuse die Bilobalid erhielten wurden im Rahmen dieser Dissertation nicht durchgeführt. Sie sind bereits in einer vorangehenden Arbeit beschrieben (Lang 2011, Lang et al. 2011).

Die Motorik der alten Mäuse wurde bestimmt. Zufällig ausgewählte Mäuse erhielten Bilobalid (10 mg/kg intraperitoneal) eine Stunde vor tMCAO. Alle Verhaltenstests wurden am Vormittag vor und am Vormittag nach der Schlaganfall-OP durchgeführt.

Triheptanoin

Die beschriebenen motorischen Tests wurden nach 14-tägiger Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät durchgeführt. Ausgewählte Mäuse erfuhren eine einstündige Ischämie. Verglichen wurde die Motorik vor tMCAO und 1 bzw. 3 Tage danach.

2.6 Mikrodialyse

Die Mikrodialyse ist eine minimalinvasive Methode, die es erlaubt, kontinuierlich Konzentrationsänderungen im Extrazellularraum zu untersuchen. Die Methode wurde von Delgado et al. 1972 entwickelt und in den darauffolgenden Jahren modifiziert und verbessert (Ungerstedt et al. 1982, Lönnroth et al. 1987, Lönnroth et al. 1989). Die Dialysesonde kann in unterschiedliche Gewebe implantiert werden, in denen sie eine Blutkapillare nachahmt und durch ihre semipermeable Membran einen Austausch von Molekülen zulässt (Abbildung 2.11).

Nach Implantation einer Sonde ins Striatum des Mäusehirns und Perfusion selbiger mit artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF, Zusammensetzung siehe Tabelle 2.8), findet ein Austausch von Molekülen des Liquors hin zur Perfusionsflüssigkeit statt (Konzentrationsgefälle). So wird die Zusammensetzung des Liquors zu diesem Zeitpunkt exakt widerspiegelt und Veränderungen können detektiert werden. Da der Austausch in beide Richtungen möglich ist, kann zusätzlich mit der Perfusionslösung eine Substanz direkt in das Zielgewebe transportiert werden (Chaurasia et al. 2007, Mueller 2002, Li et al. 2006).

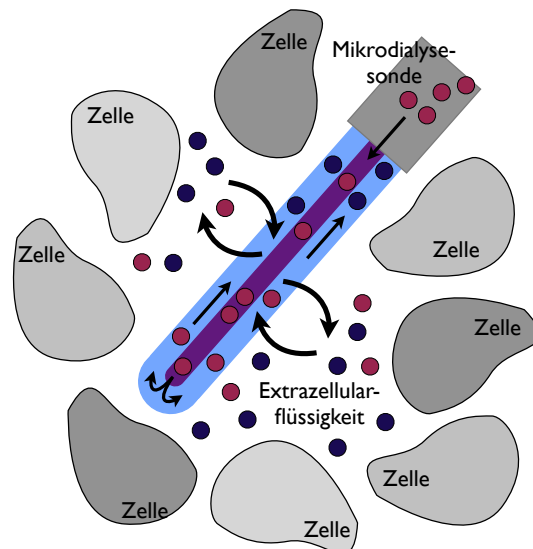


Abbildung 2.11: Mikrodialysesonde im Gewebe.

Somit wird mit Hilfe der Mikrodialysetechnik ein zeitlicher Verlauf eines Experiments im lebenden Tier dargestellt. Anders als bei der Liquor-Entnahme bestehen keine Einschränkungen bezüglich Zeitpunkt und Volumen. Außerdem ist das System geschlossen und das Dialysat aufgrund der begrenzten Porengröße der Membran sehr rein; es muss für die folgende Analytik keine weitere Aufreinigung erfolgen (Horn und Engelman 2001).

2.6.1 Materialien

Material	Hersteller
PE Schlauch (0,38 mm ID)	Hartenstein, Würzburg, D
Glaskapillare (Fused Silica, 0,074 mmID)	Polymicro Technologies, Kehl, D
Sterican Kanüle grau 27G x 3/4"	B. Braun, Melsungen, D
Sterican Kanüle orange 25G x 1 1/2"	B. Braun, Melsungen, D
Dialysemembran AN69 HF	Hospal Industrie, Meyzieu, F
Cyanacrylat Plastik Kleber	Pattex, Henkel, Düsseldorf, D
Cyanacrylat Gel Kleber	UHU, Bühl, D
Siliconkleber IBF-Ferotherm 5-n	IBF Chemotechnik Elektronik
Heißkleber Gluematic 3002	Steinel, Herzebrock-Clarholz, D

Tabelle 2.4: Materialien zum Bau der Mikrodialysesonden.

Material	Hersteller
PE Schlauch 1 (0,28 mm ID)	Hartenstein, Würzburg, D
PE Schlauch 2 (0,38 mm ID)	VWR, Darmstadt, D
PE Schlauch 3 (0,76 mm ID)	Ismatec, Wertheim-Mondfeld, D
PE Schlauch 4 (2 mm ID)	Hartenstein, Würzburg, D
Cyanacrylat Plastik Kleber	Pattex, Henkel, Düsseldorf, D

Tabelle 2.5: Materialien zum Bau der Mikrodialyseschläuche.

Material	Hersteller
Stereotakt	Stoelting, Chicago, IL, USA
Mausadapter	Reinhold Stutz, Institut für Pharmakologie, Mainz, D
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, D / Hartenstein, Würzburg, D / Carl Roth, Karlsruhe, D
Dentalbohrer (RF 104018)	Firma Hager & Meisinger, Neuss, D
Dentalzement + Primer	Ivoclar Vivadent, Multilink Automix, Schaan, Liechtenstein
Gewebekleber Vet Glu	B. Braun Vet Care, Tuttlingen, D
Klemmen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Alkoholpads	B. Braun, Melsungen, D
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer, Leverkusen, D

Tabelle 2.6: Materialien zur Sondenimplantation.

Material	Hersteller
Fraktionssammler 2110	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Präzisionsspritze 1 ml	Hamilton, Reno, NV, USA
Präzisionsspritzenpumpe KDS200	KDScientific, Holliston, MA, USA

Tabelle 2.7: Materialien zum Mikrodialyseversuch.

Inhaltsstoff	Gehalt
Natriumchlorid	147 mM
Kaliumchlorid	2,7 mM
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	1,2 mM
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	1,2 mM

Tabelle 2.8: Zusammensetzung der artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF).

2.6.2 Fertigung von Mikrodialyse-Sonden und -Schläuchen

Die Mikrodialysesonden wurden für die durchgeführten Studien im Eigenbau hergestellt. Dies brachte gegenüber den vorgefertigten Sonden den Vorteil, dass Größe und Austauschfläche der Membran variiert werden konnten (Santiago und Westerink 1990). Die hergestellten Sonden ließen einen Molekülaustausch bis zu einem Gewicht von 10 kDa zu. Die Originalsonden und ihr schematischer Aufbau sind in Abbildung 2.12 dargestellt.

Mikrodialyse-Sonden

Ein Polyethylenschlauch ($d = 0,38 \text{ mm}$) der Länge 25 mm wurde mit Hilfe einer eingeführten Kanüle (27G x 3/4“) nach etwa 5 mm durchstoßen. In die Kanüle wurde ein 20 mm langes Stück Glaskapillare eingeführt. Da die Kanüle nur zur Stabilisierung dient, wurde diese entfernt und die Glaskapillare in dem PE-Schlauch mittels Aktivator und zugehörigem Cyanacrylat-Gelkleber fixiert. Nach Aushärten des Klebers wurde eine Dialysemembran über die Glaskapillare und etwa 5 mm weiter innerhalb des PE-Schlauches geschoben. Das Loch zwischen Membran und PE-Schlauch wurde mittels Cyanacrylat-Gelkleber geschlossen. Unter dem Mikroskop wurde die Dialysemembran an der Spitze der Glaskapillare gekürzt und auch dort mit Cyanacrylat-Gelkleber verschlossen. Über das andere Ende der Glaskapillare wurde zur Stabilisierung eine 10 mm lange Metallhülse (aus Kanüle 25G x 1 1/2“) gestülpt und mit Cyanacrylat-Gelkleber fixiert. Um die Austauschfläche der Dialysesonde zu begrenzen, wurden von der Spitze der Membran 3 mm abgemessen, markiert und der verbleibende Membranbereich bis zum PE Schlauch mit Siliconkleber wasserundurchlässig versiegelt. Zum Abschluss wurde die Gabelung der Mikrodialysesonde mit Heisskleber umhüllt und stabilisiert.

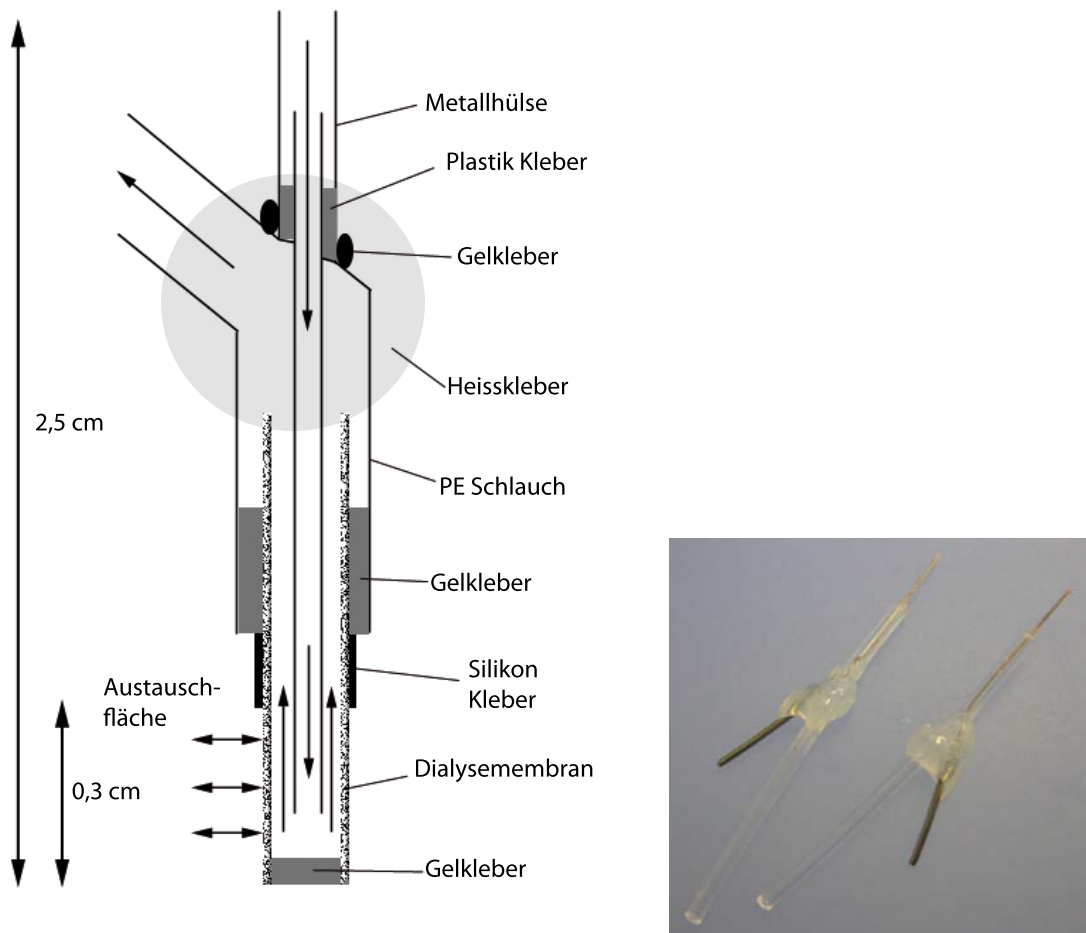


Abbildung 2.12: Mikro dialysesonden.

Mikrodialyse-Schläuche

Die Mikro dialysesonden wurden mit Schläuchen an die Perfusionspumpe (Eingangsschlauch) und den Fraktionssammler (Ausgangsschlauch) angeschlossen. Der Versuchsaufbau wird in Kapitel 2.6.5 näher beschrieben.

Zum Eigenbau von Eingangsschlauch und Ausgangsschlauch wurden ein jeweils 80 cm langes Stück des dünnen PE-Schlauches Nr. 1 benötigt. Zum Anschluss an die Mikro dialysesonde erhielten diese folgende Adapterstücke:

Für den Eingangsschlauch (zwischen Pumpe und Sonde, siehe Abbildung 2.13) wurden 2 Stücke von PE-Schlauch Nr. 2 benötigt, welche jeweils 7 mm lang waren. Mit Hilfe eines Metalldrahtes, der zur temporären Festigung des dünnen PE-Schlauches in diesen

geschoben wurde, konnte der dünne PE-Schlauch in den dickeren hinein geführt werden. Dies wurde an beiden Enden durchgeführt. Adapter und Schlauch wurden mittels Cyanacrylat-Gelkleber fixiert.



Abbildung 2.13: Darstellung des Eingangsschlauches zur Mikrodialysetsonde.

Der Ausgangsschlauch (zwischen Sonde und Fraktionssammler, Abbildung 2.14) besaß einen Sondenadapter, welcher aus einem 7 mm langen Teil von PE-Schlauch Nr. 2, einem 7 mm langen Teil von PE-Schlauch Nr. 3 und einem 10 mm langen Stück von PE-Schlauch Nr. 4 bestand. PE-Schlauch Nr. 2 wurde wie im vorherigen Punkt beschrieben auf den dünnen PE-Schlauch Nr. 1 gezogen. Anschließend konnte das Stück Nr. 4 auf Nr. 2 etwa zur Hälfte aufgezogen werden. In den überstehenden Teil von Schlauchstück Nr. 4 wurde nun Nr. 3 eingeführt, welches während des Versuches optimal auf das freie PE-Ende der Mikrodialysetsonde passte.

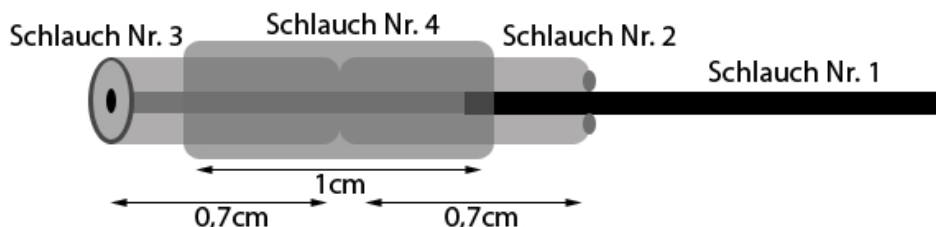


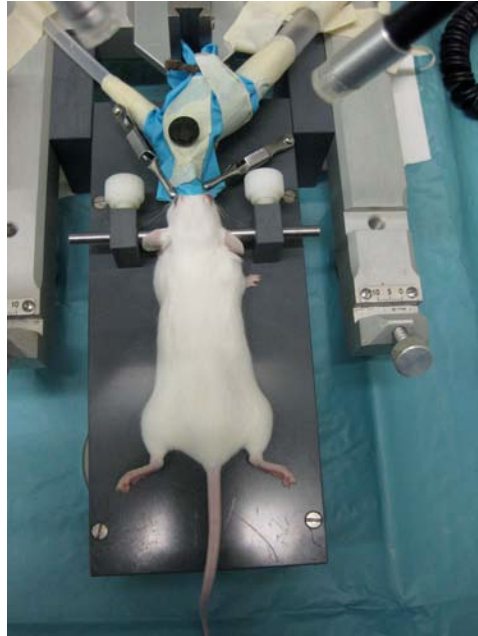
Abbildung 2.14: Darstellung des Ausgangsschlauches von der Mikrodialysetsonde.

2.6.3 Sondenimplantation

Unmittelbar vor Implantation der Mikrodialysetsonde wurde diese auf ihre Durchlässigkeit sowie Dichtigkeit überprüft. Hierzu wurde die Sonde mit Hilfe des Eingangsschlauches an die 1 ml-Präzisionspritze angeschlossen und mit einer Fließrate von $4 \mu\text{l}/\text{min}$ mit aCSF durchspült. Hielt die Sonde dem Druck stand und war durchlässig, so wurde sie bis zur Operation in aCSF aufbewahrt.

2 Material & Methoden

Zur Implantation der Sonde wurde die Maus narkotisiert (Anfangsdosis: 4% Isofluran in synthetischer Luft). Die anschließende Operation erfolgte bei einer Erhaltungsdosis von 2-2,3% Isofluran. Zur genauen Platzierung der Mikrodialysesonde fand die Operation unter stereotaktischer Kontrolle statt. In Abbildung 2.15(a) ist ein Stereotakt zu sehen.



(a) Maus eingespannt in Stereotakt



(b) Loch in Schädel



(c) Einführen der Sonde



(d) Implantierte Sonde

Abbildung 2.15: Operationsverfahren Mikrodialyse.

Der Schädel der narkotisierten Maus wurde mittig fixiert, indem die Maus mit den Frontzähnen in eine Aussparung der Halterung gelegt wurde. Anschließend wurden die Stifte zu beiden Seiten in die Ohrmuscheln eingeführt, so dass der Schädel auch seitlich fest verankert war. Die Augen wurden zur Befeuchtung mit Augensalbe bedeckt und die Kopfhaut mit Alkohol desinfiziert.

Ein sagittaler Schnitt legte die Schädeldecke frei. Nun waren die Abgrenzungen der Fontanellen deutlich zu sehen. Als Orientierungshilfe diente der Punkt Bregma. Mit Hilfe der Maßskala des Stereotakten wurde der Punkt 0,5 mm anterior und 2,2 mm lateral von Bregma ermittelt und markiert. Eine Implantation der Sonde an dieser Stelle führte zu einer Dialyse des Striatumgewebes (Abbildung 2.16). Mit einem Dentalbohrer wurde der Schädel an der markierten Stelle durchbohrt, ohne die *Dura mater* zu verletzen. Diese konnte anschließend mit einer Pinzette vorsichtig durchstoßen werden. Austretendes Blut wurde mit Tupfern aufgesaugt (Abbildung 2.15(b)).

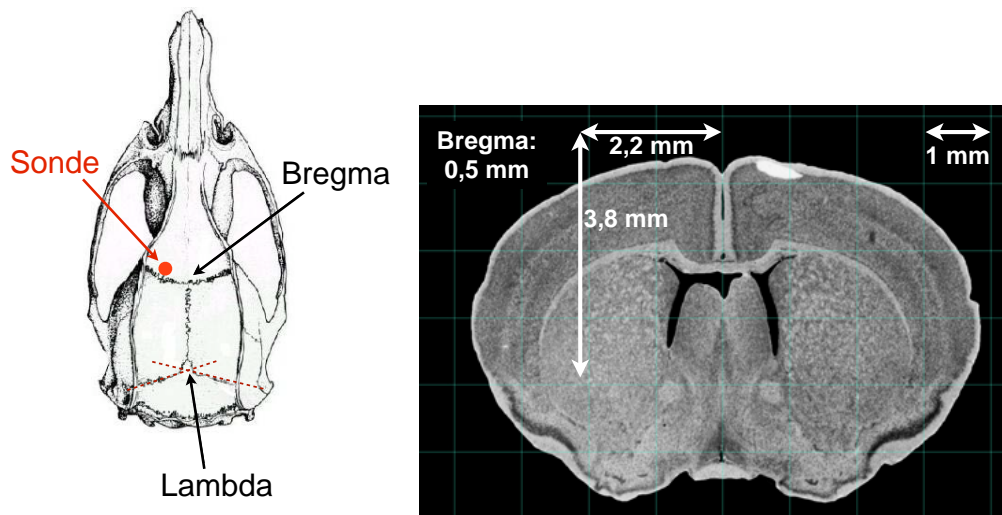


Abbildung 2.16: Platzierung der Sonde im Striatum. Links: Schädel der Maus, modifiziert nach Paxinos und Franklin 1997. Die Punkte Bregma und Lambda entstehen durch das Zusammenwachsen der Schädelfontanellen. Der rot gekennzeichnete Punkt ist die Implantationsstelle der Mikrodialysesonde. Rechts: Hirnschnitt, modifiziert nach www.mbl.org.

Nun wurde die Mikrodialysesonde in den Stereotakten eingespannt und 3,8 mm tief in das Gehirn der Maus eingeführt (Abbildung 2.15(c)). Die Sonde wurde mit Zahnzement der Firma Ivoclar Vivadent fixiert. Hierzu wurde zunächst der Primer auf dem Schädel verstrichen, um eine bessere Haftung herzustellen. Anschließend wurde der Zement kegel-

förmig auf den Schädel und um die Sonde herum aufgetragen. War der Dentalzement durch Lichteinwirkung vollständig ausgehärtet, konnte eine eventuell zu weit aufklaffende Kopfwunde durch Gewebekleber verschlossen und zur Schmerzstillung Lidocaingel aufgetragen werden. Danach wurde die Maus aus Stereotakten und Narkose entlassen (Abbildung 2.15(d), Schwarzkopf et al. 2013a).

2.6.4 Wiederfindungswert

Vor Durchführung der Versuche wurde der Wiederfindungswert von repräsentativen Sonden einer Charge bestimmt (mehr hierzu siehe Korth und Klein 2001). Er sagt aus, wie viel der tatsächlichen Konzentration einer Substanz aus dem Liquor in dem gewonnenen Dialysat wiederzufinden ist. Hierzu wurde eine Stammlösung aus bekannten Konzentrationen an Glucose und Glutamat hergestellt (siehe Tabelle 2.9), welche den Liquor nachahmte. Die Sonde wurde mit der Spitze in die hergestellte Lösung getaucht und mit aCSF perfundiert (Versuchsaufbau in Abbildung 2.17 dargestellt). In dem gewonnenen Dialysat wurden mittels CMA 600 die Konzentrationen an Glucose und Glutamat bestimmt. Ein Vergleich mit den ursprünglichen Konzentrationen der Stammlösung ergab den Wiederfindungswert.

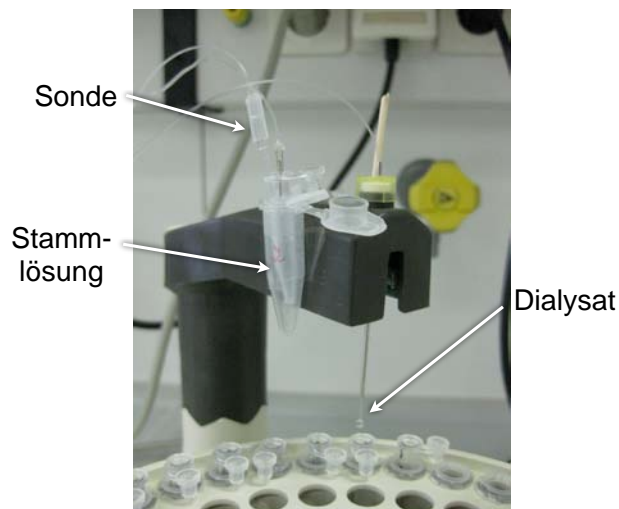


Abbildung 2.17: Versuchsaufbau Wiederfindungswert.

Inhaltsstoff	Gehalt
Glucose	6 mM
Glutamat	150 μ M

Tabelle 2.9: Zusammensetzung der Stammlösung zur Bestimmung des Wiederfindungswertes.

2.6.5 Ablauf der Mikrodialyse

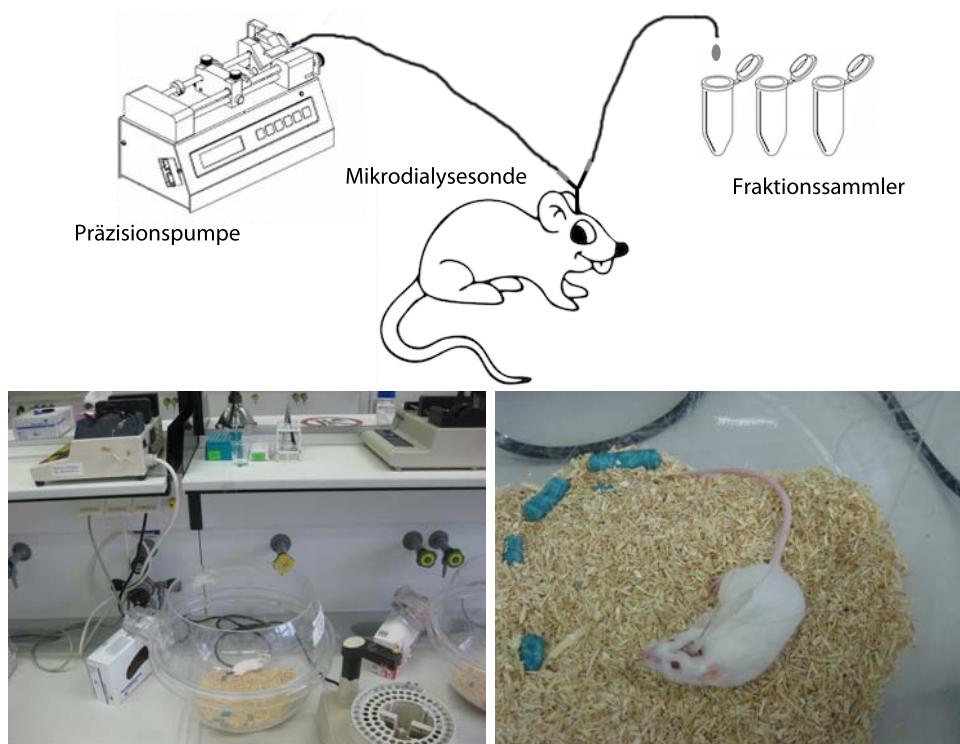


Abbildung 2.18: Versuchsaufbau der Mikrodialyse.

Das Sammeln der Mikrodialysate erfolgte zur Erholung des Gewebes und der Blut-Hirn-Schranke einen Tag nach Sondenimplantation (Sumbria et al. 2011). Der Eingangsschlauch wurde mit der 1 ml-Präzisionsspritze und der Sonde verbunden. Der Ausgangsschlauch führte das Dialysat zu einem Fraktionssammler (Abbildung 2.18). Als Perfusionsflüssigkeit wurde artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) mit einer Flussrate von 2 μ l/min und einem Sammelintervall von 10 min gewählt.

2.6.6 Auswertung

CMA 600

Das Gerät CMA 600 ist für die klinische Anwendung zur Analyse kleiner Volumina konzipiert. Somit ist das System ideal, um Mikrodialysate zu untersuchen. Unter anderem können die Konzentrationen von Glucose, Lactat und Glutamat photometrisch bestimmt werden. Das Messverfahren ist im Folgenden dargestellt:

Glucose (linearer Messbereich: 0,02 - 6,0 mM)

GOD Reaktion: $\text{Glucose} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Gluconsäure} + \text{H}_2\text{O}_2$

POD Reaktion: $2 \text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-Aminoantipyrin} + \text{Phenol} \rightarrow \text{Chinonimin} + 4 \text{H}_2\text{O}$

Detektion des rot-violetten Chinonimins bei 546 nm.

Lactat (linearer Messbereich: 0,02 - 2,5 mM)

LOD Reaktion: $\text{Lactat} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Pyruvat} + \text{H}_2\text{O}_2$

POD Reaktion: $\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-Aminoantipyrin} + 4\text{-Chlorphenol} \rightarrow \text{Chinonimin} + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{HCl}$

Detektion des rot-violetten Chinonimins bei 546 nm.

Glutamat (linearer Messbereich: 1 - 150 μM)

GltOx Reaktion: $\text{Glutamat} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{-Oxoglutarat} + \text{H}_2\text{O}_2$

POD Reaktion: $\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-Aminoantipyrin} + \text{TOOS} \rightarrow \text{Chinondiimin} + 4 \text{H}_2\text{O}$

Detektion des rot-violetten Chinondiimins bei 546 nm.

Das Gerät CMA 600 sowie alle Reagenzien und Spülflüssigkeiten stammten von Axel Semrau, Sprockhövel, Deutschland.

2.7 Schlaganfallmodell

In unseren Versuchen wurde im Mausmodell der häufigste humane Schlaganfall nachgeahmt: der Verschluss der mittleren Cerebralarterie (MCA, *Arteria cerebri media*). Durch ihre anatomisch bedingte Lage und ihre Funktion als Endarterie erfolgt ein Hirninfarkt meist im Bereich der MCA. Da Mensch und Maus sich im Bezug auf die Anatomie der Hirnarterien sehr ähneln, ist die Maus ein adäquates Tiermodell für den humanen Schlaganfall (Carmichael 2005, Ardehali und Rondouin 2003).

Zur Veranschaulichung eines thromboembolischen Ereignisses wurde das Fadenmodell verwendet, wobei ein Filament ähnlich eines Thrombus die MCA an ihrem Ursprung

verschloss. Im Vergleich mit dem Thrombusmodell ist ein Filament wesentlich besser steuerbar und erzeugt reproduzierbare Infarkte. Das Entfernen des Filaments nach einer genau definierten Zeit bzw. der Verbleib in der MCA unterscheidet eine transiente von einer permanenten Okklusion (siehe Kapitel 1.5).

2.7.1 Materialien

Material	Hersteller
Anästhesieeinheit	Kent Scientific Corporation, Toorington, CT, USA
Univentor 400 Anaesthesia Unit	TSE systems, Bad Homburg, D
Stereomikroskop Omano (OM99-V15)	The Microscope Store, Wirtz, VA, USA
Kaltlichtbeleuchtung PL 2000	Optech, Belgrade, MT, USA
Heizpad mit Rektalsonde	Harvard Instrument, Holliston, MA, USA
Laser Doppler	Moor Instruments, Devon, UK
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, D / Hartenstein, Würzburg, D / Carl Roth, Karlsruhe, D
Filamente	Doccol, Redlands, CA, USA
Fäden zur Ligation 18020-60	Fine Science Tools, Heidelberg, D
Elektrokoagulator	Fine Science Tools, Heidelberg, D

Tabelle 2.10: Materialien zur Durchführung der Schlaganfall-OP.

2.7.2 Operationsverfahren MCAO

Der Schlaganfall wurde in der narkotisierten Maus durch Verschließen der mittleren Cerebralarterie (MCA) mit Hilfe eines Filaments erzeugt. Die Narkose erfolgte mit einer Anfangsdosis von 4% und einer Erhaltungsdosis von 2-2,3% Isofluran in synthetischer Luft. Zur Schmerzstillung war es möglich, 0,1 mg/kg Buprenorphin subcutan zu verabreichen. Das zur Okklusion verwendete Filament von der Firma Doccol war 20 mm lang und am vorderen Ende über eine Länge von 0,5 mm mit einer 0,23 mm dicken Siliconschicht überzogen. Mittels Laser-Doppler-Flussmessung konnte auf der Schädeldecke (1 mm posterior; 3,5 mm lateral von Bregma) der cerebrale Blutfluss bestimmt werden.

2 Material & Methoden

Während der gesamten Operation wurde die Temperatur der Maus durch ein Heizpad mit Rektalthermometer auf 37°C gehalten, um eine Hypothermie zu vermeiden (siehe Abbildung 2.19).

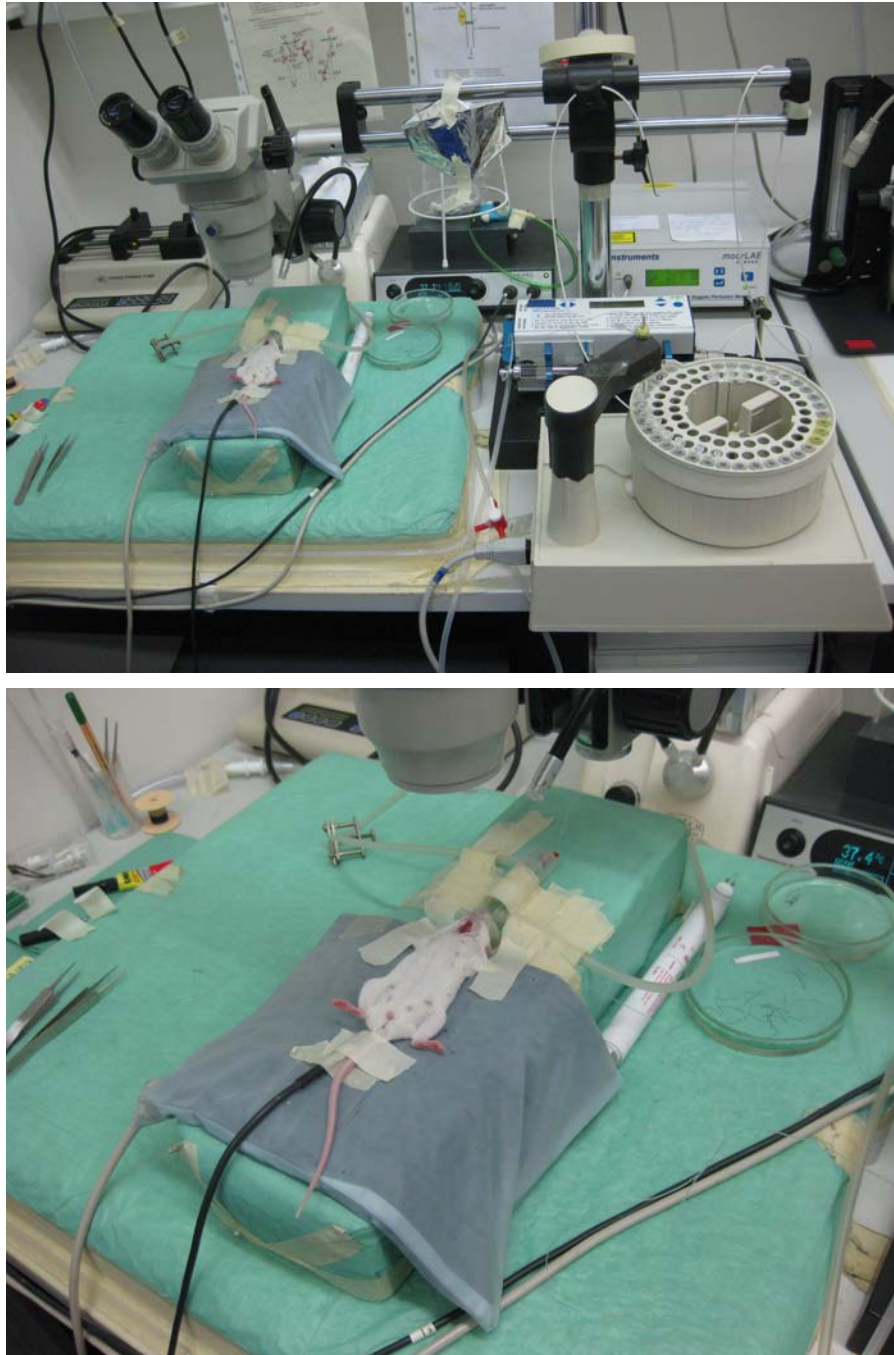


Abbildung 2.19: Aufbau der MCAO Operation.

Zum Einführen des Filaments wurde die Maus in Rückenlage gebracht und durch eine cervikale Inzision die Luftröhre und die daneben liegende rechte *Arteria carotis communis* (ACC, Halsschlagader) durch stumpfe Präparation frei gelegt. Nun wurden alle drei von der Carotidgabel abgehenden Arterien, das heißt die ACC, *Arteria carotis interna* (ACI) und *Arteria carotis externa* (ACE), mit einem temporären Knoten verschlossen (Abbildungen 2.20(a) und 2.21). Die seitlich abgehende *Arteria thyroidalis* wurde mit einem Elektrokoagulator verödet. Durch einen Schnitt in die ECA wurde das Filament eingeführt und mit einem Knoten fixiert. Die ACE wurde oberhalb des eben geschlossenen Knotens durchtrennt und der Knoten an der ACI geöffnet. Nun konnte das Filament circa 11 mm weit bis hoch in das Gehirn der Maus geschoben werden, so dass es dort die MCA, welche vom Arterienring (*Circulus arteriosus Willisii*) entspringt, verschloss (Abbildung 2.20(b)).

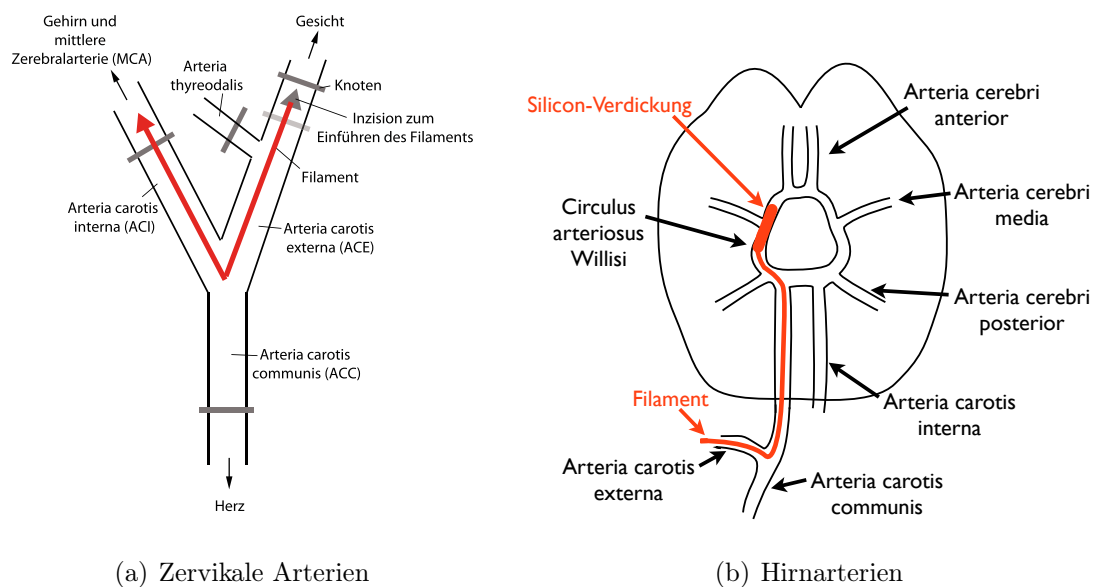
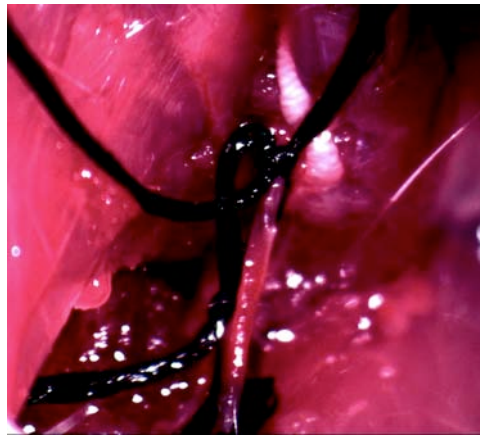
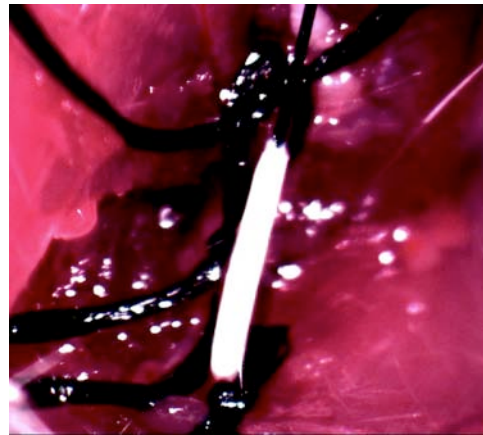


Abbildung 2.20: Schematische Darstellung der Hirnarterien mit eingeführtem Filament.

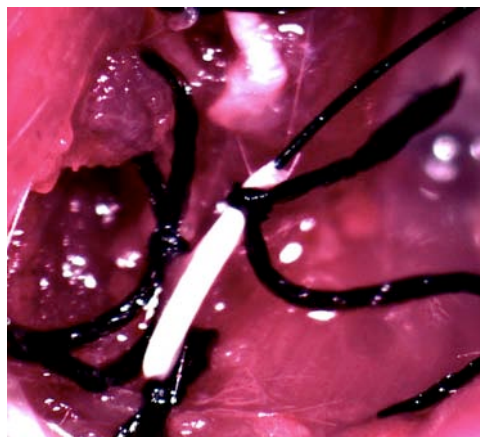
Der Knoten an der ACC wurde geöffnet und auf dem Schädeldach mittels Laser-Doppler-Flussmessung die richtige Positionierung des Filaments überprüft. Der Verschluss der MCA wurde als erfolgreich deklariert, wenn der Blutfluss auf $<20\%$ des Ausgangswertes gesunken war. Die Methode wurde nach Mdzinarishvili et al. 2005 durchgeführt.



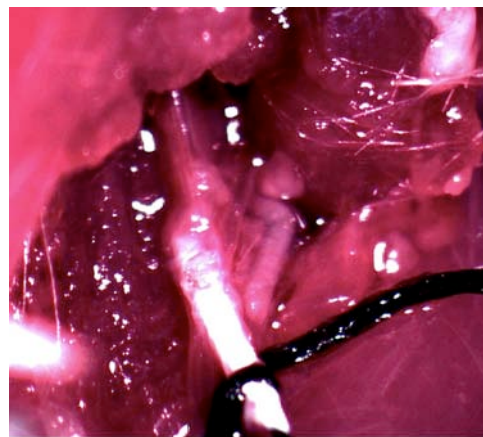
(a) Karotisgabel, abgehende Arterien verschlossen



(b) Filament, in die ACE eingeführt



(c) ACE durchtrennt



(d) Filament wird in Richtung Gehirn geschoben

Abbildung 2.21: Operationsverfahren MCAO.

Bei dem transienten Modell wurde die Okklusion der mittleren Cerebralarterie (*middle cerebral artery occlusion*, MCAO) für 1 h aufrecht erhalten. Anschließend wurde die ACC erneut temporär verschlossen, das Filament entfernt und die verbleibende *Arteria carotis externa* durch Veröden verschlossen. Die vollständige Reperfusion wurde durch Öffnen des ACC-Knotens erreicht und konnte mittels Laser-Doppler-Flussmessung überprüft werden (etwa 50 % des Ausgangswertes vor MCAO). Im permanenten Modell verblieb das Filament für 24 h bis zur Dekapitation der Maus in der MCA.

Die Inzision wurde mit Gewebekleber geschlossen und die Maus aus der Narkose entlassen. 24 h nach der MCAO wurde die Maus mit einer Überdosis Isofluran narkotisiert und schließlich durch Dekapitation euthanisiert.

2.7.3 Schlaganfall und Mikrodialyse

Bei Kombination der beiden Methoden „Schlaganfall“ und „Mikrodialyse“ erstreckte sich der Versuch über drei Tage. An Tag 1 erfolgte die Implantation der Mikrodialysesonde wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben. Das Sammeln der Mikrodialysate begann an Tag 2 bereits eine Stunde vor Ischämie (Basalwerte). Während der Schlaganfall-OP wurde die Mikrodialyse fortgesetzt, so dass eine kontinuierliche Messung der Liquorparameter erfolgte. Die Maus verblieb zur einfacheren Handhabung eine Stunde in Isofluran-Narkose (1,8%). Anschließend wurde das Filament entfernt, um eine Reperfusion zu ermöglichen. Die Maus wurde aus der Narkose entlassen und die Mikrodialyse für 2 h fortgesetzt. An Tag 3 wurde die Maus mit Isofluran euthanasiert und die Hirnschnitte mit TTC-Lösung eingefärbt, um die Größe des Infarktes bestimmen zu können (siehe Kapitel 2.4).

2.7.4 Neuroprotektive Behandlung

Bilobalid

Beliebig ausgewählten Mäusen wurde Bilobalid (10 μ M in aCSF) beginnend eine Stunde vor Schlaganfall über die Mikrodialysesonde verabreicht. Die Gabe wurde für die Zeit der Dialyse aufrecht erhalten.

Für die alten Mäuse wurde die gleiche Versuchsdurchführung gewählt.

Triheptanoin

Die beschriebene Kombination aus tMCAO und Mikrodialyse wurde nach 14-tägiger Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät durchgeführt.

2.8 Mitochondriale Atmung

Mit dem Oroboros Oxygraphen wurde ein Gerät entwickelt, in dem die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette in Zellen oder direkt in Mitochondrien in optimaler Umgebung gemessen werden kann (siehe Gnaiger 2010, Gnaiger et al. 2012). In dem Gerätemodell O2k (Abbildung 2.22) sind zwei inerte Atemkammern vorhanden, in denen das enthaltene Medium durch jeweils einen Teflonrührer durchmischt wird. Das Medium

2 Material & Methoden

einer Kammer umspült eine Clark-Elektrode, welche Änderungen des Sauerstoffgehalts in der Lösung detektiert. Durch eine Öffnung im Stopfen der Kammer konnten mit Hilfe einer Hamilton-Präzisionspritze Mitochondrien sowie Substrate und Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette injiziert werden. Ein umfangreiches Pipettierschema ermöglichte die Funktionsmessung der einzelnen Atmungskomplexe, sowie der minimalen und maximalen Atmungskapazität (Hand et al. 2010, Eckert et al. 2012).

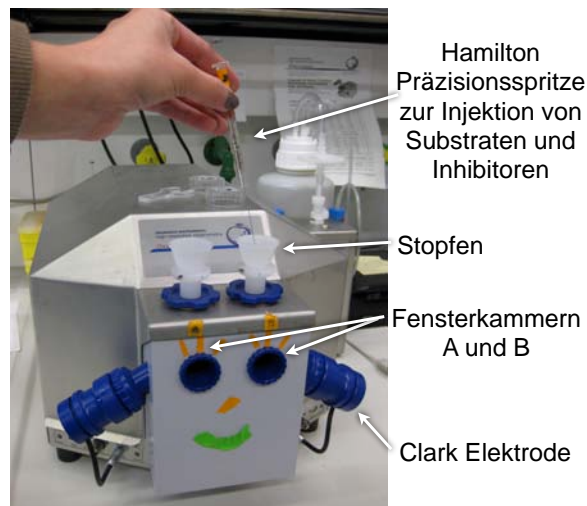


Abbildung 2.22: Oroboros Oxygraph O2k.

2.8.1 Materialien

Inhaltsstoff	Gehalt
EGTA	0,5 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	3 mM
K-Lactobionat	60 mM
Taurin	20 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM
HEPES (pH 7)	20 mM
Sucrose	110 mM
Bovines Serumalbumin	1g/l

Tabelle 2.11: Zusammensetzung des mitochondrialen Respirations-Mediums MiR05 (pH 7,1).

Material	Hersteller
Oroboros Oxygraph O2k	Oroboros instruments, Innsbruck, AU
Hamilton Präzisionspritzen	Hamilton, Reno, NV, USA
Beckman Mircofuge R	Beckman & Coulter GmbH, Krefeld, D
Potter und Zubehör	B. Braun, Melsungen, D
Cell disruptor B15 Branson (Ultraschall)	Heinemann, Schwäbisch-Gmünd, D
Promax 1020 (Plattformschüttler)	Heidolph Instruments, Schwabach, D
ELISA Reader Digiscan	Asys Hitech GmbH, Eugendorf, AU
ATP-Kit LT27-102/008	Lonza GmbH, Köln, D
OP-Besteck	Fine Science Tools, Heidelberg, D / Carl Roth, Karlsruhe, D
Präzisions-Pipetten	Abimed, Langenfeld, D
Eppendorf-Gefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Mikroplatten 96er	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

Tabelle 2.12: Materialien zur Bestimmung der mitochondrialen Atmungskapazität.

2.8.2 Die Mitochondriale Atmungskette

Die Energiegewinnung einer Zelle erfolgt unter normalen Bedingungen über den Abbau von Glucose zu Pyruvat durch die cytosolisch ablaufende Glycolyse. Pyruvat wird in die Mitochondrienmatrix geschleust und durch oxidative Decarboxylierung in Acetyl-CoA, das Ausgangsmolekül des Citratcyclus, umgewandelt (siehe Einleitung Abbildung 1.9). Alternativ entsteht Acetyl-CoA bei der beta-Oxidation, dem Fettsäureabbau. Der Citratcyclus läuft in der Mitochondrienmatrix ab und produziert die Reduktionsäquivalente $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 , die in die Atmungskette der Mitochondrien eingeschleust werden und über einen Protonengradienten zur ATP-Bildung führen. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 2.23 dargestellt und soll im Folgenden kurz erläutert werden (aus Doenecke et al. 2005, Lehninger et al. 1998).

Komplex I:

Das Enzym des ersten Komplexes der mitochondrialen Atmungskette, die NADH-Q-Oxidoreduktase, befindet sich wie die anderen vier Komplexe in der inneren Mitochondrienmembran, welche die Matrix vom Intermembranraum trennt. Komplex I überträgt zwei Elektronen von $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf Coenzym Q (Q). Durch Q werde die Elektronen

2 Material & Methoden

zu Komplex III transportiert. Zusätzlich werden von Komplex I vier Protonen gegen den Konzentrationsgradienten in den Intermembranraum abgegeben.

Komplex II:

Die Succinat-Q-Reduktase, das Enzym des Atmungskomplex II, überträgt ein Elektron von FADH_2 auf Q. Coenzym Q übernimmt den Transport der Elektronen zu Komplex III.

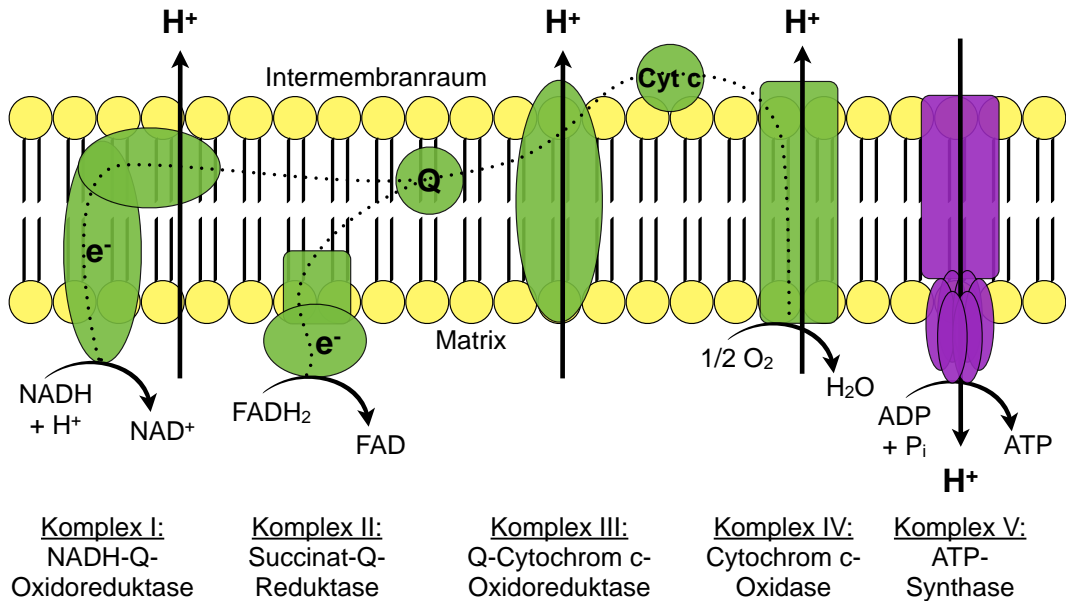


Abbildung 2.23: Mitochondriale Atmungskette.

Komplex III:

In Komplex III, der Q-Cytochrom-c-Oxidoreduktase, werden die Elektronen von Komplex I und II zusammengeführt und an Cytochrom c (Cyt c) in den Intermembranraum abgegeben. Gleichzeitig werden hierbei vier Protonen in den Intermembranraum gepumpt.

Komplex IV:

Die Cytochrom-c-Oxidase von Komplex IV nimmt Cyt c aus dem Intermembranraum auf und oxidiert dieses. Im Gegenzug wird die Reduktion von O_2 zu H_2O katalysiert. So werden die Elektronen aufgefangen und erneut zwei Protonen in den Intermembranraum befördert.

Komplex V:

Der durch die ersten vier Komplexe aufgebaute Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran wird von Komplex V, der ATP-Synthase, genutzt. Durch Rotation transportiert er die Protonen zurück in die mitochondriale Matrix. Die entstandene protonenmotorische Kraft wird schließlich benutzt, um aus $\text{ADP} + \text{P}_i$ über oxidative Phosphorylierung ATP herzustellen.

2.8.3 Isolierung der Mitochondrien

Zur Gewinnung der Mitochondrien wurde eine Maus mittels Isofluran-Narkose euthanasiert. Zügig wurde das Gehirn entnommen. Das Kleinhirn wurde separiert und verworfen. Der verbleibende Teil wurde in die beiden Hemisphären getrennt und zur groben Abtrennung von Blut zunächst in PBS-Puffer (siehe Tabelle 2.3) gelegt. Anschließend wurde jeweils eine Hemisphäre in ein gekühltes, mit 2 ml MiR05 und zugesetztem Protease-Inhibitor (PI) gefülltes Pottergefäß überführt (Tabelle 2.11). Mit 15 Hüben bei 800 rpm wurde das Hirngewebe zerkleinert. Nun wurde die komplette Zell-Suspension zur weiteren Aufreinigung jeweils in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Es entstanden demnach zwei Versuchsreihen, eine der rechten und eine der linken Hemisphäre. Bei *ex vivo* Schlaganfall-Versuchen war auf diese Weise ein Vergleich der ischämischen zur gesunden Hirnhälfte möglich. Alle nachfolgend beschriebenen Aufreinigungsschritte sind auf einen Ansatz bezogen.

Die Zell-Suspension wurde in dem 2 ml-Eppendorf-Gefäß für 7 min bei 1400 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Es erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt für 3 min bei 1400 x g. Der Überstand wurde erneut in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und die Mitochondrien durch Zentrifugation für 5 min bei 10.000 x g ins Sediment befördert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml MiR05-Medium resuspendiert. Zur Aufreinigung wurde für 3 min bei 1400 x g zentrifugiert und nach Überführen des Überstandes in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß erneut die Mitochondrien für 5 min bei 10.000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert, verworfen und das Pellet in 0,5 ml MiR05 resuspendiert.

Die entstandene Mitochondrien-Suspension konnte nun direkt in die Kammer des Oxygraphen injiziert werden (siehe Kapitel 2.8.4). Die restliche Lösung wurde zur späteren Proteinbestimmung (Kapitel 2.8.5) bei -80°C eingefroren. Die Isolierung der Mitochondri-

2 Material & Methoden

en erfolgte nach Hand et al. 2010, modifiziert von Kathrin Sattler-Renner, Stefanie Hagl und Schamim Eckert.

2.8.4 Pipettierschema zur Messung der mitochondrialen Atmung

Das Pipettierschema zur Messung der mitochondrialen Atmung ist in Abbildung 2.24 dargestellt. Die einzelnen Schritte werden im Folgenden näher erläutert.

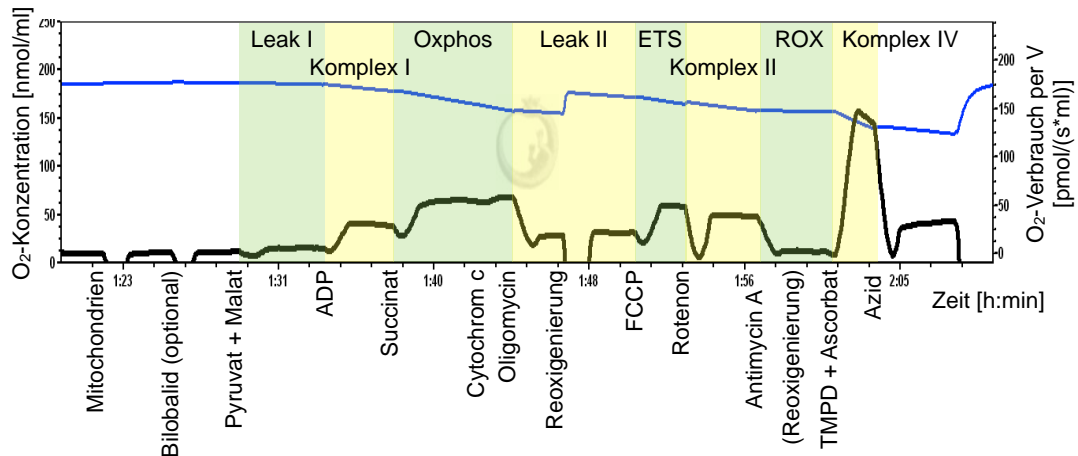


Abbildung 2.24: Pipettierschema zur Messung der mitochondrialen Atmung. In schwarz ist der Sauerstoff-Verbrauch, in blau der Sauerstoffgehalt in der Kammer des Oxygraphen zu sehen. Zusätzlich sind die verabreichten Substrate und Inhibitoren der Atmungskette sowie die Bezeichnung des Atmungs-Status aufgetragen.

Mitochondrien

Die Messung wurde gestartet, nachdem die Kammern einen gleichbleibenden gesättigten Sauerstoffgehalt aufwiesen. Die Mitochondrien, deren Atmungsaktivität zu bestimmen war, wurden gewonnen wie in Kapitel 2.8.3 beschrieben. Es wurden je 80 μ l der isolierten Mitochondriensuspension in eine Kammer injiziert.

Pyruvat + Malat = Leak I-Status

Durch die Injektion von Pyruvat und Malat (5 mM bzw. 2 mM) sind die Substrate für die Komplex I-Atmung im System vorhanden. Die ATP-Synthase kann jedoch noch nicht phosphorylieren, da ihr das Ausgangssubstrat ADP fehlt. Die vorhandenen Protonen diffundieren mit dem Konzentrationsgefälle durch die Membran. Dieser Status wird als „Leak“ bezeichnet.

ADP = Komplex I-Atmung

Durch die Zugabe von 2 mM ADP erhält Komplex V das benötigte Substrat. Der Protonengradient wird aktiv abgebaut und die gemessene Änderung im Sauerstoffgehalt der Lösung ist repräsentativ für die Atmung von Komplex I.

Succinat = Oxphos-Status

Sobald der Lösung 10 mM Succinat zugeführt werden, wird Komplex II aktiviert. Alle benötigten Substrate der mitochondrialen Atmungskette sind nun im System vorhanden. Der gemessene Sauerstoffverbrauch zeigt die gesamte physiologische Atmung, das heißt die oxidative Phosphorylierung (Oxphos).

Cytochrom c = Qualitätskontrolle

Die Zugabe von 10 μ M Cytochrom c dient der Qualitätskontrolle. Falls die in der Lösung enthaltenen Mitochondrien während der Isolierung geschädigt worden sind, würde ein Austritt von Cytochrom c erfolgen. Dieses würde somit in der Atmungskette fehlen, so dass der gemessene Oxphos-Wert nicht dem physiologischen Maximum der Atmungskette entspricht. Eine Zugabe von Cytochrom c würde in diesem Fall eine verbesserte Atmung zur Folge haben, gemessen in einem erhöhten Sauerstoffverbrauch. Der Sauerstoffverbrauch nach Cytochrom c-Zugabe darf demnach nur minimal ansteigen (<15%), um zu garantieren, dass die Messung mit ungeschädigten und daher repräsentativen Mitochondrien erfolgt (Gnaiger und Kuznetsov 2002).

Oligomycin = Leak II-Status

Oligomycin (2 μ g/ml) hemmt die ATP-Synthase (Review zu Inhibitoren der Atmungskette siehe Foster et al. 2006). Die mitochondriale Atmung befindet sich in einem unphysiologischen „Leak-Zustand“. Der Leak II-Wert zeigt normalerweise einen höheren Sauerstoffverbrauch als der Leak I-Wert, da die ATP-Synthase durch sogenanntes *Recycling* im Leak I-Status Protonen mit dem Konzentrationsgefälle durch die Membran transportiert. Hierdurch entsteht im Leak I eine geringe negative Atmung. Durch die aktive Hemmung des Enzyms mittels Oligomycin wurde der *Recycling*-Prozess blockiert.

FCCP = ETS-Status

FCCP, Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon, ist ein Entkoppler der Atmungskette. Er baut den Konzentrationsgradienten ab, indem er Protonen aktiv über die innere Mitochondrienmembran schleust. Der gemessene Sauerstoffverbrauch symbolisiert die physiologisch maximale Kapazität der Komplexe I bis IV, da diese versuchen, den Protonengradienten wieder herzustellen. Es wurde also das Elektronen-Transport-System

2 Material & Methoden

(ETS) detektiert. FCCP wurde in 0,5 μM -Schritten auftitriert. In den Versuchen wurden maximal 1,5 μM FCCP injiziert.

Rotenon = Komplex II-Atmung

Die Zugabe von 0,5 μM Rotenon hemmt Komplex I, so dass die verbleibende Änderung der Sauerstoffkonzentration allein auf die Komplex II-Atmung zurückzuführen ist.

Antimycin A = ROX-Status

ROX bezeichnet den verbleibenden Sauerstoffverbrauch (*residual oxygen consumption*), wenn alle Komplexe der Atmungskette inaktiv sind. Dies wird erreicht durch die Zugabe von 2,5 μM Antimycin A, einem Komplex III-Hemmer. Die Redoxreaktion kommt zum Stillstand, wodurch auch die ATP-Synthase ihre Funktion nicht mehr wahrnehmen kann. Gerätebedingt verblieb im Oroboros Oxygraphen ein Sauerstoffverbrauch von 2-5 % der ETS-Kapazität (Garadew et al. 2007, Hand et al. 2010, Hütter et al. 2002). Dieser Wert der „Nullatmung“ wurde bei der Auswertung von allen anderen Werten abgezogen.

TMPD + Ascorbat = Komplex IV-Atmung

0,5 mM des Elektronendonators TMPD, Tetramethylphenylendiamin, dienen als künstliches Substrat für Komplex IV. Die maximale unphysiologische Atmung von Komplex IV wurde gemessen. 2 mM Ascorbat dienen zur Regeneration von TMPD.

Azid = Autoxidation

Die Azid-Zugabe von 100 mM hemmte alle mitochondrialen Oxigenasen, unter anderem Komplex IV. Nach Reoxygenierung durch das Öffnen der Kammern wurde der Autoxidationswert der Mitochondrien (vor allem durch TMPD) gemessen. Dieser Wert wurde bei der Auswertung zusätzlich zu ROX von der Komplex IV-Atmung abgezogen.

Reoxygenierung

Durch die mitochondriale Atmung sank der Sauerstoff-Gehalt in den Kammern während der Messung stetig. Zur Regeneration konnten nach Oligomycin- bzw. nach Antimycin A-Zugabe die Kammern durch Öffnen belüftet werden. Die Messung wurde für diese Zeit gestoppt und nach Schließen der Kammern fortgesetzt.

2.8.5 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung in der mitochondrialen Suspension wurde nach Lowry (siehe Lowry et al. 1951) durchgeführt. Durch Normierung der Messwerte des Oxygraphen auf

die Proteinmenge der jeweils verwendeten Mitochondrien-Suspension war ein Vergleich zwischen den einzelnen Versuchen möglich.

Hierfür wurde die eingefrorene Suspension zunächst auf Eis aufgetaut und mittels Ultraschallwellen homogenisiert. Anschließend erfolgte eine 1:6 Verdünnung der Proben mit Tris-HCl-Puffer 20 mM (pH 7,4), um den Messbereich des ELISA-Photometers zu erreichen.

Auf eine 96-Well-Platte wurden je drei Mal 5 µl Standard (0 mg/ml; 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,33 mg/ml, 0,5 mg/ml und 1 mg/ml Bovines Serumalbumin (BSA) in Tris-HCl-Puffer 20 mM) sowie die Proben pipettiert. Anschließend wurden in jedes Well 25 µl Bio-Rad-Reagenz A (alkalische Kupfertartratlösung) und 200 µl Bio-Rad-Reagenz B (Folin-Ciocalteau-Reagenz) gegeben und die Platte für 15 min unter leichtem Schütteln abgedeckt inkubiert (Reagenzien: BioRad DC Protein Assay 500-0113/0114, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland).

Die Messung erfolgte mit einem ELISA-Photometer bei einer Wellenlänge von 620 nm.

2.8.6 Neuroprotektive Behandlung

Bilobalid

Die Mitochondrien für die Messung der Atmung wurden zum einen von Kontrolltieren gewonnen. Da in diesen Versuchen im lebenden Tier keine Behandlung erfolgte, werden sie im Folgenden als „*in vitro*-Versuche“ bezeichnet. Zum anderen wurden Mitochondrien von Mäusen gewonnen, welche *in vivo* eine MCAO erfuhren. Diese Versuche werden im Folgenden „*ex vivo*“ genannt. Die Behandlung mit Bilobalid erfolgte entweder akut im Oxygraphen oder eine Stunde vor Schlaganfall intraperitoneal. Die Versuchsgruppen ließen sich wie folgt einteilen:

In vitro

Die Mitochondrien wurden wie in Kapitel 2.8.3 isoliert und ohne Behandlung in die Kammern des Oxygraphen injiziert. Eine Behandlung erfolgte durch direkte Gabe der Bilobalid- bzw. Kontroll-Lösung in die Kammer.

Kammer A	Kammer B
Injektion von DMSO 2 µl	Injektion von Bilobalid-DMSO 2 µl (10 µM)

Tabelle 2.13: Versuche an unbehandelten isolierten Mitochondrien *in vitro*.

Ex vivo

Die Mäuse erfuhren am Tag der Mitochondrien-Isolation eine 60-minütige transiente MCAO (siehe 2.7.2). Direkt im Anschluss an die Reperfusion wurde die Dekapitation und Isolierung der Mitochondrien vorgenommen. Eine Behandlung erfolgte entweder *in vitro* durch Injektion direkt in die Kammer des Oxygraphen oder in der Maus *in vivo* durch intraperitoneale Injektion eine Stunde vor Ischämie. Die beiden Hemisphären wurden getrennt voneinander aufbereitet, so dass eine Unterscheidung zwischen den ischämischen und den contralateralen, im Folgenden „gesunden“, Mitochondrien nach Schlaganfall erfolgen konnte.

Kammer A = gesund	Kammer B = ischämisch
keine Behandlung	keine Behandlung
Injektion von DMSO 2 µl	Injektion von Bilobalid-DMSO 2 µl (10 µM)
intraperitoneale Injektion von Bilobalid 10 mg/kg 1 h vor MCAO	intraperitoneale Injektion von Bilobalid 10 mg/kg 1 h vor MCAO

Tabelle 2.14: Versuche an Mitochondrien nach 60 min transientser MCAO *ex vivo*.

Die Versuche mit alten Tieren wurde nach gleichem Schema durchgeführt, jedoch wurde hier auf die akute Injektion von Bilobalid 10 µM in die Kammer des Oxygraphen verzichtet.

Triheptanoin

Die Mäuse erhielten eine 14-tägige Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät. Unterschieden wurde zwischen *in vitro* und *ex vivo* gewonnenen Mitochondrien; letztere wurden direkt nach 60 min MCAO isoliert und in die beiden Hemisphären „gesund“ und „ischämisch“ unterteilt.

2.9 Mitochondriale Schwellung

Werden Mitochondrien zum Beispiel durch eine Ischämie stark geschädigt, können sie den Zelltod einleiten. Ein wichtiger Schritt hierbei ist das Schwellen der Mitochondrien, was durch Öffnen der mPT-Pore (*mitochondrial permeability-transition-pore*) ausgelöst werden kann. Die mPT-Pore wird unter anderem aus dem spannungsabhängigen Anionen-Kanal (*voltage dependent anion channel*, VDAC), der Adenin-Nucleotid-Translokase (ANT) und Cyclophilin-D (CyP-D) gebildet (siehe Eckmann et al. 2013). Die sonst undurchlässige innere Mitochondrienmembran wird durchlässig für kleine Moleküle und der Ionenhaushalt gerät aus dem Gleichgewicht. Durch den osmotischen Druck strömt zudem Wasser in das Mitochondrium, so dass es anschwillt. Das Ausmaß der Schwellung ist somit ein Hinweis auf das Ausmaß der mitochondrialen Schädigung (Crompton 1999).

2.9.1 Materialien

Material	Hersteller
Beckman Zentrifuge J2-HS (Rotor J 20.1a)	Beckman & Coulter GmbH, Krefeld, D
Beckman Mircofuge R Inkubator 4010	Beckman & Coulter GmbH, Krefeld, D
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
SLM-Aminco-Spektrometer, Series 2	Julabo Labortechnik, Seelbach, D
Bowman	Sopra GmbH, Büttelborn, D
ELISA Reader Digiscan	Asys Hitech GmbH, Eugendorf, AU
Pierce BCA Protein Kit 23225	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
Dounce Homogenisator 15 ml	Wheaton, Millville, NJ, USA
Glas-Spritze 5ml Fortuna optima	Poulten & Graf GmbH, Wertheim, D
Zentrifugenröhrchen PPCP 12 ml	Nalge Company, Rochester, NY, USA
Pasteur-Pipetten 3,2 ml	Roth EA65.1
Eppendorf Gefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
96-well Platte unsteril	Greiner bio-one, Frickenhausen, D

Tabelle 2.15: Materialien für die mitochondriale Schwellung.

Inhaltsstoff	Gehalt
Saccharose	320 mM
EGTA	2 mM
Trizma Base	10 mM

Tabelle 2.16: Zusammensetzung des Isolationspuffers; pH 7,4 bei 4°C.

Der verwendete Isolationspuffer mit bovinem Serumalbumin (BSA) bestand aus 50 ml Isolationspuffer (siehe Tabelle 2.16) in welchem 50 mg BSA gelöst waren.

Inhaltsstoff	Gehalt
Saccharose	320 mM
EGTA	2 mM
Trizma Base	10 mM
in Percoll gelöst	

Tabelle 2.17: Zusammensetzung der Percoll-Lösung; pH 7,4 bei 4°C.

Die 12%-ige, 24%-ige und 40%-igen Percoll-Lösungen wurden aus der in Tabelle 2.17 beschriebenen Percoll-Stammlösung durch Verdünnen mit Isolationspuffer (pH 7,4 bei 4°C) hergestellt.

Inhaltsstoff	Gehalt
Kaliumchlorid	125 mM
MOPS	20 mM
Trizma Base	10 mM
Dikaliumhydrogenphosphat	2 mM
Magnesiumchlorid	1 mM
EGTA	1 μ M

Tabelle 2.18: Zusammensetzung des Messpuffers; pH 7,2 bei 37°C.

2.9.2 Isolierung der Mitochondrien

Da die Methode zur Analyse der mitochondrialen Schwellung sehr empfindlich ist, erfolgte eine manuelle Isolation über einen Dichte-Gradienten, um zellulären Stress weitestgehend

zu vermeiden. Der Gradient wurde mittels Percoll aufgebaut, einer Suspension aus kolloidalen Kieselpartikeln (15-30 nm), überzogen mit Polyvinylpyrrolidon (Sims 1990, Sims und Anderson 2008).

Das Hirn wurde wie bereits in Kapitel 2.8.3 beschrieben aus der euthanasierten Maus entnommen, das Kleinhirn abgetrennt und das Großhirn entsprechend der beiden Hemisphären geteilt. In allen folgenden Schritten wurde die rechte und linke Hemisphäre separat behandelt. Das entsprechende Hirngewebe wurde zunächst in 5 ml kaltem Isolationspuffer gewaschen und anschließend in den Dounce Homogenisator, gefüllt mit 15 ml 12%-iger Percoll Lösung, überführt. 10 Hübe mit dem „*loose paddle*“ und 10 Hübe mit dem „*tight paddle*“ homogenisierten die Hemisphäre zu einer Zellsuspension. Die Auftrennung erfolgte mittels eines Percoll-Dichte-Gradienten. Hierzu wurden zunächst 3 ml 24%-iges Percoll in ein Zentrifugenröhrchen (12 ml) gefüllt und mit 1,5 ml 40%-igem Percoll unterschichtet. Auf diesen Gradienten wurde das Homogenat vorsichtig mit einer Pasteurpipette gegeben. Die Zellsuspension eines ganzen Hirnes wurde auf sechs Zentrifugenröhrchen, das heißt drei pro Hemisphäre verteilt. Zentrifugation bei 30.700 x g für 7 min in der auf 4°C gekühlten Beckmann Zentrifuge diente zur Abtrennung der Mitochondrien, wie es in Abbildung 2.25 veranschaulicht ist.

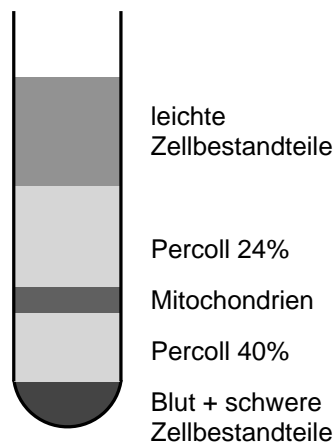


Abbildung 2.25: Percoll-Dichte-Gradient.

Mit einer Spritze wurde die Mitochondrien-Schicht abgesaugt und die drei Proben einer Hemisphäre in einem Zentrifugenröhrchen vereint. Die Mitochondrien-Suspension wurde mit 5 ml Isolationspuffer verdünnt, mit einer Pasteur-Pipette durchmischt und bei 16.700 x g für 12 min zentrifugiert, um das Percoll abzutrennen. Der Überstand wurde

2 Material & Methoden

anschließend verworfen und das Pellet in einem 1,5 ml-Eppendorf Gefäß in 500 µl Isolationspuffer mit BSA aufgenommen. BSA dient hierbei zur Stabilisierung der Mitochondrien. Die Probe wurde bei 7.600 x g für 6 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl Isolationspuffer aufgenommen. Hiervon wurden 50 µl für die Sauerstoffelektrode (Kapitel 2.9.4) und 20 µl für die Proteinbestimmung (Kapitel 2.9.3) abgezweigt. Die restliche Suspension wurde erneut bei 7.600 x g für 6 min zentrifugiert und das Pellet entsprechend dem bestimmten Proteingehalt in Isolationspuffer gelöst (27,5 µg pro ml Puffer).

2.9.3 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure

Die Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA) erfolgt durch eine Redoxreaktion: Zweiwertige Kupferionen werden durch Proteine reduziert. Das einwertige Kupferion reagiert mit der BCA zu einem violetten Komplex. Je 10 µl Suspension wurden 1:3 und 1:6 mit Isolationspuffer verdünnt und auf eine 96-well Platte pipettiert (10 µl), ebenso der im Pierce BCA Protein Kit (Thermo scientific) vorhandene Standard (Konzentrationen: 0; 0,1; 0,25; 0,33; 0,5; 1 mg/ml in Isolationspuffer). Hinzu kamen 200 µl des Detektionsreagenz (Reagenz A+B im Verhältnis 50:1). Nach kurzem Durchmischen wurde die Platte 30 min bei 37°C inkubiert (Smith et al. 1985, Wiechelman et al. 1988).

Die Messung erfolgte mit einem ELISA-Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm.

2.9.4 Qualitätskontrolle

Während der gesamten Prozedur der Homogenisierung bestand keinerlei Kontrolle, ob die Mitochondrien noch aktiv oder bereits geschädigt waren. Daher wurde vor der Absorptionsmessung die mitochondriale Atmung an der Sauerstoffelektrode überprüft. Hierfür wurden 20 µl der Zellsuspension in eine der Kammern des Oxygraphen injiziert und die Messung wie in Kapitel 2.8 beschrieben durchgeführt.

Untersucht wurde, ob die Mitochondrien eine Atmungsaktivität zeigten und nur einen geringfügigen Anstieg der Atmung nach Cytochrom c-Zugabe aufwiesen. Wurde ein Cytochrom c-Anstieg von über 15 % gemessen, so war dies ein Indiz für eine Schädigung bei der Aufarbeitung der Mitochondrien (Gnaiger und Kuznetsov 2002). Die Suspension wurde verworfen und der Versuch abgebrochen.

2.9.5 Absorptionsmessung

Die Absorptionsmessung zur Bestimmung der mitochondrialen Schwellung erfolgte am Aminco-Spektrometer als Zeitverlauf über 750 sec (Messintervall: 2 sec; Ex: 540 bp: 2 nm; Em: 540 bp: 2 nm). In eine gerührte Glasküvette wurden 1,1 ml Messpuffer (37°C) und 10 µl der auf Protein (27,5 µg/ml) normierten Mitochondrien-Suspension gegeben. Nach Zugabe von 5 mM Glutamat und 5 mM Malat folgte eine Inkubationszeit von 3 min, bevor die Messung startete (Protokoll nach Hansson et al. 2004):

Messprotokoll

0 sec	START nach Zugabe von Oligomycin (0,5 µl; 1 µg/ml)
60 sec	EtOH (2 µl) bzw. Cyclosporin A (2 µl; 2 µM)
120 sec	ADP (4,4 µl; 20 µM)
300 sec	Calciumchlorid (10 µl; 4 bzw. 8 µmol/mg Protein)
500 sec	Alamethicin (5,5 µl; 40 µg/mg Protein)
750 sec	ENDE

2.9.6 Neuroprotektive Behandlung

Bilobalid

Es wurden folgende Versuchsgruppen unterschieden:

In vitro

Mitochondrien unbehandelter Mäuse als Kontrolle.

Ex vivo

Die Mäuse erfuhren am Tag der Mitochondrien-Isolation eine 60-minütige MCAO (siehe 2.7.2). Direkt im Anschluss an die Reperfusion wurde die Maus dekapitiert und die Isolierung der Mitochondrien vorgenommen, jeweils separat für die rechte „gesunde“ und linke „ischämische“ Hemisphäre.

Einige zufällig ausgewählte Mäuse erhielten 1 h vor MCAO einmalig Bilobalid 10 mg/kg intraperitoneal verabreicht.

Die Versuche wurden sowohl für junge als auch für alte Tiere durchgeführt.

2.10 Messung von ATP und Membranpotential

Die photometrische Messung des ATP-Gehaltes und des Membranpotentials in dissoziierten Neuronen erlaubt eine Aussage über den Energiehaushalt in der Zelle.

2.10.1 Materialien

Material	Hersteller
Viktor X3	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Beckman Zentrifuge Allegra 6R	Beckman & Coulter GmbH, Krefeld, D
Brutschrank RS Biotech Galaxy A Mini	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Wasserbad 1003	GFL, Burgwedel, D
ATP-Kit LT 27-102/008	Lonza GmbH, Köln, D
Skalpell	Roth EX77.1
Pasteur-Pipetten 3,2 ml	Roth EA65.1
24-well Platte	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Filternetz Nylon (100/200 μm)	Sefar, Heiden, CH

Tabelle 2.19: Materialien für ATP-Gehalt und Membranpotential.

Inhaltsstoff	Gehalt
Natriumchlorid	138 mM
Kaliumchlorid	5,4 mM
Dinatriumhydrogenphosphat	0,17 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	0,22 mM
Glucose (Hydrat)	5,5 mM
Saccharose	58,4 mM

Tabelle 2.20: Zusammensetzung Medium 1; pH 7,35 bei 2-8°C.

Inhaltsstoff	Gehalt
Natriumchlorid	110 mM
Kaliumchlorid	5,3 mM
Calciumchlorid (Dihydrat)	1,8 mM
Magnesiumchlorid (Hexahydrat)	1 mM
Glucose (Hydrat)	25 mM
Saccharose	70 mM
HEPES	20 mM

Tabelle 2.21: Zusammensetzung Medium 2; pH 7,4 bei 2-8°C.

2.10.2 Isolation der dissoziierten Hirnzellen

Zur Gewinnung von dissoziierten Hirnzellen wurde eine Maus durch Überstrecken getötet und das Gehirn zügig entnommen. Die gesamte Präparation fand gekühlt auf Eis statt, um zellulären Stress weitestgehend zu vermeiden. Das Cerebellum wurde entfernt und die beiden Hemisphären voneinander getrennt. In allen folgenden Schritten wurden die Hemisphären separat voneinander aufbereitet. Eine Hemisphäre wurde zunächst in 6 ml Medium 1 (Tabelle 2.20) gewaschen, anschließend in ein Becherglas mit 2 ml Medium 1 überführt und dort mit einem Skalpell zerkleinert. Nach Zugabe von 2 ml Medium 1 wurde die grobe Hirnsuspension in einen selbstgebauten Filter (200 µm Porenweite, siehe Abbildung 2.26) überführt. Die Filter wurden hergestellt, indem eine 50-ml-Spritze am oberen Ende abgeschnitten und mit dem Filternetz überzogen wurde. Das Filternetz wurde durch eng anliegendes Klebeband fixiert. Durch den mit einer Pasteurpipette ausgeübten Druck wurde die grobe Hirnsuspension durch den Filter in ein neues Becherglas gepresst. Die Zugabe von 16 ml Medium 1 und eine erneute Filtration mit dem Feinfilter (100 µm Porenweite) ergab die gewünschte feine Zellsuspension.

Das 50-ml-Vial mit 20 ml Suspension wurde zentrifugiert (913 x g; 5 min; 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml Medium 2 (Tabelle 2.21) resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde dreimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 4,5 ml *Dulbecco's Modified Eagle-Medium* (DMEM) resuspendiert. Die Methode wurde beschrieben von Stoll und Müller 1991.



Abbildung 2.26: Selbstgebaute Filter.

2.10.3 ATP-Messung

Für die Messung des ATP-Gehaltes wurden die Proben und Reagenzien wie in Abbildung 2.27 gezeigt auf eine 96-Well-Platte pipettiert (die Angaben verstehen sich pro Well). Mit „Probe“ sind die in Kapitel 2.10.2 beschriebenen isolierten Hirnzellen bezeichnet. „DMEM“ ist das verwendete Zellmedium (*Dulbecco's Modified Eagle-Medium*). Der ATP-Standard stammte aus dem verwendeten ATP-Kit (LT, Lonza).

Sodiumnitroprussid (SNP; $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \times 2 \text{H}_2\text{O}$) sorgt durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) für oxidativen Stress in den Zellen und wird gezielt zur *in vitro* Schädigung eingesetzt. Durch Zugabe von 1 μl DMEM bzw. SNP (5 mM) erfolgte *in vitro* eine Unterscheidung in „ungeschädigte“ und „geschädigte“ dissoziierte Hirnzellen.

Die Platte wurde 3 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der in DMEM hergestellte ATP-Standard auf die Well-Platte pipettiert. Zu allen Wells wurden 25 μl Zell-Lyse Reagenz (aus ATP-Kit LT, Lonza) gegeben. Nach 10 min Inkubationszeit wurden in alle Wells 50 μl ATP-Mess-Reagenz (aus ATP-Kit LT, Lonza) pipettiert und nach 5 min Inkubationszeit erfolgte die Messung der ATP-Lumineszenz am UV-Spektrometer (Absorption: 490 nm; Emission: 535 nm).

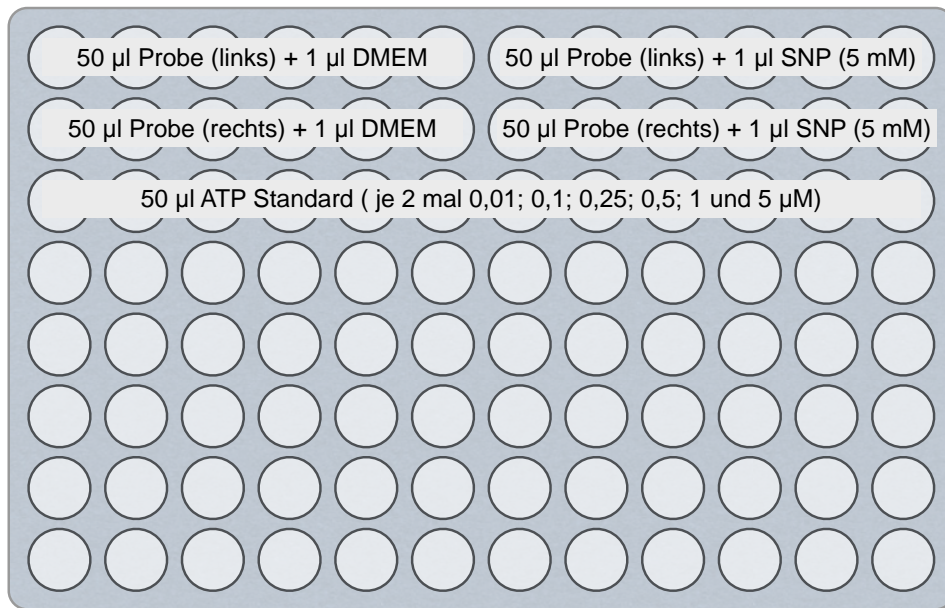


Abbildung 2.27: Pipettierschema zur ATP-Bestimmung.

2.10.4 Messung des Membranpotentials

Zur Messung des Membranpotentials wurden die Proben und Reagenzien wie in Abbildung 2.28 gezeigt auf eine 24-Well-Platte pipettiert (die Angaben verstehen sich pro Well). Mit „Probe“ sind die in Kapitel 2.10.2 beschriebenen isolierten Hirnzellen bezeichnet. „DMEM“ ist das verwendete Zellmedium (*Dulbecco's Modified Eagle-Medium*). Wie bereits in Kapitel 2.10.3 beschrieben, ist SNP (Sodiumnitroprussid) durch die Freisetzung von NO ein Generator von oxidativem Stress für die Zellen.

Die Platte wurde 3 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert, anschließend wurden zu allen Wells 5 μ l des Farbstoffes Rhodamin123 (20 μ M in *Hanks balanced salts solution*, HBSS) gegeben und 15 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von 250 μ l HBSS stoppte die Farbreaktion. Es wurde bei 1643 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in 250 μ l HBSS resuspendiert. Rhodamin123 lagert sich in die Zellmembranen ein, die Unterschiede in der Lumineszenz können bei einer Wellenlänge von 510 nm mit dem UV-Spektrometer gemessen werden (Emaus et al. 1986, Baracca et al. 2003, Foster et al. 2006).

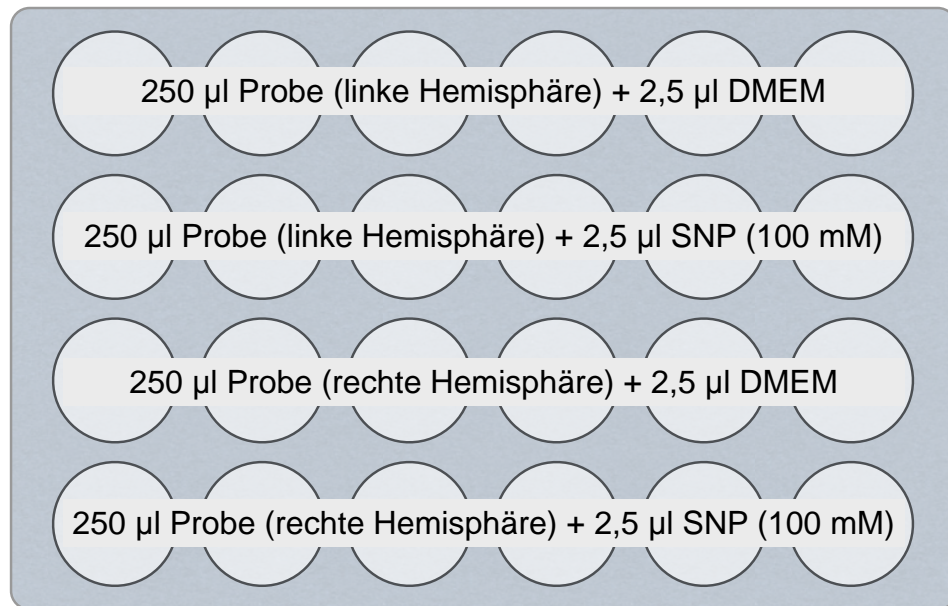


Abbildung 2.28: Pipettierschema zur Messung des Membranpotentials.

2.10.5 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry (siehe Kapitel 2.8.5) mit einer 1:7 Verdünnung der Proben.

2.10.6 Neuroprotektive Behandlung

Triheptanoin

Nach 14-tägiger Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät wurden die ATP-Spiegel und das Membranpotential in dissoziierten Hirnzellen bestimmt. Verglichen wurde eine Kontrollgruppe (ohne Ischämie) gegen eine MCAO-Gruppe (Hirnentnahme direkt nach 60 min Ischämie). Durch separate Aufarbeitung beider Hemisphären konnte letztere unterteilt werden in „gesunde“ (rechte) und „ischämische“ (linke) Hemisphäre. Zusätzlich zu der beschriebenen *in vivo*-Schädigung wurde durch Zugabe von SNP *in vitro* oxidativer Stress erzeugt.

2.11 Statistische Verfahren

Die Statistik der gezeigten Daten wurde mit dem Programm GraphPad Prism 5.0b (GraphPad Software, CA, USA) berechnet.

Der Vergleich innerhalb der Datensätze wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt.

Auswahl der geeigneten Statistikmethode

nicht parametrisch

One-way ANOVA nach Kruskal-Wallis mit Dunn post-Test	Vergleich von >2 Datensätzen
--	------------------------------

parametrisch

t-Test	Vergleich von 2 Datensätzen
t-Test mit Welch-Korrektur	Vergleich von 2 Datensätzen mit unterschiedlicher Standardabweichung
One-way ANOVA mit Dunnett post-Test	Vergleicht Datensätze mit der Kontrollgruppe
One-way ANOVA mit Bonferroni post-Test	Vergleich von >2 Datensätzen
Two-way ANOVA mit Bonferroni post-Test	Vergleich von Datenkurven

Zunächst wurde unterschieden, ob eine Verteilung der Daten nach Gauss (parametrisch) oder eine nicht parametrische Verteilung vorlag. Anschließend ergaben sich verschiedene Tests und post-Tests, je nachdem wie viele Datensätze untereinander verglichen wurden und auf welche Weise der Vergleich stattfinden sollte. Die Signifikanz von Zeitkurven wurde mit einem Two-way ANOVA bestimmt.

Für alle parametrischen Datensätze wurde in den Graphiken Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) abgebildet. Die nicht parametrischen Daten wurden als Median \pm Interquartilenabstand dargestellt.

2 Material & Methoden

Die errechneten Signifikanzstufen unterteilen sich wie folgt.

Signifikanzstufen		
*	$p < 0,05$	signifikant
**	$p < 0,01$	sehr signifikant
***	$p < 0,001$	hoch signifikant

2.12 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Forene (Isofluran)	Abbott, Wiesbaden, D
Narcoren (Pentobarbital)	Merck, Halbergmoos, D
Temgesic (Buprenorphin)	Essex Pharma, München, D
Natriumchlorid	Merck 1.06404
Kaliumchlorid	Merck 1.04936
Magnesiumchlorid (Hexahydrat)	Merck 1.05833
Calciumchlorid (Dihydrat)	Merck 1.02382
Natriumdihydrogenphosphat (Hydrat)	Merck 1.06346
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck 4873
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck 5101
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck 1.06586
Natrium-morpholino-propansulfonat (Na-MOPS)	Sigma M9381
Glucose (Hydrat)	Merck 1.08346
Saccharose	Merck 1.07697
Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure (HE-PES)	Alfa Aesar A16516
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck 1.08382
Trizma Base	Sigma T1503
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 937956	Life technologies, Darmstadt, D
Hanks balanced salts (HBSS)	Sigma H4891
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	Sigma T8877
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck 1.02952
Lactobionsäure	Sigma L2398
Taurin	Sigma T0625
Ethylenglycol-aminoethylether-tetraessigsäure(EGTA)	Sigma 8145
Natrium-Pyruvat	Sigma P2256
Oxybernsteinsäure (Malat)	Sigma M1000
Glutaminsäure (Glutamat)	Sigma G1626
ADP	Sigma A2383

Chemikalie	Hersteller
Natrium-Succinat	Sigma S2378
Cytochrom c	Sigma C6749
Oligomycin	Sigma O4876
Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxy-phenylhydrazon (FCCP)	Sigma C2920
Rotenon	Sigma R8875
Antimycin A	Sigma A8674
Tetramethyl-Phenylendiamin (TMPD)	Sigma T3134
Natrium-Ascorbat	Sigma A4034
Natrium-Azid	Sigma S8032
Bovines Serumalbumin	Sigma A6003
Complete Protease Inhibitor Tabletten	Roche diagnostics, Mannheim, D
Alamethicin	Sigma A4665
Cyclosporin A	Sigma 30024
Percoll	Sigma P1644
Sodium-nitroprussid (SNP)	Sigma 71778
Rhodamin 123	Sigma R8004
Ringer-Lactat	Delta Select, Rimbach, D
Ethanol	Merck 1.00983

Tabelle 2.22: Verwendete Chemikalien.

3 Ergebnisse

Die Messdaten und Ergebnisse der durchgeführten Schlaganfall-Experimente sind nachfolgend aufgezeigt. Zunächst ist eine kleine Versuchsreihe über die Veränderung von Blutgasen und -metaboliten dargestellt. Anschließend sind die Ergebnisse zum Wiederfindungswert der Mikrodialysesonden gezeigt.

Es folgen ausführliche Studien zur neuroprotektiven Wirkweise von Bilobalid an jungen sowie an alten Mäusen. Den Abschluss dieses Kapitels bilden die Resultate der Arbeit über die anaplerotische Wirkweise von Triheptanoin.

3.1 Blutanalyse

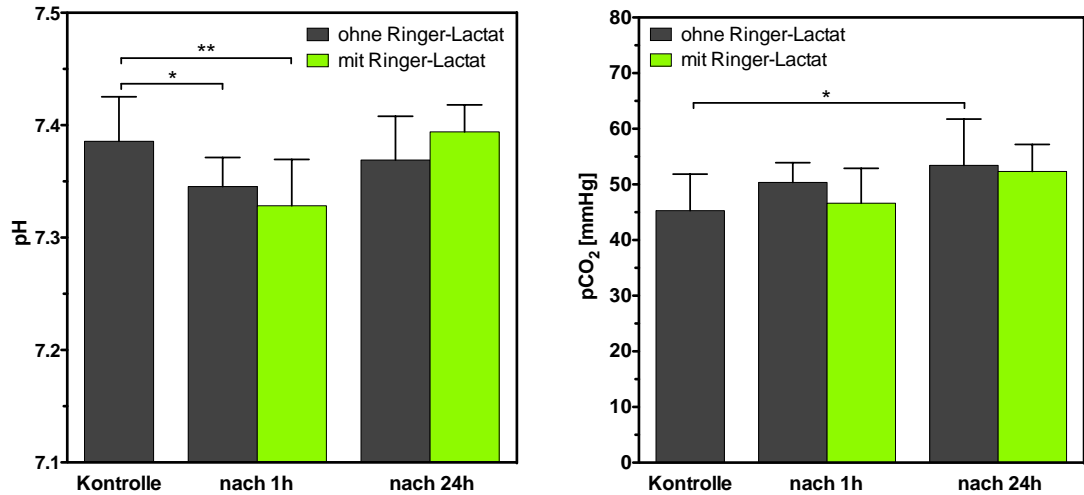
In venösem Blut wurden der pH-Wert sowie Konzentrationen an Blutgasen (Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid) und Blutparametern (Glucose und Lactat) bestimmt. Nach einer transienten Ischämie (60 min) wiesen die gesammelten Daten auf eine respiratorische Azidose hin: Der pH Wert (Abbildung 3.1(a)) wurde von 7,38 auf 7,34 vermindert, erholte sich jedoch nach 24 h. Die $p\text{CO}_2$ -Werte (Abbildung 3.1(b)) stiegen von 45,3 mmHg auf 50,4 mmHg. Sie blieben auch nach 24 h deutlich erhöht (53,4 mmHg). Eine Stunde nach Ischämie war der $p\text{O}_2$ -Wert von 40,2 mmHg auf 45,9 mmHg leicht erhöht (Abbildung 3.1(c)). 24 h nach transienter Ischämie erreichte der $p\text{O}_2$ -Wert wieder Kontrollniveau.

Bei einer Versuchsgruppe wurde direkt nach Reperfusion 1 ml Ringer-Lactat-Lösung intraperitoneal verabreicht, um das Blutvolumen wieder herzustellen und eine Azidose zu vermindern (Methode siehe Kapitel 2.3). Die gemessenen Blutgaswerte zeigten keine deutlichen Abweichungen zwischen den beiden Gruppen.

Untersucht wurden auch die venösen Konzentrationen an Glucose und Lactat nach permanenter Ischämie (Abbildung 3.2). Während der Schlaganfall-OP wurden die Mäuse entweder mit Isofluran (inhalativ) oder Pentobarbital (intraperitoneal) narkotisiert. Die

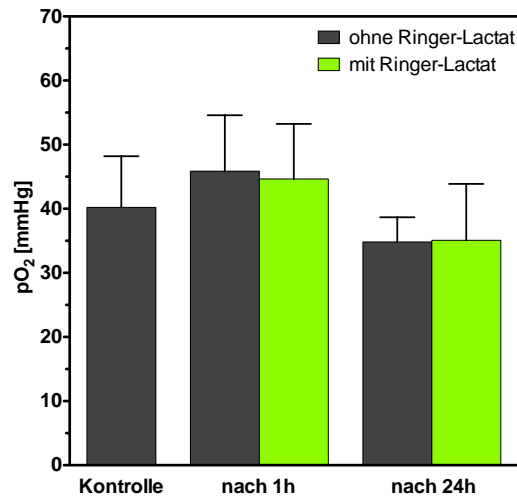
3 Ergebnisse

Inhalation von Isofluran hatte einen signifikanten Anstieg der Glucose- und Lactat-Werte 1 h nach Induktion des Schlaganfalls zur Folge (von 6,62 auf 8,29 mM bzw. von 2,80 auf 5,77 mM). In den nächsten 24 h erholten sich Blutparameter und erreichten wieder Kontrollniveau.



(a) pH Wert

(b) Kohlendioxid Partialdruck



(c) Sauerstoff Partialdruck

Abbildung 3.1: Einfluss von Ringer-Lactat Lösung auf die Blutgaswerte nach Ischämie. Die Blutgase pH, pCO₂ und pO₂ (in mmHg) wurden 1 h und 24 h nach 60-minütiger Ischämie gemessen. Direkt nach Reperfusion wurde bei der einen Gruppe Ringer-Lactat-Lösung (1 ml, i.p.) verabreicht. Statistik: N=6-13; Mittelwert \pm SD; **p<0,01; *p<0,05; One-way ANOVA mit Dunnett post-Test.

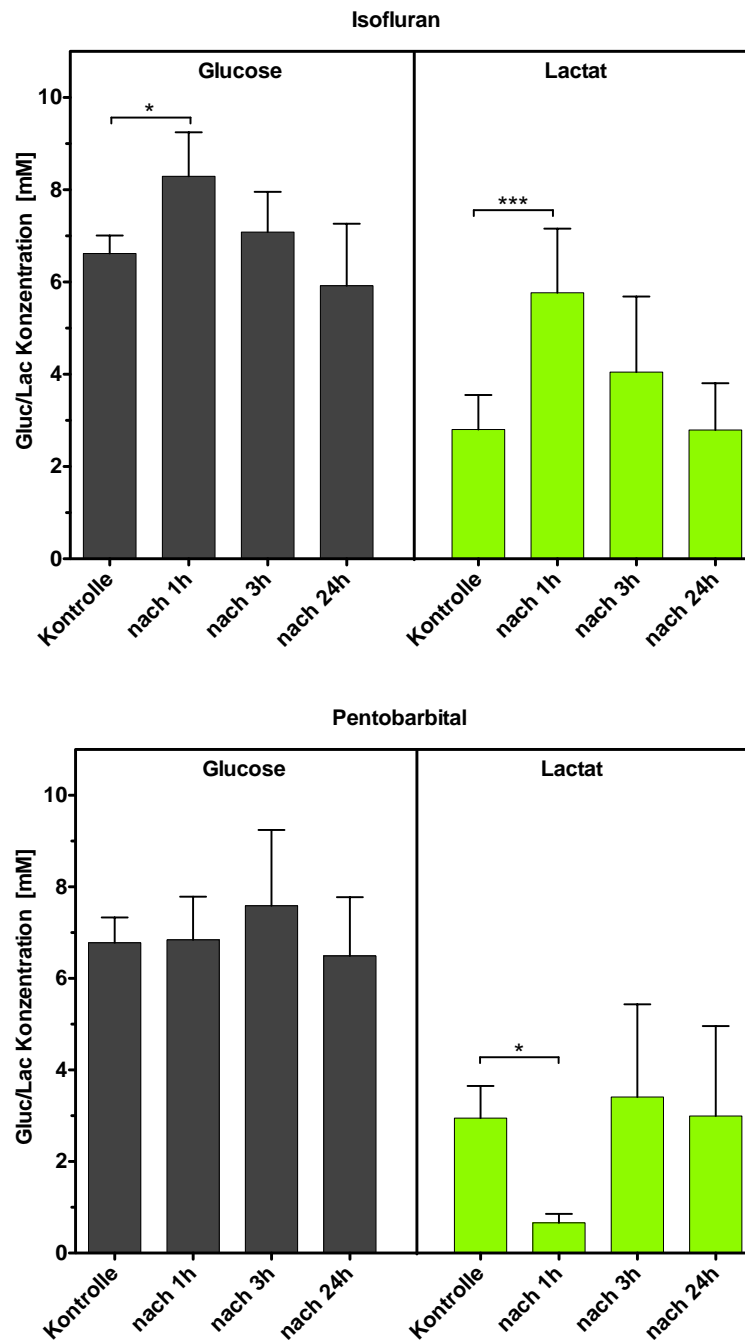


Abbildung 3.2: Einfluss des Anästhetikums auf die Blutparameter Glucose und Lactat nach Ischämie. Aufgetragen sind die Konzentrationen an Glucose und Lactat in mM im venösen Blut 1, 3 und 24 h nach Induktion eines permanenten Schlaganfalls. Die etwa 20-minütige Narkose wurde entweder mit Isofluran oder mit Pentobarbital ausgeführt. Statistik: N=5-11; Mittelwert \pm SD; *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; One-way ANOVA mit Dunnett post-Test.

3 Ergebnisse

Eine Pentobarbital-Narkose hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Blut-Glucose-Konzentrationen, jedoch bewirkte sie eine drastische Reduktion der Lactat-Konzentrationen 1 h nach Schlaganfall-OP (von 2,95 auf 0,66 mM). 24 h nach Induktion des permanenten Schlaganfalls waren die Werte bei 3 von 5 Tieren wieder auf Kontrollniveau zurückgekehrt. Die restlichen 2 Tiere hatten nach 24 h weiterhin erhöhte Lactat-Konzentrationen im Blut, woher die große Standardabweichung resultierte.

Eine ausführliche Studie über die Veränderungen von Blutgasen und -metaboliten während des ischämischen Schlaganfalls wurde unter Schwarzkopf et al. 2013b publiziert.

3.2 Wiederfindungswert

Der Wiederfindungswert der im Eigenbau hergestellten Mikrodialysesonden ist wichtig für die Abschätzung der tatsächlich vorkommenden Konzentrationen an Glucose und Glutamat im Extrazellularraum des Gehirns. Es wurde eine Lösung hergestellt, welche vergleichbare Konzentrationen an Glucose und Glutamat wie die Cerebrospinalflüssigkeit enthielt (siehe Tabelle 2.8). Der Anteil der dialysierten Metaboliten-Konzentration in Prozent ergab den Wiederfindungswert der verwendeten Sonde (Versuchsaufbau siehe Kapitel 2.6.4). Die im Eigenbau hergestellten Mikrodialysesonden wiesen einen gemittelten Wiederfindungswert von 18 % auf (siehe Abbildung 3.3).

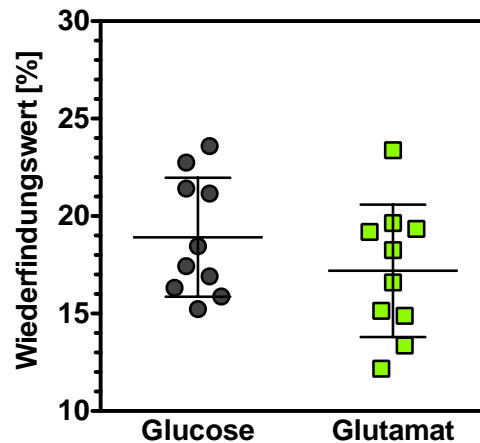


Abbildung 3.3: Wiederfindungswert der Mikrodialysesonden in Prozent. Dialysierte Glucose- und Glutamat-Konzentrationen wurden *in vitro* gemessen. Statistik: N=10; Mittelwert \pm SD.

3.3 Neuroprotektive Wirkung von Bilobalid

Im Folgenden sind die Versuche zur neuroprotektive Wirkung von Bilobalid bei 60-minütiger Ischämie (tMCAO) dargestellt. Bilobalid wurde eine Stunde vor Schlaganfall über die Mikrodialysesonde infundiert (10 μ M) oder intraperitoneal verabreicht (10 mg/kg).

Um Veränderungen im Alter zu untersuchen wurden die Versuche vergleichend bei jungen (6-8 Wochen) und alten (18-22 Monate) Mäusen durchgeführt.

3.3.1 Ausmaß des Schlaganfalls

24 h nach Schlaganfall wurde die Maus dekapitiert und das Hirn in 1 mm dicke Scheiben geschnitten. In den Schnitten 2, 3 und 4 (von vorne nach hinten gesehen) war der Bereich des Striatums zu sehen. Die TTC-Färbung ließ eine deutliche Unterscheidung zwischen geschädigtem und gesundem Gewebe zu: Der Farbstoff wurde von gesunden Mitochondrien verstoffwechselt und färbte sich rot, in ischämischem Gewebe verblieb er dagegen weiß (Methode siehe Kapitel 2.4.2).

In Abbildung 3.4 sind TTC-gefärbte Hirnschnitte von jungen Mäusen 24 h nach 60 min tMCAO dargestellt. Untereinander sind verschiedene Tiere, in Spalten jeweils die Schnitte 2-4 abgebildet. Deutlich zu sehen ist der weiße ischämische Bereich im Striatum. Teilweise weitete sich die Infarktregion bis in den Cortex aus. Die Hirne wurden von Mäusen gewonnen, welche während der Schlaganfall-OP mikrodialysiert wurden, daher ist in einigen Fotos die Eindringstelle der Mikrodialysesonde als rötlicher Strich zu sehen.

Die Hirnschnitte aus Abbildung 3.5 stammen von jungen Mäusen, welche *in vivo* mit Bilobalid 10 μ M behandelt wurden. Bilobalid wurde zusammen mit der Mikrodialyse-Flüssigkeit eine Stunde vor Schlaganfall lokal infundiert. Hierdurch war eine deutliche Reduktion der weißen Fläche zu sehen bzw. das Striatum nahm anstatt einer weißen eine rosa-rötliche Farbe an. Abgebildet sind sechs Beispielschnitte aus einer Versuchsgruppe von n=11 Mäusen (siehe auch Kapitel 3.3.3).

Die gleichen Beobachtungen sind für alte Tiere nach tMCAO mit und ohne Bilobalid-Behandlung in den Abbildungen 3.6 und 3.7 zu sehen. Verglichen mit den jungen Tieren war die Infarktgröße nach tMCAO (ohne Behandlung) bei den alten Mäusen wesentlich größer, jedoch auch variabler in der betroffenen Hirnregion.

3 Ergebnisse

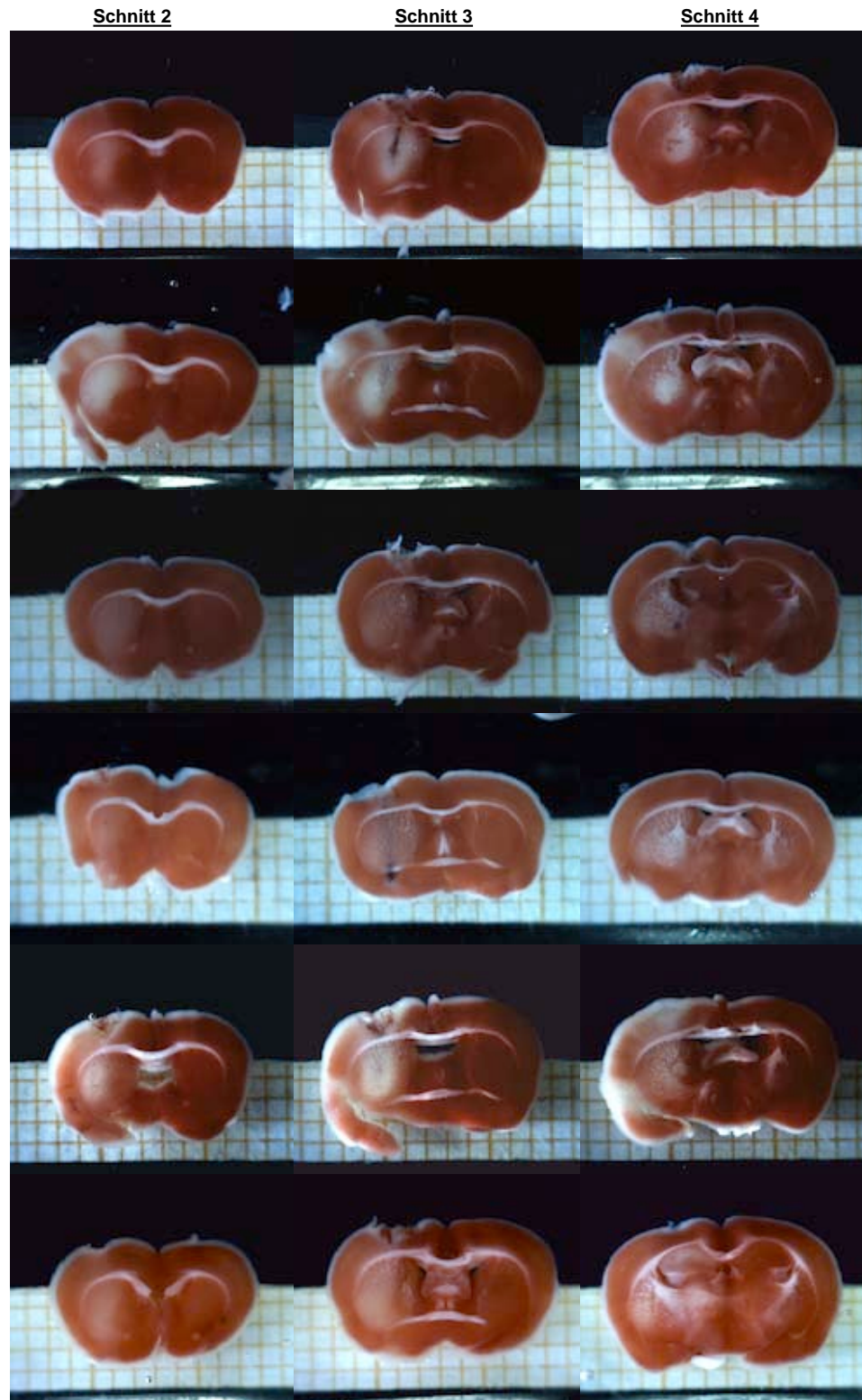


Abbildung 3.4: TTC-gefärbte Hirnschnitte 24 h nach 60 min tMCAO. In Spalten angeordnet jeweils die Schnitte 2-4 von 6 verschiedenen jungen Mäusen.

3.3 Neuroprotektive Wirkung von Bilobalid

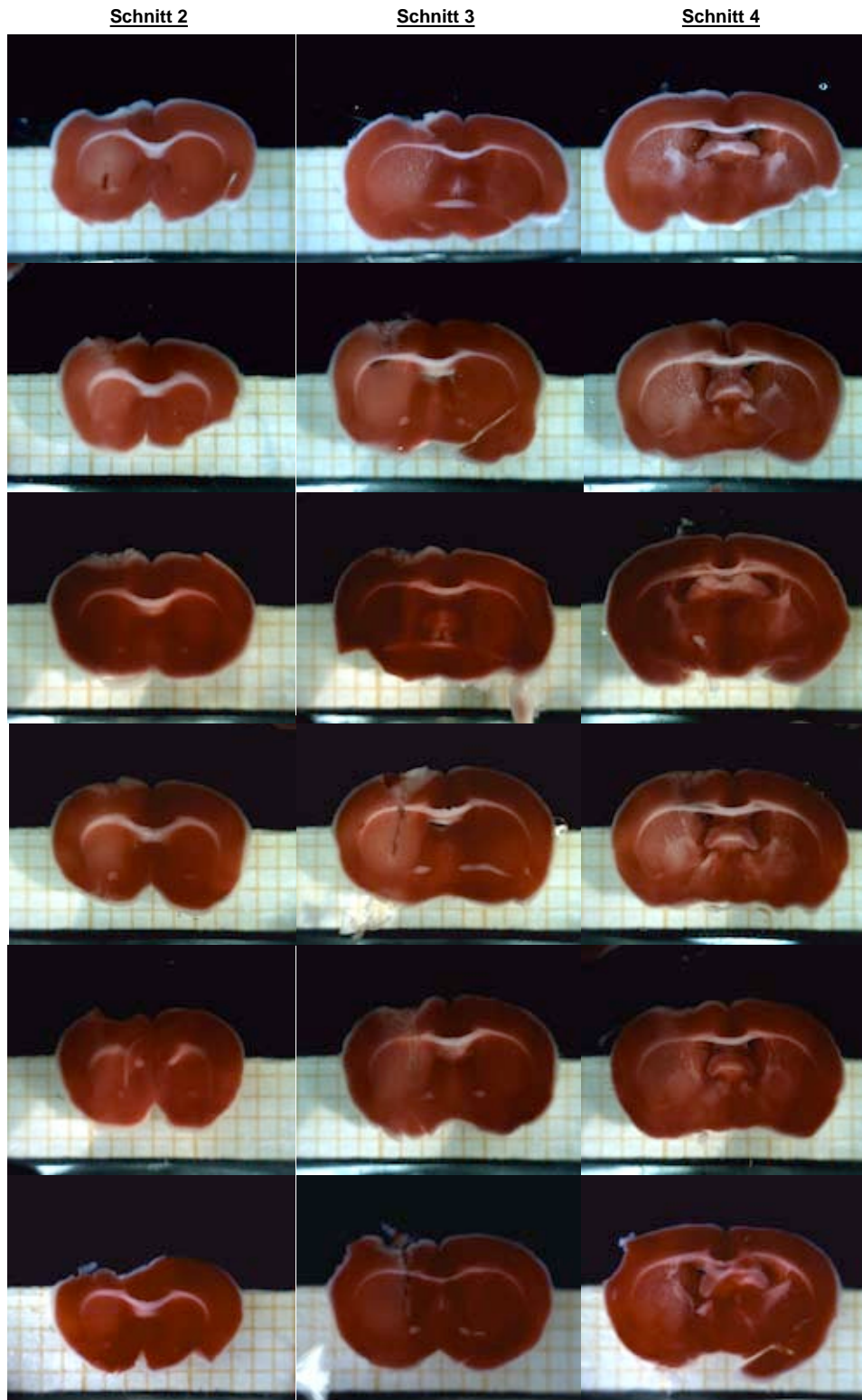


Abbildung 3.5: TTC-gefärbte Hirnschnitte 24 h nach 60 min tMCAO. In Spalten angeordnet jeweils die Schnitte 2-4 von 6 verschiedenen jungen Mäusen, behandelt mit Bilobalid 10 μ M.

3 Ergebnisse

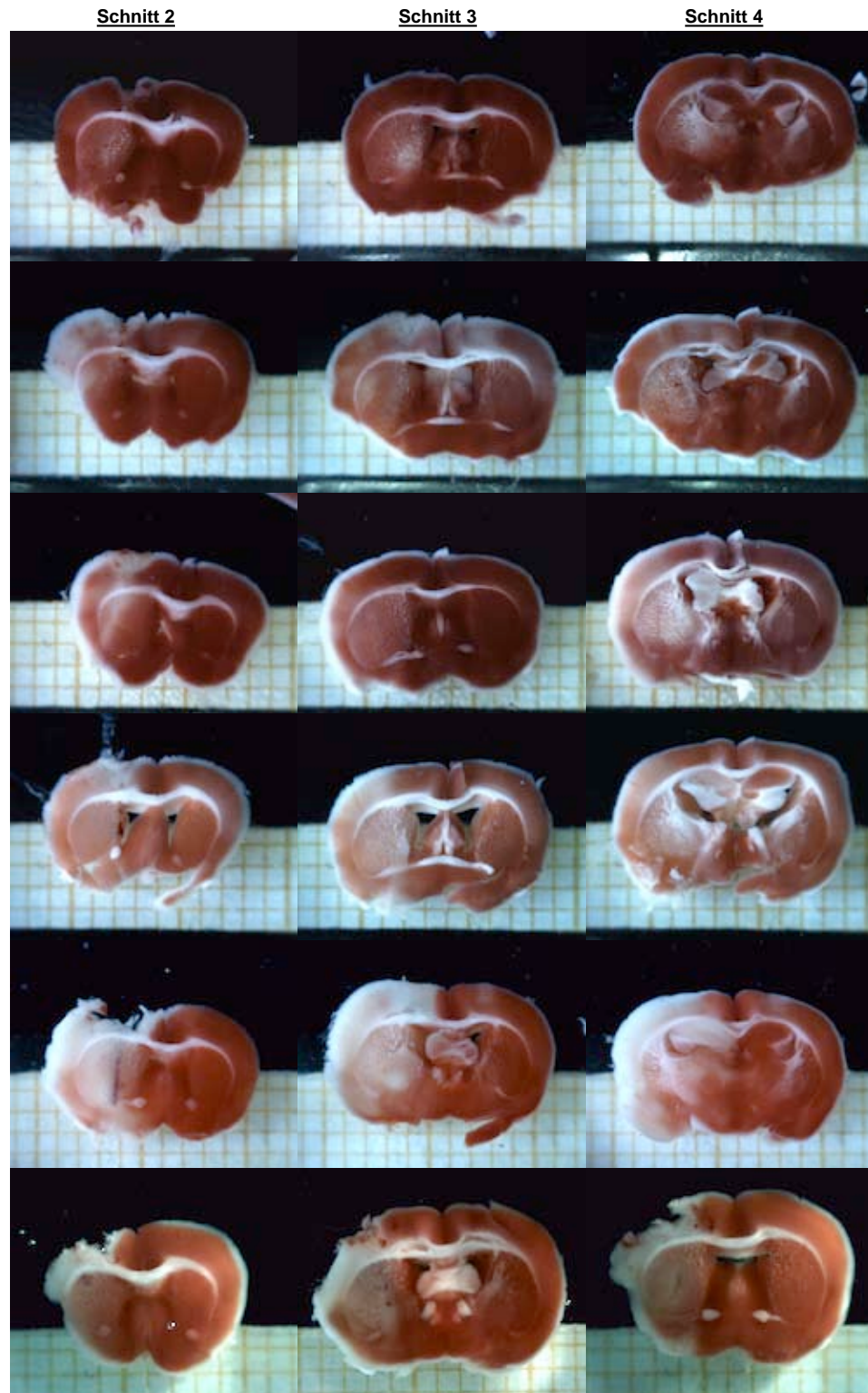


Abbildung 3.6: TTC-gefärbte Hirnschnitte 24 h nach 60 min tMCAO. In Spalten angeordnet jeweils die Schnitte 2-4 von 6 verschiedenen alten Mäusen.

3.3 Neuroprotektive Wirkung von Bilobalid



Abbildung 3.7: TTC-gefärbte Hirnschnitte 24 h nach 60 min tMCAO. In Spalten angeordnet jeweils die Schnitte 2-4 von 6 verschiedenen alten Mäusen, behandelt mit Bilobalid 10 μ M.

3 Ergebnisse

Bilobalid bewirkte auch bei alten Mäusen eine Reduktion der Infarktfläche. Abgebildet sind sechs Beispielschnitte aus einer Versuchsgruppe von n=7 Mäusen (siehe auch Kapitel 3.3.3).

In Abbildung 3.8 sind die Infarktflächen der betroffenen Hirnregion, ermittelt durch Image J (Version 1.42q, National Institutes of Health, USA), dargestellt. Vergleichend sind junge und alte Tiere jeweils mit und ohne Behandlung mit Bilobalid (Infusion, 10 μ M) aufgetragen. 24 h nach 60 min tMCAO wiesen die alten Tiere eine größere Infarktfläche von 12,03 mm² im Mittel auf, verglichen mit den jungen Mäusen (6,03 mm²). Die Behandlung mit Bilobalid bewirkte eine signifikante Reduktion der Infarktfläche auf 3,32 mm² bei den jungen und 3,47 mm² bei den alten Mäusen.

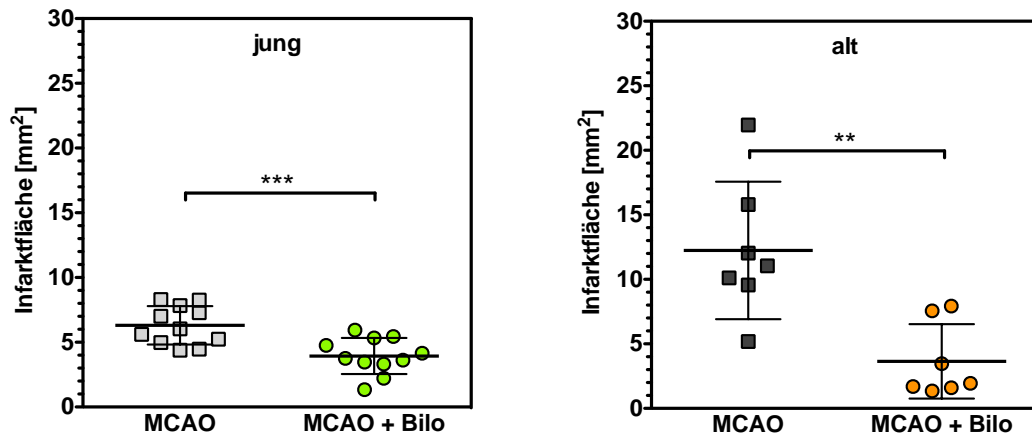


Abbildung 3.8: Infarktfläche ermittelt mit Image J. Aufgetragen ist die Fläche in mm² von unbehandelten sowie mit Bilobalid 10 μ M behandelten jungen und alten Mäusen 24 h nach 60 min tMCAO. Statistik: N=7-11; Mittelwert \pm SD; ***p<0,001; ** p<0,01; t-Test, für alte mit Welch-Korrektur.

3.3.2 Verhalten

Das Ausmaß des Infarktes wurde auch durch Verhaltenstests untersucht. Als motorische Tests eigneten sich Chimney, Rotarod und Corner Test (Durchführung siehe Kapitel 2.5). Die Tests wurden einen Tag vor und einen Tag nach einstündiger tMCAO durchgeführt. Eine Versuchsgruppe erhielt 1 h vor Induktion des Schlaganfalls Bilobalid (10 mg/kg) intraperitoneal verabreicht.

Die motorischen Tests wurden für junge und alte Mäuse vergleichend durchgeführt, wobei jedoch die Gruppe der jungen Mäuse mit Bilobalid-Behandlung ausgelassen wurde, da diese schon hinreichend von Dorothee Lang beschrieben wurden (Lang et al. 2011).

Die Ergebnisse der Verhaltenstests sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

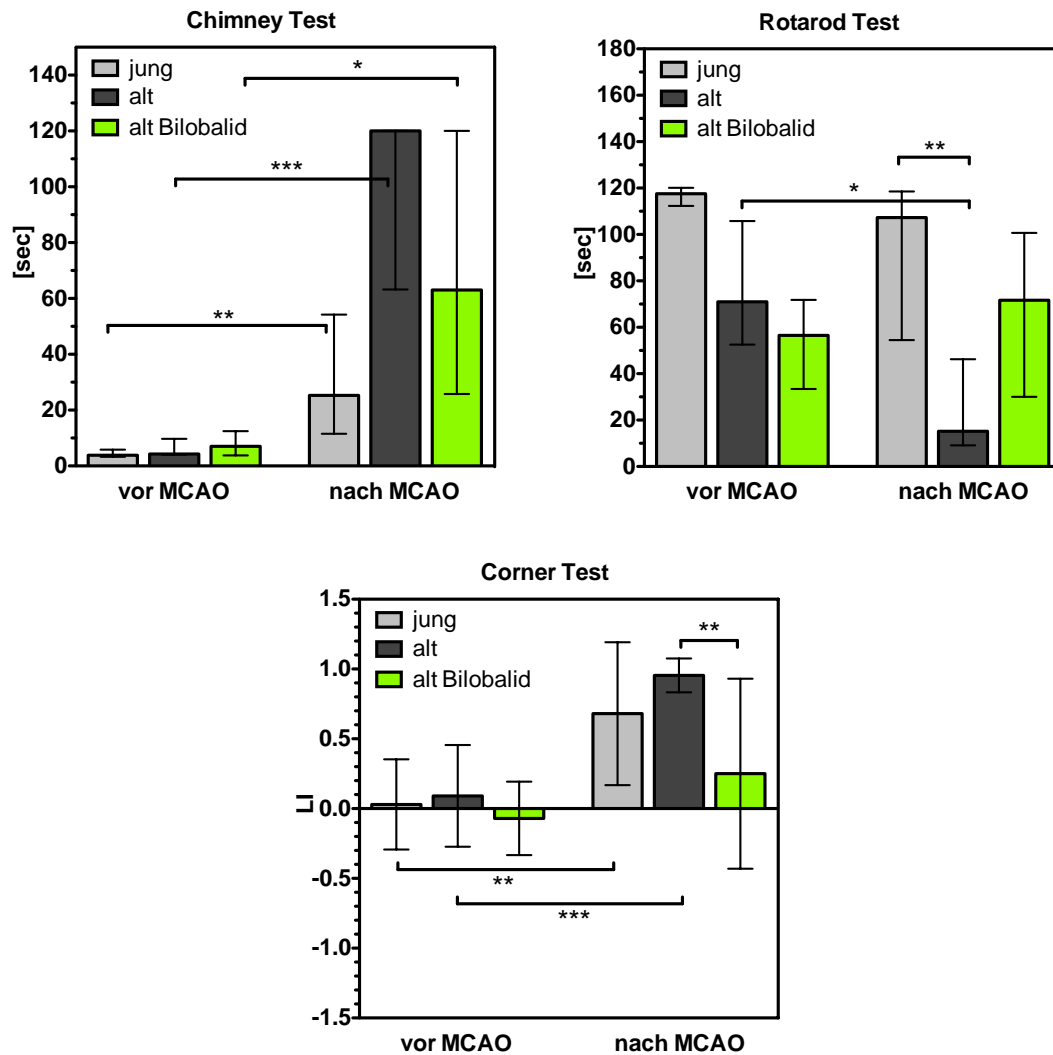


Abbildung 3.9: Motorische Verhaltenstests einen Tag vor und nach einstündiger Ischämie. Bilobalid wurde eine Stunde vor tMCAO verabreicht (10 mg/kg i.p.). Die Versuche wurden verglichen für junge und alte Mäuse durchgeführt. Statistik: N=8-11; „Chimney“ und „Rotarod“: nicht parametrisch: Median \pm Interquartilenabstand; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; One-way ANOVA nach Kruskal-Wallis mit Dunn post-Test; „Corner“: Mittelwert \pm SD; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; One-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

3 Ergebnisse

Im Chimney Test wurde gemessen, wie viel Zeit die Mäuse benötigten, um eine Röhre rückwärts zu verlassen. Hier war ein deutlicher Unterschied zwischen den motorischen Fähigkeiten junger und alter Mäuse sichtbar: Die alten Mäuse benötigten sowohl vor als auch nach Schlaganfall deutlich mehr Zeit zum Verlassen der Röhre als die jungen Mäuse. Eine 60-minütige MCAO bewirkte sowohl bei den jungen als auch bei den alten Mäusen einen starken Anstieg der benötigten Kletterzeit (jung: 25 statt 4 sec; alt: 120 statt 4 sec). Einigen Mäusen war es gar nicht mehr möglich, die Röhre zu verlassen. In diesem Fall wurde der Versuch nach 120 sec abgebrochen. Diese Mäusen erhielten den Wert „120 sec“ und unterschieden sich damit sehr von Mäusen, welche den Versuch absolvieren konnten. Das Resultat war ein großer Interquartilenabstand nach Schlaganfall. In der mit Bilobalid behandelten Gruppe war eine Tendenz, die Auswirkungen des Schlaganfalls zu vermindern, zu sehen, diese ist jedoch nicht signifikant (im Mittel 63 sec Kletterzeit).

Im Rotarod Test wurde die Zeit gemessen, welche eine Maus auf einer sich drehenden Walze verblieb. Bereits ohne Schlaganfall war es den alten Mäusen nicht möglich, bis zum Ende der Laufzeit (120 sec) auf der Walze zu bleiben. Sie schafften im Mittel 71 sec. 24 h nach tMCAO wurde bei den alten Tieren eine deutlich verkürzte Zeit gemessen (15 sec). Bilobalid bewirkte einen Anstieg der Laufzeit nach MCAO auf 71 sec.

Der Corner Test ist ein Maß für die einseitige motorische Beeinträchtigung. Die präferierte Drehrichtung der Mäuse wird bestimmt. Ein Lateralitätsindex (LI) von 0 steht für gleichermaßen viele Drehungen nach rechts und links. Nach Schlaganfall drehten sich die Mäuse durch die halbseitige Lähmung vermehrt um die linke Achse, was einem LI von 1 entspricht. Dies war auch in den Ergebnissen des Tests sichtbar: Vor Schlaganfall lag der LI aller Gruppen bei nahezu 0. Einen Tag nach 60 min tMCAO wurden vermehrt Linksdrehungen beobachtet (jung: LI = 0,68; alt: LI = 0,95). Die alten Mäuse schienen nach Schlaganfall auch in diesem Test schlechter abzuschneiden als die jungen Mäuse. Bilobalid bewirkte eine deutliche Verminderung der halbseitigen Lähmung, gemessen an den Drehungen zur linken Körperseite (LI = 0,25 im Mittel).

3.3.3 Schlaganfall und Mikrodialyse

Während eines ischämischen Schlaganfalls verändern sich viele Parameter im Gehirn, unter anderem die Konzentrationen von endogenen Stoffwechsel-Metaboliten. Besonders wichtig sind hierbei die extrazellulären Glucose- und Glutamat-Konzentrationen. Glucose kann bei unterbrochenem Blutfluss nicht mehr in die betroffene Region gelangen, so dass die Spiegel dramatisch sinken. Der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat tritt während der Ischämie in großen Mengen in den Extrazellularraum, was neurotoxische Auswirkungen hat (siehe Kapitel 1.3 und Lipton 2007). Die Veränderungen von Metaboliten im Gehirn während eines ischämischen Schlaganfalls wurde mittels Mikrodialysetechnik gemessen (Methoden siehe Kapitel 2.6 und 2.7).

In den Abbildungen 3.10 und 3.11 ist sowohl der dramatische Abfall an extrazellulärer Glucose bis auf das Detektionslimit von 0,02 mM als auch der extreme Anstieg von Glutamat auf bis zu 23,5 μ M bzw. 2000 % während der Ischämie junger Tiere gezeigt. Nach Reperfusion normalisierten sich die Konzentrationen der beiden Metaboliten innerhalb einer Stunde und erreichten Ausgangsniveau. Eine Behandlung mit Bilobalid 10 μ M, 1 h vor tMCAO über die Mikrodialysesonde infundiert, verminderte den Glutamat-Anstieg signifikant auf 6,5 μ M bzw. 550 %. Die Glucose-Werte wurden durch eine Behandlung mit Bilobalid nicht beeinflusst.

Hierzu im Vergleich zeigen die Abbildungen 3.12 und 3.13 die extrazellulären Konzentrationen an Glucose und Glutamat bei alten Tieren. Die Glucose-Kurven verliefen vergleichbar zu denen der jungen Tiere, mit einem Abfall während Ischämie auf das Detektionslimit von 0,02 mM. Auch die Glutamat-Spiegel erreichten bei unbehandelten Mäusen während der Ischämie ein Maximum von 20 μ M bzw. 1300 %. Mit Bilobalid 10 μ M, 1 h vor tMCAO über die Mikrodialysesonde infundiert, veränderten sich die Glucose-Spiegel nicht. Der Glutamat-Anstieg erfolgte weiterhin auf bis zu 18 μ M. Die Glutamat-Basalwerte scheinen mit Bilobalid-Behandlung leicht erhöht (weitere Untersuchungen siehe Abbildung 3.15). Aufgrund dessen ist auch bei den alten Tieren der Glutamat-Anstieg während Ischämie als Differenz zwischen Hochpunkt und Mittelwert der Basalwerte deutlich niedriger mit Bilobalid-Behandlung als ohne (auf 400 % statt 1300 %).

Zum direkten Vergleich sind die Mikrodialyse-Ergebnisse für Glutamat von jungen und alten Tieren in der Abbildungen 3.14 zusammengefasst dargestellt.

3 Ergebnisse

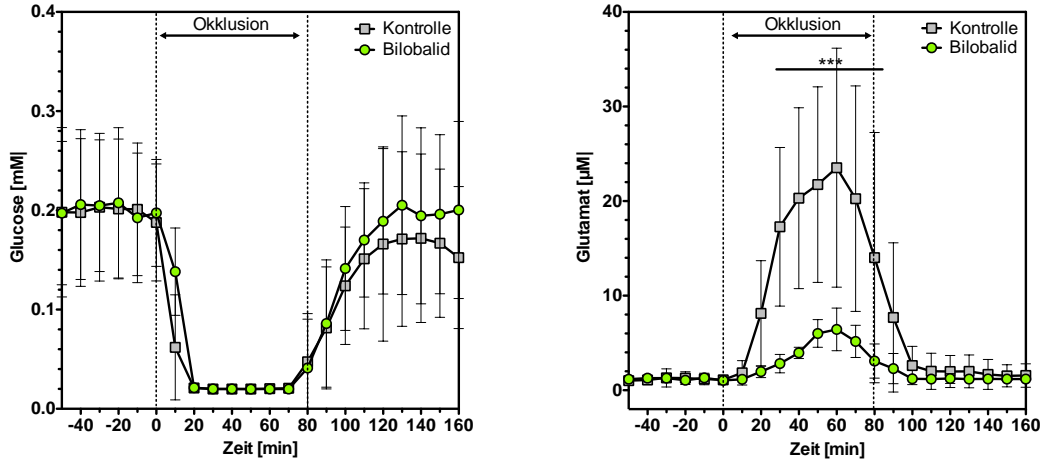


Abbildung 3.10: Extrazelluläre Konzentrationen von Glucose (mM) und Glutamat (μM) im Striatum während 60 min tMCAO. Vergleichend sind die Werte für unbehandelte und mit Bilobalid $10\ \mu\text{M}$ behandelte junge Mäuse gezeigt. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die Induktion des Schlaganfalls. Statistik: $N=11$; Mittelwert \pm SD; *** $p<0,001$; Two-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

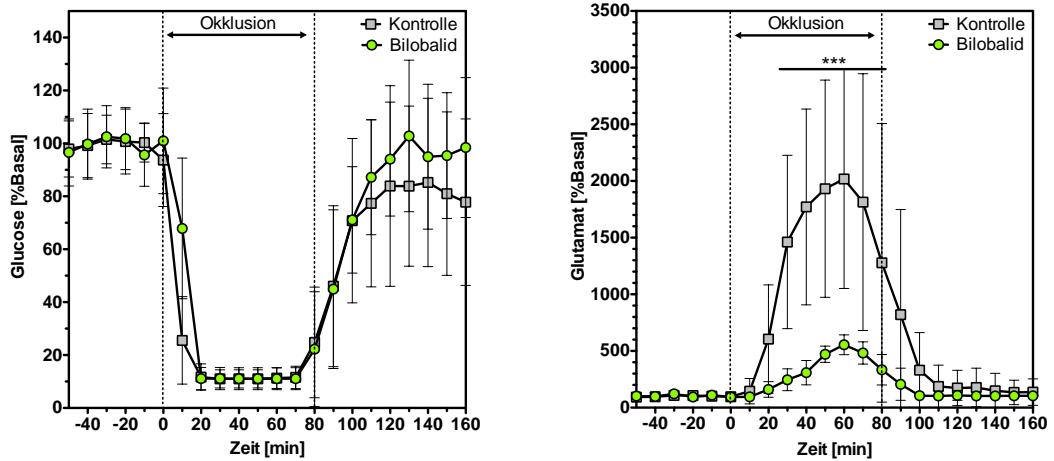


Abbildung 3.11: Extrazelluläre Konzentrationen von Glucose und Glutamat im Striatum während 60 min tMCAO prozentual bezogen auf den Mittelwert des Basalwertes. Vergleichend sind die Werte für unbehandelte und mit Bilobalid $10\ \mu\text{M}$ behandelte junge Mäuse gezeigt. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die Induktion des Schlaganfalls. Statistik: $N=11$; Mittelwert \pm SD; *** $p<0,001$; Two-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

3.3 Neuroprotektive Wirkung von Bilobalid

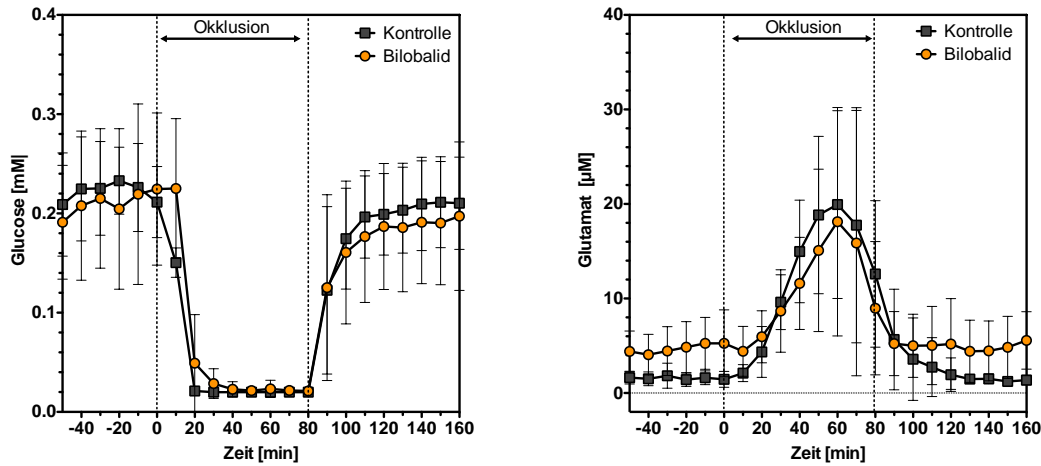


Abbildung 3.12: Extrazelluläre Konzentrationen von Glucose (mM) und Glutamat (μM) im Striatum während 60 min tMCAO. Vergleichend sind die Werte für unbehandelte und mit Bilobalid $10\ \mu\text{M}$ behandelte alte Mäuse gezeigt. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die Induktion des Schlaganfalls. Statistik: $N=7$; Mittelwert \pm SD.

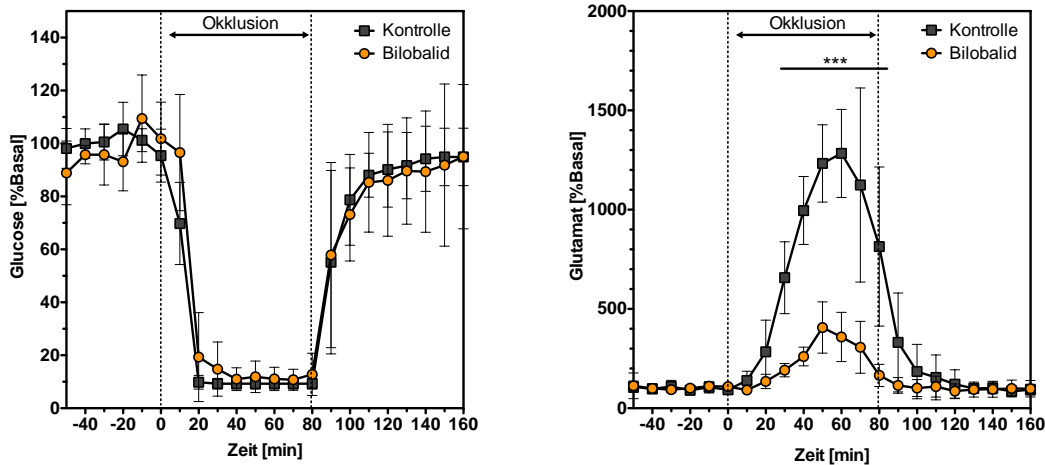


Abbildung 3.13: Extrazelluläre Konzentrationen von Glucose und Glutamat im Striatum während 60 min tMCAO prozentual bezogen auf den Mittelwert des Basalwertes. Vergleichend sind die Werte für unbehandelte und mit Bilobalid $10\ \mu\text{M}$ behandelte alte Mäuse gezeigt. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die Induktion des Schlaganfalls. Statistik: $N=7$; Mittelwert \pm SD; *** $p<0,001$; Two-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

3 Ergebnisse

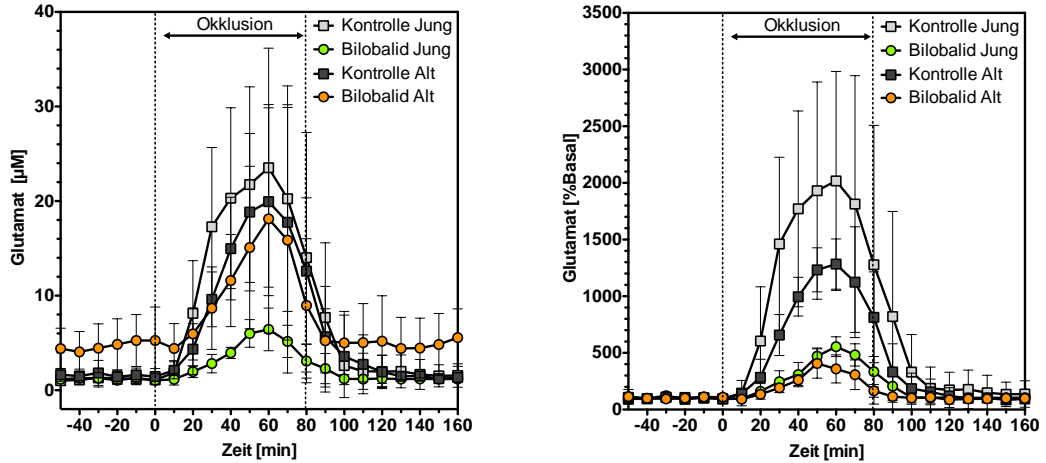


Abbildung 3.14: Extrazelluläre Konzentrationen von Glutamat (μM) im Striatum während 60 min tMCAO. Die Glutamat-Konzentrationen sind links absolut und rechts prozentual bezogen auf den Mittelwert des Basalwertes jeweils vergleichend für junge und alte Mäuse dargestellt. Eine Behandlung erfolgte mit Bilobalid $10\ \mu\text{M}$. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die Induktion des Schlaganfalls. Statistik: $N=7-11$; Mittelwert \pm SD; $***p<0,001$; Two-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

Ein Blick auf die basalen Konzentrationen an Glutamat bei alten Tieren (siehe Abbildung 3.12) ließ die Vermutung aufkommen, dass die Infusion von Bilobalid $10\ \mu\text{M}$ eine Erhöhung der basalen Glutamat-Spiegel zur Folge hatte. Diese Hypothese wurde mittels Mikrodialyse überprüft, indem bei alten Tieren zunächst über 70 min reines aCSF infundiert wurde. Anschließend wurde die Infusionslösung zu aCSF + Bilobalid ($10\ \mu\text{M}$) getauscht und für weitere 70 min Dialysate gesammelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 dargestellt.

Bilobalid $10\ \mu\text{M}$ bewirkte keinen Anstieg der Glutamat-Konzentrationen. Es wurde vielmehr deutlich, dass eine große Variabilität der Glutamat-Basalwerte vorherrschte.

Zur Kontrolle, ob die Okklusion der mittleren Cerebralarterie während der Schlaganfall-OP erfolgreich war, wurde der Blutfluss mittels Laser-Doppler durch das Schädeldach gemessen (siehe Kapitel 2.7.2). Eine Okklusion wurde als erfolgreich angesehen, wenn der Blutfluss auf $<20\%$ des Ausgangswertes gesunken war. Abbildung 3.16 zeigt die Doppler-Werte (willkürliche Einheit) von jungen und alten Mäusen vor, während und nach tMCAO.

3.3 Neuroprotektive Wirkung von Bilobalid

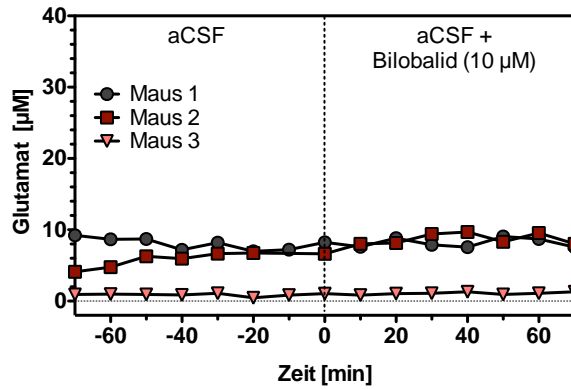


Abbildung 3.15: Basale Konzentrationen von Glutamat im Striatum von 3 einzelnen Mäusen. Es erfolgte eine Mikrodialyse über 70 min mit reinem aCSF, anschließend wurde zu aCSF + Bilobalid 10 μ M gewechselt.

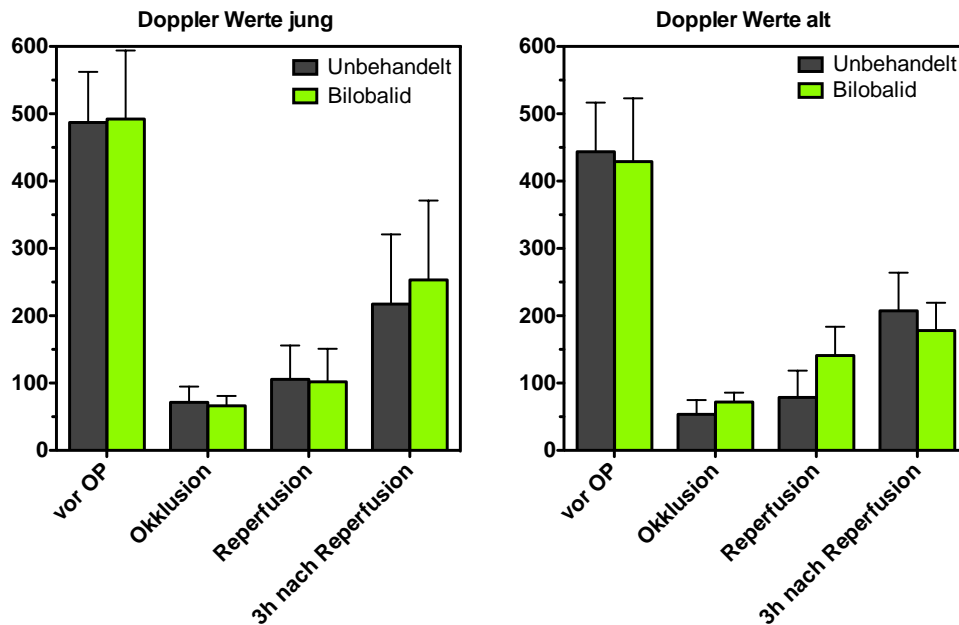


Abbildung 3.16: Laser-Doppler-Werte, die den Blutfluss im Bereich der MCA symbolisieren (willkürliche Einheit). Gemessen wurde vor, während und nach tMCAO, vergleichend für junge und alte Tiere. Bilobalid (10 μ M) wurde eine Stunde vor MCAO verabreicht. Statistik: N=7-23; Mittelwert \pm SD.

Junge Tiere hatten vor MCAO einen mittleren Doppler-Wert von 487. Dieser sank während Okklusion auf 71 (14 %) und stieg nach Reperfusion wieder auf 217 (45 % des Ausgangswertes). Der Blutfluss alter Tiere lag vor MCAO bei 443, während Okklusion bei 53 (12 %) und nach Reperfusion bei 207 (46 % des Ausgangswertes). Die Gabe von Bilobalid zeigte weder bei den jungen noch bei den alten Mäusen eine signifikante Auswirkung auf die Doppler-Werte.

3.3.4 Mitochondriale Atmung

Durch einen ischämischen Schlaganfall und dem daraus resultierenden Mangel an Sauerstoff und Glucose wird die mitochondriale Atmung beeinträchtigt. Diese Beeinträchtigung wurde mittels Oroboros Oxygraph in isolierten Mitochondrien analytisch bestimmt (Methode siehe Kapitel 2.8.3). Durch Zugabe von verschiedenen Substraten und Inhibitoren der Atmungskette konnte die Atmung der Komplexe I, II und IV ebenso wie verschiedene respiratorische Zustände bestimmt werden. Oxphos spiegelt hierbei die vollständige Atmung aller Komplexe wider, ETS den entkoppelten Zustand. Im Leak-Status treten Protonen durch die Membran unter Umgehung der ATP-Synthase (genauer siehe Kapitel 2.8.4). Gemessen wurde die Änderung im Sauerstoffgehalt in der isolierten Kammer des Oxygraphen, normiert auf den Proteingehalt der Probe.

Die Mitochondrien wurden aus Hirnhomogenat von jungen und alten Tieren gewonnen, so dass einerseits der Einfluss einer Bilobalid-Gabe und andererseits altersbedingte Veränderungen vermessen wurden.

In Abbildung 3.17 ist die mitochondriale Atmung der jungen und alten Kontrolltiere (ohne Bilobalid-Behandlung) zu sehen. Für die *in vitro*-Ergebnisse wurden die Mitochondrien ohne vorherige Behandlung der Maus isoliert; *ex vivo*-Mitochondrien stammten von Tieren, welche zuvor eine einstündige Ischämie erfuhren, wobei zwischen gesunder und ischämischer Hemisphäre unterschieden wurde (Methode siehe Kapitel 2.8.3).

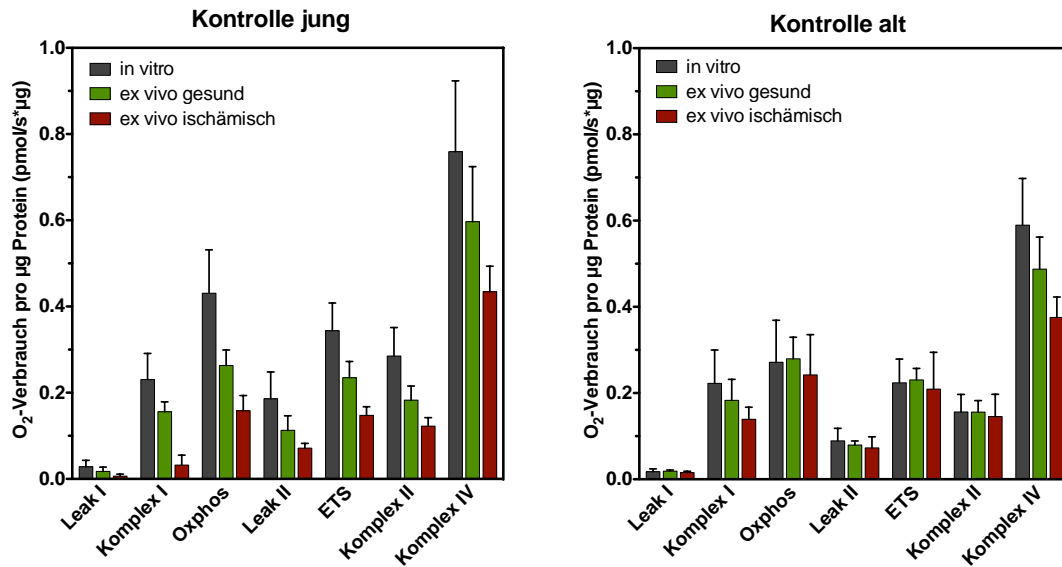


Abbildung 3.17: Mitochondriale Atmung der Kontrolltiere als Sauerstoff-Verbrauch, normiert auf Protein. Respiratorische Zustände wie Komplex- und Leak-Atmung, sowie ETS und Oxphos wurden in unbehandelten und *ex vivo* ischämischen Mitochondrien untersucht. Letztere untergliedern sich in direkt betroffene „ischämische“ und von der contralateralen Hemisphäre stammende „gesunde“ Mitochondrien. Statistik: N=5-11; Mittelwert \pm SD.

Die Versuchsgruppe der unbehandelten *in vitro*-Mitochondrien von jungen Tieren zeigte in allen respiratorischen Zuständen die höchste Atmung. Die nach einstündiger Ischämie isolierten Mitochondrien waren verglichen mit den unbehandelten deutlich geschädigt, wobei die vermeintlich gesunde Hemisphäre eine moderate Reduktion und die ischämische Hemisphäre, in welcher der Schlaganfall stattfand, eine hoch signifikante Verminderung der mitochondrialen Atmung zeigte. Komplex I zeigte hierbei die drastischste Reduktion des Sauerstoff-Verbrauchs nach Ischämie.

Die mitochondriale Atmungsaktivität der alten Tiere war in allen vermessenen respiratorischen Zuständen deutlich niedriger als die der jungen Tiere. Interessanterweise zeigten die alten Tieren keine so deutliche Reduktion des mitochondrialen Sauerstoff-Verbrauchs nach Ischämie. Allein in Komplex I und IV wies die „ischämische Hemisphäre“ nach MCAO eine signifikant verminderte respiratorische Aktivität auf.

Abbildung 3.18 zeigt den Originalgraphen zweier Messungen der mitochondrialen Atmung nach einstündiger Ischämie.

3 Ergebnisse

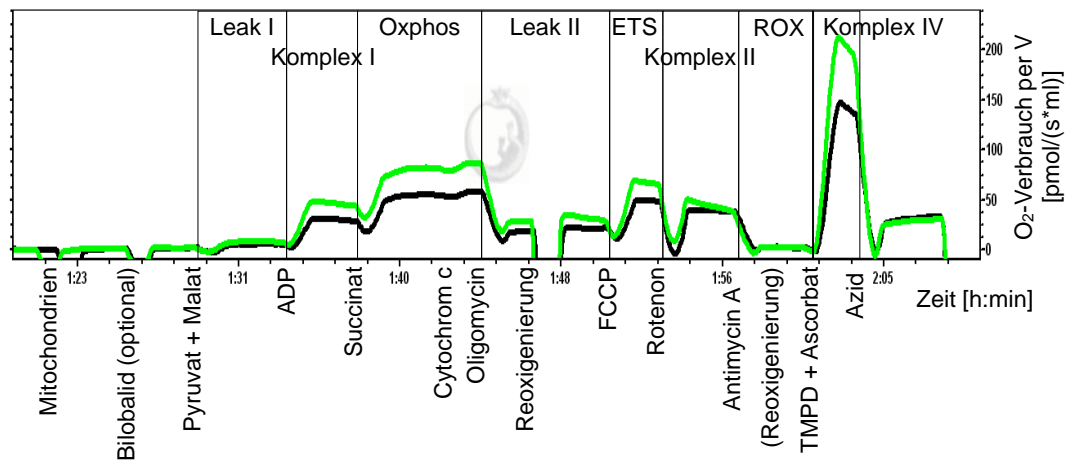


Abbildung 3.18: Originalgraph der Messung der mitochondrialen Atmung nach einstündiger Ischämie *ex vivo*. Abgebildet ist der Sauerstoff-Verbrauch während der Messung nach Zugabe verschiedener Substrate und Inhibitoren der Atmungskette. Verglichen wurde die gesunde (grün) mit der ischämischen (schwarz) Hemisphäre.

Der Einfluss von Bilobalid auf die mitochondriale Atmung ist in den Abbildungen 3.19, 3.20 und 3.21 dargestellt. Bilobalid wurde entweder direkt vor der Messung im Oxygraphen zu der mitochondrialen Suspension gegeben (10 μM) oder eine Stunde vor MCAO der Maus intraperitoneal verabreicht (10 mg/kg). Wie bereits zuvor erwähnt, war die Atmung bei jungen Tieren nach Ischämie in der gesunden Hemisphäre moderat und in der ischämischen Hemisphäre deutlich beeinträchtigt (in Komplex I von 0,214 auf 0,156 pmol/s* μg bzw. auf 0,033 pmol/s* μg). Die direkte Zugabe von Bilobalid in die Kammer des Oxygraphen bewirkte eine Verdoppelung der Komplex I-Atmung (0,058 pmol/s* μg). Durch intraperitoneale Vorbehandlung mit Bilobalid wurde eine Verdreifachung der mitochondrialen Atmungsaktivität von Komplex I erreicht (0,094 pmol/s* μg), im Vergleich zur Kontrolle (0,033 pmol/s* μg).

Bei den alten Tieren bewirkte Bilobalid keine signifikante Verbesserung der mitochondrialen Atmungsaktivität nach Ischämie.

3.3 Neuroprotektive Wirkung von Bilobalid

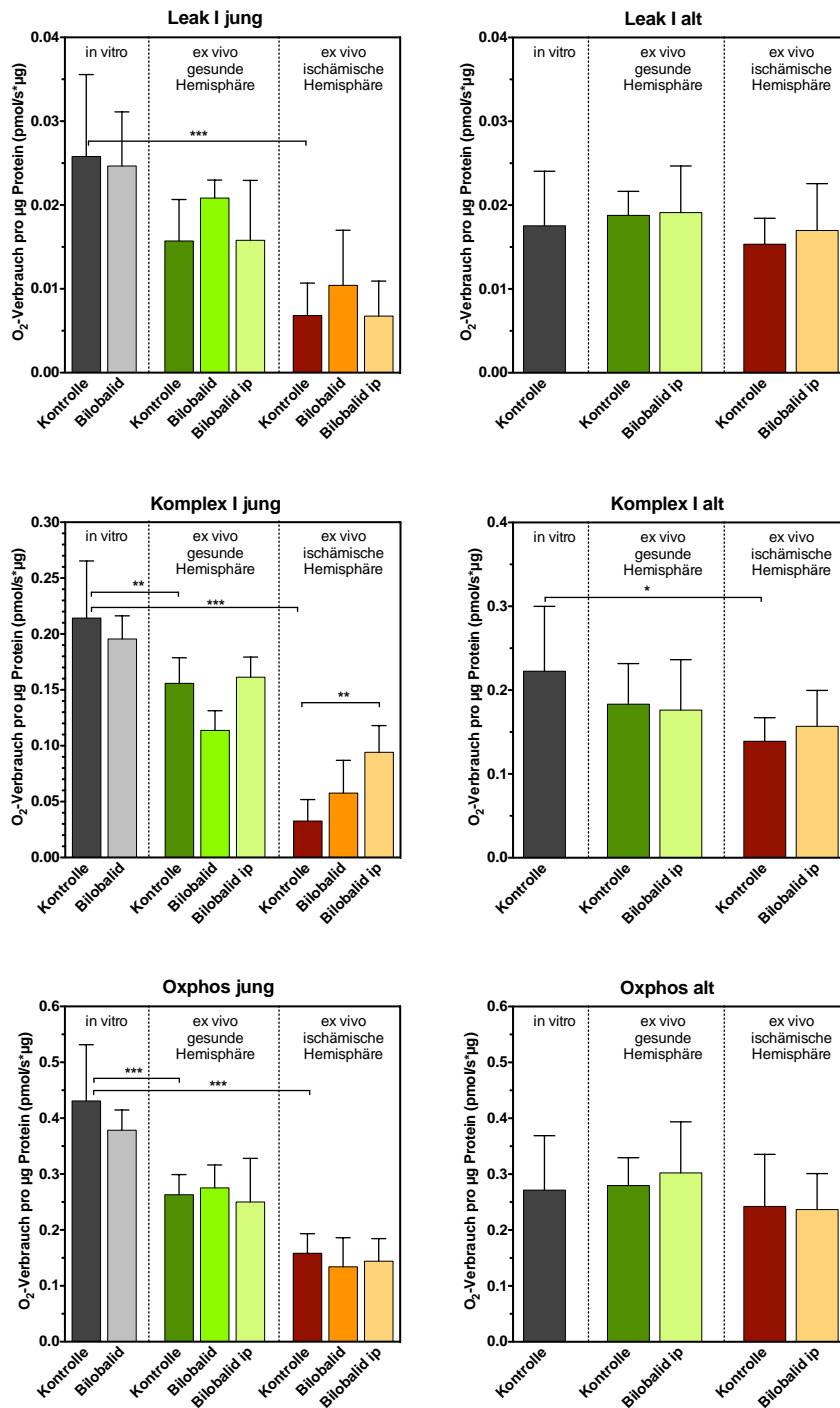


Abbildung 3.19: Bilobalid-Wirkung auf Leak I-, Komplex I- und Oxphos-Status der mitochondrialen Atmungskette in Sauerstoff-Verbrauch, normiert auf Protein, untersucht in unbehandelten und *ex vivo* ischämischen Mitochondrien (untergliedert in gesunde und ischämische Hemisphäre). Bilobalid wurde entweder direkt vor der Messung in die mitochondriale Suspension gegeben (10 μ M; „Bilobalid“) oder eine Stunde vor MCAO intraperitoneal verabreicht (10 mg/kg; „Bilobalid ip“). Statistik: N=5-11; Mittelwert \pm SD; ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05; One-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

3 Ergebnisse

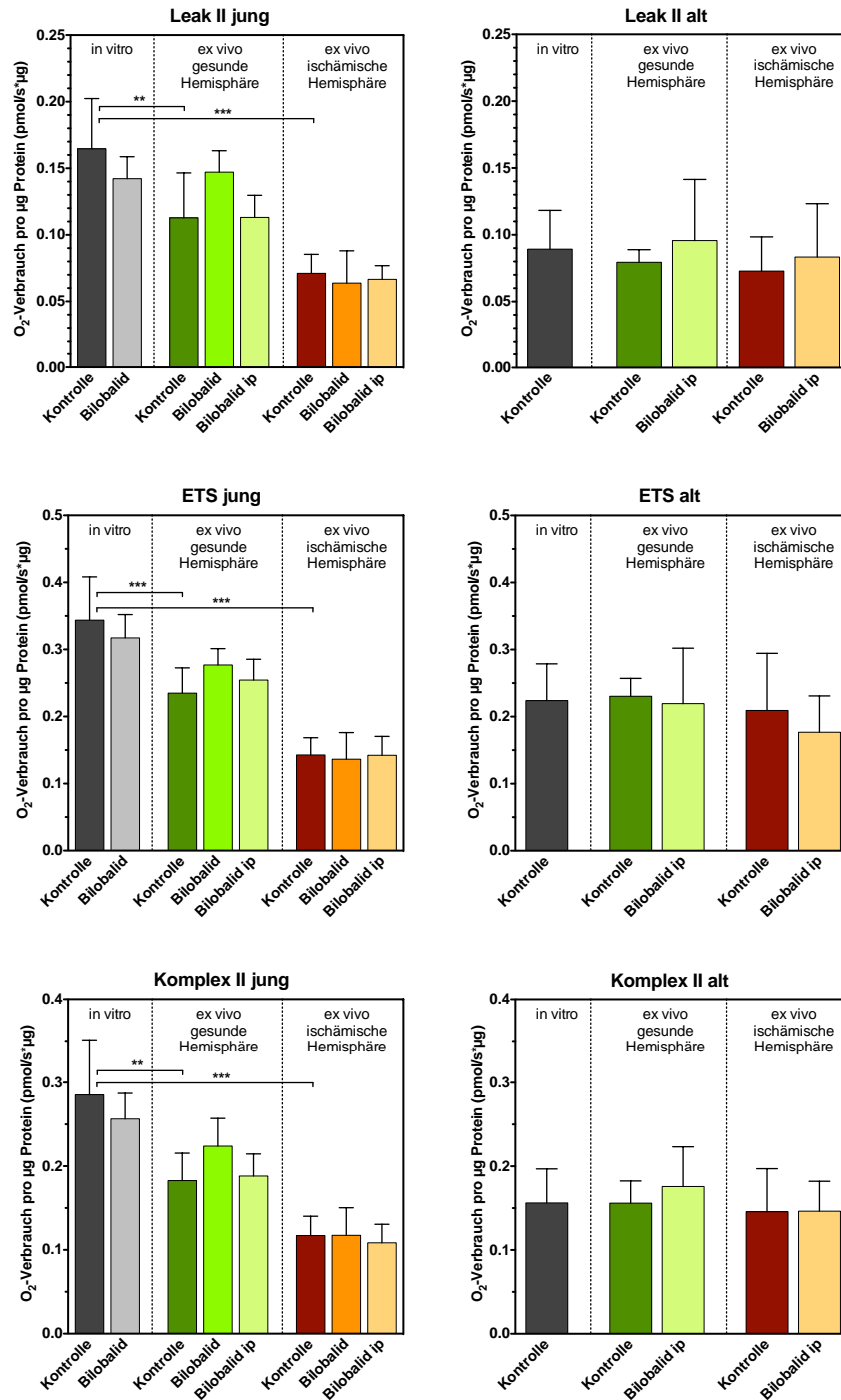


Abbildung 3.20: Bilobalid-Wirkung auf Leak II-, ETS- und Komplex II-Status der mitochondrialen Atmungskette in Sauerstoff-Verbrauch, normiert auf Protein, untersucht in unbehandelten und *ex vivo* ischämischen Mitochondrien (untergliedert in gesunde und ischämische Hemisphäre). Bilobalid wurde entweder direkt vor der Messung in die mitochondriale Suspension gegeben (10 µM; „Bilobalid“) oder eine Stunde vor MCAO intraperitoneal verabreicht (10 mg/kg; „Bilobalid ip“). Statistik: N=5-11; Mittelwert ± SD; ***p<0,001; **p<0,01; One-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

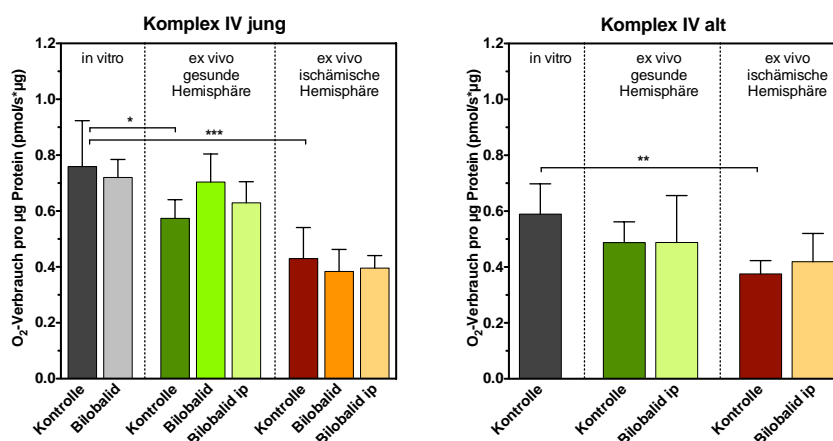


Abbildung 3.21: Bilobalid-Wirkung auf Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette in Sauerstoff-Verbrauch, normiert auf Protein, untersucht in unbehandelten und *ex vivo* ischämischen Mitochondrien (untergliedert in gesunde und ischämische Hemisphäre). Bilobalid wurde entweder direkt vor der Messung in die mitochondriale Suspension gegeben (10 µM; „Bilobalid“) oder eine Stunde vor MCAO intraperitoneal verabreicht (10 mg/kg; „Bilobalid ip“). Statistik: N=5-11; Mittelwert ± SD; ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05; One-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

3.3.5 Mitochondriale Schwellung

Die als Apoptosemarker bekannte mitochondriale Schwellung kann durch eine gravierende Ischämie ausgelöst werden. Ein wichtiger Schritt ist hierbei das Öffnen der mPT-Pore, durch welche kleinere Moleküle die sonst undurchlässige Mitochondrienmembran passieren können. Durch den herrschenden osmotischen Druck schwillt das Mitochondrium an, was seine Funktion stark beeinträchtigt (siehe Kapitel 2.9).

Das Ausmaß der Schwellung konnte mit einem Photometer vermessen werden, da sich die Absorption der mitochondrialen Lösung durch die Schwellung ändert. Induziert wurde das Öffnen der mPT-Pore durch hohe Dosen an Calciumchlorid (4 bzw. 8 µmol/mg Protein). Die Mitochondrien wurden wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben gewonnen, wobei zwischen gesunden Mitochondrien ohne vorherige Behandlung und *ex vivo* gewonnenen Mitochondrien der gesunden und ischämischen Hemisphäre nach 60 min tMCAO unterschieden wurde. Bilobalid (10 mg/kg) wurde eine Stunde vor Schlaganfall intraperitoneal verabreicht.

3 Ergebnisse

In Abbildung 3.22 ist das prozentuale Ausmaß der Schwellung, induziert durch Calciumchlorid zu sehen. Die Ischämie verminderte das Ausmaß der Schwellung deutlich, verglichen mit der Kontrolle (Ca 4: von 28,03% Kontrolle auf 23,09% bzw. 18,64% in gesunder und ischämischer Hemisphäre nach MCAO). Die ischämische Hemisphäre war jedoch im Vergleich zur gesunden nur moderat stärker betroffen. Mit Bilobalid-Behandlung erreichten die Schwellungs-Werte wieder nahezu Kontrollniveau (Ca 4: 30,19% bzw. 28,59% in gesunder und ischämischer Hemisphäre nach MCAO). Diese Beobachtungen galten für beide getesteten Konzentrationen an Calciumchlorid. Wie zu erwarten, waren die Mitochondrien, welche mit 8 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein Calciumchlorid behandelt wurden, stärker von der Schwellung betroffen, als die mit 4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein Calciumchlorid behandelten.

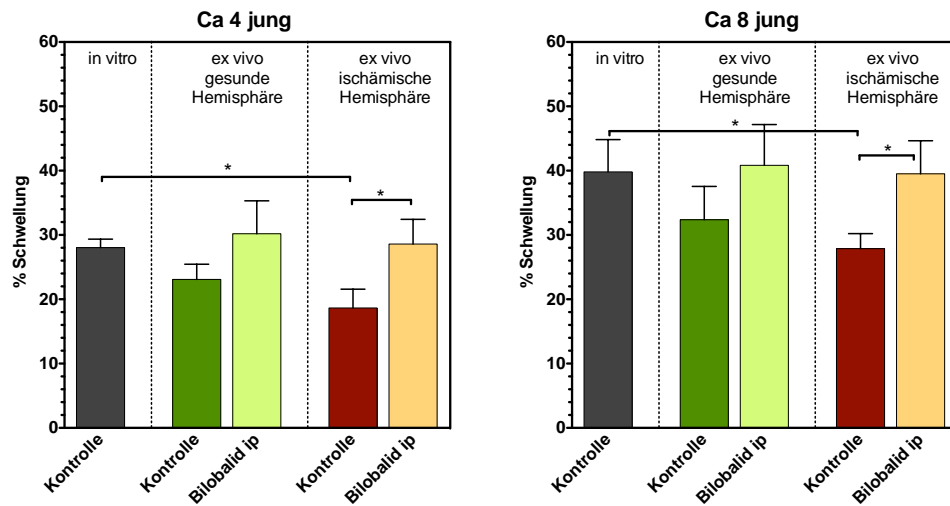


Abbildung 3.22: Mitochondriale Schwellung junger Tiere in Prozent, induziert durch Calciumchlorid (4 bzw. 8 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein). Mitochondrien der Kontrolltiere wurden *in vitro* gewonnen. Von Tieren nach 60-minütigem Schlaganfall stammten die „*ex vivo*“-Mitochondrien, unterteilt in gesunde und ischämische Hemisphäre. Bilobalid (10 mg/kg) wurde eine Stunde vor MCAO intraperitoneal verabreicht. Statistik: N=4; Mittelwert \pm SD; * $p < 0,05$; One-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

Cyclosporin A (CsA) ist ein Hemmstoff der mPT-Pore (Crompton 1999). Die in Abbildung 3.23 dargestellten Werte repräsentieren demnach die Schwellung bzw. Absorptionsänderung, welche ohne Beteiligung der mPT-Pore erzeugt wurde.

In Abbildung 3.24 sind Verlaufsgraphen des mitochondrialen Schwellungsversuchs zu

sehen. Hier wird noch einmal graphisch deutlich, dass die Schwellung nach Behandlung mit Bilobalid (10 mg/kg) wieder Kontrollniveau erreichte.

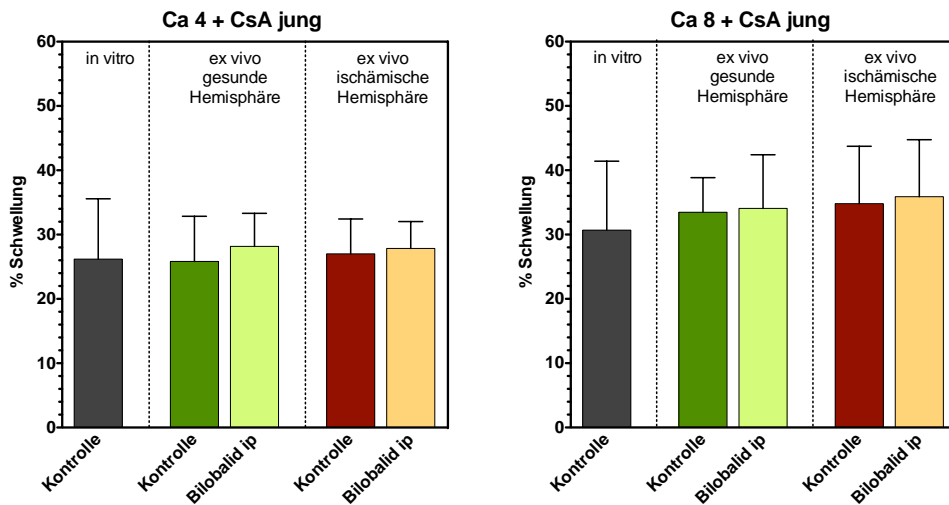


Abbildung 3.23: Mitochondriale Schwellung junger Tiere in Prozent, gehemmt durch Cyclosporin A (1 μ M). Mitochondrien der Kontrolltiere wurden *in vitro* gewonnen. Von Tieren nach 60-minütigem Schlaganfall stammten die „*ex vivo*“-Mitochondrien, unterteilt in gesunde und ischämische Hemisphäre. Bilobalid (10 mg/kg) wurde eine Stunde vor MCAO intraperitoneal verabreicht. Statistik: N=4; Mittelwert \pm SD.

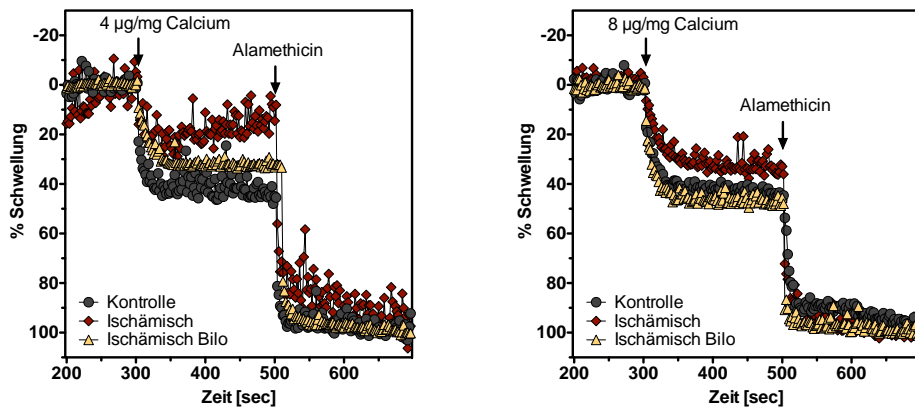


Abbildung 3.24: Verlaufsgraphen des mitochondrialen Schwellungsversuchs junger Tiere nach Zugabe von 4 bzw. 8 μ mol/mg Protein Calciumchlorid. Vergleichend ist die prozentuale Schwellung von je einem Versuch der Kontrollgruppe gegen die ischämischen und mit Bilobalid (10 mg/kg) behandelten ischämischen Mitochondrien aufgetragen.

3 Ergebnisse

Das Ausmaß der Schwellung alter Tiere ist in Abbildung 3.25 zu sehen. Durch die Ischämie ist ein deutlicher Anstieg in der mitochondrialen Schwellung zu sehen: Von 22,55 % Kontrolle auf 40,88 % in der ischämischen Hemisphäre nach MCAO (nach Gabe von 4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein Calciumchlorid). Die intraperitoneale Gabe von Bilobalid (10 mg/kg) eine Stunde vor MCAO bewirkte eine signifikante Reduktion der mitochondrialen Schwellung auf 25,65 % in der ischämischen Hemisphäre. Aus der Gabe von 8 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein Calciumchlorid resultierten die gleichen Ergebnisse, jedoch mit leicht höherem Ausmaß der Schwellung.

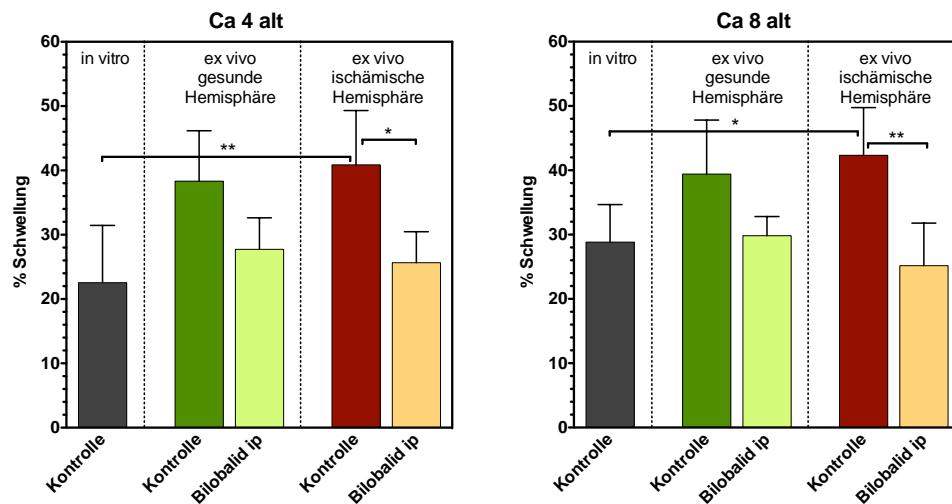


Abbildung 3.25: Mitochondriale Schwellung alter Tiere in Prozent, induziert durch Calciumchlorid (4 bzw. 8 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein). Mitochondrien der Kontrolltiere wurden *in vitro* gewonnen. Von Tieren nach 60-minütigem Schlaganfall stammten die „*ex vivo*“-Mitochondrien, unterteilt in gesunde und ischämische Hemisphäre. Bilobalid (10 mg/kg) wurde eine Stunde vor MCAO intraperitoneal verabreicht. Statistik: N=5-6; Mittelwert \pm SD; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; One-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

Abbildung 3.26 zeigt das Ausmaß der Schwellung alter Tiere nach Zugabe von Cyclosporin A, einem Hemmstoff der mPT. Die hier gezeigten Werte sind als mitochondriale Schwellung ohne Beteiligung der mPT zu verstehen.

Die Verlaufsgraphen eines mitochondrialen Schwellungsversuchs alter Tiere sind in Abbildung 3.27 dargestellt. Im Gegensatz zur „Kontrolle“ zeigt die „ischämische“ Kurve nach Zugabe von Calciumchlorid einen deutlichen stärkeren Abfall, was mit einer stärkeren mitochondrialen Schwellung nach Ischämie gleichzusetzen ist. Erfolgte eine *in*

in vivo-Behandlung mit Bilobalid, so kehrten die Werte fast auf Kontrollniveau zurück.

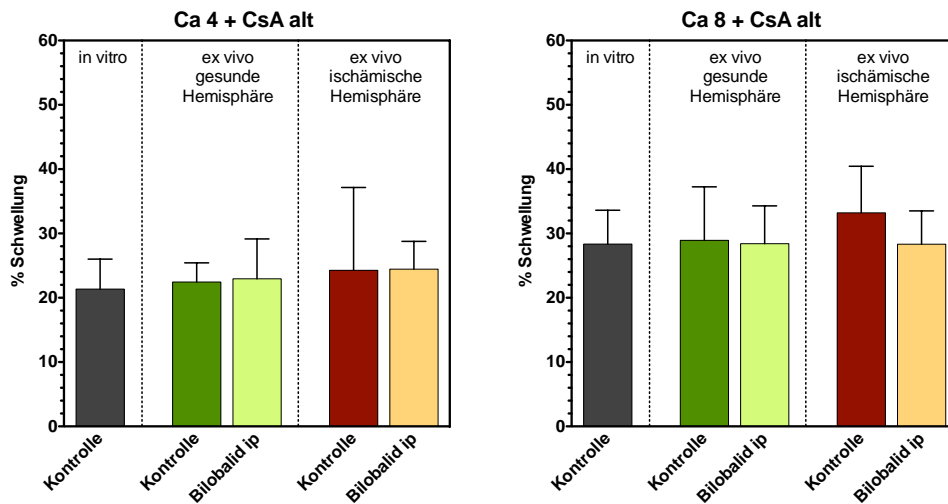


Abbildung 3.26: Mitochondriale Schwellung alter Tiere in Prozent, gehemmt durch Cyclosporin A (1 μ M). Mitochondrien der Kontrolltiere wurden *in vitro* gewonnen. Von Tieren nach 60-minütigem Schlaganfall stammten die „*ex vivo*“-Mitochondrien, unterteilt in gesunde und ischämische Hemisphäre. Bilobalid (10 mg/kg) wurde eine Stunde vor MCAO intraperitoneal verabreicht. Statistik: N=5-6; Mittelwert \pm SD.

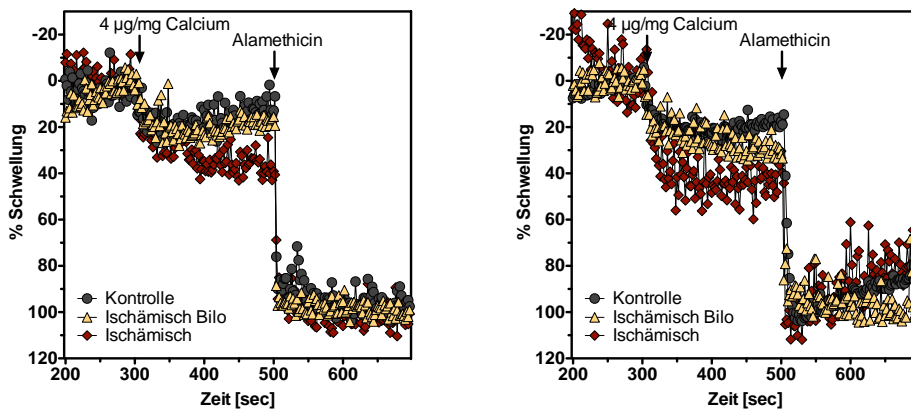


Abbildung 3.27: Verlaufsgraphen des mitochondrialen Schwellungsversuchs alter Tiere nach Zugabe von 4 bzw. 8 μ mol/mg Protein Calciumchlorid. Vergleichend ist die prozentuale Schwellung von je einem Versuch der Kontrollgruppe gegen die ischämischen und mit Bilobalid (10 mg/kg) behandelten ischämischen Mitochondrien aufgetragen.

3.3.6 Zusammenfassung

In den Versuchen wurde die Wirkung des Neuroprotektivums Bilobalid nach einstündiger Ischämie für junge und alte Tiere untersucht. Bilobalid (10 μ M, lokal infundiert) bewirkte in beiden Altersgruppen eine signifikante Reduktion der Infarktfläche 24 h nach einstündiger MCAO.

In den motorischen Verhaltenstests „Rotarod Test“ und „Corner Test“, durchgeführt für die alten Tiere, wurde eine signifikante Verbesserung der Leistung nach Gabe von Bilobalid (10 mg/kg, i.p.) beobachtet. In diesen Versuchen waren auch Unterschiede der beiden Altersgruppen zu sehen. Alte Tiere zeigten bereits ohne Beeinträchtigung durch die Ischämie eine deutlich schlechtere Leistung als junge Tiere.

Durch Mikrodialyse wurden extrazelluläre Glutamat-Konzentrationen im Striatum während Ischämie beobachtet. Diese stiegen bei jungen Mäusen bis auf 2000 % an. Bilobalid (10 μ M, lokal infundiert) bewirkte eine signifikante Reduktion des Anstiegs auf nur 550 %. Bei den alten Tieren wurde der Glutamat-Anstieg durch Bilobalid in gleicher Weise vermindert (von 1300 % auf 400 %).

Die mitochondriale Atmungsaktivität wurde mittels Oroboros Oxygraph in isolierten Mitochondrien bestimmt. Nach Ischämie (einstündige MCAO *in vivo*) wiesen die Mitochondrien junger Tiere eine deutlich verminderte Atmungsaktivität auf. Besonders in Komplex I der mitochondrialen Atmungskette war eine starke Reduktion des Sauerstoffverbrauchs der ischämischen Hemisphäre nach Ischämie zu sehen. Bilobalid (10 mg/kg, i.p.) bewirkte einen signifikanten Anstieg der respiratorischen Aktivität von Komplex I. Ein Vergleich der beiden Altersgruppen zeigte einen deutlich niedrigeren Sauerstoffverbrauch von Mitochondrien welche von alten Tieren gewonnen wurden.

Als weiteres Anzeichen für eine Schädigung der Mitochondrien durch die Ischämie wurde die mitochondriale Schwellung durch die mPT-Pore untersucht. Das Ausmaß der Schwellung war bei den jungen Tieren nach Ischämie deutlich vermindert. Die Behandlung mit Bilobalid (10 mg/kg, i.p.) ließ die Werte wieder auf Kontrollniveau zurückkehren. Bei den alten Tieren waren die Mitochondrien nach Ischämie deutlich vergrößert. Bilobalid bewirkte eine signifikante Verminderung der Schwellung nach Ischämie.

3.4 Anaplerotische Diät - Triheptanoin

Das Prinzip der anaplerotischen Diät beruht auf dem „Auffüllen“ mangelnder Substrate im Citratcyclus (siehe Kapitel 1.4.2). Dies wurde in den vorliegenden Versuchen mit dem Öl Triheptanoin erreicht, welches nach Metabolisierung Acetyl-CoA und Propionyl-CoA bereitstellt. Nach der aufgestellten Hypothese würde die Gabe von Triheptanoin das metabolische Ungleichgewicht nach Ischämie teilweise ausgleichen und durch Bereitstellen von Energiemetaboliten zu einer verbesserten ATP-Produktion in den ischämischen Zellen beitragen.

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde das Triheptanoin-Öl über 14 Tage an Mäuse verfüttert (33% der Kalorien, genaue Futterzusammensetzung siehe Abbildung 2.3). Die Kontrollgruppe erhielt ein vergleichbares Futter, in welchem Triheptanoin gegen Sojaöl ausgetauscht war. Am Tag 14 wurde eine 60-minütige Ischämie (tMCAO) ausgelöst

3.4.1 Entwicklung des Körpergewichts

Während der 14-tägigen Fütterung wurde das Körpergewicht der Tiere permanent überwacht, um zu garantieren, dass die Mäuse das Futter nicht verweigerten. Weiterhin wurde das Gewicht bis zu drei Tage nach Schlaganfall notiert (Abbildung 3.28).

Die Kontrolltiere hatten bei Beginn der Fütterung ein mittleres Körpergewicht von 31,0 g. Die Triheptanoin-Tiere wogen im Mittel 29,7 g. Während der 14-tägigen Fütterung gab es keine auffallende Gewichtsänderung. Die Mäuse hatten demnach das Futter angenommen. Durch den Schlaganfall verloren die Kontrolltiere drastisch an Gewicht (um 23%), wohingegen die Triheptanoin-gefütterten Tiere nur eine moderate Gewichtsreduktion aufwiesen (um 15%).

3 Ergebnisse

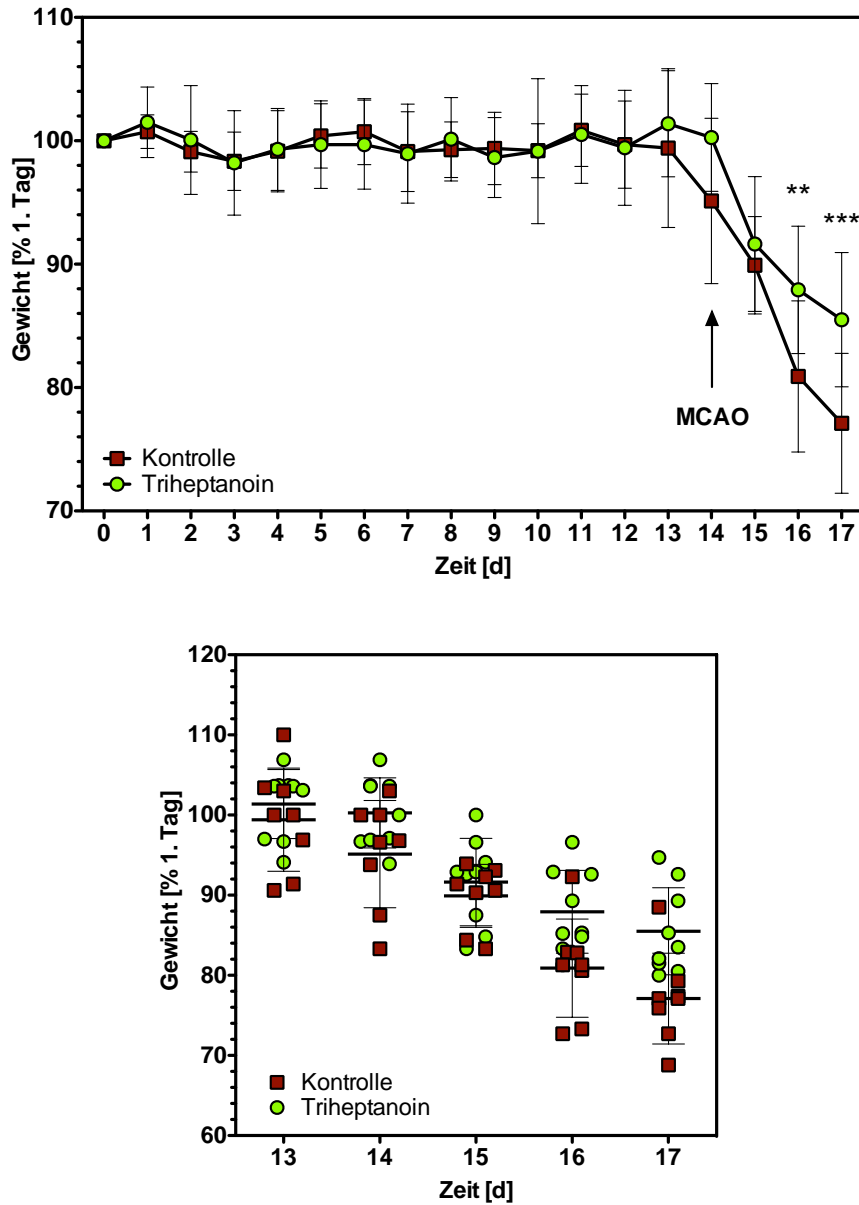


Abbildung 3.28: Körpergewicht in Prozent, bezogen auf Tag 1 der Fütterungsstudie mit Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät. Das Gewicht während des kompletten Verlaufs der Fütterung und separat während der letzten 5 Tage ist dargestellt. An Tag 14 erfolgte die Induktion des Schlaganfalls (MCAO). Statistik: N=8-9; Mittelwert \pm SD; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Two-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

3.4.2 Blutanalyse

Abbildung 3.29 zeigt die Konzentrationsänderungen von Glucose, Lactat und Glutamat in venösem Blut nach 14-tägiger Kontroll- bzw. Triheptanoin Diät (Methode siehe Kapitel 2.3). Die Glutamat-Werte waren sehr variabel, jedoch wurde deutlich, dass durch die anaplerotische Diät metabolische Veränderungen stattgefunden hatten. Ein Trend zu erhöhten Glutamat-Spiegeln im Blut nach 14-tägiger Gabe von Triheptanoin war sichtbar.

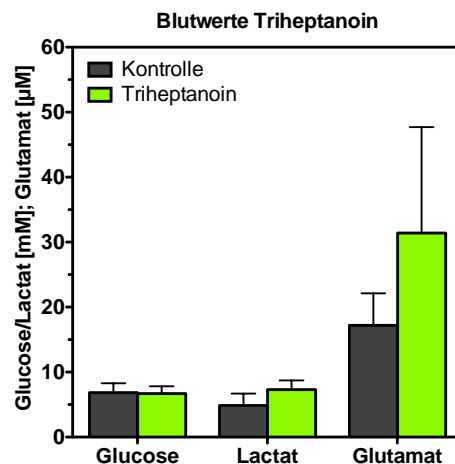


Abbildung 3.29: Konzentrationen an Glucose, Lactat (in mM) und Glutamat (in μM) in venösem Blut nach 14-tägiger Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät.

3.4.3 Ausmaß des Schlaganfalls

Wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, wurde das Ausmaß des Schlaganfalls 24 h nach tMCAO in TTC-gefärbten Hirnschnitten bestimmt. Das Mäusehirn wurde hierzu in 1 mm dicke Scheiben geschnitten, wobei in den Schnitten 2, 3 und 4 (von vorne nach hinten gesehen) der Bereich des Striatums zu sehen war. Der Farbstoff TTC wurde von gesunden Mitochondrien zu einem roten Farbstoff reduziert, in ischämischem Gewebe mit geschädigten Mitochondrien verblieb er dagegen weiß. Die Infarktfläche war demnach deutlich als weißer Bereich im roten Hirnschnitt auszumachen.

In Abbildung 3.30 sind TTC-gefärbte Hirnschnitte von Sojaöl-gefütterten Mäusen (Kontrollen) 24 h nach 60 min tMCAO dargestellt.

3 Ergebnisse

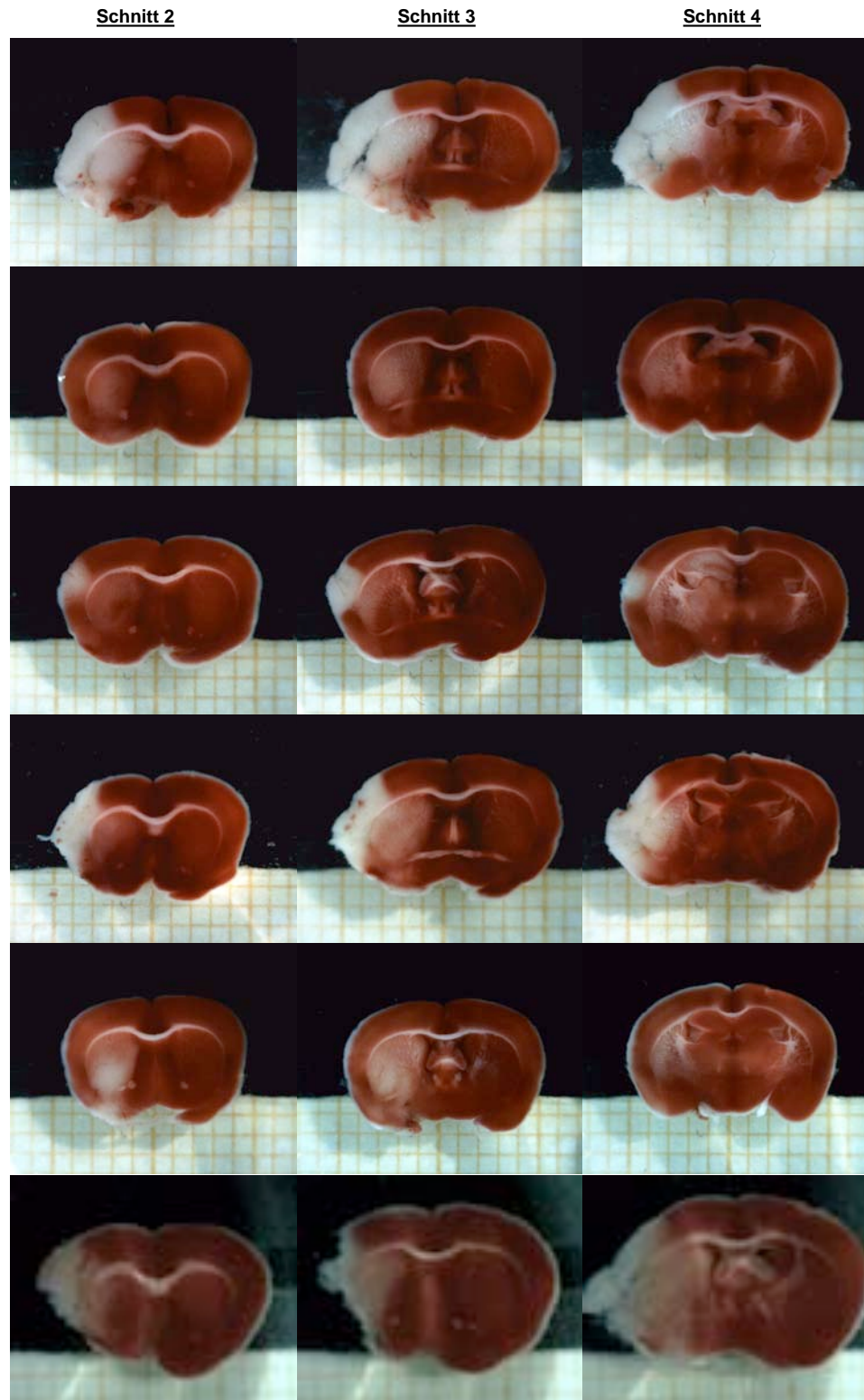


Abbildung 3.30: TTC-gefärbte Hirnschnitte 24 h nach 60 min tMCAO. In Spalten angeordnet jeweils die Schnitte 2-4 von Mäusen, gefüttert mit Kontroll-Diät.

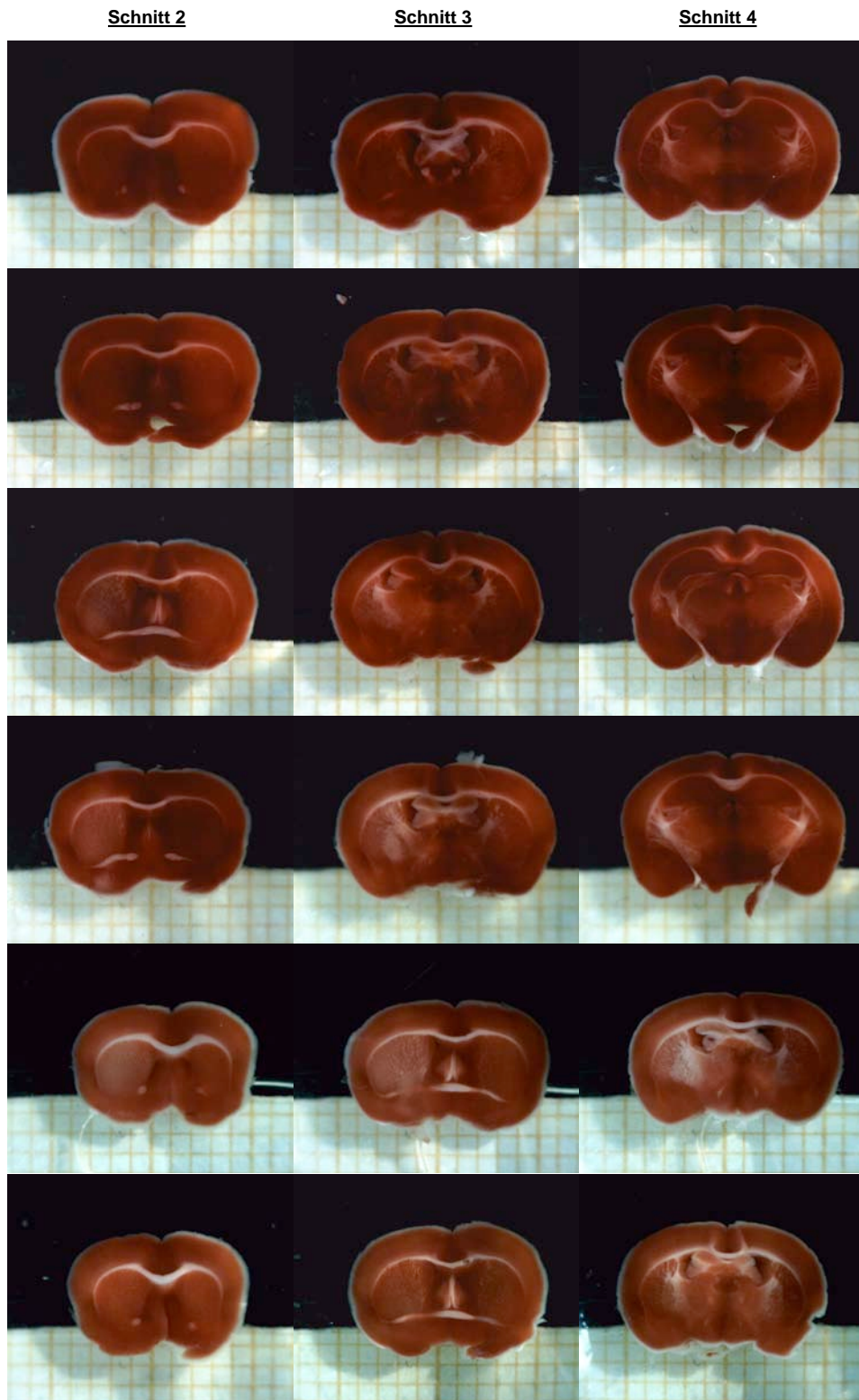


Abbildung 3.31: TTC-gefärbte Hirnschnitte 24 h nach 60 min tMCAO. In Spalten angeordnet jeweils die Schnitte 2-4 von Mäusen, gefüttert mit Triheptanoin-Diät.

3 Ergebnisse

Untereinander sind die verschiedenen Mäuse, in den Spalten jeweils die Schnitte 2-4 abgebildet. Nach Ischämie wurde durch die Färbung ein weißer, ischämischer Bereich in Striatum und Cortex deutlich.

Die Hirnschnitte aus Abbildung 3.31 stammten von Mäusen, welche zuvor eine 14-tägige Triheptanoin-Diät erfuhren. In den meisten Schnitten der Triheptanoin-gefütterten Mäusen war keinerlei weiße Infarktregion zu sehen. Einige zeigten ein rosa-rötliches Striatum, die Folge einer sehr milden Ischämie bzw. Protektion der Mitochondrien, die den Farbstoff TTC verstoffwechselten.

Eine graphische Auswertung ist in Abbildung 3.32 dargestellt. Die Infarktfläche der abgebildeten Schnitte wurde durch das Zeichenprogramm Image J (Version 1.42q, National Institutes of Health, USA) ermittelt und für die Kontroll- ebenso wie für die Triheptanoin-gefütterten Tiere aufgetragen.

24 h nach 60 min tMCAO wiesen die Kontroll-Tiere eine große Infarktfläche von 12,52 mm² im Mittel auf. Die Fütterung über 14 Tage mit Triheptanoin, bewirkte eine signifikante Reduktion der Infarktfläche auf 5,19 mm².

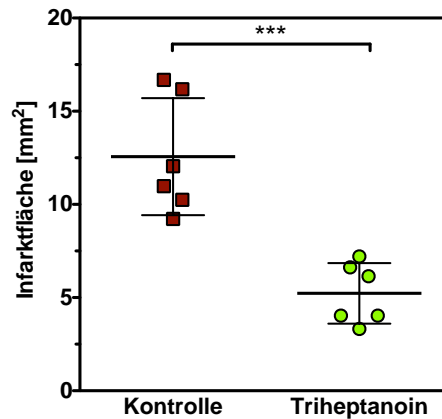


Abbildung 3.32: Infarktfläche ermittelt mit Image J. Aufgetragen ist die Fläche in mm² von Mäusen, gefüttert mit Kontroll- oder Triheptanoin-Diät, 24 h nach 60 min tMCAO. Statistik: N=6; Mittelwert \pm SD; ***p<0,001; t-Test.

3.4.4 Verhalten

Das Ausmaß des Infarktes wurde auch in Verhaltenstest untersucht. Als motorische Tests eigneten sich Chimney, Rotarod und Corner Test (Durchführung siehe Kapitel 2.5). Die Tests wurden eine Tag vor und einen sowie drei Tage nach einstündiger tMCAO durchgeführt. Zuvor erhielten die Mäuse eine 14-tägige Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät.

Die Ergebnisse der Verhaltenstests sind in Abbildung 3.33 gezeigt. Um den Chimney Test zu absolvieren, krabbelten die Mäuse aus einer um 90° aufgestellten Röhre rückwärts heraus. Vor Schlaganfall geschah dies in durchschnittlich 10 sec. Nach Schlaganfall benötigten die Mäuse durch die halbseitige Lähmung wesentlich länger oder verließen die Röhre gar nicht mehr selbstständig. In diesem Fall wurde der Versuch nach 120 sec abgebrochen. Tiere, die die Röhre nicht mehr verlassen konnten, erhielten den Wert „120 sec“. Mäuse, die mit Triheptanoin gefüttert wurden, besaßen nach Schlaganfall noch ausreichend koordinative Fähigkeiten, um weiterhin in unter 10 sec die Röhre zu verlassen.

Der Rotarod ist eine rotierende Walze, auf welcher die Mäuse laufen. Vor Schlaganfall war es fast allen Mäusen möglich, bis zum Ende des Versuches (120 sec) auf der Walze zu verbleiben. Ein Tag nach Schlaganfall traten bei den Kontroll-Tiere motorische Probleme auf. Sie fielen im Mittel bei 70 sec von der Walze. Nach 3 Tagen hatten sie sich jedoch wieder fast auf Kontroll-Niveau erholt. Bei den Mäusen, welche die Triheptanoin-Diät erhielten, war keinerlei Verschlechterung in der Laufzeit nach Schlaganfall zu beobachten.

Für den Corner Test laufen die Mäuse in eine spitze Ecke, welche sie durch Rechts- bzw. Linksdrehung verlassen. Der Lateraliätsindex (LI) gibt an, in welche Richtung sich die Maus bevorzugt dreht (-1 = nur Rechtsdrehungen; 0 = in beide Richtungen gleich oft; +1 = nur Linksdrehungen). Vor Schlaganfall drehten sich die Mäuse gleich oft zu beiden Seiten. Nach Schlaganfall war eine deutliche Präferenz für die linke Seite zu sehen, wobei diese bei der Triheptanoin-Gruppe signifikant weniger stark ausgeprägt war, verglichen zur Kontrolle.

3 Ergebnisse

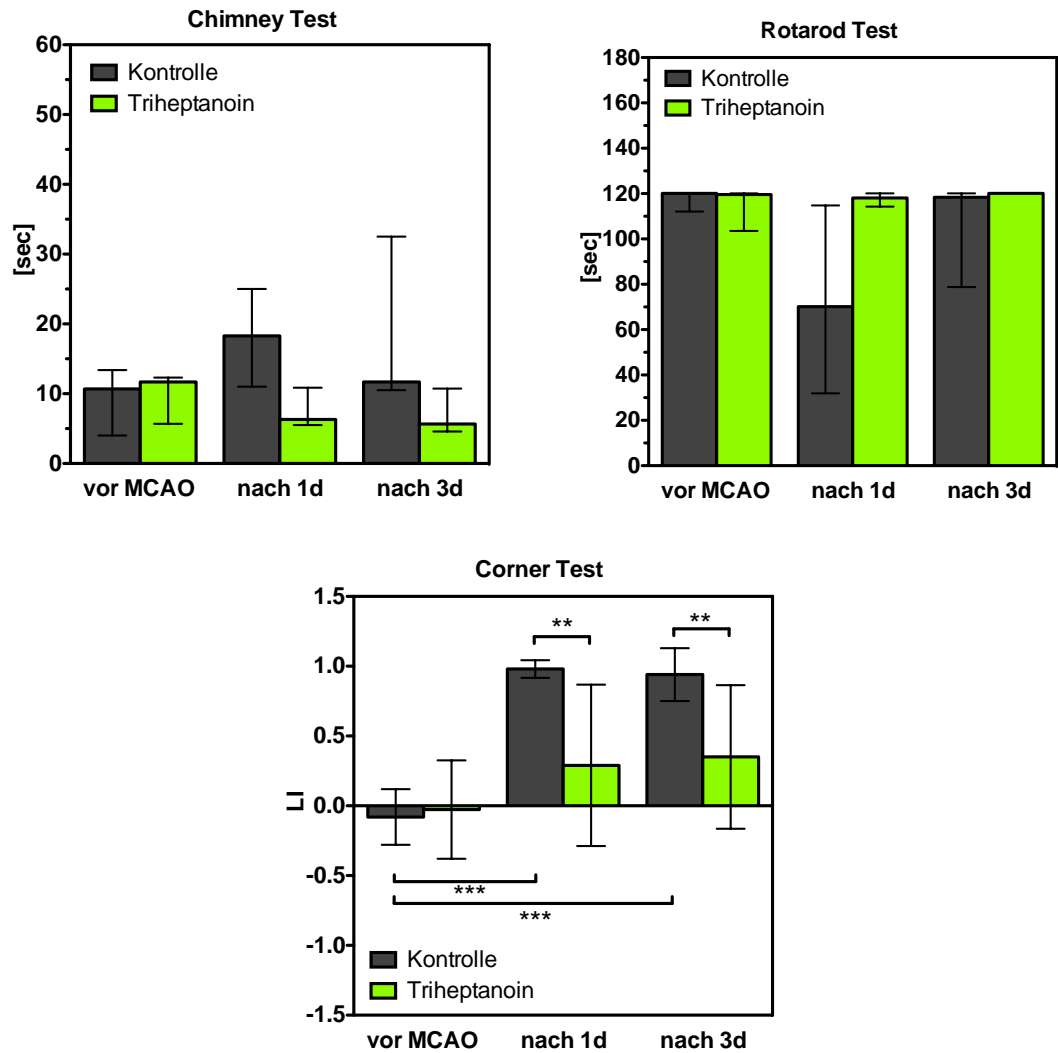


Abbildung 3.33: Ergebnisse der Verhaltenstest vor sowie 1 und 3 Tage nach tMCAO. Die Mäuse wurden zuvor mit Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät über 14 Tage gefüttert. Statistik: N=9-10; „Chimney“ und „Rotarod“: nicht parametrisch: Median \pm Interquartilenabstand; One-way ANOVA nach Kruskal-Wallis mit Dunn post-Test; „Corner“: Mittelwert \pm SD; ***p<0,001; **p<0,01; One-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

3.4.5 Schlaganfall und Mikrodialyse

Durch die Mikrodialysetechnik war es möglich, extrazelluläre Konzentrationen von Glucose und Glutamat im Infarktgebiet zu bestimmen, um die metabolischen Änderungen während des Schlaganfalls zu verfolgen. Hierfür wurde die Mikrodialysesonde während der Schlaganfall-OP mit aCSF perfundiert und Dialysate gesammelt (genauer Versuchsaufbau siehe Kapitel 2.7.3).

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.34 und 3.35 gezeigt. Da während der Ischämie der Blutfluss unterbrochen war, konnte keine Glucose als Energielieferant in das Striatum gelangen. Zu sehen war eine drastische Reduktion der Glucose-Konzentration bis auf das Detektionslimit von 0,02 mM sowohl bei Kontroll- als auch bei Triheptanoin-gefütterten Tieren. Nach Reperfusion kehrten die Glucose-Werte jedoch sehr schnell auf Ausgangsniveau zurück. Zusätzlich fällt bei Betrachtung der Glucose-Werte auf, dass die basalen extrazellulären Glucose-Konzentrationen in der Triheptanoin-Gruppe leicht erhöht sind im Gegensatz zu der mit Sojaöl-Diät gefütterten Kontrollen (0,262 mM zu 0,201 mM).

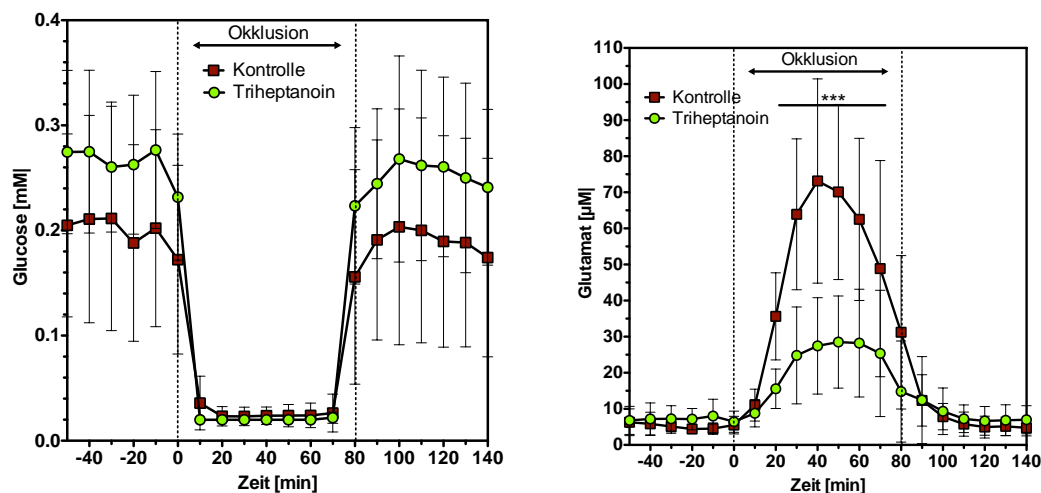


Abbildung 3.34: Extrazelluläre Konzentrationen von Glucose (mM) und Glutamat (μM) im Striatum während 60 min tMCAO. Vergleichend sind die Werte für Mäuse nach 14-tägiger Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät gezeigt. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die Induktion des Schlaganfalls. Statistik: $N=8$; Mittelwert \pm SD; *** $p<0,001$; Two-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

3 Ergebnisse

Bei den Kontrolltieren kam es durch die Ischämie außerdem zu einem enormen Anstieg an extrazellulärem Glutamat auf bis zu 73,1 μM bzw. 1600% (bezogen auf den Mittelwert des Basalwertes). Die 14-tägige Fütterung mit Triheptanoin bewirkte eine signifikante Reduktion des neurotoxischen Glutamat-Anstiegs auf 28,5 μM bzw. 460%. Auch die Glutamat-Konzentrationen erholten sich innerhalb einer Stunde nach Reperfusion.

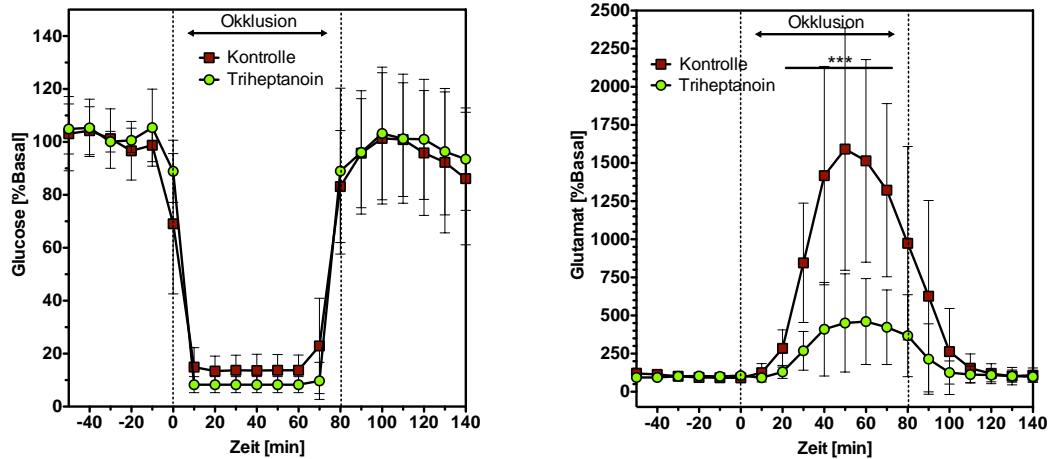


Abbildung 3.35: Extrazelluläre Konzentrationen von Glucose und Glutamat im Striatum während 60 min tMCAO, prozentual bezogen auf den Mittelwert des Basalwertes. Vergleichend sind die Werte für Mäuse nach 14-tägiger Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät gezeigt. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die Induktion des Schlaganfalls. Statistik: N=8; Mittelwert \pm SD; *** $p < 0,001$; Two-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

Die Laser-Doppler-Flussmessung diente als Kontrolle der vollständigen Okklusion der mittleren Cerebralarterie (Methode siehe 2.7). Durch die Schädeldecke wurde der Blutfluss gemessen, welcher während der Okklusion auf $< 20\%$ des Ausgangswertes gesunken sein musste, um den Schlaganfall als erfolgreich zu deklarieren und den Versuch fortzusetzen. In Abbildung 3.36 sind die Doppler-Werte von Mäusen gezeigt, welche vor MCAO 14 Tage lang mit Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät gefüttert wurden. Die Kontroll-Gruppe besaß einen mittleren Doppler-Wert von 523 vor tMCAO, 71 (14%) während Okklusion und 119 (23% des Ausgangswertes) nach Reperfusion. Die Fütterung mit Triheptanoin bewirkte keine Veränderung in den Doppler-Werten (Reperfusion auf 145 bzw. 26% des Ausgangswertes).

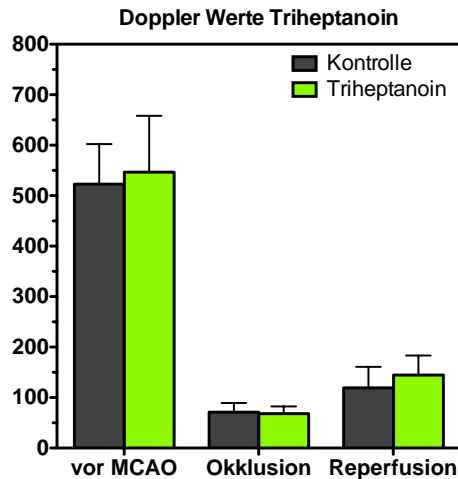


Abbildung 3.36: Laser-Doppler Werte, die den Blutfluss im Bereich der MCA symbolisieren. Gemessen wurde vor, während und nach tMCAO, vergleichend für Tiere die mit Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät gefüttert wurden. Statistik: N=17-24; Mittelwert \pm SD.

3.4.6 Mitochondriale Atmung

Mit dem Oroboros Oxygraphen konnten Änderungen im Sauerstoffgehalt einer mitochondrialen Suspension gemessen werden. Der Versuchsaufbau ermöglichte die Bestimmung der Atmungsaktivität von Mitochondrien nach Schlaganfall (Methode siehe Kapitel 2.8). Durch Injektion verschiedener Substrate und Inhibitoren der Atmungskette wurde die Aktivität der Komplexe I, II und IV bestimmt. Außerdem wurden verschiedene respiratorische Zustände gemessen: „Oxphos“ als vollständige Atmung aller Komplexe, „ETS“, der entkoppelten Zustand und „Leak“, in dem das Diffundieren der Protonen durch die Membran, unter Umgehung der ATP-Synthase, gemessen wurde (genauer siehe Kapitel 2.8.4). Gemessen wurde die Änderung im Sauerstoffgehalt der isolierten Kammer des Oxygraphen, normiert auf den Proteingehalt der Probe.

Die Mitochondrien wurden von Tieren gewonnen, welche zuvor eine 14-tägige Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät erhalten hatten. Für die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse wurden die Mitochondrien ohne vorherige Behandlung der Maus isoliert, *ex vivo*-Mitochondrien stammten von Tieren nach einstündiger tMCAO, wobei unterschieden wurde zwischen gesunder und ischämischer Hemisphäre (Methode siehe Kapitel 2.8.3).

3 Ergebnisse

Nach Ischämie waren die Mitochondrien deutlich geschädigt, in der ischämischen Hemisphäre gravierender als in der contralateralen gesunden Hemisphäre. Diese Beobachtung wurde in ähnlicher Weise bereits in Kapitel 3.3.4 für das Neuroprotektivum Bilobalid beschrieben.

In den Abbildungen 3.37 und 3.38 ist die Wirkung der Triheptanoin-Diät auf die mitochondriale Atmung dargestellt.

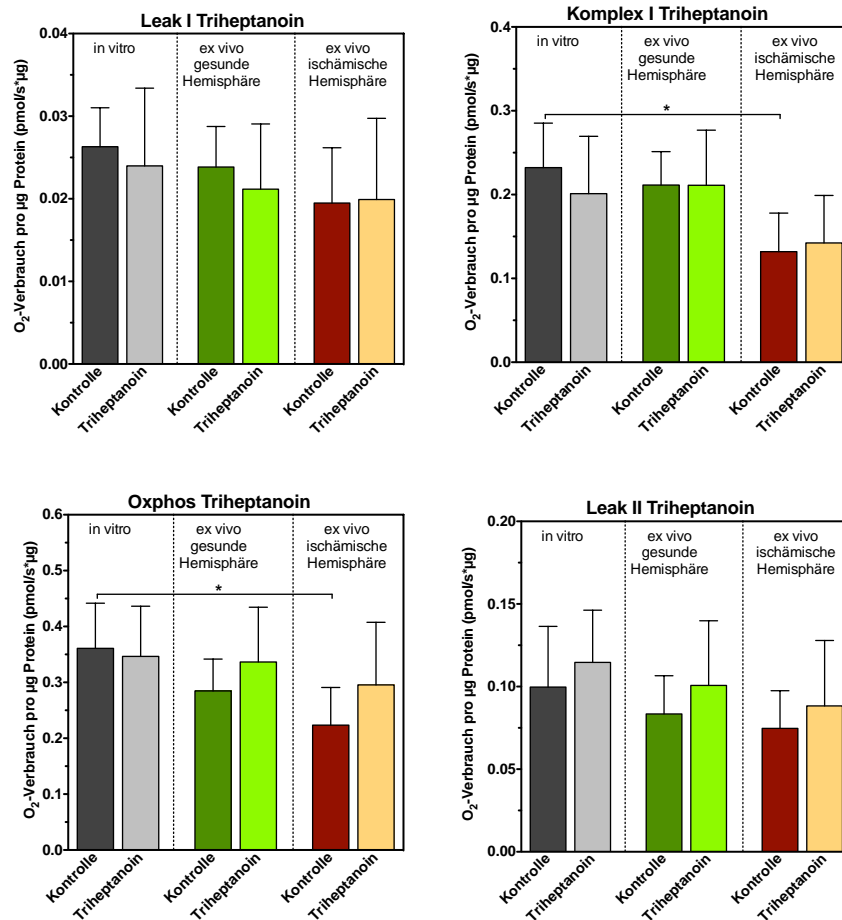


Abbildung 3.37: Triheptanoin-Wirkung auf Leak I-, Komplex I-, Oxphos- und Leak II-Status der mitochondrialen Atmungskette in Sauerstoff-Verbrauch, normiert auf Protein, untersucht in unbehandelten und *ex vivo* ischämischen Mitochondrien (untergliedert in gesunde und ischämische Hemisphäre). Triheptanoin wurde als 14-tägige Diät mit dem Futter verabreicht. Die Kontrolldiät enthielt die gleiche Menge an Sojaöl. Statistik: N=8-11; Mittelwert \pm SD; *p<0,05; One-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

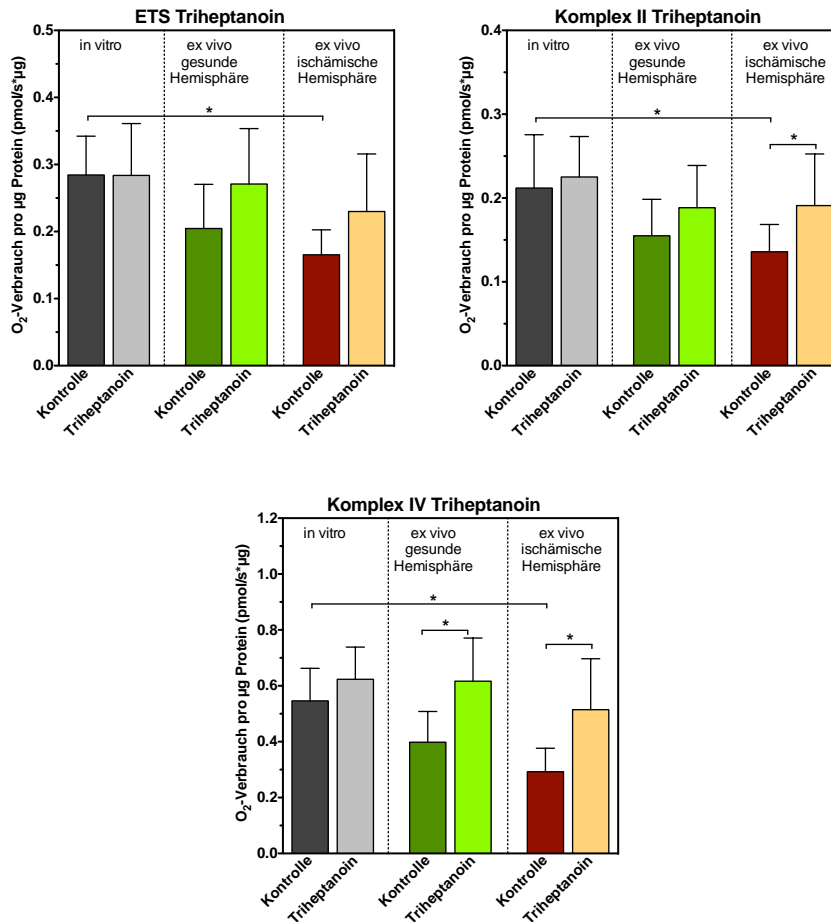


Abbildung 3.38: Triheptanoin-Wirkung auf ETS-, Komplex II- und Komplex IV-Status der mitochondrialen Atmungskette in Sauerstoff-Verbrauch, normiert auf Protein, untersucht in unbehandelten und *ex vivo* ischämischen Mitochondrien (untergliedert in gesunde und ischämische Hemisphäre). Triheptanoin wurde als 14-tägige Diät mit dem Futter verabreicht. Die Kontrolldiät enthielt die gleiche Menge an Sojaöl. Statistik: N=8-11; Mittelwert \pm SD; * $p < 0,05$; One-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

Wie bereits zuvor erwähnt, war die Atmung nach Ischämie moderat in der gesunden und deutlich in der ischämischen Hemisphäre beeinträchtigt. Die Aktivität der Komplexe II und IV wurde durch eine vorherige Fütterung mit Triheptanoin signifikant beeinflusst. Triheptanoin bewirkte eine Verbesserung der Komplex II-Atmung der ischämischen Hemisphäre nach 60 min MCAO (von 0,136 auf 0,191 pmol/s*µg). Die Komplex IV-Atmung wurde in beiden *ex vivo* gewonnenen Hemisphären signifikant verbessert: in der gesunden Hemisphäre von 0,398 auf 0,617 pmol/s*µg und in der ischämischen Hemisphäre

von 0,293 auf 0,585 pmol/s* μ g.

3.4.7 ATP-Gehalt und Membranpotential

Da nach Fütterung einer anaplerotischen Diät in Form von Triheptanoin eine Änderung im Energiehaushalt der Zellen angenommen wurde, wurde sowohl der ATP-Gehalt als auch Änderungen im Membranpotential dissoziierter Hirnzellen gemessen (Durchführung siehe Kapitel 2.10). Als Versuchsgruppen wurden Tiere ohne spezielle Diät sowie mit der Kontrolldiät oder mit der Triheptanoin-Diät gefütterte Mäuse gewählt (Zusammensetzung der Diäten siehe Abbildung 2.3). In einigen Tieren wurde eine Ischämie durch einstündige MCAO induziert. Nach Schlaganfall wurden die beiden Hemisphären separat aufgearbeitet, so dass in gesunde und ischämische Hemisphäre unterteilt werden konnte. Außerdem wurde für alle Versuchsgruppen eine zusätzliche Schädigung *in vitro* mit SNP (Nitroprussid-Natrium) durchgeführt.

In Abbildung 3.39 ist der Gehalt an ATP, normiert auf Protein, für alle Versuchsgruppen dargestellt. Es wird deutlich, dass die Diät keinen Einfluss auf den ATP-Gehalt in unbehandelten Tieren hatte. Die Hirnzellen der mit Kontrolldiät gefütterten Mäuse zeigten nach Schlaganfall in der ischämischen Hemisphäre eine Reduktion des ATP-Gehaltes (von 5,5 auf 3,8 μ mol/mg Protein). Die Fütterung mit Triheptanoin ließ diesen Effekt verschwinden und sorgte für gleichbleibende ATP-Spiegel vor und nach Schlaganfall (signifikante Erhöhung der ATP-Spiegel durch Triheptanoin in der ischämischen Hemisphäre nach MCAO auf 6,1 μ mol/mg Protein). Die darüber hinaus mit SNP zusätzlich geschädigten Hirnzellen zeigten ein ähnliches Verhalten, wobei die ATP-Spiegel nach *in vitro*-Schädigung deutlich niedriger lagen.

Veränderungen im Membranpotential sind in Abbildung 3.40 dargestellt. Die einstündige MCAO verminderte das Membranpotential der Hirnzellen nach Kontrolldiät leicht. Nach Triheptanoin-Diät wurde eine signifikante Erhöhung des Membranpotentials in der ischämischen Hemisphäre nach Schlaganfall beobachtet, verglichen mit der Kontrolle (Fluoreszenz gesunde Hemisphäre: Kontrolle 284, Triheptanoin 479; Fluoreszenz ischämische Hemisphäre: Kontrolle 363, Triheptanoin 554, Werte in willkürlicher Einheit). Auch in diesem Versuch lieferten die zusätzlich SNP-geschädigten Hirnzellen vergleichbare Aussagen.

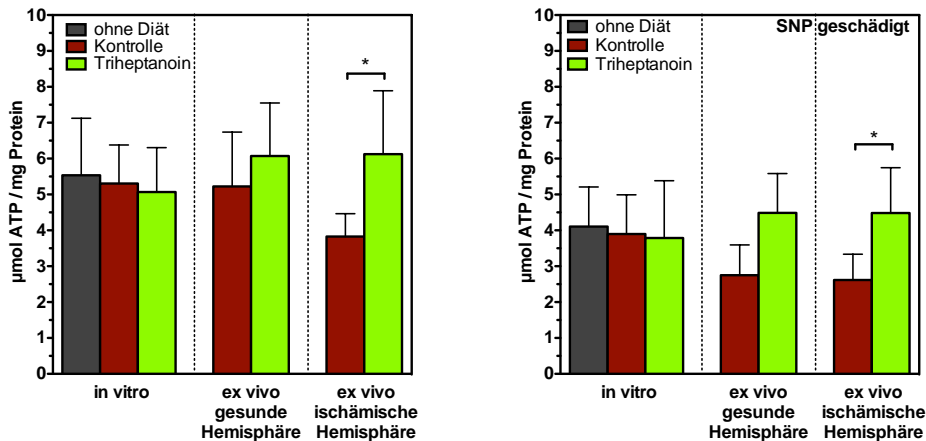


Abbildung 3.39: ATP-Gehalt in $\mu\text{mol/mg Protein}$ in dissoziierten Hirnzellen. Die Mäuse wurden zuvor 14 Tage mit Kontroll- oder Triheptanoin-Diät gefüttert bzw. erhielten keine spezielle Diät. Die *ex vivo* gewonnenen Hirnzellen erfuhren 1 h vor Aufarbeitung eine Ischämie. Alle Versuchsgruppen wurden zusätzlich nach einer *in vitro* Schädigung mit SNP vermessen. Statistik: $N=6-10$; Mittelwert \pm SD; $*p < 0,05$; One-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

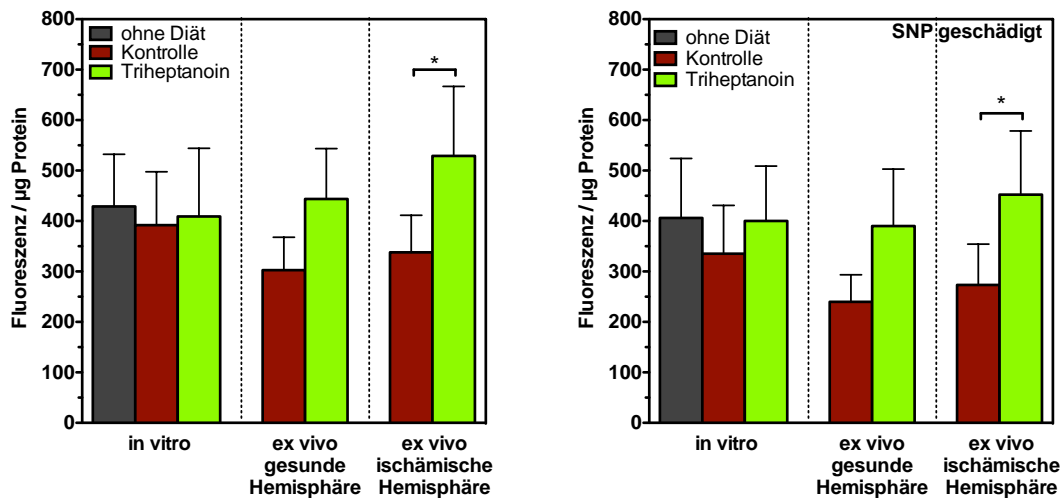


Abbildung 3.40: Membranpotential, gemessen als Rhodamin123-Fluoreszenz, in dissoziierten Hirnzellen (willkürliche Einheit). Die Mäuse wurden zuvor 14 Tage mit Kontroll- oder Triheptanoin-Diät gefüttert bzw. erhielten keine spezielle Diät. Die *ex vivo* gewonnenen Hirnzellen erfuhren 1 h vor Aufarbeitung eine Ischämie. Alle Versuchsgruppen wurden zusätzlich nach einer *in vitro* Schädigung mit SNP vermessen. Statistik: $N=6-10$; Mittelwert \pm SD; $*p < 0,05$; One-way ANOVA mit Bonferroni post-Test.

3.4.8 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der anaplerotischen Fütterungsstudie ergaben, dass Triheptanoin die erwarteten neuroprotektive Eigenschaften aufweist. Bereits durch Wiegen der Mäuse nach Ischämie wurde deutlich, dass die Triheptanoin-gefütterten Tiere keine so drastische Abnahme des Körpergewichts aufwiesen wie die Kontrolltiere.

TTC-gefärbte Hirnschnitte zeigten eine deutlich verminderte Infarktregion bei Tieren die zuvor über 14 Tage mit Triheptanoin gefüttert wurden, verglichen zur Kontrolle.

Außerdem absolvierte die Triheptanoin-Gruppe die motorischen Verhaltenstest nach Schlaganfall signifikant besser als die Kontrollgruppe.

Extrazelluläre Glutamat-Konzentrationen während der Ischämie wurden mittels Mikro-dialyse gemessen. Der dramatische Anstieg von Glutamat konnte durch eine Fütterung mit Triheptanoin deutlich vermindert werden (von 1600 % auf 460 %).

In der mitochondrialen Atmungskette verbesserte Triheptanoin die Aktivität der Komplexe II und IV. Diese waren zuvor ischämisch geschädigt worden.

In dissoziierten Hirnzellen wurde der ATP-Gehalt und das Membranpotential bestimmt. Die 14-tägige Fütterung mit Triheptanoin bewirkte einen signifikanten Anstieg der ATP-Spiegel und des Membranpotentials nach MCAO.

4 Diskussion

Im Folgenden werden die in Kapitel 3 vorgestellten Ergebnisse näher erläutert, hinterfragt und mit bekannten Literaturdaten verglichen. Zunächst wird eine kleine Studie über die Auswirkung von Anästhetika und Ischämie auf die Blutgaswerte und -metabolite analysiert. Im Anschluss ist die Diskussion nach den zwei untersuchten Neuroprotektiva Bilobalid und Triheptanoin unterteilt. Da die Wirkung von Bilobalid auch in alten Tieren untersucht wurde, ist in diesem Kapitel zusätzlich zu der Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung ein Vergleich zwischen jungen und alten Tieren vorgenommen.

4.1 Blutanalyse

Als kleines Projekt dieser Dissertation wurden die Blutgaswerte pH, pCO₂ und pO₂ in venösem Blut bestimmt. Zusätzlich wurden Änderungen des Glucose- und Lactatspiegels im Blut während Anästhesie mit Isofluran oder Pentobarbital als Narkotikum detektiert. In beiden Versuchen wurden zunächst basale Werte gesammelt, anschließend erfolgte die Induktion einer 60-minütigen MCAO und der nachfolgenden Reperfusion. 1 h und 24 h nach Ischämie wurde erneut Blut abgenommen und mit den basalen Werten verglichen (Methode siehe Kapitel 2.3).

Der pH-Wert im venösen Blut war 1 h nach Ischämie signifikant auf 7,32-7,34 vermindert, hatte sich jedoch nach 24 h normalisiert (Kapitel 3.1). Die pCO₂-Werte stiegen durch die Ischämie an und waren 24 h nach MCAO deutlich erhöht (auf bis zu 53 mmHg). In den pO₂-Spiegeln zeigte sich eine leichte Erhöhung auf 45,8 mmHg eine Stunde nach Ischämie, welche nach 24 h nicht mehr zu beobachten war.

Die Kombination aus erniedrigtem pH und erhöhtem pCO₂ zeigt eine respiratorische Azidose an. Diese entsteht durch eine geringere Abatmung von Kohlenstoffdioxid, wodurch sich der pCO₂-Wert erhöht. Dadurch ist das Verhältnis $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ gestört und der pH-Wert im Blut steigt an. Beim Menschen liegen die kritischen Werte für eine respiratorische

4 Diskussion

Azidose bei $\text{pH} < 7,36$ und $\text{pCO}_2 > 45$ mmHg (Vaupel et al. 2007). Diese Schwellenwerte wurden durch die Ischämie in den Mäusen deutlich überschritten.

Interessanterweise hatte sich in den gemessenen Blutproben der pH-Wert 24 h nach Ischämie erholt, wohingegen der pCO_2 -Wert immer noch signifikant erhöht war. Dies hängt wahrscheinlich mit der nicht-respiratorischen Gegenregulation der Niere zusammen. Kann die respiratorische Gegenregulation durch Abatmen des überschüssigen CO_2 das Gleichgewicht nicht wiederherstellen, so steigert die Niere nach 1-2 Tagen den Bicarbonat-Gehalt im Blut: HCO_3^- wird rückresorbiert und die Ausscheidung von NH_4^+ gefördert. Dadurch normalisiert sich der pH-Wert des Blutes. Liegt jedoch immer noch ein respiratorisches Defizit vor, bleibt der pCO_2 -Wert erhöht (Lucius und Schwegler 2011, Silbernagl 2012). Die Ergebnisse sprechen also für eine deutliche respiratorische Azidose und eine länger anhaltende eingeschränkte Lungenfunktion durch die Ischämie.

Der Anstieg des pO_2 -Wertes im Blut 1 h nach Ischämie ist eine Reaktion auf den stark verminderten Sauerstoffgehalt im ischämischen Gewebe. Durch die eingeschränkte Durchblutung wird das Striatum während der MCAO kaum mit Sauerstoff versorgt. Der Körper versucht daher dieses Defizit auszugleichen und erhöht das Sauerstoffangebot im Blut. Dieser Effekt konnte noch 1 h nach Ischämie gemessen werden (Meyer 1957, Malik et al. 1977).

Eine Teilstudie beschäftigte sich mit der Gabe von Ringer-Lactat-Lösung (1 ml, intraperitoneal) direkt nach Reperfusion. Ringer-Lactat-Lösung füllt zum einen das durch die Operation gesenkte Blutvolumen auf, zum anderen enthält die Lösung Elektrolyte und die Pufferkapazität von Lactat, um den pH-Wert wieder zu erhöhen (Khajavi et al. 2009). Beim Menschen wird daher nach schwerwiegenden Operationen so lange Ringer-Lactat-Lösung als Infusion verabreicht, bis die Niere die Kompensation übernimmt.

In den durchgeführten Studien wurde die Ringer-Lactat-Lösung direkt nach einstündiger transienter MCAO verabreicht und Unterschiede zu den Kontrollversuchen ohne Ringer-Lactat-Gabe nach 1 h und nach 24 h untersucht. Im transienten Modell brachte die Gabe von Ringer-Lactat-Lösung keinen Vorteil bezogen auf die Erholung der Blutgaswerte pH, pCO_2 und pO_2 . Unter Schwarzkopf et al. 2013b wurden jedoch auch Studien publiziert, welche von Dorothee Lang durchgeführt wurden. In diesen wurde durch die Gabe von 1 ml Ringer-Lactat-Lösung direkt nach Induktion eines permanenten Schlaganfalls eine signifikante Verbesserung der Blutgaswerte erreicht.

Die zweite Studie, welche sich mit dem Einfluss des verwendeten Anästhetikums auf

die Glucose- und Lactat-Spiegel im Blut während permanenter Ischämie beschäftigte, wurde in Zusammenarbeit mit Tobias Horn durchgeführt. Wurde die Narkose mit dem inhalativen Anästhetikum Isofluran (2 % in synthetischer Luft) induziert, so zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Glucose- und Lactat-Konzentrationen im Blut eine Stunde nach MCAO (Glucose: von 6,6 auf 8,3 mM; Lactat: von 2,8 auf 5,7 mM). Diese Werte erholten sich in den folgenden 24 h, so dass die Wirkung hauptsächlich auf die Narkose zurückgeführt wurde. In der Literatur sind als Erklärung für den Glucose-Anstieg eine Zunahme von Stresshormonen wie Adrenalin genannt, welche Glucose aus den Glycogen-Speichern mobilisieren. Außerdem wurde eine Abnahme der Insulin-Spiegel im Blut durch die Isofluran-Narkose postuliert (Lattermann et al. 2001, Zuurbier et al. 2008, Tanaka et al. 2005).

Die Erhöhung der Blut-Lactat-Spiegel kann nicht durch einen vermehrten anaeroben Metabolismus erklärt werden, da die Glucose-Spiegel ebenfalls anstiegen. Der Mechanismus, welcher diesem Effekt zu Grund liegt, ist daher noch unbekannt. Sicherlich ist der Lactat-Anstieg im Blut an die von Horn und Klein 2010 beobachteten erhöhten Lactat-Konzentrationen im Extrazellularraum des Gehirns gekoppelt.

Wurde die MCAO-Operation unter Pentobarbital-Narkose (60 mg/kg in NaCl) durchgeführt, einem injizierbaren und eher kurz wirksamen Anästhetikum, so zeigte sich bis zu 24 h nach Ischämie keine Beeinflussung der Glucose-Spiegel im Blut (Zuurbier et al. 2008). Dieser Befund bezeugt, dass der Glucose-Anstieg unter Isofluran-Narkose allein auf das Anästhetikum zurückzuführen war.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen unter Isofluran-Narkose wurden die Lactat-Konzentrationen im Blut durch die Gabe von Pentobarbital stark vermindert (von 2,95 auf 0,66 mM). Auch für diesen Befund gibt es bisher keine Erklärung. Die Werte zeigen deutlich, dass sich die Lactat-Spiegel nach Abfluten der Narkose wieder erholten. Die hohen Standardabweichungen entstanden vermutlich, weil einige Mäuse auch nach 24 h ein lethargisches, bewegungsloses Verhalten zeigten. Diese behielten die erniedrigten Lactat-Spiegel, wohingegen die Werte bei sich bewegenden Tieren wieder auf Kontrollniveau anstiegen.

Diese Voruntersuchungen der physiologischen Blutparameter zeigen, dass sich die Mäuse 24 h nach der MCAO-Operation im Bezug auf den Stoffwechsel wieder größtenteils normalisiert hatten. Die weiterhin erhöhten $p\text{CO}_2$ -Werte deuten auf ein anhaltendes respiratorisches Defizit hin, was durch die ischämisch bedingte halbseitige Lähmung erklärbar ist. Die Tiere bewegten sich nach Schlaganfall generell weniger und nahmen

auch weniger Nahrung zu sich. Daher war eine umfassende körperliche Erholung generell ausgeschlossen.

Der Vergleich der beiden Anästhetika Isofluran und Pentobarbital zeigt deutlich, dass die Narkose einen entscheidenden Einfluss auf die metabolische Stoffwechsellage im Gehirn hat. Dieser Diskussionpunkt wurde in einer Gemeinschaftsarbeit des Arbeitskreises noch weiter ausgeführt (Schwarzkopf et al. 2013b). Allein die wesentlich einfachere Handhabung eines inhalativen Anästhetikums führte zu dessen Bevorzugung für die durchgeführten Operationen. In den dieser Dissertation zugrunde liegenden Studien wurden daher alle Narkosen mit Isofluran durchgeführt. Gegen dieses Narkotikum würde die Erhöhung der Glucose-Spiegel im Blut während der Schlaganfall-Operation sprechen. Eine Hyperglycämie verschlechtert die Folgen eines Schlaganfalls dramatisch (Luitse et al. 2012, MacDougall und Muir 2011). Daher wäre es ratsamer, ein Anästhetikum zu wählen, welches die Glucose-Spiegel nicht erhöht, wie beispielsweise das inhalative, aber teure, Anästhetikum Sevofluran (Schwarzkopf et al. 2013b). Für die Wahl von Isofluran als Anästhetikum sprachen jedoch die hohen Erfahrungswerte vorangegangener Experimente innerhalb des Arbeitskreises.

4.2 Neuroprotektive Wirkung von Bilobalid

Die Inhaltsstoffe des *Ginkgo biloba* Baumes sind bereits in ausführlichen Studien auf ihre neuroprotektiven Eigenschaften untersucht worden (Ahlemeyer und Kriegelstein 2003, DeFeudis und Drieu 2000). In den Fokus gerückt ist hierbei das im Extrakt enthaltene Sesquiterpen Bilobalid (DeFeudis 2002, Klein et al. 1997). Daher beschäftigte sich die Arbeitsgruppe Klein intensiv mit der Aufklärung des Wirkmechanismus, wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde (siehe Kapitel 1.4.1, Abbildung 1.8). Zum einen könnte Bilobalid auf diese Weise für die Pharmaindustrie als Wirkstoff relevant werden, zum anderen könnte die Aufklärung des Wirkmechanismus Hinweise zur allgemeinen Pathobiologie bei einem Schlaganfall liefern (Choi 1996, Martin et al. 1998). Auch eine Weiterentwicklung oder chemische Modifikation von Bilobalid mit gleicher oder sogar verbesserter Wirkweise wäre als Therapieoption vorstellbar.

Bisherige Arbeiten lieferten Beweise für die neuroprotektive Wirkung von Bilobalid nach ischämischem Schlaganfall, jedoch konnte bisher noch kein primäres Target identifiziert werden (Weichel et al. 1999, Klein et al. 2003, Kiewert et al. 2007, Kiewert et al. 2008).

Für diesen ersten Teil der Dissertation wurde daher Bilobalid erneut als zu untersuchendes Neuroprotektivum gewählt. Da bisher nur Versuche in einem permanenten Schlaganfall-Modell durchgeführt wurden und neuroprotektive Ansätze in einem transienten Modell aufgrund der größeren resolutierenden Penumbra besser abgebildet werden können (siehe Kapitel 1.5), wurde im Rahmen dieser Dissertation eine 60-minütige transiente Okklusion der mittleren Cerebralarterie (MCAO) gewählt (Methode siehe Kapitel 2.7). In diesem Modell wurde das Ausmaß des Schlaganfalls mit und ohne Bilobalid-Gabe verglichen, es wurden Verhaltenstests durchgeführt und die extrazellulären Konzentrationen an Glucose und Glutamat im Extrazellulärraum des Striatums (Core-Region des Schlaganfalls) gemessen. Diese Versuche sollten die neuroprotektiven Eigenschaften von Bilobalid untermauern. Zusätzlich wurde der Einfluss von Bilobalid auf die mitochondriale Atmung und die mitochondriale Schwellung durch Öffnen der mPT-Pore untersucht. Dieses für die Arbeitsgruppe Klein neue Forschungsbiet wurde aufgrund der Erkenntnisse bisheriger Experimente gewählt, da eine Einwirkung von Bilobalid auf mitochondriale Prozesse als logisch erschien (Abbildung 1.8). Somit sollte diese Arbeit weitere Informationen über den Wirkmechanismus von Bilobalid bringen.

Da die meisten neuroprotektiven Studien in jungen Tieren durchgeführt werden, Schlaganfälle beim Menschen jedoch vermehrt im Alter auftreten (siehe Kapitel 1.2), wurde eine Bilobalid-Studie an alten Tieren durchgeführt. Diese brachte zum einen den Vergleich der Auswirkungen eines ischämischen Schlaganfalls zwischen jungen (6-8 Wochen) und alten (18-22 Monate) Tieren. Zum anderen sollte diese Studie die neuroprotektiven Eigenschaften von Bilobalid im Alter aufzeigen. All diese Aspekte werden nachfolgend diskutiert.

4.2.1 Ausmaß des Schlaganfalls

Die in Kapitel 3.3.1 gezeigten Hirnschnitte wurden 24 h nach 60-minütiger transienter Ischämie mit Triphenol-tetrazoliumchlorid (TTC) angefärbt. TTC wird von den Dehydrogenasen der mitochondrialen Atmungskette zu einem roten Farbstoff reduziert. Rich et al. 2001 postulierten eine Beteiligung von Komplex I an der Farbreaktion, wohingegen Kun und Abood 1949 nachwiesen, dass die Reduktion vornehmlich durch Elektronen des Komplex II der Atmungskette katalysiert wird. Rötlich gefärbte Zellen weisen demnach auf aktive Dehydrogenasen der Mitochondrien hin. Ungefärbte, weiße Zellen besitzen geschädigte Mitochondrien, welche nicht mehr in der Lage sind, TTC zu reduzieren.

4 Diskussion

Unbehandelte junge Tiere wiesen nach Schlaganfall eine mittlere Infarktfläche von $6,03 \text{ mm}^2$ auf (siehe Abbildung 3.8 in Kapitel 3.3). Die Behandlung mit Bilobalid ($10 \mu\text{M}$, 1 h vor tMCAO, lokal) reduzierte die Fläche signifikant auf $3,32 \text{ mm}^2$ im Mittel, dies entspricht einer Verminderung um 55 %. Zum Vergleich sind Studien von Mdzinarishvili et al. 2007 und Lang et al. 2011 zu nennen, in welchen der Schlaganfall in permanenter Form ohne Reperfusion durchgeführt wurde. Die resultierenden Infarktflächen waren wesentlich größer, besonders der weiße Core-Bereich. Das Neuroprotektivum Bilobalid hatte durch die kleinere Penumbra weniger Angriffsmöglichkeiten, so dass Bilobalid in diesen Studien nur eine Reduktion der Infarktfläche zwischen 25 und 43 % bewirkte. Folglich war die Anwendung des transienten Schlaganfall-Modells im Rahmen dieser Dissertation gut geeignet, um die neuroprotektiven Eigenschaften von Bilobalid exakt wiederzugeben.

Bereits beim Schneiden der Hirne alter Mäuse fiel auf, dass das Gewebe wesentlich weicher war als das der jungen Tiere. In den Hirnschnitten wird dies durch die teilweise ausgefranzte Hemisphäre, in welcher die Mikrodialysesonde implantiert war, deutlich. Außerdem erkennt man sowohl an den Hirnschnitten selbst als auch an der Berechnung der Infarktfläche, dass die Schlaganfallfläche in alten Tieren wesentlich variabler war als in jungen. Teilweise weitete sich die betroffene Fläche bis in den Cortex aus. Eine Ursache hierfür kann in den erschwerten operativen Bedingungen gefunden werden. Die Induktion des Schlaganfalls bei alten Tieren war wesentlich diffiziler. Das cervikale Gewebe alter Mäuse war teilweise verhärtet oder von Fett durchwachsen. Auch ist eine Veränderung im Arterien Durchmesser durch das Altern möglich, was eine Erklärung für die weniger reproduzierbaren Schlaganfälle in gealterten Tieren liefern würde (Spratt et al. 2006, Liu et al. 2009, Giwa et al. 2012, McColla et al. 2004).

In Zahlen ausgedrückt war die Infarktfläche alter Tiere im Mittel $12,03 \text{ mm}^2$ groß. Dies entspricht etwa dem doppelten Ausmaß der Infarktfläche junger Tiere. Sutherland et al. 1996 beobachteten bereits ähnliches: gealterte Ratten wiesen nach MCAO eine größere Infarktfläche auf als junge. Wang et al. 2003 beobachteten nur eine leichte Vergrößerung des Infarktgebietes 24 h nach Ischämie, dafür jedoch eine deutlich erhöhte Mortalität in alten Ratten. In Mäusen wurde ebenfalls eine erhöhte Mortalität nach fokaler Ischämie beobachtet (Arumugam et al. 2010). Eine rückblickende Humanstudie führte zu dem Ergebnis, dass gealterte Menschen einen Schlaganfall schlechter verkraften als junge (Ay et al. 2005).

Ebenso wie in jungen Tieren verminderte die Gabe von Bilobalid ($10 \mu\text{M}$, 1 h vor tMCAO,

lokal) das Ausmaß des Schlaganfalls bei alten Tieren signifikant auf 3,47 mm² im Mittel. Dies zeigt, dass die bisher gewonnenen neuroprotektiven Daten von Bilobalid im Bezug auf die Infarktfläche auf gealterte Tiere übertragbar sind.

Ein wichtiger Diskussionspunkt ist die Zeit, welche zwischen Ischämie und TTC-Färbung vergehen sollte. Für die Versuche der vorliegenden Dissertation wurde eine Zeitspanne von 24 h gewählt, da diese in vorherigen Versuchen reproduzierbare und aussagekräftige Ergebnisse geliefert hatte. Wie bereits von Benedek et al. 2006 beschrieben ist ein früherer Zeitpunkt für die Bestimmung der Infarktfläche nicht sinnvoll, da die *in vitro*-Messung erst nach 24 h die tatsächliche *in vivo*-Fläche widerspiegeln kann. Chiamulera et al. 1993 untersuchten Hirnschnitte bis zu 21 Tage nach Ischämie und stellten eine deutliche Abnahme der Infarktfläche nach 3 Tagen fest. Diese Beobachtung wurde von Du et al. 1996 bestätigt, welche den Hirnschaden an Tag 3 und 14 nach milder Ischämie bestimmten. Zur Beobachtung von Langzeiteffekten des neuroprotektiven Wirkstoffs Bilobalid müssten die Infarktfläche demnach über mehrere Tage verfolgt werden. Die Messung der Infarktfläche 24 h nach transientscher Ischämie ergibt jedoch ein aussagekräftiges Ergebnis über die stabilisierende Wirkung des Neuroprotektivums. Die Gabe von Bilobalid unterstützt in diesem Fall ischämische Hirnzellen, bis die Reperfusion nach Lyse-Therapie stattgefunden hat.

4.2.2 Verhalten

Über das Verhalten von jungen Tieren nach transientscher Ischämie lagen bereits ausführliche Studien vor (Bouet et al. 2007, Lang 2011, Lang et al. 2011). Bouet et al. 2007 stellten eine Vielzahl sensimotorischer Tests für Nager vor, welche besonders auf die Untersuchung der motorischen Defizite durch halbseitige Lähmung, wie sie nach einem Schlaganfall vorliegen, abzielen. Dorothee Lang führte aus diesen die drei am relevantesten erscheinenden Tests durch: Chimney Test, Rotarod Test und Corner Test. Diese wurden für junge Tiere nach tMCAO evaluiert und anschließend die Wirkung einer Gabe von Bilobalid (10 mg/kg, i.p.) eine Stunde vor Ischämie untersucht. In der vorliegenden Dissertation wurden diese Ergebnisse mit dem Verhalten alter Tiere mit und ohne Bilobalid-Behandlung verglichen.

Der Chimney Test besteht aus einer Röhre, welche in einem Winkel von 45° bzw. 90° aufgestellt wird. Die Maus benötigt eine gewisse Zeit, um aus der Röhre rückwärts hinaus zu klettern (genauer Versuchsaufbau siehe Kapitel 2.5, Ergebnisse siehe Kapitel 3.3.2).

4 Diskussion

Vor Schlaganfall war dies den Mäusen in circa 4sec möglich. Einen Tag nach einstündiger Ischämie benötigten die jungen Mäuse wesentlich länger (25 sec). Ähnliche Ergebnisse wurden von Lang et al. 2011 und Bouet et al. 2007 beobachtet (etwa 60sec). Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass es den alten Mäusen nicht möglich war, eine senkrecht aufgestellte Röhre zu verlassen. Der Chimney Test wurde demnach abgewandelt und die Röhre bei allen in dieser Versuchsreihe getesteten Gruppen nur um 45° angehoben. Daher resultierte auch die leicht verkürzte Kletterzeit der jungen Mäuse im Vergleich zu den Studien von Bouet et al. 2007. Nach Lang et al. 2011 verbesserte die Gabe von Bilobalid (10 mg/kg, i.p.) eine Stunde vor Ischämie die motorischen Fähigkeiten der Mäuse im Chimney Test signifikant.

Der in dieser Dissertation durchgeführte Vergleich zwischen jungen und alten Tieren ergab vor Schlaganfall keine deutlichen Unterschiede. Einen Tag nach Schlaganfall wiesen die alten Mäuse ein deutlich höheres motorisches Defizit auf. Sie benötigten im Mittel 120sec zum Verlassen der angehobenen Röhre. Die Gabe von Bilobalid (10 mg/kg, i.p.) eine Stunde vor tMCAO zeigte eine leichte Tendenz, die Kletterzeit zu verbessern, jedoch war diese aufgrund des großen Interquartilenabstands nicht signifikant.

Im Rotarod Test läuft die Maus auf einer beschleunigt rotierenden Walze. Es wird die Zeit gemessen, welche die Maus auf der Walze verbleiben kann. Der Versuch wurde nach 120sec gestoppt. Den meisten jungen, gesunden Tieren war es möglich, bis zum Ende des Versuches auf der Walze zu laufen. Einen Tag nach tMCAO war durch die Ischämie ein leichtes motorisches Defizit sichtbar. In den Versuchen dieser Dissertation wurde eine mittlere Laufzeit von 107sec gemessen, Bouet et al. 2007 berichteten von 60sec. Die Studien von Lang 2011 zeigten zwar eine Tendenz der Verbesserung durch die Gabe von Bilobalid, jedoch war diese nicht signifikant.

Bei den alten Tieren fiel auf, dass diese bereits vor Schlaganfall eine wesentlich kürzere Laufzeit auf der Walze zeigten (71sec). Einen Tag nach tMCAO wurde dieses Defizit noch ausgeprägter: Die alten Tiere verblieben im Mittel 15sec auf der rotierenden Walze. Die Gabe von Bilobalid bewirkte bei den alten Tieren jedoch einen signifikanten Anstieg der Laufzeit auf 71sec. Möglicherweise wurde dieser Effekt bei den jungen Tieren aufgrund der nur moderaten Schädigung nicht beobachtet.

Der Corner Test überprüft, ob die Tiere sich bevorzugt zu einer Seite drehen. Umgerechnet in den Lateralitätsindex ergibt sich ein Wert von 0, wenn sich die Maus zu beiden Seiten gleich oft dreht. Bewegt sich die Maus ausschließlich um die linke Achse, entsteht ein LI von 1. Alleinige Rechtsdrehungen haben einen LI von 1 zur Folge (siehe Kapitel 2.5). Der

Corner Test stellt somit ein gutes Maß für die Stärke der halbseitigen Lähmung dar. Vor der Ischämie drehten sich die Mäuse etwa gleich oft um beide Körperachsen, ohne eine Präferenz für eine Seite (siehe auch Bouet et al. 2007 und Lang et al. 2011). Ein Tag nach Ischämie wurde eine deutliche Bevorzugung der linken Seite als Drehrichtung beobachtet (jung: LI = 0,68). Da der Schlaganfall in der linken Hirnhälfte induziert wurde, ergibt sich eine Lähmung der contralateralen, rechten Körperhälfte. Die Maus kann ihre rechten Pfoten nicht mehr benutzen, um sich aus der Ecke heraus zu drehen. Sie dreht sich daher zur linken Seite. Diese Beobachtung wurde bereits in den Studien von Bouet et al. 2007 und Lang et al. 2011 beobachtet. Bilobalid verminderte nach Lang et al. 2011 bei jungen Tieren die Drehungen zur linken Seite signifikant.

Auch die alten Mäuse zeigten vor Schlaganfall keine Bevorzugung einer Seite. Einen Tag nach Ischämie drehten sich die alten Mäuse fast ausschließlich zur linken Seite (LI = 0,95). Bilobalid verbesserte die halbseitige Lähmung auch bei alten Tieren signifikant, resultierend in einem mittleren LI von 0,25.

Von anderen Arbeitsgruppen wurden ebenfalls Verhaltenstests in alten Tieren durchgeführt. Brown et al. 2003 untersuchten das motorische Verhalten bei Ratten: Durch Laufen auf einem schmalen Balken (*narrow beam*) wurden Balance und Feinmotorik getestet. Gealterte Tiere schnitten in diesem Test deutlich schlechter ab als junge. Shapira et al. 2002 beobachteten das Verhalten von jungen und alten Ratten bis zu 2 Wochen nach Schlaganfall. Die alten Tiere zeigten eine deutlich gravierendere Beeinträchtigung durch die Ischämie als die jungen. Badan et al. 2003 untersuchten Ratten bis zu 28 Tage nach Ischämie. Auch sie stellten eine deutliche Verschlechterung der Motorik nach tMCAO im Alter fest und führten diese auf die früher einsetzende Bildung von Narbengewebe aus Gliazellen zurück.

All diese Beobachtungen bestätigen die im Rahmen dieser Dissertation beobachteten motorischen Defizite und deutlich gravierenderen Schäden nach Schlaganfall im Alter.

4.2.3 Schlaganfall und Mikrodialyse

Durch die Methode der Mikrodialyse können Moleküle aus dem Extrazellulärraum dialysiert werden. In den dieser Dissertation zugrunde liegenden Studien wurde eine Dialysesonde mit einem *Cut-off* von 10 kDa in das Striatum des Mäusehirns implantiert. Während die Dialysate gesammelt wurden, erfolgte die Induktion eines Schlaganfalls mit

4 Diskussion

anschließender Reperfusion. So konnten die Änderungen der extrazellulären Konzentrationen von Glucose und Glutamat im Core-Bereich der Ischämie widergespiegelt werden (Li et al. 2006, Chaurasia et al. 2007).

Die in Kapitel 3.2 gezeigten Wiederfindungswerte wurden mit repräsentativen Sonden bestimmt. Der Wiederfindungswert betrug im Mittel 18 %. Er entspricht dem Anteil an Glucose bzw. Glutamat, welcher ausgehend von der tatsächlich im Gehirn vorkommenden Konzentration durch die Sonde dialysiert wurde. Die Bestimmung unterlag leichten Schwankungen, jedoch ergaben die gemittelten Wiederfindungswerte von Glucose verglichen mit denen von Glutamat nahezu den gleichen prozentual dialysierten Anteil (18,9 % im Vergleich zu 17,1 %). Mikrodialysesonden, welche mit dem gleichen Verfahren im Eigenbau hergestellt wurden, ergaben auch in vorherigen Arbeiten einen Wiederfindungswert von etwa 20 % (Lang 2011, Horn 2011).

Die in jungen Tieren gemessenen Glucose-Werte zeigten zunächst eine stabile basale Konzentration von etwa 0,2 mM (Kapitel 3.3.3). Nach Induktion des Schlaganfalls durch Okklusion der mittleren Cerebralarterie sanken die Glucose-Werte bis auf das Detektionslimit von 0,02 mM. Dies zeigt an, dass die Okklusion vollständig erfolgt war. Auch die Reperfusion ist in den Glucose-Werten durch einen sofortigen Anstieg deutlich zu sehen. 60 min nach Ischämie hatten sich die Glucose-Konzentrationen vollständig erholt.

Eine Behandlung mit Bilobalid (10 μ M, lokal durch die Sonde) zeigte keinen Einfluss auf die Glucose-Konzentrationen. Die Werte nach Reperfusion scheinen mit Bilobalid-Behandlung leicht erhöht, jedoch ist dies im Rahmen der großen Variabilität nicht aussagekräftig.

In den Altersstudien zeigten die Glucose-Konzentrationen exakt den gleichen Verlauf. Es wurde weder ein altersbedingter Unterschied noch eine Veränderung nach Bilobalid-Gabe beobachtet. Jedoch konnte auch in diesen Studien eine erfolgreich durchgeführte Ischämie und Reperfusion durch die Glucose-Werte bestätigt werden.

Durch die Laser-Doppler-Flussmessung wurde der Blutfluss im Bereich der mittleren cerebralen Arterie bestimmt. Die Doppler-Werte zeigten eine deutliche Reduktion auf <20 % des Blutflusses während der Ischämie und bestätigen somit die erfolgreich durchgeführten MCAOs. Nach Reperfusion ist ein leichter Anstieg des Blutflusses zu sehen. Dieser erreicht jedoch auch 3 h nach Reperfusion nur 45 % des Ausgangswertes. Da die gemessenen Konzentrationen der Metabolite im Gehirn jedoch bereits 1 h nach Reperfusion

wieder Ausgangsniveau erreicht hatten, scheint die moderate Verbesserung des Blutflusses auszureichen, um das metabolische Ungleichgewicht des Gehirns zu normalisieren.

Der Neurotransmitter Glutamat besaß basale Konzentrationen im Extrazellularraum von etwa $1,2\ \mu\text{M}$. Eine Okklusion der mittleren Cerebralarterie bewirkte einen drastischen Anstieg der extrazellulären Spiegel von Glutamat auf bis zu $23,5\ \mu\text{M}$ (dies entspricht einem Anstieg von 2000 %). Diese Beobachtungen wurden bereits von Kiewert et al. 2010 im permanenten Schlaganfall-Modell beschrieben. Nach Reperfusion sanken die Glutamat-Konzentrationen innerhalb von 40 min wieder auf basale Werte. Auch hier schien die unvollständige Verbesserung des Blutflusses nach Reperfusion, gemessen mit der Laser-Doppler-Flussmessung, ausreichend zu sein, um das metabolische Gleichgewicht wieder herzustellen.

Die extrazellulären Konzentrationen von Glutamat werden in intakten Zellen durch den Natrium-Glutamat-Symport gering gehalten. Dieser nutzt das Konzentrationsgefälle der Natrium-Ionen aus, um Glutamat als Gegenion in die Zellen zu transportieren. Der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat bewirkt im Extrazellularraum eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, welche Ionenkanäle für Ca^{2+} sind (Dingeldine et al. 1999, Goldberg et al. 1987, Moro et al. 2005, McBain und Mayer 1994).

Während einer Ischämie liegt aufgrund des Sauerstoff- und Glucose-Mangels ein Energie-defizit vor. Die ATPasen können das zelluläre Gleichgewicht nicht mehr aufrecht erhalten, unter anderem die niedrigen intrazellulären Na^+ -Konzentrationen. Der Natrium-Glutamat-Symport dreht sich um und die extrazellulären Konzentrationen an Glutamat steigen an (Nicholls und Attwell 1990, Danbolt 2001). Zu hohe extrazelluläre Glutamat-Spiegel wirken durch den nachfolgenden übermäßigen Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen neurotoxisch (siehe Kapitel 1.3)

Demnach hat der gemessene enorme Glutamat-Anstieg, welcher durch die Ischämie induziert wurde, einen entscheidenden Anteil an den Folgeschäden des Schlaganfalls (Choi 1990).

Die Glutamat-Spiegel, welche in den alten Tieren bestimmt wurden, wiesen ähnlich niedrige basale Werte von circa $1,5\ \mu\text{M}$ auf. Während der tMCAO stiegen die extrazellulären Glutamat-Konzentrationen auf bis zu $20\ \mu\text{M}$ an. Dies entspricht einem Anstieg um 1300 %. Verglichen mit dem Anstieg in jungen Tieren, der bei 2000 % lag, ist der Anstieg in alten Tieren somit etwas geringer. Durch die große Standardabweichung der Glutamat-Spiegel junger Tiere ist der Unterschied jedoch nicht signifikant und könnte im Rahmen der

4 Diskussion

Messungenauigkeit ein Artefakt sein. In den Basalwerten wurden schließlich auch keine abweichenden Werte zwischen jungen und alten Tieren gefunden.

Die Behandlung mit Bilobalid (10 μM , lokal durch die Dialysesonde) zeigte bei den jungen Tieren keinen Einfluss auf die basalen Konzentrationen von Glutamat. Während der Ischämie wurde jedoch der enorme Anstieg von Glutamat durch Bilobalid signifikant vermindert (von 2000 % auf 550 %). Ähnliche Ergebnisse wurden bereits im permanenten Schlaganfall-Modell erhalten (Lang et al. 2011). Da die hohen extrazellulären Konzentrationen an Glutamat neurotoxisch sind, ist Bilobalid als Glutamat-Senker im Umkehrschluss als neuroprotektiv einzustufen (Greenamyre 1986). Ebenso wie bei den unbehandelten Tieren sanken die Glutamat-Spiegel nach Reperfusion wieder auf Ausgangsniveau.

Aus den Mikrodialyse-Studien mit alten Tieren ergaben sich bereits vor Ischämie Unterschiede in den Basalwerten. Durch die Bilobalid-Behandlung schienen die Basalwerte höher als ohne Behandlung (gemittelt 4,5 μM im Vergleich zu 1,6 μM). Daher wurde in einer separaten Versuchsreihe untersucht, ob der Zusatz von Bilobalid (10 μM) zur Perfusionsflüssigkeit der Mikrodialysetenden die Glutamat-Werte erhöht. Das Ergebnis war, dass Bilobalid keinen Anstieg der Glutamat-Konzentrationen bewirkte. Vielmehr wurde deutlich, dass eine große Variabilität zwischen den Glutamat-Basalwerten der einzelnen Mäuse vorlag. Bei vier der sieben verwendeten Mäuse lagen die basalen Konzentrationen zwischen 1 und 3 μM . Die drei anderen Tiere wiesen Glutamat-Basalwerte zwischen 6 und 8 μM auf. In einer separaten Studie waren die Glutamat-Konzentrationen von zwei der drei dialysierten Mäuse leicht erhöht. Diese interindividuelle Variabilität wird auch in den Standardabweichungen der Basalwerte deutlich.

In der Literatur gab es keine Hinweise auf altersbedingte Unterschiede in den basalen Konzentrationen von Glutamat im Extrazellulärraum. Cobo et al. 1992 führten eine Mikrodialyse mit push-pull-System durch und analysierten die Dialysate mittels HPLC. Sie stellten keine Abweichungen in Glutamat-, Aspartat- oder Serin-Konzentrationen zwischen und jungen und alten Tieren fest.

Was kann nun die Erklärung für die abweichenden Glutamat-Basalwerte der einzelnen Mäuse sein? Da dieser Effekt bei den alten Tieren ohne Bilobalid-Behandlung nicht beobachtet wurde, kann er nicht altersbedingt sein. Durch die separate Studie mit einem Wechsel der Perfusionsflüssigkeit von aCSF auf aCSF+Bilobalid kann ausgeschlossen werden, dass der Wirkstoff Bilobalid die basalen Glutamat-Konzentrationen beeinflusst. Es ist demnach wahrscheinlich, dass interindividuelle Schwankungen der Grund für

die leicht abweichenden basalen Glutamat-Konzentrationen sind. Die Tiere der beiden Versuchsreihen („unbehandelt“ und „Bilobalid-behandelt“) waren zwar in Stamm (CD-1), Geschlecht und Alter gleich und wurden jeweils von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen, sie stammten jedoch nicht aus der gleichen Zuchtlinie. Daher ist es möglich, dass die interindividuellen Unterschiede erst in der zweiten Versuchsreihe auffallend wurden.

In den durchgeführten Versuchen stiegen die Glutamat-Konzentrationen während der Ischämie auch mit Bilobalid-Behandlung stark an, fast bis auf Kontrollniveau der jungen Tiere. Da die Differenz des Anstiegs durch die erhöhten Basalwerte nach Bilobalid-Behandlung jedoch wesentlich geringer war als ohne Behandlung, wurde der Datensatz prozentual auf den Mittelwert des Basalwertes gerechnet. Die prozentualen Werte zeigen eine signifikante Reduktion des Glutamat-Anstiegs während der Ischämie nach einer Behandlung mit Bilobalid (400 statt 1300 %).

Zusammengefasst lässt sich aus dieser Studie schließen, dass Bilobalid den neurotoxischen Glutamat-Anstieg während Ischämie sowohl in jungen als auch in alten Tieren deutlich verringert.

In vorangegangenen Arbeiten wurde nach einer Erklärung für die Verminderung des Glutamat-Anstiegs durch Bilobalid geforscht. In Studien von Kiewert et al. 2007 und Kiewert et al. 2008 wurden Wechselwirkungen von Bilobalid mit GABA- oder Glycin-Rezeptoren untersucht. Diese konnten jedoch nicht als primäre Targets von Bilobalid identifiziert werden. Lang et al. 2011 überprüften Interaktionen von Bilobalid mit den Enzymen Glutaminase und NAALADase, welche an der Glutamat-Bildung beteiligt sind. Auch diese Versuche zeigten keine positiven Resultate. Im Rahmen dieser Dissertation wurde daher der Schluss gezogen, dass der zelluläre Angriffspunkt von Bilobalid in den Mitochondrien liegen könnte. Durch eine dort induzierte Verminderung des Energiedefizits könnte der Ionengradient innerhalb und außerhalb der Zellen aufrecht erhalten werden. Dies würde somit auch die Verminderung der neurotoxischen extrazellulären Konzentrationen an Glutamat erklären.

Aus diesem Grund folgte die Untersuchung der mitochondrialen Atmungskette als primäres Target von Bilobalid.

4.2.4 Mitochondriale Atmung

Mit dem Oroboros Oxygraphen-2k kann der mitochondriale Sauerstoff-Verbrauch exakt widergespiegelt werden (Garedeu et al. 2005). Durch die Zugabe von verschiedenen Substraten und Inhibitoren der Atmungskette wird die Aktivität von Komplex I, II und IV sowie der Leak-Status, die vollständige Atmung (Oxphos) und das Elektronentransportsystem (ETS) gemessen (genauer siehe Kapitel 2.8).

Die ersten Versuche dieser Art wurden durchgeführt von Chance und Williams 1955. Sie definierten die mitochondriale Atmung in zwei hauptsächlich vorliegende Zustände: *State 3* ist der Zustand, in dem die Substrate ausreichend zur Verfügung stehen und die Atmung vollständig abläuft. Im Oroboros Oxygraphen ist der *state 3* mit dem Oxphos-Zustand vergleichbar. In *state 4* stagniert die Atmung, da das gesamte vorhandene ADP zu ATP umgewandelt wurde. Dieser Zustand wird im Oxygraphen als „Leak I“ bezeichnet, welcher in diesem Fall die mitochondriale Atmung vor Hinzugabe von ADP als Substrat widerspiegelt.

In dieser Dissertation wurde zunächst die Atmung von Mitochondrien junger Tiere bestimmt (Methode siehe Kapitel 2.8). Diese zeigte reproduzierbare Ergebnisse, die den Erwartungen entsprachen: Die Leak-Zustände wiesen einen relativ geringen Sauerstoffverbrauch auf, wohingegen besonders der Oxphos-, ETS- und Komplex-IV-Zustand eine hohe Atmungsaktivität ergaben. In weiterführenden Versuchen wurde eine Ischämie durch 60-minütige MCAO in der linken Hemisphäre induziert. Direkt im Anschluss wurden die Mitochondrien der rechten und linken Hemisphäre separat voneinander isoliert. So konnte die Atmungsaktivität der „ischämischen“ Hemisphäre mit der contralateralen, vermeintlich „gesunden“, Hemisphäre verglichen werden. Wie erwartet bewirkte die Ischämie eine drastische Reduktion des Sauerstoffverbrauchs aller mitochondrialen Komplexe und Zustände. Die Beeinträchtigung war in der „ischämischen“ Hemisphäre stärker ausgeprägt als in der „gesunden“. Am drastischsten wurde die Atmung von Komplex I der Atmungskette durch die Ischämie gesenkt (auf 14 % der Kontrolle).

Diese Befunde sind in der Literatur bereits zu finden. Janssens et al. 2000 beschrieben eine starke Reduktion der Aktivität von Komplex I und III nach Ischämie. Die Komplex III-Atmung ist der einzige Status, welcher von dem in dieser Dissertation verwendeten Pipettierschema nicht erfasst wird und separat bestimmt werden müsste. Demnach wurde die Komplex III-Atmung in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Literaturdaten zeigten außerdem, dass eine Ischämie einen starken Abfall der *state 3*-Rate und des

entkoppelten Zustandes bewirkt. Zusätzlich wurde eine moderate Reduktion in *state 4* beobachtet (Ginsberg et al. 1977). Die Hemmung der einzelnen Komplexe der Atmungskette scheint außerdem von der Stärke der Ischämie abhängig zu sein. Die Aktivität von Komplex I wird zum Beispiel erst durch eine massive Ischämie signifikant vermindert (Allen et al. 1995). Andere Studien berichten über eine besonders starke Beeinträchtigung in Komplex IV nach Ischämie (Canevari et al. 1997). In den Versuchen der vorliegenden Dissertation wurden alle respiratorischen Zustände etwa in gleichem Maße durch die Ischämie gehemmt. Die Verminderung der Aktivität der gesamten Atmungskette wurde auch von Moro et al. 2005 zusammengefasst. Wie bereits erwähnt, zeigte in den Versuchen dieser Dissertation die Komplex I-Atmung ein besonders deutliches Defizit.

Auch die Hersteller des Oroboros Oxygraphen machten sich über die Verminderung der respiratorischen Kapazität nach einer Ischämie bereits Gedanken (Gnaiger 2001). Nach den durchgeführten Studien würde eine milde Hypoxie vor oxidativem Stress schützen und für eine Ökonomisierung des Transports durch die respiratorische Kaskade führen. Ein hoher Sauerstoffgehalt würde sogar die oxidative Phosphorylierung (Oxphos) vermindern und zu einer weniger effizienten mitochondrialen Atmung führen (Gnaiger et al. 2000).

Diese Studien wurden durchgeführt, um den optimalen Sauerstoffgehalt der Kammern des Oxygraphen festzulegen. Natürlich sind die Schäden, welche durch die Ischämie *in vivo* entstehen, wesentlich gravierender. Sie begünstigen oxidativen Stress vielmehr als davor zu schützen (Juurink und Sweeney 1997, Sastre et al. 2000). Nichtsdestotrotz führt die Analyse des angemessenen Sauerstoffangebots im Oxygraphen zu der Überlegung, dass die vorherrschenden Bedingungen während der Messung der mitochondrialen Atmung durch die Hersteller auf das Optimum eingestellt wurden. Bereits bei Isolation der Mitochondrien befinden sich diese in einem Medium (Mir05), welches die mitochondrialen Strukturen bestmöglich stabilisiert und mit Sauerstoff und Glucose versorgt. Diese Bedingungen werden im Oxygraphen aufrecht erhalten. Zudem werden zur Messung der mitochondrialen Atmung ausreichend Substrate zur Verfügung gestellt. *In vivo* wären die zellulären Bedingungen gerade nach einer Ischämie nicht mehr als optimal einzustufen. Es würde an Sauerstoff und Glucose mangeln, was sekundär zu einem Mangel an weiteren Substraten führt und die mitochondriale Atmung stark beeinträchtigt (Sims und Muyderman 2010).

Die verwendeten Mitochondrien erfuhren vor der Isolation eine 60-minütige Ischämie *in vivo*. Dies war die beste und einzige Möglichkeit, die mitochondriale Atmungskette einer möglichst physiologischen Ischämie auszusetzen. Der anschließende Transfer in ein

optimales Medium ist demnach einer (unphysiologischen) Reperfusion gleichzusetzen (Reperfusionsschäden siehe Murakami et al. 1997, Mao et al. 1999, Almeida et al. 1995). Natürlich können nach Zerstören der zellulären Strukturen keine Entzündungsprozesse und Sekundärschäden auftreten; dafür haben die Mitochondrien in der Zeit der Aufarbeitung und Messung Zeit, sich von dem vorherigen Glucose- und Sauerstoffmangel *in vivo* zu erholen. Da jedoch alle Versuche mit gleichem Ablauf durchgeführt wurden, stellt diese Kombination aus *in vivo*- und *in vitro*-Arbeiten eine durchdachte und bestmöglich physiologische Methode zur Bestimmung der mitochondrialen Atmungskapazität nach einem Schlaganfall dar.

Die Behandlung mit Bilobalid erfolgte in diesem Versuch bei jungen Tieren auf zwei Wegen: Bilobalid (10 μ M) wurde entweder direkt vor der Messung des Sauerstoffverbrauchs zu den Mitochondrien in die Kammern des Oxygraphen gespritzt oder es wurde eine Stunde vor MCAO intraperitoneal verabreicht (10 mg/kg). Die lokale Zugabe von Bilobalid zeigte eine leichte Verbesserung der Atmungsaktivität von Komplex I nach Ischämie. Die intraperitoneale Gabe von Bilobalid vor Schlaganfall bewirkte eine signifikante Verbesserung der respiratorischen Aktivität von Komplex I in der ischämischen Hemisphäre. Diese Befunde waren bereits von Janssens et al. 2000 in einem einfacheren Modell berichtet worden. Die Arbeitsgruppe um Janssens induzierte die Ischämie bei Ratten *in vitro*, indem das Hirn für 15 min bei 37°C ruhte, bevor die Isolierung der Mitochondrien vorgenommen wurde. Die Aktivität der einzelnen Komplexe wurde in getrennten Ansätzen mit einer Clark-Elektrode bestimmt. Die in der vorliegenden Dissertation durchgeführten Versuche bringen daher den methodischen Vorteil einer *in vivo* induzierten Ischämie sowie eines abgeschlossenen Systems zur Messung der Komplexaktivitäten. Der Bilobalid-Effekt auf die mitochondriale Atmung wurde von Janssens et al. 2000 in Komplex I und III der Atmungskette lokalisiert. Auch auf molekularer Ebene stellten Tendi et al. 2002 eine Beeinflussung von Komplex I durch Bilobalid fest. In PC 12-Zellen regulierte Bilobalid (10 μ g/ml) die mRNA der NADH-Dehydrogenase hoch. Bouaziz et al. 2002 verfolgten einen anderen Ansatz: Die Arbeitsgruppe entwickelte neue Moleküle, welche Strukturmerkmale von Bilobalid enthielten. Anschließend wurde der Einfluss dieser Moleküle auf die mitochondriale Atmung in hypoxischen SH-SY5Y Neuroblastomzellen untersucht. Das Ergebnis war eine Verbesserung der Komplex I und III-Atmung, wie bereits von Janssens et al. 2000 beschrieben.

Zusammengefasst kann der neuroprotektive Effekt von Bilobalid nun auf die Komplexe der Atmungskette lokalisiert werden. In den Studien dieser Dissertation wurde eine

deutliche Verbesserung der Atmung von Komplex I beobachtet (von 14 % auf 44 % der Kontrolle). Eine Beteiligung von Komplex II der Atmungskette konnte durch die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Studien ausgeschlossen werden. Ebenfalls wurde die vollständige mitochondriale Atmung im Oxphos-Zustand durch Bilobalid nicht verbessert. Dies bedeutet, dass eine Sättigung von Komplex II mit Succinat, wie sie während der Messung vorlag, den Bilobalid-Effekt durch den konvergenten Elektronentransport nivelliert. Der Angriffspunkt von Bilobalid muss demzufolge in Komplex I oder auf dem Transportweg der Elektronen von Komplex I zu Komplex III liegen. Dieser Transport wird durch das Coenzym Q durchgeführt (siehe Abbildung 4.1 und Mourier und Larsson 2011).

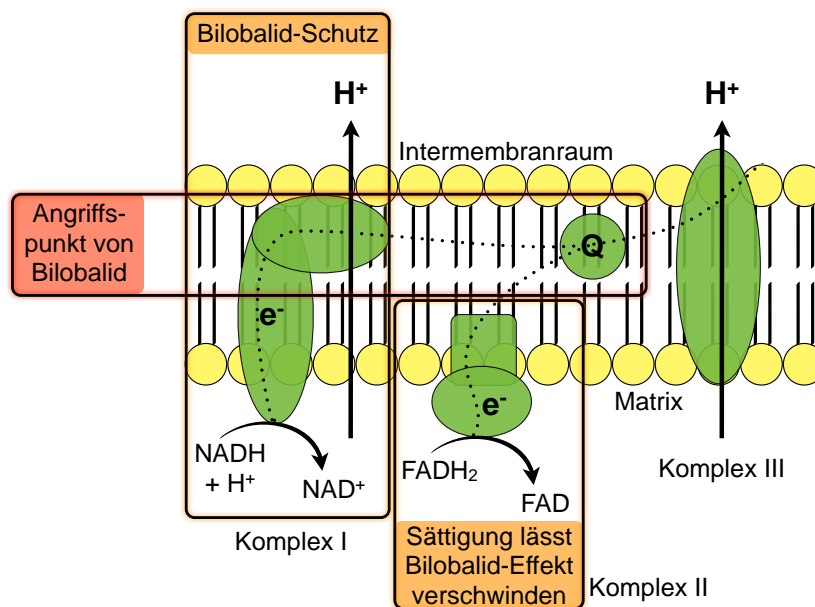


Abbildung 4.1: Bilobalid-Effekt auf die mitochondriale Atmungskette. In Komplex I der Atmungskette wurde ein Schutzeffekt durch Bilobalid nach Ischämie festgestellt. Komplex II und die gesamte Atmung aller Komplexe (Oxphos-Status) zeigte keine Beeinflussung durch Bilobalid. Der konvergente Elektronentransport von Komplex I und II nivelliert demnach den Bilobalid-Effekt, was auf einen Angriffspunkt des Neuroprotektivums in Komplex I oder Coenzym Q schließen lässt.

Veränderungen im O_2 -Verbrauch wurden auch in Mitochondrien von alten Tieren mit dem Oroboros Oxygraphen untersucht. Zunächst fiel bei diesen Studien auf, dass die gesamte Atmungsaktivität in alten Tieren geringer war als in jungen (etwa 55-70 % des Sauerstoffverbrauchs junger Tiere). Dieser Effekt zog sich über alle untersuchten

Atmungszustände (Komplex I, II, IV, Leak, Oxphos, ETS). *In vitro* wurden bereits altersbedingte Defizite in den Komplexen I, II und IV publiziert (Benzi und Moretti 1995). Zudem stellten Sastre et al. 1998 fest, dass das Membranpotential im Alter niedriger ist, was zu einer verminderten Energiebereitstellung führt. Chang und Reynolds 2006 beobachteten eine bessere Mobilität von „jungen“ Mitochondrien. Im Alter wären die mitochondrialen Prozesse langsamer und könnten dem Energiebedarf nicht mehr gerecht werden, besonders nicht während einer Ischämie.

Um die respiratorische Aktivität nach einer Ischämie zu untersuchen, wurde in gealterten Tiere eine 60-minütige MCAO *in vivo* induziert und die Mitochondrien im Anschluss separat für die rechte („gesunde“) und linke („ischämische“) Hemisphäre isoliert (Methode siehe Kapitel 2.8). Interessanterweise reduzierte die Ischämie den Sauerstoff-Verbrauch nur sehr moderat. Am meisten beeinträchtigt waren die Komplexe I und IV mit einer Verminderung des Sauerstoffverbrauchs auf 59 % bzw. 63 % der Kontrolle.

Was könnten die Gründe für die vermeintliche Resistenz der mitochondrialen Atmungskomplexe alter Tiere gegenüber der *in vivo* induzierten Ischämie sein? Da sämtliche Versuche dieser Dissertation ebenso wie die Literaturdaten belegen, dass ein Schlaganfall im Alter gravierendere Auswirkungen besitzt als in jungen Jahren, müssten die alten Mitochondrien eigentlich ein noch größeres Energiedefizit nach Ischämie zeigen.

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, wurde in gealterten Zellen ein erhöhter Anteil an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gefunden (Sastre et al. 2002, Moran et al. 2012, Lenaz et al. 2002). Es könnte daher sein, dass der dauerhaft erhöhte oxidative Stress im Alter zu der Ausbildung von Kompensationsmechanismen geführt hat. Dieser Ansatz wurde von Manczak et al. 2005 verfolgt. Die Arbeitsgruppe beobachtete eine erhöhte Expression der mRNA, welche die Komplexe der Atmungskette codieren, in Cortex und Hippocampus von 12-18 Monate alten Mäusen. In anderen Arbeiten konnten ebenfalls Hinweise auf eine kompensatorische Aktivierung von Reparaturenzymen oder antioxidativen Mechanismen gefunden werden (Szczesny et al. 2003, Trifunovic und Larsson 2008, Siddiq et al. 2007, Lenaz et al. 2002, Calabrese et al. 2004). All diese Arbeitsgruppen wiesen separat voneinander auf eine „Anpassung“ an den oxidativen Stress im Alter hin. Die Literaturrecherche ergab jedoch keine klare Aussage darüber, ob Kompensationsmechanismen im Alter nachgewiesen werden konnten.

Es scheint zudem unrealistisch, dass eine solche „Anpassung“ an oxidativen Stress ausreicht, um eine 60-minütige Ischämie zu kompensieren. Wenn dies der Fall wäre, hätten die Ergebnisse der TTC-Färbung und der motorischen Fähigkeiten (Kapitel 3.3.1 und

3.3.2) einen altersbedingten Schutz vor Schlaganfall zeigen müssen. Da dies nicht zu beobachten war, müssen noch andere Faktoren an der hohen respiratorischen Aktivität nach MCAO beteiligt sein.

Villa et al. 2009 induzierten bei jungen und alten Ratten jeweils eine 15-minütige globale Ischämie und untersuchten anschließend die Aktivität der Enzyme des Citratcyclus in isolierten Mitochondrien. Bei alten Tieren waren die Enzymaktivitäten durch die Ischämie deutlich stärker vermindert als bei jungen. Auch Corbisier und Remacle 1993 machten diese Entdeckung, indem sie gealterte Mitochondrien in „junge“ Fibroblasten injizierten und dadurch eine verminderte Energieproduktion durch langsamer ablaufende Stoffwechselprozesse beobachteten. Ist die Aktivität des Citratcyclus reduziert, so heißt dies jedoch im Umkehrschluss, dass nicht nur weniger Reduktionsäquivalente gebildet werden, sondern auch Substrate für die Atmungskette in niedrigeren Konzentrationen vorliegen. Während der Messung im Oxygraphen lagen die Substrate jedoch in hohen Konzentrationen vor. Möglicherweise sind die Atmungskomplexe alter Tiere auf ein niedriges Angebot an Substraten eingestellt und können bei optimaler Sättigung *in vitro* wesentlich höhere Aktivitäten zeigen, als es *in vivo* der Fall gewesen wäre.

Dies könnte eine plausible Erklärung für den *ex vivo* beobachteten geringen Schaden der mitochondrialen Atmungskette nach Ischämie sein. Da die respiratorische Kapazität nicht *in situ* im Hirn gemessen werden kann, müsste man die Bedingungen im Oxygraphen ändern. Ein niedriger Sauerstoffgehalt sowie die Bereitstellung von weniger Substraten könnten in diesem Versuch bei alten Tieren die *in vivo* ablaufenden Prozesse eventuell besser darstellen (Hütter et al. 2006).

Da laut dieser Theorie die erhöhte Kapazität der Atmungskette methodisch bedingt nur *in vitro* zu beobachten ist und *in vivo* weiterhin eine starke Schädigung der mitochondrialen Atmung vorliegt, besteht kein Widerspruch zwischen den Befunden dieser Experimente und der allgemeinen Annahme, dass Schlaganfälle im Alter gravierendere zelluläre Schäden nach sich ziehen. Bei jungen Mäusen zeigte sich dieser Effekt nicht, da die Mengen an hinzugegebenen Substraten den physiologischen Bedingungen in jungen Mitochondrien angepasst war (Hand et al. 2010, Lassnig et al. 2011).

Die intraperitoneale Gabe von Bilobalid (10 mg/kg) eine Stunde vor Ischämie bewirkte bei den alten Tieren keine deutliche Verbesserung der mitochondrialen Atmung. Lediglich in Komplex I und IV war eine leichte Tendenz zu sehen. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die geringe *in vitro* beobachtete Schädigung durch die Ischämie zurückzuführen.

4.2.5 Mitochondriale Schwellung

Als weiterer potentieller Angriffspunkt für Neuroprotektiva wurde die mPT-Pore (*mitochondrial permeability transition pore*) untersucht. Sie wurde erstmalig von Hunter et al. 1976 beschrieben und bildet sich bei zellulären Schäden in der inneren mitochondrialen Membran, so dass diese für Moleküle mit einem Gewicht von weniger als 1,5 kDa durchlässig wird (Eckmann et al. 2013, Halestrap 2006, Jonas 2009, Lemasters et al. 1997). Dadurch kann unter anderem das Membranpotential nicht mehr aufrecht erhalten werden und die Energieproduktion wird stark beeinträchtigt (Crompton 1999). Das Ausmaß der Schwellung kann durch das osmotisch bedingte Anschwellen des Mitochondriums gemessen werden.

Dubinsky et al. 1999 berichten von einem Glutamat-induzierten Anschwellen der Mitochondrien hippocampaler Neurone. Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, ist der Neurotransmitter Glutamat ein Ligand der Ca^{2+} -leitenden NMDA-Rezeptoren. Hohe Konzentrationen von Calciumionen in der Zelle induzieren demnach die Bildung der mPT-Pore und führen letztlich zum programmierten Zelltod, der Apoptose (Kristian und Siesjö 1998, Halestrap 2009, Szydlowska und Tymianski 2010). In den Versuchen dieser Dissertation wurde die Schwellung direkt durch Ca^{2+} -Zugabe induziert. Da jedoch, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, eine zelluläre Schädigung durch Ischämie die extrazellulären Konzentrationen von Glutamat enorm erhöht, kann folglich nach einer Ischämie auch von einer Schwellung der Mitochondrien, induziert durch die mPT-Pore, ausgegangen werden.

Um zu verifizieren, dass die gemessene Schwellung tatsächlich von der mPT-Pore ausgelöst war, wurde jeder Versuch nach Zugabe von Cyclosporin A (CsA), einem Hemmstoff der Pore, wiederholt (Bernardi et al. 1994). In diesen Versuchen war das Schwellungsvermögen der Mitochondrien deutlich gehemmt. Die verbleibende gemessene Schwellung nach CsA-Zugabe war demnach nicht durch die mPT-Pore induziert. Kuroda et al. 1999 führten Experimente nach tMCAO in Ratten durch, in welchen eine vorherige Gabe des Immunosuppressivums CsA einen deutlich protektiven Effekt in TTC-gefärbten Hirnschnitte bewirkte. Muramatsu et al. 2007 konnten diese Ergebnisse in einer transienten globalen Ischämie in Gerbilen und einer transienten fokalen Ischämie in Ratten bestätigen. Sie postulierten jedoch mehr einen aufschiebenden als einen hemmenden Effekt auf den entstehenden Hirnschaden. Zusammengefasst wird in diesen Versuchen jedoch deutlich, dass die mPT-Pore einen entscheidenden Beitrag zu der Auslösung von Apoptose und den

bleibenden Schäden nach Schlaganfall besitzt und eine Hemmung der Pore neuroprotektiv wirkt.

In den Versuchen der vorliegenden Dissertation wurde eine Ischämie *in vivo* durch 60-minütige MCAO ausgelöst. Direkt im Anschluss wurden die Mitochondrien separat für die ischämische und contralaterale („gesunde“) Hemisphäre isoliert (Kapitel 2.9). Die Schwellung wurde durch zwei verschiedene Konzentrationen an Calcium-Ionen induziert (4 bzw. 8 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein) und die Absorption der mitochondrialen Lösung mit einem Photometer bestimmt. Mit dem Porenöffner Alamethicin wurde eine maximale Schwellung der Mitochondrien erreicht und als 100 % definiert (Hansson et al. 2004).

Die Ergebnisse zeigten bei jungen Tieren eine Verminderung der Schwellungskapazität nach Ischämie um 10-12 %, wobei die ischämische Hemisphäre leicht stärker betroffen war als die contralaterale. Die beobachtete verminderte Schwellung nach Ischämie scheint im ersten Moment widersprüchlich. Die Literaturrecherche lieferte jedoch eine ähnliche Arbeit, in welcher eine temporäre Okklusion der mittleren Cerebralarterie (MCAO) bei Ratten durchgeführt wurde (Sun et al. 2012). Wie in den Versuchen dieser Dissertation wurden die Mitochondrien direkt im Anschluss an die MCAO isoliert und zur Messung der mitochondrialen Schwellung aufgearbeitet. Die Kontrollgruppe von Sun et al. 2012 zeigte nahezu keine Beeinflussung im Schwellungsausmaß nach Zugabe von Ca^{2+} . Andere Arbeiten beobachteten einen signifikanten Anstieg der mitochondrialen Schwellung nach einer Ischämie (Atif et al. 2009, Qi et al. 2010). In diesen Studien wurden die Mitochondrien jedoch erst 22 h nach Reperfusion isoliert. In den Experimenten der vorliegenden Dissertation erhielt das Hirngewebe keine Reperfusion, weshalb die Ergebnisse nicht unmittelbar vergleichbar sind.

Cheng et al. 2008 untersuchten den Einfluss einer Ischämie auf verschiedene Kanäle der mitochondrialen Membran. In den direkten Vergleich stellten sie die mPT-Pore und den mitochondrialen BK-Kanal. Der mtBK-Kanal ist einer von bisher fünf bekannten Kalium-Kanälen der inneren Mitochondrienmembran (Cheng et al. 2010). Er ist mit dem BK-Kanal der Plasmamembran verwandt und wird ebenfalls durch Ca^{2+} und oxidativen Stress aktiviert. Der mtBK-Kanal ist aber bisher nur wenig erforscht. In den Versuchen der Arbeitsgruppe um Cheng erhöhte eine Hypoxie in Ratten-Astrocyten, ausgelöst durch Stickstoffbegasung *in vitro*, die Aktivität des mtBK-Kanals. Die Bildung der mPT-Pore wurde durch die Ischämie dagegen vermindert. Dies wurde auf eine erhöhte Ca^{2+} -Retention zurückgeführt, welche mit dem Fluoreszenzfarbstoff Safranin O detektiert wurde. Die Arbeitsgruppe stellte die Hypothese auf, dass es einen Zusammenhang zwischen dem

4 Diskussion

mtBK-Kanal und der mPT-Pore gibt: Ein geöffneter mtBK-Kanal verhindert die Bildung der mPT-Pore.

Die von Cheng et al. 2010 aufgestellte Vermutung deckt sich sehr gut mit den Ergebnissen dieser Dissertation. Durch die Ischämie sinkt die Schwellungskapazität etwa auf die gleichen Werte, welche nach CsA-Behandlung beobachtet wurden. Das heißt, dass keine Schwellung vorhanden war, welche durch die mPT-Pore ausgelöst wurde. Die Kontrolltiere ohne ischämische Vorbehandlung zeigten eine größere mitochondriale Schwellung. In den Mitochondrien, welche keine Ischämie *in vivo* erfuhren, wurde die Schwellung demnach durch die hinzugegebenen Calcium-Ionen induziert. Dies zeigt an, dass die Induktion der Porenbildung und Schwellung erfolgreich war. Bestätigt wird dies durch die zwei eingesetzten verschieden hohen Konzentrationen an Ca^{2+} : mehr Ca^{2+} induzierte ein höheres Schwellungspotential. Überträgt man die Theorie von Cheng et al. 2010 auf die durchgeführten Versuche, so war bei den jungen Tieren nach Ischämie keine Schwellung mehr zu beobachten, da durch die Ischämie der mtBK-Kanal aktiv und die mPT-Pore gehemmt war.

Die Behandlung mit Bilobalid (10 mg/kg) eine Stunde vor MCAO verhinderte die Senkung der Schwellungskapazität nach Ischämie, so dass die Absorption nahezu Kontrollniveau behielt. Verfolgt man weiterhin die Theorie nach Cheng et al. 2010, so würde dies bedeuten, dass Bilobalid einen Einfluss auf den Zusammenhang zwischen dem mtBK-Kanal und der mPT-Pore hätte. Es könnte sein, dass Bilobalid durch die bessere Energiebereitstellung und die daraus resultierenden niedrigeren intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen den mtBK-Kanal weniger aktiviert oder auf andere Weise beeinflusst, so dass die mPT-Pore wie bei Kontrolltieren wieder aktiv wird. Ob mitochondriale Kanäle, wie zum Beispiel der mtBK-Kanal, ein Target für Bilobalid darstellen, müsste in weiteren Studien untersucht werden.

Die Untersuchung des Schwellungsverhaltens der Mitochondrien von alten Tieren ergab ein deutlich anderes Bild. Nach Ischämie waren die Mitochondrien stärker angeschwollen als bei Kontrollversuchen ohne vorherige Ischämie (13-18 % mehr Schwellung). Wie bereits für die jungen Tiere berichtet, war die Schwellung, welche durch höhere Konzentrationen Ca^{2+} induziert war, deutlicher ausgeprägt (verglichen wurden 4 mit 8 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein Ca^{2+}). Dies bedeutet, dass auch in diesen Versuchen die Induktion der Schwellung durch die Calcium-Ionen erfolgreich war.

Laut Literaturdaten sind gealterte Mitochondrien generell anfälliger gegenüber Calcium-Ionen (Lores-Arnaiz und Bustamante 2011, Brown et al. 2004). Zusätzlich hängt die

Bildung der mPT-Pore auch sehr stark mit dem oxidativem Stress der Zellen zusammen (Zorov et al. 2006). ROS aktivieren das Öffnen der mPT-Pore und diese kommen in gealterten Zellen in höherem Anteil vor als in jungen (siehe Kapitel 1.2).

Dies wäre eine Möglichkeit, um die erhöhte Schwellung der Mitochondrien nach Ischämie in gealterten Tieren zu erklären. Durch die höhere Anfälligkeit gegenüber intrazellulären Calcium-Ionen und oxidativem Stress kann der mtBK-Kanal die mPT-Pore nicht ausreichend hemmen, wie dies bei jungen Mitochondrien der Fall war. Eine plausible Erklärung wäre, dass der mtBK-Kanal im Alter weniger aktiv ist. Es könnte jedoch auch möglich sein, dass der mtBK-Kanal die mPT-Pore nur bis zu einem gewissen Schwellenwert an Schädigungen hemmen kann. Leider gibt es keine Literaturdaten über Veränderungen des mtBK-Kanals im Alter, da dieser hierfür noch zu wenig erforscht ist. Die aufgestellte Hypothese kann demnach nicht belegt werden, ergibt sich jedoch als mögliche Schlussfolgerung.

In der Altersstudie bewirkte die Behandlung mit Bilobalid (10 mg/kg) eine Stunde vor Ischämie eine signifikante Erniedrigung der mitochondrialen Schwellung auf Kontrollniveau.

Ein Vergleich der Schwellungskapazitäten zwischen jungen und alten Tieren zeigt, dass Kontroll- und Bilobalidgruppe in beiden Altersgruppen eine Schwellungskapazität von 20-30 % (für 4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein Ca^{2+}) aufweisen. Allein der starke Anstieg der Schwellung nach Ischämie im Alter lässt Bilobalid protektiv erscheinen. Genau genommen hält die Behandlung mit Bilobalid die Schwellung auf Kontrollniveau, wie bereits bei den jungen Tieren beobachtet. In diesen Versuchen wird deutlich, dass Bilobalid die mitochondriale Schwellung beeinflusst und auf einem konstanten Wert nahe der Kontrolle hält. Da jedoch die Wirkung von Bilobalid bei jungen Tieren erhöhend und bei alten Tieren erniedrigend war und nur bei der altersbedingten Schwellung die mPT-Pore direkt beteiligt war, scheint die mPT-Pore kein direktes Target von Bilobalid zu sein. Vielmehr scheint Bilobalid eine Wirkung auf die mitochondriale Membran zu haben, welche die mitochondriale Schwellung sekundär beeinflusst.

4.2.6 Zusammenfassung

In Abbildung 4.2 sind die pathobiologischen Auswirkungen, welche durch eine Ischämie entstehen, schematisch zusammengefasst. Die genaue Beschreibung dieses Schemas ist in der Einleitung, Kapitel 1.3, zu finden.

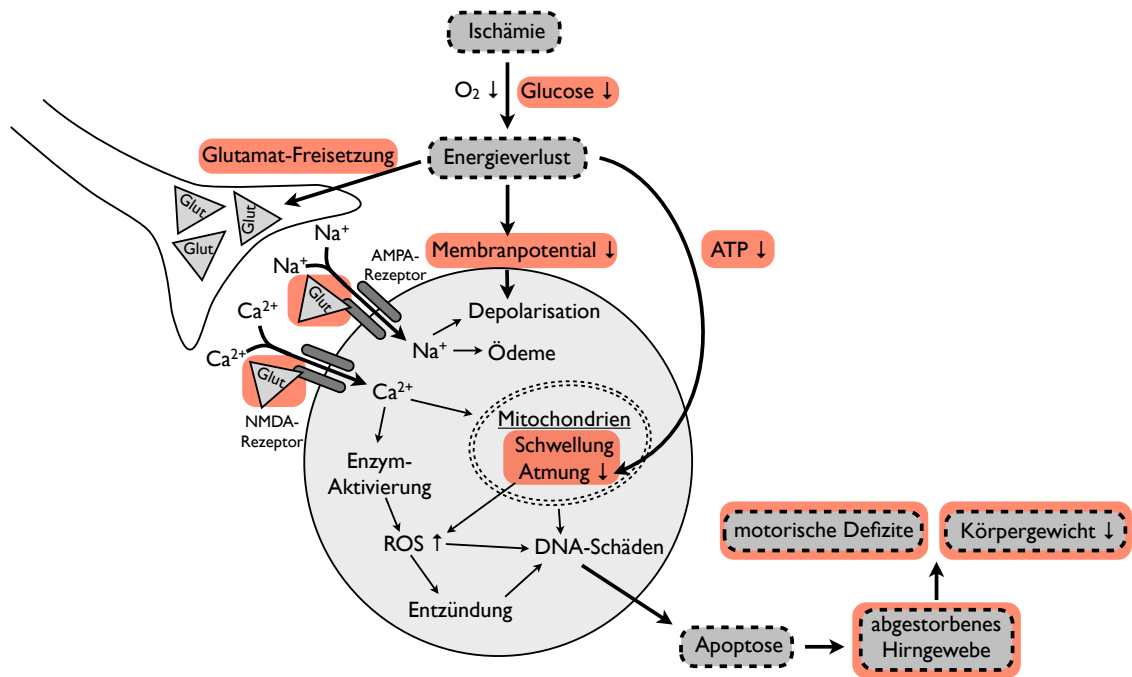


Abbildung 4.2: Im Rahmen dieser Dissertation untersuchte pathobiologische Veränderungen im Gehirn nach Ischämie (in rot unterlegt). Durch den Mangel an Sauerstoff und Glucose kommt es zum Energieverlust in den Zellen. Unter anderem führen die Freisetzung von Glutamat und die mitochondriale Schwellung zum Zelltod, welcher mittels Färbemethoden im Gehirn und Verhaltenstests determiniert werden kann.

In Kürze erläutert, entsteht durch den stark verminderten Blutfluss ein Mangel an Glucose und Sauerstoff in dem betroffenen Gewebe. Hierdurch mangelt es der mitochondrialen Atmung an Substraten und die Energiegewinnung ist stark beeinträchtigt. Der Ionengradient über die Zellmembran kann nicht mehr aufrecht erhalten werden und das Membranpotential bricht zusammen. Die Konsequenz ist unter anderem ein enormer Anstieg des Neurotransmitters Glutamat im Extrazellularraum, welcher durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren für einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle sorgt und damit weitere Schäden, wie beispielsweise die mitochondriale Schwellung, auslöst. All diese Faktoren führen letztendlich zu dem Absterben des betroffenen Hirngewebes, was anhand der TTC-Färbung überprüft werden kann. Die in der Graphik rot markierten Bereiche wurden im Rahmen dieser Dissertation untersucht und deren Veränderungen nach MCAO bestätigt.

Die neuroprotektive Wirkung von Bilobalid ist in Abbildung 4.3 zusammengefasst. Alle zellulären Veränderungen, welche Bilobalid in den Versuchen dieser Dissertation nach Schlaganfall gezeigt hat, sind in grün hinterlegt.

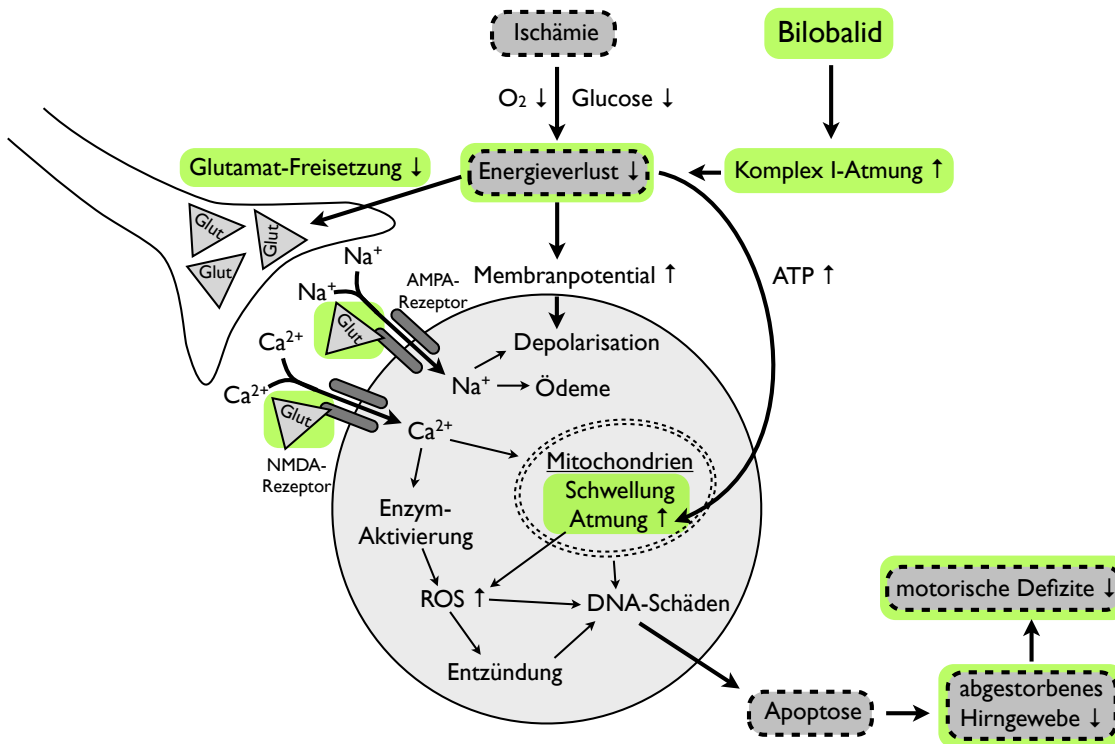


Abbildung 4.3: Bilobalid-Effekt auf die pathobiologischen Veränderungen nach Schlaganfall (in grün unterlegt). Durch Bilobalid wurde die Komplex I-Atmung signifikant verbessert, wodurch einem Energiedefizit nach Schlaganfall entgegengewirkt wird. Zusätzlich wurde eine Verringerung des extrazellulären Glutamat-Anstiegs und der mitochondrialen Schwellung beobachtet. Auch die Infarktfläche und das motorische Defizit nach Schlaganfall wurden durch Bilobalid vermindert. All diese Ergebnisse resultieren aus einer besseren Energiebereitstellung und identifizieren die mitochondriale Atmungskette daher als Zielstruktur von Bilobalid.

In dieser Dissertation wurde bewiesen, dass Bilobalid die Aktivität von Komplex I der Atmungskette in *ex vivo* gewonnenen, ischämischen Mitochondrien signifikant verbessert. Mit diesem Ergebnis kann der neuroprotektive Wirkmechanismus von Bilobalid erklärt werden. Außerdem wurde mit diesem Befund der zelluläre Wirkort von Bilobalid weiter eingengt.

Bilobalid wirkt dem Energiedefizit nach Ischämie durch die Verbesserung der mitochon-

4 Diskussion

drialen Atmung von Komplex I deutlich entgegen. Nach einer Gabe von Bilobalid steht der Zelle folglich mehr ATP zur Verfügung und der Ionengradient der Zellmembran wird nicht so stark beeinträchtigt. Hierdurch tritt signifikant weniger neurotoxisches Glutamat in den Extrazellularraum, was in den Mikrodialyse-Versuchen dieser Dissertation deutlich wurde.

Der hohe Calcium-Ionen-Einstrom, welcher in ischämischen Zellen auftritt, würde durch diesen Effekt vermindert werden, da durch weniger Glutamat auch weniger NMDA-Rezeptoren aktiviert würden. Ein gutes Maß für den Ca^{2+} -Einstrom ist die mitochondriale Schwellung. Durch hohe Calcium-Konzentrationen wird die Bildung von Kanälen in der inneren Mitochondrienmembran, wie der mPT-Pore, aktiviert. Die Membran wird folglich durchlässig für kleine Moleküle und das Mitochondrium schwillt an. Auch die Senkung der mitochondrialen Schwellung konnte in den Bilobalid-Studien gezeigt werden. In diesem Versuch wurde jedoch auf keine direkte Beeinflussung der mPT-Pore durch Bilobalid geschlossen, sondern vielmehr auf ein Zusammenspiel zwischen dem mtBK-Kanal und der mPT-Pore.

Der durch Bilobalid verhinderte Zelltod konnte in TTC-gefärbten Hirnschnitten als stark verminderte Infarktfläche gezeigt werden.

Die durchgeführte Altersstudie bestätigte die neuroprotektive Wirkung von Bilobalid in 18-24 Monate alten Tieren, legte jedoch auch einige altersbedingte Unterschiede dar. Am auffälligsten waren diese Abweichungen in der mitochondrialen Atmungsaktivität alter Tiere. Diese war stark vermindert, was auf die im Alter vorherrschenden hohen Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies zurückgeführt werden könnte.

Ebenso wie in jungen Tieren zeigte Bilobalid bei alten Tieren neuroprotektive Eigenschaften. Der enorme Anstieg an extrazellulärem Glutamat, welcher durch eine Ischämie ausgelöst wird, wurde durch Bilobalid vermindert. Auch das Ausmaß der mitochondrialen Schwellung wurde durch Bilobalid auf Kontrollniveau gesenkt.

Ein Tag nach MCAO war die Infarktfläche der Hirnschnitte bei alten Tieren deutlich größer als bei jungen, aber auch in diesem Versuch war ein deutlicher Bilobalid-Effekt bei alten Tieren sichtbar.

Schlussendlich zeigten die alten Tiere eine generell schlechtere Leistung in den motorischen Verhaltenstests. Eine Ischämie ließ diese Beeinträchtigung noch wachsen. Die Bilobalid-Behandlung verbesserte die Leistungen der Tiere nach Ischämie, was besonders im Rotarod und Corner Test deutlich wurde.

Nach Abschluss des Altersvergleiches kann generell gesagt werden, dass eine 60-minütige Ischämie bei alten Tieren zu gravierenderen Schäden führt als bei jungen. Bilobalid bewirkte jedoch in beiden Altersgruppen eine signifikante Verbesserung des zellulären und neurologischen Defizits.

Wie in Abbildung 4.3 gezeigt, sind all die aufgeführten Ergebnisse zu Bilobalid auf die Aktivierung der Atmungskette und die dadurch bedingte Reduzierung des Energiedefizits zurückzuführen. Auch die Befunde vorheriger Studien, welche im Arbeitskreis Klein durchgeführt und in der Einleitung ausführlich beschrieben wurden (siehe Abbildung 1.8, Kapitel 1.4.1) finden in den mitochondrialen Prozessen ihren Ursprung.

Genauer gesagt müsste das Target von Bilobalid in Komplex I der mitochondrialen Atmungskette oder zwischen Komplex I und III liegen. Diese Schlussfolgerung kommt aus der Beobachtung, dass die Gesamtaktivität der mitochondrialen Atmung nach Ischämie durch Bilobalid nicht deutlich verbessert wurde. Eine Sättigung von Komplex II mit Succinat scheint also den Bilobalid-Effekt aufzuheben. Da die Komplexe I und II konvergent Komplex III speisen, kann das Target folglich nur vor Komplex III liegen.

In weiterführenden Studien müsste demnach die Interaktion von Bilobalid mit Komplex I sowie dem Transportprotein CoQ näher untersucht werden, um das Target von Bilobalid zu identifizieren.

Diese Dissertation lieferte somit einen entscheidenden Beitrag zur Eingrenzung der zellulären Zielstruktur von Bilobalid. Außerdem wurde die neuroprotektive Wirksamkeit von Bilobalid im transienten Schlaganfallmodell erneut unterstrichen, so dass der klinische Einsatz des Pflanzeninhaltsstoffes bei cerebraler Ischämie in Betracht gezogen werden sollte.

4.3 Anaplerotische Diät - Triheptanoin

Triheptanoin ist eine Substanz, die chemisch gesehen aus einem Molekül Glycerol, verestert mit drei Heptansäuren, besteht. Im menschlichen Darm spalten Lipasen die Fettsäuren ab. Diese werden im Anschluss in die Leber transportiert, um nach beta-Oxidation dem Körper als Energielieferanten zur Verfügung zu stehen (Doenecke et al. 2005, Lehninger et al. 1998). Der Metabolismus von Triheptanoin bedient sich demnach der physiologischen Stoffwechselwege. Da in der menschlichen Nahrung jedoch normalerweise nur geradkettige Fettsäuren enthalten sind (Lehninger et al. 1998), wurde in dieser

Dissertation der neuroprotektive Einfluss einer Triheptanoin-reichen Diät, welche hohe Dosen an ungeradkettiger Heptansäure liefert, im Schlaganfallmodell untersucht.

In der folgenden Diskussion liegt der Schwerpunkt zunächst auf den zellulären metabolischen Veränderungen, welche durch die Gabe von Triheptanoin bewirkt werden. Im Anschluss werden die durchgeführten Versuche mit bekannten Literaturdaten verglichen, soweit dies auf diesem wenig erforschten Gebiet möglich war. Auf eine allgemeine methodische Diskussion soll in diesem Kapitel verzichtet werden, da diese bereits in Kapitel 4.2 zum Neuroprotektivum Bilobalid abgehandelt wurde.

4.3.1 Anaplerotische Wirkung von Triheptanoin

Der Begriff der „Anaplerose“ wurde von Kornberg 1965 geprägt. Anaplerotische Reaktionen sind „Auffüllreaktionen“ des Citratcyclus, um diesen nach Verlust von Intermediaten zu regenerieren (siehe Kapitel 1.4.2 und Owen et al. 2002).

Ein Verlust von Intermediaten kann beispielsweise durch eine Ischämie ausgelöst werden. Von Goldberg et al. 1966, Folbergrová et al. 1974 und Benzi et al. 1982 wurde im Hirnhomogenat von Ratten nach Ischämie ein Anstieg von Succinat und GABA, sowie ein Abfall von Citrat, Oxalacetat, Malat und alpha-Ketoglutarat beobachtet. Graphisch dargestellt sind diese Befunde in Abbildung 4.4.

Auffallend war der starke Anstieg von Succinat. Die Reaktion von Succinat zu Fumarat wird von der Succinat-Dehydrogenase durchgeführt, dem Komplex II der Atmungskette. Diese Reaktion liefert Energie in Form von FADH_2 . Außerdem war die starke Verarmung an alpha-Ketoglutarat bemerkenswert. Diese wurde durch eine Erhöhung des GABA-Umschlags erklärt und deckt sich mit der Beobachtung, dass die GABA-Spiegel anstiegen. Interessanterweise blieben die Glutamat-Konzentrationen laut den Autoren im Hirnhomogenat nach Ischämie unverändert.

Anaplerotische Reaktionen zielen nun darauf ab, die fehlenden Intermediate „aufzufüllen“ und das metabolische Gleichgewicht wiederherzustellen. Laut Hassel 2001 findet Anaplerose im Hirn sowohl in Gliazellen als auch in Neuronen statt. Das wichtigste anaplerotische Enzym ist die Pyruvat-Carboxylase, welche den Mangel an Oxalacetat auszugleichen vermag. Jedoch zielen die anaplerotischen Reaktionen laut Hassel 2001 auch darauf ab, das fehlende alpha-Ketoglutarat zu ersetzen.

von Komplex II der Atmungskette. Aus der Reaktion mit der Succinat-Dehydrogenase entsteht Fumarat, welches zu Malat weiter verstoffwechselt wird. Über einen sekundären Weg, der normalerweise nicht häufig angesteuert wird, da in der menschlichen Nahrung kaum Heptansäuren enthalten sind (Lehninger et al. 1998), kann demnach Energie in Form von FADH_2 generiert und zusätzlich Substrate des Citratcyclus wieder aufgefüllt werden (Gu et al. 2010, Kinman et al. 2006, Sokoloff 1973).

Durch die Gabe von Triheptanoin entstehen neben Propionyl-CoA auch große Mengen an Acetyl-CoA, die dem Citratcyclus ebenfalls zugeführt werden und die Energiebereitstellung verbessern (siehe Abbildung 4.5).

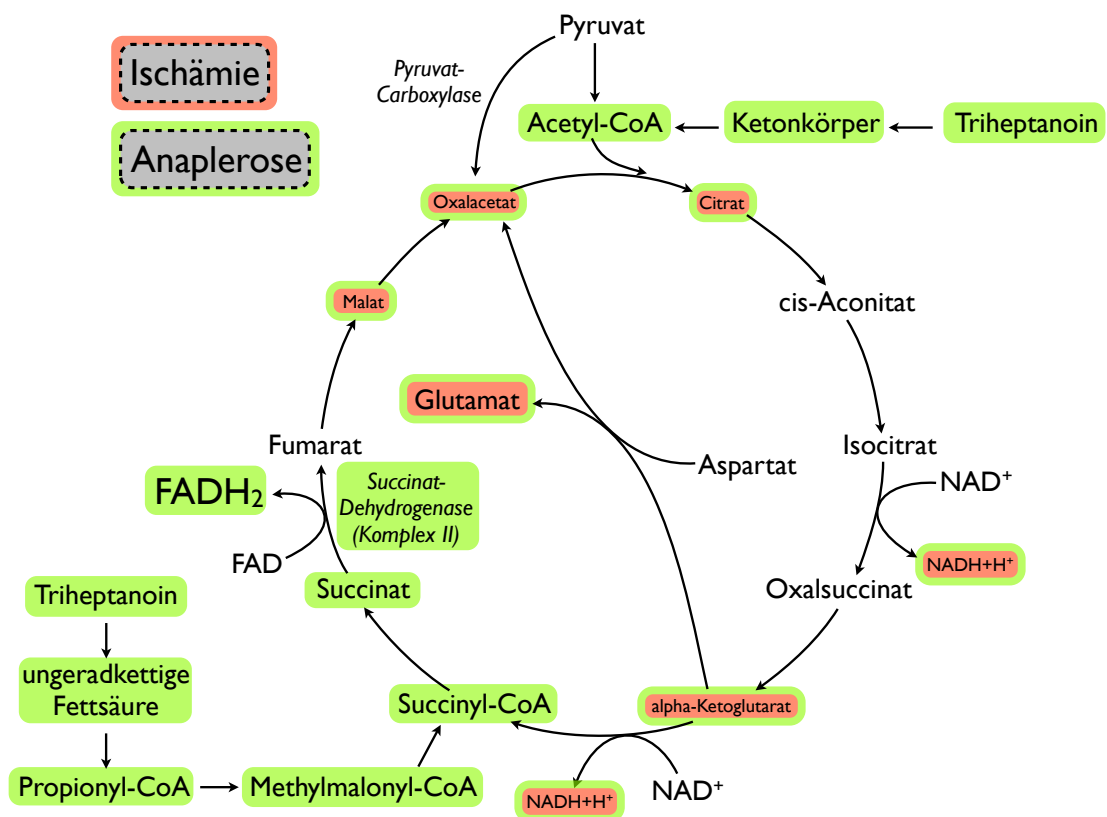


Abbildung 4.5: Anaplerotische Effekte von Triheptanoin nach Ischämie. Eine Ischämie verändert die metabolische Zusammensetzung des Citratcyclus (in rot dargestellt). Dies hat eine Verminderung der Energiebereitstellung zur Folge. Triheptanoin liefert nach Verstoffwechslung Acetyl-CoA, das den Citratcyclus speist (in grün dargestellt). Zusätzlich stellt Triheptanoin Propionyl-CoA bereit, das als Succinyl-CoA direkt in Komplex II der Atmungskette Energie in Form von FADH_2 generiert.

Dieser Effekt wird bereits in der „Ketogenen Diät“ ausgenutzt (Sokoloff 1973). Diese Diätform enthält hohe Dosen an geradkettigen Fettsäuren, welche nach Verstoffwechslung Acetyl-CoA bereitstellen. Die Ketogene Diät zeigte bereits in einigen Studien neuroprotektive Eigenschaften. Eine gute Zusammenfassung hierüber geben Maalouf et al. 2009. Die Studien beschäftigten sich jedoch meist mit der Verminderung von Stoffwechselstörungen oder epileptischen Anfällen (Knerr und Pearl 2008, Hartman et al. 2007, Borges 2008). Nach diesen Erkenntnissen ersetzen die Ketone, besonders beta-Hydroxybutyrat, Glucose effizient als Energielieferanten für das Gehirn (Prins 2008).

Triheptanoin besitzt gegenüber der Ketogenen Diät den entscheidenden Vorteil der Zweiseitigkeit: Zum einen speist Acetyl-CoA den Citratcyclus, zum anderen liefert Propionyl-CoA direkt Energie in Komplex II der Atmungskette. Zudem ist die Triheptanoin-Diät wesentlich besser verträglich als die Ketogene Diät, da nur ein Drittel der zugeführten Kalorien durch das Öl ersetzt werden müssen.

4.3.2 Entwicklung des Körpergewichts

Willis et al. 2010 beobachteten bereits das Körpergewicht von Mäusen, welche eine Triheptanoin-Diät erhielten (35 % der Kalorien Triheptanoin). Es wurde kein Unterschied zwischen Kontroll- und Triheptanoin-Gruppe festgestellt.

Auch in den Studien dieser Dissertation wurden keine Abweichungen im Körpergewicht zwischen Kontroll- und Triheptanoin-gefütterten Mäusen bemerkt. In der 14-tägigen Fütterungszeit blieb das Gewicht konstant bei etwa 30 g (siehe Ergebnisteil Kapitel 3.4).

Nach Induktion des Schlaganfalls an Tag 14 verloren die Mäuse mit Kontrolldiät stark an Gewicht. Dieser Effekt wurde bereits von Lang 2011, Horn 2011 und Gibson et al. 2005 berichtet. Da die Mäuse nach gravierender Ischämie und den dadurch ausgelösten Stress nicht mehr fressen, verlieren sie pro Tag etwa 2 g an Körpergewicht.

Eine neuroprotektive Behandlung vermochte bereits in den angesprochenen vorherigen Studien diese Reduktion des Körpergewichts zu vermindern. Auch die Gabe von Triheptanoin bewirkte eine signifikante Erhöhung des Körpergewichts 3 Tage nach tMCAO, verglichen mit der Kontrolle. Nimmt man das Körpergewicht als generelles Zeichen einer besseren Gesundheit an, so bedeutet dies, dass die Ischämie bei den Mäusen, welche die Triheptanoin-Diät erhielten, weniger starke Schäden hinterließ.

4.3.3 Blutanalyse

Die Untersuchung von venösem Blut nach 14-tägiger Diät ergab keine eindeutigen Erkenntnisse.

Basale Blutspiegel ohne Fütterung einer speziellen Diät bewegten sich bei 6,7-6,8 mM für Glucose und 2,8-2,9 mM für Lactat (siehe Kapitel 3.1). Nach 14-tägiger Kontrolldiät, welche mit Sojaöl angereichert war, blieben die Glucose-Werte im Blut bei 6,7 mM, die Lactat-Konzentrationen erreichten 4,8 mM. Die Triheptanoin-Diät hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Glucose-Spiegel (6,8 mM) jedoch bewirkte sie eine weitere Erhöhung der Lactat-Werte im Blut auf 7,3 mM.

Auch die Glutamat-Spiegel im Blut wurden durch eine 14-tägige Triheptanoin-Diät beeinflusst. Laut Teichberg et al. 2009 liegen normale Glutamat-Werte im Blut bei 40-60 μ M. Verglichen dazu, waren die Glutamat-Konzentrationen in Mäusen nach 14-tägiger Kontroll- oder Triheptanoin-Diät stark vermindert. Kontroll-Tiere wiesen einen gemittelten Glutamat-Wert von 17,2 μ M, Triheptanoin-Tiere von 31,4 μ M auf. Nach Triheptanoin-Diät waren die Glutamat-Spiegel jedoch sehr schwankend, so dass der Effekt nicht signifikant ist.

4.3.4 Ausmaß des Schlaganfalls

Die Auswertung der TTC-gefärbten Hirnschnitte zeigte einen gravierenden Unterschied in der vom Schlaganfall betroffenen Hirnregion zwischen Kontroll- und Triheptanoin-Gruppe (siehe Kapitel 3.4.3). In der Kontrollgruppe war das Ausmaß des Schlaganfalls deutlich zu sehen. Der ischämische Bereich weitete sich meist bis in den Cortex aus. Im Vergleich dazu wiesen die Hirnschnitte von Triheptanoin-gefütterten Mäusen nahezu keinen Schaden auf. Lediglich ein rosa gefärbter Bereich zeichnete sich im Striatum ab. Der Vergleich der ausgemessenen Schlaganfallflächen zwischen den beiden Gruppen war hoch signifikant.

Gasior et al. 2006 untersuchten den Effekt der Ketogenen Diät auf die Infarktfläche nach Ischämie. Sie stellten eine deutliche Reduktion des betroffenen Areals statt, was sie vornehmlich dem Keton beta-Hydroxybutyrat (BHB) zuschrieben. Ähnliche Ergebnisse erhielten Suzuki et al. 2002 nach einer Infusion von 30 mg/kg/h BHB in Ratten vor permanenter MCAO. Die Schlaganfallfläche war 24 h nach Okklusion signifikant vermindert. 72 h nach Induktion des Schlaganfalls hatten sich die Flächen der Kontroll- und Verumgruppe angeglichen. BHB hatte in diesem Fall demnach nur einen verzögernden Effekt.

Puchowicz et al. 2008 infundierten BHB (10 mM) 4 Tage vor tMCAO (2 h Okklusion). Auch sie beobachteten ein kleineres Infarktvolumen 24 h nach Ischämie.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden auch TTC-gefärbte Hirnschnitte an Tag 3 nach tMCAO angefertigt. Diese waren in der Größe der Infarktfläche identisch mit den Hirnschnitten, welche 24 h nach Ischämie angefärbt wurden. In dem untersuchten transienten Modell war der Hirnschaden demnach auch nach 72 h noch signifikant reduziert. Zudem wurde in den Studien dieser Dissertation nicht BHB sondern Triheptanoin verabreicht, was durch die zusätzliche Aktivierung von Komplex II der Atmungskette deutlich mehr Energie bereitstellen kann.

4.3.5 Verhalten

Die Verhaltenstests unterstrichen die neuroprotektive Wirkung von Triheptanoin, welche in den Hirnschnitten beobachtet wurde.

Im Chimney Test, in welchem eine Maus rückwärts aus einer senkrecht aufgestellten Röhre hinaus klettern muss, war die benötigte Kletterzeit vor Ischämie von Kontroll- und Triheptanoin-Gruppe nahezu identisch (10,7 gegen 11,7 sec). Ein Tag nach Ischämie hatte sich die Kletterzeit der Kontrollgruppe auf etwa 18 sec erhöht. Triheptanoin bewirkte eine deutliche Verbesserung der motorischen Fähigkeiten im Chimney Test nach Ischämie (6,3 sec nach 1 d).

Der Rotarod Test erlaubt ebenfalls Aussagen über die koordinativen Fähigkeiten. Eine Maus läuft über 120 sec auf einer beschleunigt rotierenden Walze. Vor Ischämie war es den Tieren möglich, nahezu über die gesamte Zeit auf der Walze zu bleiben (119-120 sec). Ein Tag nach MCAO waren die mit Kontrolldiät gefütterten Mäuse deutlich beeinträchtigt (70 sec). Der Fehlerbalken der Graphik weist jedoch darauf hin, dass die Mäuse nach Ischämie sehr abweichende Laufzeiten auf der Walze absolvierten. Diese reichten von 20 bis 120 sec, was zeigt, dass der induzierte Schlaganfall sehr unterschiedliche motorische Defizite hervorbringt. Diese Beobachtung machte bereits Lang 2011. Es müsste daher reevaluiert werden, ob der Rotarod-Test die motorischen Defizite nach Ischämie ausreichend differenziert wiedergeben kann.

Triheptanoin-gefütterte Tiere wiesen auch einen Tag nach Ischämie noch eine Laufzeit nahe dem Maximum von 120 sec auf. Drei Tage nach Schlaganfall hatte sich die Gruppe, welche Kontrolldiät erhielt, erholt und erreichte im Median wieder 118 sec Laufzeit, jedoch

4 Diskussion

ebenfalls mit erheblichen interindividuellen Schwankungen. Abschließend ist also zu sagen, dass eine Tendenz der neuroprotektiven Eigenschaften von Triheptanoin auch in diesem Test sichtbar ist, durch die starken Abweichungen zwischen den einzelnen getesteten Mäusen verliert der Rotarod Test jedoch an Aussagekraft.

Ein Maß für die halbseitige Lähmung wird mit dem Corner Test geliefert. Hierbei werden die Drehungen einer Maus um die rechte und linke Achse als Lateralitätsindex (LI) wiedergegeben (LI = -1 entspricht nur Rechtsdrehungen, LI = +1 nur Linksdrehungen). Vor Schlaganfall wurde sowohl in der Kontroll- als auch in der Triheptanoin-Gruppe wie erwartet ein LI nahe 0 identifiziert. Ein und drei Tage nach tMCAO zeigten die Mäuse, welche zuvor Kontrolldiät erhielten, eine deutliche Präferenz für die linke Seite, resultierend in einem LI von 0,98. Durch die halbseitige Lähmung nach Schlaganfall war die rechte Körperhälfte motorisch eingeschränkt. Den Mäusen blieben demnach nur noch Bewegungen mit den linken Pfoten, um sich aus der Ecke heraus zu drehen. Triheptanoin verbesserte die halbseitige Lähmung signifikant, die Drehungen um die linke Achse nahmen deutlich ab und der LI sank.

Sollte nach diesen Ergebnissen eine Bewertung der durchgeführten Tests erfolgen, so spiegelte der Corner Test das motorische Defizit nach Schlaganfall am Besten wider. Die halbseitige Lähmung ist nach erfolgreicher MCAO bereits im Heimatkäfig der Tiere zu sehen (siehe Abbildung 2.7 in den Methoden). Durch den Corner Test wird dann dieser Befund in Zahlen ausgewertet und graphisch dargestellt. Allein in diesem Test erreichte das Neuroprotektivum Triheptanoin eine signifikante Verbesserung der motorischen Defizite nach Schlaganfall. In den beiden anderen durchgeführten Tests war der Schutzeffekt zwar auch als Tendenz sichtbar, jedoch zeigten die Mäuse große interindividuelle Unterschiede in ihren motorischen Fähigkeiten. Es wurde oft bemerkt, dass die Mäuse nach Schlaganfall beispielsweise den Rotarod Test deutlich schwerfälliger absolvierten. Dennoch vermochten sie es, durch Nachziehen eines Beines die gesamte Zeit auf der Walze zu verbleiben. Subjektiv betrachtet lief die Maus natürlich wesentlich langsamer und ungelenkiger, objektiv zählte jedoch die absolvierte Laufzeit. Im Corner Test bestand diese Differenz zwischen subjektiv beobachtetem Verhalten und objektiven Messdaten nicht. Bouet et al. 2007 gelangten zu ähnlichen Schlussfolgerungen. Für Langzeittests wären der Rotarod und Chimney Test nicht geeignet, da eine spontane funktionelle Erholung der Tiere zu oft vorkommen würde und die aufgeführten Tests daher nicht genug Aussagekraft hätten. Nach Bouet et al. 2007 zeigten der Corner Test und der Passive Avoidance Test (welcher in dieser Dissertation nicht durchgeführt wurde) die beste Aussagekraft, jedoch sei die

Kombination mehrerer Test sinnvoll für ein repräsentatives Ergebnis.

4.3.6 Schlaganfall und Mikrodialyse

Mit der Mikrodialyse-Technik wurden im Rahmen dieser Dissertation extrazelluläre Konzentrationen an Glucose und Glutamat vor, während und nach der einstündigen Ischämie bestimmt.

Um zu überprüfen, ob die Induktion des Schlaganfalls erfolgreich war, wurde der Blutfluss in der mittleren Cerebralarterie mittels Laser-Doppler überprüft. Vor MCAO lag der Blutfluss bei etwa 500 (willkürliche Einheit). Durch Okklusion der Cerebralarterie sank der Wert auf etwa 70 (14% des Ausgangswertes). Nach Reperfusion wurden Werte von 120-140 gemessen (24-28% des Ausgangswertes). Die Okklusion und damit das Gelingen der Schlaganfall-Induktion wurde durch die Laser-Doppler-Werte deutlich gezeigt, jedoch wiesen diese auch auf eine nur geringfügige Verbesserung des Blutflusses in dem geschädigten Bereich nach Lösen des Verschlusses hin.

Betrachtet man die extrazellulären Glucose-Werte, so wird zunächst deutlich, dass Kontrolltiere eine wesentlich geringere basale Konzentration aufweisen als Triheptanoin-behandelte Tiere (0,2 mM gegenüber 2,7 mM). Aufgrund der großen Standardabweichungen der Messdaten ist dieser Unterschied jedoch nicht signifikant. Die Ursache hierfür ist vermutlich im anaplerotischen Effekt von Triheptanoin zu finden. Der Citratcyclus wird über Succinyl-CoA gespeist. Zusätzlich liefern Ketonkörper Acetyl-CoA zur Gewinnung von Reduktionsäquivalenten, das heißt die Substrate des Citratcyclus, besonders Acetyl-CoA, und Energie in Form von $\text{NADH} + \text{H}^+$ sind ausreichend vorhanden. Dies führt zu einer Hemmung der Pyruvat-Dehydrogenase und damit zu einem geringeren Glucose-Verbrauch durch die Glycolyse (siehe Abbildung 1.9 in der Einleitung, Lehninger et al. 1998, Doenecke et al. 2005). Glucose wird in der Triheptanoin-Gruppe daher als Energielieferant weniger verbraucht und liegt in höheren Konzentrationen im Extrazellularraum vor. In der Kontroll-Gruppe ist Glucose weiterhin ein wichtiger Lieferant für Acetyl-CoA, sie wird verbraucht und liegt daher in niedrigeren Konzentrationen vor als in der Triheptanoin-Gruppe (Ardawi und Newsholme 1982, Silver und Erecinska 1994).

Vergleicht man die basalen Glucose-Konzentrationen mit den Kontrollwerten der Bilobalid-Studie, so zeigen diese ähnliche Werte wie die Kontroll-Gruppe der Triheptanoin-Studie (etwa 0,2 mM). Auch von Sumbria et al. 2011 wurden basale extrazelluläre Glucose-Spiegel von 0,22 mM gemessen. Dies zeigt, dass die Fütterung von Sojaöl keinen Einfluss auf die

basalen Konzentrationen von Glucose im Extrazellularraum hatte. Die Glucose-Spiegel der Triheptanoin-Gruppe waren dagegen im Vergleich zu beiden Kontroll-Gruppen erhöht, wie oben bereits beschrieben. Um diese Theorie weiter zu bestätigen, wäre es interessant, die extrazellulären Konzentrationen an Ketonkörpern und Propionyl-CoA im Gehirn zu messen. Nach einer Triheptanoin-reichen Diät müssten diese folglich einen großen Anteil an der Energieproduktion haben und daher im Vergleich zur Kontrolldiät stark angestiegen sein. Willis et al. 2010 und Yudkoff et al. 2001 bestätigten bereits den Anstieg des Ketonkörpers beta-Hydroxybutyrat im Hirnhomogenat nach 3-wöchiger Triheptanoin- bzw. Ketogener Diät. Weiterführende Studien sollten die metabolischen Änderungen durch Triheptanoin im Gehirn genauer verfolgen.

Die Ischämie bewirkte eine deutliche Reduktion der extrazellulären Glucose-Spiegel bis auf das Detektionslimit in beiden diätetischen Gruppen. Der Abfall in Glucose bestätigt den korrekten Verschluss der mittleren Cerebralarterie. Nach Reperfusion erholten sich die Glucose-Konzentrationen trotz unvollständiger Wiederherstellung des Blutflusses (gemessen mit Laser-Doppler) innerhalb von 30 min wieder auf Ausgangsniveau. Die Glucose Werte in der Triheptanoin-Gruppe stiegen nach Reperfusion wieder etwas höher als die der Kontroll-Gruppe.

Die basalen Glutamat-Werte waren im Vergleich zu den Kontrollen ohne spezielle Diät ($1\text{-}2\ \mu\text{M}$) in der Kontrolldiät-Gruppe leicht erhöht ($4\text{-}5\ \mu\text{M}$) und in der Triheptanoin-Gruppe etwas stärker erhöht ($6\text{-}7\ \mu\text{M}$). Vergleicht man diese Werte mit Mikrodialyse-Daten aus der Literatur, so liegen diese ebenfalls in diesem Bereich: Von Sumbria et al. 2011 wurden basale Glutamat-Werte von $1,2\ \mu\text{M}$ gemessen und Lang et al. 2011 detektierten mittlere Glutamat-Spiegel von $3,59\ \mu\text{M}$. All diese Versuche wurden unter gleichen Bedingungen wie die Experimente in dieser Dissertation durchgeführt. Die einzige Änderung bestand in der Wahl der Flussrate der Perfusionsflüssigkeit der Mikrodialysesonde ($1\ \mu\text{l}/\text{min}$ gegenüber $2\ \mu\text{l}/\text{min}$).

Der Verschluss der mittleren Cerebralarterie bewirkte einen enormen Anstieg der extrazellulären Glutamat-Spiegel. Die zugrunde liegende Pathobiologie wurde bereits in Kapitel 1.3 beschrieben. Bei mit Kontrolldiät gefütterten Mäusen bewirkte die Ischämie einen Glutamat-Anstieg auf bis zu $73\ \mu\text{M}$. Nach einer 14-tägigen Triheptanoin-Diät stiegen die extrazellulären Glutamat-Konzentrationen durch die Ischämie zwar an, jedoch war das Ausmaß des Anstieges durch die Behandlung signifikant vermindert (auf 28 statt $73\ \mu\text{M}$). Nach Reperfusion fielen die Glutamat-Spiegel innerhalb von 40 min sowohl in der Kontroll- als auch in der Triheptanoin-Gruppe auf basale Werte zurück. Der mittels Laser-Doppler

gemessene Blutfluss nach Reperfusion scheint demnach auszureichen, um das aufgetretene metabolische Ungleichgewicht von Glucose und Glutamat im Extrazellularraum des Gehirns zu beheben.

Die in Abbildung 4.5 gezeigte angenommene Wirkung von Triheptanoin auf den Citratcyclus ließ eine Beeinflussung der Glutamat-Spiegel erwarten. Mehr Energiebereitstellung durch Komplex II der Atmungskette hält den Ionenhaushalt in den Zellen aufrecht, so dass Glutamat extrazellulär in normalen niedrigen Konzentrationen vorliegt (Glutamat-Transport siehe Abbildung 1.4 in der Einleitung). Da Glutamat aus alpha-Ketoglutarat durch Transaminierung gebildet wird, würde dies folglich auch ein geringeres Defizit an dem Citratcyclus-Intermediat nach sich ziehen (Doenecke et al. 2005, Lehninger et al. 1998, Fonnum 1984).

Ein ähnlich protektiver Effekt wurde bereits durch beta-Hydroxybutyrat (BHB) beobachtet, welches durch die Energiebereitstellung auf dem Ketonkörper-Weg ebenfalls den neurotoxischen Anstieg von Glutamat im Extrazellularraum verminderte (Maalouf et al. 2009). Da Triheptanoin auch die Konzentration an Ketonkörpern im Gehirn erhöht (Willis et al. 2010), würde dieser Weg demnach die Energiebereitstellung durch Komplex II unterstützen.

4.3.7 Mitochondriale Atmung

Die Aktivität der mitochondrialen Atmung nach einstündiger Ischämie wurde mit dem Oroboros Oxygraphen-2k bestimmt. Dieses Gerät besitzt zwei abgeschlossene, luftdichte Kammern, in welche zunächst die isolierten Mitochondrien und anschließend verschiedene Substrate und Inhibitoren der Atmungskette gegeben werden (Methode siehe Kapitel 2.8). Mit dieser Methode können die Aktivitäten der Komplexe I, II und IV, sowie der Leak-Status, die oxidative Phosphorylierung (Oxphos) und der entkoppelte Zustand des Elektronentransportsystems (ETS) bestimmt werden.

Wie bereits in Kapitel 4.2 beschrieben, wird die mitochondriale Atmung durch eine Ischämie stark beeinträchtigt. Am meisten hiervon betroffen sind laut Literaturdaten Komplex I, III und IV (Janssens et al. 2000, Canevari et al. 1997). Die Ischämie wurde in der vorliegenden Dissertation *in vivo* als MCAO induziert und nach 60-minütiger Okklusion die Isolation der Mitochondrien vorgenommen. Wie bereits für die Kontrollen der Bilobalid-Studie beschrieben, wurde in allen gemessenen respiratorische Zuständen ein Defizit durch die vorherige Ischämie festgestellt. Diese Befunde konnten in der

Triheptanoin-Studie bestätigt werden: Eine signifikante Verminderung des Sauerstoff-Verbrauchs wurde in den Komplexen I, II, IV sowie dem Oxphos- und ETS-Status detektiert.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Bilobalid-Studie wurde in der Triheptanoin-Studie durch die Ischämie keine so drastische Reduktion der Komplex I-Atmung erreicht (auf 14 % des Ausgangswertes bei Bilobalid-Kontrollen, auf 56 % bei Triheptanoin-Kontrollen). Die Ursache hierfür könnte in der fettreichen Zusammensetzung der Kontrolldiät in der Triheptanoin-Studie liegen. Um die Kontrolldiät mit der Öl-haltigen Verumdiät vergleichbar zu machen, wurde diese mit einem hohen Anteil an Sojaöl versetzt (Zusammensetzung siehe Abbildung 2.3 in den Methoden). Durch die 14-tägige sehr fettreiche Nahrungszufuhr wird sich der Stoffwechsel aller Tiere der Triheptanoin-Studie umgestellt haben und vermehrt Fettsäuren und Ketone verwerten. Die Ketogene Diät zeigte in Studien über Epilepsie-Patienten mit einem Defekt in Komplex I der Atmungskette deutlich positive Wirkungen (Lee et al. 2008, Seo et al. 2010). Wie diese Wirkung zustande kommt, ist bisher unklar, jedoch zeigen die vorgestellten Daten ebenso wie die Studien, dass durch die Bereitstellung von Ketonkörpern eine Umstellung in der Aktivität der Atmungskettenkomplexe stattgefunden hat.

Die 14-tägige Fütterung mit der Triheptanoin-reichen Diät bewirkte eine signifikante Verbesserung der respiratorischen Aktivität von Komplex II der Atmungskette nach Ischämie. Dieser Effekt wurde mit der Ketogenen Diät nicht beobachtet, da Triheptanoin den zusätzlichen anaplerotischen Wirkmechanismus besitzt. Der Anstieg der Komplex II-Atmung war demnach durch die postulierten metabolischen Änderungen zu erwarten gewesen: Die Heptansäuren des Triheptanoins stellen nach beta-Oxidation große Mengen an Propionyl-CoA bereit, welches zu Succinyl-CoA verstoffwechselt wird und als direktes Substrat den Komplex II der Atmungskette speisen kann (siehe Abbildung 4.5, Doenecke et al. 2005, Lehninger et al. 1998). Dieser anaplerotische Wirkmechanismus kann demnach einen Glucose-Mangel zeitweise überbrücken und so das durch die Ischämie entstandene Energiedefizit vermindern. Durch die vermehrte Aktivität von Komplex II sollte sich auch die Wirksamkeit der nachfolgenden Komplexe verbessern. Die Komplex III-Aktivität wurde in dieser Methode nicht erfasst, jedoch konnte eine signifikante Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs in Komplex IV der Atmungskette durch die Triheptanoin-Diät gemessen werden.

4.3.8 ATP-Gehalt und Membranpotential

Um die verbesserte Energiebereitstellung durch die Aktivierung von Komplex II zu bestätigen, wurden in dissoziierten Hirnzellen der ATP-Gehalt und das Membranpotential (MMP) gemessen. Für Kontrollversuche, in denen die Tiere vor Entnahme der Hirne keine Ischämie erfuhren, wurden drei Gruppen gewählt: Kontrolltiere ohne spezielle Diät und die beiden Diätgruppen mit Sojaöl als Kontrolle und Triheptanoin als Verum. Zwischen den drei Gruppen gab es keine Abweichungen im basalen ATP-Gehalt oder Membranpotential (ATP etwa 5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$; MMP Rhodamin123-Fluoreszenz etwa 420, willkürliche Einheit). *In vitro* ausgelöster oxidativer Stress schädigte die Zellen und führte zu verminderten Werten von ATP-Gehalt und MMP (ATP etwa 4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$; MMP Rhodamin123-Fluoreszenz etwa 400 willkürliche Einheiten). Der oxidative Stress wurde mit Nitroprussid-Natrium (*sodium-nitroprusside*, SNP) induziert, einem Molekül, das Stickstoffmonoxid (NO) freisetzt. Dieser *in vitro*-Test sollte zunächst zeigen, dass die isolierten dissoziierten Hirnzellen sensibel auf oxidativen Stress reagieren und ein Abfall von ATP-Gehalt und MMP in diesem Modell messbar ist.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde eine Ischämie *in vivo* durch MCAO induziert und die Isolation der dissoziierten Hirnzellen direkt nach 60-minütiger Ischämie vorgenommen. Die Hirne wurden hierfür geteilt und die ischämische Hemisphäre separat von der contralateralen („gesunden“) Hemisphäre aufgearbeitet. Die *in vivo* induzierte Ischämie bewirkte einen deutlichen Abfall des ATP-Gehalts in der ischämischen Hemisphäre (auf 3,8 $\mu\text{mol}/\text{mg}$). Die contralaterale Hemisphäre wurde nicht beeinflusst (5,2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$). Auch das Membranpotential wurde durch die Ischämie verringert, jedoch waren in diesem Versuch beide Hemisphären etwa gleich stark durch die Ischämie geschädigt (Rhodamin123-Fluoreszenz: 300-340).

Die 14-tägige Fütterung mit Triheptanoin bewirkte einen signifikanten Anstieg des ATP-Gehalts nach Ischämie bis auf Kontrollniveau (6 $\mu\text{mol}/\text{mg}$). Auch das Membranpotential wurde durch die Diät deutlich erhöht, mit einer Fluoreszenz von 530 in der ischämischen Hemisphäre war es sogar höher als die basalen Werte.

Da es sich methodisch anbot, wurde die SNP-Schädigung auch für die bereits *ex vivo* geschädigten Hirnzellen durchgeführt. Diese Zellen waren demnach „doppelt“ geschädigt und lieferten noch niedrigere ATP- und MMP-Werte. Triheptanoin bewirkte auch bei den *ex vivo* und SNP-geschädigten dissoziierten Hirnzellen einen deutlichen Anstieg im ATP-Gehalt und Membranpotential.

Es fällt auf, dass die Schädigung durch die Ischämie nur sehr moderat war. Durch die hohen Standardabweichungen ergibt sich keine Signifikanz in Bezug auf die Beeinträchtigung nach MCAO. Dies könnte an der langen Aufarbeitungs- und Inkubationszeit der dissoziierten Hirnzellen liegen, welche in optimalem Medium stattfand. In dieser Zeit könnten sich die Zellen teilweise erholt haben und bei Messung nur noch ein verringertes Energiedefizit aufweisen. Da jedoch alle Versuchsgruppen gleich lange in dem Medium verweilen durften, hat dieser Effekt bei dem durchgeführten Vergleich der einzelnen Gruppen keine Bedeutung. Sinnvoll könnte jedoch sein, die Ischämie *in vitro* zu erhalten, indem die Zellen in OGD-Medium (*oxygen-glucose-deprived*, Sauerstoff-Glucose-armes Medium) aufgearbeitet würden.

Um einen Einfluss der Kontrolldiät auf den Energiehaushalt auszuschließen, wurde eine Kontrollgruppe untersucht, welche keine spezielle Diät erhielt, sondern das Standardfutter für Nager. Da diese Gruppe keinerlei Abweichungen in ATP-Gehalt und MMP zeigte, hat weder die Kontroll- noch die Triheptanoin-Diät unter Kontroll-Bedingungen einen Einfluss auf die beiden gemessenen Energieparameter.

Beta-Hydroxybutyrat (BHB), ein Ketonkörper, welcher sich durch die Gabe von Triheptanoin im Hirnhomogenat anreichert (Willis et al. 2010), wurde bereits positiv auf den Ausgleich eines Energiedefizits getestet. Suzuki et al. 2001 verabreichten BHB als Infusion vor einstündiger MCAO. Sie beobachteten eine signifikante Erhöhung der durch die Ischämie erniedrigten ATP-Werte. Diese Beobachtung konnte in den vorgestellten Experimenten mit Triheptanoin bestätigt werden.

Insgesamt liefern die in der vorliegenden Dissertation erhobenen Daten einen wichtigen Baustein in der bisher postulierten metabolischen Wirkung von Triheptanoin: Die erhöhte Aktivität von Komplex II konnte durch den erhöhten ATP-Gehalt und die Aufrechterhaltung des Membranpotentials nach einer Ischämie bestätigt werden.

4.3.9 Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuche und daraus gewonnen Erkenntnisse zu der Wirkung von Triheptanoin sind in Abbildung 4.6 (grün hinterlegt) zusammengefasst.

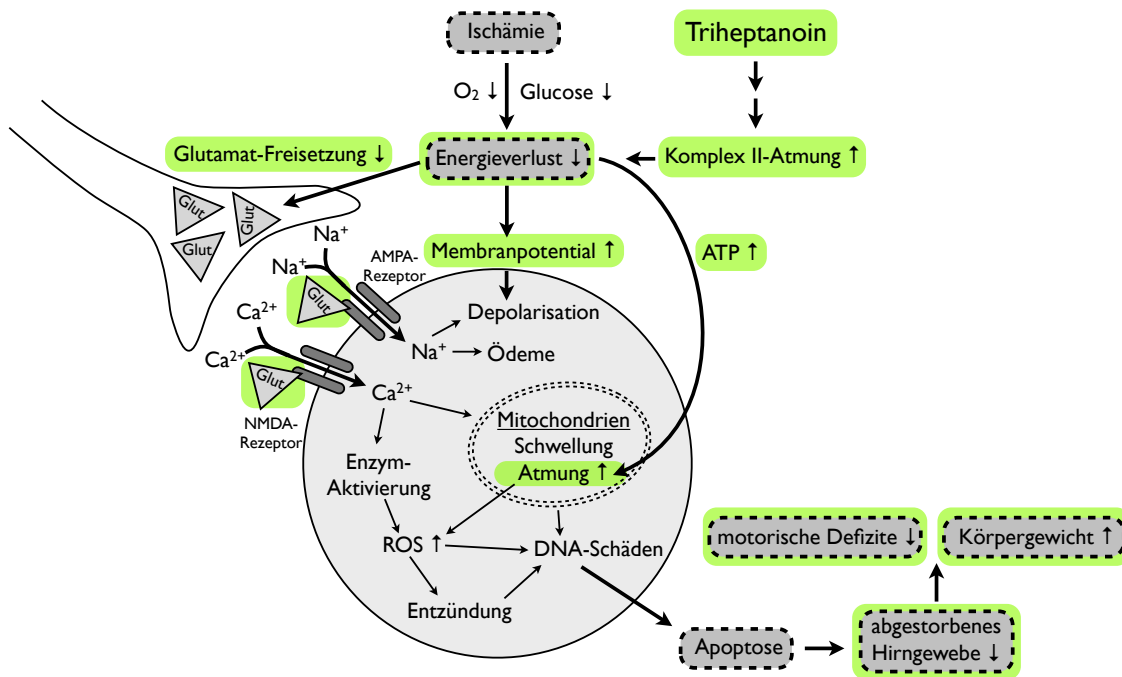


Abbildung 4.6: Der Effekt von Triheptanoin auf die pathobiologischen Veränderungen nach Schlaganfall (in grün unterlegt). Durch Triheptanoin wurde die Komplexe II-Atmung signifikant verbessert, wodurch einem Energiedefizit und dem Zusammenbruch des Membranpotentials nach Schlaganfall entgegengewirkt wird. Zusätzlich wurde eine Verringerung des extrazellulären Glutamat-Anstiegs beobachtet. Auch die Infarktfläche und das motorische Defizit nach Schlaganfall wurden durch Triheptanoin vermindert. All diese Ergebnisse resultieren aus einer besseren Energiebereitstellung und dem anaplerotischen Effekt auf den Citratcyclus.

Triheptanoin liefert einen wertvollen Beitrag zur Energiebereitstellung in ischämischen Zellen. Durch den anaplerotischen Effekt wird Komplex II der Atmungskette direkt gespeist und produziert Energie in Form von FADH₂, das über die Atmungskette zu ATP umgewandelt wird. Ein Anstieg der Aktivität von Komplex II und IV nach Ischämie wurde in einer Triheptanoin-Fütterungsstudie dieser Dissertation nachgewiesen. Auch eine Erhöhung der ATP-Spiegel und die Aufrechterhaltung des Membranpotentials ischämischer Zellen konnte nach 14-tätiger Fütterung mit Triheptanoin beobachtet werden.

Durch die Bereitstellung von Energie kann der Ionengradient über die Zellmembran aufrecht erhalten werden. Glutamat, welches während einer Ischämie durch das Energiedefizit extrazellulär in sehr hohen Konzentrationen vorkommt, kann nach Triheptanoin-

Behandlung durch die funktionsfähigen ATPasen vermehrt in den Zellen gehalten werden. Die signifikante Verminderung des extrazellulären Glutamat-Anstiegs durch Triheptanoin während MCAO wurde in dieser Dissertation bestätigt.

Um den Schweregrad der Schäden nach einstündiger Ischämie abzuschätzen, wurden motorische Verhaltenstests durchgeführt. Die Gabe von Triheptanoin bewirkte bei den Tieren sowohl im Chimney als auch im Rotarod Test eine Tendenz zur Verbesserung der motorischen Funktion. Im Corner Test waren die Triheptanoin-gefütterten Tiere den Kontrollen deutlich überlegen. Auch die Entwicklung des Körpergewichts sprach für eine Verminderung der Schäden nach Ischämie durch Triheptanoin, da der Wirkstoff die Abnahme des Körpergewichts der Tiere nach MCAO signifikant verringerte. Die Infarktfläche im betroffenen Hirnareal, dem Striatum, wurde durch Triheptanoin ebenfalls stark vermindert.

Zusammengefasst zeigen diese Studien, dass Triheptanoin im Schlaganfallmodell eine deutliche neuroprotektive Wirkung aufweist.

Es bleibt jedoch die Frage offen, aus welchem Grund Glucose als Energielieferant nicht in Frage kommt? Könnte das Energiedefizit nicht durch ein Überangebot an Glucose ebenso vermindert werden wie durch Triheptanoin? Die Antwort ist einfach, denn paradoxerweise ist eine Hyperglycämie schädlich nach Ischämie. Der Grund hierfür ist bisher unbekannt, jedoch sind etliche klinische Fälle bekannt, in welchen Diabetes-Patienten mit Hyperglycämie deutlich gravierendere Schäden durch einen Schlaganfall erlitten (Luitse et al. 2012, MacDougall und Muir 2011, Hartman et al. 2007).

Vorangehende Studien (Gasior et al. 2006, Maalouf et al. 2009, Puchowicz et al. 2008), sowie die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen jedoch eindeutig, dass die Erhöhung von Ketonkörpern im Blut, welche größtenteils aus dem Fettstoffwechsel stammen, das Defizit nach Schlaganfall stark vermindern können. Triheptanoin kann demnach als alternatives Energiesubstrat zu Glucose während einer Ischämie eingesetzt werden. Gegenüber der Ketogenen Diät birgt Triheptanoin den entscheidenden Vorteil, dass nicht nur Acetyl-CoA, sondern auch Propionyl-CoA für die Energiegewinnung bereitgestellt wird. Durch diesen anaplerotischen Zusatzeffekt werden neben der gesteigerten ATP-Produktion auch fehlende Substrate des Citratcyclus wieder aufgefüllt. Brunenegraber und Roe 2006 merkten bereits an, dass ein Defizit an Intermediaten im Citratcyclus stark an der Zunahme der Schäden durch Reperfusion des ischämischen Gewebes beteiligt ist. Möglicherweise ist der Mangel an Intermediaten und dem resultierenden Defizit an metabolischen Substraten ebenso schädigend für die betroffenen Hirnzellen wie der Mangel an Energie.

Aus diesem Grund und basierend auf den durchgeführten Versuchen, stellt die anaplerotische Diät, durchgeführt mit dem Wirkstoff Triheptanoin, einen wichtigen neuen Ansatzpunkt für die Therapie von Schlaganfallpatienten dar. Da Triheptanoin gut verträglich ist und sich physiologischer metabolischer Wege bedient, sollte es als Präventiv-Medikation für Risikopatienten oder zur Sekundärprophylaxe nach Schlaganfall eingesetzt werden.

4.4 Ausblick

In dieser Dissertation wurden zwei neue präventive Therapieoptionen des ischämischen Schlaganfalls vorgestellt: Bilobalid und Triheptanoin. Beide Wirkstoffe sind gut verträglich und können daher bedenkenlos von Risikopatienten zur Prophylaxe eingenommen werden. Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber den bisher erforschten potentiellen Therapeutika, welche zum Teil wegen Unverträglichkeit in klinischen Studien versagten (siehe Kapitel 1.4). Die neuroprotektiven Effekte von Bilobalid und Triheptanoin überzeugten bereits in vorangehenden Studien ebenso wie in dieser Dissertation im Mausmodell (siehe auch Kapitel 1.4.1 und 1.4.2).

Zukünftige Studien sollten darauf ausgelegt sein, den Wirkmechanismus von Bilobalid weiter zu erforschen. Aus den Experimenten der vorliegenden Dissertation konnten Rückschlüsse auf eine Wirkung von Bilobalid auf mitochondriale Prozesse geschlossen werden. Besonders Komplex I der mitochondrialen Atmungskette deutete sich als potentielles Target an. Nachfolgende Arbeiten sollten Molekülinteraktionen zwischen Bilobalid und den Proteinen der mitochondrialen Atmungskette bestimmen, um die neuroprotektive Wirkweise von Bilobalid vollends aufzuklären.

Die Triheptanoin-Studie legte einen deutlichen protektiven Effekt nach ischämischem Schlaganfall durch eine 14-tägige anaplerotische Diät offen. Bisherige Studien zu dem Wirkstoff Triheptanoin hatten andere Ansatzpunkte, wie Stoffwechselstörungen oder Epilepsie (siehe Kapitel 1.4.2). Daher bietet die Erforschung der Wirkung einer anaplerotischen Diät auf die Folgen eines ischämischen Schlaganfalls noch sehr viele Möglichkeiten für weitere Studien. Nachfolgende Arbeiten sollten zunächst die metabolischen Änderungen nach Triheptanoin-reicher Diät aufklären, um die in dieser Dissertation angenommene Wirkweise zu untermauern. Zudem wurde der Wirkstoff Triheptanoin in Form einer Fütterungsstudie bisher nur prophylaktisch verabreicht. Weiterführende Experimente könnten außerdem die Wirkung einer Gabe von Triheptanoin nach Ischämie untersuchen.

4 Diskussion

Sowohl die Wirkung von Bilobalid als auch die der anaplerotischen Diät wurde bisher nur über kurze Zeit (bis zu 3 Tage) nach Schlaganfall erforscht. Interessant wäre, ob die Schädigung nach Ischämie durch die Therapie nur verzögert wird oder ob die neuroprotektive Wirkung auch nach mehreren Wochen anhält. Dies könnte in einer Langzeitstudie an Maus oder Mensch verfolgt werden.

Da die momentan zur Verfügung stehenden Möglichkeiten zur Therapie eines ischämischen Schlaganfalls sehr begrenzt sind (siehe Kapitel 1.4), sollte die Wirkung der beiden Neuroprotektiva zeitnah in klinischen Studien im Menschen belegt werden. Beide vorgestellten Wirkstoffe, Bilobalid und Triheptanoin, haben das Potential, den Arzneimittelmarkt um die Wirkstoffklasse der Neuroprotektiva zu erweitern und könnten daher wegweisend in der Schlaganfalltherapie sein.

Danksagung

Diese Dissertation hätte nicht fertiggestellt werden können ohne die Mithilfe aller Menschen, die an mich geglaubt haben und mich immer und überall unterstützt haben. Dafür möchte ich ein großes DANKESCHÖN aussprechen.

Besonderem Dank gilt...

... meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jochen Klein, der immer ein offenes Ohr für seine Mitarbeiter hat und mich über die 3 Jahre in allen Belangen unterstützt hat.

... Herrn Prof. Dr. Müller für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

... meinem Arbeitskreis, ohne den die Arbeit im Labor nur halb so viel Spaß gemacht hätte. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dorothee Lang, Tobias Horn und Markus Hillert für die „Starthilfe“ und die vielen guten methodischen Tipps. Außerdem möchte ich Ute Burkhardt, Franziska Mohr und Jana Lietsche danken, die mit mir gemeinsam die 3 Jahre bestritten haben und mir sowohl privat als auch im Labor immer eine seelische Stütze waren.

... dem Arbeitskreis Müller, für die vielen schönen gemeinsamen Stunden und den Methodenaustausch. Hier möchte ich besonders Janett Eckmann, Schamim Eckert und Stephanie Hagl für die Einführung in die Methode der Sauerstoffelektrode danken.

... meinen Praktikanten, die mich aktiv bei der Fertigstellung der Dissertation unterstützt haben: Florian Kössl in analytischen Methoden, Burak Yalcin für die Durchführung der Verhaltenstests in der Triheptanoin-Studie, Konstantin Wolf bei den Triheptanoin-Versuchen an der Sauerstoffelektrode, Natalie Kolesova für die Unterstützung bei der mitochondrialen Schwellung und Ilona Betzel für die Durchführung der ATP- und MMP-Messungen.

... zu guter Letzt gilt ein großes Dankeschön meinem Freund Lennart Anger, der täglich mit mir meine Ergebnisse diskutieren durfte, ganz viel Korrektur gelesen hat und sowieso immer für mich da ist.

Literaturverzeichnis

- Abdel-Kader R, Hauptmann S, Keil U, Scherping I, Leuner K, Eckert A, Müller WE (2007) Stabilization of mitochondrial function by Ginkgo biloba extract (EGb 761). *Pharm Res*, 56(6):493–502.
- Abrahám H, Somogyvári-Vigh A, Maderdrut JL, Vigh S, Arimura A (2002) Filament size influences temperature changes and brain damage following middle cerebral artery occlusion in rats. *Exp Brain Res*, 142(1):131–138.
- Adams, Jr HP, del Zoppo G, Alberts MJ, Bhatt DL, Brass L, Furlan A, Grubb RL, Higashida RT, Jauch EC, Kidwell C, Lyden PD, Morgenstern LB, Qureshi AI, Rosenwasser RH, Scott PA, Wijndicks EFM, American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, American Heart Association/American Stroke Association Clinical Cardiology Council, American Heart Association/American Stroke Association Cardiovascular Radiology and Intervention Council, Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Working Group, Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Group (2007) Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke. *Circulation*, 115(20):478–534.
- Ahlemeyer B, Kriegelstein J (2003) Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract. *Cell Mol Life Sci*, 60:1779–1792.
- Alberts MJ (2003) Medical management of patients with an acute stroke: treatment and prevention. *Top Stroke Rehabil*, 10(3):34–45.
- Allen KL, Almeida A, Bates TE, Clark JB (1995) Changes of respiratory chain activity in mitochondrial and synaptosomal fractions isolated from the gerbil brain after graded ischaemia. *J Neurochem*, 64:2222–2229.
- Almeida A, Allen KL, Bates TE, Clark JB (1995) Effect of reperfusion following cerebral ischaemia on the activity of the mitochondrial respiratory chain in the gerbil brain. *J Neurochem*, 65:1698–1703.

- Altman FP (1976) Tetrazolium salts and formazans. *Prog Histochem Cytochem*, 9(3):1–56.
- Anderson EJ, Katunga LA, Willis MS (2012) Mitochondria as a source and target of lipid peroxidation products in healthy and diseased heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 39:179–193.
- Ardawi MS, Newsholme EA (1982) Maximum activities of some enzymes of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and ketone-body and glutamine utilization pathways in lymphocytes of the rat. *Biochem J*, 208:743–748.
- Ardehali MR, Rondouin G (2003) Microsurgical intraluminal middle cerebral artery occlusion model in rodents. *Acta Neurol Scand*, 107:267–275.
- Arumugam TV, Mattson MP (2006) *Models for the study of stroke. Handbook of models for human aging*. Academic Press, San Diego.
- Arumugam TV, Phillips TM, Cheng A, Morrell CH, Mattson MP, Wan R (2010) Age and energy intake interact to modify cell stress pathways and stroke outcome. *Ann Neurol*, 67:41–52.
- Aso E, Semakova J, Semak V, Halbaut L, Calpena A, Escolano C, Perales JC, Ferrer I (2012) Triheptanoin supplementation to ketogenic diet curbs cognitive impairment in APP/PS1 mice used as a model of familial Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, [Epub].
- Ataide TR, DeOliveira SL, DaSilva FM, Vitorino Filha LGC, Tavares MC, SantAna AEG (2009) Toxicological analysis of the chronic consumption of diheptanoin and triheptanoin in rats. *Food Sci Technol Int*, 44(3):484–492.
- Atif F, Yousuf S, Agrawal SK (2009) S-Allyl L-cysteine diminishes cerebral ischemia-induced mitochondrial dysfunctions in hippocampus. *Brain Res*, 1265:128–137.
- Ay H, Koroshetz WJ, Vangel M, Benner T, Melinosky C, Zhu M, Lopez CJ, Sorensen G (2005) Conversion of ischemic brain tissue into infarction increases with age. *Stroke*, 36:2632–2636.
- Aymanns C, Keller F, Maus S, Hartmann B, Czock D (2010) Review on pharmacokinetics and pharmacodynamics and the aging kidney. *Clin J Am Soc Nephrol*, 5(2):314–327.
- Badan I, Buchhold B, Hamm A, Gratz M, Walker L, Platt D, Kessler C, Popa-Wagner A (2003) Accelerated glial reactivity to stroke in aged rats correlates with reduced functional recovery. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23:845–854.

- Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo YD (2011) Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells*, 32:491–509.
- Baltan S (2009) Ischemic injury to white matter: an age-dependent process. *Neuroscientist*, 15(2):126–133.
- Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, Lenaz G (2003) Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1606:137–146.
- Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg M (1996) Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. *Stroke*, 27:1616–1623.
- Benedek A, Móricz K, Jurányi Z, Gigler G, Lévy G, Hársing, Jr LG, Mátyus P, Szénási G, Albert M (2006) Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*, 1116(1):159–165.
- Benzi G, Moretti A (1995) Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic Biol Med*, 19(1):77–101.
- Benzi G, Pastoris O, Dossena M (1982) Relationships between γ -aminobutyrate and succinate cycles during and after cerebral ischemia. *J Neurosci Res*, 7:193–201.
- Bernardi P, Broekmeier KM, Pfeiffer DR (1994) Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr*, 26:509–517.
- Borges K (2008) Mouse models: the ketogenic diet and polyunsaturated fatty acids. *Epilepsia*, 49:64–66.
- Borges K, Sonnewald U (2012) Triheptanoin - a medium chain triglyceride with odd chain fatty acids: a new anaplerotic anticonvulsant treatment? *Epilepsy Res*, 100(3):239–44.
- Bouaziz N, Redon M, Quéré L, Remacle J, Michiels C (2002) Mitochondrial respiratory chain as a new target for anti-ischemic molecules. *Eur J Pharmacol*, 441(1-2):35–45.
- Bouet V, Freret T, Toutain J, Divoux D, Boulouard M, Schumann-Bard P (2007) Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Exp Neurol*, 203(2):555–567.
- Bousser MG (2012) Stroke prevention: an update. *Front Med*, 6(1):22–34.

- Broderick J, Connolly S, Feldmann E, Hanley D, Kase C, Krieger D, Mayberg M, Morgenstern L, Ogilvy CS, Vespa P, Zuccarello MA, American Stroke Association Stroke Council, High Blood Pressure Research Council, Quality of Care and Outcomes in Research Interdisciplinary Working Group (2007) Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage in adults. *Stroke*, 38(6):2001–2023.
- Brown AW, Marlowe KJ, Bjelke B (2003) Age effect on motor recovery in a post-acute animal stroke model. *Neurobiol Aging*, 24:607–614.
- Brown MR, Geddes JW, Sullivan PG (2004) Brain region-specific, age-related, alterations in mitochondrial responses to elevated calcium. *J Bioenerg Biomembr*, 36(4):401–406.
- Brunengraber H, Roe CR (2006) Anaplerotic molecules: current and future. *J Inherit Metab Dis*, 29(2-3):327–331.
- Caesar W (2009) Von Ginkgo über Gbl zu EGb - ein langer Weg zum rationalen Phytopharmakon. *Pharm Unserer Zeit*, 38(5):400–405.
- Calabrese V, Boyd-Kimball D, Scapagnini G, Butterfield DA (2004) Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of vitagenes. *in vivo*, 18:245–268.
- Canevari L, Kuroda S, Bates TE, Clark JB, Siesjö BK (1997) Activity of mitochondrial respiratory chain enzymes after transient focal ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17:1166–1169.
- Carandang R, Seshadri S, Beiser A, Kelly-Hayes M, Kase CS, Kannel WB, Wolf PA (2006) Trends in incidence, lifetime risk, severity, and 30-day mortality of stroke over the past 50 years. *JAMA*, 296(24):2939–2946.
- Carmichael ST (2005) Rodent models of focal stroke: size, mechanism and purpose. *NeuroRx*, 2:396–409.
- Chance B, Williams G (1955) A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature*, 175:1120–1121.
- Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B, Drieu K, Fiskum G (2001) Neuroprotective effects of bilobalide, a component of the Ginkgo biloba extract (EGb 761), in gerbil global brain ischemia. *Brain Res*, 922:282–292.
- Chang DTW, Reynolds IJ (2006) Differences in mitochondrial movement and morphology in young and mature primary cortical neurons in culture. *Neuroscience*, 141(2):727–736.

- Charriaut-Marlangue C, Remolleau S, Aggoun-Zouaoui D, Ben-Ari Y (1998) Apoptosis and programmed cell death: a role in cerebral ischemia. *Biomed Pharmacother*, 52(6):264–269.
- Chatterjee SS, Kondratskaya EL, Krishtal OA (2003) Structure-activity studies with Ginkgo biloba extract constituents as receptor-gated chloride channel blockers and modulators. *Pharmacopsychiatry*, 36:68–77.
- Chaurasia CS, Müller M, Bashaw ED, Benfeldt E, Bolinder J, Bullock R, Bungay PM, DeLange ECM, Derendorf H, Elmquist WF, Hammarlund-Udenaes M, Joukhadar C, Kellogg, Jr DL, Lunte CE, Nordstrom CH, Rollema H, Sawchuk RJ, Cheung BWY, Shah VP, Stahle L, Ungerstedt U, Welty DF, Yeo H (2007) AAPS-FDA workshop white paper: microdialysis principles, application and regulatory perspectives. *Pharm Res*, 24(5):1014–1025.
- Cheng Y, Debska-Vielhaber G, Siemen D (2010) Interaction of mitochondrial potassium channels with the permeability transition pore. *FEBS Letters*, 584:2005–2012.
- Cheng Y, Gu XQ, Bednarczyk P, Wiedemann FR, Haddad GG, Siemen D (2008) Hypoxia increases activity of the BK-channel in the inner mitochondrial membrane and reduces activity of the permeability transition pore. *Cell Physiol Biochem*, 22:127–136.
- Chiamulera C, Andrea T, Reggiani A, Cristofori P (1993) Qualitative and quantitative analysis of the progressive cerebral damage after middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res*, 606:251–258.
- Choi DW (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci*, 13:171–182.
- Choi DW (1996) Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol*, 6(5):667–672.
- Christen Y, Maixent JM (2002) What is Ginkgo biloba extract EGb761? An overview - from molecular biology to clinical medicine. *Cell Mol Biol*, 48(6):601–611.
- Cobo M, Exposito I, Porrás A, Mora F (1992) Release of amino acid neurotransmitters in different cortical areas of conscious adult and aged rats. *Neurobiol Aging*, 13:705–709.
- Colak G, Filliano AJ, Johnson GV (2011) The application of permanent middle cerebral artery ligation in the mouse. *J Vis Exp*, 25(53):pii:3039.

- Corbisier P, Remacle J (1993) Influence of the energetic pattern of mitochondria in cell ageing. *Mech Ageing Dev*, 71:47–58.
- Crompton M (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, 341:233–249.
- Crowell RM, Marcoux FW, DeGirolami U (1981) Variability and reversibility of focal cerebral ischemia in unanesthetized monkeys. *Neurology*, 31(10):1295–1302.
- Dai DF, Chen T, Johnson SC, Szeto H, Rabinovitch PS (2012) Cardiac aging: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 16(12):1492–1526.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 65:1–105.
- DeFeudis FV (2002) Bilobalide and neuroprotection. *Pharm Res*, 46(6):565–568.
- DeFeudis FV, Drieu K (2000) Ginkgo biloba extract (EGb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications. *Curr Drug Targets*, 1:25–58.
- Delgado JM, DeFeudis FV, Roth RH, Ryugo DK, Mitruka BM (1972) Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 198(1):9–21.
- Deng S, Zhang GF, Kasumov T, Roe CR, Brunengraber H (2009) Interrelations between C4 ketogenesis, C5 ketogenesis, and anaplerosis in the perfused rat liver. *J Biol Chem*, 284(41):799–807.
- Dinapoli VA, Rosen CL, Nagamine T, Crocco T (2006) Selective MCA occlusion: a precise embolic stroke model. *J Neurosci Methods*, 154(1-2):233–238.
- Dingeldine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharm Rev*, 51(1):7–61.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22(9):391–397.
- Dittmar M, Spruss T, Schuierer G, Horn M (2003) External carotid artery territory ischemia impairs outcome in the endovascular filament model of middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 34:2252–2257.
- Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W (2005) *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. Georg Thieme Verlag.

- Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM (2008) Stroke. *Lancet*, 371(9624):1612–1623.
- Dörken VM (2013) Ginkgo biloba - Ginkgo, Fächerblattbaum (Ginkgoaceae), ein lebendes Fossil aus China. *Jahrb Bochumer Bot Ver*, 4:181–186.
- Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW (1996) Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab*, 16:195–201.
- Dubinsky J, Brustovetsky N, Pinelis V, Kristal B, Herman C, Li X (1999) The mitochondrial permeability transition: the brain's point of view. *Biochem Soc Symp*, 66:75–84.
- Ducros A (2012) Reversible cerebral vasoconstriction syndrome. *Lancet Neurol*, 11:906–917.
- Dyker A, Lees K (1998) Duration of neuroprotective treatment for ischemic stroke. *Stroke*, 29:535–542.
- Eagles DA (2008) Design of dietary treatment: humans versus rodents. *Epilepsia*, 49:61–63.
- Eckert A, Keil U, Kressmann S, Schindowski K, Leutner S, Leutz S, Müller WE (2003) Effects of EGb 761 Ginkgo biloba extract on mitochondrial function and oxidative stress. *Pharmacopsychiatry*, 36:15–23.
- Eckert A, Keil U, Scherping I, Hauptmann S, Müller WE (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 SH, Eckmann J, Renner K, Eckert GP, Leuner K, Müller WE (2012) Dimebon ameliorates amyloid-beta induced impairments of mitochondrial form and function. *J Alzheimers Dis*, 31:21–32.
- Eckmann J, Eckert SH, Leuner K, Müller WE, Eckert GP (2013) Mitochondria: mitochondrial membranes in brain ageing and neurodegeneration. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(1):76–80.
- Emaus RK, Grunwald R, Lemaster J (1986) Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta*, 850:436–448.

- Esmon CT, Esmon NL (2011) The link between vascular features and thrombosis. *Ann Rev Physiol*, 73:503–514.
- Featherstone DE (2010) Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond. *ACS Chem Neurosci*, 1(1):4–12.
- Feuerstein G, Wang X, Barone FC (1998) Cytokines in brain ischemia-the role of TNF alpha. *Cell Mol Neurobiol*, 18(6):695–701.
- Foerch C, Misselwitz B, Sitzer M, Steinmetz H, Neumann-Haefelin T, Hesse Stroke Study Group (2008) The projected burden of stroke in the german federal state of Hesse up to the year 2050. *Dtsch Arztebl Int*, 105(26):467–473.
- Folbergrová J, Ljunggren B, Norberg K, Siesjö BK (1974) Influence of complete ischemia on glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates, and associated amino acids in the rat cerebral cortex. *Brain Res*, 80(2):265–279.
- Fonnum F (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem*, 42(1):1–11.
- Foster KA, Galeffi F, Gerich FJ, Turner DA, Müller M (2006) Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. *Prog Neurobiol*, 79(3):136–171.
- Franchini M (2006) Hemostasis and aging. *Crit Rev Oncol Hematol*, 60:144–151.
- Gandolfo C, Sandercock P, Conti M (2002) Lubeluzole for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*, 1:CD001924.
- Garadew A, Haffner B, Hütter E, Gnaiger E (2007) An experiment with high-resolution respirometry: phosphorylation control in cell respiration. *Mito Phys Net*, 10.4:51–61.
- Garedew A, Hütter E, Haffner B, Grandl L, Jansen-Dürr P, Gnaiger E (2005) High-resolution respirometry for the study of mitochondrial function in health and disease. the OROBOROS Oxygraph-2k. *Medimond*, Seiten 107–111.
- Gasior M, Rogawski MA, Hartmann AL (2006) Neuroprotective and disease-modifying effects of the ketogenic diet. *Behav Pharmacol*, 17:431–439.
- Gest H (1987) Evolutionary roots of the citric acid cycle in prokaryotes. *Biochem Soc Symp*, 54:3–16.

- Gharacholou SM, Becker RC (2009) Hemostasis and thrombosis in older adults. *J Thromb Thrombolysis*, 27:249–251.
- Gibson CL, Bath PMW, Murphy SP (2005) G-CSF reduces infarct volume and improves functional outcome after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25(4):431–439.
- Ginsberg MD (1995) Neuroprotection in brain ischemia: an update. *Neuroscientist*, 1(2):95–103.
- Ginsberg MD (2008) Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology*, 55:363–389.
- Ginsberg MD, Mela L, Wrobel-Kuhl K, Reivich M (1977) Mitochondrial metabolism following bilateral cerebral ischemie in the gerbil. *Ann Neurol*, 1:519–527.
- Giwa MO, Williams J, Elderfield K, Jiwa NS, Bridges LR, Kalaria RN, Markus HS, Esiri MM, Hainsworth AH (2012) Neuropathologic evidence of endothelial changes in cerebral small vessel disease. *Neurology*, 78(3):167–174.
- Gnaiger E (2001) Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir Physiol*, 128(3):277–297.
- Gnaiger E (2010) The oxygraph for high-resolution respirometry (HRR). *Mito Phys Net*, 06.01:1–18.
- Gnaiger E, Fasching M, Gradl L, Gradl P (2012) Oxygraph-2k: start high-resolution respirometry. *Mito Phys Net*, 12.06:1–20.
- Gnaiger E, Kuznetsov AV (2002) Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c. *Biochem Soc Trans*, 30(2):252–258.
- Gnaiger E, Mendez G, Hand SC (2000) High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia. *PNAS*, 97(20):11080–11085.
- Goldberg MP, Choi DW (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci*, 13(8):3510–3524.
- Goldberg MP, Weiss JH, Pham PC, Choi DW (1987) N-Methyl-D-Aspartate receptors injury in cortical culture. *J Pharmacol Exp Ther*, 243(2):784–792.

- Goldberg N, Passonneau J, Lowry O (1966) Effects of changes in brain metabolism on the levels of citric acid cycle intermediates. *J Biol Chem*, 241(17):3997–4003.
- Grabb MC, Lobner D, Turetsky DM, Choi DW (2002) Preconditioned resistance to oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal death: alterations in vesicular GABA and glutamate release. *Neuroscience*, 115(1):173–183.
- Grassi M, Petraccia L, Mennuni G, Fontana M, Scarno A, Sabetta S, Fraioli A (2011) Changes, functional disorders, and diseases in the gastrointestinal tract of elderly. *Nutr Hosp*, 26(4):659–668.
- Green RC, DeKosky ST (2006) Primary prevention trials in Alzheimer disease. *Neurology*, 3:2–5.
- Greenamyre JT (1986) The role of glutamate in neurotransmission and in neurologic disease. *Arch Neurol*, 43:1058–1063.
- Gu L, Zhang GF, Kombu RS, Allen F, Kutz G, Brewer WU, Roe CR, Brunengraber H (2010) Parenteral and enteral metabolism of anaplerotic triheptanoin in normal rats. II. effects on lipolysis, glucose production, and liver acyl-CoA profile. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298(2):362–371.
- Haberg A, Qu H, Saether O, Unsgard G, Haraldseth O, Sonnewald U (2001) Differences in neurotransmitter synthesis and intermediary metabolism between glutamatergic and GABAergic neurons during 4 hours of middle cerebral artery occlusion in the rat: the role of astrocytes in neuronal survival. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21:1451–1463.
- Haberg A, Qu H, Sonnewald U (2009) Acute changes in intermediary metabolism in cerebellum and contralateral hemisphere following middle cerebral artery occlusion in rat. *J Neurochem*, 109:174–181.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees K, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 359(13):1317–1329.
- Hakim AM (2012) The future of stroke thrombolysis. *Ann N Y Acad Sci*, 1268:8–13.
- Halestrap AP (2006) Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans*, 34:232–237.

- Halestrap AP (2009) Mitochondrial calcium in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1787(11):1289–1290.
- Hand SC, Lemieux H, Gnaiger E (2010) Basic protocol with isolated mitochondria: LEAK, OXPHOS, ETS, ROX. *Mito Phys Net*, 12.11:1–5.
- Hansson MJ, Månsson R, Mattiasson G, Ohlsson J, Karlsson J, Keep MF, Elmér E (2004) Brain-derived respiring mitochondria exhibit homogeneous, complete and cyclosporin-sensitive permeability transition. *J Neurochem*, 89(3):715–729.
- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11(3):298–300.
- Hartman AL, Gasior M, Vining EPG, Rogawski MA (2007) The neuropharmacology of the ketogenic diet. *Pediatr Neurol*, 36(5):281–292.
- Hassel B (2001) Carboxylation and anaplerosis in neurons and glia. *Mol Neurobiol*, 22:21–40.
- Hegde ML, Mantha AK, Hazra TK, Bhakat KK, Mitra S, Szczesny B (2012) Oxidative genome damage and its repair: implications in aging and neurodegenerative diseases. *Mech Ageing Dev*, 133(4):157–168.
- Heinecke H (1987) A comparison of two variants of the chimney behaviour test in mice. *Z Versuchstierkd*, 29(3-4):145–148.
- Heuschmann PU, Busse O, Endres M, Villringer A, Röther J, Kolominsky-Rabas PL, Berger K (2010) Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Akt Neurol*, 37:333–340.
- Hill NC, Millikan CH, Wakim KG, Sayre GP (1955) Studies in cerebrovascular disease. VII. experimental production of cerebral infarction by intracarotid injection of homologous blood clot; preliminary report. *Proc Staff Meet Mayo Clin*, 30(26):625–633.
- Horn J, de Haan RJ, Vermeulen M, Limburg M (2001) Very Early Nimodipine Use in Stroke (VENUS): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Stroke*, 32(2):461–465.
- Horn T (2011) *Laktat im Gehirn: Modulation durch Anästhetika und neuroprotektive Eigenschaften*. Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität.

- Horn T, Klein J (2010) Lactate levels in the brain are elevated upon exposure to volatile anesthetics: a microdialysis study. *Neurochem Int*, 57(8):940–947.
- Horn TFW, Engelman M (2001) In vivo microdialysis for nonapeptides in rat brain - a practical guide. *Methods*, 23(1):41–53.
- Howells DW, Porritt MJ, Rewell SSJ, O'Collins V, Sena ES, van der Worp HB, Traystman RJ, Macleod MR (2010) Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30(8):1412–1431.
- Hunter DR, Hawort RA, Southard JH (1976) Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem*, 251(16):5069–5077.
- Hütter E, Renner K, Jansen-Dürr P, Gnaiger E (2002) Biphasic oxygen kinetics of cellular respiration and linear oxygen dependence of antimycin A inhibited oxygen consumption. *Mol Biol Rep*, 29:83–87.
- Hütter E, Unterluggauer H, Garede A, Jansen-Dürr P, Gnaiger E (2006) High-resolution respirometry - a modern tool in aging research. *Exp Gerontol*, 41(1):103–109.
- Janssens D, Delaive E, Remacle J, Michiels C (2000) Protection by bilobalide of the ischaemia-induced alterations of the mitochondrial respiratory activity. *Fundamen Clin Pharmacol*, 14:193–201.
- Janssens IM, Sturtz S, Skipka G, Zentner A, Garrido MV, Busse R (2010) Ginkgo biloba in Alzheimer's disease: a systematic review. *Wien Med Wochenschr*, 160(21-22):539–546.
- Jena NR (2012) DNA damage by reactive species: mechanisms, mutation and repair. *J Biosci*, 37:503–517.
- Jonas EA (2009) Molecular participants in mitochondrial cell death channel formation during neuronal ischemia. *Exp Neurol*, 218:203–212.
- Jones BJ, Roberts DJ (1968) The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol*, 20(4):302–304.
- Juurink BH, Sweeney MI (1997) Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. *Neurosci Biobehav Rev*, 21(2):121–128.
- Kanowski S, Herrmann WM, Stephan K, Wierich W, Hörr R (1996) Proof of efficacy of the Ginkgo biloba special extract EGb 761 in outpatients suffering from mild

- to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia. *Pharmacopsychiatry*, 29:47–56.
- Kazda S, Towart R (1982) Nimodipine: a new calcium antagonistic drug with a preferential cerebrovascular action. *Acta Neurochir*, 63:259–265.
- Khajavi MR, Etezadi F, Moharari RS, Imani F, Meysamie AP, Khashayar P, Najafi A (2009) Effects of normal saline vs. lactated ringer's during renal transplantation. *Ren Fail*, 30:535–539.
- Kiewert C, Kumar V, Hildmann O, Hartmann J, Hillert M, Klein J (2008) Role of glycine receptors and glycine release for the neuroprotective activity of bilobalide. *Brain Res*, 1201:143–150.
- Kiewert C, Kumar V, Hildmann O, Rueda M, Hartmann J, Naik RS, Klein J (2007) Role of GABAergic antagonism in the neuroprotective effects of bilobalide. *Brain Res*, 1128(1):70–78.
- Kiewert C, Mdzinarishvili A, Hartmann J, Bickel U, Klein J (2010) Metabolic and transmitter changes in core and penumbra after middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res*, 1312:101–107.
- Kim TH, Borges K, Petrou S, Reid CA (2013) Triheptanoin reduces seizure susceptibility in a syndrome-specific mouse model of generalized epilepsy. *Epilepsy Res*, 103(1):101–105.
- Kinman RP, Kasumov T, Jobbins KA, Thomas KR, Adams JE, Brunengraber LN, Kutz G, Brewer WU, Roe CR, Brunengraber H (2006) Parenteral and enteral metabolism of anaplerotic triheptanoin in normal rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291(4):860–866.
- Klein J, Chatterjee SS, Löffelholz K (1997) Phospholipid breakdown and choline release under hypoxic conditions: inhibition by bilobalide, a constituent of Ginkgo biloba. *Brain Res*, 755(2):347–350.
- Klein J, Weichel O, Hilgert M, Rupp J, Chatterjee SS, Nawrath H (2003) Excitotoxic hippocampal membrane breakdown and its inhibition by bilobalide: role of chloride fluxes. *Pharmacopsychiatry*, 36:578–583.
- Kloft C, Kellermann A (2009) Bleeding caused by Ginkgo biloba extract? *Pharm Unserer Zeit*, 38(5):440–446.

- Knerr I, Pearl PL (2008) Ketogenic diet: stoking energy stores and still posing questions. *Exp Neurol*, 211(1):11–13.
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G (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.
- Kornberg HL (1965) Anaplerotic sequences and their role in metabolism. *Angew Chem internat Edit*, 4(7):558–565.
- Korth U, Klein J (2001) Methodik und Anwendung der Mikrodialyse. *Anaesthesiologie und Intensivmedizin*, 42:732–739.
- Krams M, Lees KR, Hacke W, Grieve AP, Orgogozo JM, Ford GA (2003) Acute Stroke Therapy by Inhibition of Neutrophils (ASTIN): an adaptive dose-response study of UK-279,276 in acute ischemic stroke. *Stroke*, 34(11):2543–2548.
- Krieglstein J, Ausmeier F, El-Abhar H, Lippert K, Welsch M, Rupalla K, Henrich-Noack P (1995) Neuroprotective effects of Ginkgo biloba constituents. *Eur J Pharm Sci*, 3:39–48.
- Kristian T, Siesjö BK (1998) Calcium in ischemic cell death. *Stroke*, 29:705–718.
- Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, Fukunaga N (1982) An animal model of cerebral infarction. homologous blood clot emboli in rats. *Stroke*, 13:505–508.
- Kun E, Abood LG (1949) Colorimetric estimation of succinic dehydrogenase by triphenyltetrazolium chloride. *Science*, 109:144–146.
- Kuraoka M, Furuta T, Matsuwaki T, Omatsu T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y (2009) Direct experimental occlusion of the distal middle cerebral artery induces high reproducibility of brain ischemia in mice. *Exp Anim*, 58(1):19–29.
- Kuroda S, Janelidze S, Siesjö BK (1999) The immunosuppressants cyclosporin A and FK506 equally ameliorate brain damage due to 30-min middle cerebral artery occlusion in hyperglycemic rats. *Brain Res*, 835:148–153.
- Laing RJ, Jakubowski J, Laing RW (1993) Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Which method works best? *Stroke*, 24:294–297.
- Lang D (2011) *Charakterisierung des fokalen Schlaganfalls in der Maus und Einsatz von Bilobalid als Neuroprotektivum*. Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität.

- Lang D, Kiewert C, Mdzinarishvili A, Schwarzkopf TM, Sumbria R, Hartmann J, Klein J (2011) Neuroprotective effects of bilobalide are accompanied by a reduction of ischemia-induced glutamate release in vivo. *Brain Res*, 1425:155–163.
- Lang D, Ude C, Wurglics M, Schubert-Zsilavecz M, Klein J (2010) Brain permeability of bilobalide as probed by microdialysis before and after middle cerebral artery occlusion in mice. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 13(4):607–614.
- Lassnig B, Stadlmann S, Rieger G, Haffner B, Lemieux H, Gnaiger E (2011) Selected media and chemicals for respirometry with mitochondria and permeabilized cells. *Mito Phys Net*, 03.02:1–9.
- Lattermann R, Schricker T, Wachter U, Georgieff M, Goertz A (2001) Understanding the mechanisms by which isoflurane modifies the hyperglycemic response to surgery. *Anesth Analg*, 93:121–127.
- Lee YM, Kang HC, Lee JS, Kim SH, Kim EY, Lee SK, Slama A, Kim HD (2008) Mitochondrial respiratory chain defects: underlying etiology in various epileptic conditions. *Epilepsia*, 49(4):685–690.
- Lees KR, Asplund K, Carolei A, Davis SM, Diener HC, Kaste M, Orogozo JM, Whitehead J (2000) Glycine Antagonist (gavestinel) In Neuroprotection (GAIN International) in patients with acute stroke: a randomised controlled trial. *Lancet*, 355(9219):1949–1954.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1998) *Prinzipien der Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Herman B (1997) The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*, 174:159–165.
- Lenaz G, Bovina C, D'Aurelio M, Fato R, Formigini G, Genova ML, Giuliano G, Pich MM, Paolucci U, Castelli GP, Ventura B (2002) Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann N Y Acad Sci*, 959:199–213.
- Lesage AS, Peeters L, Leysen JE (1996) Lubeluzole, a novel long-term neuroprotectant, inhibits the glutamate-activated nitric oxide synthase pathway. *J Pharmacol Exp Ther*, 279(2):759–766.
- Li Y, Peris J, Zhong L, Derendorf H (2006) Microdialysis as a tool in local pharmacodynamics. *AAPS J*, 8(2):222–235.

- Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 79(4):1431–1568.
- Lipton SA (2007) Pathologically-activated therapeutics for neuroprotection: mechanism of NMDA receptor block by memantine and S-nitrosylation. *Curr Drug Targets*, 8:621–632.
- Liu F, McCullough L (2011) Middle cerebral artery occlusion model in rodents: methods and potential pitfalls. *J Biomed Biotechnol*, 2011:464701:464701.
- Liu F, Yuan R, Benashski SE, McCullough LD (2009) Changes in experimental stroke outcome across the life span. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29(4):792–802.
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA (2003) Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*, 4(5):399–415.
- Longa ES, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20:84–91.
- Lönnroth P, Jansson PA, B. F, Smith U (1989) Microdialysis of intercellular adenosine concentration in subcutaneous tissue in humans. *Am J Physiol*, 256(2):250–255.
- Lönnroth P, Jansson PA, Smith U (1987) A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. *Am J Physiol*, 253:228–231.
- Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ (2006) Global and regional burden of disease and risk factors: systematic analysis of population health data. *Lancet*, 367:1747–1757.
- Lores-Arnaiz S, Bustamante J (2011) Age-related alterations in mitochondrial physiological parameters and nitric oxide production in synaptic and non-synaptic brain cortex mitochondria. *Neuroscience*, 188:117–124.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem*, 193:265–275.
- Lucius R, Schwegler JS (2011) *Der Mensch - Anatomie und Physiologie*. Georg Thieme Verlag.
- Luitse MJA, Biessels GJ, Rutten GE, Kappelle LJ (2012) Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. *Lancet Neurol*, 11:261–271.
- Maalouf M, Rho JM, Mattson MP (2009) The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. *Brain Res Rev*, 59(2):293–315.

- MacDougall NJJ, Muir KW (2011) Hyperglycaemia and infarct size in animal models of middle cerebral artery occlusion: systematic review and meta-analysis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(3):807–818.
- Malik AB, Krasney JA, Royce GJ (1977) Respiratory influence on the total and regional cerebral blood flow responses to intracranial hypertension. *Stroke*, 8:243–249.
- Mammucari C, Rizzuto R (2010) Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mech Ageing Dev*, 131(7-8):536–543.
- Manczak M, Jung Y, Park BS, Partovi D, Reddy PH (2005) Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging. *J Neurochem*, 92(3):494–504.
- Mao Y, Yang GY, Zhou LF, Stern JD, Betz AL (1999) Focal cerebral ischemia in the mouse: description of a model and effects of permanent and temporary occlusion. *Brain Res Mol Brain Res*, 63(2):366–370.
- Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C (1998) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull*, 46(4):281–309.
- McBain CJ, Mayer ML (1994) N-Methyl-D-Aspartic-acid receptor structure and function. *Physiol Rev*, 74(3):723–760.
- McColla BW, Carswella HV, McCulloch J, Horsburgh K (2004) Extension of cerebral hypoperfusion and ischaemic pathology beyond MCA territory after intraluminal filament occlusion in C57Bl/6J mice. *Brain Res*, 997:14–22.
- McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Stevenson J, Zielke HR (1996) Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J Neurochem*, 66(1):386–393.
- Mdzinarishvili A, Geldenhuys WJ, Abbruscato TJ, Bickel U, Klein J, Van der Schyf CJ (2005) NGP1-01, a lipophilic polycyclic cage amine, is neuroprotective in focal ischemia. *Neurosci Lett*, 383:49–53.
- Mdzinarishvili A, Kiewert C, Kumar V, Hillert M, Klein J (2007) Bilobalide prevents ischemia-induced edema formation in vitro and in vivo. *Neuroscience*, 144(1):217–22.

- Mdzinarishvili A, Sumbria R, Lang D, Klein J (2012) Ginkgo extract EGb761 confers neuroprotection by reduction of glutamate release in ischemic brain. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 15(1):94–102.
- Meyer JS (1957) Studies of cerebral circulation in brain injury. IV. Ischemia and hypoxemia of the brain stem and respiratory center. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 9:83–100.
- Minematsu K, Fisher M, Li L, Sotak CH (1993) Diffusion and perfusion magnetic resonance imaging studies to evaluate a noncompetitive N-Methyl-D-Aspartate antagonist and reperfusion in experimental stroke in rats. *Stroke*, 24(12):2074–2081.
- Mochel F, DeLonlay P, Touati G, Brunengraber H, Kinman RP, Rabier D, Roe CR, Saudubray JM (2005) Pyruvate carboxylase deficiency: clinical and biochemical response to anaplerotic diet therapy. *Mol Genet Metab*, 84(4):305–312.
- Mochel F, Duteil S, Marelli C, Jauffret C, Barles A, Holm J, Sweetman L, Benoist JF, Rabier D, Carlier PG, Durr A (2010) Dietary anaplerotic therapy improves peripheral tissue energy metabolism in patients with Huntington's disease. *Eur J Hum Genet*, 18(9):1057–1060.
- Moran M, Moreno-Lastres D, Marin-Buera L, Arenas J, Martin MA, Ugalde C (2012) Mitochondrial respiratory chain dysfunction: implications in neurodegeneration. *Free Radic Biol Med*, 53:595–609.
- Moro MA, Almeida A, Bolanos JP, Lizasoain I (2005) Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radic Biol Med*, 39:1291–1304.
- Mourier A, Larsson NG (2011) Tracing the trail of protons through complex I of the mitochondrial respiratory chain. *PLoS Biol*, 9(8):e1001129.
- Mueller M (2002) Science, medicine, and the future: microdialysis. *BMJ*, 324:588–591.
- Muir KW, Grosset DG, Ganzu E, R LK (1994) Pharmacological effects of the non-competitive NMDA antagonist CNS 1102 in normal volunteers. *Br J Clin Pharm*, 38:33–38.
- Müller WE, Abdel-Kader R, Fehske CJ, Leuner K (2009) Grundlagen der therapeutischen Anwendung von EGb 761. Wirkung auf die Kraftwerke der Zellen. *Pharm Unserer Zeit*, 38(5):408–416.
- Müller WE, Juretzek W (1999) *Neuro-Psychopharmaka: Ginkgo biloba*. Springer Verlag.

- Murakami K, Kondo T, Chan PH (1997) Reperfusion following focal cerebral ischemia alters distribution of neuronal cells with DNA fragmentation in mice. *Brain Res*, 751(1):160–164.
- Muramatsu Y, Furuichi Y, Tojo N, Moriguchi A, Maemoto T, Nakada H, Hino M, Matsuoka N (2007) Neuroprotective efficacy of FR901459, a novel derivative of cyclosporin A, in in vitro mitochondrial damage and in vivo transient cerebral ischemia models. *Brain Res*, 1149:181–190.
- Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, Rhee SG, Thornalley PJ, Partridge L, Gems D, Nyström T, Belousov V, Schumacker PT, Winterbourn CC (2011) Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab*, 13(4):361–366.
- Nakamura T, Cho DH, Lipton SA (2012) Redox regulation of protein misfolding, mitochondrial dysfunction, synaptic damage, and cell death in neurodegenerative diseases. *Exp Neurol*, 238:12–21.
- Navarro A, Boveris A (2007) The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(2):670–86.
- Nentwich LM, Veloz W (2012) Neuroimaging in acute stroke. *Emerg Med Clin N Am*, 30:659–680.
- Nicholls D, Attwell D (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *TiPS*, 11:462–468.
- Niessen F, Hilger T, Hoehn M, Hossmann K (2003) Differences in clot preparation determine outcome of recombinant tissue plasminogen activator treatment in experimental thromboembolic stroke. *Stroke*, 34:2019–2024.
- O'Brien MD, Waltz AG (1973) Transorbital approach for occluding the middle cerebral artery without craniectomy. *Stroke*, 4(2):201–206.
- O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, Ragarajan S, Islam S, Pais P, McQueen MJ, Mondo C, Damasceno A, Lopez-Jaramillo P, Hankey GJ, Dans AL, Yusuf K, Truelsen T, Diener HC, Sacco RL, Ryglewicz D, Czlonkowska A, Weimer C, Wang X, Yusuf S (2010) Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet*, 276(9735):112–123.

- Okere IC, McElfresh TA, Brunengraber DZ, Martini W, Sterk JP, Huang H, Chandler MP, Brunengraber H, Stanley WC (2006) Differential effects of heptanoate and hexanoate on myocardial citric acid cycle intermediates following ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol*, 100(1):76–82.
- Olney JW (1994) Neurotoxicity of NMDA receptor antagonists: an overview. *Psychopharmacol Bull*, 30(4):533–540.
- Olsen TS, Skriver EB, Herning M (1985) Cause of cerebral infarction in the carotid territory. Its relation to the size and the location of the infarct and to the underlying vascular lesion. *Stroke*, 16:459–466.
- O'Neill MJ, Clemens JA (2000) Rodent models of focal cerebral ischemia. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 9, unit 9.6.
- Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW (2002) The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem*, 277(34):409–412.
- Paxinos G, Franklin KBJ (1997) *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press.
- Prins ML (2008) Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28(1):1–16.
- Puchowicz MA, Zechel JL, Valerio J, Emancipator DS, Xu K, Pundik S, LaManna JC, Lust WD (2008) Neuroprotection in diet-induced ketotic rat brain after focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28(12):1907–1916.
- Qi J, Hong ZY, Xin H, Zhu YZ (2010) Neuroprotective effects of leonurine on ischemia/reperfusion-induced mitochondrial dysfunctions in rat cerebral cortex. *Biol Pharm Bull*, 33(12):1958–1964.
- Rich PR, Mischis, Lidia A, Purton S, Wiskich JT (2001) The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains. *FEMS Microbiol Lett*, 202:181–187.
- Roe CR, Bottiglieri T, Wallace M, Arning E, Martin A (2010) Adult Polyglucosan Body Disease (APBD): Anaplerotic diet therapy (triheptanoin) and demonstration of defective methylation pathways. *Mol Genet Metab*, 101(2-3):246–452.
- Roe CR, Mochel F (2006) Anaplerotic diet therapy in inherited metabolic disease: therapeutic potential. *J Inherit Metab Dis*, 29(2-3):332–340.

- Roe CR, Yang BZ, Brunengraber H, Roe DS, Wallace M, Garritson BK (2008) Carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Neurology*, 71(4):260–264.
- Rothwell PM, Coull AJ, Giles MF, Howard SC, Silver LE, Bull LM, Gutnikov SA, Edwards P, Mant D, Sacklex CM, Farmer A, Sandercock PA, Dennis MS, Warlow CP, Bamford JM, Anslow P (2004) Change in stroke incidence, mortality, case-fatality, severity, and risk factors in Oxfordshire, UK from 1981 to 2004 (Oxford Vascular Study). *Lancet*, 363(9425):1925–1933.
- Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Miro-Casas E, Abellan A, Soler-Soler J (2006) Mitochondrial Ca^{2+} uptake during simulated ischemia does not affect permeability transition pore opening upon simulated reperfusion. *Cardiovasc Res*, 71:715–724.
- Sahin E, DePinho RA (2012) Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. *Nat Rev*, 13:397–404.
- Santiago M, Westerink BHC (1990) Characterization of the in vivo release of dopamine as recorded by different types of intracerebral microdialysis probes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 342(4):407–414.
- Sastre J, Borrás C, Garcia-Sala D, Lloret A, Pallardo FV, Vina J (2002) Mitochondrial damage in aging and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*, 959:448–451.
- Sastre J, Millan A, De la Asuncion JG, Pla R, Juan G, Pallardo FV, O'Connor E, Martin JA, Droy-Lefaix MT, Vina J (1998) A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 24(2):298–304.
- Sastre J, Pallardo FV, Vina J (2000) Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*, 49:427–435.
- Schallert T, Upchurch M, Lobaugh N, Farrar SB (1982) Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage. *Pharmacol Biochem Behav*, 16(3):455–462.
- Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ, Garcia JH (1998) A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-doppler flowmetry. *Stroke*, 29:2162–2170.

- Schwarzkopf TM, Hagl S, Eckert G, Klein J (2013a) Neuroprotection by bilobalide in ischemia: improvement of mitochondrial function. *Pharmazie*, 68:1–6.
- Schwarzkopf TM, Horn T, Lang D, Klein J (2013b) Blood gases and energy metabolites in mouse blood before and after cerebral ischemia: effect of anesthetics. *Ex Med Biol*, 238(1):84–89.
- Scriabine A, Schuurman T, Traber J (1989) Pharmacological basis for the use of nimodipine in central nervous system disorders. *FASEB*, 3(7):1799–1806.
- Seo JH, Lee YM, Lee JS, Kim SH, Kim HD (2010) A case of Ohtahara syndrome with mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. *Brain Dev*, 32(3):253–257.
- Shapira S, Sapir M, Wengier A, Grauer E, Kadar T (2002) Aging has a complex effect on a rat model of ischemic stroke. *Brain Res*, 925(2):148–158.
- Shi S, Klotz U (2011) Age-related changes in pharmacokinetics. *Curr Drug Metab*, 12(7):601–610.
- Shoulson I (1998) Where do we stand on neuroprotection? Where do we go from here? *Mov Disord*, 13:46–48.
- Siddiq A, Aminova LR, Ratan RR (2007) Hypoxia inducible factor prolyl 4-hydroxylase enzymes: center stage in the battle against hypoxia, metabolic compromise and oxidative stress. *Neurochem Res*, 32(4-5):931–946.
- Silbernagl S (2012) *Taschenatlas Physiologie*. Georg Thieme Verlag.
- Silver IA, Erecinska M (1994) Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J Neurosci*, 14(8):5068–5076.
- Sims NR (1990) Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J Neurochem*, 55(2):698–707.
- Sims NR, Anderson MF (2008) Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nat Protoc*, 3(7):1228–1239.
- Sims NR, Muyderman H (2010) Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochim Biophys Acta*, 1802(1):80–91.

- Smith JV, Burdick AJ, Golik P, Khan I, Wallace D, Luo Y (2002) Anti-apoptotic properties of Ginkgo biloba EGb 761 in differentiated PC12 cells. *Cell Mol Biol*, 48(6):699–707.
- Smith PF, Maclennan K, Darlington CL (1996) The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). *J Ethnopharmacol*, 50(3):131–139.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1):76–85.
- Smith WS (2004) Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective. *J Vasc Interv Radiol*, 15:3–12.
- Sokoloff L (1973) Metabolism of ketone bodies by the brain. *Annu Rev Med*, 24:271–280.
- Sonnewald U, Westergaard N, Petersen S, Unsgard G, Schousboe A (1993) Metabolism of [U-13C]glutamate in astrocytes studied by 13C NMR spectroscopy: incorporation of more label into lactate than into glutamine demonstrates the importance of the tricarboxylic acid cycle. *J Neurochem*, 6(3):1179–1182.
- Spiekerkoetter U, Bastin J, Gillingham M, Morris A, Wijburg F, Wicken B (2010) Current issues regarding treatment of mitochondrial fatty acid oxidation disorders. *J Inherit Metab Dis*, 33(5):555–461.
- Spratt NJ, Fernandez J, Chen M, Rewell S, Cox S, van Raay L, Hogan L, Howells DW (2006) Modification of the method of thread manufacture improves stroke induction rate and reduces mortality after thread-occlusion of the middle cerebral artery in young or aged rats. *J Neurosci Methods*, 155(2):285–290.
- Stoll L, Müller WE (1991) In vitro down-regulation predicts agonist efficacy at central muscarinic cholinergic receptors. *Biochem Pharmacol*, 41(12):1963–1966.
- Strong K, Mathers C, Bonita R (2007) Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurol*, 6(2):182–187.
- Sughrue ME, Connolly ES (2004) Effectively bridging the preclinical/clinical gap: the results of the ASTIN trial. *Stroke*, 35(4):81–82.

- Sumbria RK, Klein J, Bickel U (2011) Acute depression of energy metabolism after microdialysis probe implantation is distinct from ischemia-induced changes in mouse brain. *Neurochem Res*, 36:109–116.
- Sun J, Luan Q, Dong H, Song W, Xie K, Hou L, Xiong L (2012) Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening contributes to the neuroprotective effects of ischemic postconditioning in rats. *Brain Res*, 1436:101–110.
- Sutherland G, Dix GA, Auer RN (1996) Effect of age in rodent models of focal and forebrain ischemia. *Stroke*, 27:1663–1668.
- Suzuki M, Suzuki M, Kitamura Y, Mori S, Kazunori S, Dohi S, Sato T, Matsuura A, Hiraide A (2002) beta-Hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, protects rat brain against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia. *Jpn J Pharmacol*, 89:36–43.
- Suzuki M, Suzuki M, Sato K, Dohi S, Sato T, Matsuura A, Hiraide A (2001) Effect of beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats. *Jpn J Pharmacol*, 87:143–150.
- Szczesny B, Hazra TK, Papaconstantinou J, Mitra S, Boldogh I (2003) Age-dependent deficiency in import of mitochondrial DNA glycosylases required for repair of oxidatively damaged bases. *PNAS*, 100(19):10670–10675.
- Szydlowska K, Tymianski M (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*, 47(122-129).
- Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981) Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1(1):53–60.
- Tanaka T, Nabatame H, Tanifuji Y (2005) Insulin secretion and glucose utilization are impaired under general anesthesia with sevoflurane as well as isoflurane in a concentration-independent manner. *J Anesth*, 19(4):277–281.
- Taylor JB (2008) *My stroke of insight: a brain scientist's personal journey*. Hodder and Stoughton Publisher.
- Teichberg VI, Cohen-Kashi-Malina K, Cooper I, Zlotnik A (2009) Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by

- blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies. *Neuroscience*, 158(1):301–308.
- Tendi EA, Bosetti F, DasGupta SF, Giuffrida Stella AM, Drieu K, Rapoport SI (2002) Ginkgo biloba extracts EGb 761 and bilobalide increase NADH dehydrogenase mRNA level and mitochondrial respiratory control ratio in PC12 cells. *Neurochem Res*, 27(4):319–323.
- Thomas NK, Willis S, Sweetman L, Borges K (2012) Triheptanoin in acute mouse seizure models. *Epilepsy Res*, 99(3):312–317.
- Toomey JR, Valocik RE, Koster PF, Gabriel MA, McVey M, Hart TK, Ohlstein EH, Parsons AA, Barone FC (2002) Inhibition of factor IX(a) is protective in a rat model of thromboembolic stroke. *Stroke*, 33:578–585.
- Trifunovic A, Larsson NG (2008) Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *J Intern Med*, 263(2):167–178.
- Tümpel S, Rudolph KL (2012) The role of telomere shortening in somatic stem cells and tissue aging: lessons from telomerase model systems. *Ann N Y Acad Sci*, 1266:28–39.
- Ungerstedt U, Herrera-Marschitz M, Jungnelius U, Stahle L, Tossman U, Zetterstrom T (1982) Dopamine synaptic mechanisms reflected in studies combining behavioural recordings and brain dialysis. *Adv Biosci*, 37:219–231.
- Vaupel P, Mutschler E, G T (2007) *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Buchgesellschaft.
- Villa RF, Gorini A, Hoyer S (2009) Effect of ageing and ischemia on enzymatic activities linked to Krebs' cycle, electron transfer chain, glutamate and aminoacids metabolism of free and intrasynaptic mitochondria of cerebral cortex. *Neurochem Res*, 34(12):2102–2016.
- Wang CX, Yang T, Shuaib A (2001) An improved version of embolic model of brain ischemic injury in the rat. *J Neurosci Methods*, 109(2):147–151.
- Wang RY, Wang PSG, Yang YR (2003) Effect of age in rats following middle cerebral artery occlusion. *Gerontology*, 49:27–32.
- Wauthier V, Verbeeck RK, Calderon PB (2007) The effect of ageing on cytochrome p450 enzymes: consequences for drug biotransformation in the elderly. *Curr Med Chem*, 14(7):745–757.

- Weichel O, Hilgert M, Chatterjee SS, Lehr M, Klein J (1999) Bilobalide, a constituent of Ginkgo biloba, inhibits NMDA-induced phospholipase A2 activation and phospholipid breakdown in rat hippocampus. *Arch Pharmacol*, 360:609–615.
- Weinachter SN, Blaver N, Donnel RA, MacKenzie ET, Rapin JR (1990) Models of hypoxia and cerebral ischemia. *Pharmacopsychiatry*, 23:94–98.
- Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*, 175(1):231–237.
- Willis S, Stoll J, Sweetman L, Borges K (2010) Anticonvulsant effects of a triheptanoin diet in two mouse chronic seizure models. *Neurobiol Dis*, 40(3):565–572.
- Yudkoff M, Daikhin Y, Lazarow A, Nissim I (2001) Brain amino acid metabolism and ketosis. *J Neurosci Res*, 66:272–281.
- Zhang J, Yang J, Zhang C, Jiang X, Zhou H, Liu M (2012) Calcium antagonists for acute ischemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*, 5.
- Zhang Z, Zhang RL, Jiang Q, Raman SBK, Cantwell L, Chopp M (1997) A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17:123–135.
- Zhou ZY (2009) An overview of fossil Ginkgoales. *Palaeoworld*, 18:1–22.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ (2006) Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta*, 1757(5-6):509–517.
- Zuurbier CJ, Keijzers PJ, Koeman A, Van Wezel HB, Hollmann MW (2008) Anesthesia's effects on plasma glucose and insulin and cardiac hexokinase at similar hemodynamics and without major surgical stress in fed rats. *Anesth Analg*, 106:135–142.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Hirnarterien des Menschen.	2
1.2	Teufelskreis der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).	5
1.3	Pathobiologische Veränderungen im Gehirn nach Ischämie.	6
1.4	Zelluläres Glutamat-Gleichgewicht.	7
1.5	Blätter und Früchte des Ginkgo-Baumes.	12
1.6	<i>Ginkgo biloba</i> Skizze, angefertigt von Engelbert Kaempfer.	12
1.7	Strukturformel von Bilobalid.	14
1.8	Erkenntnisse der Arbeitsgruppe Klein zum Wirkmechanismus von Bilobalid.	15
1.9	Der Citratcyclus.	18
1.10	Die Strukturformel von Triheptanoin (Glyceroltriheptanoat).	20
1.11	Abbau von Triheptanoin.	21
1.12	Anaplerotischer Wirkmechanismus von Triheptanoin.	23
1.13	Unterschiedlich stark geschädigte Bereiche des Schlaganfalls.	25
1.14	Nylon-Filament der Firma Docol.	26
1.15	Schematische Darstellung des Verschlusses der mittleren Cerebralarterie.	27
2.1	Tierstall.	31
2.2	Triheptanoin-Fütterungsstudie.	33
2.3	Zusammensetzung der anaplerotischen Diät.	34
2.4	Blutentnahme bei der Maus.	36
2.5	Redoxreaktion von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid.	38
2.6	Hirnschnitte nach TTC Färbung.	39
2.7	Mäuse mit Schlaganfall.	40
2.8	Chimney Test.	41
2.9	Rotarod Test.	42
2.10	Corner Test.	43
2.11	Mikrodialysesonde im Gewebe.	45

2.12	Mikrodialysesonden.	48
2.13	Darstellung des Eingangsschlauches zur Mikrodialysesonde.	49
2.14	Darstellung des Ausgangsschlauches von der Mikrodialysesonde.	49
2.15	Operationsverfahren Mikrodialyse.	50
2.16	Platzierung der Sonde im Striatum.	51
2.17	Versuchsaufbau Wiederfindungswert.	52
2.18	Versuchsaufbau der Mikrodialyse.	53
2.19	Aufbau der MCAO Operation.	56
2.20	Schematische Darstellung der Hirnarterien mit eingeführtem Filament.	57
2.21	Operationsverfahren MCAO.	58
2.22	Oroboros Oxygraph O2k.	60
2.23	Mitochondriale Atmungskette.	62
2.24	Pipettierschema zur Messung der mitochondrialen Atmung.	64
2.25	Percoll-Dichte-Gradient.	71
2.26	Selbstgebaute Filter.	76
2.27	Pipettierschema zur ATP-Bestimmung.	77
2.28	Pipettierschema zur Messung des Membranpotentials.	78
3.1	Einfluss von Ringer-Lactat Lösung auf die Blutgaswerte nach Ischämie.	84
3.2	Einfluss des Anästhetikums auf die Blutparameter Glucose und Lactat nach Ischämie.	85
3.3	Wiederfindungswert der Mikrodialysesonden.	86
3.4	TTC-gefärbte Hirnschnitte junger Mäuse nach tMCAO.	88
3.5	TTC-gefärbte Hirnschnitte junger Mäuse nach tMCAO, behandelt mit Bilobalid.	89
3.6	TTC-gefärbte Hirnschnitte alter Mäuse nach tMCAO.	90
3.7	TTC-gefärbte Hirnschnitte alter Mäuse nach tMCAO, behandelt mit Bilobalid.	91
3.8	Infarktfläche von unbehandelten und mit Bilobalid behandelten jungen und alten Mäusen.	92
3.9	Motorische Verhaltenstests einen Tag vor und nach einstündiger Ischämie, mit und ohne Bilobalid-Behandlung.	93
3.10	Extrazelluläre Konzentrationen von Glucose und Glutamat im Striatum junger Mäuse während tMCAO, mit und ohne Bilobalid-Behandlung.	96

3.11	Prozentuale extrazelluläre Konzentrationen von Glucose und Glutamat im Striatum junger Mäuse während tMCAO, mit und ohne Bilobalid-Behandlung.	96
3.12	Extrazelluläre Konzentrationen von Glucose und Glutamat im Striatum alter Mäuse während tMCAO, mit und ohne Bilobalid-Behandlung. . . .	97
3.13	Prozentuale extrazelluläre Konzentrationen von Glucose und Glutamat im Striatum alter Mäuse während tMCAO, mit und ohne Bilobalid-Behandlung.	97
3.14	Extrazelluläre Konzentrationen von Glutamat im Striatum zusammengefasst für junge und alte Mäuse während tMCAO, mit und ohne Bilobalid-Behandlung.	98
3.15	Basale Konzentrationen von Glutamat im Striatum alter Mäuse.	99
3.16	Laser-Doppler-Werte, vor, während und nach tMCAO, vergleichend für junge und alte Mäuse.	99
3.17	Mitochondriale Atmung der Kontrolltiere.	101
3.18	Originalgraph der Messung der mitochondrialen Atmung nach einstündiger Ischämie <i>ex vivo</i>	102
3.19	Bilobalid-Wirkung auf Leak I-, Komplex I- und Oxphos-Status der mitochondrialen Atmungskette junger und alter Mäuse.	103
3.20	Bilobalid-Wirkung auf Leak II-, ETS- und Komplex II-Status der mitochondrialen Atmungskette junger und alter Mäuse.	104
3.21	Bilobalid-Wirkung auf Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette junger und alter Mäuse.	105
3.22	Mitochondriale Schwellung junger Tiere in Prozent, induziert durch Calciumchlorid.	106
3.23	Mitochondriale Schwellung junger Tiere in Prozent, gehemmt durch Cyclosporin A.	107
3.24	Verlaufsgraphen des mitochondrialen Schwellungsversuchs junger Tiere. . .	107
3.25	Mitochondriale Schwellung alter Tiere in Prozent, induziert durch Calciumchlorid.	108
3.26	Mitochondriale Schwellung alter Tiere in Prozent, gehemmt durch Cyclosporin A.	109
3.27	Verlaufsgraphen des mitochondrialen Schwellungsversuchs alter Tiere. . .	109
3.28	Körpergewicht der Mäuse während der Fütterungsstudie.	112

3.29	Venöse Konzentrationen an Glucose, Lactat und Glutamat nach Kontroll- bzw. Trieptanoin-Diät.	113
3.30	TTC-gefärbte Hirnschnitte nach tMCAO von Mäusen gefüttert mit Kontroll-Diät.	114
3.31	TTC-gefärbte Hirnschnitte nach tMCAO von Mäusen gefüttert mit Triheptanoin-Diät.	115
3.32	Infarktfläche nach tMCAO von Mäusen gefüttert mit Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät.	116
3.33	Verhaltenstest vor, sowie 1 und 3 Tage nach tMCAO von Mäusen gefüttert mit Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät.	118
3.34	Extrazelluläre Konzentrationen von Glucose und Glutamat im Striatum während tMCAO, vergleichend für Mäuse nach Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät.	119
3.35	Prozentuale extrazelluläre Konzentrationen von Glucose und Glutamat im Striatum während tMCAO, vergleichend für Mäuse nach Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät.	120
3.36	Laser-Doppler Werte vor, während und nach tMCAO von Tieren gefüttert mit Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät.	121
3.37	Triheptanoin-Wirkung auf Leak I-, Komplex I-, Oxphos- und Leak II-Status der mitochondrialen Atmungskette.	122
3.38	Triheptanoin-Wirkung auf ETS-, Komplex II- und Komplex IV-Status der mitochondrialen Atmungskette.	123
3.39	ATP-Gehalt in dissoziierten Hirnzellen, stammend von Mäuse die zuvor mit Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät gefüttert wurden.	125
3.40	Membranpotential in dissoziierten Hirnzellen, stammend von Mäuse die zuvor mit Kontroll- bzw. Triheptanoin-Diät gefüttert wurden.	125
4.1	Bilobalid-Effekt auf die mitochondriale Atmungskette.	143
4.2	Im Rahmen dieser Dissertation untersuchte pathobiologische Veränderungen im Gehirn nach Ischämie.	150
4.3	Bilobalid-Effekt auf die pathobiologischen Veränderungen nach Schlaganfall.	151
4.4	Metabolische Auswirkungen auf den Citratcyclus nach Ischämie.	155
4.5	Anaplerotische Effekte von Triheptanoin.	156
4.6	Effekt von Triheptanoin auf die pathobiologischen Veränderungen nach Schlaganfall.	167

Tabellenverzeichnis

2.1	Materialien zur Durchführung der Blutgasanalyse.	35
2.2	Materialien für die TTC Färbung.	37
2.3	Zusammensetzung des Phosphatpuffers (PBS).	38
2.4	Materialien zum Bau der Mikrodialysesonden.	45
2.5	Materialien zum Bau der Mikrodialyseschläuche.	46
2.6	Materialien zur Sondenimplantation.	46
2.7	Materialien zum Mikrodialyseversuch.	46
2.8	Zusammensetzung der artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF). . . .	47
2.9	Zusammensetzung der Stammlösung zur Bestimmung des Wiederfindungs- wertes.	53
2.10	Materialien zur Durchführung der Schlaganfall-OP.	55
2.11	Zusammensetzung des mitochondrialen Respirations-Mediums MiR05 (pH 7,1).	60
2.12	Materialien zur Bestimmung der mitochondrialen Atmungskapazität. . . .	61
2.13	Versuche an unbehandelten isolierten Mitochondrien <i>in vitro</i>	68
2.14	Versuche an Mitochondrien nach 60 min transienter MCAO <i>ex vivo</i>	68
2.15	Materialien für die mitochondriale Schwellung.	69
2.16	Zusammensetzung des Isolationspuffers; pH 7,4 bei 4°C.	70
2.17	Zusammensetzung der Percoll-Lösung; pH 7,4 bei 4°C.	70
2.18	Zusammensetzung des Messpuffers; pH 7,2 bei 37°C.	70
2.19	Materialien für ATP-Gehalt und Membranpotential.	74
2.20	Zusammensetzung Medium 1; pH 7,35 bei 2-8°C.	74
2.21	Zusammensetzung Medium 2; pH 7,4 bei 2-8°C.	75
2.22	Verwendete Chemikalien.	82

