

# **Ketonkörper im Schlaganfallgeschehen**

–

## **Eine neuroprotektive und akute Interventionsstudie**

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich  
Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Goethe - Universität  
in Frankfurt am Main

von

Konrad Koch

geboren in Ehringshausen (Hessen)

D - 30

Frankfurt am Main 2017



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

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

1. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Klein

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Karas

Datum der Disputation: 17.04.2018



*Für Sina und meine Familie*

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. EINLEITUNG.....</b>   | <b>11</b> |
| 1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Schlaganfalls.....                        | 11        |
| 1.2 Pathophysiologie des Schlaganfalls.....                                   | 16        |
| 1.3 Therapie des akuten ischämischen Schlaganfalls.....                       | 19        |
| 1.4 Der Citratzyklus.....   | 21        |
| 1.5 Die Pyruvatdehydrogenase.....   | 23        |
| 1.5.1 Regulation der Pyruvat-Dehydrogenase.....                               | 24        |
| 1.6 Die oxidative Phosphorylierung.....                                       | 26        |
| 1.6.1 Die Hemmstoffe und Entkoppler der Atmungskette.....                     | 27        |
| 1.7 Energiestoffwechsel des Gehirns unter physiologischen Bedingungen.....    | 29        |
| 1.7.1 Das Astrozyten - Neuronen - Laktat - Shuttle.....                       | 30        |
| 1.7.2 Der Glutamin - Glutamat - GABA Zyklus.....                              | 31        |
| 1.7.3 Malat - Aspartat - Shuttle.....   | 33        |
| 1.7.4 Das Glycerol - 3 - Phosphat - Shuttle.....                              | 35        |
| 1.8 Die Physiologie der Fettsäuren und Ketonkörper.....                       | 36        |
| 1.8.1 Die Physiologie der Fettsäuren.....                                     | 36        |
| 1.8.1.1 Die Lipolyse.....   | 37        |
| 1.8.1.2 Die Aktivierung der Fettsäuren.....                                   | 37        |
| 1.8.1.3 Die $\beta$ - Oxidation.....  | 38        |
| 1.9 Ketogenese.....   | 41        |
| 1.9.1 Substrate und Regulation der Ketogenese.....                            | 42        |
| 1.10 Verstoffwechslung der Ketonkörper in extrahepatischen Geweben.....       | 43        |
| 1.10.1 Nicht - oxidative Verstoffwechslung von Ketonkörpern.....              | 44        |
| 1.11 Die Gaschromatographie mit gekoppeltem Massenspektrometer (GC - MS)..... | 45        |
| 1.11.1 Aufbau und Prinzip der Gaschromatographie.....                         | 45        |
| 1.11.2 Aufbau und Prinzip der Massenspektrometrie.....                        | 49        |
| 1.12 Fragestellungen der Dissertation.....                                    | 55        |
| <b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>  | <b>56</b> |
| 2.1 Material und Methoden für den Schlaganfall und die Mikrodialyse.....      | 56        |
| 2.1.1 Materialien und Geräte.....   | 56        |
| 2.1.1.1 Geräte.....   | 56        |
| 2.1.1.2 Verwendete Tiere und Tierhaltung.....                                 | 59        |
| 2.1.1.3 Verwendete Diäten.....  | 59        |
| 2.1.1.4 Mikrodialyse.....   | 60        |
| 2.1.1.4.1 Aufbau und Funktionsweise der Mikrodialysesonden.....               | 61        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.1.1.4.2 Bau der Mikrodialysesonde .....  | 63        |
| 2.1.1.4.3 Bau des Perfusionsschlauches und Auffangsystem für das Mikrodialysat .....                     | 64        |
| 2.1.1.4.4 Perfusionslösung .....   | 64        |
| 2.1.1.4.5 In vitro Wiederfindungsrate .....  | 64        |
| 2.1.1.4.6 Sondenimplantation in das linke Striatum .....   | 65        |
| 2.1.1.5 Transiente Okklusion der mittleren Zerebralarterie (t - MCAO).....                               | 67        |
| 2.1.1.5.1 Methoden der transienten mittleren Zerebralarterienokklusion .....                             | 67        |
| 2.1.1.5.2 Durchführung und Validierung der transienten Okklusion der mittleren<br>Zerebralarterien ..... | 67        |
| 2.1.1.5.3 Reperfusion .....  | 71        |
| 2.1.1.6 Studiendesign .....  | 71        |
| <b>2.2 Material und Methoden.....</b>  | <b>72</b> |
| 2.2.1 Geräte und Materialien.....  | 72        |
| 2.2.2 Chemikalien.....   | 73        |
| 2.2.3 Interventions- und Kontrolllösungen .....  | 74        |
| 2.2.4 MiRO (Mitochondrial Respiration Medium) .....  | 74        |
| 2.2.5 Isolation von Mitochondrien.....   | 75        |
| 2.2.6 Mitochondriale Atmung.....   | 76        |
| 2.2.7 BCA Proteinbestimmung.....   | 76        |
| 2.2.8 Citratsynthase (CS) .....  | 78        |
| 2.2.9 Verhaltenstests .....  | 80        |
| 2.2.9.1 Neuroscore .....   | 80        |
| 2.2.9.2 Exit - Circle - Test: .....  | 81        |
| 2.2.9.3 Corner - Test: .....   | 82        |
| 2.2.9.4 Gerader Gang.....  | 83        |
| 2.2.9.5 Schreckreflex .....  | 83        |
| 2.2.9.6 Suchverhalten .....  | 83        |
| 2.2.9.7 Balancieren - Test .....   | 83        |
| 2.2.9.8 Motortest.....   | 84        |
| 2.2.9.10 Gangtest .....  | 85        |
| 2.2.9.11 Pinnareflex.....  | 85        |
| 2.2.9.12 Chimney - Test .....  | 85        |
| <b>2.3 Material und Methoden der Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie .....</b>          | <b>86</b> |
| 2.3.1 Materialien und Geräte.....  | 86        |
| 2.3.2 Methode der Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie.....                              | 89        |
| 2.3.2.1 Die Silylierung .....  | 89        |
| 2.3.2.2 Qualitative Etablierung der Metabolite .....   | 89        |
| 2.3.2.3 Quantitative Analyse mithilfe der internen Standardmethode .....                                 | 92        |
| 2.3.2.4 Der Responsefaktor (R <sub>f</sub> -Wert) .....  | 94        |
| 2.3.2.5 Charakterisierung der Lösungsmittel und Derivatisierungsmittel .....                             | 95        |
| 2.3.2.5.1 Pyridin .....  | 95        |
| 2.3.2.5.2 N,O - Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA).....  | 96        |
| 2.3.2.5.3 Trimethylchlorsilan (TMCS) .....   | 96        |
| 2.3.2.5.4 Diisopropylethylamin (Hünig - Base) .....  | 96        |
| 2.3.2.5.5 Sonstige Lösungsmittel.....  | 97        |
| 2.3.2.5.6 Endvolumina in Abhängigkeit des zu vermessenden Kompartiments .....                            | 97        |
| 2.3.2.6 Vorbereitung der Chemikalien und Lösungen für die quantitative Vermessung .....                  | 97        |
| 2.3.2.7 Versetzen der Proben mit internem Standard .....   | 98        |

|             |  |            |
|-------------|--|------------|
| 2.3.3       | Quantitative Bestimmung von Metaboliten aus unterschiedlichen Mauskompartimenten .....           | 99         |
| 2.3.3.1     | Quantitative Bestimmung der Metabolite im Mikrodialysat mithilfe der GC - MS .....               | 99         |
| 2.3.3.2     | Quantitative Bestimmung der Metabolite im Plasma - Kompartiment.....                             | 100        |
| 2.3.3.2.1   | Probenaufbereitungen der Plasmaproben.....   | 100        |
| 2.3.3.2.2   | Silylierung der Plasmaproben.....  | 100        |
| 2.3.3.3     | Quantitative Bestimmung der Metabolite im Hirn - und Leberhomogenat .....                        | 101        |
| 2.3.3.3.1   | Probenaufbereitungen der Hirn - und Leberhomogenate .....  | 101        |
| 2.3.3.3.2   | Silylierung der Hirn - und Leberhomogenate .....   | 102        |
| 2.3.3.4     | Spezifikationen der GC - MS für die quantitative Bestimmung .....                                | 103        |
| 2.3.3.4.1   | Temperaturprogramme .....  | 103        |
| 2.3.3.4.1.1 | Temperaturprogramm Agilent VF - 5 ms 60 m x 25 mm x 0,25 µm + 10<br>m Vorsäule .....             | 103        |
| 2.3.3.4.1.2 | Temperaturprogramm Agilent VF - 5 ms, 30 m x 25 mm x 0,25 µm + 5<br>m Vorsäule .....             | 104        |
| 2.3.3.4.1.3 | Inlet Spezifikationen.....   | 104        |
| 2.3.3.4.2   | Spezifikationen für Helium als Trägergas .....   | 105        |
| 2.3.3.4.3   | Wartung der Autosamplerspritze.....  | 106        |
| 2.3.3.4.4   | Messesequenz .....   | 106        |
| 2.3.3.5     | Berechnung der Analytenkonzentration im jeweiligen Kompartiment.....                             | 106        |
| <b>3</b>    | <b>ERGEBNISSE .....</b>  | <b>109</b> |
| <b>3.1</b>  | <b>Hepatische Ketogenese in Abhängigkeit unterschiedlicher Diäten .....</b>                      | <b>109</b> |
| 3.1.1       | Reproduzierbarkeit der transienten Okklusion der mittleren Zerebralarterien (t - MCAO) .....     | 110        |
| 3.1.2       | Hepatische Ketogenese nach Schlaganfallinduktion.....  | 113        |
| 3.1.3       | Metabolitenspiegel von BHB und Glukose bei Reperfusion .....                                     | 117        |
| 3.1.4       | Einfluss der hepatischen Ketogenese auf die Intermediate des Zitronensäurezyklus .....           | 119        |
| 3.1.5       | Effekte von Propranolol auf die hepatische Ketogenese .....                                      | 121        |
| <b>3.2.</b> | <b>Akutintervention mit dem Ketonkörper BHB bei Reperfusion .....</b>                            | <b>124</b> |
| 3.2.1       | BHB und Glukose Spiegel im Mikrodialysat nach intraperitonealer Injektion .....                  | 124        |
| 3.2.2       | BHB Effekte auf das Verhalten der Mäuse nach Schlaganfall .....                                  | 125        |
| 3.2.3       | Metabolitenspiegel nach 24 h Reperfusion .....   | 126        |
| 3.2.4       | Effekte von BHB auf Mitochondrien .....  | 128        |
| 3.2.4.1     | Citratsynthese bei Ischämie.....   | 130        |
| 3.2.4.2     | Einfluss unterschiedlicher Substrate auf die Atmung isolierter Mitochondrien .....               | 131        |
| 3.2.4.3     | Veränderungen der Korticosteronkonzentration bei zerebraler Ischämie.....                        | 132        |
| <b>3.3</b>  | <b>Etablierung und Validierung der Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometer .....</b> | <b>133</b> |
| 3.3.1       | Nachweisgrenze und Linearität.....   | 133        |
| 3.3.2       | N,N - Diisopropylethylamin (Hünig Base) als Zusatz in der Silylierungsreaktion .....             | 137        |
| 3.3.3       | Temperatur - und Zeitabhängigkeit der Silylierungsreaktion .....                                 | 139        |
| 3.3.4       | Lösungsmiteleinfluss auf die Silylierungsreaktion .....  | 141        |
| 3.3.5       | Extraktionseffektivität.....   | 142        |
| 3.3.6       | In vitro Wiederfindungsrate.....   | 143        |
| <b>3.6</b>  | <b>Responsefaktoren der Analyte .....</b>  | <b>144</b> |



|  |   |
|--|---|
| <b>4. DISKUSSION.....</b>  | <b>145</b>                                |
| <b>4.1 Die hepatische Ketogenese bei Induktion eines Schlaganfalls .....</b>   | <b>145</b>                                |
| 4.1.1 Laser-Doppler Flussmessung und Okklusion der mittleren Zerebralarterie .....                                   | 145                                       |
| 4.1.2 Die Metabolitenspiegel von Glukose, Laktat und BHB im Mikrodialysat .....                                      | 146                                       |
| 4.1.3 Hepatische Ketogenese in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten und zerebraler Ischämie .....               | 147                                       |
| 4.1.3.1 Hypothesen für die Veränderungen der Metabolitenspiegel in unterschiedlichen Kompartimenten .....            | 148                                       |
| 4.1.3.2 Hypothese über die Distribution von BHB zwischen den Kompartimenten .....                                    | 149                                       |
| 4.1.4 Citratspiegel in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten und zerebraler Ischämie.....                        | 151                                       |
| 4.1.5 BHB und Glukosespiegel bei Reperfusion .....   | 152                                       |
| 4.1.5.1 Hypothesen für die Konzentrationsänderungen von BHB nach Reperfusion.....                                    | 152                                       |
| 4.1.5.2 Hypothesen für die Konzentrationsänderungen von Glukose nach Reperfusion.....                                | 153                                       |
| 4.1.6 Effekte einer Propranololgabe auf die Energieträger Glukose und BHB.....                                       | 155                                       |
| 4.1.7 Zusammenfassung und Ausblick .....   | 157                                       |
| <b>4.2 Akutintervention mit dem Ketonkörper BHB bei Reperfusion.....</b>   | <b>158</b>                                |
| 4.2.1 Glukose und BHB Konzentrationen im Mikrodialysat nach Injektion einer Einzeldosis BHB .....                    | 158                                       |
| 4.2.2 Auswirkungen einer Akutintervention mit BHB auf das Verhalten der Mäuse nach 24 h .....                        | 159                                       |
| 4.2.3 Metabolitenspiegel von Glukose und BHB im Leberhomogenat nach 24 h bei akuter BHB Gabe zur Reperfusion.....    | 161                                       |
| 4.2.4 Effekte einer akuten Gabe von BHB auf Mitochondrien.....   | 163                                       |
| 4.2.4.1 Effekte einer akuten Gabe von BHB auf die Atmungskettenkomplexe .....  | 163                                       |
| 4.2.4.2 Effekte einer akuten Gabe von BHB auf die Aktivität der Citratsynthase.....                                  | 164                                       |
| 4.2.4.3 Substrateinflüsse auf isolierte Mitochondrien .....  | 165                                       |
| 4.2.4.3.1 Einfluss von BHB auf isolierte Mitochondrien .....   | 166                                       |
| 4.2.4.3.2 Einfluss von Glukose auf isolierte Mitochondrien .....   | 166                                       |
| 2.2.4 MiRO (Mitochondrial Respiration Medium) .....  | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 4.2.4.3.3 Einfluss von Propranolol auf isolierte Mitochondrien.....  | 167                                       |
| 4.2.4.3.4 Einfluss von Acetat auf isolierte Mitochondrien .....  | 167                                       |
| 4.2.4.3.5 Einfluss von Acetat auf isolierte Mitochondrien .....  | 168                                       |
| 4.2.4.3.6 Einfluss von Oxalacetat und Acetat auf isolierte Mitochondrien .....                                       | 168                                       |
| 4.2.4.3.7 Einfluss von Citrat auf isolierte Mitochondrien.....   | 168                                       |
| 4.2.5 Zusammenfassung und Ausblick .....   | 169                                       |
| <b>4.3 Etablierung und Validierung der Gaschromatographie gekoppelt mit einem Massenspektrometer (GC – MS) .....</b> | <b>172</b>                                |
| 4.3.1 Richtigkeit und Selektivität .....   | 172                                       |
| 4.3.2 Linearität .....   | 174                                       |
| 4.3.3 Nachweis – und Bestimmungsgrenze .....   | 175                                       |
| 4.3.4 Robustheit.....  | 176                                       |
| 4.3.5 Wiederfindungsrate .....   | 177                                       |
| 4.3.6 Zusammenfassung und Ausblick .....   | 178                                       |
| <b>5 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>   | <b>181</b>                                |
| <b>6 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>  | <b>202</b>                                |

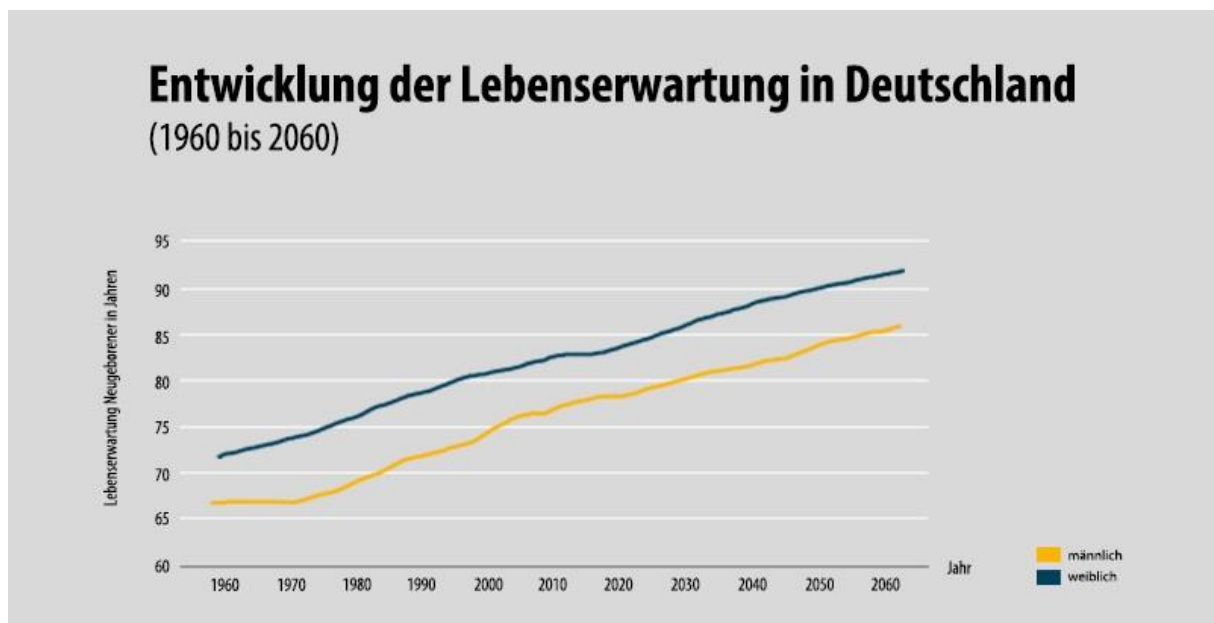
|             |                                       |                                    |
|-------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| <b>7</b>    | <b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>     | <b>204</b>                         |
| <b>8</b>    | <b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>       | <b>207</b>                         |
| <b>9</b>    | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>     | <b>208</b>                         |
| <b>10</b>   | <b>ANHANG.....</b>                    | <b>212</b>                         |
| <b>10.1</b> | <b>Danksagung.....</b>                | Fehler! Textmarke nicht definiert. |
| <b>10.2</b> | <b>Publikationen und Poster.....</b>  | <b>212</b>                         |
| 10.2.1      | Publikationen.....                    | 212                                |
| 10.2.2      | Poster.....                           | 212                                |
| <b>10.3</b> | <b>Lebenslauf.....</b>                | Fehler! Textmarke nicht definiert. |
| <b>10.4</b> | <b>Erklärung.....</b>                 | <b>213</b>                         |
| <b>10.5</b> | <b>Eidesstattliche Erklärung.....</b> | <b>213</b>                         |

# 1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den Einflüssen von fettreichen Diäten bzw. die Gabe des Ketonkörpers  $\beta$  - Hydroxybutyrat (BHB) auf den Endpunkt Schlaganfall. Um alle gezeigten Metabolite messen zu können, wurde eine GC - MS Analytik etabliert. Hieraus ergeben sich die drei Teile der vorliegenden Arbeit. Im ersten Teil wird die Etablierung der GC - MS Analytik vorgestellt, im zweiten Teil der Einfluss unterschiedlicher Diäten auf den Endpunkt Schlaganfall. Im letzten Teil wird die akute Gabe des Ketonkörpers BHB im Schlaganfallmodell untersucht.

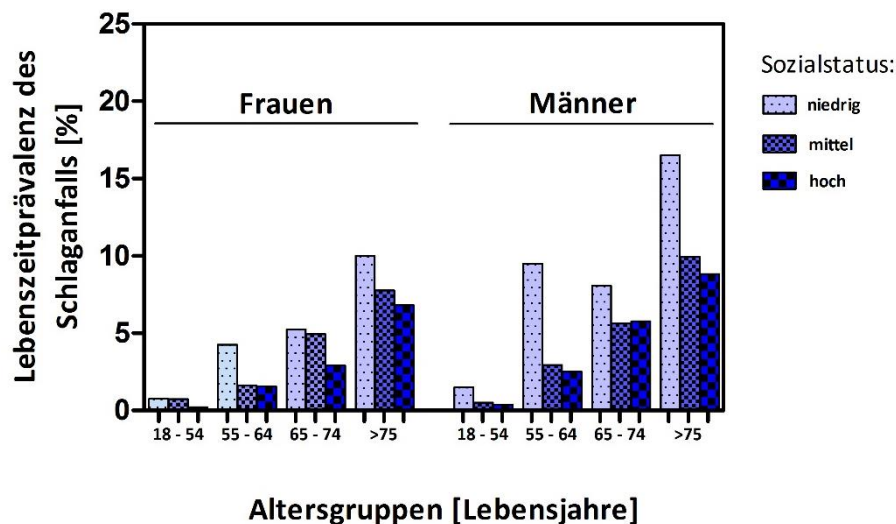
## 1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Schlaganfalls

Laut WHO erlitten 2012 weltweit geschätzt 6,7 Millionen Menschen einen Schlaganfall [1]. Damit stellt der Schlaganfall die zweithäufigste Todesursache nach Herzinfarkten mit geschätzt 7,4 Millionen Menschen weltweit dar [1], [2]. Sowohl ischämische als auch hämorrhagische Schlaganfälle stellen den Hauptgrund für dauerhafte Behinderungen dar [1], [3], [4]. Die anfallenden Kosten für einen Schlaganfallpatienten, der zum ersten Mal einen Schlaganfall erlitten hat und das erste Jahr überlebt hat, belaufen sich in Deutschland auf 18517 € / Jahr [4]. Allerdings sind die Rehabilitationsmaßnahmen der wesentliche Kostenträger, der gemittelt für Frauen und Männer bei 43129 € / Jahr liegt [4]. Damit ergibt sich eine Gesamtbelastung im Jahr in Deutschland von 7,1 Milliarden Euro [4]. Diese Zahlen veranschaulichen deutlich die Beeinträchtigung des Patienten nach einem Schlaganfall, als auch die enormen finanziellen Kosten bei der Langzeitpflege.



**Abb. 1** Fernere Lebenserwartung in Deutschland von 1960 - 2060 nach Geschlecht. Abbildung aus Institut für Automation und Kommunikation (IfAK) von Nadine Kärcher [5].

In Deutschland steigt die Lebenserwartung seit 1949 stetig an. Ein 60 jähriger Mann konnte im Jahre 1871 im Mittel mit 12,1 Jahren zusätzlich rechnen. Im Vergleich dazu, kann ein Mann Hochrechnungen zufolge im Jahr 2060 mit zusätzlichen 26,6 Jahren rechnen. Bei Frauen ist die Spanne zwischen 1871 und 2060 noch größer. Während eine Frau im Jahre 1871 im Durchschnitt 72,7 Jahre alt geworden ist, wird Sie im Mittel 2060 90,1 Jahre alt werden [6].



**Abb. 2** Lebenszeitprävalenz des Schlaganfalls nach sozialem Status. Rohdaten aus Gesundheitsberichterstattung des Bundes [7].

Laut der DEGS-1 Studie liegt die Lebenszeitprävalenz in Deutschland für den Schlaganfall im Alter zwischen 40 – 79 Jahren bei 2,9 % [8]. Interessant ist auch, dass Menschen mit niedrigem Sozialstatus häufiger (4,7 %) einen Schlaganfall erleiden, als Bevölkerungsgruppen mit hohem Sozialstatus (1,15 %) [8] (s. **Abb. 2**). Sowohl die steigende Lebenszeitprävalenz, als auch die steigende Lebenserwartung können den Schluss zulassen, dass die Anzahl an Schlaganfallpatienten bis 2060 steigen wird. Wenn man Hochrechnungen der Schlaganfallzahlen bis 2050 in Hessen näher betrachtet, erkennt man, dass die Anzahl von Schlaganfallpatienten von 20846 (2006) auf über 35000 Personen ansteigen soll [8]. Ein Grund hierfür ist die stetig steigende Lebenserwartung in Deutschland [6] (s. **Abb. 1**).

Den voraussichtlich steigenden Zahlen an Schlaganfallpatienten kann man gegenüberstellen, dass die Versorgung von Schlaganfallpatienten in westlichen Ländern permanent verbessert wird [8], [9] und die Mortalität laut dieser Studien sinkt. Ein weiteres Argument für sinkende Langzeitbehandlungen in der Zukunft, sind die verbesserten Hilfsfristen (von der Alarmierung des Rettungsmittels bis zum Eintreffen am Einsatzort) im Rettungsdienst. Die Hilfsfristen lagen 2008/2009 im Mittel in Deutschland bei 8,7 min. [11]. In Deutschland gibt es 163 sogenannte *Stroke - Units* (Stand: Mai 2010), in denen 51% aller auftretenden Schlaganfälle behandelt werden [10]. Wenn diese Zahlen weiterhin verbessert werden, kann man von sinkenden Langzeitkosten, sowie sinkenden Todesfällen ausgehen.

Abschließend kann man festhalten, dass die effektive Anzahl an Schlaganfallpatienten sehr wahrscheinlich steigen wird, die Kosten für die Langzeitbehandlung und die absoluten Todesfälle durch den Schlaganfall jedoch voraussichtlich sinken werden.

Im Folgenden soll die Ätiologie des Schlaganfalls anhand der Risikofaktoren näher erläutert werden. Die Risikofaktoren für den ischämischen Schlaganfall sind nach [12] gliederbar:

- Neue Risikofaktoren (Homocystein, CRP)
- Traditionelle Risikofaktoren (körperliche Inaktivität )
- Modifizierbare Risikofaktoren (Rauchen, Adipositas, Diabetes, Vorhofflimmern)
- Nicht-modifizierbare Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, Ethnie, Familienanamnese)

Es gestaltet sich mitunter schwierig, anhand eines bestehenden Risikofaktors die Wahrscheinlichkeit für den Eintritt einer Erkrankung vorherzusagen. Im Falle des Schlaganfalls ist 1991 die sogenannte *Framingham-Stroke-Risk-Profile (FSRP)* Skala vorgeschlagen und etabliert worden [13]. In den darauffolgenden Jahren wurde dieses diagnostische Instrumentarium, zur Abschätzung der 10 Jahres Schlaganfallprävalenz, immer weiter optimiert und an aktuelle Forschungsergebnisse zum Thema Schlaganfall angepasst [11] - [15]. Die Skala der *FSRP* reicht von 0 – 27 Punkten, wobei 0 Punkte einem 10 Jahres Risiko von 1,1 % bzw. 27 Punkte einem 10 Jahres Risiko von 84,4 %, einen Schlaganfall zu erleiden, entsprechen [12], [14].

Neben den zuvor genannten Gründen, stellen die modifizierbaren Risikofaktoren Rauchen, Hypertonie, Hyperlipidämien, Diabetes und Adipositas die hauptsächlich Gründe für die steigende Inzidenz von Schlaganfällen in westlichen Ländern dar [15]. Der Beitrag eines jeden Risikofaktors zur Erhöhung der Schlaganfallwahrscheinlichkeit, ist **Tab. 1** zu entnehmen.

|  | Risikofaktoren                                      | Prävalenz [% pro 100000]  | Relatives Risiko für Schlaganfall                  | Risikoreduktion mit Therapie  | Maßnahmen           |   |
|--|---|---|--|---|---------------------|---|
| <b>Nicht-modifizierbare Risikofaktoren</b> | Alter [17]  | 18 – 44 <b>0,5</b>  |  | Entfällt  | entfällt            |   |
|  |   | 45 – 64 <b>2,4</b>  |  |   |                     |   |
|  |   | 65 – 70 <b>7,6</b>  |  |   |                     |   |
|  |   | >75 <b>11,2</b>   |  |   |                     |   |
| <b>Nicht-modifizierbare Risikofaktoren</b> | Geschlecht [17]                                     | Männer <b>2,9</b>   |  | Entfällt  | entfällt            |   |
|  |   | Frauen <b>2,3</b>   |  |   |                     |   |
|  |   | Absolut <b>2,6</b>  |  |   |                     |   |
| <b>Modifizierbare Risikofaktoren</b>       | Rauchen (Zigaretten) [17]                           | Männer <b>22,3</b><br>Frauen <b>17,4</b><br>Absolut <b>19,8</b> | 1,9  | 50 % im 1. Jahr<br>Nach 5 Jahren Basisniveau  | Rauch - restriktion |   |
|  | Bluthochdruck [13;18]                               | <u>Männer</u> <u>Frauen</u>                                     |  | 2 - 8 [18]  | 32 % [14]           | Romero et al. 2008: niedrig dosierte Diuretika ergaben niedrigste Mortalität für Schlaganfall |
|  |   | 20 – 34 <b>13,4</b> <b>6,2</b>                                  |  |   |                     |   |
|  |   | 35 – 44 <b>23,2</b> <b>16,5</b>                                 |  |   |                     |   |
|  |   | 45 – 54 <b>36,2</b> <b>35,9</b>                                 |  |   |                     |   |
| 55 – 64 <b>53,7</b> <b>55,8</b>            |   |   |  |   |                     |   |
| 65 – 74 <b>64,7</b> <b>69,6</b>            |   |   |  |   |                     |   |
| >75 <b>64,1</b> <b>76,4</b>                |   |   |  |   |                     |   |
| Diabetes                                   | Absolut <b>7,3</b>                                  | 1,8 – 6,0   | 60 % über 7,8 Jahre [19];<br>40 % über 1 Jahr [19] | EBM konforme Therapie: HbA1c: 6,5<br>Diuretika;<br>ACE-Inhibitoren;<br>AT-1 Antagonisten ;<br>β-Blocker wenn Blutdruck hoch |                     |   |
| Hohe Cholesterinspiegel                    | Dauerhaft erhöhtes Risiko<br>Kontroverse Datenlage! | 1,5   | 0,81   | Diät, Gewichtsreduktion, bei sistieren Statine [20];<br>bei Hypertriglyceridämie Nicotinsäure derivate ; s. auch [14]       |                     |   |
| Physische Inaktivität                      | 25  | 2,7 [21]  | Entfällt   | Körperliche Aktivität   |                     |   |

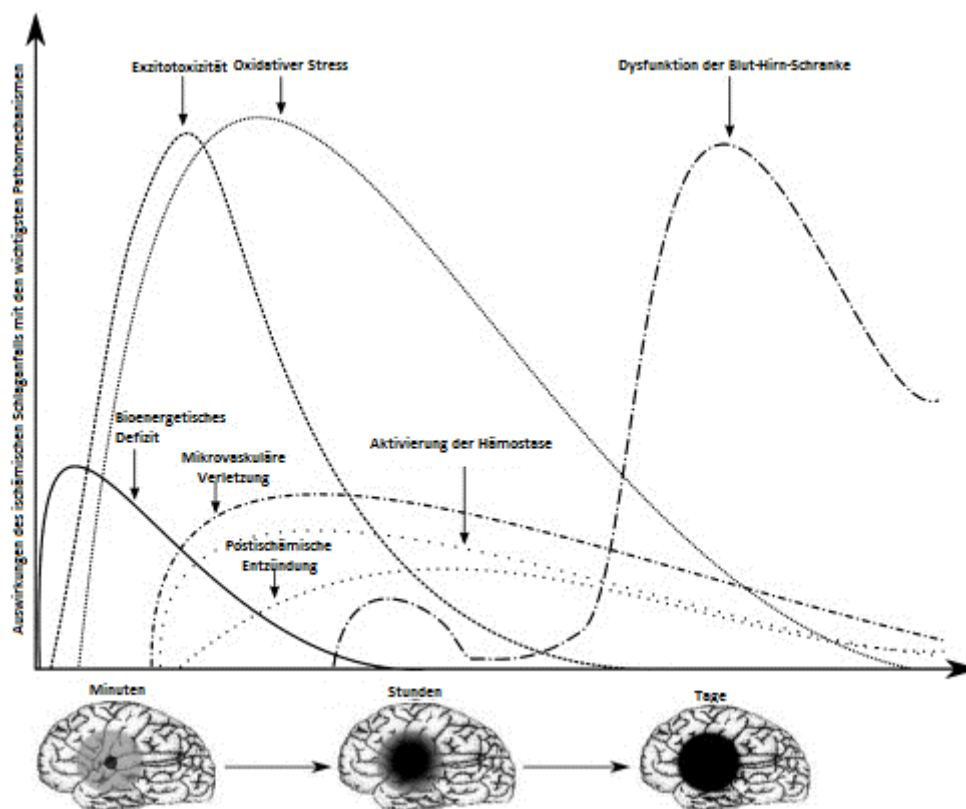
**Tab. 1 Risikofaktoren des ischämischen Schlaganfalls und die sich daraus ergebenden Faktoren Prävalenz, relatives Risiko und abzuleitende Maßnahmen. Modifiziert nach [3], [13], [20].**

Die genannten Risikofaktoren können entweder zu einem ischämischen Schlaganfall (Thromboisierung; Embolisierung) oder im Falle einer hämorrhagischen Diathese durch die Ruptur eines Aneurysmas bzw. das sekundäre Platzen einer Hirnarterie, Venensini oder Hauptvene zu einer Hirnblutung führen [12].

## 1.2 Pathophysiologie des Schlaganfalls

In diesem Kapitel wird die Pathophysiologie des Schlaganfalls auf den Energiestoffwechsel bzw. auf zellulärer Ebene erläutert. Grundsätzlich zu unterscheiden ist dabei der ischämische vom hämorrhagischen Schlaganfall [23]. Der ischämische Schlaganfall stellt mit 80 – 85 % (gegenüber 15 – 20 % Hämorrhagien) den überwiegenden Anteil der gesamten Schlaganfälle dar [24]. Die ischämischen Schlaganfälle stehen im Fokus unserer Arbeitsgruppe und das Modell zur Induktion eines Schlaganfalls in der Maus generiert Minderperfusion der mittleren Zerebralarterie, was auch einer ischämischen Diathese entspricht. Deswegen soll an dieser Stelle die Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls näher betrachtet werden.

Zum akuten ischämischen Schlaganfall kommt es durch einen plötzlichen Abfall oder Verlust der Perfusion bestimmter Versorgungsgebiete des Gehirns [25]. Die neurologische Funktion der distal zur Ischämie gelegenen Hirnabschnitte kann nicht mehr aufrechterhalten werden [25]. Durch die Minderperfusion entwickeln sich im weiteren zeitlichen Verlauf unterschiedliche Pathomechanismen, die bei fehlender Wiedereröffnung (Reperfusion) zum endgültigen Zelltod führen [26]. In **Abb. 3** wird die zeitliche Abfolge aller aktuell untersuchten Pathomechanismen im zeitlichen Verlauf grafisch dargestellt.



**Abb. 3** Zeitliches Profil der ablaufenden Pathomechanismen des ischämischen Schlaganfalls, modifiziert nach Brouns et al. 2009 [26].

Wie in **Abb. 3** ersichtlich, ergibt sich in Abhängigkeit von der Zeit eine *Core* Region und eine *Penumbra* Region [27]. Die *Penumbra* ist eine Region, in der eine Hypoperfusion besteht, die aber nicht vollständig von der Nährstoffversorgung abgeschnitten ist. Die *Core* Region ist ein irreversibel zerstörter Bereich, in dem keinerlei Nährstoffversorgung mehr stattfindet und die Zellen in diesem

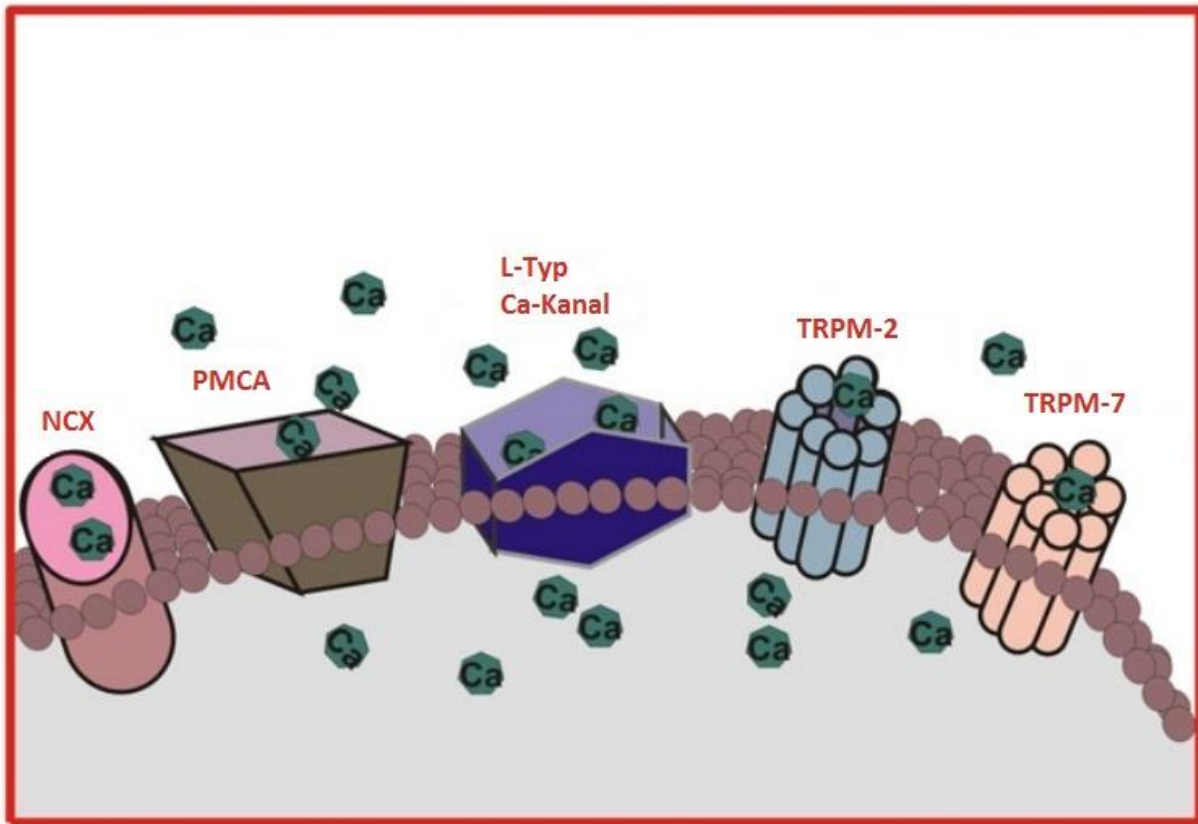


Bereich nekrotisieren. Im Vergleich hierzu unterliegen die Zellen, die im *Penumbra-Bereich* liegen, apoptotischen Prozessen [23] – [25]. Die *Penumbra-Region* wird mit der Zeit immer kleiner und geht in die irreversibel geschädigte *Core-Region* über. Der Ionengradient bleibt in der *Penumbra-Region* zwar bestehen, aber dieser Übergangszustand ist durch Azidose, erhöhte Sauerstoffextraktion und minimal verbleibende ATP-Spiegel charakterisiert [28].

In der vorliegenden Arbeit wird das bioenergetische Defizit als Interventionsschnittstelle zur Verbesserung des neurologischen Status fokussiert. Aus diesem Grund werden die anderen Pathomechanismen an dieser Stelle nicht im Detail besprochen. Weiterführende Literatur zu diesem Thema ist in den Publikationen [21], [22], [26], [27] einsehbar. Die Pathologie der mitochondrialen Dysfunktion wird zum besseren Verständnis direkt im Diskussionsteil unter **Kap. 4.2.4 Effekte einer akuten Gabe von BHB auf Mitochondrien** abgehandelt.

Einleitend wird die zeitliche Abfolge der eintretenden Ereignisse nach Einsetzen der Ischämie besprochen. Eine aktuelle NMR-Studie ergab bei Ratten, dass direkt nach der einsetzenden Ischämie die Laktat-Spiegel auf über 10 mM ansteigen, die ATP-Spiegel um 1,0 mM abfallen, die Phosphokreatin - Spiegel um 1,5 mM sinken, der pH-Wert auf 6,2 absinkt und die Sauerstoffsättigung der distal gelegenen Erthrozyten (BOLD - Effekt = Blood - Oxygenation - Level - Dependent - Effekt) um 30 -40 % abnimmt [32]. Das resultierende Sauerstoffdefizit ist ein Schlüsselereignis, das die weitere Progression bestimmt. Der gesamte Hirnstoffwechsel kann nunmehr seine Energie (ATP) nicht mehr über die oxidative Phosphorylierung, sondern nur noch über die anaerobe Glykolyse bereitstellen [29] - [31]. Durch die anaerobe Glykolyse entsteht durch fehlenden Sauerstoff aus 1 Mol Glukose, 2 Mol Laktat [36]. Die distalen Hirnareale zur Okklusion verarmen an Glukose und Sauerstoff [37]. Des Weiteren resultiert aus dieser Art der ATP-Regeneration auch eine Azidose, da pro Mol Laktat auch immer 1 Mol Protonen freigesetzt wird, die den pH-Wert im Gehirn auf bis zu 6,2 sinken lassen [29], [30]. Ab diesem Punkt der Pathogenese sind sich Forscher nicht mehr einig über die zeitlich ablaufenden Prozesse [38]. Durch die Azidose öffnen sich präsynaptische ASIC - 1a Kanäle (*acid - sensing - ion - channels - 1a*) in hippocampalen Neuronen von Mäusen, die die cytosolische Calciumkonzentration ( $[Ca]^{2+}_{cyt}$ ) ansteigen lassen. Bei Mäusen, die ASIC - 1a defizient sind, zeigt sich kein Anstieg an  $[Ca]^{2+}_{cyt}$  [39]. Es gibt aber noch weitere Pathomechanismen, die einen Anstieg an cytosolischem Calcium bedingen. Zum einen sind hier die *transient – receptor – potential - channels* (TRPM) vom Subtyp 2 und 7 zu nennen und zum anderen die NMDA / AMPA und Kainat-Rezeptoren [36], [37]. Aber auch der Transport von cytosolischem Calcium aus der Zelle ist bei zerebraler Ischämie beeinträchtigt. Hier spielt vor allem die Beeinträchtigung der Plasmamembran  $Ca^{2+}$  ATP-ase (PMCA) und des Natrium-Calcium-Austauschers (NCX) eine tragende Rolle. Beide Transporter sind an der Calcium-Homöostase in Neuronen beteiligt [42]. Unter physiologischen Bedingungen arbeitet der NCX so, dass er drei Natrium-Ionen aus der Zelle schleust und dafür 1 Calcium-Ion im Austausch in die Zelle transportiert [42]. Dieser Transporter ist bidirektional und kann im sogenannten Calcium-Eintrittsmodus Calcium-Ionen in die Zelle bzw. im Calcium-Austrittsmodus Calcium aus der Zelle transportieren [43]. Es gibt Forschungsgruppen, die dem NCX eine neuroprotektive Wirkung zusprechen und andere die im NCX die treibende Kraft für den neuronalen Zelltod sehen [43]. Wichtig zu erwähnen ist, dass die Plasmamembrantransporter für Calcium-Ionen eine tragende Rolle bei der Regulierung von Calcium spielen und somit einen großen Beitrag an der Pathophysiologie des Schlaganfalles haben.

In **Abb. 4** wird die Beteiligung der wichtigsten Transporter und Kanäle außer dem *ASIC - 1a* veranschaulicht.



**Abb. 4** Transporter und Kanäle, die an der Erhöhung des cytosolischen Calciums ( $[Ca^{2+}]_{cyt.}$ ) beteiligt sind. Modifiziert nach Szydlowska et al. 2010 [43]. NCX = Natrium - Calcium - Austauscher, PMCA = Plasmamembran - Calcium - ATPase, TRPM - 2 / 7 = transiente - Rezeptor - Potential Kationen - Kanäle Typ 2 + 7.

Mit den beschriebenen Mechanismen, wird zum einen der Calcium-Einstrom erhöht und der Calcium-Transport aus der Zelle verhindert. Beide Mechanismen führen so zu einer Erhöhung des cytosolischen Calciums.

Neben der Erhöhung des cytosolischen Calciums durch Transporter und Kanäle, gibt es die zweite wichtige und sehr gut erforschte Komponente der Exzitotoxizität [43]. Olney et al. hat diesen Begriff 1969 geprägt. Er beschreibt die neuronale Toxizität aufgrund einer exzessiven Aktivierung von ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren [44]. Dieser Mechanismus stellt einer der Hauptmechanismen für den neuronalen Verlust von Neuronen bei andauernder zerebraler Ischämie dar [44]. Durch eine vermehrte Aktivierung von AMPA -, NMDA - und Kainatrezeptoren durch Glutamat kommt es zu einem erhöhtem Natrium - und Calciumeinstrom in die Zelle [45]. Calcium kann Proteasen (z. Bsp. Calpaine) aktivieren [46], fördert den oxidativen Stress [47] und kann selbst Zellschwellung und Zerstörung der Plasmamembran bedingen [46].

Die sogenannte Glutamatexzitotoxizität ist ein wichtiger Kernpunkt in der pathogenetischen Betrachtung des ischämischen Schlaganfalls. Allerdings haben viele Humanstudien mit NMDA Rezeptorantagonisten (Selfotel, Memantin) ihre Wirksamkeit in Bezug auf die Unterdrückung der Glutamatexzitotoxizität nicht belegen können [48].

## 1.3 Therapie des akuten ischämischen Schlaganfalls

Die Therapie des akuten ischämischen Schlaganfalls soll anhand der bestehenden Leitlinien, die in Deutschland verbindlich sind, erläutert werden. Diese Leitlinien entstehen in Kooperation zwischen der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN), der Deutschen Schlaganfall-Gesellschaft (DSG) und der Deutschen Gesellschaft für Neuroradiologie (DGNR) [39], [40]. Durch eine Vielzahl an neuen Publikationen im Jahr 2015 bezüglich der medikamentösen Thrombolysen mit rekombinanten-Gewebe - Plasminogen - Aktivatoren (kurz: rtPa) und der mechanischen Thrombektomie, wurde 2016 ein Ergänzungstext von der DGN veröffentlicht, der die bestehende Leitlinie „Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls“ ergänzt [51].

Die akute Behandlung von Schlaganfallpatienten basiert auf 5 unterschiedlichen Prinzipien [49]. Dazu gehören:

- Allgemeine Behandlung/Basistherapie
- Spezifische Behandlung, z.B. rekanalisierende Therapie
- Frühe Sekundärprophylaxe
- Erkennung, Vorbeugung und Behandlung von Komplikationen
- Frühe rehabilitative Therapien

Die allgemeine Behandlung / Basistherapie umfasst den Erhalt der Vitalfunktion, sowie die ständige Kontrolle des neurologischen Status. Die Vitalparameter Atem - und Herzfrequenz, Sauerstoffsättigung, Blutdruck und Körpertemperatur werden an dieser Stelle nicht ausführlich besprochen, sind aber in den Publikationen [39], [41] – [44] beschrieben.

In den Leitlinien der DGN hat sich in Bezug auf die Thrombolysen / Thrombektomie zwischen den Jahren 2000 - 2013 ein Paradigmenwechsel vollzogen. Grund dieses Paradigmenwechsels in der Therapie ist das gute Abschneiden von mechanischen Verfahren in der Behandlung der proximal intrakraniellen Gefäße von Schlaganfallpatienten und die Verbesserung der bestehenden medikamentösen Thrombolytika.

Zu Beginn der Thrombolysetherapie [55] wurden für das rtPa Alteplase (Actilyse®) ein Zeitfenster von 3 h nach Beginn der Symptome von der europäischen Zulassungsstelle genehmigt. Nachdem Hacke et al. 2008 das Zeitfenster zwischen 3,0 und 6,0 Stunden für ihre Studie (ECASS - III) gesetzt hatten und auch hier einen signifikant besseren neurologischen Status der Patienten erreichen konnten, wurde die Empfehlung der DGN im November 2010 auf 4,5 h erweitert. Andere Vertreter der rtPa's, wie Tenecteplase (Metalyse®) oder Reteplase (Raptilysin®) sollen nach Empfehlung der DGN nur für Studienzwecke benutzt werden [49]. Die Indikation zur Lysetherapie besitzt in Deutschland nur Alteplase [56].

Nahezu zeitgleich wurde von Rha et al. 2007 die Rekanalisation mit mechanischen Verfahren der medikamentösen Thrombolysetherapie gegenübergestellt. Die Thrombektomietherapie kommt nur in Frage, wenn proximal intrakranielle Arterienverschlüsse vorliegen (Arteria Carotis, Arteria Cerebri, Arteria Vertebralis, Arteria Basillaris). Die Rekanalisationsrate war in dieser Studie der medikamentösen Therapie signifikant überlegen, allerdings nicht die Gesamtmortalität [55]. Folgestudien (EXTEND - 1A und ESCAPE), mit einheitlichen Werkzeugen (*Stent - Retrievern*)

erbrachten dann auch das Ergebnis der Überlegenheit von mechanischen Rekanalisationstechniken gegenüber bestehenden medikamentösen Interventionen [46], [47].

Abschließend ist zu erwähnen, dass nahezu alle Patienten (85 %), die an den Studien teilgenommen haben, vorher mit rtPa behandelt wurden und die alleinige Überlegenheit von mechanischen Verfahren gegenüber medikamentösen Lyseverfahren mit rtPa somit nicht untersucht worden ist [59].

Nach erlittenem Schlaganfall oder einer transitorisch ischämischen Attacke (TIA) muss eine Sekundärprophylaxe erfolgen [12], [14]; [60]; [61]. Die aktuell geltende Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V (AWMF) aus dem Jahr 2015 beschreibt vier Säulen der Sekundärprophylaxe [60].

- Thrombozytenaggregationshemmer
- Lipidsenker
- Orale Antikoagulantien bei Vorhofflimmern
- Arterielle Hypertonie

Die Hemmung der Thrombozytenaggregation soll mit Acetylsalicylsäure (ASS) erfolgen [62]. Zusätzlich sollte Dipyridamol oder Clopidogrel verabreicht werden [63]. Die unterschiedlichen Kombinationen mit ASS sind im Vergleich nicht besser oder schlechter (Evidenzgrad: B) [64]. Zur Prophylaxe müssen Dosierungen von 100 mg ASS, 75 mg Clopidogrel und 200 mg Dipyridamol verabreicht werden [64]. Im Falle eines Ulkuseidens können Protonenpumpeninhibitoren (PPI's) zusätzlich gegeben werden.

Im Falle von Hyperlipidämien sollte ein Statin verabreicht werden (Simvastatin, Atorvastatin, Pravastatin) und solange eskalierend therapiert werden, bis der Zielwert < 100 mg/dl LDL Cholesterin erreicht [65] - [66]. Andere Präparate, wie Nikotinsäurederivate, Fibrate oder Ezetimib dürfen nicht routinemäßig eingesetzt werden, sondern nur nach kritischer Prüfung der Indikation verabreicht werden [65], [67], [68].

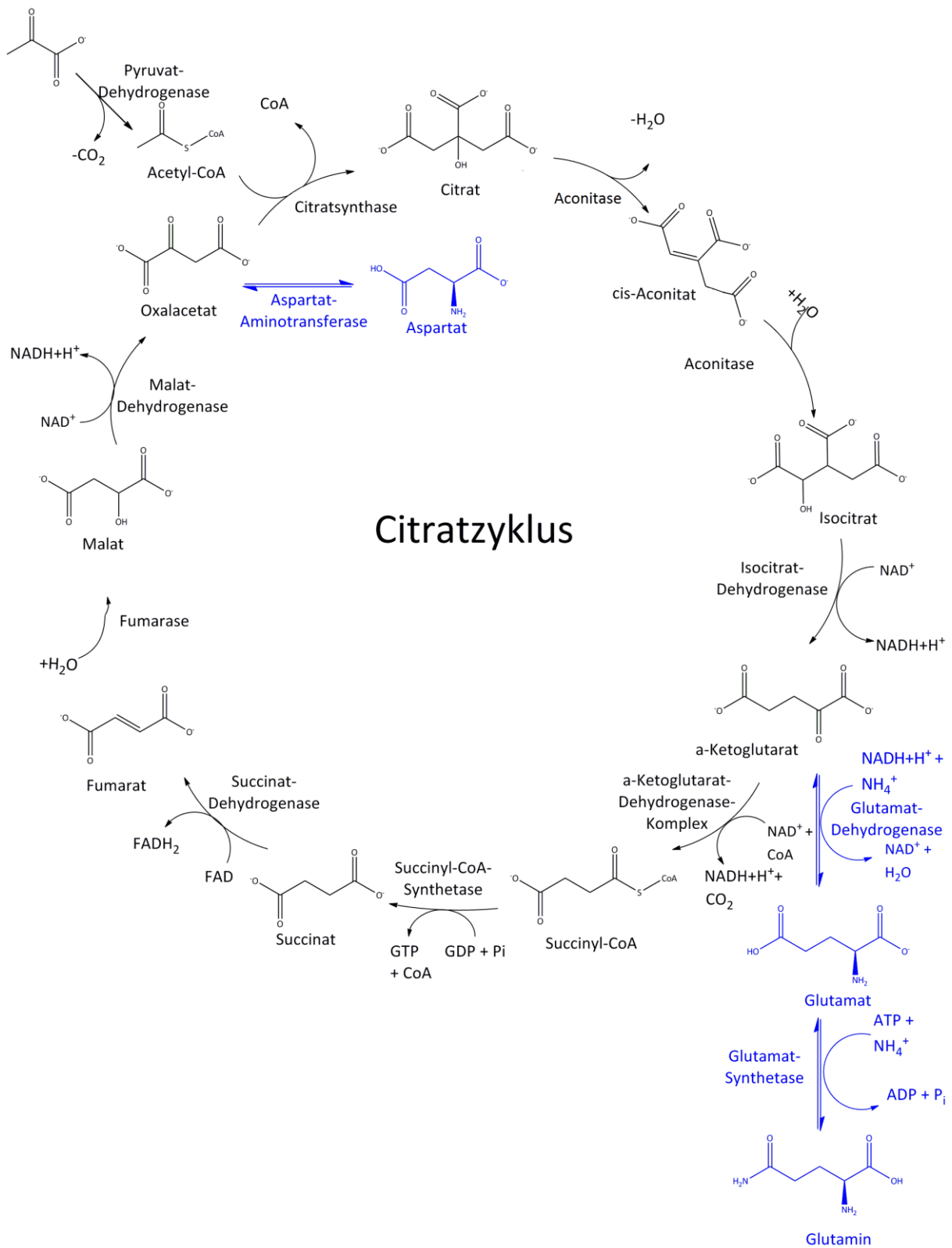
Die Gruppe der neuen oralen Antikoagulantien (NOAK's) sind auch in der Sekundärprophylaxe implementiert [60]. Sie weisen gegenüber den Coumarinen ein besseres Nutzen-Risiko Verhältnis auf. Im Falle von Vorhofflimmern, wird diese Gruppe, bestehend aus Rivaroxaban, Dabigatran und Apixaban, empfohlen [69] - [71]. Die Nierenfunktion sollte einmal jährlich unter der Therapie untersucht werden.

Die letzte Säule der Sekundärprophylaxe stellt die Behandlung der arteriellen Hypertonie dar. Empfohlen werden ACE-Hemmer oder Angiotensin-Rezeptorantagonisten in Kombination mit einem Diuretikum, definitiv aber keine  $\beta$ -Blocker [62] - [64].

## 1.4 Der Citratzyklus

Der Forscher Hans Adolf Krebs und sein Kollege William Arthur Johnson postulierten 1937 den Citratzyklus als gemeinsamen Stoffwechselweg für Kohlenhydrate [73]. Sie entdeckten, dass die Konzentrationen von Citrat in der Brustmuskulatur von Tauben nur geringen Schwankungen unterlegen waren und folgerte daraus die immer wiederkehrende Bildung von Citrat aus Oxalacetat [73]. Nach dieser Erkenntnis wurden die gesamten Intermediate des Citratzyklus mit den jeweiligen Enzymen in den darauffolgenden Dekaden erschlossen.

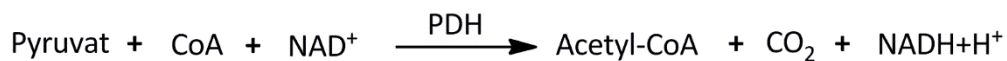
Der Citratzyklus beschreibt einen Stoffwechselweg, in dem Reduktionsäquivalente in Form von NADH + H<sup>+</sup> bzw. FADH<sub>2</sub> regeneriert werden. Kohlenhydrate, Proteine und Fette, sofern sie in Acetyl - CoA oder in ein Zwischenprodukt des Citratzyklus umgewandelt werden können, sind in der Lage, zu der aeroben Energiegewinnung einen Beitrag zu leisten. Die aufeinanderfolgenden Reaktionen des Citratzyklus finden alle in der mitochondrialen Matrix der Zelle statt. Das bei der Glykolyse gebildete Pyruvat muss erst aus dem Cytosol in die Mitochondrien gelangen, wird dort aber sehr schnell zu Acetyl - CoA oxidativ decarboxyliert. Die Enzyme der  $\beta$  - Oxidation hingegen befinden sich an der inneren Mitochondrienmembran und können so das am Ende entstehende Acetyl - CoA direkt in den Citratzyklus einspeisen [36]. Im Folgenden wird nicht auf die Einzelreaktionen des Citratzyklus eingegangen, sondern auf die Regulierung der wichtigsten Enzyme und somit die Regulierung der Einspeisung von Substraten in den Citratzyklus. In **Abb. 5** sind die Reaktionen sowie die auffüllenden (anaplerotischen) und abzweigenden (kataplerotischen) Reaktionen graphisch dargestellt.



**Abb. 5 Citratzyklus mit den wichtigsten anaplerotischen und kataplerotischen Reaktionen. Anaplerotische und kataplerotische Reaktionen sind blau hinterlegt.**

## 1.5 Die Pyruvatdehydrogenase

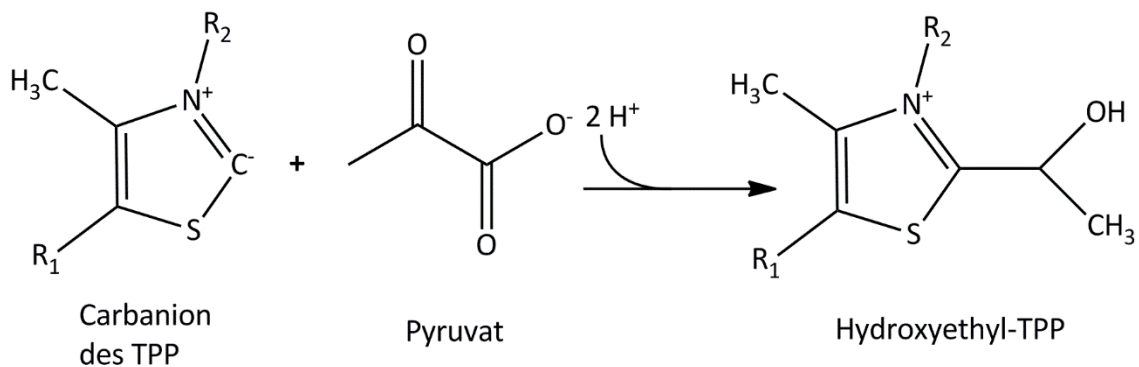
Bevor die hohe Komplexität der *Pyruvatdehydrogenase* (PDH) erklärt wird, soll auf die zentrale Stellung der PDH innerhalb der Energieregulation der Zelle aufmerksam gemacht werden. Die *Pyruvatdehydrogenase* entspricht einem Multienzymkomplex, der aus drei Enzymen und 5 Coenzymen aufgebaut ist [74]. Dieser Enzymkomplex stellt die wesentliche Verbindung von der Glykolyse zum Citratzyklus her. Eukaryonten können aus Acetyl - CoA keine Glukose generieren, da die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl - CoA durch die PDH irreversibel ist [36]. Die Reaktion ist auf den ersten Blick nicht sonderlich komplex, da sie einer einfachen Decarboxylierung entspricht (s. **Abb. 6**)



**Abb. 6** Das Reaktionsschema der *Pyruvatdehydrogenase* (PDH).

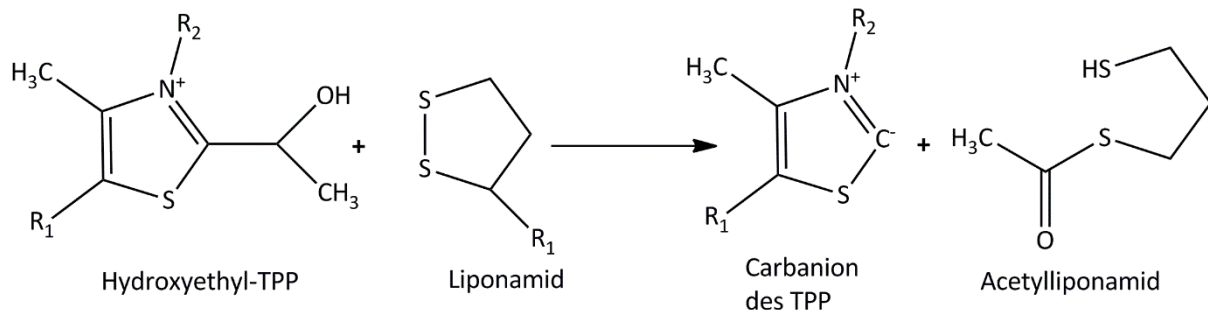
Die Umsetzung dieser Reaktion basiert auf drei gekoppelten Reaktionen, einer Decarboxylierung, einer Oxidation und abschließend die Übertragung auf Acetyl - CoA. Der PDH-Komplex ist aus drei Enzymen aufgebaut, aus einer *Transacetylase* ( $E_2$ ), der *Pyruvatdehydrogenase* Einheit ( $E_1$ ) und der *Dihydrolipoyldehydrogenase* ( $E_3$ ). Diesen drei Enzymen sind fünf Coenzyme bei der Umsetzung behilflich, Thiaminpyrophosphat (TPP), Liponsäure und FAD ( $\triangleq$  katalytische Coenzyme), sowie CoA und  $\text{NAD}^+$ , die als stöchiometrische Co - Substrate dienen [36].

Im ersten Schritt wird die Decarboxylierung von Pyruvat durch die *Pyruvatdehydrogenase*-Komponente ( $E_1$ ) katalysiert. Hierzu muss Pyruvat an TPP gebunden vorliegen.



**Abb. 7** Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl - CoA durch die *Pyruvat - Dehydrogenase - Komponente* ( $E_1$ )

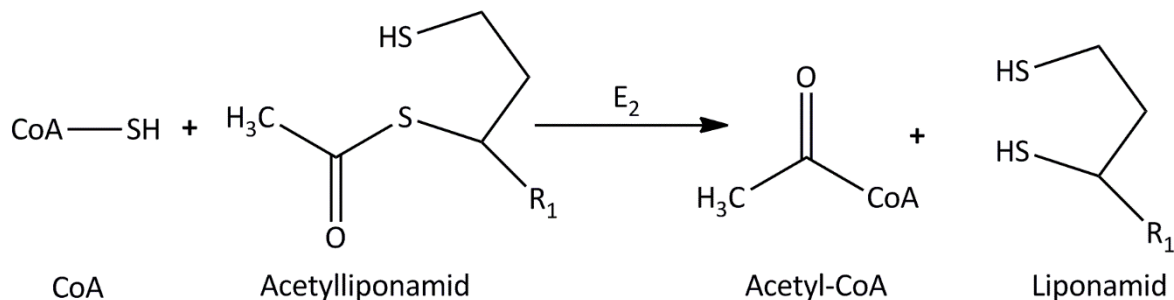
Im zweiten Schritt wird die Oxidation der OH - Gruppe des Hydroxyethyl - TPP vollzogen. Hierbei wird Liponamid als prosthetische Gruppe benutzt, wobei die Umsetzung hier durch die PDH - Komponente  $E_1$  katalysiert wird.



**Abb. 8 Oxidation der OH - Gruppe des Hydroxy - TPP und nachfolgende Konjugation mit Liponamid**

In diesem Oxidationsschritt dient die Disulfidbrücke sowohl als Oxidationsmittel und der Folgereaktion auch als Konjugationspartner.

Der letzte Schritt bei der Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl - CoA, ist die Transferierung der Acetyl-Gruppe von Liponamid auf Coenzym A. Diese Reaktion wird durch die *Dihydrolipoyltransacetylase* ( $E_2$ ) katalysiert.



**Abb. 9 Transferierung der Acetylgruppe von Liponamid auf Coenzym A durch die Dihydrolipoyl-Transacetylase ( $E_2$ )**

Nach diesem Schritt ist die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl - CoA vollzogen. Allerdings kann ein weiterer Zyklus der PDH nur erneut beginnen, wenn die Sulhydrylgruppen des Liponamid wieder in ihre reduzierte Form überführt werden. Hierzu wird  $FAD^+$  als Reduktionsäquivalent benutzt [36]. Das katalysierende Enzym bei dieser Reaktion ist die *Dihydrolipoyldehydrogenase* ( $E_3$ ). Diese Umsetzungsreaktionen laufen alle an dem PDH Enzymkomplex ab. Dieser Komplex ist an der mitochondrialen Matrix lokalisiert.

### 1.5.1 Regulation der Pyruvat-Dehydrogenase

Wie bereits in **Kap. 1.5 Die Pyruvatdehydrogenase** beschrieben, hat die PDH eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Energiestatus der Zelle. Die PDH kann sowohl allosterisch als auch durch reversible Phosphorylierung reguliert werden [75]. Diese zwei grundlegenden Mechanismen der Regulation werden im Folgenden näher erläutert.

Hohe Konzentrationen von Acetyl - CoA hemmen die Transacetylase-Komponente ( $E_2$ ), indem Acetyl - CoA bindet, aber nicht umgesetzt wird [74]. An dieser Stelle soll auf die  $\beta$  - Oxidation in **Kap. 1.8.1.3 Die  $\beta$  - Oxidation** verwiesen werden, da das Produkt dieses Stoffwechselweges auch Acetyl - CoA ist, was ebenfalls in den Citratzyklus eingeschleust werden kann. Wenn die Konzentrationen von Acetyl - CoA durch die  $\beta$  - Oxidation ansteigen, wird die PDH - Aktivität ebenfalls gesenkt.



Ein anderer allosterischer Mechanismus betrifft die Hemmung durch  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Wenn hohe Konzentrationen an  $\text{NADH} + \text{H}^+$  generiert werden, bindet  $\text{NADH} + \text{H}^+$  an die *Dihydrolipoyl-dehydrogenase* ( $\text{E}_3$ ) und bedingt mit der Bindung, dass die Regenerierung der Sulfhydrylgruppen zur Disulfideinheit unterbleibt. Somit kann ein weiterer Zyklus der PDH nicht vollzogen werden [36].

Da die PDH als Energiesensor in der Zelle betrachtet werden kann (neben der *AMP-Kinase*), erscheint es nicht verwunderlich, wenn die PDH durch Acetyl-CoA,  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und auch durch ATP gehemmt werden kann [76].

Ein anderer Mechanismus für die Regulation ist die reversible Phosphorylierung durch *Phosphatasen* und *Kinasen* [77]. Die *PDH-Kinase* inaktiviert die Katalyseaktivität durch Phosphorylierung an Serinresten der PDH  $\text{E}_1$  Komponente. Die Dephosphorylierung der genannten Serinreste wird durch die *PDH-Phosphatase* katalysiert, was die Reaktivierung der  $\text{E}_1$  Komponente der PDH zur Folge hat [76].

Sowohl die *PDH-Kinase*, als auch die *PDH-Phosphatase* werden selbst stark durch Intermediate/Endprodukte des Energiestoffwechsels reguliert. Die *PDH-Phosphatase* wird durch AMP, Phosphoenolpyruvat und Insulin aktiviert, wobei  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , ATP und Acetyl-CoA die Aktivität senken [78] - [81]. Der Gegenspieler, die *PDH-Kinase* wird durch ATP,  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und Acetyl-CoA aktiviert, wobei ADP,  $\text{NAD}^+$ , CoA und Pyruvat die *PDH-Kinase* inhibieren [78], [79], [83].

## 1.6 Die oxidative Phosphorylierung

Die oxidative Phosphorylierung ist der entscheidende Stoffwechselweg, der den enormen Bedarf an ATP, durch die Regenerierung von ADP zu ATP, bereitstellt [36]. Das Prinzip der oxidativen Phosphorylierung ist der Aufbau eines Protonengradienten entlang der inneren Mitochondrienmembran. Die Energie, die aufgrund des Gradienten generiert wird, wird dazu benutzt, die *ATP-Synthase* (Komplex - V) zu betreiben [82].

Die Reduktionsäquivalente  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$  werden in der Glykolyse, der Fettsäureoxidation und dem Citratzyklus aus Kohlenstoffverbindungen regeneriert und stellen die Verbindungen in Eukaryonten dar, die ein hohes Elektronenübertragungspotential besitzen [83]. Diese leicht zu übertragenden Elektronen dienen in der Atmungskette dazu, reinen Sauerstoff zu Wasser zu reduzieren [1], [15]. Dieser gesamte Prozess inklusive der oxidativen Phosphorylierung wird als Zellatmung oder Respiration bezeichnet.

Die Atmungskette wird durch drei Protonenpumpen und die *Succinat - Q - Reduktase* (Komplex - II) gebildet. Die drei Protonenpumpen werden

- *NADH - Coenzym - Q - Oxidoreduktase* (Komplex - I)
- *Cytochrom - c - Reduktase* (Komplex - III)
- *Cytochrom - c - Oxidase* (Komplex - IV)

genannt und im Folgenden mit ihren Kurznamen beschrieben. Die Komplexe - I, III und IV sind Protonenpumpen, die bei der Elektronenübertragung von Komplex zu Komplex Protonen vom Matrixraum in den Intermembranraum pumpen. Der Komplex - II stellt eine unmittelbare Verbindung zum Citratzyklus her, da sie die *Succinat - Dehydrogenase* enthält, die  $\text{FADH}_2$  im Rahmen des Citratzyklus bildet und direkt die im  $\text{FADH}_2$  enthaltenen Elektronen auf Komplex - III überträgt.

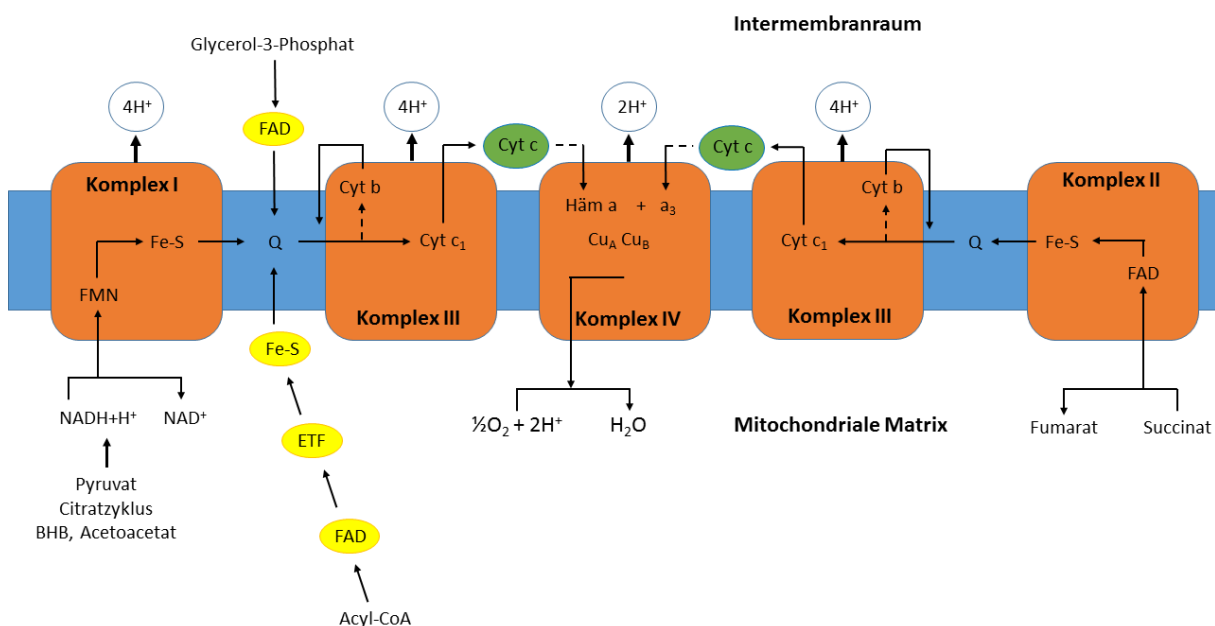


Abb. 10 Die Atmungskette mit den beteiligten Komplexen und den Einspeisungswegen des Stoffwechsels. Q = Ubichinon; FMN = Flavinhaltige Nukleotide; FAD = Flavin – Adenin – Dinukleotid;

**Fe-S = Eisen-Schwefel - Proteine; Cyt c = Cytochrom c; ETF = Elektronentransferierendes Flavoprotein**

Der so generierte Protonengradient entlang der inneren Mitochondrienmembran kann die *ATP - Synthase* (Komplex - V) durch Zurückdiffundieren der Protonen in die mitochondriale Matrix betreiben und so die Regenerierung von ATP durch ADP vollziehen.

### 1.6.1 Die Hemmstoffe und Entkoppler der Atmungskette

Die Hemmstoffe der Atmungskette bedingen alle einen geringeren Sauerstoffverbrauch durch kompetitive Hemmung an den jeweiligen Bindungsstellen. Sie zerstören aber nicht den Protonengradienten, wie es die Entkoppler der Atmungskette bedingen. Im Folgenden werden die Hemmstoffe und Entkoppler der Atmungskette mit ihrer Wirkung und ihren Eigenschaften auf die Atmungskette in tabellarischer Form dargestellt (s. **Tab. 2; Tab. 3**).

| Hemmstoffe                | Komplexhemmung                             | Eigenschaften  |
|---------------------------|--|--|
| Rotenon                   | Komplex - I<br>NADH - Oxidase              | Die OxPhos funktioniert weiter → Grund: FADH <sub>2</sub> kann über Komplex - II Elektronen liefern  |
| Malonat                   | Komplex - II<br>Succinat - Dehydrogenase   | Die OxPhos funktioniert weiter, aber FADH <sub>2</sub> kann nicht mehr über Komplex - II Elektronen liefern, NADH+H <sup>+</sup> ist Hauptdonor für Elektronen |
| Antimycin A               | Komplex - III<br>Cytochrom - c - Reduktase | Unterbindet den Elektronentransfer von Cytochrom b auf Cytochrom c1  |
| Azid, CO, CN <sup>-</sup> | Komplex - IV<br>Cytochrom - c - Oxidase    | Binden an die Sauerstoffbindungsstelle des Komplexes → Atmungskette kommt zum Stillstand   |
| Oligomycin                | Komplex - V<br>ATP - Synthase              | Elektronengradient wird langsamer degradiert → Sauerstoffverbrauch sinkt   |

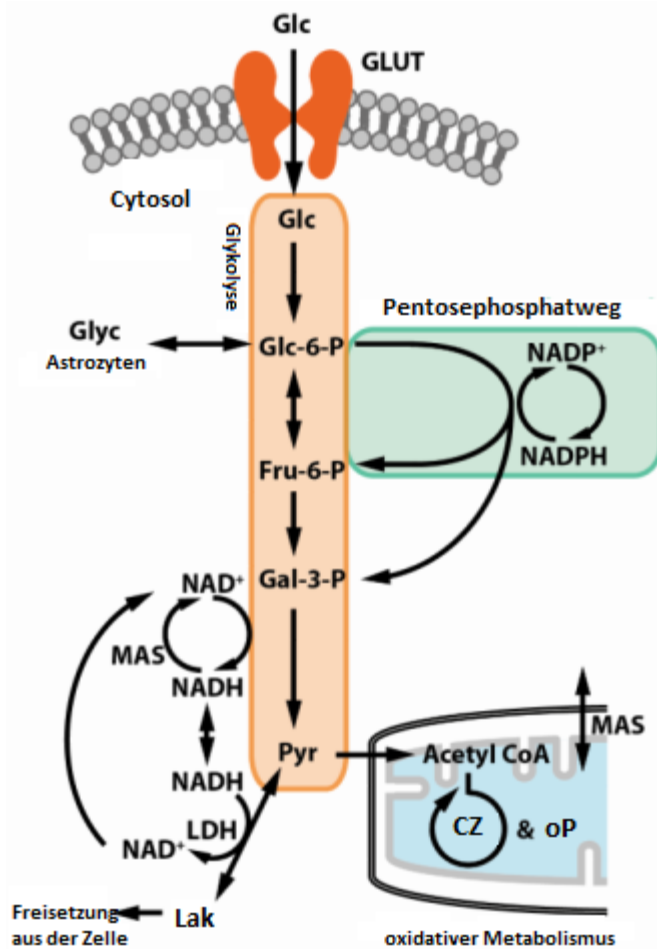
**Tab. 2 Hemmstoffe der Atmungskette [85], [86]**

| Entkoppler  | Wirkung      | Eigenschaften  |
|---|--------------|--|
| CCCP $\triangleq$<br>Carbonylcyanid - m -<br>chlorphenylhydrazon            | Protonophore | Beide Substanzen bedingen<br>das Zusammenbrechen des<br>Protonengradienten $\rightarrow$<br>Dadurch keinerlei ATP-<br>Synthese mehr möglich. Die<br>Einzelkomplexe<br>funktionieren aber weiter! |
| FCCP $\triangleq$<br>Carbonylcyanid - p -<br>trifluoromethoxyphenylhydrazon |              |  |

*Tab. 3 Entkoppler der Atmungskette [84]*

## 1.7 Energiestoffwechsel des Gehirns unter physiologischen Bedingungen

Die Hauptenergiequelle zur Generierung von Adenosintriphosphat (ATP) des Gehirns ist Glukose [36]. Neuronen haben im Vergleich zu allen anderen Geweben im menschlichen Körper den höchsten Energiebedarf mit 5,6 mg Glukose pro 100 g Hirngewebe in der Stunde [56], [57]. Die generierte Energie in Form von ATP wird für die Aufrechterhaltung bzw. die Wiederherstellung des neuronalen Ionengradienten, die Synthese von Neurotransmittern und die physiologische Hirnfunktion benötigt bzw. verbraucht [88]. Der menschliche Cortex benötigt ungefähr  $3 \times 10^{23}$  ATP / s / kg. Die präsynaptische Vesikelschmelzung benötigt ungefähr  $1,64 \times 10^5$  Moleküle ATP / s / kg [89]. Beide Beispiele zeigen, dass die generierte Energie in Form von ATP hauptsächlich für die neuronale Aktivität verbraucht wird. Wenn die Aktivität des Gehirns zunimmt, nimmt auch parallel die Glukoseutilisation der Zellen zu [90]. Das Gehirn ist dabei auf die peripheren Gewebe für die Versorgung mit Glukose angewiesen, obwohl Astrozyten selbst Glykogenspeicher besitzen, die die neuronale Aktivität für 10 min. aufrechterhalten können [91]. Dieser Glykogenspeicher kann als Reservespeicher für kurzfristige Energiedefizite angesehen werden und stellt nicht die Hauptversorgung des Gehirns mit Glukose dar [88]. Wenn die astrozytären Glykogenspeicher im Gehirn nicht für die Versorgung ausreichen, muss Glukose also extrazerebral bereitgestellt und ins Gehirn gelangen. Der Transport von Glukose über die Blut - Hirn - Schranke (BHS) erfolgt durch den Glukosetransporter GLUT - 1 [36]. Der Glukosetransporter vom Typ 1 ist ein Uniporter mit einer Michaeliskonstanten ( $K_m$ ) von 1,5 mM [92]. Im Blutplasma eines gesunden Menschen liegen Konzentrationen von 3,3 – 6,1 mmol/l vor, d.h. der GLUT - 1 Transporter ist bei physiologischen Blutzuckerwerten immer gesättigt und der Transport ins Gehirn erfolgt auf Basis des Gradienten zwischen Blutplasma und Extrazellularraum des Gehirns [93]. Wenn Glukose im Extrazellularraum aufgenommen worden ist, wird die Glukose in Astrozyten, Oligodendrozyten und Microgliazellen von GLUT - 1 Transportern aufgenommen, in Neuronen von GLUT - 3 Transportern [94]. Die Besonderheit von GLUT - 3 Transportern ist im Vergleich zu GLUT - 1 Transportern die höhere Transportrate, was den höheren Energiebedarf von Neuronen beschreibt [94]. In der Zelle wird die Glukose direkt von der *Hexokinase - 1* zu Glukose - 6 - Phosphat phosphoryliert, was einem Ionenfallenprinzip gleicht, da die negativ geladene Glukose weder aus der Zelle diffundieren kann, noch durch den GLUT - 1 bzw. 3 rücktransportiert werden kann [95]. Glukose - 6 - Phosphat hat außerdem die Funktion durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus die *Hexokinase - 1* zu hemmen und so den Energiebedarf der Zelle zu regulieren [95]. Falls die Zelle ausreichend Energie in Form von ATP zur Verfügung hat, kann Glukose - 6 - Phosphat auch als Substrat für den Glykogenaufbau verwendet werden [96]. Glykogen stellt im Gehirn die einzige Energiereserve dar, die nur von Astrozyten gebildet werden kann [91]. Umgekehrt kann im Falle eines massiven steigenden Energiebedarfs (oder im Falle eines Krampfanfalls) Glukose - 6 - Phosphat vermehrt abgebaut werden, was die *Hexokinaseaktivität* um den Faktor 4 – 6 steigert ( $K_m$  *HK - 1* für G - 6 - P = 0,02 mM), da die negative Rückkopplung aufgrund der fehlenden (bereits metabolisierten) Glukose - 6 - Phosphat ausbleibt [67], [68]. Die dritte Möglichkeit in der Glukose - 6 - Phosphat metabolisiert werden kann, ist der Pentosephosphatweg, in dem Reduktionsäquivalente in Form von NADPH gebildet werden können [83]. Im Falle der Glykolyse wird Glukose - 6 - Phosphat zu Pyruvat durch die Enzyme der Glykolyse abgebaut [99]. Die Möglichkeiten der Metabolisierung von Glukose nach Aufnahme der Glukose werden in **Abb. 11** dargestellt.



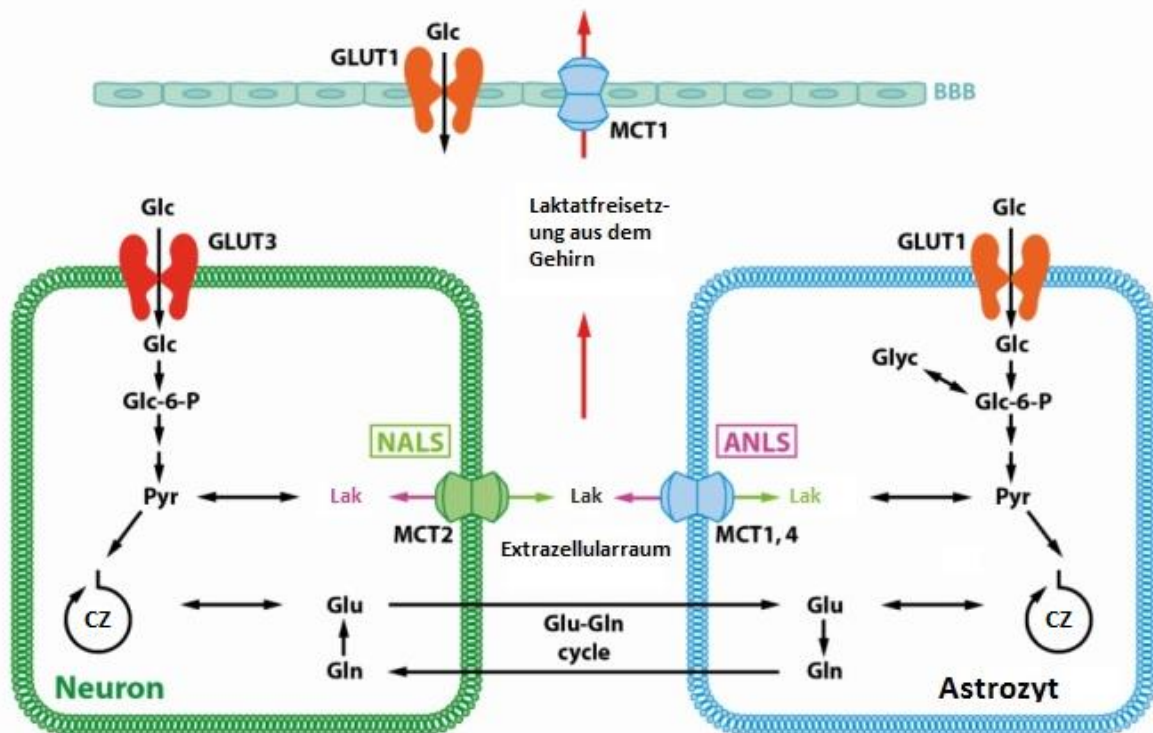
**Abb. 11** Glukoseaufnahme in die Zelle und weitere Möglichkeiten der Metabolisierung. Modifiziert nach Mergenthaler et al. 2013 [88]. MAS = Malat-Aspartat-Shuttle; LDH = Laktat-Dehydrogenase; CZ = Citratzyklus; oP = oxidative Phosphorylierung; GLUT = Glukosetransporter; Glc = Glukose

Nachdem die Glukose zu Pyruvat abgebaut worden ist, kann Pyruvat in die mitochondriale Matrix geschleust und zu Acetyl - CoA abgebaut werden. Das gebildete Acetyl - CoA kann durch den Krebs-Zyklus für die Regeneration von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  genutzt werden oder durch die *Laktatdehydrogenase* zu Laktat weiter umgesetzt werden [83].

### 1.7.1 Das Astrozyten - Neuronen - Laktat - Shuttle

Lange Jahre ging man davon aus, dass Laktat ein reines Stoffwechselabbauprodukt ist [100]. Im Jahre 1994 veröffentlichten Pellerin und Magistretti die Hypothese des Astrozyten - Neuronen - Laktat - Shuttle (ANLS). Basis dieser Hypothese ist die Tatsache, dass glutamaterge Neurotransmission bei erhöhtem Energiebedarf Astrozyten aktiviert. Astrozyten sind die einzigen Zellen im Gehirn, die Glykogen als Energiereserve aufbauen können bzw. Glykogen zu Glukose abbauen können [96]. Nach erfolgter Glykolyse wird in Astrozyten vermehrt Laktat gebildet, da die überwiegende Energie in Astrozyten glykolytisch gewonnen wird [89]. Das gebildete Laktat wird dann über Monocarboxylattransporter vom Typ 1 und 4 (MCT - 1 / 4) in den Extrazellularraum abgegeben und von umliegenden Neuronen über MCT - 2 aufgenommen (s. **Abb. 12**). Neuronal wird das

aufgenommene Laktat zu Pyruvat oxidiert, wobei ein Äquivalent  $\text{NADH} + \text{H}^+$  regeneriert wird. Das gebildete Pyruvat kann in Mitochondrien zu Acetyl - CoA abgebaut werden, um über den Krebs-Zyklus und die Atmungskette weitere  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und ATP zu bilden [101].



**Abb. 12 Astrozyten - Neuronen - Laktat - Shuttle (ANLS) und Neuronen - Astrozyten - Laktat - Shuttle (NALS).** Modifiziert nach Mergenthaler et al. 2013 [88]. MCT 1, 2, 4 = Monocarboxylattransporter-1, 2, 4; GLUT 1, 3 = Glukosetransporter 1, 3; Glc = Glukose; NALS = Neuronen - Astrozyten - Laktat - Shuttle; ANLS = Astrozyten - Neuronen - Laktat - Shuttle; Glu = Glutamat; Gln = Glutamin.

Im Widerspruch steht das ANLS aufgrund der Tatsache, dass Glutamat selbst in Astrozytenkulturen (hippokampale Schnitte aus Ratten) nicht in der Lage ist, die Glykolyse zu aktivieren [102]. Ein weiteres Problem ist der fehlende Nachweis des Ursprungs von Laktat *in vivo* [103]. Abschließend ist anzumerken, dass die Präferenz des Gehirns für die verwendeten Energiesubstrate die Reihenfolge Glukose - Ketonkörper - Laktat einnimmt und nur bei stark erhöhter neuronaler Aktivität Laktat in Neuronen als Energiesubstrat benutzt werden kann.

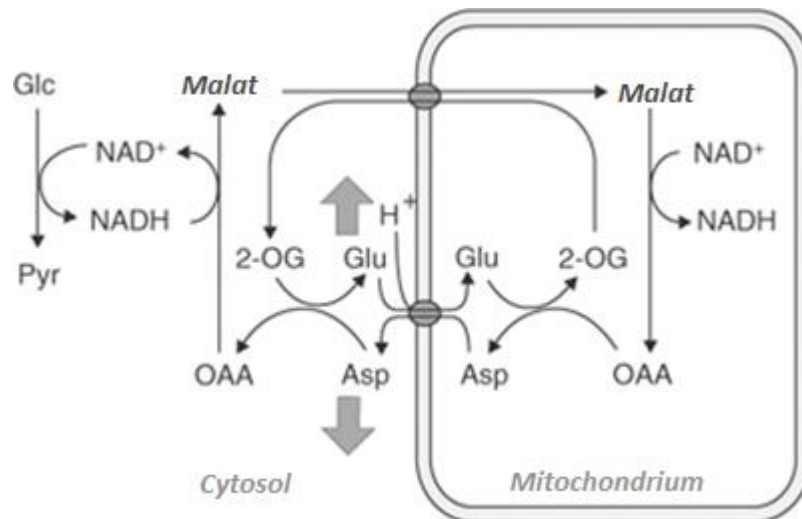
### 1.7.2 Der Glutamin - Glutamat - GABA Zyklus

Um die wechselnden Energieanforderungen von Neuronen und Astrozyten und die Synthese der Neurotransmitter Glutamat und GABA zu gewährleisten, gibt es neben dem ANLS bzw. NALS den sogenannten Glutamin - Glutamat - GABA - Zyklus [80], [81]. Dieser Zyklus soll im weiteren Verlauf näher erläutert werden. Grundsätzlich basiert dieser Zyklus auf der Aufnahme von Glutamat durch Astrozyten und die Umwandlung und Freisetzung von Glutamat zu Glutamin [82] - [84]. Das freigesetzte Glutamin kann wiederum von Neuronen aufgenommen werden [109]. Glutamaterge oder GABAerge Neurone können aus dem aufgenommenen Glutamin entweder Glutamat oder im Falle der GABAergen Neurone Glutamat und dann GABA synthetisieren [109]. Nach Calcium - vermittelter Depolarisation kommt es zur vesikulären Verschmelzung mit der präsynaptischen

Membran und der folgenden Freisetzung der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt [93]. Nachdem die Neurotransmitter an der Postsynapse ihre Wirkung vermittelt haben, diffundieren sie von den jeweiligen Rezeptoren ab [36]. Nach Hertz et al. 2013 wird Glutamat aus dem synaptischen Spalt von Astrozyten aufgenommen und zu Glutamin transaminiert [109]. *In vivo* Studien nennen einen Anteil von 85 % Glutamat, der durch Astrozyten wieder aufgenommen wird und zu Glutamin umgewandelt wird. Die restlichen 15 % werden oxidativ abgebaut [110]. Der Glutamin - Glutamat - Zyklus ist an dieser Stelle geschlossen und kann von vorne beginnen. Beide Neurotransmitter (Glutamat und GABA) können aber auch von Astrozyten wieder aufgenommen werden und über  $\alpha$  - Ketoglutarat dem Krebs - Zyklus wieder zugeführt werden [87], [88]. GABA wird durch Astrozyten aufgenommen und zum Succinat - Semi - Aldehyd transaminiert [113]. Ausgehend vom Succinat - Semi - Aldehyd gibt es zwei unterschiedliche Möglichkeiten der weiteren Verstoffwechslung. Als erstes kann es wieder in den Krebs - Zyklus eingespeist werden und verlässt den Krebs Zyklus als Malat. In der zweiten Möglichkeit wird es über  $\alpha$  - Ketoglutarat zu Glutamat und danach zu Glutamin umgesetzt und kann wieder dem Glutamin - Glutamat - Zyklus zugeführt werden [111]. Falls Malat aus GABA gebildet werden soll, diffundiert dieses Malat aus den Mitochondrien der Astrozyten ins Cytosol und wird dort von dem *cytosolischen Malat Enzym* zu Pyruvat decarboxyliert [114]. Das gebildete Pyruvat kann ab diesem Punkt oxidativ über den Krebs-Zyklus zu CO<sub>2</sub> abgebaut werden [36]. Wenn man sich die weitere Verstoffwechslung von Glutamat näher betrachtet, wird Glutamat nicht zum Semi - Aldehyd (vgl. GABA), sondern entweder zum Glutamin oder zum  $\alpha$  - Ketoglutarat [115]. Interessanterweise nimmt die oxidative Umwandlung von Glutamat zu  $\alpha$  - Ketoglutarat nahezu linear mit der vorherrschenden Glutamatkonzentration zu [116]. Die Wiedereinbringung von Glutamat bzw. GABA in den Krebs - Zyklus kann nur durch Astrozyten erfolgen, da nur dieser Zelltyp über die *Pyruvatcarboxylase* und die *Glutamin - Synthetase* verfügt [93] - [95]. Die *Pyruvatcarboxylase* katalysiert die Umsetzung von Pyruvat zu Oxalacetat, die *Glutamin - Synthetase* die Umsetzung von Glutamat zu Glutamin [36]. Wichtig bei der Betrachtung der *Pyruvatcarboxylase* ist die Tatsache, dass dieser Stoffwechselweg nur bei erhöhter Hirnaktivität nachweisbar ist, genauso wie Laktat nur unter gesteigerter neuronaler Aktivität als Substrat benutzt wird [119]. Ein weiterer wichtiger Punkt als Fazit aus dem GABA - Glutamat - Glutamin - Zyklus ist die Erkenntnis, dass 15 - 30 % des zirkulierenden Glutamat bzw. GABA dem Zyklus entzogen werden und über Malat zu Pyruvat abgebaut werden, um die in Pyruvat enthaltene Energie zur oxidativen Phosphorylierung zu nutzen [120].







**Abb. 14 Malat - Aspartat - Shuttle zur Transferierung des durch die Glykolyse regenerierten  $\text{NADH} + \text{H}^+$  vom Cytosol ins Mitochondrium. Das mitochondrial regenerierte  $\text{NADH} + \text{H}^+$  kann über die Atmungskette direkt über Komplex --I verbraucht werden. Modifiziert nach Mangia et al. 2009 [125]. 2 - OG = 2 - Oxo - Glutarat; Asp = Aspartat; Glu = Glutamat; Glc = Glukose; Pyr = Pyruvat; OAA = Oxalacetat**

Das Malat - Aspartat - Shuttle dient dazu, die durch die Glykolyse im Cytosol regenerierten  $\text{NADH} + \text{H}^+$  Äquivalente ins Mitochondrium zu transferieren, um dort direkt über den Komplex - I der Atmungskette ( $\text{NADH} - \text{Ubichinon} - \text{Oxidoreduktase}$ ) zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert zu werden [83]. Der Zyklus startet im Cytosol, wo Oxalacetat zu Malat reduziert wird. Das Enzym, welches die Reaktion katalysiert, ist die *cytosolische Malatdehydrogenase* (c - MDH oder MDH - 1), die  $\text{NADH} + \text{H}^+$  abhängig arbeitet [126]. Das durch diese Reaktion gebildete  $\text{NAD}^+$  kann cytosolisch wieder für die Glykolyse eingesetzt werden. Das auch aus dieser Reaktion gebildete Malat wird im Austausch mit  $\alpha$  - Ketoglutarat über den  $\alpha$  - Ketoglutarat - Malat - Transporter ins Mitochondrium transportiert [127]. Die MDH - 1 besitzt auch ein mitochondriales Isoenzym, welches *mitochondriale Malatdehydrogenase* (m - MDH oder MDH - 2) genannt wird [128]. Die MDH - 2 katalysiert die Reduktion von Malat zu Oxalacetat (unter Verbrauch von  $\text{NAD}^+$ ) im Mitochondrium. Das erhaltene Reduktionsäquivalent  $\text{NADH} + \text{H}^+$  ist die transferierte Energieform, welches durch die Glykolyse im Cytosol entstanden ist, aber nicht direkt ins Mitochondrium translozieren kann. An dieser Stelle ist die Funktion des Shuttles bereits erfüllt, allerdings benötigt das gesamte System noch zusätzliche Schritte um metabolisch ausgeglichen zu sein. Aus Oxalacetat wird im Mitochondrium durch die *mitochondriale Aspartat - Aminotransferase* (m - AAT), Aspartat hergestellt [129]. Die Umsetzungsreaktion von Oxalacetat zu Aspartat ist an die Reduktion von Glutamat zu  $\alpha$  - Ketoglutarat gekoppelt [36]. Das umgesetzte Glutamat in dieser Reaktion stammt aus dem Cytosol und wird gegen Aspartat (Mitochondrium  $\rightarrow$  Cytosol) durch den Aspartat - Glutamat - Transporter ausgetauscht [130]. Damit der Zyklus sich schließt, wird das transferierte Aspartat durch die *cytosolische Aspartat - Aminotransferase* (c - AAT) wieder zu Oxalacetat desaminiert [36]. Der Zyklus kann ausgehend vom Oxalacetat wieder neu beginnen.

Um auf die Ergebnisse von Lin et al. 2012 und Dienel et al. 2002 zurückzukommen, bleibt der Zusammenhang zwischen dem Anstieg von Glutamat und die Senkung von Aspartat weiterhin unbeantwortet. Die Aminogruppe, die von Glutamat auf Glutamin übertragen wird, stammt laut

Mangia et al. 2012 aus Aspartat [123]. Bei der Umsetzung von Aspartat zu Oxalacetat wird die Aminogruppe transferiert und für die Aminierung von Glutamin aus Glutamat benutzt.

#### **1.7.4 Das Glycerol - 3 - Phosphat - Shuttle**

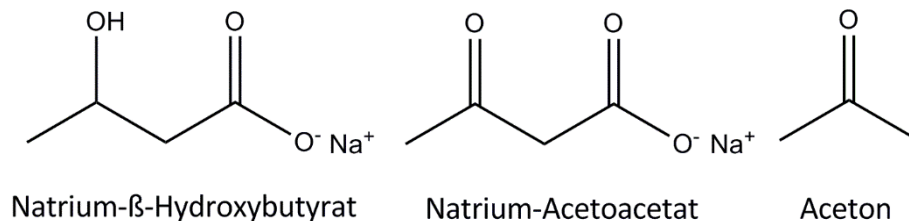
Die gängige Lehrbuchmeinung in Bezug auf die Transferierung von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  vom Cytosol ins Mitochondrium wird damit beantwortet, dass im Gehirn von Tieren, Pilzen und Bakterien vorwiegend das sogenannte Glycerol - 3 - Phosphat - Shuttle den Transfer von cytosolischem  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu  $\text{FADH} + \text{H}^+$  bereitstellt [108] - [109]. Die beiden involvierten Enzyme, die *cytosolische* bzw. *mitochondriale Glycerin - 3 - phosphat-Dehydrogenase* (c / m - GPD) sind zwar im Gehirn nachgewiesen worden, aber beide müssen zwingend auch in einer Zelle nebeneinander vorliegen, damit der Zyklus überhaupt funktionieren kann. Der einzige Zelltyp im Gehirn der nachgewiesenermaßen beide Isoenzyme exprimieren kann sind Oligodendrozyten [110] - [111].

Das Prinzip des Glycerol - 3 - phosphat-Shuttles beruht auf der Tatsache, dass cytosolisch  $\text{NADH} + \text{H}^+$  über die Glykolyse generiert wird und die enthaltene „Energie“ auf  $\text{FADH}_2$  übertragen wird. Diese ins Mitochondrium transferierte Energie wird dann über Komplex - II zur Regenerierung von ATP verwendet [135].

Im ersten Schritt des Zyklus wird im Cytosol Di - Hydroxy - Aceton - Phosphat (DHAP) durch die c - GPD zu Glycerin - 3 - phosphat reduziert. Für diese Reaktion wird  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert, was danach wieder für die Glykolyse bereitgestellt wird. Das gebildete Glycerin - 3 - phosphat diffundiert durch die mitochondriale Membran und wird dort von der m - GDP wieder zum Aceton oxidiert. Hierbei wird FAD zu  $\text{FADH}_2$  reduziert. Die im  $\text{FADH}_2$  enthaltenen Elektronen bzw. Protonen werden dann für die für die Reduktion des Ubichinons verwendet. Diese aus der Oxidation des Glycerin - 3 - phosphats transferierten Elektronen speisen den Komplex-II der Atmungskette, um ADP zu ATP phosphorylieren [37], [74].

## 1.8 Die Physiologie der Fettsäuren und Ketonkörper

Ketonkörper stellen einen zentralen Punkt in der physiologischen Homöostase von Eukaryonten, Bakterien und Archaeen dar [136]. Wenn man über Ketonkörper spricht, meint man drei zu unterscheidende C<sub>3</sub>-Körper, β - Hydroxybutyrat (BHB), Acetoacetat (AcAc) und Aceton (s. **Abb. 15**). Im Folgenden wird die zugrundeliegende Physiologie der Ketonkörper, als alternative Energiesubstrate im menschlichen Kontext erläutert.



**Abb. 15 Die drei Ketonkörper in Eukaryonten, Bakterien und Archaeen.**

Die Leber stellt den Hauptsyntheseort für die *de novo* Synthese der Ketonkörper dar [36]. Die Ketonkörper werden in Situationen synthetisiert, in denen das Hauptenergiesubstrat Glukose nicht mehr ausreichend zur Verfügung gestellt werden kann [137]. Solche Situationen können Fasten, Hungern, kohlenhydratarme oder kohlenhydratfreie Diäten, neonatale Entwicklung, Schwangerschaft, lange extensive körperliche Betätigung, aber auch pathologische Situationen wie zum Beispiel das ketoazidotische Koma sein [113] - [116]. Die physiologischen Konzentrationen im menschlichen Plasma liegen bei normaler Ernährung (60 % Kohlenhydrate, 30 % Fette, 10 % Protein [140]) zwischen 100 - 250 μM, bei 24 h Fasten oder langer sportlicher Betätigung schon bei 1 mM und bei eskalierter Stoffwechsellage im Rahmen einer Ketoazidose sogar bei bis zu 20 mM [113], [114], [118], [119]. Die humane Leber ist in der Lage in 24 h bis zu 300 g Ketonkörper herzustellen, was zwischen 5 - 20 % der gesamten Energie pro Tag entspricht [120], [121]. Die drei genannten Ketonkörper haben nicht nur die angesprochene metabolische Funktion, sondern sind auch bei der Signaltransduktion, bei der posttranslationalen Modifizierung von Proteinen, bei der Modulation von Entzündungen und bei Reduktion von oxidativem Stress beteiligt [136].

### 1.8.1 Die Physiologie der Fettsäuren

Als erstes wird an dieser Stelle die grundlegende Fettsäurephysiologie erläutert, da Fettsäuren und Glukose die Hauptquellen für Acetyl - CoA sind, welches Grundbaustein für die Synthese der Ketonkörper ist. Wenn langkettige Triacylglyceride (TG) mit der Nahrung aufgenommen werden, werden sie durch die Magen - und Pankreaslipasen gespalten und in ihre einzelnen Fettsäuren und Glycerol aufgetrennt. Die Fettsäuren bzw. Mono - und Diacylglyceride werden durch Gallensäuren emulgiert und können durch Enterozyten aufgenommen werden (passive Diffusion). In den Enterozyten werden aus dem aufgenommenen Glycerol und den Fettsäuren, sowie Mono - und Diacylglyceriden wieder TG's synthetisiert, die über Apolipoproteine bzw. Chylomikrone ins Blut aufgenommen werden können. Chylomikrone werden über die Lymphe abtransportiert und gelangen über den linken Venenwinkel in den systemischen Kreislauf. Durch Lipoproteinlipasen (vor allem an Adipozyten) werden aus den Chylomikronen Fettsäuren abgespalten und in die jeweiligen Zellen aufgenommen. Die an TG verarmten Chylomikronen werden *Remnants* genannt und in der Leber über *Remnant* - Rezeptoren aufgenommen und weiter verstoffwechselt [37], [68], [74].

Damit die in den TG's enthaltene Energie mobilisiert werden kann, erfordert es drei grundlegende Schritte,

- Die Lipolyse der TG's
- Die Aktivierung der Fettsäuren
- Der Abbau zu Acetyl - CoA.

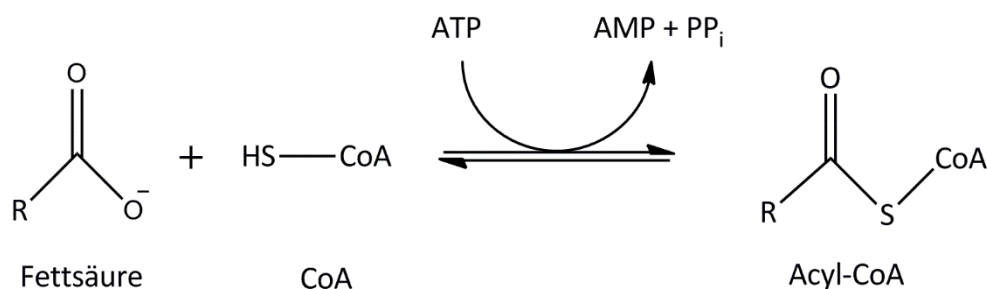
Diese drei Punkte werden im Folgenden kurz erläutert.

### 1.8.1.1 Die Lipolyse

Die Lipolyse definiert die hydrolytische Spaltung durch Lipasen. In den Adipozyten wird je nach Stoffwechsellage das gespeicherte Fett wieder mobilisiert und in Form von freien Fettsäuren und Glycerol ins Blut abgegeben [1], [15]. Bei der Lipolyse gibt es drei wichtige Lipasen, die *Adipozyten - Triglycerid - Lipase* (ATGL), die *Hormon - sensitive - Lipase* (HSL) und die *Monoglyceridlipase* (MGL) [145]. Die ATGL spaltet TG zu einer Fettsäure plus ein Diacalglycerid, die HSL wiederum spaltet aus den Diacalglyceriden eine Fettsäure und ein Monoacylglycerid ab. Der letzte Schritt der Lipolyse wird durch die MGL katalysiert. Hierbei entstehen aus den Monoacylglyceriden freie Fettsäuren und Glycerol, die dann ins Blut abgegeben werden (Fettsäuren an Albumin gebunden). Die Fettsäuren und Glycerol werden zur Leber oder zu Geweben, die die Enzymausstattung zur  $\beta$  - Oxidation besitzen, transportiert [37], [68], [74]. Das abgespaltene Glycerol wird wieder von der Leber absorbiert und wird dem Glycerin - 3 - phosphat-Zyklus unterzogen (s. **Kap. 1.7.4 Das Glycerol - 3 - Phosphat - Shuttle**). Das Glycerol stellt nach Umwandlung in Glycerinaldehyd - 3 - phosphat ein Zwischenprodukt der Glykolyse, aber auch der Gluconeogenese dar [63], [64].

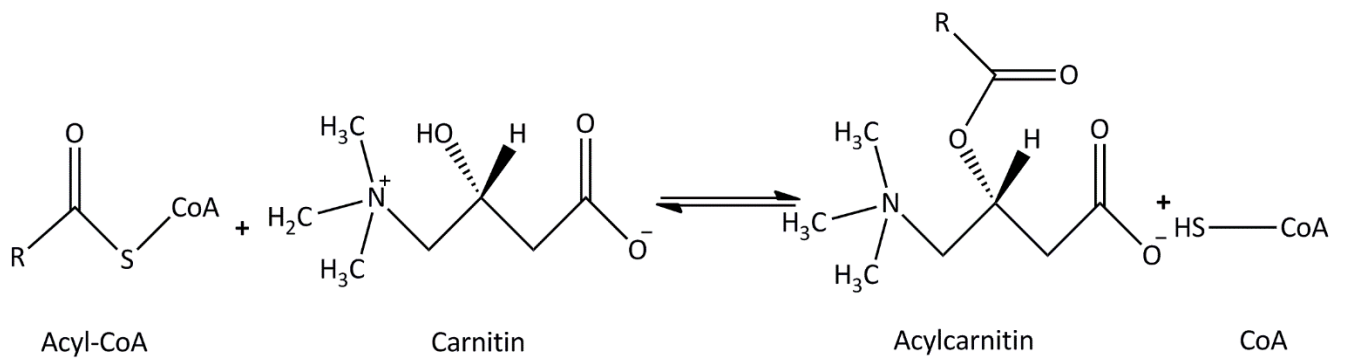
### 1.8.1.2 Die Aktivierung der Fettsäuren

Die Mitochondrien stellen den Ort der  $\beta$  - Oxidation dar. Fettsäuren können aber nur in aktivierter Form, d.h. gebunden an Coenzym - A in die Mitochondrien gelangen. Diese Aufgabe wird von der *Acyl - CoA - Synthetase* an der äußeren Mitochondrienmembran wahrgenommen.



**Abb. 16 Aktivierung der Fettsäuren mit Coenzym - A (CoA) durch die Acyl - CoA - Synthetase.**

Die aktivierten Fettsäuren müssen in die mitochondriale Matrix transportiert werden, da in diesem Kompartiment die  $\beta$  - Oxidation stattfindet. Für diesen Transport müssen die aktivierten Fettsäuren aber noch an Carnitin gebunden werden, da nur Acylcarnitin durch die Translokase erkannt wird und so die Fettsäuren überhaupt der  $\beta$  - Oxidation unterzogen werden können [147].

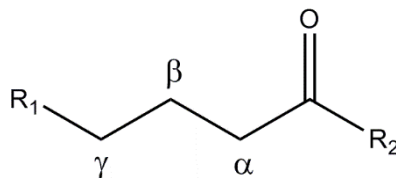


**Abb. 17** Bildung der Acylcarnitin - Derivate durch die Carnitin - Palmitoyltransferase - I (CPT - I).

Das Acylcarnitin kann durch eine Translokase durch die innere Mitochondrienmembran geschleust werden und wird dort wieder mit Coenzym A unter Abspaltung des Carnitins konjugiert. Das analoge mitochondriale Enzym, was die Umkehrung der in **Abb. 16** gezeigten Reaktion katalysiert, ist die Carnitin - Palmitoyltransferase - II (CPT - II). Diese Aktivierung bzw. Carnitinkonjugation benötigen nur Fettsäuren, die eine effektive Kettenlänge von > 10 C - Atomen haben [1], [15].

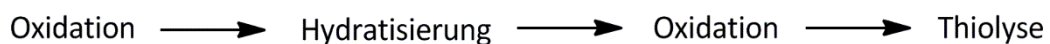
### 1.8.1.3 Die $\beta$ - Oxidation

Die  $\beta$  - Oxidation beschreibt vier aufeinanderfolgende enzymatische Reaktionen, die in einem Zyklus jeweils ein Acetyl - CoA und ein um zwei C - Atome verkürztes Acyl - CoA generieren. In der chemischen Nomenklatur werden die von einer Ketogruppe benachbarten C - Atome mit  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichnet (s. **Abb. 18**).



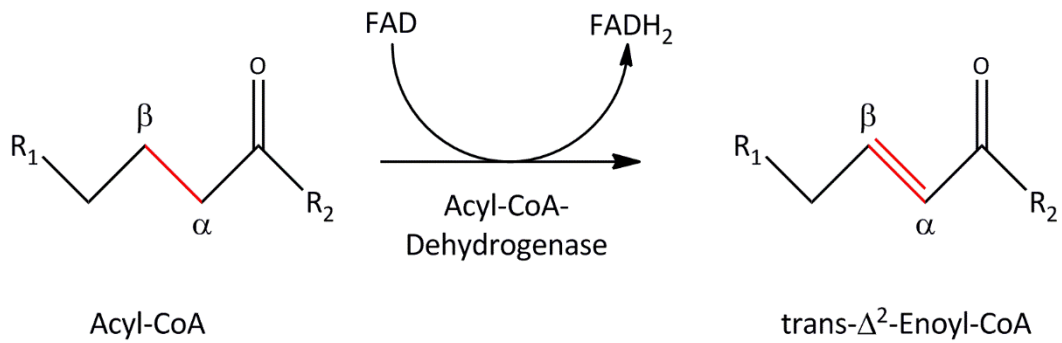
**Abb. 18** Chemische Nomenklatur für benachbarte C - Atome ausgehend von der Ketogruppe.

Da alle vier Schritte immer an der  $\beta$  - Position vollzogen werden und die Reaktionen alle eine Erhöhung der Oxidationszahl am C - Atom bedingen, heißt die Reaktionsfolge  $\beta$  - Oxidation. Die Reaktionsfolge soll anhand des in  $\beta$  - Position liegenden C - Atoms verdeutlicht werden (s. **Abb. 19**).



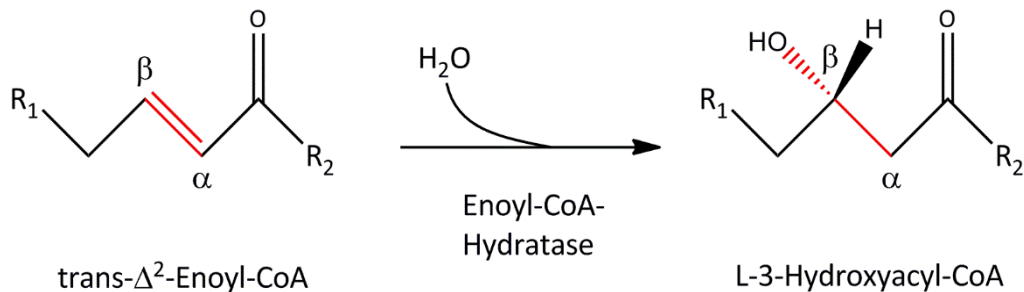
**Abb. 19** Reaktionsreihenfolge am C - Atom in  $\beta$  - Position bei der  $\beta$  - Oxidation.

Wie bereits in **Kap. 1.8.1.2 Die Aktivierung der Fettsäuren** erläutert, müssen die Fettsäuren mit Acetyl - CoA bzw. Carnitin konjugiert werden, um an den Ort der  $\beta$  - Oxidation, die innere Mitochondrienmembran, zu gelangen. Im Folgenden werden die Einzelreaktionen dieses Zyklus näher dargestellt. Die erste Oxidation wird durch die Acyl - CoA - Dehydrogenase katalysiert, die als Elektronenakzeptor Flavin - Adenin - Dinukleotid (FAD) benutzt, um die transferierten Elektronen zu überführen (s. **Abb. 19**). Diese transferierten Elektronen werden am Ende auf die Ubichinon - Reduktase transferiert, wodurch aus Ubichinon die reduzierte Ubichinol - Form gebildet werden kann. Die generierten Elektronen werden somit zur ATP - Regenerierung benutzt [65], [66].



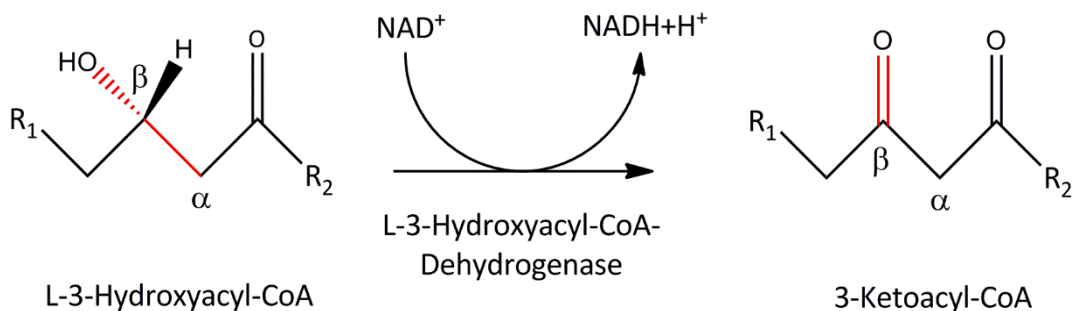
**Abb. 20 Oxidation des Acyl - CoA.**

Die zweite Reaktion beschreibt eine einfache Hydratisierung am zweiten C-Atom durch die *Enoyl - CoA - Hydratase*. Bei dieser Reaktion entsteht stereospezifisch das L - Isomer, also L - 3 - Hydroxyacyl - CoA.



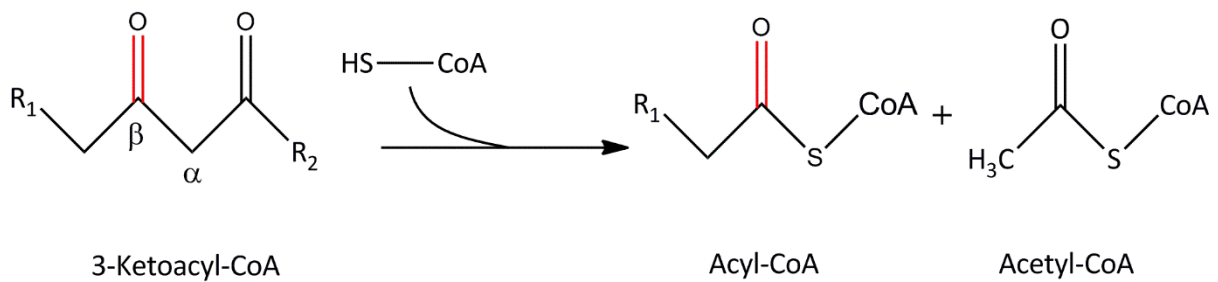
**Abb. 21 Hydratisierung des Enoyl - CoA.**

Im dritten Schritt wird bei der Oxidation der Hydroxygruppe an der  $\beta$  - Position ein Äquivalent  $\text{NADH} + \text{H}^+$  gebildet. Diese Reaktion wird durch die *L - 3 - Hydroxyacyldehydrogenase* katalysiert.



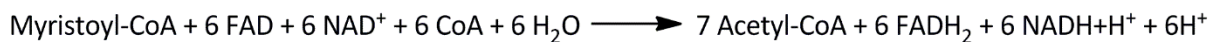
**Abb. 22 Oxidation des Hydroxyacyl - CoA.**

Nach dieser Oxidation entsteht eine  $\beta$  - Ketoverbindung, die sehr leicht hydrolysierbar ist und zusätzlich erkennen lässt, dass immer ein Zyklus der  $\beta$  - Oxidation zu einer Verkürzung des Acyl - CoA's um zwei C - Atome führt. Um den zweiten Durchgang der  $\beta$  - Oxidation vollziehen zu können, bedarf es der Aktivierung mit CoA. Der letzte Reaktionsschritt beschreibt eine Thiolyse, die sowohl die Hydrolyse des 3 - Ketoacyl - CoA als auch die Aktivierung mit CoA der um zwei C - Einheiten verkürzten Acyl - CoA Einheit in einem Reaktionsschritt ermöglicht.



*Abb. 23 Thiolyse des 3 - Ketoacyl - CoA.*

Abschließend wird an dieser Stelle eine Beispielrechnung anhand eines Molekül Myristoyl - CoA (C<sub>14</sub>) erläutert, bei denen die Ausbeute von NADH + H<sup>+</sup>, FADH<sub>2</sub> und der entstehenden Acetyl - CoA Moleküle näher beschrieben wird. Der Komplex - I der Atmungskette (*NADH: Ubichinon - Oxidoreduktase*) entspricht im biochemischen Sinn einer Protonenpumpe und einem Elektronenakzeptor. Der Komplex - II der Atmungskette (*Succinat: Ubichinon - Oxidoreduktase*) hat nur Eigenschaften als Elektronenakzeptor und keine Funktion als Protonenpumpe. Die Potentialdifferenz an der inneren Mitochondrienmembran bedingt die grundsätzliche Funktion des Komplex - V (*ATP - Synthase*) (s. **Kap. 1.6 Die oxidative Phosphorylierung**). Wenn ein Enzym keine Funktion als Protonenpumpe hat, ist die Ausbeute an effektiven ATP - Äquivalenten niedriger. Genau dieser Sachverhalt bedingt die unterschiedliche Ausbeute an ATP-Molekülen in Abhängigkeit von NADH + H<sup>+</sup> bzw. FADH<sub>2</sub>. Während FADH<sub>2</sub> ungefähr 1,5 Moleküle ATP als „Ausbeute“ besitzt, hat NADH + H<sup>+</sup> 2,5 Moleküle als „Ausbeute“. Während Acetyl - CoA in den Citratzyklus eingeschleust wird, kann es bis zum Oxalacetat ca. 10 Moleküle ATP indirekt über NADH + H<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub> bereitstellen. Auf Basis dieses Sachverhalts ergibt sich eine Bruttorechnung für die β - Oxidation (s. *Gleichung 1*) [36]; [83].



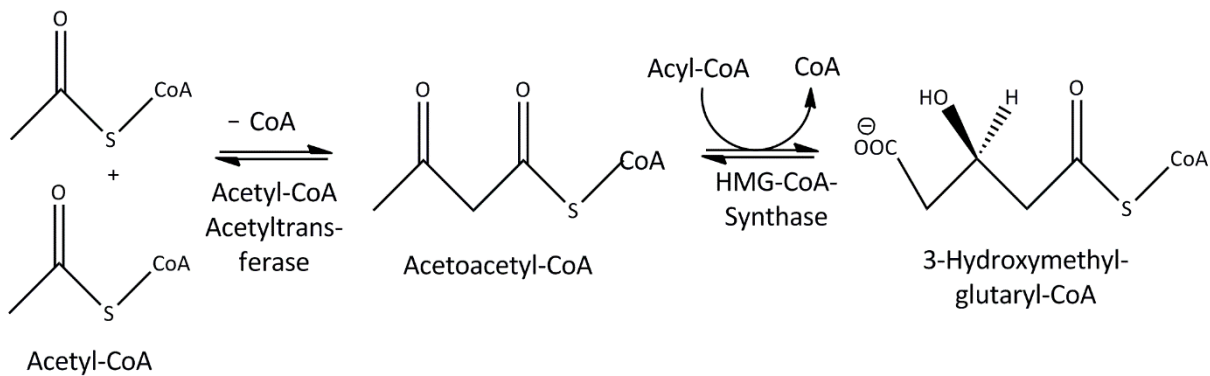
*Gleichung 1 Bruttorechnung für die Umsetzung eines Myristoyl - CoA bei der vollständigen β - Oxidation.*

Auf Basis der oben beschriebenen theoretischen Ausbeuten für die Reduktionsäquivalente NADH + H<sup>+</sup> (2,5 Moleküle ATP) und FADH<sub>2</sub> (1,5 Moleküle ATP) bzw. von Acetyl - CoA (10 Moleküle ATP) ergibt sich für Myristat eine Ausbeute von 94 Molekülen ATP. Diese Zahl entspricht der Bruttoausbeute für die Verstoffwechslung von Myristat. Allerdings muss man noch zwei ATP abziehen, da die Aktivierung der Fettsäuren 2 Moleküle ATP verbraucht. Somit entsteht bei der kompletten Verstoffwechslung von Myristat **92 Moleküle ATP**, gewonnen durch die β - Oxidation.



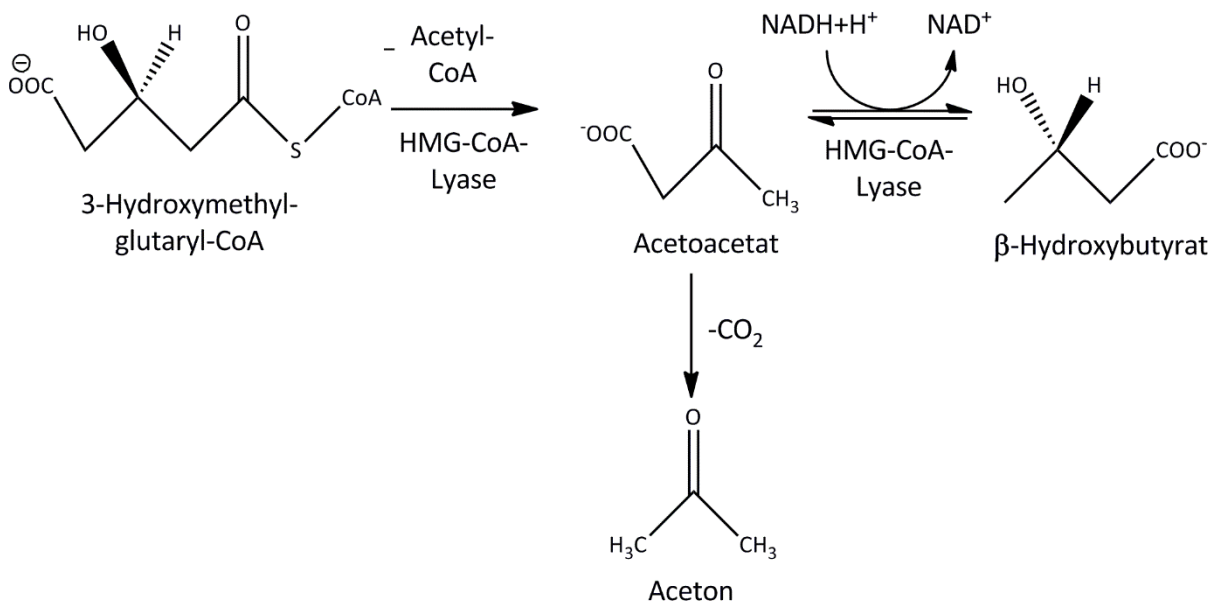
## 1.9 Ketogenese

Die Ketogenese beschreibt den Aufbau von Ketonkörpern, insbesondere BHB und Acetoacetat, ausgehend von Acetyl - CoA. Die Synthese der Ketonkörper erfolgt überwiegend in den Mitochondrien der Leber [137]. Der nach Feodor Lynen benannte Aufbauzyklus für Ketonkörper, findet vor allem in katabolen Stoffwechsellagen statt (Hunger, Fasten, kohlenhydratarmer Ernährung) [150]. Im ersten Schritt des Lynen - Zyklus werden durch die *Acetyl - CoA - Acetyltransferase* zwei Moleküle Acetyl - CoA zu Aceto - Acetyl - CoA kondensiert. In einer Folgereaktion wird durch die *HMG - CoA - Synthase* aus Aceto - Acetyl - CoA 3 - Hydroxymethylglutaryl - CoA (HMG - CoA), was auch im Aufbau von Cholesterin im Rahmen des Mevalonat - Zyklus auftritt, gebildet (s. **Abb. 24**).



**Abb. 24** Bildung von 3 - Hydroxymethylglutaryl - CoA (HMG - CoA) aus drei Molekülen Acetyl - CoA.

Nach der Bildung von HMG - CoA wird nach Oxidation und Hydrolyse durch die HMG - CoA - Lyase der erste Ketonkörper, nämlich Acetoacetat gebildet. Durch spontane Decarboxylierung kann aus Acetoacetat Aceton werden, was aufgrund seiner pulmonalen Elimination, den klassischen Aceton Foetor beim ketoazidotischen Koma bedingt [36]. Ausgehend von Acetoacetat kann auch durch die *HMG - CoA - Lyase* der wichtigste der drei Ketonkörper, BHB, gebildet werden (s. **Abb. 25**).



**Abb. 25** Bildung der 3 möglichen Ketonkörper  $\beta$  - Hydroxybutyrate, Acetoacetat und Aceton aus dem Stoffwechselintermediat 3 - Hydroxymethylglutaryl - CoA.

### 1.9.1 Substrate und Regulation der Ketogenese

Die Ausgangsquelle der Ketogenese ist Acetyl - CoA, welches über den Abbau von Fettsäuren erhalten wird (> 96%) [122] – [124]. Begründet liegt diese Tatsache darin, dass das Endprodukt der Glykolyse (Pyruvat) im Falle einer Glukoseverarmung nicht zu Acetyl - CoA decarboxyliert wird, sondern zu Oxalacetat (Carboxylierung) oder zu Malat (Carboxylierung + Reduktion) verstoffwechselt wird (Anaplerose). Wenn Glukose intrazellulär in ausreichender Menge vorhanden ist, stellt die Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl - CoA den gängigen Abbauweg von Glukose dar [151]. Selbst unter maximaler Kapazität der *Pyruvatdecarboxylase*, steuert die Decarboxylierung von Pyruvat nur einen vernachlässigbar kleinen Anteil an Acetyl - CoA Äquivalenten zur Ketogenese bei [151]. Acetyl - CoA kann allosterisch die *Pyruvatcarboxylase* aktivieren, was einen Kontrollmechanismus für den jeweiligen Stoffwechselweg darstellt [124], [125]. Parallel zur Aktivierung der *Pyruvatcarboxylase* kann Acetyl - CoA auch die *Pyruvatdehydrogenase - Kinase* (PDHK) aktivieren, was zur Phosphorylierung der *Pyruvatdehydrogenase* führt und somit die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl - CoA inhibiert [155]. Beide beschriebenen Mechanismen tragen dazu bei, dass das gebildete Pyruvat anaplerotisch in den Krebs - Zyklus aufgenommen wird.

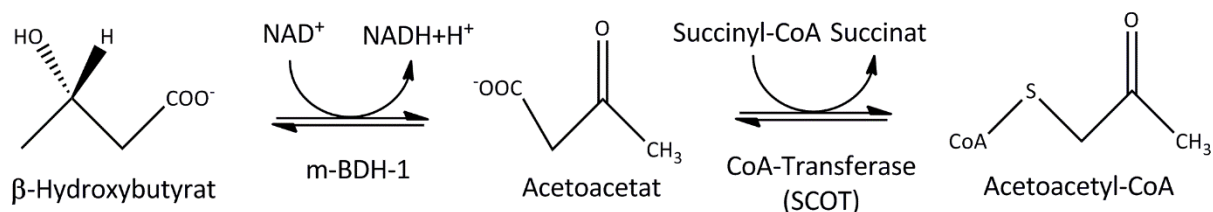
Die Regulation der Ketogenese findet aber nicht ausschließlich durch die vorherrschende Konzentration von Acetyl - CoA statt, sondern auch auf hormoneller, transkriptioneller und posttranslatiöner Ebene [136]. Ein wichtiger Mechanismus wird an dieser Stelle näher erläutert. Die Arbeitsgruppe um McGarry et al. 1989 hat an perfundierten Rattenlebern herausgefunden, dass das Verhältnis zwischen Insulin und Glukagon entscheidend für die Initiierung der Ketogenese ist [156]. Außerdem muss für den Wechsel von Glukose zu Ketonkörper als Hauptenergiesubstrat ein erhöhter Fluss von freien Fettsäuren zur Leber stattfinden, der durch einen erniedrigten Insulinspiegel zustande kommt [91], [155]. Desweiteren stellt die bessere Verwertung von Fettsäuren durch einen Anstieg des Verhältnisses von Glukagon zu Insulin einen wesentlichen Punkt der Forschungsergebnisse um McGarry und Kollegen dar. Durch einen Anstieg des Verhältnisses von Glukagon zu Insulin kommt es zu einer verstärkten Fettsäureoxidation in der Leber. Die Funktion der *Carnitin Palmitoyltransferase 1* und *2* (CPT - 1 / 2) spielt bei der erhöhten Verstoffwechslung eine wesentliche Rolle [158]. Grundsätzlich werden die Fettsäuren > 12 C-Atome über dieses Transportsystem in die Mitochondrien geschleust d.h. Heptanoat als Fettsäure zum Beispiel gelangt über reine Diffusion in die Mitochondrien, wobei die Fettsäuren von Sojaöl über den CPT - 1 bzw. 2 transportiert werden [149]. Die CPT-1 und 2 können ihre Funktion nur in Abhängigkeit der vorherrschenden Carnitinspiegel erfüllen. Desto höher der Carnitinspiegel in den Hepatozyten von perfundierten Rattenlebern ist, desto höher ist auch die Ketogenese [156], [159]. Die grundsätzliche Voraussetzung für eine Erhöhung der Carnitinkonzentration ist ein niedriger Insulin Spiegel und ein steigender Glukoagonspiegel [159].

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Regulationsmechanismen der Ketogenese haben auch Adrenalin und das Schilddrüsenhormon ( $T_3$ ) einen Effekt auf die Ketogenese [160]. Das Schilddrüsenhormon hat nur einen indirekten Effekt auf die Ketogenese, indem es die freie Fettsäurekonzentration im Plasma erhöhen kann und die Lipolyse steigert [155], [158]. Adrenalin selbst hat einen anti - ketogenen Effekt [157]. Daraus lässt sich folgern, dass Glukagon das limitierende Hormon ist, welches ketogene Eigenschaft, in Abhängigkeit der vorherrschenden Insulin Konzentrationen, besitzt.

## 1.10 Verstoffwechslung der Ketonkörper in extrahepatischen Geweben

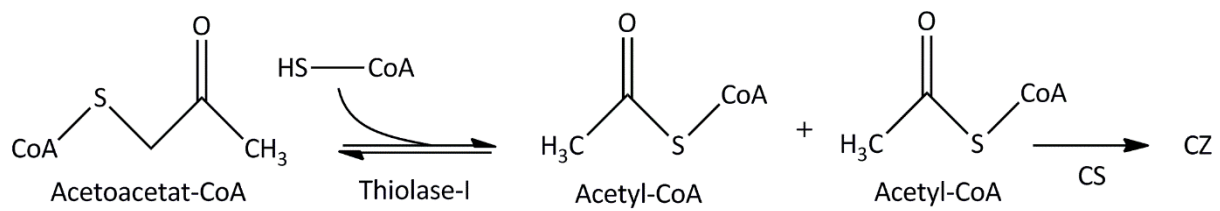
Nach der Bildung der Ketonkörper werden sie von der Leber über Monocarboxylattransporter vom Typ 1 und 2 (MCT - 1 / 2) ins Blutplasma abgegeben. Von hier aus gelangen sie über den Blutweg zu den extrahepatischen Geweben für die terminale Oxidation [113], [114], [120], [125]. Das Herz und die Nierenrinde bevorzugen sogar Acetoacetat gegenüber Glukose als Hauptenergiesubstrat. In den extrahepatischen Geweben wird Acetoacetat und BHB ebenfalls über MCT - 1 und 2 aufgenommen. Wichtig ist die Tatsache, dass die Konzentration an zirkulierenden Ketonkörpern höher ist als in den extrahepatischen Geweben. Diese Aussage impliziert, dass Ketonkörper entlang einem Konzentrationsgradienten in das Zellinnere transportiert werden [161]. Van Hasselt et al. 2014 hat die Auswirkungen eines kompletten Fehlens an MCT - 1 untersucht und festgestellt, dass die Tiere ketoazidotische Entgleisungen entwickelt haben [162]. Diese Aussage unterstreicht die Wichtigkeit dieses Transporters beim Transport der Ketonkörper in extrahepatische Gewebe. Die Hepatozyten selbst sind in der Lage, die *de novo* - Synthese von Ketonkörpern zu vollziehen, sind aber nicht in der Lage, die aufgebauten Ketonkörper selbst wieder zu Acetyl - CoA abzubauen.

Nachdem die Ketonkörper in die Zelle aufgenommen worden sind, stellt die Literatur keine ausreichende Erklärung für den Transport vom Cytosol in die mitochondriale Matrix zur Verfügung. Dieser Weg ist bis dato nicht erschlossen. Im ersten Schritt der Metabolisierung von BHB in extrahepatischen Geweben muss das aufgenommene BHB wieder in Acetoacetat umgewandelt werden. Diese Reaktion wird durch die *mitochondriale -  $\beta$  - Hydroxybutyrat - Dehydrogenase* katalysiert. Acetoacetat wird über den gleichen Weg wie BHB in die Zelle aufgenommen und bedarf keiner weiteren Umwandlung in BHB, da der Metabolisierungsweg von BHB zu Acetoacetat erfolgt. Der nächste Schritt wird durch das Enzym *Succinyl - CoA : 3 - oxosäure - CoA - Transferase* (SCOT) katalysiert, welches für den Ketonstoffwechsel eine wichtige Rolle spielt. Es ist das Enzym, welches in der Leber nicht exprimiert wird und dafür verantwortlich ist, ob eine Zelle in der Lage ist, Ketonkörper für die Energiegewinnung zugänglich zu machen oder nicht. Bei der katalysierten Reaktion durch die SCOT wird Acetoacetat mit CoA aktiviert. Das CoA wird von Succinyl - CoA auf Acetoacetat übertragen (s. **Abb. 26**).



**Abb. 26** Verstoffwechslung von BHB in extrahepatischen Geweben bis zum AcetoAcetyl - CoA. *m - BDH - 1: mitochondriale -  $\beta$  - Hydroxybutyrat - Dehydrogenase; SCOT : Succinyl - CoA : 3 - oxosäure - CoA - Transferase*

Der letzte Schritt ist die thiolitische Spaltung von AcetoAcetyl - CoA zu zwei Molekülen Acetyl - CoA, die dann durch die *Citratsynthase* in den Citronensäurezyklus eingespeist werden.



**Abb. 27** *Verstoffwechslung von AcetoAcetyl - CoA bis zum Acetyl - CoA mit anschließender Einschleußung in den Citratzyklus (CZ) durch die Citratsynthase (CS). m - Thiolase : mitochondriale - 3 - Ketoacyl - CoA Thiolase*

### 1.10.1 Nicht - oxidative Verstoffwechslung von Ketonkörpern

Neben der oxidativen Verstoffwechslung der Ketonkörper können extrahepatische Gewebe die aufgenommenen Ketonkörper auch für die *de novo* - Lipogenese bzw. für den Aufbau von Cholesterol benutzen [136], [163]. Dieser anabole Stoffwechselweg kommt bei der Hirnentwicklung bzw. der laktierenden Milchdrüse zum Tragen [131], [132]. Aus diesem Grund wird dieser Stoffwechselweg ohne Abbildungen kurz erläutert. Das Acetoacetyl wird über ein cytosolisches Isoenzym, der *Thiolase - I* in AcetoAcetyl - CoA umgewandelt. Nach dieser Aktivierung wird es durch die *cytosolische - 3 - Hydroxymethylglutaryl - CoA - Synthase* (HMGCS - 1) in Hydroxymethylglutaryl - CoA überführt. Dieses Stoffwechselintermediat ist aus dem Mevalonat - Zyklus bekannt und wird zur Biosynthese von Cholesterol bzw. Isoprenoiden benutzt. Die andere Möglichkeit für den anabolen Stoffwechsel der Ketonkörper betrifft die cytosolische Umwandlung von AcetoAcetyl - CoA zu Malonyl-CoA. Dieses Malonyl - CoA wird im weiteren Verlauf für den Aufbau von Fettsäuren benutzt [133] - [135]. Weitere physiologische Rollen der Ketonkörper für den anabolen Stoffwechsel in der Leber sollen an dieser Stelle nicht erörtert werden, sind aber Gegenstand aktueller Forschung [136].

## 1.11 Die Gaschromatographie mit gekoppeltem Massenspektrometer (GC - MS)

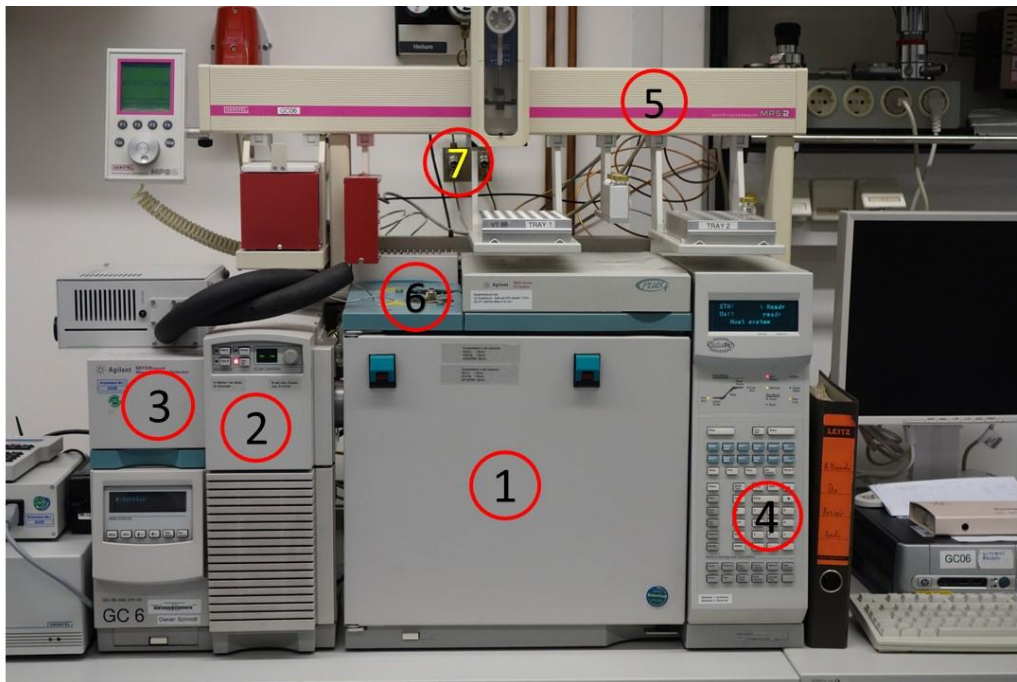
Die Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometern (GC - MS) stellt in der heutigen Forschung, aber auch in zahlreichen anderen Gebieten wie

- der Arzneimittelzulassung
- der Aroma - und Geruchsanalytik
- bei Dopingkontrollen
- der Toxikologie und Kampfstoffanalytik
- und viele mehr

eine sehr wichtige Rolle im Rahmen des qualitativen und quantitativen Nachweises von bekannten und unbekanntem Proben dar [137], [138]. Im Folgenden wird die GC - MS Analytik, die zugrundeliegenden Prinzipien, Probenvorbereitungen, Etablierung und Validierung, mit Fokus auf das verwendete Gerät erklärt.

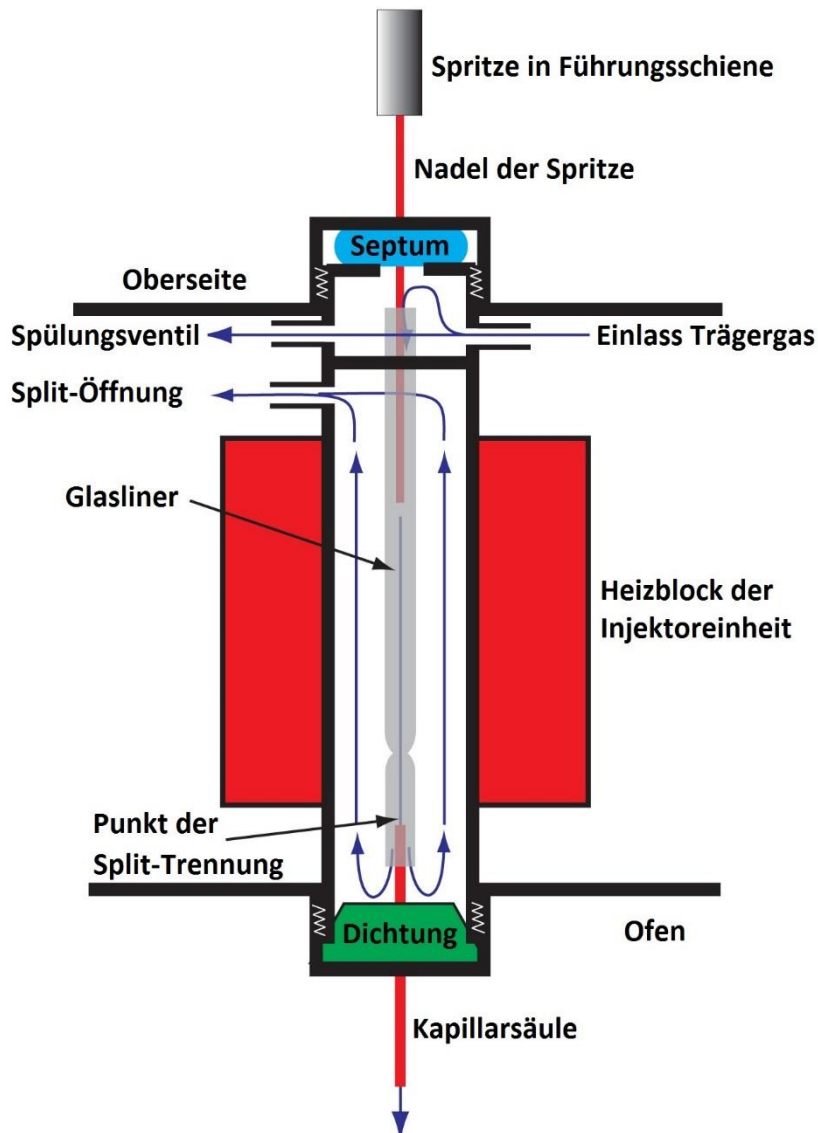
### 1.11.1 Aufbau und Prinzip der Gaschromatographie

Die Gaschromatographie basiert auf dem Prinzip der Adsorptions - bzw. Verteilungschromatographie, wobei als Trägergas ein inertes Gas ( $N_2$ ,  $H_2$ , He, Ar,  $CO_2$ ), als mobile Phase fungiert. In **Abb. 28** ist das verwendete Gerät mit allen Einzelkomponenten dargestellt.



**Abb. 28** Gaschromatograph mit gekoppeltem Massenspektrometer (GC - MS). 1. Chromatograph (Ofen); 2. Stoßkammer mit Elektronen - Stoßionisations - (EI) und chemischem Ionisationsmodul (CI); 3. Massenselektiver Detektor auf Basis eines Quadrupol; 4. Manuelles Bedienfeld; 5. Autosampler - Einheit mit Injektionspritze; 6. Einlasssystem mit Vorder - und Rückeinlasssystem; 7. Gaszufuhr mit Heliumgas

Um eine Substanz mithilfe der GC - MS überhaupt qualitativ bzw. quantitativ bestimmen zu können, muss diese Substanz in die Gasphase überführt werden [169]. Die Injektorspritze taucht in das Probengefäß ein, nimmt ein vorgegebenes Volumen auf und injiziert dieses in den Injektor (s. **Abb. 29**).

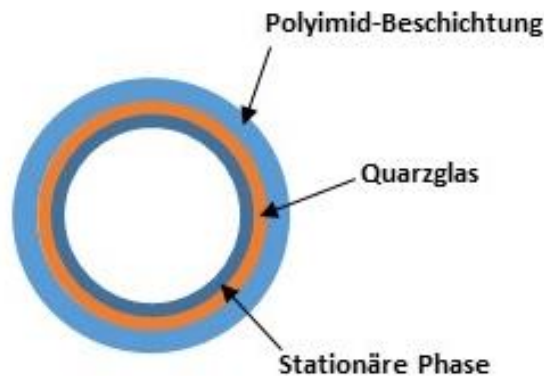


**Abb. 29** Injektoreinheit mit kombiniertem Splitventil. Abbildung modifiziert nach [171] mit den geltenden Lizenzvereinbarungen unter: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/us/>

Der Heizblock kann den *Glasliner* auf bis zu 300 °C beheizen (s. **Abb. 29**). Die flüssigen Substanzen werden dadurch verdampft und expandieren in dem *Glasliner*. Bevor die gasförmigen Substanzen endgültig auf die Säule gelangen, kann elektronisch das sogenannte Split - Verhältnis (typisch 1:5 ; 1 : 10) definiert werden [170]. Über die Splitöffnung kann das Volumen, was nicht auf die Säule gelangen soll, mit dem Trägergasstrom direkt ins Vakuum geleitet und abtransportiert werden [171]. Man definiert je nach etabliertem Protokoll ein Splitverhältnis von 1 : 5 bzw. 1 : 10 um die Kapillarsäule (i.D.: 0,25 mm) nicht zu überladen und somit die Peakqualität (Auflösung;  $R_s$ ) bzw. die Lebensdauer der Säule zu erhöhen. Falls Kompartimente vermessen werden sollen, die sehr wenig Masse enthalten, muss entweder innerhalb der Probenvorbereitung eine Aufkonzentrierung der Probe erfolgen oder das *Split* - Verhältnis geringer eingestellt werden. Auch ein sogenannter *splitless*

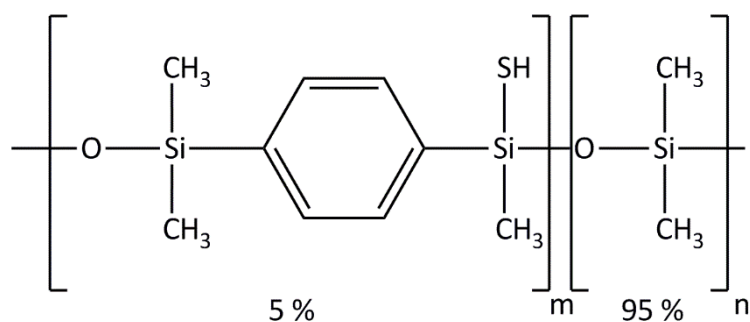
Modus ist möglich. Bei dieser Einstellung wird das gesamte Gasvolumen auf die Säule verbracht (Achtung: Lebensdauer ↓ und *Leading* der Peaks). Neben diesen verschiedenen Aufgabesystemen gibt es noch die Dampfraumprobenaufgabe (*Head - Space*) und die kalte Aufgabe (*On - column*) [169].

Nachdem die Probe auf die Säule verbracht worden ist, erfolgt die Auftrennung der Probe anhand ihrer physikochemischen Eigenschaften. Als Trennsäulen können grundsätzlich gepackte von Kapillarsäulen unterschieden werden. Alle beschriebenen Methoden wurden mit einer Kapillarsäule vermessen (s. **Abb. 31**), weshalb hier nur auf diese Art der Säulen eingegangen werden soll. Wenn man sich eine Kapillarsäule mit fester stationärer Phase (SCOT) näher anschaut, entdeckt man grundsätzlich drei zu unterscheidende Schichten. Die mittlere Schicht bildet Quarzglas, was auch die Basis bei der Herstellung bildet. Nach innen wird auf die Quarzglasschicht eine stationäre feste Phase aufgebracht (SCOT = support coated open tubular column). Um die bessere Handhabung bzw. Stabilität der Säule zu gewährleisten wird sie mit einer Polyimid - Schicht ummantelt.



**Abb. 30** Aufbau einer modernen Kapillarsäule.

Kapillarsäulen haben eine Länge von 10 - 100 m, mit einem sehr dünnen Durchmesser von 0,1 - 0,5 mm (s. **Abb. 31**) [169]. Die innere Schicht ist bei der in dieser Arbeit verwendeten Säule ein Gemisch aus 95 % Dimethylsiloxan und 5 % Diphenylpolysiloxan [172].



**Abb. 31** Agilent Kapillarsäule VF - 5ms (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm + 10 m Vorsäule). Die Zusammensetzung besteht aus 95 % Dimethylpolysiloxan und 5 % Dimethylphenylpolysiloxan.

Die stationäre Phase ist somit unpolar und die Auftrennung der Substanzen an der stationären Phase findet aufgrund von van - der - Waals und π - π Wechselwirkungen statt [173]. Im Folgenden wird näher auf die allgemeinen Auftrennungsprinzipien in der Gaschromatographie eingegangen.



Das Prinzip der Auftrennung in der Gaschromatographie ist Physisorption und Chemisorption. Die folgende Tabelle soll den Unterschied näher erläutern.

| Eigenschaft                        | Physisorption  | Chemisorption   |
|------------------------------------|--|---|
| Veränderungen durch Wechselwirkung | Nein<br>Dipol kann sich ändern   | Ja<br>kovalente Bindungen möglich                           |
| Schichtbildung am Adsorbens        | Mehrfachlagen möglich  | Monolagen   |
| Aktivierungsenergie                | Nein   | Ja  |
| Bindungsenthalpie                  | < 50 kJ/mol  | 50 - 500 kJ/mol   |
| Reversibilität                     | Ja   | Nein<br>Nur sehr hohe Temperaturen<br>(Ausheizen nötig)     |
| Art der Wechselwirkungen           | Van - der - Waals<br><br>Dipol - Dipol<br><br>$\pi - \pi$<br><br>Ionen – Dipol | Kovalente Bindungsenergien<br><br>Oxidationen / Reduktionen |
| Schnelligkeit der Reaktion         | Sehr schnell → Grund: keine Aktivierungsenergie nötig                          | niedrig   |

**Tab. 4 Eigenschaften in Abhängigkeit der Wechselwirkung von Adsorbatmolekülen und stationärer Phase (Adsorbens) [174].**

Aus **Tab. 4** ist ableitbar, dass Chemisorption in der Gaschromatographie nicht die erwünschte Wechselwirkung zur Auftrennung darstellt, da sie oftmals irreversibel ist und mit einer Veränderung des Adsorbats einhergeht. Da aber bei hohen Temperaturen (> 150 °C) die notwendige Energie für Chemisorption besteht, sollte man in der Gaschromatographie am Ende der Auftrennung aller Substanzen ein *Aufheizen* auf 300 °C nachschalten. Das sogenannte *Ausheizen* ist äquivalent mit dem Säulen bzw. Komponentenspülen bei der HPLC - Analytik.

Die Trenneffizienz in der Gaschromatographie ist ungeschlagen in der instrumentellen Analytik. Um diesen Sachverhalt nochmals zu verdeutlichen, soll ein Vergleich der theoretischen Trenneffizienz einer gängigen HPLC - Säule und einer Kapillarsäule in der GC herangezogen werden. Die



Bodenanzahl ist definiert durch eine abgeschlossene Wechselwirkung zwischen Substanz und stationärer Phase [169].

$$N = 5,54 * \left(\frac{t_r}{w_h}\right)^2$$

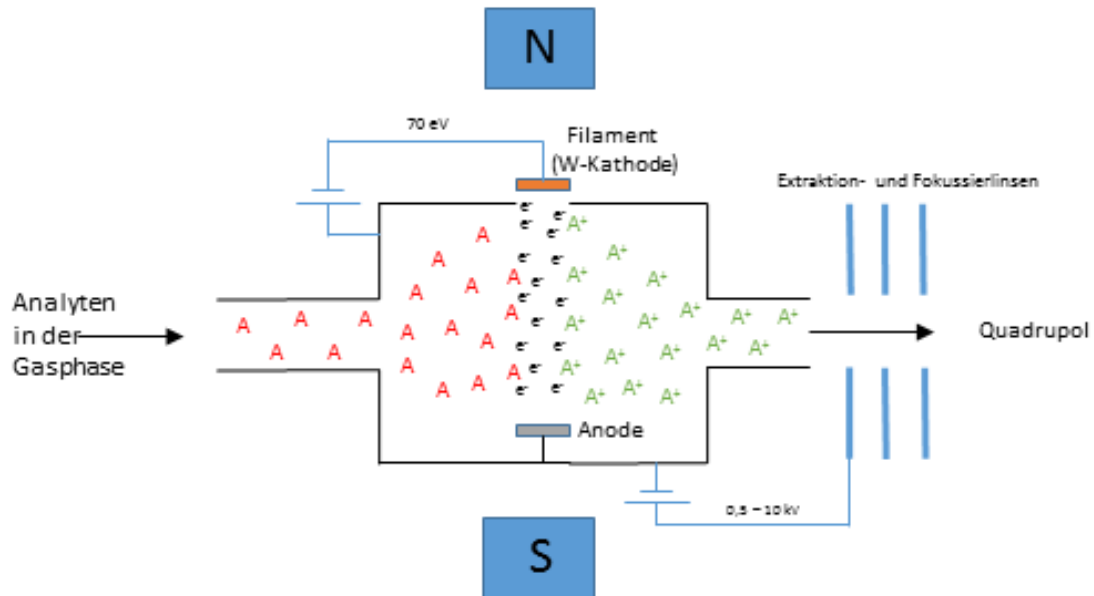
**Tab. 5 Berechnung der theoretischen Trennstufen (Böden) aus [169]**

Zu beachten ist die Tatsache, dass die Bodenanzahl eine theoretische Betrachtung darstellt, die modellhaft die Anzahl der Wechselwirkungen zwischen stationärer Phase und den aufzutrennenden Substanzgemischen darstellt [169]. Kapillarsäulen in der GC haben eine theoretische Trennstufe von > 10000, gängige HPLC - Säulen zwischen 1000 - 8000 [172]. Die in dieser Arbeit verwendete Säule (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) hat eine theoretische Bodenanzahl für n - tridecan von 284544 [175].

### 1.11.2 Aufbau und Prinzip der Massenspektrometrie

Wenn das Substanzgemisch durch die Wechselwirkungen zwischen Trägergas und stationärer Phase in einzelne Stoffe aufgetrennt wurde, eluieren diese Substanzen zeitlich getrennt von der Säule. Da in der GC oftmals Massenspektrometer nachgeschaltet sind und diese im Vakuum ( $10^{-6}$  Torr  $\triangleq$   $1,33 * 10^{-6}$  mbar) betrieben werden, muss eine zwischengeschaltete Einheit die Substanzen von einem Hochdruck in ein Niederdrucksystem transferieren. Diese Aufgabe übernimmt die *transfer - line*, welche die aufgetrennten Substanzen von der Säule in das Massenspektrometer verbringt. Die *transfer - line* ist für gewöhnlich > 200 °C und direkt mit der Stoßkammer des Massenspektrometers verbunden [176].

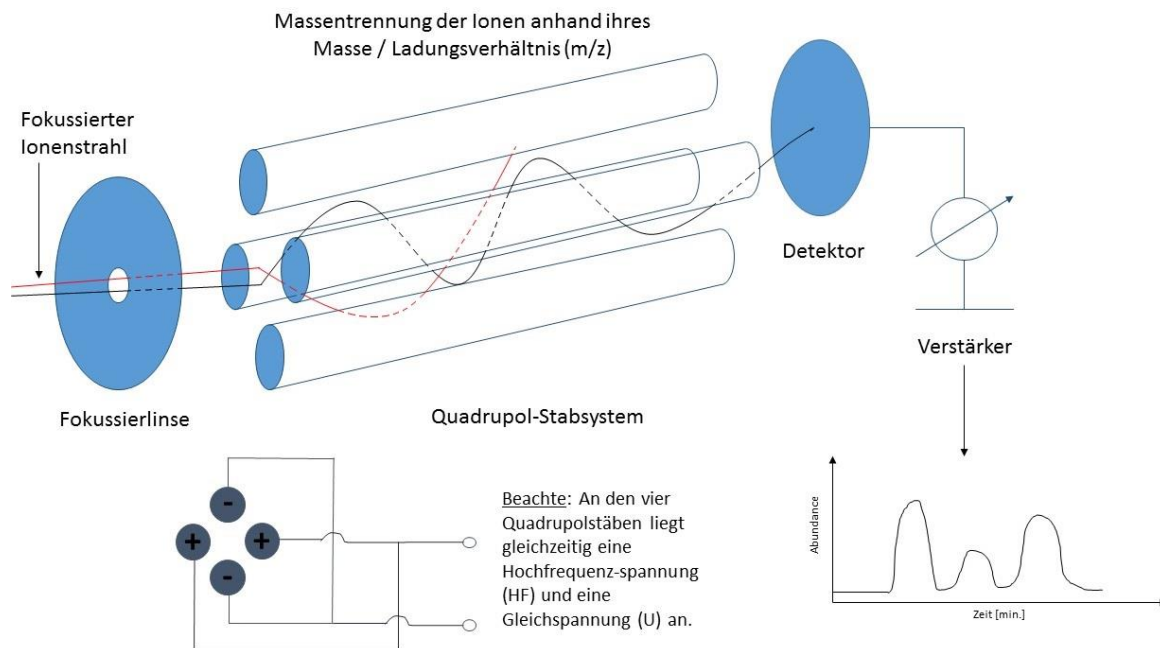
In der Stoßkammer kann man bei Quadrupol Massenspektrometern grundsätzlich zwei Ionisierungstechniken voneinander unterscheiden, die Elektronenstoßionisation (EI) und die chemische Ionisation (CI) mit Gasen [177]. Die Ionisierung ist ein notwendiger Schritt, da ansonsten die entstehenden Verbindungen nicht im Quadrupol abgelenkt werden und somit nicht detektiert werden können. Die gemessenen Werte in dieser Arbeit wurden alle im EI - Modus bei 70 eV gemessen, weshalb das Prinzip und der Aufbau in **Abb. 32** verdeutlicht werden soll.



**Abb. 32 Prinzip und Aufbau der Elektronenstoßionisation (EI)**

Der Vorteil bei der Elektronenstoßionisation ist die hohe Vergleichbarkeit mit angelegten Datenbanken [178]. Das klassische Referenzspektrum wird in den meisten Fällen mit 70 eV an Ionisierungsenergie vermessen. Von Nachteil ist die EI allerdings bei der Berechnung des Molekulargewichts, da eine Energie von 70 eV so hoch ist, dass die Fragmentierung gegenüber der CI nur einen sehr kleinen Molpeak generiert. Für die Berechnung des Molekulargewichts einer unbekannt Substanz eignet sich besonders gut die chemische Ionisation bzw. das Ausweichen auf eine andere Ionisierungstechnik, wie die Elektrosprayionisation (ESI) [176].

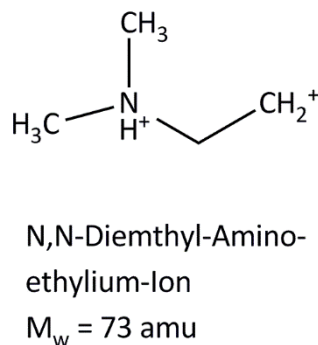
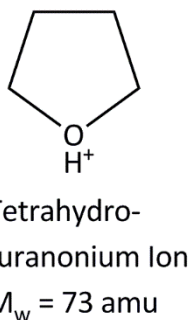
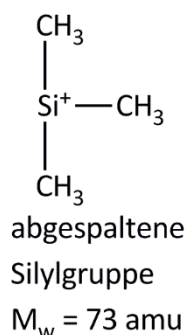
Nach der Ionisierung werden die Ionen durch Serienschaltung einzelner Extraktions - und Fokussierlinsen in einen Ionenstrahl gebündelt und einer Gleichspannung ausgesetzt, die die Ionen beschleunigt. Die beschleunigten Ionen werden zu den Quadrupolstäben geleitet. Ein Quadrupol ist so aufgebaut, dass gleichzeitig eine hochfrequente Wechselspannung mit einer überlagerten Gleichspannung an jedem einzelnen Stab anliegt. Durch die Änderung der Frequenz der Wechselspannung oder der Gleichspannung können nur bestimmte Masse / Ladungsverhältnisse durch die Stäbe gelangen. Falls das Ion mit einem bestimmten Masse / Ladungsverhältnis nicht der passenden Wechselspannungsfrequenz und Gleichspannung ausgesetzt ist, die das Ion zwischen den Stäben halten kann, kollidiert das Ion mit dem Stab und es kommt zur Impaktion. Durch Veränderung der Frequenz oder Spannung, können bestimmte Massenbereiche definiert werden, die den Detektor am Ende der Stäbe erreicht [176]. Man kann die Frequenzen und Spannung so definieren, dass die Sensitivität bestimmter Massenbereiche erhöht wird. Wenn man zum Beispiel nur Moleküle mit einem Massenbereich bis 200 Da bestimmen möchte, kann man die Frequenz und Spannung so adaptieren, dass die Massen > 200 Da das Ende des Stabes nicht erreichen. Die Änderungen der Frequenzen und Spannungen an den Stäbe sollten nur geschulten und fortgeschrittenen Anwendern vorbehalten sein [179].



**Abb. 33** Aufbau und Prinzip eines Quadrupol

### 1.11.3 Fragmentierungsreaktionen bei der Elektronenstoßionisation - Massenspektrometrie

Die Interpretation von Massenspektren wird in den meisten Fällen (EDV - gestützt) durch Abgleich mit hinterlegten Referenzspektren vollzogen [180]. Das Wissen über die wichtigsten Zerfallsreaktionen bei der Ionisation ist für die Qualität der Aussage wichtig, da durch Matrixeffekte Überlagerungen von Peaks möglich sind und der hinterlegte Algorithmus zum Abgleich der Spektren zu falschen Aussagen führen kann. Ein weiterer wichtiger Punkt wird durch den *single – ion - monitoring* Modus (SIM) beigesteuert (s. **Kap. 2.3.2.3 Quantitative Analyse mithilfe der internen Standardmethode**), da charakteristische Massen der EDV vorgegeben werden, die falsche Ergebnisse liefern können. Hierzu wird ein kurzes Beispiel hinzugezogen. Im SIM - Modus gibt man der EDV vor, eine Masse von 73 amu in einem bestimmten Zeitfenster zu scannen. Die Masse 73 amu ist sehr unspezifisch, wie **Abb. 34** zeigt. Alle drei Strukturen liefern die Masse 73 und führen so eventuell zu falschen Interpretationen der Analysenergebnisse.



**Abb. 34** Massenfragmente der Masse 73

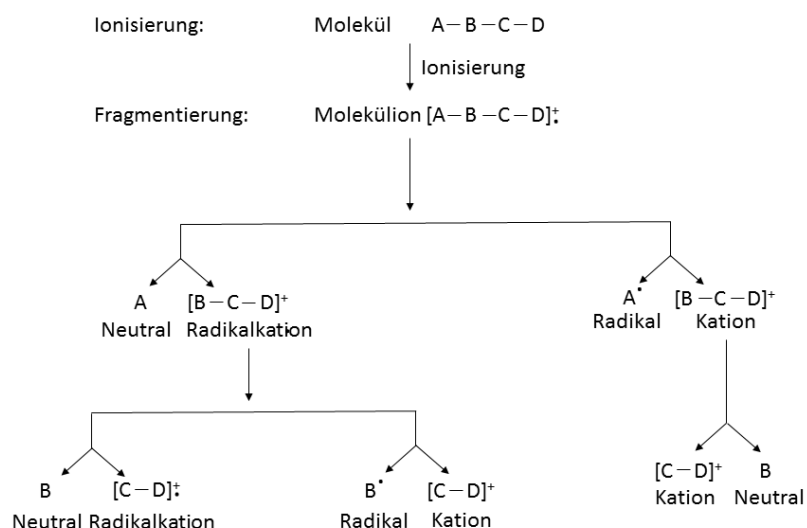
Um die Qualität der Analysenergebnisse zu steigern, sollte man Massenfragmente wählen, die zwar in hoher Anzahl auf den Detektor treffen (Erhöhung der Nachweisgrenze), die aber trotzdem noch eine qualitative Beurteilung der Messergebnisse zulässt. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Etablierung der SIM - Parameter mindestens drei Massen ausgewählt. Hierzu wird ein Massenfragment, was nur diese Substanz aufweist (Molmasse - 1 / 2 / 3 amu) gewählt. Hinzu kommen eine hohe typische Masse und eine niedrige allgemeine Masse (sogenannte *Qualifier*). Um die Massenfragmente richtig etablieren zu können, bedarf es Wissen über die typischen Fragmentierungen in der Elektronenstoßionisation [169].

Mc Lafferty und Kollegen haben versucht, typische Fragmentierungsreaktionen in der EI einer Gesetzmäßigkeit zu unterstellen [181]. Sie entwickelten ausgehend von der organischen Chemie, sowie der physikalischen Eigenschaften der Substanzen einfache Regeln der Fragmentierung [169]. Grundsätzlich haben Fragmentierungsreaktionen drei zu unterscheidende Charakteristika zu anderen chemischen Reaktionen. Laut Rucker et al. 2008 sind Fragmentierungsreaktionen

- monomolekular → Teilchenzusammenstöße in der Ionenquelle finden kaum statt
- endotherm
- kinetisch kontrolliert → es werden die Teilchen bevorzugt im MS registriert, die am schnellsten gebildet werden [169].

Die Fragmentierung findet nach der Kollision mit Elektronen, welche aus dem Wolfram - Filament emittiert werden, statt. In den meisten Fällen wird ein Radikal aus dem Molekül herausgeschlagen und es entstehen Radikalkationen, die einen sehr reaktiven Charakter zeigen. Folgende Möglichkeiten sind nach der Ionisierung möglich.

- Umlagerung oder Abspaltung eines Neutalmoleküls zu stabileren Radikalkationen.
- Eliminierung des radikalischen Elektrons durch Abspaltung von Radikalen und der Ausbildung von Kationen [137]; [138]; [141].

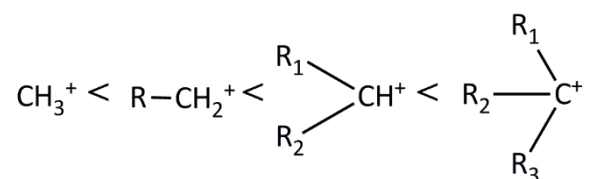


**Abb. 35 Möglichkeiten der Fragmentierung nach erfolgter Ionisierung durch Elektronenstoßionisation**

Das in **Abb. 35** dargestellte Schema der möglichen Fragmentierungen gilt nur für Moleküle mit gerader Anzahl von Elektronen.

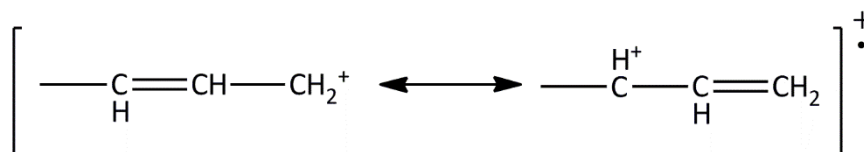
Die Spaltungsreaktionen werden an dieser Stelle kurz genannt und erläutert. Weiterführende Literatur zum Thema Fragmentierung ist in der aufgeführten Literatur zu finden [137]; [138]; [141]; [145].

Als erste wichtige Fragmentierungsreaktion ist die Alkylspaltung zu nennen. Nach erfolgter Ionisierung wird das Kation gebildet, welches am besten durch induktive Effekte (+ I -Effekt) am besten stabilisiert werden kann. Es kann folgende Stabilisierung der Moleküle postuliert werden [182]<sup>1</sup>:



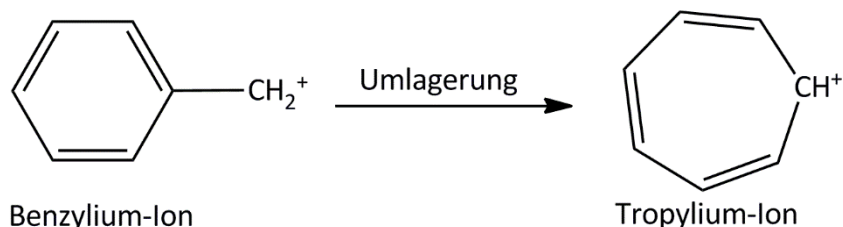
**Abb. 36 Reihenfolge der Stabilisierung von Alkylresten nach Ionisierung**

Die zweite Fragmentierung betrifft Allylspaltungen. Hier wird die Spaltung in Allylposition zur Doppelbindung vollzogen, da das entstehende Radikalkation über mesomere und eventuell (abhängig vom Grad der Verzweigung) induktive Effekte stabilisiert werden kann. Folgender Übergangszustand kann formuliert werden [182].



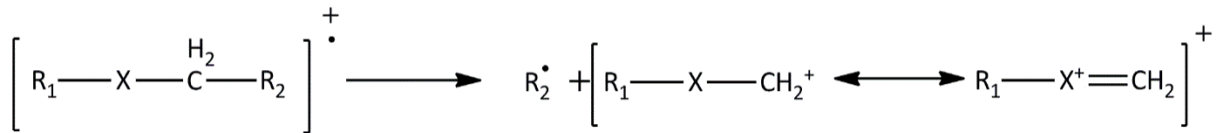
**Abb. 37 Stabilisierung des Radikalkation mit Allylstruktur.**

Die dritte Fragmentierung ist die Benzyl - und Tropyliumspaltung, bei sich ein Benzylum - Ion in ein Tropylium - Ion umlagert. Die Stabilisierung beider Zustände wird hauptsächlich über mesomere Effekte (+ M) bewirkt. Der induktive Effekt (+ Effekt) spielt nur eine untergeordnete Rolle.



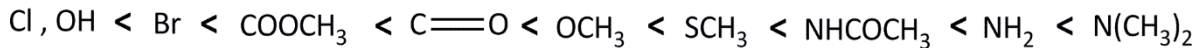
**Abb. 38 Umlagerung des Benzylum - Ion zum Tropylium - Ion**

Die  $\beta$  - Spaltung oder Oniumspaltung beschreibt ähnlich der Allylspaltung eine Spaltung an der  $\beta$  - Position zu einem einfach gebundenen Heteroatom (N, O, S). Auch dieser Zustand wird durch einen + M - Effekt stabilisiert.



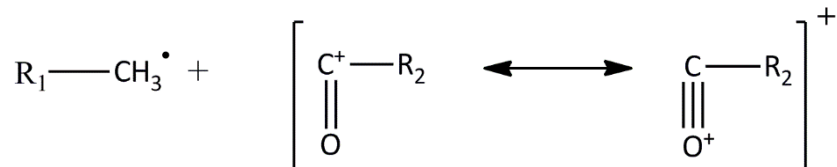
**Abb. 39 β - Spaltung mit Heteroatomen**

Auch bei der β - Spaltung gibt es eine Reihenfolge wie die Kationen sich in Abhängigkeit der stabilisierenden funktionellen Gruppe stabilisieren können (s. **Abb. 40**).



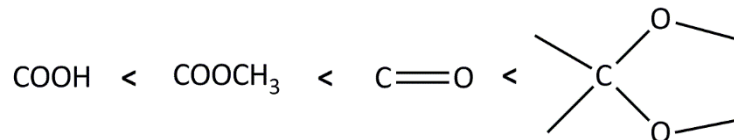
**Abb. 40 Reihenfolge der Stabilisierung von Kationen in Abhängigkeit des Heteroatoms**

Als letzte Spaltung wird an dieser Stelle die α - Spaltung erläutert. Carbonylverbindungen werden bevorzugt an der α - Position gespalten. Auch hier tragen + M Effekte zur Stabilisierung bei.



**Abb. 41 α - Spaltung bei Carbonylverbindungen**

Auch bei der α - Spaltung gibt es in Abhängigkeit der Carbonylverbindungen Gruppen, die durch mesomere Effekte den kationischen Zustand besser stabilisieren können (s. **Abb. 42**).



**Abb. 42 Reihenfolge der Stabilisierungskapazität von Carbonylverbindungen**

Mit diesen beschriebenen Fragmentierungsregeln können bereits eine ganze Menge an Massenspektren interpretiert werden. Entscheidend ist die zusätzliche Beurteilung der Spektren neben dem computergestützten Spektrenabgleich, da die hinterlegten Algorithmen teilweise unzureichende Aussagen über die Substanzen generieren.

## 1.12 Fragestellungen der Dissertation

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit (s. **Kap. 3.1 Hepatische Ketogenese in Abhängigkeit unterschiedlicher Diäten**) wird die Fragestellung beantworten, inwieweit unterschiedliche Diäten das Ergebnis eines ischämischen Schlaganfalls (90 min.) auf pharmakokinetischer Ebene beeinflussen. Hierbei wird der Fokus auf die zwei Metaboliten Glukose und BHB gelegt.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wird die Fragestellung verfolgt, welche Effekte die akute Gabe von BHB bei Reperfusion auf die pharmakodynamischen (Neuroscore; Atmungskettenkomplexe; Citratsynthase) sowie die pharmakokinetischen Parameter (BHB - und Glukosespiegel) nach 24 h hat.

Im dritten Teil wird die Fragestellung der richtigen Etablierung und Validierung der GC - MS Analytik anhand der geltenden *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use* (ICH - Q2(R1)) betrachtet und in den industriellen Kontext für die Validierung gesetzt. Die Etablierung und Validierung der GC - MS Analytik stellt eine Bedingung für die Beantwortung der ersten und zweiten Fragestellung dar.

## 2. Material und Methoden

Das Kapitel 2 der vorliegenden Arbeit ist der gesamte Material und Methodenteil, der in drei Unterkapitel gegliedert ist. Das erste Unterkapitel beschäftigt sich mit den verwendeten Materialien und Gerätschaften, die man für die transiente Induktion eines Schlaganfalls benötigt. Das zweite Unterkapitel beschreibt die Materialien und Gerätschaften für die verwendeten Verhaltenstests und die mitochondriale Atmung. Im letzten Unterkapitel wird die GC - MS Analytik vorgestellt werden, wobei hier der Fokus auf die verwendeten Materialien, Gerätschaften und vor allem die Anleitung zur Bedienung im Fokus stehen werden.

### 2.1 Material und Methoden für den Schlaganfall und die Mikrodialyse

Im Folgenden werden die verwendeten Geräte und Materialien für die Induktion des Schlaganfalls, sowie die Durchführung der Mikrodialyse, tabellarisch aufgeführt. Im Anschluss daran werden die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Methoden näher erläutert.

#### 2.1.1 Materialien und Geräte

##### 2.1.1.1 Geräte

| Gerät                           | Hersteller                                  |
|---------------------------------|---|
| Aktivatorstift                  | UHU, Bühl, D                                |
| Alkoholtupfer                   | B. Braun, Melsungen, D                      |
| Anästhesieeinheit               | Kent Scientific Corporation, Torington, USA |
| Beckman Microfuge R             | Beckman & Coulter GmbH, Krefeld, D          |
| Beckman Zentrifuge Allegra 6R   | Beckman & Coulter GmbH, Krefeld, D          |
| Bepanthen Augen- und Nasensalbe | Bayer, Leverkusen, D                        |
| Cyanacrylat Gel Kleber          | UHU, Bühl, D                                |
| Cyanacrylat Plastik Kleber      | Henkel, Düsseldorf, D                       |
| Dentalbohrer (RF 104018)        | Firma Hager & Meisinger, Neuss, D           |



|  |  |
|--|--|
| Dentalzement + Primer                    | Ivoclar Vivadent, Multilink Automix, Schaan, Lie |
| Dialysemembran AN69 HF                   | Hospal Industrie, Meyzieu, F                     |
| Elektrokoagulator                        | Fine Science Tools, Heidelberg, D                |
| Elma S30 H (Ultraschallbad)              | Elma Schmidbauer GmbH, Singen, D                 |
| Eppendorf-Gefäße                         | Greiner Bio-One, Frickenhausen, D                |
| Fäden zur Ligation 18020-60              | Fine Science Tools, Heidelberg, D                |
| Gewebekleber Vet Glu                     | B. Braun Vet Care, Tuttlingen, D                 |
| Gewebeschnneider                         | McIlwain, Redding, USA                           |
| Glaskapillare (Fused Silica, 0,074 mmID) | Polymicro Technologies, Kehl, D                  |
| Hamilton Präzisionsspritzen              | Hamilton, Reno, USA                              |
| Heißkleber Gluematic 3002                | Steinel, Herzebrock - Clarholz, D                |
| Heizpad mit Rektalsonde                  | Harvard Instrument, Holliston, USA               |
| Kaltlichtbeleuchtung PL 2000             | Optech, Belgrade, USA                            |
| Klemmen                                  | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D                     |
| Laser Doppler                            | Moor Instruments, Devon, UK                      |
| Mausadapter                              | Harvard Instrument, Holliston, USA               |
| MCAO-Fäden 6-0 2523PK10                  | Doccol, Redlands, CA, USA                        |
| Milli-Q Akademische Wasserfilteranlage   | Millipore, Billerica, USA                        |

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| My Block (Heizblock)                 | Benchmark Scientific, Edison, USA                |
| PE Schlauch (0,38 mm ID)             | Hartenstein, Würzburg, D                         |
| pH Meter InoLab pH Level 1           | WTW, Weilheim, D                                 |
| Plastik - Laborverbrauchsmaterialien | Greiner Bio-One, Frickenhausen, D                |
| Präparier - und Operationsbesteck    | Fine Science Tools, Heidelberg, D                |
| Präzisions – Pipetten                | Abimed, Langenfeld, D                            |
| Präzisionspritze 1 ml                | Hamilton, Reno, USA                              |
| Präzisionspritzenpumpe KDS200        | KDScientific, Holliston, USA                     |
| Promax 1020 (Plattformschüttler)     | Heidolph Instruments, Schwabach, D               |
| Silikonkleber IBF - Ferrotherm 5 - n | IBF Chemotechnik Elektronik, D                   |
| Skalpell                             | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D                     |
| Sonic Dismembrator mit Sonotrode     | Thermo Fischer Scientific, Waltham, Masach., USA |
| Stereomikroskop Omano (OM99 - V15)   | The Microscope Store, Wirtz, USA                 |
| Stereotakt                           | Stoelting, Chicago, USA                          |
| Sterican Kanülen                     | B. Braun, Melsungen, D                           |
| Univentor 400 Anaesthesieeinheit     | TSE systems, Bad Homburg, D                      |
| Wasserbad 1003                       | GFL, Burgwedel, D                                |
| Wasserbad Thermomix 1441             | B. Braun, Melsungen, D                           |

*Tab. 6 Verwendete Geräte*

### 2.1.1.2 Verwendete Tiere und Tierhaltung

Alle vorgenommenen Interventionsstudien in dieser Dissertation wurden an weiblichen CD - 1 Mäusen durchgeführt. Um die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der gemessenen Endpunkte zu gewährleisten, wurden für alle Versuche weibliche CD - 1 Mäuse mit einem Gewicht von 29 - 32 g pro Maus gewählt. Dieses Gewicht entspricht einem Alter von 6 - 8 Wochen. Der CD - 1 Mausstamm ist ein Auszuchtstamm, der im Labor von Dr. de Coulon in Lausanne (Schweiz) gezüchtet wurde [183]. CD - 1 Mäuse zeichnen sich durch hohe Widerstandsfähigkeit bei chirurgischen Eingriffen aus. Des Weiteren finden CD - 1 Mäuse Anwendung in Sicherheits - und Wirksamkeitsstudien, onkologischen Fragestellungen und Verhaltenstestungen [183] - [186]. Um die Inzucht unter den CD - 1 Mäusen zu überprüfen, hat die Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) 110 Genloci gescreent und einen durchschnittlichen heterozygoten Charakter von 28,1 bzw. 28,9 % gemessen [183], [184]. Somit kann man von einer Zucht mit stabilen Auszuchtkriterien ausgehen.

Alle Mäuse wurden 7 Tage vor den geplanten Studien aus dem hausinternen Tierstall in den Labortierstall transferiert, um die Tiere an die veränderten Bedingungen zu gewöhnen. Die allgemeinen Haltungsbedingungen wurden aus den GV - Solas (Gesellschaft für Versuchstierkunde / Society of Laboratory Animal Science) Leitlinien und den gesetzlichen Regelungen (86 / 609 / EEC) abgeleitet und lauten wie folgt: Raumtemperatur 20 - 22 °C, Luftfeuchtigkeit 40 - 60 %, 12 h Tag -/ Nachtzyklus, Futter und Wasserversorgung *ad libitum*, Einstreu, Zellstoff und Laufröhren als Umgebungsanreicherung [183]; [184]; [188]. Die Käfige (Makrolon; Maße: 43 x 28 x 15 cm) wurden alle 7 Tage gereinigt und mit neuem Einstreu, Zellstoff und Laufröhren versehen.

### 2.1.1.3 Verwendete Diäten

In der vorliegenden Arbeit kamen 3 unterschiedliche Diäten zum Einsatz, die im Folgenden erläutert werden.

Im Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler wird das von Altromin International (Lage, Deutschland) hergestellte Haltungsfutter für Nager verwendet [189]. Die genaue Bezeichnung lautet 1326, wobei 132 für die Erhaltungsdiät (nicht phytoestrogenarm) und die am Ende stehende Zahl 6 für die Pelletgröße, kennzeichnend ist.

Die von Frau Schwarzkopf in Auftrag gegebene anaplerotische Diät bestand im Wesentlichen aus Triheptanoin als Fettkomponente, einem dreifach mit Heptanoat verestertem Glycerolgrundgerüst. Das Rohöl wurde ursprünglich von der Firma Sasol (Brunsbüttel, Deutschland) produziert, wurde aber von der Firma B. Braun (Melsungen, Deutschland) zur Verfügung gestellt [190].

Um eine Kontrolle für die Triheptanoindiät zu etablieren, wurde ein auf Sojaöl basierendes Öl als Fettkomponente benutzt [191]. Hierbei wurde versucht, die Diätzusammensetzung so zu konzipieren, dass der Fettanteil isokalorisch ausgetauscht wurde [192]. Die genaue Zusammensetzung ist in **Tab. 7** dargestellt.

| Name der Diät                  | Altromin 1326 | Triheptanoin | Sojaöl |
|--------------------------------|---------------|--------------|--------|
| Metabolische Energie [kcal/kg] | 3188          | 3208         | 3209   |
| kcal aus Protein [%]           | 24            | 17           | 17     |
| kcal aus Fett [%]              | 12            | 35           | 35     |
| kcal aus Kohlenhydraten [%]    | 64            | 48           | 48     |
| Roh Protein [%]                | 14,9          | 17,6         | 17,6   |
| Roh Fett [%]                   | 4,1           | 16,4         | 5,4    |
| Roh Ballaststoffe [%]          | 7,1           | 6,0          | 6,0    |
| Ascheanteil [%]                | 6,5           | 5,4          | 5,4    |
| Monosaccharide [%]             | 0             | 0            | 0      |
| Disaccharide [%]               | 3,8           | 10,7         | 10,7   |
| Polysaccharide [%]             | 39,7          | 24,4         | 35,0   |
| L-Cystin [%]                   | 0,3           | 0,3          | 0,3    |

*Tab. 7 Diätzusammensetzung*

Alle Tiere bekamen 14 Tage vor Beginn der Experimente die jeweilige Diät inklusive Trinkwasserversorgung *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.1.4 Mikrodialyse

Die Mikrodialyse ist ein minimalinvasives Verfahren, bei dem es durch passive Diffusion zu einem Konzentrationsausgleich zwischen zwei Kompartimenten kommt. Der Konzentrationsausgleich erfolgt hierbei durch kollektive Diffusion über eine semipermeable Membran, die (je nach Eigenschaften) hydrophile oder lipophile Eigenschaften haben kann. Kleine gelöste Moleküle, je nach ihrem Gradienten, können die Membran passieren. Die zugrundeliegende Gesetzmäßigkeit der kollektiven Diffusion wird mit dem 1. Fick'schen Gesetz beschrieben:

$$J = -D * \frac{\partial c}{\partial x}$$

*Gleichung 21. Fick'sches Gesetz*

Hierbei ist J die Teilchenstromdichte mit der Einheit  $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}\right]$ ,  $\frac{\partial c}{\partial x}$  der Konzentrationsgradient mit der Einheit  $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^4}\right]$  und D der Diffusionskoeffizient mit der Einheit  $\left[\frac{\text{m}^2}{\text{s}}\right]$ . Die Proportionalität zwischen Teilchenstromdichte J und Konzentrationsgradient wird durch den Faktor D hergestellt. Da die Teilchenstromdichte entgegen der Diffusionsrichtung erfolgt, hat der Diffusionskoeffizient ein negatives Vorzeichen. Um diese Gesetzmäßigkeit auf die Mikrodialyse zu übertragen, besteht zwischen dem Extrazellularraum (EZR) und dem Innenraum der Sonde ein Konzentrationsgradient. Dieser Gradient wird durch die Durchspülung (2  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) mit isoosmolarer Salzlösung (= artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF)) aufrechterhalten, sodass sich immer wieder neue Gleichgewichte einstellen können. Allerdings ist die Durchflussgeschwindigkeit so zu wählen, dass sich zwar eine Anreicherung in der Spüllösung vollziehen kann, aber die Geschwindigkeit nicht zu schnell sein darf, sodass sich die Gleichgewichtsbildung bereits vollzogen hat. In der vorliegenden Arbeit wurden immer 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  als Durchflussgeschwindigkeit gewählt. Die Diffusion wird wesentlich durch die Einflussfaktoren Temperatur, Molekulargewicht, Poren- und Gesamtfläche der Membran, sowie die Ladung der diffusiblen Substanzen bestimmt. Im Folgenden sollen spezifische Termini zur Mikrodialyse erklärt werden. Die sogenannte maximal passierbare Molekülgröße (*cut - off*) wird in Da

angegeben und beschreibt das Molekulargewicht in Dalton, bei den 80 % der Moleküle gehindert werden, die Membran zu passieren [193].

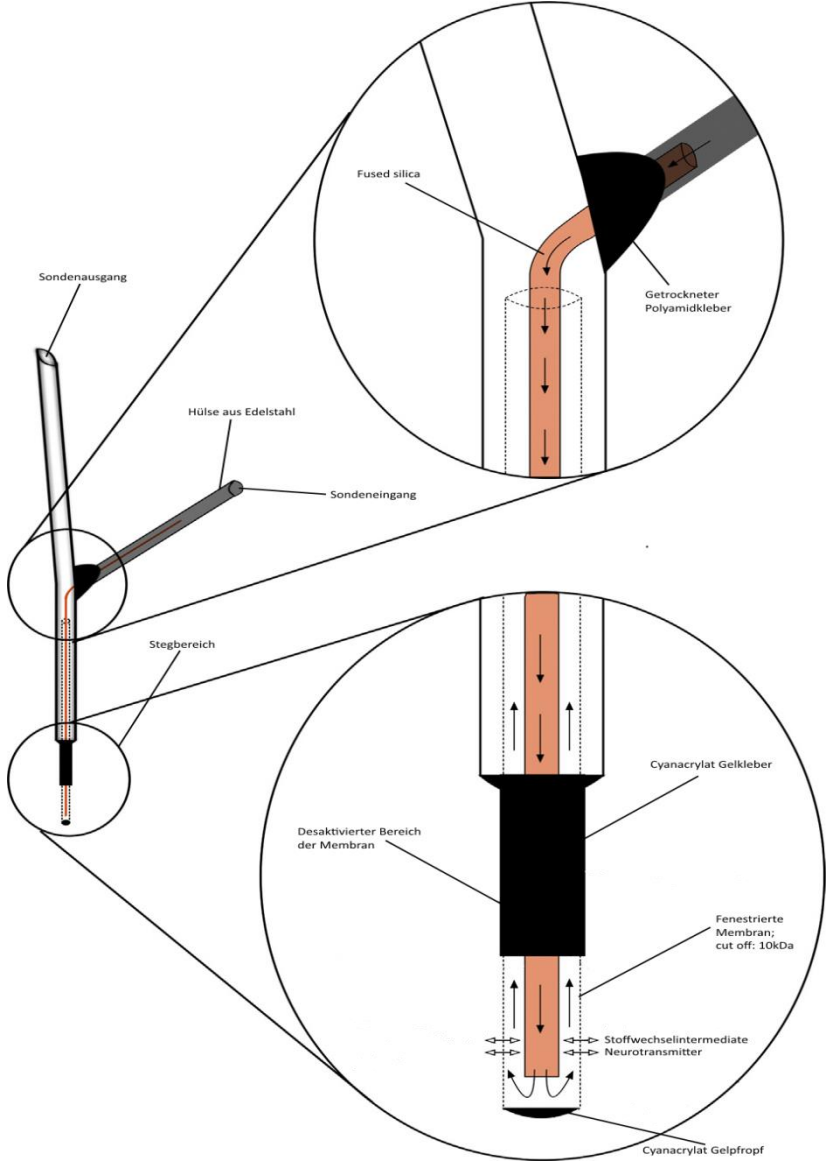
#### 2.1.1.4.1 Aufbau und Funktionsweise der Mikrodialysesonden

Die Mikrodialysesonden im Arbeitskreis sind selbstgefertigt. Der Bau, sowie die Komponenten zum Bau wurden aus einem bestehenden Protokoll modifiziert und werden im nächsten Kapitel im Detail erläutert [194]. Aufgrund der erhöhten Kosten von kommerziellen Mikrodialysesonden gibt es mittlerweile mehrere Arbeitskreise, die ihre Sonden selbst anfertigen [193] – [195].

Der Aufbau der Mikrodialysesonden ist Y - förmig und besteht im Wesentlichen aus einem Sondeneingangs -, einem Sondenausgangsbereich sowie einem Stegbereich mit Membran (s. **Abb. 43**). Ein Stahlmandrin wird über die Quarzglas Kapillare gestülpt und stellt den Sondeneingangsbereich dar. Hier kann der Polyethylen - Schlauch (PE), ausgehend vom Perfusor, angeschlossen werden. Der linke Schenkel der Y - förmigen Mikrodialysesonde stellt den Sondenausgangsbereich dar und kann zum leichteren verbinden angeschragt werden. Der Stegbereich wird durch den PE - Schlauch, die *fused-silica* und die Dialysemembran aufgebaut. Die Membran ist so mit Silikonkleber modifiziert, dass eine Austauschfläche von 2 mm resultiert. Um die Dichtigkeit der Sonde zu gewährleisten, wird der untere Stegbereich der Sonde mit Gelkleber verschlossen.

Die Funktionsweise soll anhand **Abb. 43** erläutert werden [197]. Man benötigt einen Perfusor, der mit einer 1 ml Hamiltonspritze (mit aCSF) bestückt wurde. Nun verbindet man den Sondeneingang über einen PE - Schlauch mit der Hamiltonspritze. Bei konstanter Durchflußgeschwindigkeit (2 µl/min) wird die Sonde über die Quarzglas Kapillare durchströmt. Am unteren Ende der Quarzglas Kapillare strömt aCSF aus der Öffnung. Durch den hydrodynamischen Druck steigt die aCSF - Lösung in der Sonde Richtung Sondenausgang. Der fenestrierte, nicht desaktivierte Teil der Membran wird dadurch geflutet und es kommt zur Gleichgewichtseinstellung mit dem Extrazellularraum des jeweiligen Hirnkompartmentes. Über den Sondenausgang kann das Dialysat entweder über eine Pipettenspitze oder über einen Ausgangsschlauch mit angeschlossenem Kollektor gesammelt werden. Um eine schärfere Fraktionstrennung (vor / während / nach t - MCAO)

zu gewährleisten, wurde in der vorliegenden Arbeit grundsätzlich mit der Pipettenspitzenvariante gearbeitet, da die Spitzen nach der Fraktion verworfen werden können. So werden Adhäsion - oder Kohäsionsphänomene im PE - Schlauch verhindert.



**Abb. 43** Mikrodialyse-sonde modifiziert nach Lietsche et al. 2014

#### 2.1.1.4.2 Bau der Mikrodialyse-sonde

Am Anfang schneidet man einen PE - Schlauch (ID = 0,38 mm) in 25 mm lange Stücke, die an einem Ende jeweils angeschrägt geschnitten werden. Das angeschrägte Abschneiden bedingt eine leichtere Handhabung beim Anschließen des Ausgangsschlauches bzw. der Filterspitze an die Dialyse-sonde am implantierten Tier. Danach schneidet man die Quarzglas-ka-pillare (ID = 0,074 mm) plan mit einer Länge von 20 mm ab. Um die beiden Teile miteinander zu verbinden benötigt man eine Kanüle (Sterican<sup>®</sup>, grau 27G x 3/4), die man durch den zuvor abgeschnittenen PE - Schlauch (ca. 4 - 6 mm) schiebt. Die Stelle, an der perforiert wird, ist entscheidend für die Steglänge der Sonde und sollte nach Perforation mit einem handelsüblichen Aktivator angeraut werden. Wenn in tiefere Kompartimente, wie zum Beispiel dem Hypothalamus, (Koordinaten: AP: - 0,9 mm; L: + 0,5 mm; DV: - 5,5 mm) implantiert wird, sollte eine längere Steglänge von 6 - 8 mm gewählt werden. Mithilfe der Kanüle lässt sich der PE - Schlauch leicht perforieren. Das entstandene Loch im PE - Schlauch sollte so klein wie möglich sein, da ansonsten die Dichtigkeit der Sonde nicht gewährleistet ist. Durch den Innenraum der Kanüle lässt sich die Quarzglas-ka-pillare mit etwas Fingerspitzengefühl hindurchschieben. Wenn man die Quarzglas-ka-pillare nun mit behandschuhten Fingern fixiert und die Kanüle aus dem perforierten PE - Schlauch zurückzieht, ist die Quarzglas-ka-pillare mit dem PE - Schlauch verbunden. Um eine dauerhafte Fixierung zu erwirken, wird das perforierte Loch mit Gelkleber verschlossen. Zuvor muss allerdings sichergestellt werden, dass die Quarzglas-ka-pillare 5 mm am unteren Ende aus dem PE - Schlauch herausragt. Nachdem der Kleber ausgehärtet ist, kann man die Dialysemembran über die fixierte Quarzglas-ka-pillare stülpen. Die Membran sollte soweit vorgeschoben werden, dass sie an die Klebestelle zwischen Quarzglas-ka-pillare und PE - Schlauch stößt. Wenn dieser Schritt vollzogen ist, muss man die Membran so am unteren Ende abschneiden, dass sie bezogen auf die Quarzglas-ka-pillare ca. einen halben mm übersteht. Um die Dichtigkeit der Sonde zu gewährleisten, wird auch hier ein Gelkleberpropf zum Verschließen der Sonde gesetzt. Hierzu benetzt man eine Kanüle mit Gelkleber und lässt den Kleber durch die Kapillarkräfte das Loch verschließen. Der Raum zwischen PE - Schlauch und Quarzglas-ka-pillare wird in diesem Bearbeitungsschritt ebenfalls mit Gelkleber verschlossen. Um den Sondeneingangsbereich zu stabilisieren, wird ein Metallmandrin mit planen Enden aus einer Kanüle (orange, 25 G x 1 1/2") präpariert, auf die Quarzglas-ka-pillare gestülpt und festgeklebt. Abschließend muss noch die Austauschfläche der Dialysemembran definiert werden. Hierzu wird der Kleber, der auf der Sonde verarbeitet wurde, über Nacht der Kleber aushärten gelassen, und am nächsten Tag wird die Austauschfläche unter einem Mikroskop mit 2 mm definiert. Das Ende des sich gebildeten Gelpfropfes dient als Anfang für die Markierung der Austauschfläche. Von diesem Punkt aus werden 2 mm am Steg abgemessen. Die restliche Fläche wird mit Silikonkleber deaktiviert.

Um eine einheitliche „Produktionsqualität“ pro angefertigter Charge zu erreichen, baut man 20-25 Sonden pro Herstellungszyklus. Die so fertiggestellten Sonden sollten im Studiendesign so verbraucht werden, dass die Gesamtanzahl der Sonden auf die unterschiedlichen Gruppen verteilt werden kann.

#### 2.1.1.4.3 Bau des Perfusionsschlauches und Auffangsystem für das Mikrodialysat

Für die Mikrodialyseversuche benötigt man zum Verbinden der 1 ml Präzisionspritze (Hamilton) mit der Mikrodialysesonde einen Eingangsschlauch. Der Ausgangsschlauch entfällt und wird durch eine desaktivierte Spitze, welche mit dem Ausgang der Mikrodialysesonde verbunden wird, ersetzt. Aufgrund der aus dem Schlaganfall induzierten Hemiparese kommt es mit zwei Schläuchen zu Verdrillungen, die zumeist irreparable Schäden am Schlauchmaterial hervorrufen und so das Ersetzen des Ausgangsschlauches durch eine desaktivierte Spitze rechtfertigen.

Für den Bau des Eingangsschlauches (ID = 0,28 mm) schneidet man ein 85 cm langes Stück PE - Schlauch ab. Danach nimmt man ein Stück Kupferdraht und schiebt es in das PE-Schlauchlumen. Der Kupferdraht dient als Stabilisator um das Adapterstück auf den PE - Schlauch zu stülpen. Das Adapterstück besteht aus einem 7 mm langen Tygonschlauch (ID = 0,38 mm), der auf das andere freie Ende des Kupferdrahtes aufgezogen wird. Nun kann man das Adapterstück mithilfe des Kupferdrahtes auf den PE - Schlauch stülpen. Um die Verbindung zwischen Tygonschlauch und PE-Schlauch zu fixieren, wird mit dem Aktivatorstift die Oberfläche angeraut und danach wird der Übergang mit Gelkleber fixiert.

#### 2.1.1.4.4 Perfusionslösung

Um die kollektive Diffusion der zu bestimmenden Analyte zu gewährleisten, bedarf es einer Elektrolytlösung (proteinfrei), die die gleiche Zusammensetzung wie die Liquorflüssigkeit besitzt. Hierzu muss eine sogenannte künstliche Zerebrospinalflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid = aCSF) hergestellt werden. Die Zusammensetzung ist in **Tab. 8** dargestellt.

| Substanz         | Reinheit [%]              | Konzentration [mM] |
|------------------|---------------------------|--------------------|
| Calciumchlorid   | 99-101 (komplexometrisch) | 1,2                |
| Kaliumchlorid    | ≥ 99,5 (argentometrisch)  | 2,7                |
| Magnesiumchlorid | ≥ 99,5 (komplexometrisch) | 1,2                |
| Natriumchlorid   | ≥ 99,5 (argentometrisch)  | 147                |

*Tab. 8 Zusammensetzung der artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF)*

#### 2.1.1.4.5 In vitro Wiederfindungsrate

Die in vitro Wiederfindungsrate (WR) beschreibt das Verhältnis zwischen der gemessenen Analytkonzentration im Dialysat und der Konzentration des gleichen Analyten in der Ausgangslösung, in der die Mikrodialyse stattfindet. In diese Lösung bekannter Konzentration wird eine Dialysemembran getaucht und mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 2 µl/min mit aCSF perfundiert. Es werden in zeitlichen Abständen (15 min) Fraktionen der Dialysate gesammelt und danach direkt vermessen. Von der Ausgangslösung werden ebenfalls 3 Proben entnommen. In der vorliegenden Arbeit wurden die WR von Glukose, Laktat, Pyruvat, BHB, Citrat, Myo - Inositol, Glutamat und GABA bestimmt.

Um die WR berechnen zu können, werden mit der jeweiligen analytischen Methode (GC - MS; CMA 600) die Konzentrationen der zu bestimmenden Analyte gemessen. Um die WR zu berechnen, wird die gemittelte Konzentration der Analyte aus dem Dialysat ins Verhältnis mit dem sich ergebenden Mittelwert der Ausgangslösung gesetzt.



$$WR = \frac{\emptyset \text{ Konz. Analyt im Dialysat}}{\emptyset \text{ Konz. Analyt in Ausgangslsg.}}$$

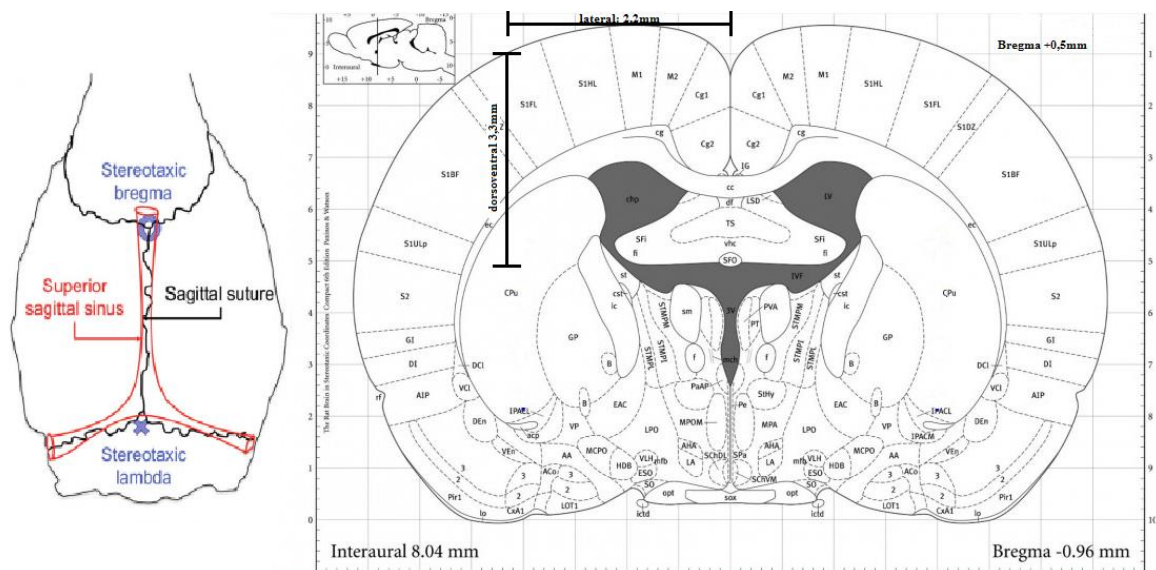
### **Gleichung 3 Berechnung der Wiederfindungsrate**

Die Bestimmung der WR kann mit ausgewählten Sonden einer Charge erfolgen oder man bestimmt die WR pro Sonde. Die letztgenannte Bestimmung der WR ist besonders aufwendig, da vor jedem Versuch die individuelle WR einer jeden Sonde bestimmt werden muss. Allerdings hat diese Methodik die geringsten Fehler in der statistischen Berechnung zur Folge, da jede Sonde mit ihrer eigenen Wiederfindungsrate korrigiert wird und nicht mit einem über mehreren Sonden gemittelten Wert (s. **Kap. 4.3.5 Wiederfindungsrate**).

#### **2.1.1.4.6 Sondenimplantation in das linke Striatum**

Die zu operierenden Tiere wurden, wie bereits im **Kap. 2.1.1.2 Verwendete Tiere und Tierhaltung** beschrieben, am Tag der OP in den OP - Raum verbracht. Der gesamte Arbeitsplatz wurde gereinigt und die benötigten Materialien wurden bereitgestellt. Eine spezielle Narkosekammer wurde unter Zuhilfenahme des Narkosevaporisators mit 5 % Isofluran in synthetischer Luft vorgeflutet. Nach ca. 3 min. Flutungszeit wurde die Maus in dieser Kammer narkotisiert und bei Eintreten des Toleranzstadiums in die Stereotakteneinheit verbracht. Hierzu gibt es einen speziellen Mausadapter für die OP-Einheit. Um die genaue Position der Maus während der OP zu gewährleisten, wurde die Maus mit zwei Stahlstiften an der linken bzw. rechten Kalottenseite leicht fixiert. Die Erhaltungsdosis an Isofluran für die OP wurde in Abhängigkeit der Atemtiefe/Atemfrequenz der Maus vorgenommen und lag im Mittel zwischen 1,5-2 % Isofluran in synthetischer Luft. Das Erreichen einer stabilen Narkose wurde anhand des Fehlens des Interdigitalreflexes, des Ausbleibens des Cornealreflexes und der Atemtiefe/Atemfrequenz festgestellt. Nach Ausbleiben des Cornealreflexes wurde der Maus noch Dexpanthenol-haltige Augencreme, zur Verhinderung des Austrocknens der Cornea, auf die Augen aufgetragen. Nach vorheriger Desinfektion der Schädelkalotte wurde eine Inzision an der Schädeldecke vorgenommen. Alle sich im OP-Situs befindlichen Häute wurden fein säuberlich freipräpariert bis die komplette Kalotte freigelegt war. Falls die unterschiedlichen Kalottenstrukturen wie Bregma und Lambda nicht mit dem bloßen Auge ersichtlich waren, konnte optional eine 3 % ige Wasserstoffperoxidlösung verwendet werden, um die Strukturen besser zu exponieren. Nun wurde von Bregma ausgehend + 0,5 mm in anteriore und + 2,2 mm in laterale Richtung eine Markierung gesetzt. Diese Markierung stellt die zweidimensionale Position des linken Striatums dar. Die genauen Koordinaten wurden aus der Literatur [198] entnommen. An der Markierung wurde mit dem Dentalbohrer, der mit einem extra dünnen Bohraufsatz für Mausapplikationen versehen ist, ein Loch gebohrt. Da die Mauskalotte sehr dünn ist und die Hirnhäute sehr stark, sowohl mit Nerven, als auch mit Arterien und Venen, versehen sind, sollte man sehr vorsichtig bohren, bis der initiale Widerstand überwunden wurde. Die drei Hirnhäute können nun vorsichtig perforiert werden, sodass das Gehirn an der Bohrstelle freigelegt worden ist. Jetzt kann die Sonde im rechten Winkel in den Stereotakten eingespannt werden. Um einen Anfang für die Tiefe der Sondenimplantation zu definieren, wurde die Benetzung mit Liquor beim Eintauchen der Sonde in das Gehirn verwendet. Wenn der untere Stegbereich der Sonde benetzt wurde, wird die Stereotakteneinheit so abgesenkt, dass man - 3,8 mm ventral in die Mitte des linken Striatums implantieren kann. Diese Koordinaten entsprechen genau dem Kernbereich des Schlaganfalls [199]. Zu diesem Zeitpunkt ist die Sonde bereits im richtigen Hirnkompartment implantiert worden, aber lediglich an den Stereotakten fixiert. Mithilfe von UV härtendem Zahnzement, wurde die Sonde irreversibel an der Kalotte fixiert. Der Zahnzement hat erst

dann optimale Verbindungseigenschaften mit der Kalotte, wenn er mit einer Primer-Lösung vorbehandelt wurde. Diese wird im gesamten Situs auf die Kalotte aufgetragen, allerdings darf sie auf keinen Fall in das gebohrte Loch gelangen, da ansonsten neurologische Nebenwirkungen auftreten könnten, die bis zum Krampfanfall oder Exodus letalis reichen. Nach einer gewissen Trockenzeit kann der Zement aufgetragen werden. Die Sonde wird nun aus dem Stereotakten entlassen und zur abschließenden Fixierung nochmals mit Zahnzement an der Kalotte fixiert. Die Haut an der Schädeldecke wird so mit dem Zement verklebt, dass sie zum einen die Wunde verklebt und zum anderen die Maus daran hindert, die Wunde permanent aufzukratzen. Nach erfolgter OP wird die Maus in den Mikrodialysekäfig transferiert und die Wundstelle mit 0,1 % iger Bupivacain - HCl-Creme versorgt. Bis zum vollständigen Erwachen der Maus wird die Maus überwacht. Falls die Maus Schmerzzeichen wie Piloerektion, stumpfes ungepflegtes Fell, Apathie oder ähnliche Symptome zeigt, wurde eine Nachsorge mit Buprenorphin (Temgesic) 0,1 mg/kg KG in zeitlichen Abständen von 8 h vorgenommen. Zur visuellen Beurteilung des Schmerzzustandes der Maus hat sich auch die Grimace scale von Langford et al. 2010 als nützlich herausgestellt [200]. Das operierte Tier bekam eine Regenerierungszeit von 24 h. Am Folgetag wurde die Operation zur Induktion des Schlaganfalls vollzogen. In dieser Zeit wurde dem Tier in seinem Käfig Wasser und die jeweilige Diät *ad libitum* zu Verfügung gestellt.



**Abb. 44 Sondenimplantation ins linke Striatum mit folgenden Koordination:**

**AP: + 0,5 mm; L: + 2,2 mm; DV: - 3,8 mm**

### 2.1.1.5 Transiente Okklusion der mittleren Zerebralarterie (t - MCAO)

Das *Kap. 2.1.1.5 Transiente Okklusion der mittleren Zerebralarterie (t - MCAO)* beinhaltet die unterschiedlichen Möglichkeiten, einen transienten Schlaganfall bei Tieren zu induzieren, sowie die Validierung der verwendeten Methodik.

#### 2.1.1.5.1 Methoden der transienten mittleren Zerebralarterienokklusion

Die transiente Okklusion der mittleren Zerebralarterie basiert auf einem Fadenmodell. Mit diesem Modell ist es möglich (ohne Kraniektomie), über die jeweiligen Karotiden extrakranial einen Faden nach intrazerebral zu führen, der dann die mittlere Zerebralarterie verschließen kann. In der Durchführung gibt es zwei unterschiedliche Methoden, erstens die Methode nach Longa et al. 1989 und zweitens die Methode nach Koizumi et al. 1986 [190], [201]. Die Koizumi - Variante bedingt den permanenten Verschluss der Arteria communis (ACC), wobei bei der Longa - Variante über die Arteria carotis externa (ACE) der Faden in die mittlere Zerebralarterie geschoben wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die Longa - Variante verwendet.

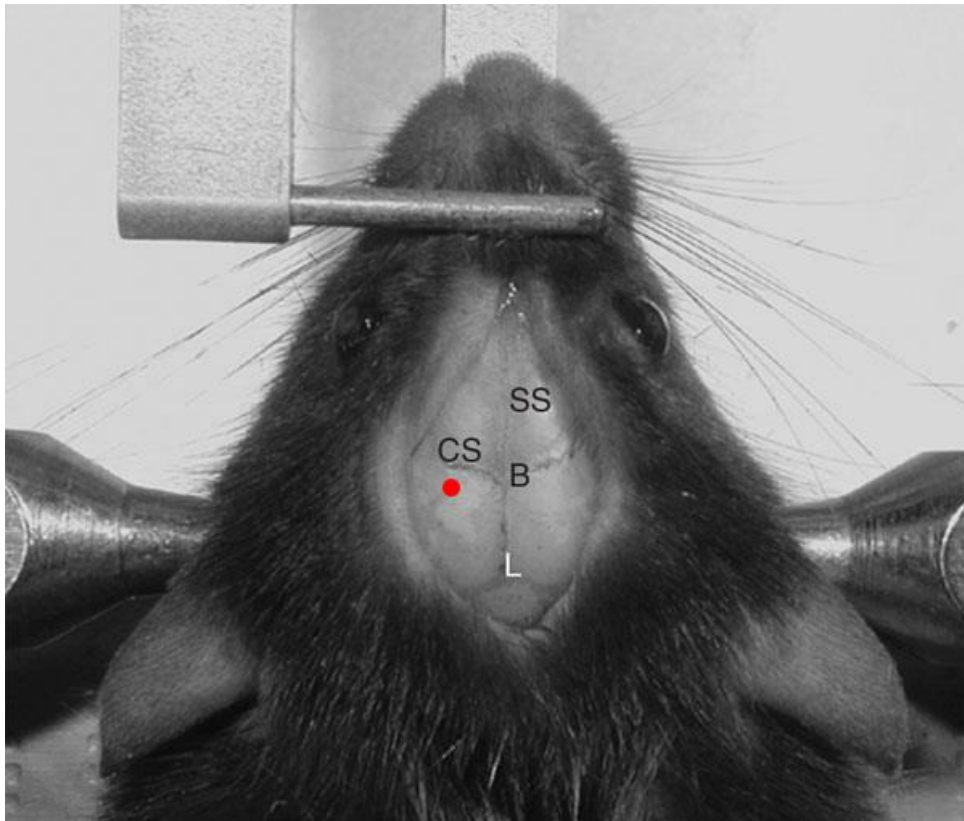


*Abb. 45 Faden zur Induktion des transienten Schlaganfalls mit Silikoncoating im vorderen Bereich.*

#### 2.1.1.5.2 Durchführung und Validierung der transienten Okklusion der mittleren Zerebralarterien

Initial wird die Maus 15 min. vor Beginn der Operation mit 0,1 mg/kg KG Buprenorphin (Temgesic®) analgisiert. Die Narkosekammer wird mit 5 % Isofluran in synthetischer Luft geflutet. Die Maus wird unter visueller Kontrolle der Atemfrequenz narkotisiert. Danach wird die Maus aus der Kammer herausgenommen und auf der OP-Einheit in Bauchlage fixiert. Die Isofluranerhaltungsdosis wird mit 2 - 2,5 % Isofluran in synthetischer Luft veranschlagt. Um ein Austrocknen des Cornealbereiches der Maus zu verhindern, werden die Augen mit einer dexpanthenolhaltigen Augencreme feucht

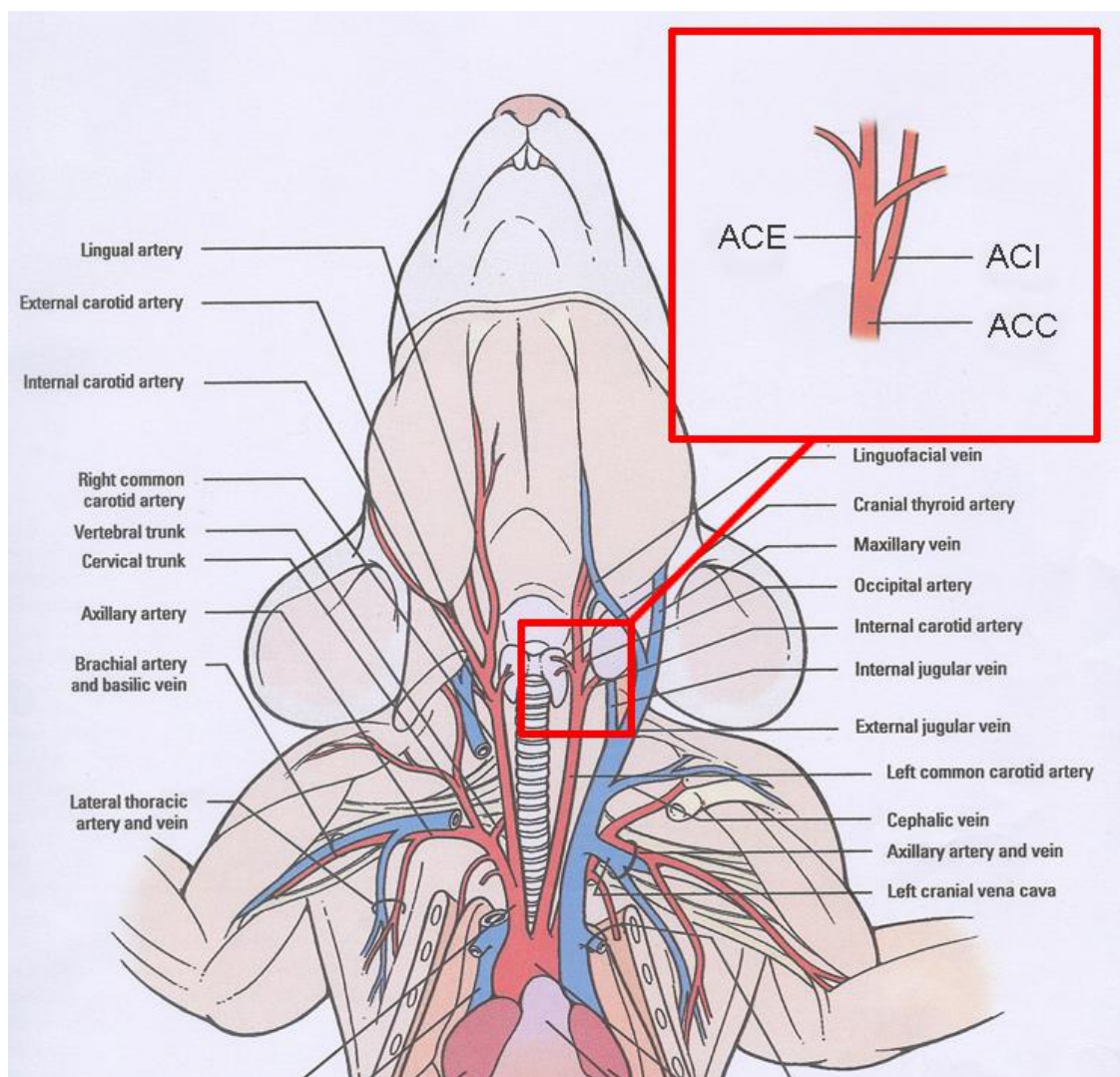
gehalten. Der Kopfbereich wird mit Alkoholpads desinfiziert (optional kann auch vorher der Schädelbereich rasiert werden). Um die basale Perfusion der mittleren Zerebralarterie zu erheben, wird eine etwa 2 cm lange longitudinale Inzision an der Kopfhaut vorgenommen. Danach werden die markanten Punkte (Lambda und Bregma) der Schädelkalotte gesucht. Falls Lambda und Bregma nicht ausreichend exponiert sind, kann eine 3 % ige Wasserstoffperoxid Lösung auf die Kalotte aufgetragen werden. Ausgehend von Bregma befindet sich die Stelle, an der die Perfusion der mittleren Zerebralarterie mittels eines Laser Dopplers gemessen werden kann, und zwar + 1 mm posterior und 3 – 3,5 cm medio lateral. Der Sondenkopf des Laser Doppler Gerätes wird dreimal über den oben beschriebenen Bereich geführt und die erhobenen Werte gemittelt.



**Abb. 46** Roter Punkt entspricht dem Messpunkt zur Bestimmung der mittleren Zerebralarterienperfusion mit Laser-Doppler Messsonde. B, Bregma; L, Lambda; CS, Koronarnaht; SS, Sagittalnaht. Modifiziert nach Rynkowski et al. (2008) [202]



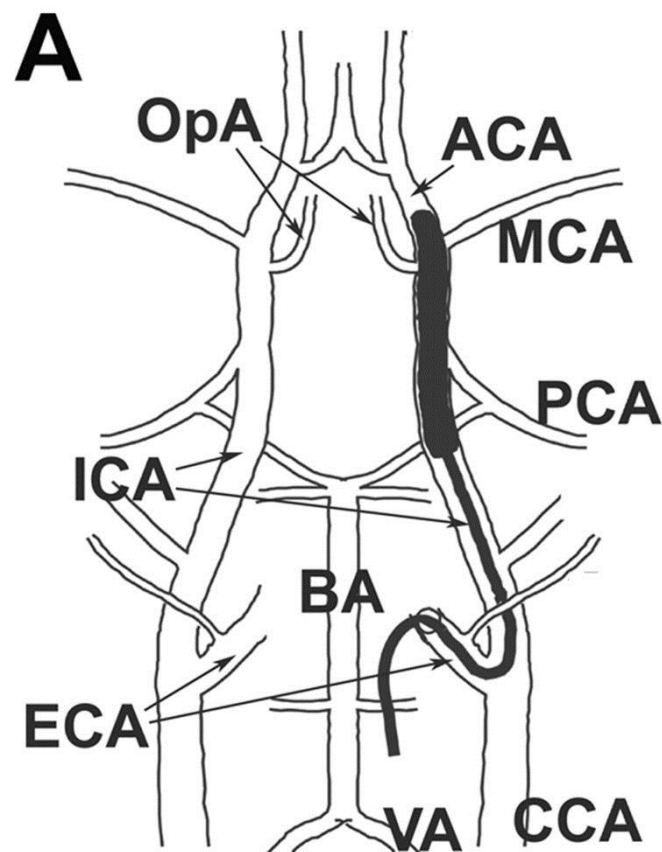
Nachdem die basale Perfusion der mittleren Zerebralarterie gemessen worden ist, kann die Maus in Rückenlage, mit leicht überstrecktem Halsbereich, verbracht werden. Auch hier wird der Halsbereich entweder rasiert und desinfiziert oder nur desinfiziert. Danach wird ein ca. 2 cm langer Medianschnitt von kaudal nach kranial durchgeführt, der zwischen dem Kopf- und dem Thoraxbereich liegen sollte. Als Orientierungshilfe zur Präparation kann man sehr gut den Sternohyoidalmuskel und den Sternocleidomastoidalmuskel verwenden. Um eine bessere Sicht auf den OP-Situs zu erhalten, verwendet man Spreizklammern. Nachdem die oberflächlichen Faszien freipräpariert wurden, geht man zwischen den zwei Muskeln paratracheal in dorsale Richtung, bis man die Arteria carotis communis freipräpariert hat. Wenn man an der ACC in kranialer Richtung präpariert, kann man irgendwann die Bifurkation der ACC in die Arteria carotis externa und interna erkennen (s. **Abb. 47**). Erst nach der Präparation der Bifurkation kann mit der eigentlichen Intervention begonnen werden.



**Abb. 47 Anatomischer Aufbau und Lage der hauptversorgenden Blutgefäße im Bereich des Halses bei Ratten und Mäusen. Modifiziert nach Schenk & Smith: Dissection Guide & Atlas to the Rat**

Hierzu legt man einen Faden um die ACC und unterbricht den Blutfluss mit einem temporären Knoten. Im weiteren Verlauf bindet man die ACE permanent und die ACI temporär ab. Die an der ACE abgehende obere Thyreoidarterie sowie die von der ACI abgehenden Occipital und Pteringopalatina

Arterien müssen mit einem Elektrokoagulator irreversibel ligiert werden. Nun nimmt man mit einer Mikroschere eine Inzision an der ACE unterhalb des Knotens vor. Nach Einführen des Silikonfadens bis zum Knoten an der ACC wird ein zusätzlicher Knoten um den Silikonfaden gebunden, der das Austreten des Fadens verhindern soll. Um die mittlere Zerebralarterie zu verschließen, schneidet man die ACE durch und nimmt den entstehenden Arterienstummel mit der Pinzette so auf, dass man durch leichtes Zurückziehen des Fadens, den Silikonkopf in die ACI vorschieben kann. Der temporäre Verschluss der ACI wird aufgehoben und der Faden mit Silikonkopf bis zur mittleren Zerebralarterie vorgeschoben. Beim Vorschieben des Fadens lässt sich ab einem gewissen Punkt ein leichter Widerstand ausmachen. Ab diesem Punkt ist der Enddurchmesser des Blutgefäßes, der sukzessive abnimmt, zu eng für den Silikonkopf und die mittlere Zerebralarterie ist verschlossen.



**Abb. 48** Schematische Darstellung des circulus arteriosus cerebri mit der optimalen Positionierung des beschichteten Fadens an der Abzweigung der mittleren Zerebralarterie. Modifiziert nach Steele et al. 2008 [203]. ACA = Anteriore Zerebralarterie; BA = Basillalarterie; ECA = externe Zerebralarterie; ICA = interne Zerebralarterie; OpA = Augenarterie; PCA = posterior Zerebralarterie; VA = Vertebralarterie;

Um die richtige Lage des Silikonkopfes zu validieren, vermisst man das herausragende Ende des Fadens (10 mm ab der ACE - Inzision) und bestimmt mit dem Laser - Doppler die zerebrale Perfusion in der gleichen Weise wie auch die basale Perfusion bestimmt wurde. Hierbei muss der Abfall der zerebralen Perfusion kleiner als 10 % des Ausgangswertes betragen. Ab diesem Punkt wurde die Zeit für die 90 min Ischämiedauer gestartet. Der OP - Situs wird mit Gewebekleber (VetGlu) an den Wundrändern verschlossen. Wenn der Faden die mittlere Zerebralarterie verschlossen hat, kann die Narkose ausgeleitet werden und die Maus in einem eigenen Käfig aufwachen.

### 2.1.1.5.3 Reperfusion

Alle hier beschriebenen Versuche wurden mit einer Ischämiedauer von 90 min. durchgeführt. Außerdem wurden die Mäuse innerhalb dieser Dauer einzeln gehalten. Nach 90 min. wurde das Procedere aus **Kap. 2.1.1.5 Transiente Okklusion der mittleren Zerebralarterie (t - MCAO)** wiederholt und der Faden wurde entnommen. Um auch die Reperfusion quantitativ zu erfassen bzw. das Auftreten von Sekundärembolien zu erkennen, wurde nach erfolgter Reperfusion eine abschließende Dreifachbestimmung der zerebralen Perfusion vorgenommen. Der Wert sollte 80 - 90 % des Ausgangswertes erreichen [204].

### 2.1.1.6 Studiendesign

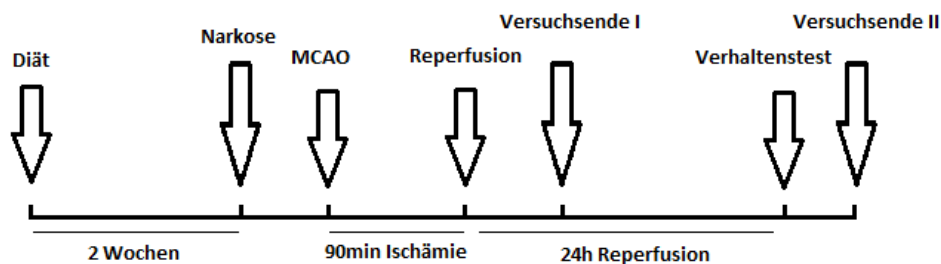
Die Tiere wurden zufällig in jeweils 6 Gruppen eingeteilt. Alle Tiere bekamen 14 Tage vor Beginn der Experimente die jeweilige Diät je nach Gruppenzugehörigkeit. In **Tab. 7** ist die Gruppenverteilung beschrieben.

| Gruppe | Altromin            | Triheptanoin        | Soja                |
|--------|---------------------|---------------------|---------------------|
|        | Schein <sup>1</sup> | Schein <sup>1</sup> | Schein <sup>1</sup> |
|        | Stroke <sup>2</sup> | Stroke <sup>2</sup> | Stroke <sup>2</sup> |

**Tab. 9 Studiendesign**

<sup>1</sup> Schein operierte Tiere bedeutet in diesem Fall, dass die unten beschriebene Methode zur Induktion des Schlaganfalls durchgeführt wurde, ohne den Faden in die mittlere Zerebralarterie vorzuschieben. Die Zerebralarterie war während der gesamten Dauer normal durchgängig.

<sup>2</sup> Stroke operierte Tiere erhielten die Operation, die zur Ischämie der Zerebralarterie für 90 min führte.



**Abb. 49 Zeitskala des Versuchsaufbaus**

In Teil 2 der vorliegenden Doktorarbeit wurde eine neuroprotektive Komponente der unterschiedlichen Diäten getestet. Endpunkt des Versuches war der Zeitpunkt nach 90 min. Ischämiedauer bzw. 60 min nach Reperfusion. Die Tiere wurden unter Isoflurannarkose dekapitiert, Vollblut wurde gewonnen und die Leberlobi entnommen. Das Vollblut wurde bei 1500 g, 20 min. bei 4 °C zentrifugiert und das erhaltene Plasma bei - 80°C bis zur Analyse zwischengelagert. Das Gehirn wurde nach Präparation in Hemisphären geteilt (beide Hemisphären ohne Cerebellum). Alle Kompartimente wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C bis zur Extraktion zwischengelagert.

## 2.2 Material und Methoden

Im Folgenden werden die Materialien und Methoden für das Projekt der Akutintervention mit BHB vorgestellt.

### 2.2.1 Geräte und Materialien

| Gerät                                    | Hersteller                          |
|--|-------------------------------------|
| Beckman Microfuge R                      | Beckman & Coulter GmbH, Krefeld, D  |
| Beckman Zentrifuge Allegra 6R            | Beckman & Coulter GmbH, Krefeld, D  |
| Eppendorf - Gefäße                       | Greiner Bio - One, Frickenhausen, D |
| Hamilton Präzisionspritzen               | Hamilton, Reno, USA                 |
| Milli - Q Akademische Wasserfilteranlage | Millipore, Billerica, USA           |
| Oroboros Oxygraph O2k                    | Oroboros Instruments, Innsbruck, AU |
| pH - Meter InoLab pH Level 1             | WTW, Weilheim, D                    |
| Potter Homogenisator Typ Potter S        | B. Braun, Melsungen, D              |
| Präparier- und Operationsbesteck         | Fine Science Tools, Heidelberg, D   |
| Präzisions - Pipetten                    | Abimed, Langenfeld, D               |
| Promax 1020 (Platten / Wellschüttler)    | Heidolph Instruments, Schwabach, D  |
| Quarzküvette 101 - QS 10 mm              | Zeiss, Jena, D                      |
| Skalpell                                 | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D        |
| Sterican Kanülen                         | B. Braun, Melsungen, D              |
| Thermomixer Comfort                      | Eppendorf, Hamburg, D               |
| Univentor 400 Anaesthesieeinheit         | TSE systems, Bad Homburg, D         |
| Wasserbad 1003                           | GFL, Burgwedel, D                   |
| Wasserbad Thermomix 1441                 | B. Braun, Melsungen, D              |

*Tab. 10 Verwendete Geräte*



## 2.2.2 Chemikalien

| Chemikalie   | Hersteller                  |
|--|-----------------------------|
| (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfon (HEPES)            | Merck KGaA, Darmstadt, D    |
| (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)                          | Sigma - Aldrich, München, D |
| Adenosindiphosphat (ADP)   | Sigma - Aldrich, München, D |
| Antimycin A  | Sigma - Aldrich, München, D |
| BioRad Reagenz A+B   | Sigma - Aldrich, München, D |
| Bovine serum albumin (BSA)   | Sigma - Aldrich, München, D |
| CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O                               | Sigma - Aldrich, München, D |
| Calciumchlorid   | Sigma - Aldrich, München, D |
| Carbonyl-cyanide-p-trifluoro-methoxy-phenylhydrazon (FCCP)           | Sigma - Aldrich, München, D |
| Citratsynthase (Schweineherz)  | Sigma - Aldrich, München, D |
| Cytochrome c   | Sigma - Aldrich, München, D |
| Ethanol > 99%  | Merck KGaA, Darmstadt, D    |
| Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) | Fluka, München, D           |
| Glukose x H <sub>2</sub> O   | Merck KGaA, Darmstadt, D    |
| Kalium Natrium Glutamat  | Sigma-Aldrich, München, D   |
| Isofluran  | Abbvie, Wiesbaden, D        |
| Kaliumdihydrogenphosphat   | Merck KGaA, Darmstadt, D    |
| Kalium-Laktobionat   | Sigma - Aldrich, München, D |
| Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O                                | Sigma - Aldrich, München, D |
| N'-N'-N'-N'-Tetramethyl-p-phenyldiamine-dihydrochloride (TMPD)       | Sigma - Aldrich, München, D |
| Natriumascorbat  | Merck, Darmstadt, D         |
| Natriumazid  | Sigma - Aldrich, München, D |
| Natriumchlorid   | Sigma - Aldrich, München, D |

|                                      |                             |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Natriummalat                         | Sigma - Aldrich, München, D |
| Natriumpyruvat                       | Sigma - Aldrich, München, D |
| Natriumsuccinat                      | Sigma - Aldrich, München, D |
| Oligomycin                           | Sigma - Aldrich, München, D |
| Natrium-Oxalacetat                   | Sigma - Aldrich, München, D |
| Protease inhibitor cocktail complete | Roche, Penzberg, D          |
| Rotenon                              | Sigma - Aldrich, München, D |
| Saccharose                           | Merck KGaA, Darmstadt, D    |
| Salzsäure 37 %                       | Merck KGaA, Darmstadt, D    |
| Taurin                               | Sigma - Aldrich, München, D |

*Tab. 11* **Verwendete Chemikalien**

### **2.2.3 Interventions - und Kontrolllösungen**

In der zweiten Studie wurde getestet, ob BHB und andere Substrate als Akutintervention (bei Reperfusion) das neurologische Ergebnis 24 h nach Schlaganfall verbessern können. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe von 10, 30 und 100 mg/ml der BHB Lösung hergestellt. Hierzu wurden die Substanzen eingewogen und mit Milli-Q Wasser gelöst. Danach wurde der pH-Wert zwischen 7,35-7,45 (0,1 N NaOH bzw. HCl) eingestellt und mit einer wässrigen Lösung (pH = 7,40 voreingestellt) auf das jeweilige Endvolumen aufgefüllt. Nun wurde die Osmolalität auf 288 mosmol/kg mit NaCl eingestellt. Zusätzlich zu der BHB Konzentrationsreihe wurden außerdem noch für Succinat und Laktat die jeweiligen 30 mg/ml Konzentrationen in der gleichen Weise wie oben beschrieben hergestellt. Die jeweiligen Lösungen wurden nach Reperfusion (Zurückziehen des Fadens aus der mittleren Zerebralarterie) verabreicht und zwar  $\frac{1}{4}$  der Dosis intravenös und  $\frac{3}{4}$  der Dosis intraperitoneal. Das gesamte injizierte Volumen betrug 200  $\mu$ l.

### **2.2.4 MiRO (Mitochondrial Respiration Medium)**

|  |  |
|--|--|
| EGTA                                   | 0.19 g   |
| MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O | 0.61 g   |
| Kalium-Laktobionat                     | 120 mL des 0.5 M Kalium - Laktobionat - Stocks |
| Taurin                                 | 2.50 g   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        | 1.36 g   |
| HEPES                                  | 4.77 g   |
| Sucrose                                | 37.65 g  |
| BSA                                    | 1.00 g   |

Kalium - Laktobionat - Stock (0.5 M): Es wurden 35.83 g Lactobionsäure in 100 mL Milli - Q - Wasser gelöst, der pH - Wert wurde mithilfe von NaOH (1 M) und HCl (1 M) auf 7.0 eingestellt. Danach wurde

das Endvolumen von 200 ml mit Milli - Q - Wasser aufgefüllt und der pH - Wert abschließend erneut auf pH = 7,0 eingestellt.

Die abgewogenen Einzelsubstanzen wurden auf 1 l mit Milli - Q - Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde der pH - Wert der Lösung mittels HCl (1 N) und NaOH (1 N) auf 7.1 eingestellt, die fertige Lösung in 50 ml Kunststoff - Falcons aliquotiert und im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert.

## 2.2.5 Isolation von Mitochondrien

Um die Atmung intakter Mitochondrien vermessen zu können, bedarf es eines Aufreinigungsprotokolls zur Isolation der Mikrosomen und Mitochondrienfraktion. Das entnommene Maushirn muss sofort nach Entnahme in zwei Hemisphären geteilt werden (ohne Cerebellum) und in einem speziellen Nährmedium (MiRO) mit Proteaseinhibitor (PI) homogenisiert werden. Hierzu legt man 2 ml des MiRO + PI in einem Pottergefäß (2 ml) vor und homogenisiert jeweils eine Hemisphäre für 15 min. bei 800 rpm, bis eine einheitliche Zellsuspension entsteht. Diese Zellsuspension unterliegt im Folgenden mehreren Isolierungs- und Aufreinigungsschritten, bis die endgültige Mitochondrienfraktion isoliert wurde:

- Zentrifugation bei 4 °C, 1400 g und 7 min
- Überstand abnehmen und erneut bei 4 °C, 1400 g und 3 min zentrifugieren
- Waschmedium erneuern → Überstand abnehmen und bei 4 °C, 10.000 g und 5 min. zentrifugieren (Mitochondrien gehen ins Pellet über)
- Pellet mit 1 ml MiRO + PI resuspendieren (auf Homogenität achten)
- Zellsuspension bei 4 °C, 1400 g und 3 min zentrifugieren
- Waschmedium erneuern → 4 °C, 10.000 g und 5 min zentrifugieren (Mitochondrien gehen ins Pellet über)
- Überstand wird dekantiert und die Mitochondrienfraktion mit 250 µl **MiRO (ohne PI)** normiert

Da die Zellsuspension weder eine Aussage über die Anzahl der vorhandenen Mitochondrien noch der Effektivität der Atmungskettenkomplexe gibt, sollte parallel dazu die Citratsynthaseaktivität und eine Proteinbestimmung durchgeführt werden. Die Citratsynthaseaktivität beschreibt die Anzahl der intakten Mitochondrien, die Proteinbestimmung hingegen, stellt eine gängige Normierungsmethode der Biochemie darstellt. Man entnimmt 80 µl der Zellsuspension für die Vermessung der Atmung, 50 µl für die Proteinbestimmung und den Rest für die Bestimmung der Citratsynthaseaktivität.

## 2.2.6 Mitochondriale Atmung

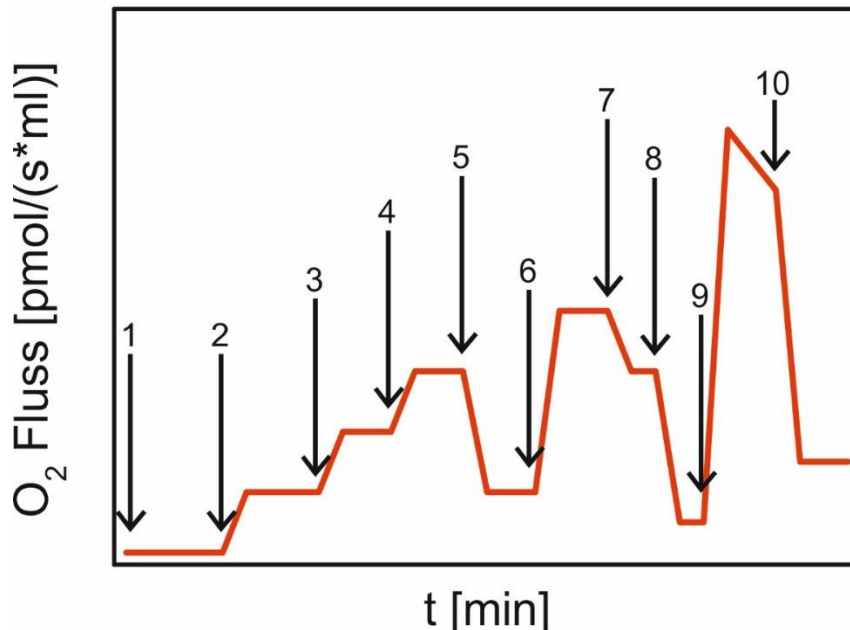


Abb. 50 Sauerstofffluss in Abhängigkeit von Substraten / Inhibitoren

Im Folgenden ist das Pipettierschema für die Messungen an der Sauerstoffelektrode dargestellt. Nach Zugabe der jeweiligen Substrate/Inhibitoren ist zu beachten, dass das Signal der Elektrode konstant bleiben muss, um eine reproduzierbare Datenerhebung zu gewährleisten. Ausnahme hiervon stellt die Zugabe von TMPD und Ascorbat (maximale Komplex - IV - Atmung) dar, da hier das Maximum zur Datenerhebung herangezogen wird.

- 1) Zugabe MiRO (2,4 mL) + 80  $\mu$ L Mitochondriensuspension
- 2) Zugabe Malat (5  $\mu$ L; 400 mM) [ und Pyruvat (5  $\mu$ L; 2000 mM)
- 3) Zugabe ADP (8  $\mu$ L; 500 mM)
- 4) Zugabe Succinat (20  $\mu$ L; 1000 mM) und bei Mitochondrien anschließend Cytochrom c (5  $\mu$ L; 4 mM)
- 5) Zugabe Oligomycin (1  $\mu$ L; 5 mM)
- 6) Zugabe FCCP ( je nach Bedarf in 2  $\mu$ L, 1  $\mu$ L oder 0,5  $\mu$ L Schritten bis zur Sättigung; 1 mM)
- 7) Zugabe Rotenon (5  $\mu$ L; 1 mM)
- 8) Zugabe Antimycin A (1  $\mu$ L; 5 mM)
- 9) Zugabe TMPD ( 5  $\mu$ L) und Ascorbat (5  $\mu$ L; 800 mM)
- 10) Zugabe Natriumazid (60  $\mu$ L; 4000 mM)

Den theoretischen Hintergrund der Funktionen aller Substrate und Inhibitoren wird in **Kap. 1.6.1 Die Hemmstoffe und Entkoppler der Atmungskette**) abgehandelt.

## 2.2.7 BCA Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung mithilfe von Bicinchoninsäure beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  im alkalischen Milieu (Biuret-Reaktion) durch die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan [205]. Nach erfolgter Reduktion chelatisieren 2 Moleküle Bichinoninat 1  $\text{Cu}^+$  zu einem violetten Chelat, welcher bei 526 nm eine starke Absorption zeigt und im Bereich von 20 - 20000  $\mu\text{g/ml}$  sich linear zur Proteinkonzentration verhält [206].

Am Anfang muss bei der BCA - Proteinbestimmung durch Verdünnung der Probe der Messbereich festgelegt werden, da die Ursprungsproben immer zu konzentriert für den linearen Messbereich der Biuret - Reaktion sind. Zumeist sind es Verdünnungen im Bereich von 1 : 5 - 1 : 100, die im linearen Bereich des BCA - Kits liegen. Im Kit - Lieferumfang sind auch zwei Arbeitslösungen enthalten, BCA - Reagenz A und B. Reagenz A wird 50 : 1 mit Reagenz B gemischt und ergibt die fertige Arbeitslösung. Für jede Probe wird ein Volumen von 200 µl benötigt. Danach muss der bovine - serum - albumin (BSA) Standard hergestellt und verdünnt werden. Folgendes Pipettierschema deckt den linearen Bereich des BCA - Kits ab:

| Vial | Endkonzentration BSA [µg/ml] | Verdünnungslösung [µl] | BSA stock[µg/ml]      |
|------|------------------------------|------------------------|-----------------------|
| A    | 2000                         | 0                      | 300 (stock)           |
| B    | 1500                         | 125                    | 375 (stock)           |
| C    | 1000                         | 375                    | 325 (stock)           |
| D    | 750                          | 175                    | 175 (Vial - B Lösung) |
| E    | 500                          | 325                    | 325 (Vial - C Lösung) |
| F    | 250                          | 325                    | 325 (Vial - E Lösung) |
| G    | 125                          | 325                    | 375 (Vial - F Lösung) |
| H    | 25                           | 400                    | 100 (Vial - G Lösung) |
| I    | 0 (blank)                    | 400                    | 0                     |

**Tab. 12 Pipettierschema zur Herstellung des BSA - Stocks**

Alle Proben wurden mit einem *Sonifier* vor der Messung nochmals homogenisiert. Nun werden die zu untersuchenden Proben anhand einer Triplettmessung untersucht. Hierzu werden Verdünnungen im Bereich von 1 : 5 bis 1 : 100 der vorangegangenen Messung angefertigt und vermessen. Um einen Vergleich der Farbintensität zu bekommen, wird auf einer Mikropipettierplatte auch der zugehörige Standard (BSA) dazupipettiert. Die gemessenen Farbintensitäten müssen visuell im linearen Bereich des BCA - Kits liegen. Die Verdünnung, die im mittleren linearen Bereich liegt, wird verbindlich für alle Proben herangezogen. Nachdem alle Proben entsprechend verdünnt wurden, findet folgende Arbeitsanweisung Anwendung:

- Jeweils 25 µl der Probe werden dreimal in eine Mikropipettierplatte pipettiert
- BSA - Standard in oben angegebener Konzentration
- 200 µl der Arbeitslösung werden zu den Proben pipettiert
- Bei RT für 30 min. auf einem Plattenrüttler kräftig mischen
- Mit Aluminiumfolie abdecken und für 30 min. bei 37 °C inkubieren
- Abkühlen auf Raumtemperatur (ca. 5-10 min)
- Vermessung mit Victor X<sup>3</sup> (Multilabelreader) bei Absorptionswellenlänge 562 nm

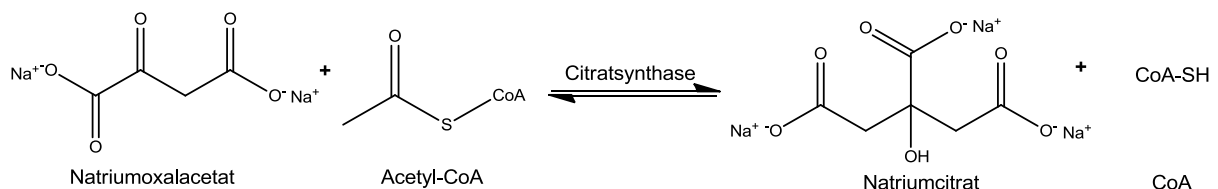
Um eine präzisere Aussage über die Ergebnisse treffen zu können, empfiehlt es sich mindestens Dupletts, eher Tripletts einer jeden Probe anzufertigen und den sich ergebenden Mittelwert für weitere Berechnungen heranzuziehen. Danach wird die Standard - Eichkurve aus dem BSA - Standard ermittelt und die gesuchten Probenkonzentrationen aus der Standardkurve interpoliert.

## 2.2.8 Citratsynthase (CS)

### Citratsynthase - Reaktionsmedium

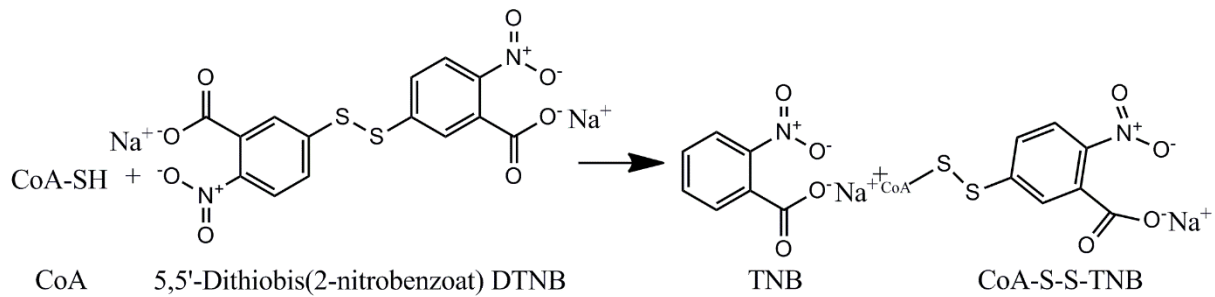
|                       |          |
|-----------------------|----------|
| DTNB                  | 0.1 mM   |
| Triton X - 100        | 10 %     |
| Oxalessigsäure        | 10 mM    |
| Acetyl - Coenzym A    | 12.2 mM  |
| Milli - Q - Wasser ad | 100,0 ml |

Das Enzym Citratsynthase (CS) ist in der Mitochondrienmatrix lokalisiert und katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Citronensäurezyklus, bei dem Oxalacetat mit Acetyl - CoA zu Citrat kondensiert wird. Die zugrundeliegende Theorie wird in **Kap. 1.4 Der Citratzyklus** Einleitung abgehandelt.



### *Reaktionsgleichung 1 Citratsynthase Reaktionsschema*

Die Citratsynthaseaktivität wird mithilfe der irreversiblen Umsetzung von Dinatrium 5,5' - Dithiobis(2 - nitrobenzoat) (DTNB; Ellmans - Reagenz) zu Natrium 5 - thio - 2 - nitrobenzoat (TNB) gemessen, wobei TNB ein Absorptionsmaximum bei 412 nm zeigt und so photometrisch zugänglich ist. Bei der Umsetzung von Oxalacetat mit Acetyl - CoA zu Citrat entsteht freies CoA, was in äquimolarem Verhältnis mit DTNB umgesetzt wird.



### Reaktionsgleichung 2 Umsetzung von DTNB mit CoA

Die aus der Homogenisierung der Hirnhemisphären zurückgelegte Citratsynthasefraktion wird auf Eis aufgetaut und danach für 5 min. bei 30 °C inkubiert. Das Reaktionsmedium mit DTNB und den beiden Substraten Acetyl - CoA und Oxalacetat wird wie folgt gemischt:

- 100 µl DTNB (0,1 mM)
  - + 25 µl Triton - X - 100 (10 %)
  - + 50 µl Oxalacetat (10 mM)
  - + 25 µl Acetyl - CoA (12,2 mM)
  - + 600 µl Milli - Q - Wasser
- 
- = 800 µl Reaktionsmedium inkl. Substrate

Dieses Reaktionsmedium wird ebenfalls 5 min. bei 30 °C inkubiert. Wenn beide Lösungen fertig inkubiert sind, werden sie in einer Glasküvette (1 ml) bei 412 nm vermessen. Auch hier wird entsprechend der Proteinbestimmung mit mindestens Duplett oder Tripletmessungen gearbeitet. Der gebildete Mittelwert wird zur Berechnung der spezifischen Aktivität ( $v$ ) herangezogen:

$$v = \frac{r_A}{l * \epsilon_B * \nu_B} * \frac{V_{Küvette}}{V_{Probe} * \rho}$$

### Gleichung 4 Berechnung der spezifischen Aktivität

- $r_A$        $dA/dt$ , Änderung der Absorptionsrate [ $\text{min}^{-1}$ ]
- $l$ :      Optische Pfadlänge (=1 cm)
- $\epsilon_B$ :      Extinktionskoeffizient von TNB in der Reaktion (= 1)
- $\nu_B$ :      Stöchiometrische Nummer von TNB in der Reaktion (= 1)
- $V_{cuvette}$ :      Gesamtvolumen der Lösung in der Küvette (= 1000 µL)
- $V_{sample}$ :      Volumen der Probe (=200 µL)
- $\rho$ :      Massenkonzentration oder Dichte des biologischen Materials in der Probe  
(Proteinkonzentration:  $\text{mg} * \text{cm}^{-3}$ , Zelldichte:  $10^6 * \text{cm}^{-3}$ )

## 2.2.9 Verhaltenstests

### 2.2.9.1 Neuroscore

Der in dieser Arbeit zur Anwendung gekommene Neuroscore ist angelehnt an die beiden Arbeiten von Chen et al. 2001 und Stahel et al. 1999 und wurde modifiziert [207], [208]. Alle Messungen erfolgten verblindet, wobei Johanna Barnstorf - Brandes alle Verhaltensexperimente ohne Kenntnisse der Gruppenzugehörigkeit durchgeführt hat. Der sogenannte neurologische Schweregrad der Schädigung (NSS) besteht aus einer Batterie unterschiedlicher sensorischer, kognitiver und motorischer Tests. Mithilfe dieses NSS ist es möglich, das Ergebnis einer Intervention auf pharmakodynamischer Ebene zu definieren. Grundsätzlich muss die Maus verschiedene Verhaltenstests durchlaufen, wobei ein Erfolg zu keinem Punkt und ein Versagen des Tests anteilig zur Bepunktung führen. Die Punktevergabe erfolgt mit ganzen Zahlen. In **Tab. 13** sind die verschiedenen Verhaltenstests dargestellt.



| Testname            | Beschreibung aus [207]; [209]  | Erfolg | Misserfolg |
|---------------------|--|--------|------------|
| Exit-Circle         | Fähigkeit und Initiative, eine umrandete Kreisfläche von 30 cm Durchmesser innerhalb von 3 Minuten durch die Tür zu verlassen                      | 0      | 1          |
| Corner-Test         | Dreht sich die Maus bei 10 Wiederholungen mehr als 8x in die gleiche Richtung aus einer Ecke heraus, gilt der Test als gescheitert                 | 0      | 1          |
| Gerader Gang        | Motorische Fähigkeit und Initiative, eine gerade Linie zu gehen, sobald die Maus auf den Boden gesetzt wurde                                       | 0      | 1          |
| Schreckreflex       | Angeborener Reflex, die Maus springt als Folge eines lauten Handklatschens hoch  | 0      | 1          |
| Suchverhalten       | Physiologisches Verhalten als ein Zeichen des Interesses an der eigenen Umgebung   | 0      | 1          |
| Balancieren<br>7 mm | Fähigkeit, auf einem 7mm Balken für mindestens 10 s zu halten  | 0      | 1          |
| Balancieren<br>5 mm | Fähigkeit, auf einem 5 mm Rundholz für mindestens 10 s zu halten   | 0      | 1          |
| Balancieren<br>3 cm | Fähigkeit, auf einem Balken 30 cm zurückzulegen, Breite: 3 cm  | 0      | 1          |
| Balancieren<br>2 cm | Fähigkeit, auf einem Balken 30 cm zurückzulegen, Breite: 2 cm  | 0      | 1          |
| Balancieren<br>1 cm | Fähigkeit, auf einem Balken 30 cm zurückzulegen, Breite: 1 cm  | 0      | 1          |
| Motortest           | Die Maus wird am Schwanz hochgehalten, eine Flexion der Vor- oder Hinterläufe mit einer Kopfbewegung < 10° zur vertikalen Achse innerhalb von 30 s | 0      | 1          |
| Gangtest            | Normaler Gang: 0 Punkte  | 0      | 1          |
|                     | Unfähigkeit, geradeaus zu laufen: 1 Punkt  | 0      | 1          |
|                     | Zirkeln zur paretischen Seite: 2 Punkte  | 0      | 1          |
| Pinnareflex         | Umfallen zur paretischen Seite: 3 Punkte   | 0      | 1          |
|                     | Kopfschütteln beim Berühren des inneren Gehörgangs mit einem spitzen Gegenstand  | 0      | 1          |
| Chimneytest         | Fähigkeit, einen Zylinder von 20 cm Länge rückwärts innerhalb von 30 s zu verlassen  | 0      | 1          |

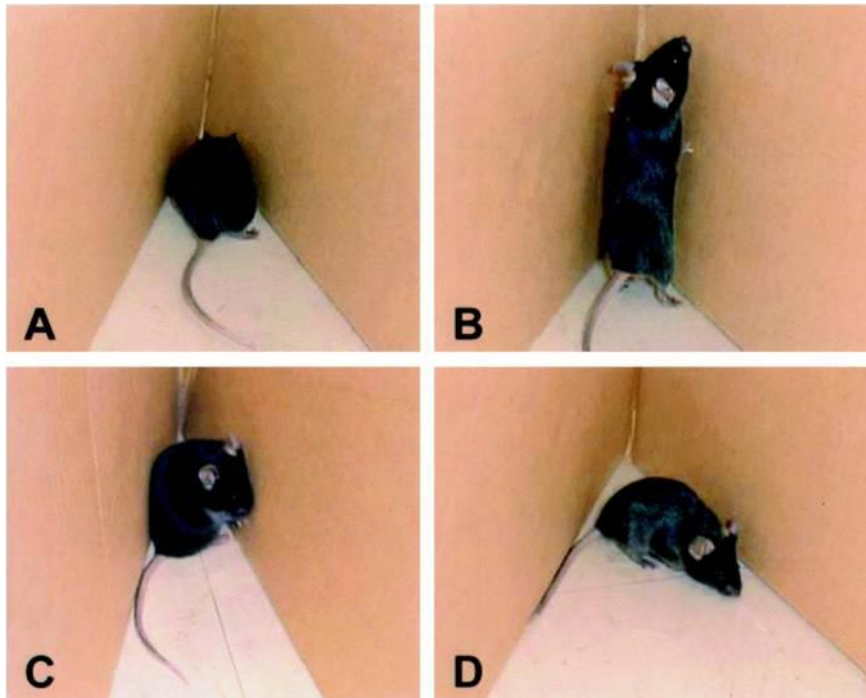
Tab. 13 Übersicht der Verhaltenstests des Neurological severity score

### 2.2.9.2 Exit - Circle - Test:

Bei diesem Test wird das physiologische Explorationsverhalten der Maus erfasst. Hierzu wird die Maus in einen nach oben geöffneten Pappzylinder (i.D.:30 cm) gesetzt. Dieser Pappzylinder hat ein kleines Fenster durch das das Tier entfliehen kann. Gemessen wird die Zeit (maximal 3 min), die das Tier benötigt, um durch das Fenster zu treten. Ein normales Tier hat ein ausgeprägtes Explorationsverhalten und wird je nach kognitiver Kapazität das Fenster in weniger als 1 min. finden und durchschreiten.

### 2.2.9.3 Corner - Test:

Dieser Test ist von Schallert et al. 2002 etabliert worden, um Langzeitdefizite bei Mäusen nach zerebraler Ischämie zu untersuchen [208]. Das Prinzip ist das Rotationsverhalten der Maus, wenn sie in einer Ecke steht. Physiologischerweise bewegt sich die Maus zufällig nach links oder rechts, aber im Mittel gleich häufig in beide Richtungen. Der induzierte Schlaganfall bedingt eine contralaterale Hemiparese, was dazu führt, dass die betreffende Maus sich präferiert in eine Richtung dreht. Normalerweise können mithilfe der ermittelten Daten aus dem Corner Test noch weitere Endpunkte wie den Lateralitätsindex erhoben werden.



*Abb. 51 Corner Test nach Zhang et al. 2002*

Berechnung des Lateralitätsindex (Li) nach Seghier et al. 2007 [210]:

$$Li = f * \frac{L_{turn} - R_{turn}}{L_{turn} + R_{turn}}$$

*Gleichung 5 Berechnung des Lateralitätsindex*

f = Skalierungsfaktor für seitliche Präferenz (Wert 1)

$L_{turn}$  = Anzahl Drehungen nach links

$R_{turn}$  = Anzahl Drehungen nach rechts

#### **2.2.9.4 Gerader Gang**

Bei diesem Test wird das Bewegungsverhalten der Maus getestet. Hierzu wird der normale Balancieren-Test (3 cm Breite des Holzstückes) benutzt. Wenn aufgrund des Schlaganfalls eine linksseitige Parese auftritt, wird die Maus sich um ihre eigene Achse drehen oder von dem 3 cm breiten Holzstück herunterfallen. Eine Intervention würde sich eventuell in einer Verbesserung hin zum physiologischen Gehverhalten äußern.

#### **2.2.9.5 Schreckreflex**

Bei diesem Test wird die Sensorik der Maus getestet. Hierzu wird die Maus in eine ruhige Umgebung verbracht und für 5min. nicht gestört (keine Umgebungsgeräusche). Nach 5min. wird laut in die Hände geklatscht, was physiologischerweise zu einem Schreckreflex führt. Die Maus schreckt hoch und versucht zu fliehen. Mäuse, bei denen die sensorischen Bahnen oder der Gyrus postcentralis (sensorischer Cortex) durch die 90 minütige Ischämiedauer geschädigt wurden, werden keine Reaktion auf das Klatschen zeigen.

#### **2.2.9.6 Suchverhalten**

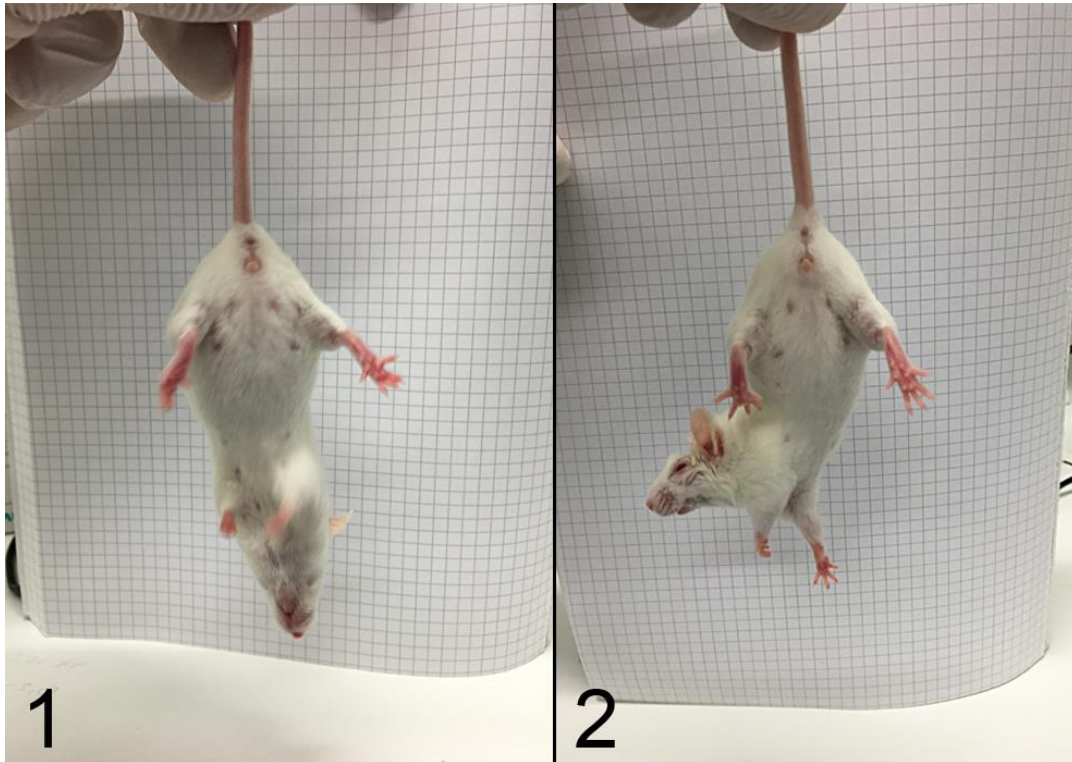
Normalerweise zeigen Mäuse in unbekannter Umgebung ein exploratives Verhalten. Falls die Maus in diesem Test ein apathisches Verhalten zeigt, gilt der Test als nicht bestanden.

#### **2.2.9.7 Balancieren - Test**

Bei diesem Test stehen die sensomotorischen Fähigkeiten im Fokus. Es gibt fünf unterschiedliche ebene Holzbalken, die ersten vier haben abnehmende Breite (3 - 2 - 1 - 0,7 cm), wobei das 5. Holzstück (5 mm) abgerundet ist. Die Maus muss bei den 3 - 2 - 1 cm breiten Holzbalken eine Strecke von 30 cm zurücklegen und darf dabei nicht runterfallen. Bei dem 0,7 cm breiten Holzbalken sowie bei dem 5 mm Rundholz muss sie sich für 10 s. auf dem jeweiligen Holzstück halten bzw. balancieren. Dieser Test besitzt eine hohe Differenzierungsmöglichkeit der motorischen Einschränkungen der zu testenden Tiere. Begründbar liegt dieser Sachverhalt darin, dass der Schwierigkeitsgrad sukzessive zunimmt und Tiere mit Schein OP keinerlei Probleme beim Überqueren zeigen, wobei Tiere mit fulminantem Schlaganfall bereits mit dem 3 cm bzw. dem 2 cm breiten Holzbalken Probleme haben. Eine mögliche wirksame Intervention kann sich bereits dadurch zeigen, dass die Maus in der Lage ist, den 1 cm breiten Holzbalken zu überqueren.

### 2.2.9.8 Motortest

Beim Motortest wird die Maus am Schwanz für 30 s. hochgehoben und ihre motorische Reaktion beobachtet. Eine gesunde Maus hängt gerade nach unten, wobei eine Maus mit Schlaganfall eine Flexion der vorderen Körperachse ( $> 10^\circ$ ), sowie eine Flexion der Vorder- bzw. Hinterläufe zeigt.



*Abb. 52* Motortest modifiziert nach Berresse et al. 2016 [211]

### **2.2.9.10 Gangtest**

Der Gangtest ist eine detailliertere Testung der motorischen Fähigkeiten als der Gerader Gang Test und kann diesen ergänzen. Bei diesem motorischen Test erfolgt eine Bepunktung nach der Schwere des motorischen Defizits. Normaler Gang entspricht 0 Punkten, die Unfähigkeit zu Laufen 1 Punkt, Zirkeln um die paretische Seite 2 Punkte, mehrmaliges Umfallen zur paretischen Seite 3 Punkte.

### **2.2.9.11 Pinnareflex**

Bei diesem Test wird mit einem spitzen Gegenstand der äußere Gehörgang der Maus leicht stimuliert. Die Maus zeigt bei vorhandenem Reflex ein Schütteln des gesamten Kopfes. Bei ausgeprägten Ischämieschäden zeigt die Maus keinerlei Anzeichen des Reflexes, was mit 1 Punkt bewertet wird.

### **2.2.9.12 Chimney - Test**

Hierbei wird ein Pappzylinder (20 cm Länge; 2 cm Durchmesser) verwendet, den die Maus rückwärts kletternd verlassen muss. Man lässt die Maus horizontal in den Zylinder klettern. Wenn sie das andere Ende des Zylinders erreicht hat, stellt man den Zylinder verikal auf eine Tischplatte um das Ende zu Verschließen und stoppt die Zeit. Die Maus muss innerhalb von 30 s. durch das oben offene Zylinderrohr klettern.

## 2.3 Material und Methoden der Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie

Im Folgenden wird der Material und Methodenteil der GC - MS Analytik vorgestellt. Wie bereits in **Kap. 2. Material und Methoden** erläutert, liegt der Schwerpunkt dieses Kapitels in der Beschreibung der Durchführung der GC - MS Analytik.

### 2.3.1 Materialien und Geräte

| GC – MS   |                               |
|---|-------------------------------|
| Gerät   | Hersteller                    |
| Gaschromatograph, HP 6890   | Agilent, Santa Clara, USA     |
| Autosampler 7683 Serie Injector                                       | Agilent, Santa Clara, USA     |
| Massenspektrometer 5973 mit massenselektivem Detektor                 | Agilent, Santa Clara, USA     |
| GC-Kapillarsäule, VF - 5 ms, 30 m x 25 mm x 0,25 µm + 5 m Vorsäule    | Agilent, Santa Clara, USA     |
| GC - Kapillarsäule, VF - 5 ms, 60 m x 25 mm x 0,25 µm + 10 m Vorsäule | Agilent, Santa Clara, USA     |
| Precision syringe gastight 1001                                       | Hamilton Co., Reno, USA       |
| Derivatisierung   |                               |
| Gerät   | Hersteller                    |
| Block Heizgerät BH - 602T   | Maplelab Scientific           |
| MS Analysen Vials inkl. Schraubverschluß                              | Agilent, Santa Clara, USA     |
| <i>Inlets</i> , Boden mit integrierter Feder                          | Kinesis, Langenfeld, D        |
| Borosilikatglas Klasse 1  | Corning Incorporated, NY, USA |
| Ultrasonic waterbath S30H   | Elmasonic                     |
| Block mini Heizblock  | Benchmark                     |
| Membran Vacuum Pumpe  | Vacuubrand                    |
| Stickstoffbelüftungssystem  | Eigenbau                      |

| <b>Gase</b>                              |   |
|--|---|
| <b>Gerät</b>                             | <b>Hersteller</b>                         |
| Argon 5.0                                | Praxair, Biebesheim am Rhein, D           |
| Helium 5.0                               | Praxair, Biebesheim am Rhein, D           |
| Stickstoff 5.0                           | Praxair, Biebesheim am Rhein, D           |
| Synthetische Luft                        | Praxair, Biebesheim am Rhein, D           |
| <b>Folch's Extraktion</b>                |   |
| <b>Gerät</b>                             | <b>Hersteller</b>                         |
| Analysenwaage                            | Mettler Toledo, Gießen, D                 |
| Falkons (15 mL, 50 mL)                   | Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich |
| Millipore                                | Merck Millipore, Darmstadt, D             |
| pH – Meter                               | Mettler Toledo, Gießen, D                 |
| Kalibrierstandard, pH 4 +7               | Hanna Instruments, Rhode Island, USA      |
| Magnetrührer                             | Carl Roth, Karlsruhe, D                   |
| Präzisionspipetten, 10 - 1000 µl         | Brand, Wertheim, D                        |
| Accu - jet Pro                           | Brand, Wertheim, D                        |
| Ultraschallhomogenisator                 | Branson, Rhode Island, USA                |
| Allegra 6R centrifuge                    | Beckmann, Krefeld, D                      |
| Plattenschüttler                         | VWR, Pennsylvania, USA                    |
| Vortex mit Multihalter für 15 ml Falcons | VWR, Pennsylvania, USA                    |
| <b>Referenzsubstanzen</b>                |   |
| <b>Chemikalie</b>                        | <b>Hersteller</b>                         |
| D - Glukose - Monohydrat                 | Merck GmbH, Darmstadt, D                  |
| Kaliumnatriummethylglutamat              | Sigma Aldrich, Missouri, USA              |
| Myo – Inositol                           | Sigma Aldrich, Missouri, USA              |
| Natrium D / L - β - Hydroxybutyrat (BHB) | Sigma Aldrich, Missouri, USA              |
| Natriumcitrat                            | Sigma Aldrich, Missouri, USA              |

|  |                              |
|--|------------------------------|
| Natriumfumarat   | Sigma Aldrich, Missouri, USA |
| Natrium - $\gamma$ - Aminobutytrat   | Sigma Aldrich, Missouri, USA |
| Natriumkaliumglutamat  | Sigma Aldrich, Missouri, USA |
| Natriumlaktat  | Sigma Aldrich, Missouri, USA |
| Natriummalat   | Sigma Aldrich, Missouri, USA |
| Natriumpyruvat   | Sigma Aldrich, Missouri, USA |
| Natriumsuccinat  | Sigma Aldrich, Missouri, USA |
| <b>Alle Referenzsubstanzen erfüllen den chemischen Reinheitsgrad pro analysi (p.a.)</b>          |                              |
| <b>Interne Standardsubstanzen</b>  |                              |
| <b>Chemikalie</b>  | <b>Hersteller</b>            |
| Natrium 6 - Aminocaproat   | Sigma Aldrich, Missouri, USA |
| Natriumphthalat  | Sigma Aldrich, Missouri, USA |
| Natriumsalicylat   | Sigma Aldrich, Missouri, USA |
| d6 - D - Glukose - Monohydrat  | Sigma Aldrich, Missouri, USA |
| d6 - $\gamma$ - Aminobutytrat  | Sigma Aldrich, Missouri, USA |
| d6 – Glutamat  | Sigma Aldrich, Missouri, USA |
| <b>Alle internen Standardsubstanzen erfüllen den chemischen Reinheitsgrad pro analysi (p.a.)</b> |                              |
| <b>Lösungsmittel</b>   |                              |
| <b>Lösungsmittel</b>   | <b>Hersteller</b>            |
| Chloroform   | Sigma Aldrich, Missouri, USA |
| Methanol   | Carl Roth, Karlsruhe, D      |
| Milli - Q – Wasser   | Millipore, Wertheim, D       |

*Tab. 14 Geräte, Chemikalien und Lösungsmittel für die GC - MS Analytik*

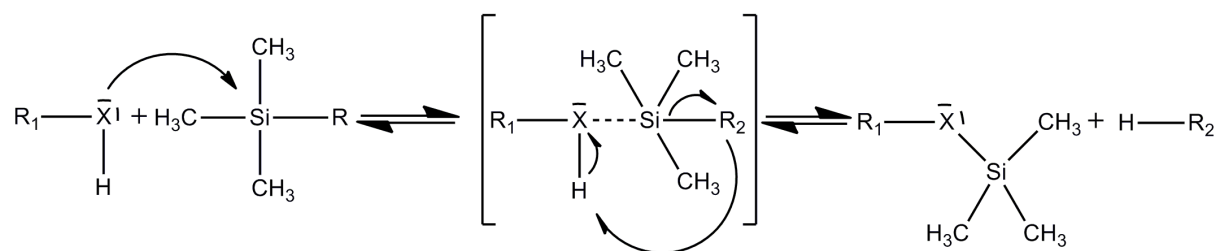


## 2.3.2 Methode der Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie

Mit der Methode der Gaschromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (GC - MS) kann eine enorme Fülle an Metaboliten parallel in einem Lauf qualitativ und quantitativ erfasst werden. Allerdings ist oftmals die Zugänglichkeit von Metaboliten, die im unteren nanomolaren Bereich vorliegen, beschränkt durch die im Vergleich zu anderen Methoden hohe Nachweisgrenze (100 nM - 1 µM, je nach Metabolit). Um diese Nachweisgrenze zu verringern, bedarf es fortwährender Weiterentwicklung was die eingesetzten Chemikalien bzw. die zur Anwendung kommenden Geräte angeht. Die Etablierung umfasste Proben aus vier Kompartimenten, die sich aus dem Studiendesign der vorliegenden Arbeit ergeben haben: Mikrodialysat, Blutplasma, Leber - und Hirnhomogenat. Die unterschiedlichen Protokolle für diese Kompartimente sollen im Folgenden in ihrer endgültigen Fassung beschrieben werden.

### 2.3.2.1 Die Silylierung

Die Siede - und Schmelzpunkte der zu analysierenden Metabolite liegen zu weit auseinander, um mit einer Temperatur von 280 °C (*Inlettemperatur*) alle Substanzen in die Gasphase zu überführen. Um eine reproduzierbare Überführung in die Gasphase zu ermöglichen, kann man in der Gaschromatographie Silylierungsreaktionen der Analyse vorschalten, um die besagten Siede - bzw. Schmelzpunkte herabzusetzen und somit die Überführung in die Gasphase quantitativ gestalten. Die Leitsubstanz der Silylierungsmittel ist Trimethylchlorsilan, das sehr leicht flüchtig ist. Die Reaktion von Trimethylchlorsilan mit Nukleophilen erfolgt allerdings nicht vollständig. Aus diesem Grund wurden zahlreiche weitere Silylierungsmittel entwickelt, die alle eine sehr hohe Elektrophilie aufweisen [212]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Kombination aus N,O - Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) und Trimethylchlorsilan (TMCS) im Verhältnis 99 : 1 gewählt, da die Ausbeuten bei 99,5 % liegen und die Elektrophilie bei dieser Kombination so hoch ist, dass selbst tertiäre Amine oder gehinderte Hydroxylgruppen noch der Silylierung zugänglich gemacht werden können [213]. Auch die Temperatur und die Zeit der Silylierung spielt für die bestmögliche Ausbeute sowie für die zeitliche Beständigkeit der silylierten Metabolite eine Rolle. Die Reaktionsdauer wurde mit **50 min. bei 70 °C** festgelegt [212] – [214]. Die allgemeine Reaktionsgleichung der Silylierung lautet:



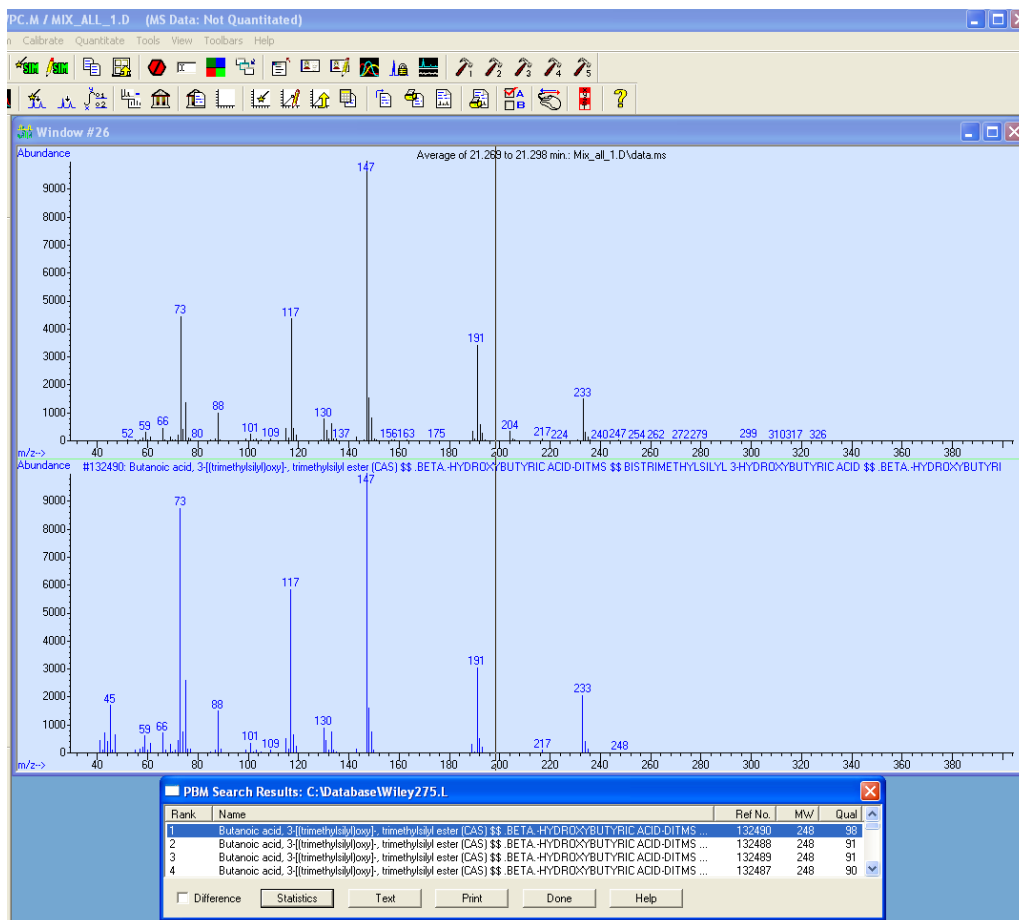
Reaktionsgleichung 3  $S_n2_t$ -Mechanismus der Silylierung mit nukleophilen Gruppen der Probe

### 2.3.2.2 Qualitative Etablierung der Metabolite

Um Metabolite in den oben beschriebenen Kompartimenten quantitativ zugänglich machen zu können, bedarf es einem vorherigen qualitativen Nachweis aller zu vermessenden Metabolite. In diesem qualitativen Nachweis muss das sogenannte Massenspektrum einer jeden Substanz aufgenommen werden und mit der Retentionszeit zusätzlich charakterisiert werden. Das

Massenspektrum einer jeden Substanz ist vergleichbar mit einem individuellen Fingerabdruck, da die Fragmentierung durch Elektronenstoßionisation (ESI) einzigartige Muster ergibt.

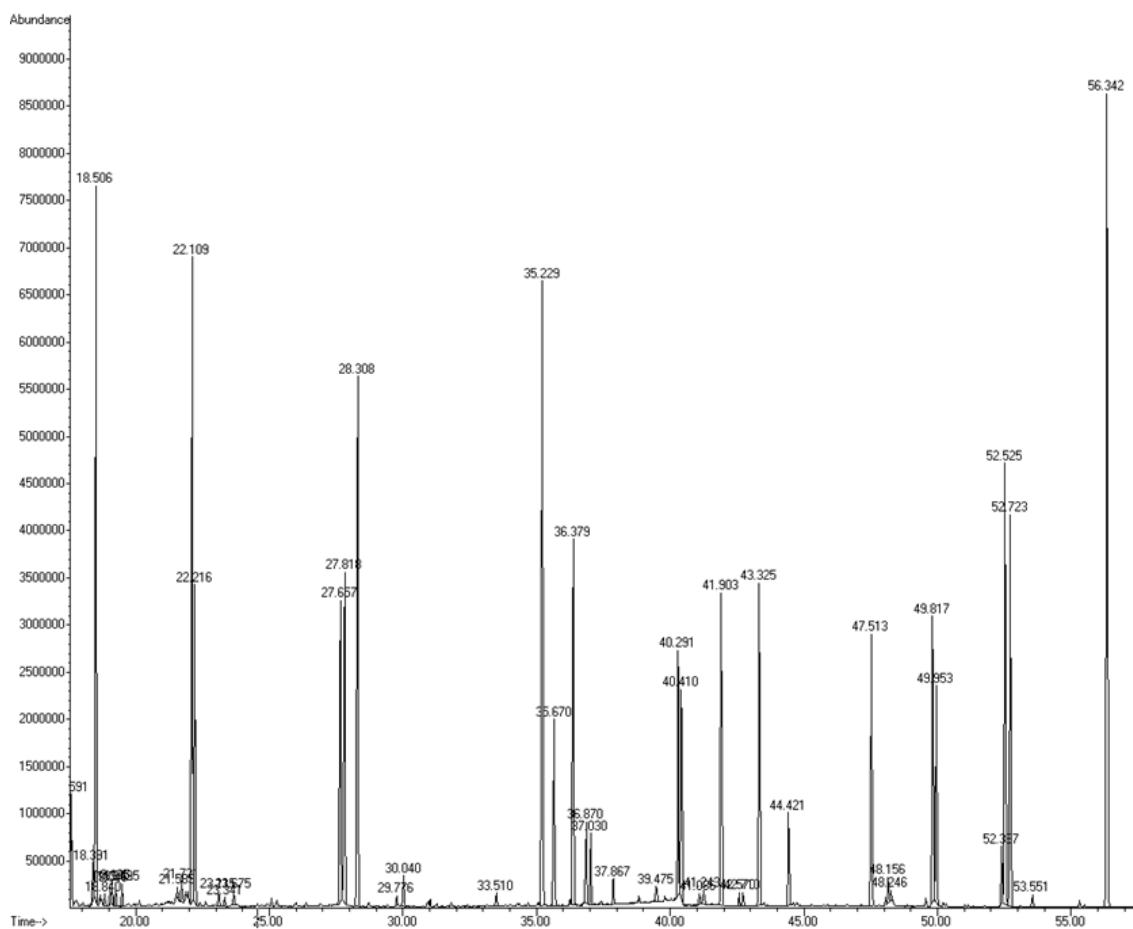
An die Referenzsubstanzen sind hohe analytische Maßstäbe zu setzen. Sie müssen einen hohen Reinheitsgehalt haben (> 99 %), da ansonsten Verunreinigungen falsche Fragmentierungsmuster bzw. falsche hohe Quantifizierungsergebnisse ergeben können. Alle Substanzen wurden im Chemikaliengroßhandel erworben und initial mit dem bestehenden Protokoll (s. **Kap. 2.3.2.2 Qualitative Etablierung der Metabolite**) vermessen. Von großem Vorteil stellte sich hier die Elektronenstoßionisation (EI) mit 70 eV dar, da alle Vergleichsspektren mit der Datenbank des nationalen Instituts für Standards und Technologie (N.I.S.T) mit den jeweiligen Spezifikationen vermessen wurden und nur so überhaupt eine Vergleichbarkeit bzw. ein Abgleich möglich ist. Der Abgleich der Substanzen ist nur im sogenannten SCAN - Modus möglich, der dadurch charakterisiert ist, dass der Detektor Massen zwischen 50 – 400 Da erfasst und aufzeichnet. Die eingesetzte Software (ChemStation 2.0) hat einen dimensionslosen Parameter (*Quality*), der das erhaltene Massenspektrum mit einer hinterlegten Datenbank abgleicht und je nach Übereinstimmung der Spektren eine hohe Übereinstimmung (hoher Qualitäts-Index) oder einer niedrigen Übereinstimmung (niedriger Qualitäts - Index) ausgibt. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, wurde ein persönliches Vertrauensintervall etabliert, welches mindestens einen Qualitäts-Index von > 95 erfüllen musste, um den qualitativen Nachweis der Substanz zu erbringen.



**Abb. 53 Qualitativer Nachweis mithilfe der N.I.S.T. Datenbank von  $\beta$  - Hydroxybutyrat (BHB)**

Desweiteren mussten Wiederholungsmessungen (mind. 3) die gleichen Retentionszeiten und die gleichen Spektren aufweisen, um die qualitative Aussage weiter zu erhärten. Erst wenn diese

Bedingungen erfüllt waren, konnten in Abhängigkeit der Fragmentierungsmuster der Substanzen sogenannte charakteristische Einzelmassenfragmente etabliert werden. Im *single-ion-mode* Modus (SIM) werden nicht alle Massen im Bereich von 50 – 400 Da, sondern nur die individuell charakteristischen Massen detektiert. Wenn der Detektor nur 2 - 3 etablierte Massen detektieren muss, spiegelt sich das in der Detektionsgrenze wieder. Wenn der Detektor nur 3 – 5 Massenfragmente selektiv detektieren muss, spiegelt sich das in der Sensitivität der Detektion wieder. Der Unterschied in der Detektionsgrenze zwischen SCAN - und SIM - Modus liegt ungefähr in einer Zehnerpotenz höher im SIM - Modus. Die ausgewählten Massen müssen so gewählt werden, dass immer noch mit ausreichend hoher Wahrscheinlichkeit ein qualitativer Nachweis aufgrund der Massenfragmentsymmetrie möglich ist. Wenn alle Metabolite qualitativ durch das oben beschriebene *Procedere* erfasst worden sind, muss jede einzelne Substanz noch im etablierten SIM-Modus vermessen werden. Erst wenn auch diese Aufgabe erfolgreich durchgeführt worden ist, kann die Analyse in biologischen *Matrizes* durchgeführt werden.



**Abb. 54 Total-Ionen-Chromatogramm (TIC)**

| Metabolit                    | Retentionszeit                           | Retentionszeit                            | m/z Massenfragmente |
|------------------------------|--|---|---------------------|
|                              | [min] VF - 5ms<br>30 m + 5 m<br>Vorsäule | [min] VF - 5ms<br>60 m + 10 m<br>Vorsäule |                     |
| Laktat - diTMS               | 17,21                                    | 18,53                                     | 147,190,191,219     |
| Pyruvat - TMS                | 18,21                                    | 19,53                                     | 147,189,217         |
| BHB - diTMS                  | 20,82                                    | 22,13                                     | 147,148,191,233     |
| d - GABA - diTMS             | 25,03                                    | 27,60                                     | 104, 147, 238       |
| GABA - diTMS                 | 25,14                                    | 27,83                                     | 102,104,147,232,238 |
| Succinat - diTMS             | 25,53                                    | 28,31                                     | 147,148,247,262     |
| Fumarat - diTMS              | 26,54                                    | 29,79                                     | 147,245,246,247     |
| Malat - diTMS                | 30,07                                    | 35,23                                     | 73,147,233,335      |
| 6-Aminocaproat –<br>diTMS    | 30,23                                    | 35,67                                     | 102,147,260         |
| Salicylat - diTMS            | 30,57                                    | 36,38                                     | 267,269,271         |
| d - GABA - triTMS            | 30,94                                    | 36,80                                     | 176,310,311         |
| GABA - triTMS                | 31,03                                    | 37,03                                     | 174,176,304         |
| d – Glutamat –<br>triTMS     | 33,14                                    | 40,30                                     | 147, 251, 252, 368  |
| Glutamat - triTMS            | 33,21                                    | 40,40                                     | 147,246,247,251,252 |
| Methylglutamat –<br>triTMS   | 34,08                                    | 41,90                                     | 244,260,261,362     |
| Phtalat - diTMS              | 34,89                                    | 43,32                                     | 147,221,295,310     |
| 6 – Aminocaproat –<br>triTMS | 35,53                                    | 44,42                                     | 174,175,332         |
| Citrat - tetraTMS            | 37,49                                    | 47,51                                     | 147,273,375         |
| d – Glukose -<br>pentaTMS    | 38,84                                    | 49,81                                     | 73, 192, 206, 220   |
| Glukose - pentaTMS           | 38,91                                    | 49,94                                     | 73, 191, 204, 217   |
| d-Glukose -<br>hexaTMS       | 40,56                                    | 52,51                                     | 73, 192,206, 220    |
| Glukose - hexaTMS            | 40,68                                    | 52,71                                     | 73,191,204,217      |
| Myo - Inositol -<br>hexaTMS  | 42,66                                    | 56,33                                     | 305, 318, 367       |

*Tab. 15 Silylierte Metabolite mit m / z-Fragmenten und Retentionszeiten in Abhängigkeit der Säulenlänge*

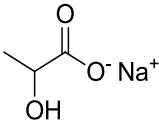
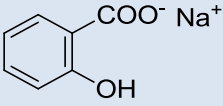
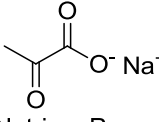
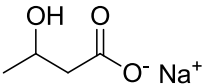
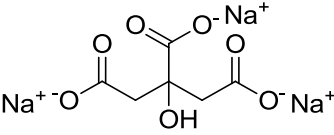
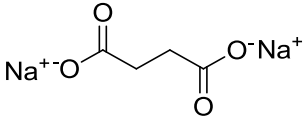
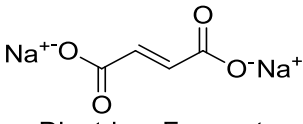
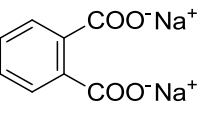
### 2.3.2.3 Quantitative Analyse mithilfe der internen Standardmethode

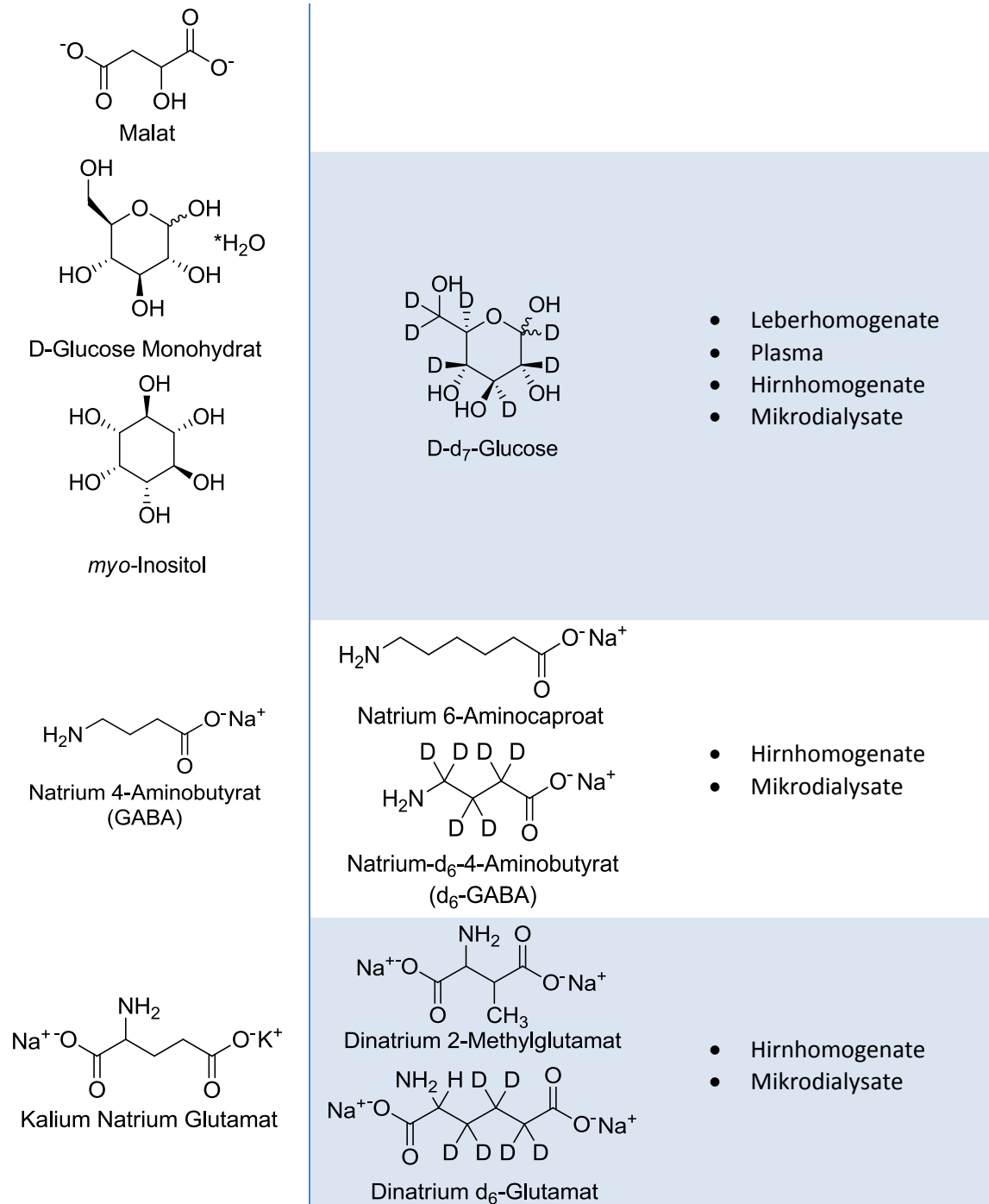
Es gibt drei unterschiedliche Möglichkeiten, Analyte in einer biologischen Matrix zu quantifizieren. Als erstes kann man die externe Standardmethode verwenden, die dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Eichkurve vermisst, die den Konzentrationsbereich der zu bestimmenden Probe abdeckt. Anhand der Standardeichgerade kann dann die zu bestimmende Substanzkonzentration interpoliert werden. Da alle biologischen Proben einer aufwendigen Probenvorbereitung unterliegen, ist diese

Methode unzureichend, da Matrixeffekte selbst bei gleicher Probenaufbereitung des externen Standards grundsätzlich falsch positive oder negative Ergebnisse generieren würden. Um diesen Problemen Rechnung zu tragen, bedarf es einer internen Standardmethode, die alle auftretenden Einflüsse auf die Probe mit in die Quantifizierung einbezieht. An den internen Standard wird ein noch höherer Anspruch gestellt als an die Referenzsubstanzen. Er muss hoch rein (> 99 %) erhältlich sein, inert gegenüber der Probe und dem Säulenmaterial sein, darf nicht in der biologischen Probe vorliegen und sollte nicht zu teuer sein.

Die dritte Variante, die isotonenmarkierte interne Standardmethode, stellt den Gold - Standard der Quantifizierung dar, ist aber mit erheblichen Kosten verbunden. Hierzu werden als interner Standard entweder deuterierte oder  $^{13}\text{C}$  markierte Verbindungen gewählt. Der Massenshift zwischen isotonenmarkierter Verbindung und zu quantifizierendem Analyt sollte mindestens 4 u betragen, da ansonsten die Trennleistung der Säule nicht ausreicht, um eine Basislinientrennung im Spektrum zu erzielen.

In der hier etablierten endgültigen Version der Methodik wurde ein Gemisch aus isotonenmarkierten Verbindungen und nicht isotonenmarkierten Verbindungen zur Quantifizierung herangezogen. In **Tab. 16** sollen die Metabolite, die zugehörigen internen Standards und die potentiell zugänglichen Kompartimente anhand ihrer chemischen Struktur veranschaulicht werden.

| Metabolit  | Interner Standard  | Kompartiment  |
|--|--|---|
| <br>Natrium Laktat                    | <br>Natrium Salicylat | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Leberhomogenate</li> <li>• Plasma</li> <li>• Hirnhomogenate</li> <li>• Mikrodialysate</li> </ul> |
| <br>Natrium Pyruvat                   |  |   |
| <br>Natrium 3-Hydroxybutyrat<br>(BHB) |  |   |
| <br>Trisodium Citrat                  |  |   |
| <br>Disodium Succinat                 |  |   |
| <br>Disodium Fumarat                  | <br>Disodium Phthalat | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Leberhomogenate</li> <li>• Hirnhomogenate</li> </ul>   |



**Tab. 16** Chemische Strukturen der Metabolite mit ihren internen Standards und dem messbaren Kompartiment.

### 2.3.2.4 Der Responsefaktor ( $R_f$ - Wert)

Der Responsefaktor beschreibt das Verhältnis zweier Peakflächen zueinander. In der Analytik gibt es bis auf deuterierte Verbindungen keine Substanz, die die gleiche Peakfläche nach Auftrennung und Fragmentierung zeigt. Um dieser unterschiedlichen Verhältnismäßigkeit bei der Quantifizierung Rechnung zu tragen, berechnet man den  $R_f$ -Wert eines jeden Analyten mit seiner internen Standardverbindung.

$$R_f = \frac{area_{Istd}}{area_{Probe}}$$

### Gleichung 6 Berechnung des Responsefaktors

Die Berechnung des Responsefaktors sollte vor jeder Messung stattfinden, da die Variation des  $R_f$ -Wertes Größenordnungen annehmen kann, die 10 – 20 % von den Messwerten anderer Tage abweichen kann. Mit dieser Maßnahme verkleinert sich der entstehende Fehler und die Präzision der Messwerte nimmt zu.

## 2.3.2.5 Charakterisierung der Lösungsmittel und Derivatisierungsmittel

In diesem Kapitel werden die zur Anwendung gekommenen Lösungsmittel chemisch näher definiert und ihre jeweiligen Funktionen im Gesamtkontext der Methode betrachtet.

### 2.3.2.5.1 Pyridin

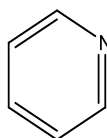
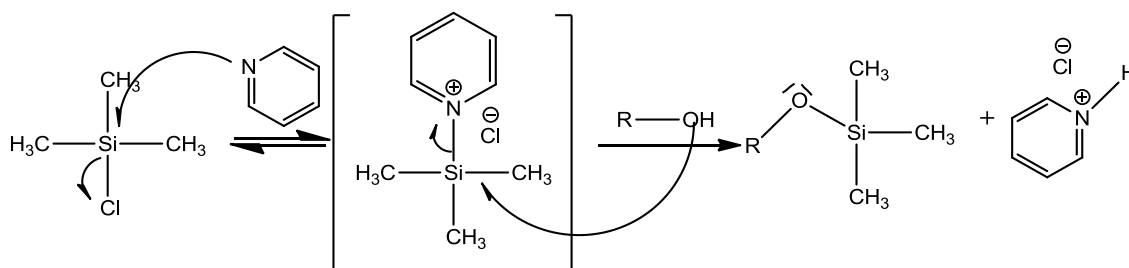


Abb. 55 Pyridin

Pyridin gehört zu den heterozyklischen Verbindungen und besitzt laut IUPAC bzw. Hantsch-Wittmann Nomenklatur die Bezeichnung *Azin*. Pyridin ist mit Wasser, Ethanol, Aceton, Diethylether und Benzol mischbar [216]. Der nukleophile Charakter von Wasser ist höher als der von Pyridin und stört somit die Silylierungsreaktion der zu bestimmenden Metabolite. Aus diesem Grund sollte nur hochreines Pyridin verwendet werden. Aus Gründen der Praktikabilität wurde nicht, wie in chemischen Laboren sonst üblich, frisch destilliertes Pyridin täglich neu hergestellt, sondern Pyridin in Gebinden bestellt, die kleine Volumina (25 ml), Molsiebe und wasserdichte Septen enthalten. Die Wasserfreiheit ist mit diesem Verfahren nicht quantitativ auszuschließen, hat aber auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nur noch geringen Einfluss. In der Silylierungsreaktion besitzt Pyridin zwei essentielle Funktionen. Zum einen erhöht es den elektrophilen Charakter von BSTFA / TMCS durch Bildung eines quartären Pyridiniumintermediates (s. **Reaktionsgleichung 4**). Zum anderen kann es die Bildung von Protonen abfangen und so den p (Pyr) - Wert während der Reaktion konstant halten, sodass Hydrolysereaktionen vermindert werden.



Reaktionsgleichung 4 Bildung des stark elektrophilen quartären Pyridiniumintermediates

### 2.3.2.5.2 N,O - Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA)

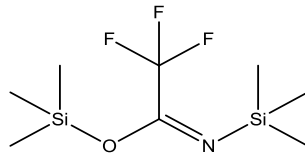


Abb. 56 N,O - Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA)

BSTFA ist ein Silylierungsmittel, das am besten geeignet ist, um polare und sterisch gehinderte Moleküle quantitativ (99,5 %) in ihre Trimethylsilylderivate zu überführen [215]. Das Molekül besteht aus einer Acetamid - Struktur, dessen Elektrophilie durch die benachbarte Trifluorgruppe deutlich steigt. Die Silylierung sollte immer mit einem Überschuss an Silylierungsmittel erfolgen. Dabei ist zu beachten, dass BSTFA zwei Trimethylsilylgruppen abspalten kann. Durch die hohe Flüchtigkeit aller Silylierungsmittel erfolgte jeder Schritt unter Inertbegasung. Die einzelnen Volumina sind in den jeweiligen Kapiteln der unterschiedlichen Kompartimente zu entnehmen.

### 2.3.2.5.3 Trimethylchlorsilan (TMCS)

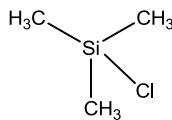


Abb. 57 Trimethylchlorsilan (TMCS)

TMCS stellt die Leitsubstanz der Silylierungsreagenzien dar. In der Silylierungsreaktion (s. *Reaktionsgleichung 3*) der hier vorliegenden Arbeit erfüllt sie die Funktion eines Silylierungsmittels und Katalysators für die Synthese der jeweiligen Metabolite.

### 2.3.2.5.4 Diisopropylethylamin (Hünig - Base)

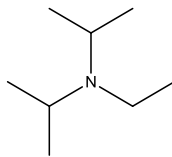


Abb. 58 N, N - Diisopropylethylamin (Hünig - Base)

Diisopropylethylamin stellt ein tertiäres Amin dar, welches in der organischen Chemie als Wasserstoffakzeptor eine große Rolle spielt. In der Silylierungsreaktion werden bei der Spaltung von BSTFA Protonen freigesetzt, die den pH - Wert senken und irreversible saure Hydrolysen katalysieren. Die chemische Struktur der Hünig - Base bedingt, dass nur ein Proton die sterische Hinderung durchdringen kann, um das tertiäre Amin zu protonieren. Nach erfolgter Protonierung wird das Proton aber nicht mehr abgegeben und verbleibt am Stickstoffatom der Hünig - Base. Hydrolysereaktionen werden somit unterdrückt, was zu einer erhöhten Stabilität der synthetisierten Produkte über die Zeit führt. Die Hünig - Base wird zusammen mit Pyridin nach der Begasung mit Stickstoff in die GC - Vials gefüllt. Das optimale Verhältnis liegt bei 70 : 30 Pyridin zu Hünig - Base.



### 2.3.2.5.5 Sonstige Lösungsmittel

Für die Extraktion werden Methanol, Chloroform und Wasser benötigt. Da Verunreinigungen in der gekoppelten Gaschromatographie mit Massenspektrometrie in sehr kleinen Mengen bereits detektierbar sind, muss auf die hohe Reinheit aller Lösungsmittel besonderen Wert gelegt werden. Die beschriebenen Lösungsmittel haben als Mindestanforderung eine Reinheit von  $\geq 99\%$  zu erfüllen.

### 2.3.2.5.6 Endvolumina in Abhängigkeit des zu vermessenden Kompartiments

| Kompartiment                  | Reagenz      | Volumen [ $\mu\text{l}$ ] | Endvolumen [ $\mu\text{l}$ ] |
|-------------------------------|--------------|---------------------------|------------------------------|
| Leber - bzw.<br>Hirnhomogenat | Pyridin      | 70                        | 200                          |
|                               | Hünig - Base | 30                        |                              |
|                               | BSTFA        | 99                        |                              |
|                               | TMCS         | 1                         |                              |
| Plasma                        | Pyridin      | 52,5                      | 150                          |
|                               | Hünig - Base | 22,5                      |                              |
|                               | BSTFA        | 74                        |                              |
|                               | TMCS         | 1                         |                              |
| Mikrodialysat                 | Pyridin      | 35                        | 100                          |
|                               | Hünig - Base | 15                        |                              |
|                               | BSTFA        | 49                        |                              |
|                               | TMCS         | 1                         |                              |

*Tab. 17 Endvolumina der zuzugebenden Reagenzien nach Kompartimenten*

Die hier gezeigten Volumina entsprechen den Volumina, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden. Allerdings können auch andere Volumina verwendet werden, jedoch sollten die Verhältnisse für Leber- und Hirnhomogenate (70 : 30 : 99 : 1) der einzelnen Reagenzien zueinander nicht verändert werden.

### 2.3.2.6 Vorbereitung der Chemikalien und Lösungen für die quantitative Vermessung

Um die mannigfaltigen Einflüsse der Probenvorbereitung auf die Quantifizierung so gering wie möglich zu halten, wurde ein täglicher Response Faktor ( $R_f$ - Wert) vermessen.

$$R_f = \frac{area_{Istd}}{area_{probe}}$$

#### *Gleichung 7 Berechnung des Responsefaktor*

Um diesen  $R_f$ - Wert zu ermitteln, müssen alle zu vermessenden Analyte in einer Probe in gleichen Massen eingewogen, gelöst, getrocknet, derivatisiert und vermessen werden. Die angestrebte Massenkonzentration eines jeden Analyten wurde auf 100 ng/ $\mu\text{l}$  festgelegt. Wichtig hierbei ist, dass alle Analyte dieselben Massenkonzentrationen in der Standardmischung besitzen. Ein  $R_f$ - Wert zwischen 0,8 - 1,2 ist ein vertrauenswürdiger Wert und spricht für die grundsätzliche Zugänglichkeit des Analyten für die GC - MS Methodik.

Alle Substanzen (iSTD + Referenzsubstanzen) werden in einem Eppendorf Reaktionsgefäß (*cup*) separat eingewogen. Die eingewogenen Massen liegen zwischen 1 – 10 mg, da hier der lineare Bereich der Analysenwaage liegt. Weiterführend wird jede Einzelsubstanz mit einem Gemisch aus 3 : 2 Methanol / Wasser (pH = 9,50 ± 0,01) auf eine Endkonzentration von 10 mg/µl eingestellt. Falls die Löslichkeit einzelner Substanzen unzureichend sein sollte, kann auch die Polarität durch Zugabe von Wasser (pH = 9,50 ± 0,01) erhöht werden. Falls diese Maßnahme durchgeführt werden soll, muss der R<sub>f</sub>-Wert definitiv neu bestimmt werden. Da die so entstandene Konzentration der Standardmischung den Massendetektor massiv verschmutzen würde, wird eine weitere 1 : 100 Verdünnung mit Methanol/Wasser auf 100 ng/µl vorgenommen. Wenn alle Substanzen vollständig gelöst vorliegen, werden diese miteinander vereint und bis zur Trockne mit strömendem N<sub>2</sub> begast und mit einem Heizblock (60 °C) reduziert. Wenn die visuelle Inspektion eine geringe Restfeuchte ergibt (gelartiger – kristalliner Zustand), sollte der gesamte Ansatz noch weitere 45 min. begast werden, um eine höhere „Wasserfreiheit“ zu gewährleisten, die zu reproduzierbareren R<sub>f</sub> - Werten führt. Nach erfolgreichem Eindampfen bis zur Trockne wird die Standardmischung mit inertem Argon begast. Danach wird Pyridin (70 µl) und Hünig-Base (30 µl) zugegeben und unter Zuhilfenahme des Ultraschallbades die gesamte Mischung gelöst (20 min). Nach erfolgter Ultraschallbehandlung wird das Probengemisch mit 99 µl BSTFA und 1 µl TMCS versetzt, der Deckel geschlossen und weitere 10 min. mit dem Ultraschallbad behandelt. Die Silylierung der Referenzsubstanzen wird bei 70 °C und 50 min. mit einem Heizblock, der auf einem Orbital - Schüttler installiert ist, vollzogen. Nachdem das Reaktionsgemisch fertig silyliert worden ist, kann es nach Äquilibrierung bei Raumtemperatur (ca. 10 min) vermessen und der Tages - R<sub>f</sub> - Wert bestimmt werden.

Für Plasmaproben benötigt man als Denaturierungsmittel ein Gemisch aus 9 : 1 Methanol / Wasser. Als Wasser wird Milli - Q - Wasser verwendet, mit jeweils 100 µl NaOH / HCl versetzt und danach wird der pH - Wert auf 9,50 ± 0,01 eingestellt. Um pH-Wertschwankungen niedrig zu halten, sollte das eingestellte Wasser in einem 50 ml Falcon fast randvoll befüllt werden und danach der pH - Wert eingestellt werden. Nach der Einstellung des pH - Wertes sollte das Falcon luftdicht verschlossen werden.

Falls Leber - oder Hirnhomogenate vermessen werden, benötigt man drei unterschiedliche Lösungen. Um die initiale Denaturierung vollziehen zu können, bedarf es einer Lösung aus Chloroform / Methanol im Verhältnis 2 : 1. Die weiteren Lösungen bestehen aus Milli - Q - Wasser mit pH = 9,50 ± 0,01 und Methanol / Wasser im Verhältnis 3 : 2. Diese Lösungen sind nach Fertigstellung bis zur Benutzung auf Eis aufzubewahren.

### **2.3.2.7 Versetzen der Proben mit internem Standard**

Um eine Quantifizierung der Metabolite in den jeweiligen Geweben vornehmen zu können, muss eine definierte Menge an internem Standard in jedem Probengefäß vorgelegt werden. Alle nachfolgenden Schritte werden sowohl vom internen Standard als auch dem zu quantifizierenden Metaboliten durchlaufen. Nur so kann bei konstantem R<sub>f</sub> -Wert eine Quantifizierung vollzogen werden.

Die Vorbereitung entspricht dem in **Kap. 2.3.2.6 Vorbereitung der Chemikalien und Lösungen für die quantitative Vermessung** besprochenem Vorgehen. Allerdings werden nur die internen Standards in einem Mix zusammengefasst und auf die gewünschte Massenkonzentration verdünnt. Wichtig beim Versetzen der Probe mit dem internen Standard - Mix ist die Beachtung der resultierenden

Konzentration nach Beendigung der Silylierung. Als Standardkonzentration wurde eine Endkonzentration von 100 ng/ $\mu$ l gewählt.

### 2.3.3 Quantitative Bestimmung von Metaboliten aus unterschiedlichen Mauskompartimenten

Die Etablierung der GC - MS Analytik wurde für unterschiedliche Kompartimente von Mäusen und Ratten etabliert. Mithilfe der etablierten Protokolle können Distributions -, Verteilungs - und Metabolisierungswege von Diäten, aber auch Arzneistoffen beantwortet werden.

#### 2.3.3.1 Quantitative Bestimmung der Metabolite im Mikrodialysat mithilfe der GC - MS

Das Mikrodialysat stellt das „Kompartiment“ dar, welches am wenigstens Probenaufbereitung bedarf. Gründe hierfür stellen die semipermeable Membran der Mikrodialysesonde und der *Liquor cerebrospinalis* dar. Der *Liquor cerebrospinalis* enthält keine Proteine, was die Probenaufbereitung enorm vereinfacht, da auftretende Matrixeffekte sehr gering sind. Dies wiederum bedingt ein sehr geringes Signal - Rausch - Verhältnis und konsekutiv eine niedrigere Nachweisgrenze. Die semipermeable Membran mit einer cut-off Grenze von > 10 kDa sorgt für eine Vorreinigung des zu vermessenden Mikrodialysates.

Nachdem die Mikrodialysatproben gesammelt wurden, wurden die Proben bis zu ihrer Vermessung bei - 80 °C zwischengelagert. Am Tag der Vermessung wurden die Proben auf Eis aufgetaut und durchmischt. Nach Beschriftung der Vials wurden 100  $\mu$ l in das *MicroInlet* (0,1 ml, konisch, mit Feder) überführt. Das Vial wurde mit *Inlet* in den Heizblock (60 °C) verbracht und der Stickstoffstrom so eingestellt, dass eine gleichmäßige Begasung stattfinden konnte. Nachdem keine Flüssigkeit mehr sichtbar vorhanden war, wurde bei allen Proben ein Sicherheitszuschlag von 45 min unter Begasung durchgeführt. Danach wurden alle Proben zuerst mit Argon begast, sodass alle weiteren Schritte unter Schutzgasatmosphäre stattfinden konnten. Das optimale Verhältnis zwischen Pyridin und Silylierungsreagenz liegt bei 30 : 70 (s. **Kap. 2.3.2.2 Qualitative Etablierung der Metabolite**). Pyridin wird mithilfe einer gasdichten Hamilton - Spritze in ein zuvor mit Argon begastetes Glasröhrchen überführt. Aus diesem Glasröhrchen werden in jedes *Inlet* jeweils 30  $\mu$ l Pyridin gefüllt. Um den Rückstand homogen in Pyridin zu lösen, wird das Vial mit seinem Drehverschluß kräftig verschlossen und für 20 min. im Ultraschallbad behandelt. Danach wird im Verhältnis 99 : 1 zuerst N, O - Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) und danach Trimethylchlorsilan (TMCS) in jedes *Vial* hinzugegeben. Um auch hier eine gleichmäßige Durchmischung des Reaktionsansatzes zu gewährleisten, wird vor der eigentlichen Silylierung jedes Vial nochmals für 10 min im Ultraschallbad behandelt. Der Heizblock wird auf 70 °C vorgeheizt. Die Vials werden nach Ablauf der Zeit aus dem Ultraschallbad genommen und mit einem Papiertuch von außen trocken gerieben. Der Heizblock hat für jedes Vial passende Bohrungen, sodass eine einheitliche Wärmeabgabe an jedes Vial gewährleistet ist. Nachdem alle Vials in den Heizblock transferiert wurden, wird die Reaktionszeit auf 50 min determiniert, wobei auf einen geschlossenen Deckel des Heizblocks zu achten ist. Um auch während der Synthese eine gleichmäßige Durchmischung des Reaktionsansatzes zu gewährleisten, ist der Heizblock auf einem Orbital-Schüttler installiert. Nachdem die 50 min. Synthese bei 70 °C beendet ist, wird jedes Vial aus dem Heizblock entnommen und bei Raumtemperatur für ca. 5 - 10

min stehen gelassen. Nachdem der Reaktionsansatz Raumtemperatur erreicht hat, können die Metabolite vermessen werden.

Das Probenvolumen kann zwischen 30 - 150 µl variabel gewählt werden. Das Endvolumen an Pyridin und Silylierungsmittel ist so zu wählen, dass alle zu bestimmenden Metabolite noch einwandfrei (Basislinientrennung, Peakgeometrie und Integrierbarkeit) detektiert werden können. Das Verhältnis zwischen eingesetztem Probenvolumen und Lösungs - bzw. Silylierungsmitteln sollte nicht kleiner als 1 : 1 ausfallen. Ebenso zu beachten ist die Anpassung der resultierenden Konzentration des internen Standards im *Vial* nach erfolgter Silylierung.

### **2.3.3.2 Quantitative Bestimmung der Metabolite im Plasma - Kompartiment**

Alle zu bestimmenden Metabolite aus Plasmaproben, die in dieser Arbeit vermessen wurden, liegen gelöst im Plasma vor. Das gewonnene Vollblut wurde nach Beendigung der Versuche gewonnen. Um Matrixeffekte, Überlagerungsphänomene und übermäßige Verschmutzung bei der Vermessung der Proben mithilfe der GC - MS zu vermeiden, bedarf es einer Probenaufbereitung des gewonnenen Vollblutes.

#### **2.3.3.2.1 Probenaufbereitungen der Plasmaproben**

Hierzu wird das frisch gewonnene Vollblut noch im EDTA - Röhrchen bei 4 °C, 1500 g und 20 min. zentrifugiert. Der Überstand (Plasma) wird quantitativ entnommen und kann entweder direkt vermessen oder bis zu einer späteren Vermessung bei - 80 °C zwischengelagert werden. Falls eine Zwischenlagerung im Kühlschrank vorgenommen wird, kann auch eine vorherige Fällung mit MeOH / H<sub>2</sub>O (9 : 1) in Betracht gezogen werden.

Wie bereits bei der Vermessung des Mikrodialysates besprochen kann das Probenvolumen an die jeweiligen Erfordernisse (Zeitauflösung, Detektionsgrenze der Metabolite etc.) angepasst werden. In Bezug auf Plasmaproben hat sich ein Vielfaches von 200 µl Plasma als zielführend herausgestellt.

Ein Eppendorf Reaktionsgefäß (2 ml) wird mit der jeweiligen Probenaufschrift versehen und mit 200 µl Plasma befüllt. In diesen Ansatz werden 20 µl eines 2000 ng/µl internen Standard - Mix hinzugegeben. Da das Endvolumen nach der Silylierung 200 µl entspricht, resultiert für den internen Standard eine endgültige Massenkonzentration von 100 ng/µl.

Nun wird ein Gemisch aus 9 : 1 Methanol / Wasser (pH = 9,50 ± 0,01) auf ein Endvolumen von 2000 µl hinzu pipettiert. Dieser Schritt denaturiert alle vorhandenen Proteine im Plasma. Um eine nahezu quantitative Ausfällung zu gewährleisten, werden alle Eppendorf Reaktionsgefäße für 10 min. (in einem speziellen Aufsatz für Eppendorf Reaktionsgefäße) kräftig durchrüttelt. Danach wird der gesamte Überstand quantitativ in ein GC - MS *Vial* überführt.

#### **2.3.3.2.2 Silylierung der Plasmaproben**

Die Lösungsmittel - bzw. Silylierungsmittelvolumina, die bei Plasmaproben hinzugegeben werden müssen, sind 45 µl Pyridin sowie 104 µl BSTFA und 1 µl TMCS. Das resultierende Volumen entspricht somit 150 µl. Bei der Silylierung der Mikrodialysatproben werden alle Schritte im fertigen *Inlet* vollzogen. Die Aufbereitung der Plasmaproben darf nicht im *Inlet* erfolgen, da hier das Trocknungsergebnis unzureichend ist. Das *Vial* wird bis zum Ende der Silylierung als Reaktionsgefäß

genutzt. Wenn der fertige Reaktionsansatz nach der Silylierung Raumtemperatur erreicht hat, werden die *Vials* in einer Zentrifuge mit entsprechendem Einsatz bei 4 °C und 1500 g 15 min. zentrifugiert. 100 µl des Überstandes werden in ein *Inlet* mit *Vial* überführt, so dass die Proben anschließend vermessen werden können.

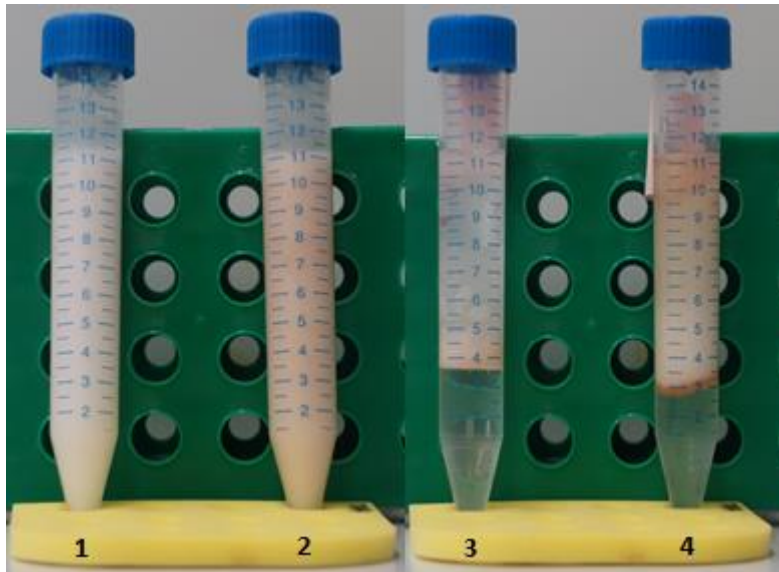
Die genannten Volumina, die an Lösungs - bzw. Silylierungsmittel dazugegeben wurden, entsprechen den in dieser Arbeit verwendeten Volumina. Sie können alle entsprechend den Bedürfnissen angepasst werden.

### **2.3.3.3 Quantitative Bestimmung der Metabolite im Hirn - und Leberhomogenat**

Wenn Hirn - oder Leberhomogenate vermessen werden sollen, bedarf es einer Aufreinigung der Proben. Die zu quantifizierenden Metabolite sind alle hydrophil und werden einer Folch Extraktion unterzogen, um die lipophile Phase der jeweiligen Gewebe von der hydrophilen zu trennen [217]. Die biphasische Extraktion wird mithilfe von Chloroform / Methanol und Wasser vollzogen. Nach Entnahme der jeweiligen Gewebe (s. **Kap. 2.3.3.2.1 Probenaufbereitungen der Plasmaproben, 2.3.3.3.1 Probenaufbereitungen der Hirn - und Leberhomogenate**), werden diese sofort in flüssigem Stickstoff abgekühlt. Die Proben können entweder bei - 80 °C zwischengelagert werden oder direkt der Extraktion unterzogen werden.

#### **2.3.3.3.1 Probenaufbereitungen der Hirn - und Leberhomogenate**

Die entnommenen Gewebe werden in flüssigem Stickstoff bis zur Homogenisierung aufbewahrt. Das zu extrahierende Gewebe wird aus dem Dewar-Gefäß entnommen und in ein tariertes 15 ml Falcon transferiert. Die Einwaage des Gewebes sollte zwischen 150 - 400 mg liegen. Bei Hirngeweben bedarf es nur der Transferierung in ein tariertes Falcon mit anschließendem Wiegen, da das Gesamtgewicht einer Hirnhemisphäre der Maus etwa 250 mg beträgt und den Gewichtsbereich von 150 - 400 mg daher nicht übersteigt. Nachdem das Gewicht notiert wurde, wird das Falcon bis zur Homogenisierung wieder in flüssigem Stickstoff verwahrt. Initialer Schritt der Extraktion ist die Zugabe von 2 ml der Chloroform / Methanol (2 : 1) Lösung. Danach wird mit dem Sonifier das gesamte Gewebe gleichmäßig homogenisiert. Sukzessive wird das gesamte Volumen von 6 ml Chloroform / Methanol hinzugegeben. Da die Energieabgabe durch den Sonifier nicht unerheblich ist, muss darauf geachtet werden, dass die Homogenisierung auf Eis und mit eisgekühlten Arbeitslösungen vollzogen wird. Begründet liegt dieser Schritt in der Tatsache, dass Chloroform selbst in einer methanolischen Lösung immer noch sehr flüchtig ist und das Extraktionsergebnis bei fehlendem Chloroformanteil negativ beeinflusst wird. Wenn das Gesamtvolumen von 6 ml Chloroform / Methanol erreicht ist, bricht man die Phasen durch Zugabe von 2 ml eiskaltem Wasser ( $\text{pH} = 9,50 \pm 0,01$ ). Nach Phasenbrechung wird erneut mit dem Sonifier eine komplette Durchmischung der Phasen bewirkt, bis eine milchig - gelbe Suspension entsteht. Im Folgenden wird die Suspension bei 0 - 2 °C, 1500 g und 15 min. zentrifugiert.



**Abb. 59 Biphase Extraktion mit Chloroform / Methanol / Wasser. links: nach Homogenisierung; rechts: nach Zentrifugation. 1: Hirn - 2: Leberhomogenat 3: Hirnhomogenat nach Zentrifugation, 4: Leberhomogenat.**

Danach wird die obere Methanol / Wasserphase quantitativ entnommen und die untere Chloroformphase in zwei weiteren Extraktionsschritten mit einer Methanol / Wasser - Mischung (3 : 2) versetzt. Für den zweiten Extraktionsschritt werden 3 ml und für den dritten Extraktionsschritt 2 ml einer Methanol / Wasser - Mischung (3 : 2) benutzt. Nach Zugabe der Extraktionslösungen wird jeweils für 10 min kräftig *gevortext*, um eine Phasendurchmischung zu begünstigen. Nach erfolgter Zentrifugation (0 - 2 °C, 1500 g, 15 min) werden die oberen Phasen quantitativ entnommen, in einem separaten Falcon vereint und bei - 80 °C zwischengelagert.

### 2.3.3.3.2 Silylierung der Hirn - und Leberhomogenate

Da die Silylierung unter „wasserfreien“ Bedingungen ablaufen hat, muss das gesamte Volumen der wässrigen Methanolphasen unter einem Stickstoffstrom und Wärme bis zur Trockne eingedampft werden. Das Eindampfen bis zur Trockne wird in den normalen GC - MS *Vials* vollzogen. Hierzu werden anteilig jeweils 1 - 1,5 ml der wässrigen Methanollösung in die jeweiligen *Vials* transferiert und eingengt. Zu beachten ist die steigende Konzentration in der einzuengenden Lösung, die längere Abdampfzeiten bedingt. Das weitere Vorgehen wurde in den vorherigen Kapiteln beschrieben und soll hier nicht weiter vertieft werden. Die Volumina an Pyridin sind 60 µl / *Vial*, sowie 138,5 µl BSTFA und 1,5 µl TMCS. Nach erfolgter Silylierung und Zentrifugation wird das Reaktionsgemisch in *Inlets* gefüllt und vermessen. Ein Verhältnis von 30 : 70 zwischen Pyridin und Silylierungsmittel hat sich als reproduzierbar und präzise über die bestehende Messdauer herausgestellt. Auch hier können die Endvolumina je nach Fragestellung an die Bedürfnisse angepasst werden.

### 2.3.3.4 Spezifikationen der GC - MS für die quantitative Bestimmung

Die GC - MS Spezifikationen, die bei der quantitativen Bestimmung der Metabolite in den jeweiligen Kompartimenten verwendet wurde, wird in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

#### 2.3.3.4.1 Temperaturprogramme

Die Temperaturprogramme müssen in Abhängigkeit der Elutionsreihenfolge der Eluenten individuell angepasst werden. Dabei muss darauf geachtet werden, dass eine Basislinientrennung aller Analyte (v.a. deuterierte Verbindungen) in einem Lauf erfolgen kann. Das Lösungsmittel bzw. Silylierungsmittel sollte nicht auf den Detektor gelangen, da ansonsten der Detektor unnötig belastet wird. Die Folge einer dauerhaften Detektion von Lösungsmitteln und Silylierungsmitteln bedingt ein schnelleres Austauschen des Elektronen - Multipliers. Außerdem muss die Stoßkammer schneller gereinigt werden, was einen hohen Zeitaufwand zur Folge hat. Aus diesen Gründen wird der Detektor in beiden Temperaturprogrammen erst bei Minute 14 eingeschaltet (Lösungsmittel *cut – off*).

##### 2.3.3.4.1.1 Temperaturprogramm Agilent VF - 5 ms 60 m x 25 mm x 0,25 µm + 10 m Vorsäule

| Ofen Rampe | °C / min | Nächste erreichte Temperatur [°C] | Haltedauer Temperatur [min.] | Gesamtlaufzeit / Rampe [min.] |
|------------|----------|-----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 1          | 0        | 50                                | 6                            | 6                             |
| 2          | 2        | 60                                | 0                            | 11                            |
| 3          | 5        | 250                               | 0                            | 49                            |
| 4          | 10       | 300                               | 5                            | 59                            |

Tab. 18 Temperaturprogramm Agilent VF - 5 ms 60 m x 25 mm x 0,25 µm + 10 m Vorsäule

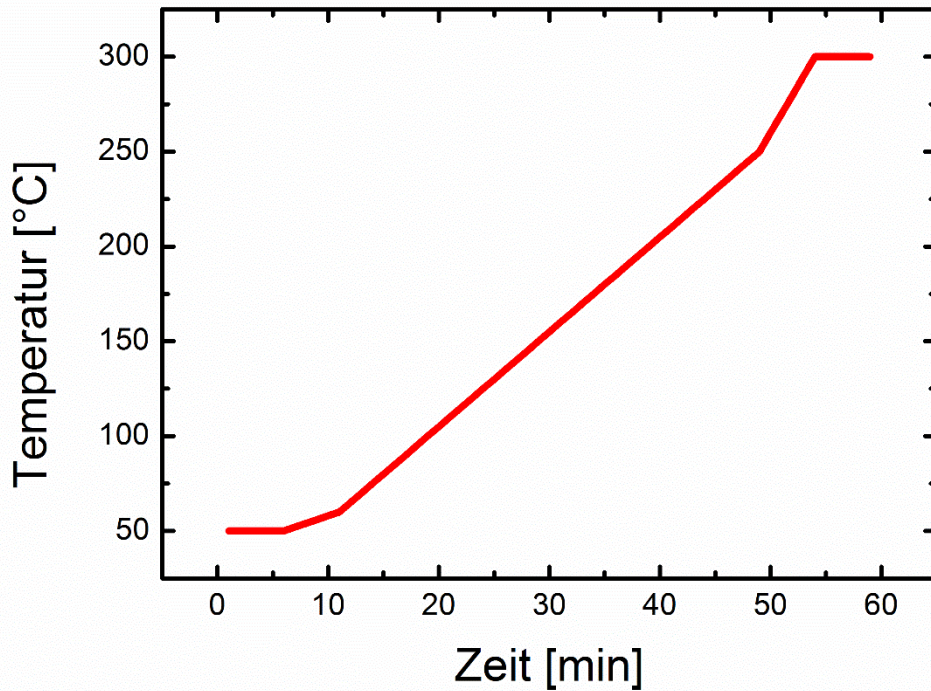


Abb. 60 Graphische Darstellung der Temperaturprogramme

#### 2.3.3.4.1.2 Temperaturprogramm Agilent VF - 5 ms, 30 m x 25 mm x 0,25 µm + 5 m Vorsäule

| Ofen Rampe | °C / min | Nächste erreichte Temperatur [°C] | Haltedauer Temperatur [min.] | Gesamtlaufzeit / Rampe [min.] |
|------------|----------|-----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 1          | 0        | 50                                | 6                            | 6                             |
| 2          | 2        | 60                                | 0                            | 11                            |
| 3          | 5        | 250                               | 0                            | 44                            |
| 4          | 10       | 300                               | 5,00                         | 49                            |

Tab. 19 Temperaturprogramm Agilent VF - 5 30 m x 25 mm x 0,25 µm + 5 m Vorsäule

#### 2.3.3.4.1.3 Inlet Spezifikationen

Das *Inlet* ist ein deaktiviertes Quarzglasröhrchen, in dem die Überführung der flüssigen Analyte in die Gasphase vollzogen wird. Das *Inlet* ist in einem temperierbaren Sockel integriert, wobei die Temperatur im Röhrchen 250 °C beträgt. Verbunden ist das *Inlet* auf der oberen Seite mit der Autosamplereinheit, wobei die gasdichte Spritze über ein Septum in das *Inlet* gelangen kann. Das Injektionsvolumen beträgt unabhängig von den gemessenen Kompartimenten 1 µl. Auf der unteren Seite wird das *Inlet* an die Säule angeschlossen, wodurch nach der Evaporation die Gasmoleküle auf die Säule gelangen können und aufgetrennt werden können. Die Probenaufbereitung bedingt eine Aufkonzentrierung der Proben im Vergleich zu ihrer ursprünglichen Form. Um die Belastung für die Detektoreinheit und die Säule minimal zu halten, kann die Gasphase im *Inlet* aufgeteilt (gesplittet) werden. Die biologische Probe definiert das Splitverhältnis, wobei Hirn- und Leberhomogenate eher höhere Splitverhältnisse (1 : 10) und weniger aufkonzentrierte Proben niedrigere bis gar keine Aufteilung benötigen. Verwendete Splitverhältnisse:



| Kompartiment               | Splitverhältnis                                       |
|----------------------------|---|
| Leber - bzw. Hirnhomogenat | 1 : 10  |
| Plasma                     | 1 : 5 – 1 : 10  |
| Mikrodialysat              | splitless (gesamtes Gasvolumen gelangt auf die Säule) |

*Tab. 20 Splitverhältnisse der einzelnen Kompartimente*

#### 2.3.3.4.2 Spezifikationen für Helium als Trägergas

Helium wird in der Gaschromatographie bevorzugt verwendet, da es alle Vorteile eines Trägergases bei geringen Sicherheitsvorkehrungen erfüllt. Die Vorteile von Helium als Trägergas sind hohe Inertheit gegenüber Säulen- und Probenmaterial, es ist untoxisch und nicht brennbar (Vergleich Wasserstoff!). Es gibt unterschiedliche Geschwindigkeiten des Trägergasflusses, wobei in der vorliegenden Arbeit immer im konstanten Gasflussmodus gearbeitet wurde. Das Gerät besitzt die Fähigkeit bei höheren Temperaturen den Gasdruck so anzupassen, dass immer die gleiche Trägergasgeschwindigkeit resultiert. Folgende Gleichungen beschreiben die physikalischen Einflussfaktoren auf die Trägergasgeschwindigkeit (u) bzw. auf die volumetrische Trägergasgeschwindigkeit (v):

$$u = \frac{l}{t_0} \quad (I)$$

*Gleichung 8 Berechnung Trägergasgeschwindigkeit*

$$v = \pi * r^2 * u \quad (II)$$

*Gleichung 9 Berechnung volumetrische Trägergasgeschwindigkeit*

u = mittlere Trägergasgeschwindigkeit [cm / s]

l = Länge der Säule [cm]

t<sub>0</sub> = Totzeit des Systems [s]

r = Innenradius der Säule [cm]

v = volumetrische Trägergasgeschwindigkeit [ml / min.]

Zu beachten ist, dass in dieser Arbeit nur Kapillarsäulen verwendet werden, die normalerweise Trägergasgeschwindigkeiten zwischen 1 - 2 ml / min. (gegenüber gepackten Säulen von 25 - 30 ml / min.) aufweisen [218].

### 2.3.3.4.3 Wartung der Autosamplerspritze

Die Silylierungsmittel BSTFA und TMCS sind stark korrodierend und bedingen so einen schnellen Verschleiß der zur Anwendung kommenden gasdichten Spritzen zur Probenaufgabe. Aus diesem Grund bedarf es eines Lösungsmittels, das die Probenintegrität nicht beeinflusst und die restlichen Silylierungsmittel herauspült. Hierzu wurde Methanol verwendet. Aufgrund des nukleophilen Charakters von Methanol muss die Spritze vorher mit Probenflüssigkeit benetzt werden, um so die Benetzung aller Proben zu gewährleisten. Im Folgenden wird die Vor - bzw. Nachspülung der Spritze veranschaulicht:

| Lösungsmittel                              | Vorspülung | Nachspülung |
|--|------------|-------------|
| Methanol                                   | 2 x        | 6 x         |
| Probe                                      | 3 x        | 0 x         |
| Benetzen der Spritze mit Probenflüssigkeit | 6 x        | 0 x         |

Tab. 21 Vor - und Nachspülung der Spritze

### 2.3.3.4.4 Messesequenz

Vor der Vermessung muss die Sequenzreihenfolge festgelegt werden. In **Abb. 61 Sequenzmodul** ist die Task - Leiste zum Schreiben der Sequenz zu sehen. Hier muss die Methode, die Vial Nummer und die Probenbezeichnung hinterlegt werden. Nachdem alle Informationen vorhanden sind, muss über den rechten Button (Vial mit Haken) die Sequenz validiert werden. Nach erfolgreicher Validierung durch das System kann man mit dem Männchen Symbol die Messung starten.



Abb. 61 Sequenzmodul

### 2.3.3.5 Berechnung der Analytenkonzentration im jeweiligen Kompartiment

Um die Stoffmengenkonzentration des jeweiligen Metaboliten im entsprechenden Gewebe berechnen zu können, benötigt man den täglich neu berechneten  $R_f$ - Wert, das Gewebenassgewicht, die „area under the curve“ (AUC) des internen Standards und des Analyten, sowie das Endvolumen im GC-Vial. Der Responsefaktor wird täglich berechnet, um die vorherrschenden Messbedingungen zu berücksichtigen. Somit berücksichtigt der Responsefaktor die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften während der Auftrennung und Fragmentierung der Probe.

Dabei gilt:

$$R_f = \frac{AUC_{iSTD}}{AUC_{Probe}} \quad (I)$$

**Gleichung 10 Berechnung des  $R_f$ - Wertes**

Mithilfe des Dreisatzes wird die zu bestimmende Konzentration des Analyten berechnet, dabei gilt:

$$\begin{aligned} AUC_{Istd} &\rightarrow 100 \frac{ng}{\mu l} \\ AUC_{Analyt} &\rightarrow x \frac{ng}{\mu l} \\ \frac{AUC_{Analyt}}{AUC_{Istd}} * 100 \frac{ng}{\mu l} &= x \frac{ng}{\mu l} \end{aligned} \quad (II)$$

**Gleichung 11 Berechnung der Massenkonzentration des Analyten**

Nun muss die berechnete Massenkonzentration mit dem  $R_f$ - Wert korrigiert werden, dabei gilt:

$$y_{Korrektur} = x \frac{ng}{\mu l} * R_f \quad \left[ \frac{ng}{\mu l} \right] \quad (III)$$

**Gleichung 12 Korrektur der Massenkonzentration**

Da der berechnete Wert nur für 1  $\mu l$  definiert ist, muss das gesamte Volumen im GC - Vial berücksichtigt werden. Das Standardprotokoll sieht für Homogenate und Plasmaproben 200  $\mu l$  und für Mikrodialysate 100  $\mu l$  als Endvolumen vor. Es folgt:

$$m_{Analyt} = y_{Korrektur} \frac{ng}{\mu l} * 200 \mu l * 10^{-9} \quad [g]$$

**Gleichung 13 Berechnung der Gesamtmasse des Analyten**

Um die Stoffmenge (n) der Probe berechnen zu können bedarf es dem Molekulargewicht der anionischen / kationischen Form des Analyten ohne Gegenion. Exemplarisch soll hierfür das Molekulargewicht von  $\beta$  - Hydroxybutyrat (BHB) verwendet werden, dabei gilt:

$$\begin{aligned} n_{Analyt} &= \frac{m_{Analyt} \frac{g}{mol}}{M_{BHB} \frac{g}{mol}} \quad [mol] \\ n_{Analyt} &= \frac{m_{Analyt} \frac{g}{mol}}{103,10 \frac{g}{mol}} \quad [mol] \end{aligned}$$

**Gleichung 14 Berechnung der Stoffmenge des Analyten**

Da alle Metabolite im Hirnwasseranteil gelöst vorliegen, wird das Nassgewicht des jeweiligen Gewebes (Wasseranteil Hirn 80 % [219], Leber 75 % [220]) auf den Wasseranteil bezogen bzw. korrigiert.

Die Konzentration im Hirnhomogenat (exemplarisch) ergibt somit:

$$c = \frac{n \text{ mol}}{V \text{ l} * 0,8 * 10^{-6}} \quad \left[ \frac{\text{mol}}{\text{l}} \right]$$

#### *Gleichung 15 Berechnung der Stoffmengenkonzentration*

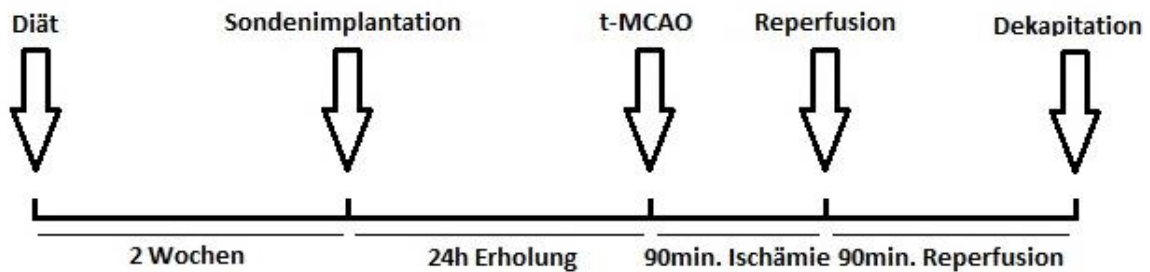
Die Berechnung der Stoffmengenkonzentration soll zur besseren Vergleichbarkeit der gemessenen Werte mit den in der Literatur beschriebenen Metabolitkonzentrationen dienen. Normalerweise wird in der Analytik die Dimension  $\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$  bevorzugt, da die Massenkonzentration in der Massenspektrometrie die leichter zugängliche Dimension darstellt und auch von allen automatisierten Softwaresystemen zur Quantifizierung der jeweiligen Analytkonzentrationen bevorzugt wird.

### 3 Ergebnisse

Die Ergebnisteile in der vorliegenden Arbeit gliedern sich in drei Teile auf. Der erste Teil beschäftigt sich mit der „hepatischen Ketogenese in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten“. Der zweite Teil befasst sich mit der „Akutintervention durch BHB bei Reperfusion“ und der dritte Teil mit der Etablierung und Reproduzierbarkeit der etablierten GC - MS Analytik.

#### 3.1 Hepatische Ketogenese in Abhängigkeit unterschiedlicher Diäten

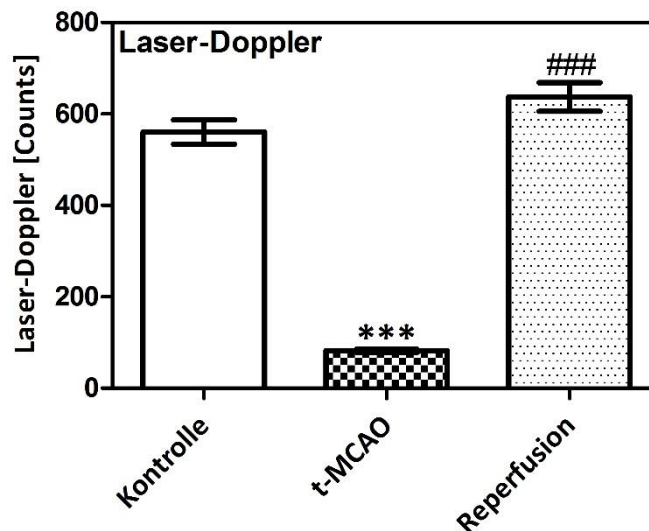
Im Folgenden werden die Ergebnisse für das erste Projekt „hepatische Ketogenese in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten“ gezeigt. Zur Übersichtlichkeit soll an dieser Stelle vor dem eigentlichen Ergebnisteil eine Übersicht über das experimentelle Vorgehen bei Mikrodialysestudien gegeben werden (s. *Abb. 62*).



*Abb. 62 Studiendesign Mikrodialyse*

### 3.1.1 Reproduzierbarkeit der transienten Okklusion der mittleren Zerebralarterien (t - MCAO)

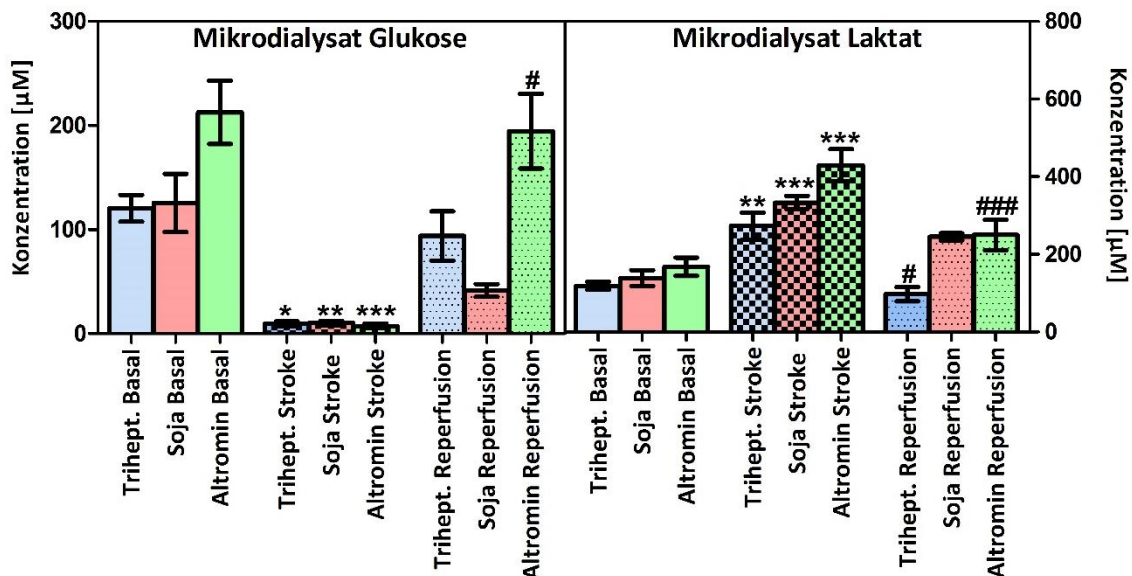
Die Sicherstellung der Reproduzierbarkeit der t - MCAO erfolgte mithilfe der Metabolitenspiegel Glukose und Laktat im Extrazellularraum (s. Abb. 64), sowie der Laser-Dopplersonographie bei erfolgter Ischämie bzw. bei Reperfusion (s. Abb. 63). Die Sondenimplantation erfolgte 24 h vor der Induktion des Schlaganfalls ins linke Striatum. Das linke Striatum ist nach der Okklusion der mittleren Zerebralarterie im Kerngebiet des Schlaganfalls [221].



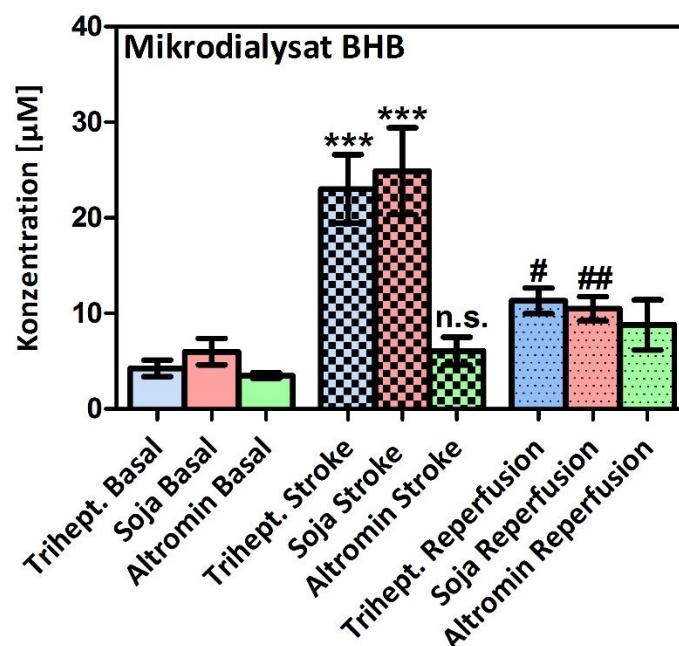
*Abb. 63* Illustriert sind Laser - Doppler Sonographie Messwerte (Mittelwerte  $\pm$  SEM) für die Perfusion der mittleren Zerebralarterie. Die einzelnen Mittelwerte sind vor, während und nach Induktion des Schlaganfalls gemessen worden. Der Messpunkt für die Doppler Sonde wurde ausgehend von Bregma: 1 mm posterior und 3,5 mm lateral (N = 15) gewählt. Statistik: Ein - Wege ANOVA mit Tukey - Post - Test;  $F_{2,44} = 160$ ; Signifikanzlevel: \*\*\*  $p < 0,001$  Kontrolle vs. t - MCAO; ###  $p < 0,001$  t - MCAO vs. Reperfusion.

In *Abb. 63* sieht man die Abnahme ( $< 15\%$  des Ausgangswertes) der mittleren Zerebralarterienperfusion, nachdem der Silikonfaden extrazerebral in die mittlere Zerebralarterie eingeführt wurde. Nach Entfernen des Fadens kann man die Zunahme der mittleren Zerebralarterienperfusion beobachten. Laktat (s. *Kap. 3.1.1 Reproduzierbarkeit der transienten Okklusion der mittleren Zerebralarterien (t - MCAO)*) kann als Indikator für die anaerobe ATP - Gewinnung dienen. Die Konzentration von Laktat steigt an, da Sauerstoff nicht mehr distal der Okklusion bereitgestellt werden kann. Alle Metabolite wurden mithilfe der GC - MS Analytik nach Silylierung gemessen (s. *Kap. 2.3.2.1 Die Silylierung*) und als lösliche Anionen (Ausnahme: Glukose) berechnet. Beide Arten, die Reproduzierbarkeit der Analytik sicherzustellen, sind auch in den STAIR - Richtlinien für die präklinische Schlaganfallforschung aufgeführt [222].

Zusätzlich zu den oben gezeigten Metaboliten Glukose und Laktat wurde im Mikrodialysat auch BHB gemessen.



**Abb. 64** Absolute Mikrodialysatspiegel von Glukose (links) und Laktat (rechts) (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im linken Striatum. Die einzelnen Fraktionen sind Basal (60 min.), während Stroke (90 min.) und nach Reperfusion (60 min.) gesammelt und anschließend vermessen worden. Die Untergruppen ergeben sich in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten (Triheptanoin; Soja; Altromin). Verwendet wurden weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35 g) (N = 6). Statistik: links: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey-Post-Test:  $F_{2,17} = 14,9$ ; rechts: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test:  $F_{2,17} = 27,1$ ; Signifikanzlevel: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  Triheptanoin / Soja / Altromin Basal vs. Triheptanoin / Soja / Altromin Stroke; #  $p < 0,05$ ; ###  $p < 0,001$  Triheptanoin / Soja / Altromin Stroke vs. Triheptanoin / Soja / Altromin Reperfusion.



**Abb. 65** Illustriert sind absolute Mikrodialysatspiegel von BHB (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im linken Striatum. Die einzelnen Fraktionen sind Basal (60 min.), während Stroke (90 min.) und nach

*Reperfusion (60 min.) gesammelt und anschließend vermessen worden. Die Untergruppen ergeben sich in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten (Triheptanoin; Soja; Altromin). Verwendet wurden weibliche CD - 1 Mäuse (28 – 35 g) (N = 6). Statistik: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test:  $F_{2,17} = 11,5$  ; Signifikanzlevel: \*\*\*  $p < 0,001$  Triheptanoin / Soja Basal vs. Triheptanoin / Soja Stroke ; #  $p < 0,05$ ; ,##  $p < 0,01$  Triheptanoin / Soja Stroke vs. Triheptanoin / Soja Reperfusion.*

Die BHB - Konzentrationen im Mikrodialysat zeigen nach Induktion eines Schlaganfalls für 90 min. eine Erhöhung in den beiden fettreich ernährten Gruppen Triheptanoin und Soja, wohingegen bei einer Standarddiät mit Altromin keine signifikante Erhöhung der BHB Spiegel messbar ist. Nach 60 min. Reperfusion sinken die BHB Spiegel in den beiden fettreich ernährten Gruppen, erreichen aber nicht Basallevelniveau.

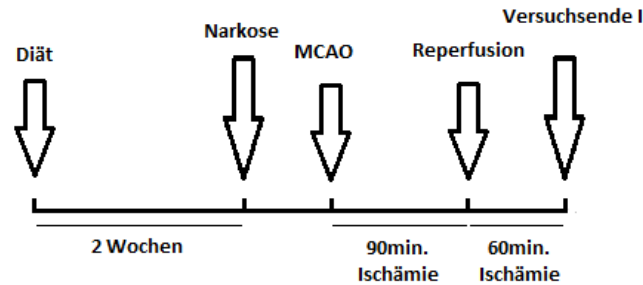
Abschließend ist anzumerken, dass die t - MCAO Methode mit den bestehenden Spezifikationen als verlässlich betrachtet werden kann. Zusammenfassend sind folgende Änderungen nach Induktion eines Schlaganfalls festzuhalten:

- Laser - Dopplerwerte sinken auf **< 15 %** des Ausgangswertes.
- Glukosekonzentrationen sinken drastisch bei Induktion eines Schlaganfalls auf **1 / 20** des Ausgangswertes.
- Laktatkonzentrationen steigen gemittelt über alle Gruppen um den **Faktor 3,2**.
- BHB - Konzentrationen steigen gemittelt in fettreich ernährten Gruppen Triheptanoin und Soja um den **Faktor 10**, bei Standarddiät mit Altromin ist keine Erhöhung messbar.



### 3.1.2 Hepatische Ketogenese nach Schlaganfallinduktion

Im Folgenden soll die hepatische Ketogenese in Abhängigkeit einer 90 min. Ischämie näher charakterisiert werden. In **Abb. 44** wird zur Verdeutlichung das Studiendesign vor Beginn der eigentlichen Ergebnisse dargestellt.

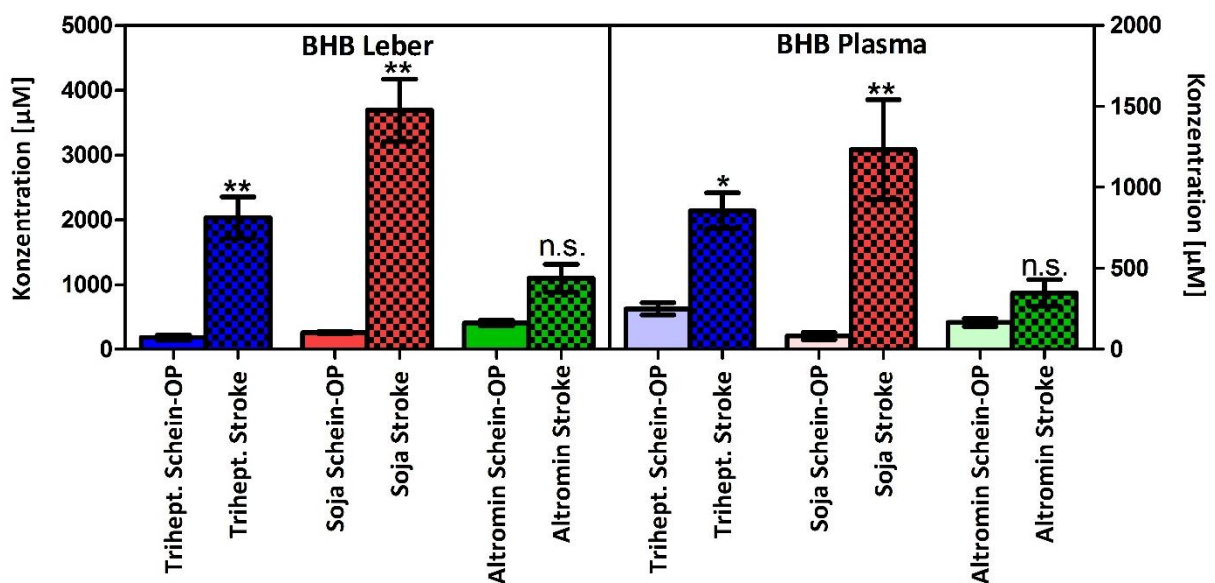


**Abb. 66 Studiendesign für das Projekt Neuroprotektion.**

Die weiblichen CD - 1 Mäuse wurden zwei Wochen vor der Schlaganfallinduktion mit den unterschiedlichen Diäten (s. **Kap. 2.1.1.3 Verwendete Diäten**) *ad libitum* gefüttert. Danach wurden die Mäuse entweder Schein operiert (Faden wird nicht verwendet) oder einer 90 min. zerebralen Ischämie unterzogen (s. **Kap. 2.1.1.5 Transiente Okklusion der mittleren Zerebralarterie (t - MCAO)**)

Die Tiere wurden nach 90 min. Ischämiedauer bzw. 90 min. Schein - OP Dauer unter Isoflurannarkose dekapitiert und die Gewebe Leberlobi, Plasma, linke Hirnhemisphäre gesammelt.

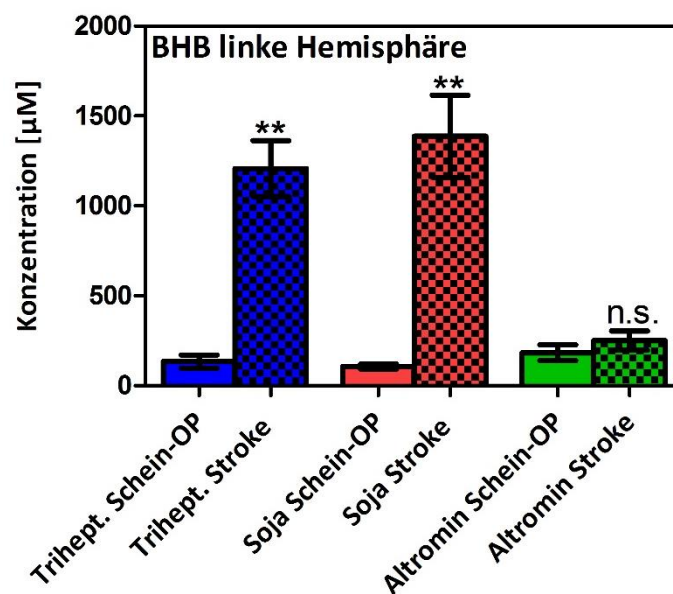
Da Glukose im Gehirn unter physiologischen Bedingungen (kein Hungerstoffwechsel) Primärsubstrat der Energiegewinnung ist, soll in diesem Kapitel eine Kontrastierung des Primärsubstrates (Glukose) mit dem alternativen Energiesubstrat, BHB, auf die Gewebe Leber, Plasma und ischämische linke Hemisphäre dargestellt werden [83], [93].



**Abb. 67** Illustriert werden absolute Konzentrationen von BHB (Mittelwerte ± SEM) links: im Leberhomogenat und rechts: im Plasma. Die Untergruppen ergeben sich in Abhängigkeit von

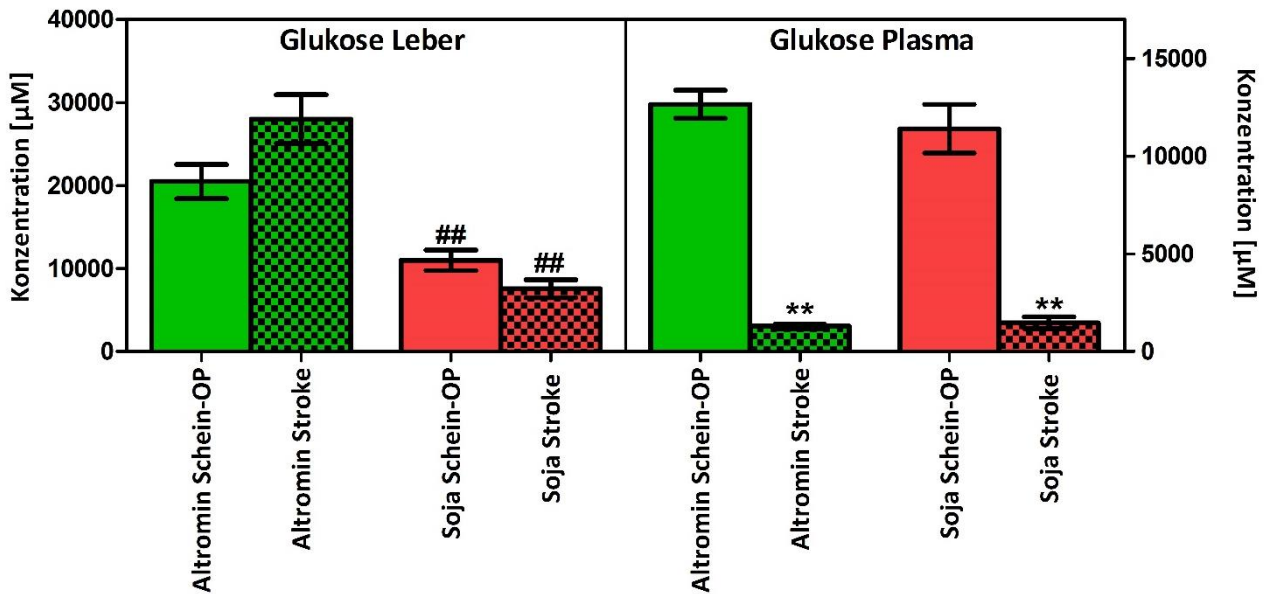
unterschiedlichen Diäten (Triheptanoin; Soja; Altromin). Schein - OP bedeutet, dass die komplette OP durchgeführt wurde, aber der Faden wurde nicht verwendet. Die Dauer der Okklusion der mittleren Zerebralarterie entspricht 90 min. Verwendet wurden weibliche CD - 1 Mäuse (28 – 35 g) (N = 6) Statistik: links: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{5,35} = 29,4$  ; rechts: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{5,35} = 10,7$  ; Signifikanzlevel: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  Triheptanoin / Soja Schein - OP vs. Triheptanoin / Soja Stroke.

In **Abb. 67** ist die Erhöhung der BHB - Konzentrationen in Abhängigkeit der unterschiedlichen Diäten (Triheptanoin, Soja, Altromin) dargestellt. Der Anstieg bei den Tieren, die Triheptanoin als Fettkomponente erhielten, ist im Vergleich zu Soja gefütterten Tieren weniger drastisch (s. **Tab. 22**). Bei Mäusen, die Standard Altromin Diät erhielten, ist kein signifikanter Anstieg der BHB - Spiegel in der Leber bzw. im Plasma messbar. Das sich ergebende Verteilungsmuster in der Leber (Ischämie steigert BHB - Spiegel bei fettreichen Diäten) ist auch im Plasma wiederzufinden.



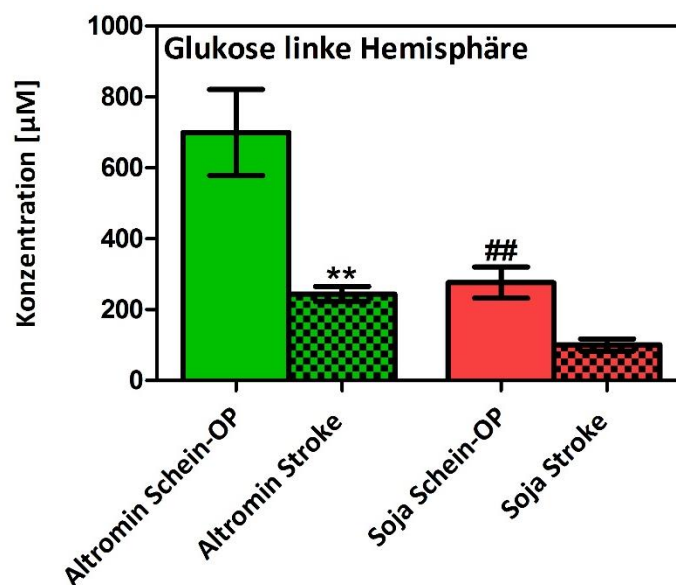
**Abb. 68** Illustriert werden absolute Konzentrationen von BHB (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Hirnhomogenat der linken ischämischen Hemisphäre. Die Untergruppen ergeben sich in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten (Triheptanoin; Soja; Altromin). Schein-OP bedeutet, dass die komplette OP durchgeführt wurde, aber der Faden wurde nicht verwendet. Die Dauer der Okklusion der mittleren Zerebralarterie entspricht 90 min. Verwendet wurden weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35 g) (N = 6) Statistik: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{5,35} = 25,1$  ; Signifikanzlevel: \*\*  $p < 0,01$  Triheptanoin / Soja Schein - OP vs. Triheptanoin / Soja Schein - OP.

Der Trend zur Erhöhung der BHB-Spiegel unter fettreicher Diät ist auch in der linken ischämischen Hemisphäre erkennbar.



**Abb. 69** Illustriert werden absolute Konzentrationen von Glukose (Mittelwerte  $\pm$  SEM) links: im Leberhomogenat und rechts: im Plasma. Die Untergruppen ergeben sich in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten (Altromin; Soja). Schein - OP bedeutet, dass die komplette OP durchgeführt wurde, aber der Faden wurde nicht verwendet. Die Dauer der Okklusion der mittleren Zerebralarterie entspricht 90 min. Verwendet wurden weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35 g) (N = 6) Statistik: links: Ein-Wege-ANOVA mit Tukey-Post-Test,  $F_{23} = 3$ ; rechts: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{70} = 3$ ; Signifikanzlevel: \*\*  $p < 0,01$  Altromin / Soja Schein - OP vs. Altromin / Soja Stroke; ##  $p < 0,01$  Altromin Schein - OP vs. Soja Schein - OP; Altromin Stroke vs. Soja Stroke.

Die Glukosekonzentrationen im Leberhomogenat bzw. im Plasma verhalten sich gegensätzlich zu den jeweiligen BHB-Konzentrationen. Der Gesamtglukosegehalt in der Leber ist zwischen den Soja- und den Altromin-gefütterten Tieren niedriger (s. **Abb. 69**). Eine zerebrale Ischämie bedingt eine gruppenübergreifende Hypoglykämie im Plasma.



**Abb. 70** Illustriert werden absolute Konzentrationen von Glukose (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Hirnhomogenat der linken ischämischen Hemisphäre. Die Untergruppen ergeben sich in

**Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten (Altromin; Soja). Schein - OP bedeutet, dass die komplette OP durchgeführt wurde, aber der Faden wurde nicht verwendet. Die Dauer der Okklusion der mittleren Zerebralarterie entspricht 90 min. Verwendet wurden weibliche CD - 1 Mäuse (28 – 35 g) (N = 6) Statistik: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{25,1} = 3$  ; Signifikanzlevel: \*\*  $p < 0,01$  Altromin Schein - OP vs. Altromin Stroke; ##  $p < 0,01$  Altromin Schein - OP vs. Soja Schein - OP.**

In der vom Schlaganfall betroffenen linken Hemisphäre, ist eine deutliche Senkung des Gesamtglukosegehaltes messbar. Selbst die basalen Glukosewerte bei einer Schein - OP unterscheiden sich signifikant zwischen Altromin und Soja gefütterten Tieren. Zusammenfassend können folgende Veränderungen der Metabolitenspiegel festgehalten werden:

| Gewebe / Metabolit   | Triheptanoin           | Soja                   | Altromin               |
|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                      | Schein - OP vs. Stroke | Schein - OP vs. Stroke | Schein - OP vs. Stroke |
| Leber BHB            | ↑                      | ↑                      | -                      |
| Plasma BHB           | ↑                      | ↑                      | -                      |
| Linke Hemisphäre BHB | ↑                      | ↑                      | -                      |

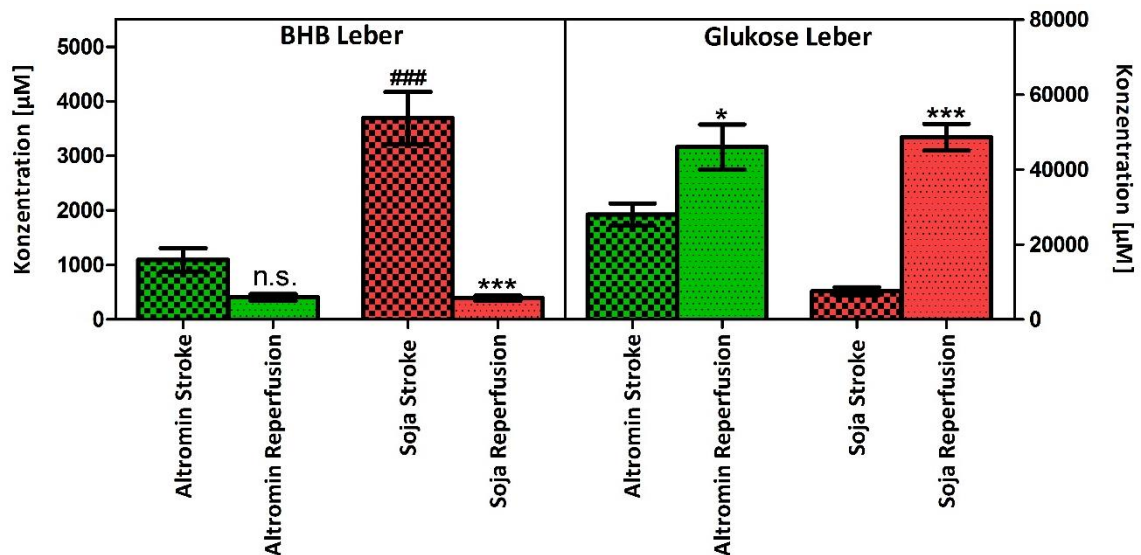
**Tab. 22 Änderung der Konzentrationen von BHB in unterschiedlichen Geweben bzw. Diätgruppen**

| Gewebe / Metabolit       | Soja Schein – OP vs. Altromin Schein – OP | Soja Schein - OP vs. Soja Stroke | Altromin Schein – OP vs. Altromin Stroke |
|--------------------------|---|----------------------------------|--|
|                          | Leber Glukose                             | ↓                                | -  |
| Plasma Glukose           | -   | ↓                                | ↓  |
| Linke Hemisphäre Glukose | ↓   | ↓                                | ↓↓                                       |

**Tab. 23 Änderung der Konzentrationen von Glukose in unterschiedlichen Geweben bzw. Diätgruppen**

### 3.1.3 Metabolitenspiegel von BHB und Glukose bei Reperfusion

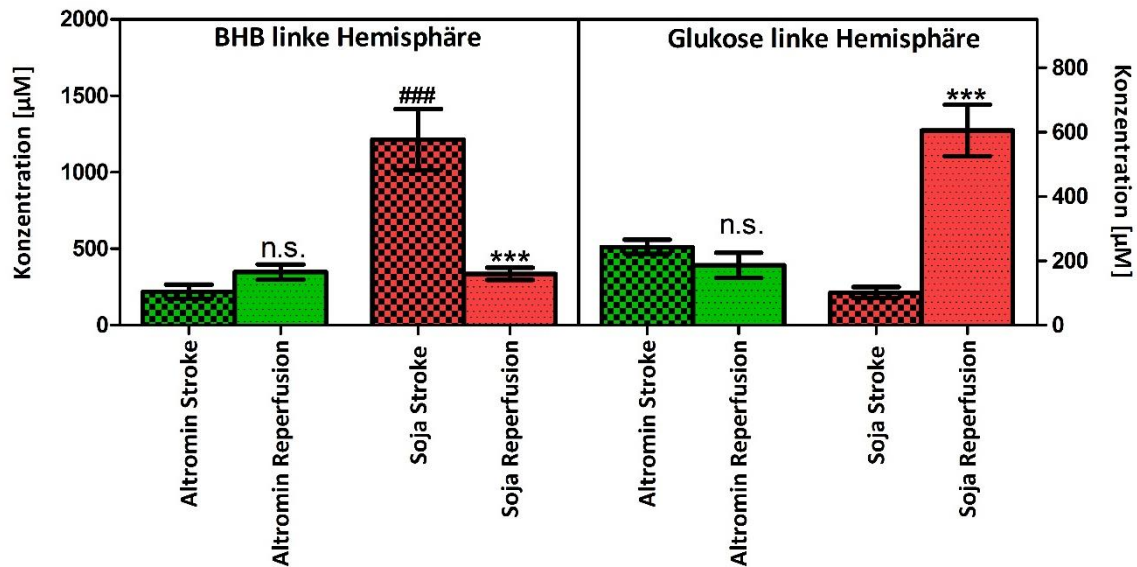
In **Kap. 3.1.2 Hepatische Ketogenese nach Schlaganfallinduktion** wurden die Veränderungen der Glukose bzw. BHB Konzentrationen in Abhängigkeit der Diäten bzw. der Ischämie gegenübergestellt. Da die BHB Spiegel in den fettreichen Diäten steigen bzw. im Falle der Glukose sinken, lohnt sich die Betrachtung, wie sich die angestiegenen Spiegel im Falle der Reperfusion (nach 60 min) verhalten. Aus diesem Grund werden in diesem Kapitel die Änderungen der Metabolitenspiegel bei Reperfusion (60 min.) näher betrachtet.



**Abb. 71** Illustriert werden absolute Konzentrationen von BHB (links) und Glukose (rechts) (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Leberhomogenat. Die Untergruppen ergeben sich in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten (Altromin; Soja). Die Dauer der Okklusion der mittleren Zerebralarterie entspricht 90 min. Die Reperfusionsdauer ist die Zeit, nachdem der Faden aus der mittleren Zerebralarterie entfernt wurde und beträgt 60 min. Verwendet wurden weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35 g) (N = 6) Statistik links: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{34,5} = 3$  ; Signifikanzlevel: \*\*\*  $p < 0,001$  Soja Stroke vs. Soja Reperfusion; ###  $p < 0,001$  Altromin Stroke vs. Soja Stroke ; Statistik rechts: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{24,8} = 3$  ; Signifikanzlevel: \*  $p < 0,05$  Altromin Stroke vs. Altromin Reperfusion; \*\*\*  $p < 0,001$  Soja Stroke vs. Soja Reperfusion.

Nach 60 min. Reperfusion sinken in beiden Gruppen die absoluten Spiegel an BHB in der Leber. Die Spiegel der Gesamtglukose steigen an. Bei Induktion eines Schlaganfalls waren die Gesamtglukose Spiegel nach 90 min. allerdings niedriger in der fettreichen Soja - Diät als in der Altromin Gruppe.

Die Plasmawerte für die Reperfusionstudie sind aus technischen Gründen nicht auswertbar gewesen und werden an dieser Stelle nicht gezeigt.



**Abb. 72** Illustriert werden absolute Konzentrationen von BHB (links) und Glukose (rechts) (Mittelwerte  $\pm$  SEM) in der ischämischen linken Hirnhemisphäre. Die Untergruppen ergeben sich in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten (Altromin; Soja). Die Dauer der Okklusion der mittleren Zerebralarterie entspricht 90 min. Die Reperfusionsdauer ist die Zeit, nachdem der Faden aus der mittleren Zerebralarterie entfernt wurde und beträgt 60min. Verwendet wurden weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35g) ; (N = 6) Statistik links: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{18,2} = 3$  ; Signifikanzlevel: \*\*\*  $p < 0,001$  Soja Stroke vs. Soja Reperfusion; ###  $p < 0,001$  Altromin Stroke vs. Soja Stroke ; Statistik rechts: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{22,8} = 3$  ; Signifikanzlevel: \*\*\*  $p < 0,001$  Soja Stroke vs. Soja Reperfusion.

In der linken Hemisphäre verändern sich bei Altromin gefütterten Tieren weder die BHB -, noch die Glukosespiegel. Bei den fettreich gefütterten Tiere hingegen erkennt man ein gegensätzliches Verhalten in Bezug auf die BHB bzw. Glukose Spiegel, d.h. bei Reperfusion sinken die BHB Spiegel und die Glukose Spiegel steigen signifikant an. Während der 60 min. Reperfusionsdauer verbraucht das ischämische Gehirn primär BHB anstatt Glukose.

| Gewebe / Metabolit   | Soja Stroke vs. Soja Reperfusion | Altromin Stroke vs. Altromin Reperfusion |
|----------------------|----------------------------------|--|
| Leber BHB            | ↓↓                               | n.s.                                     |
| Linke Hemisphäre BHB | ↓↓                               | n.s.                                     |

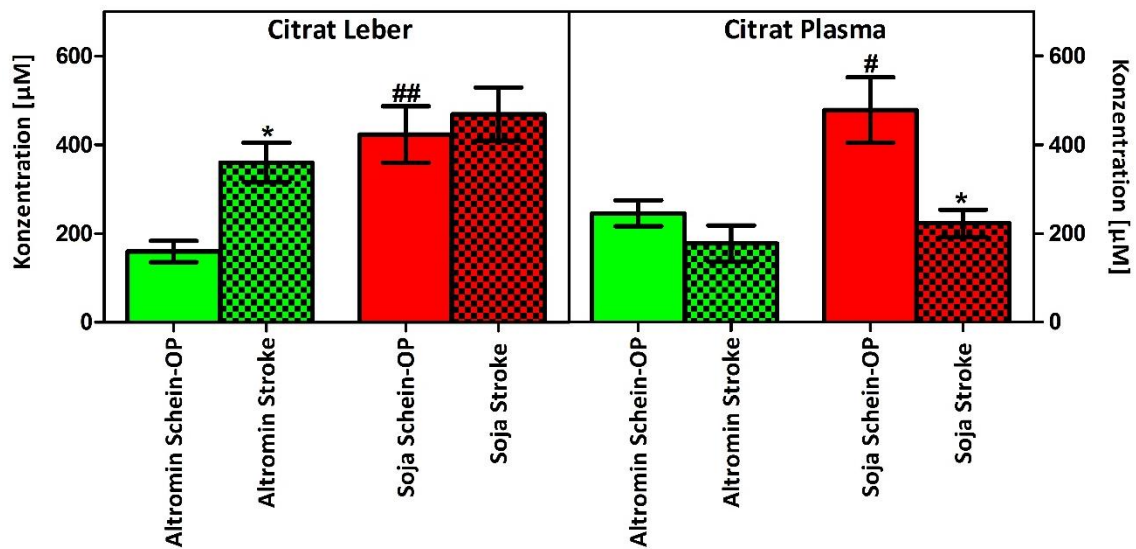
**Tab. 24** Änderung der Konzentrationen von BHB in unterschiedlichen Geweben bzw. Diätgruppen

| Gewebe / Metabolit       | Soja Stroke vs. Soja Reperfusion | Altromin Stroke vs. Altromin Reperfusion |
|--------------------------|----------------------------------|--|
| Leber Glukose            | ↑↑                               | ↑  |
| Linke Hemisphäre Glukose | ↑↑                               | n.s.                                     |

**Tab. 25** Änderung der Konzentrationen von Glukose in unterschiedlichen Geweben bzw. Diätgruppen

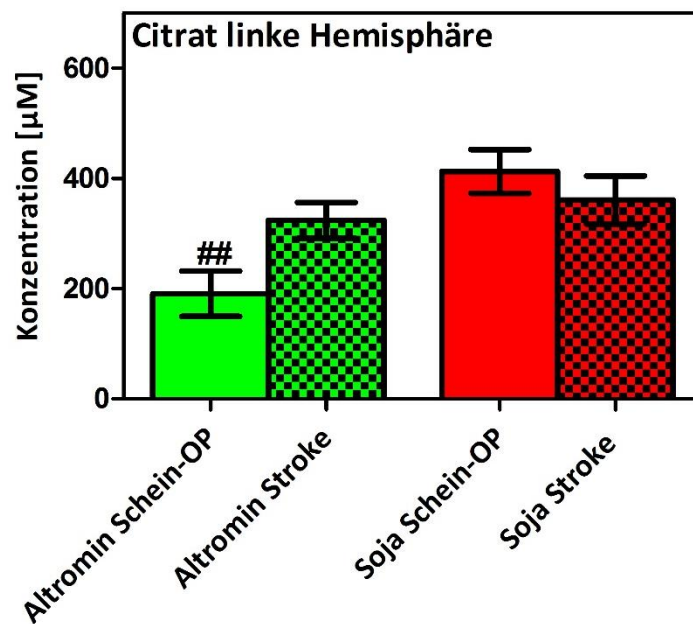


### 3.1.4 Einfluss der hepatischen Ketogenese auf die Intermediate des Zitronensäurezyklus



**Abb. 73** Illustriert werden absolute Konzentrationen von Citrat (Mittelwerte  $\pm$  SEM) links: im Leberhomogenat und rechts: im Plasma. Die Untergruppen ergeben sich in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten (Altromin; Soja). Schein - OP bedeutet, dass die komplette OP durchgeführt wurde, aber der Faden wurde nicht verwendet. Die Dauer der Okklusion der mittleren Zerebralarterie entspricht 90 min. Verwendet wurden weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35 g) (N = 6) Statistik links: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{7,37} = 3$  ; Signifikanzlevel: \*  $p < 0,05$  Altromin Schein - OP vs. Soja Schein - OP; ##  $p < 0,01$  Altromin Schein - OP vs. Soja Schein - OP; Statistik rechts: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{8,16} = 3$  ; Signifikanzlevel: \*  $p < 0,05$  Soja Schein - OP vs. Soja Stroke; #  $p < 0,05$  Altromin Schein - OP vs. Soja Schein - OP.

Die absoluten Konzentrationen an Citrat im Plasma, unterscheiden sich signifikant in den beiden Diätgruppen. Bei Induktion eines Schlaganfalls steigen die Werte im Leberhomogenat bei Altromin-gefütterten Tieren auf 400 µM an. Die Citratspiegel im Plasma fallen in der Soja - Gruppe auf 200 µM ab.



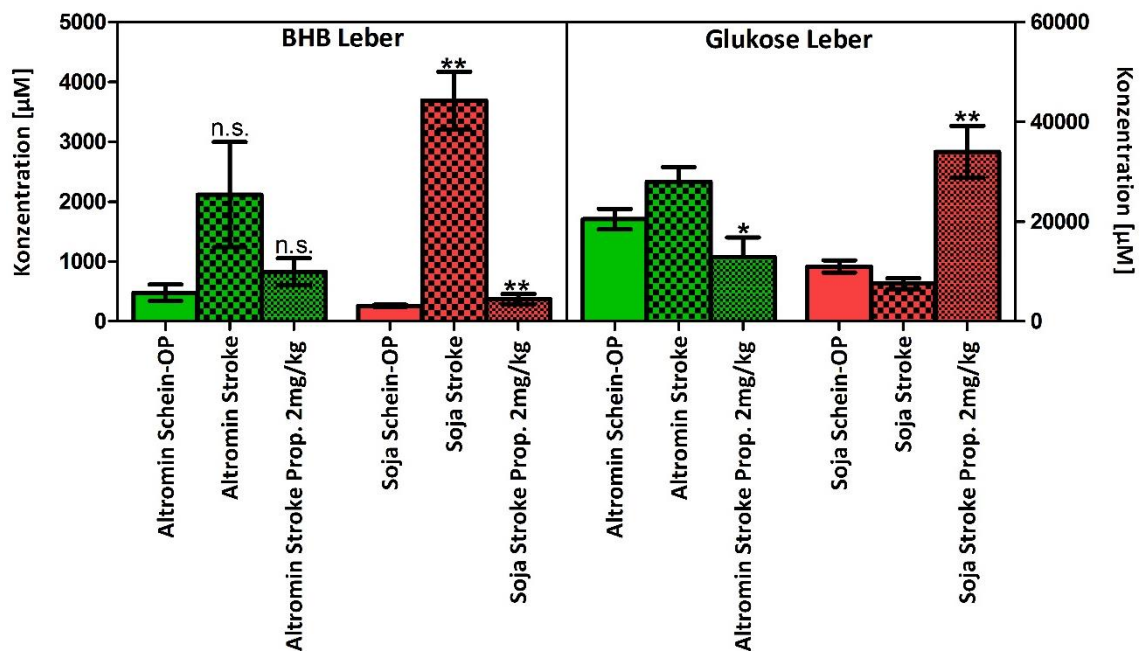
**Abb. 74** Illustriert werden absolute Konzentrationen von Citrat (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Hirnhomogenat der linken ischämischen Hemisphäre. Die Untergruppen ergeben sich in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten (Altromin; Soja). Schein - OP bedeutet, dass die komplette OP durchgeführt wurde, aber der Faden wurde nicht verwendet. Die Dauer der Okklusion der mittleren Zerebralarterie entspricht 90 min. Verwendet wurden weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35 g) (N = 6) Statistik: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{5,8} = 3$  ; Signifikanzlevel: ##  $p < 0,01$  Altromin Schein - OP vs. Soja Schein - OP

Die Konzentrationen an Citrat unterscheiden sich zwischen den beiden Schein - OP Gruppen (Soja - Diät Gruppe höher gegenüber Altromin - Diät Gruppe). Die Konzentrationen an Citrat verändern sich nach Induktion des Schlaganfalls in der Soja - Diät Gruppe nicht. Die mit Altromin gefütterten Tiere hingegen zeigen einen Trend zur Erhöhung.

Weitere Intermediate des Zitronensäurezyklus, die im Leber - und Hirnhomogenat gemessen wurden, sind Succinat, Fumarat und Malat. Bei diesen C4 Dikarbonsäuren wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gruppen bzw. Interventionen Schlaganfall und Propranololgabe gemessen (Daten nicht gezeigt).

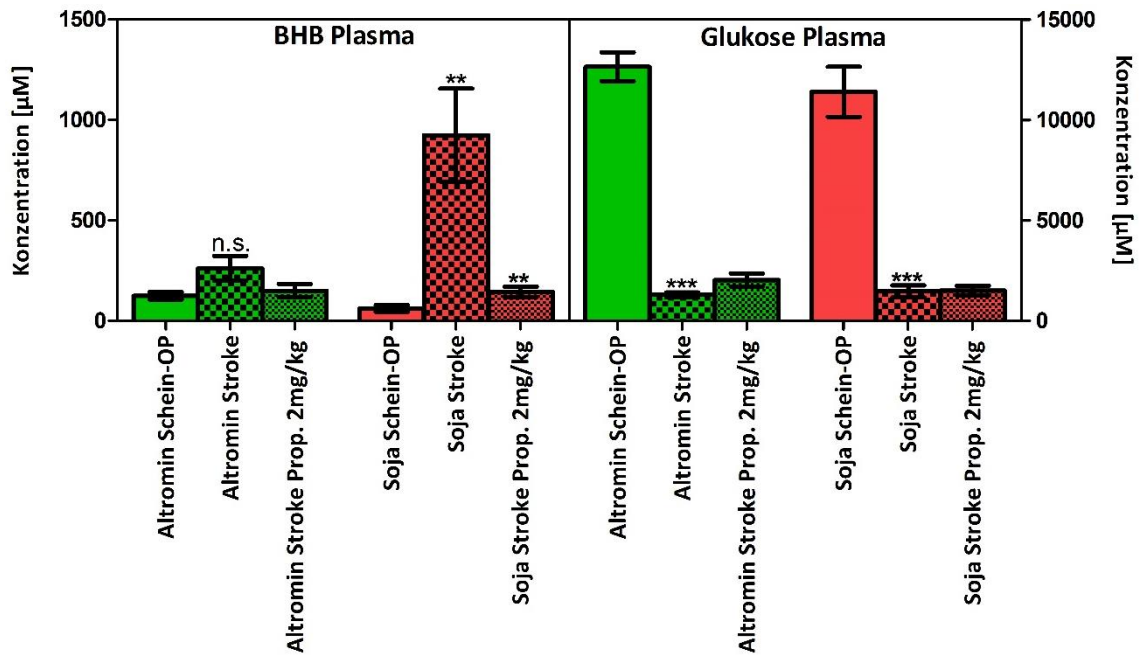


### 3.1.5 Effekte von Propranolol auf die hepatische Ketogenese

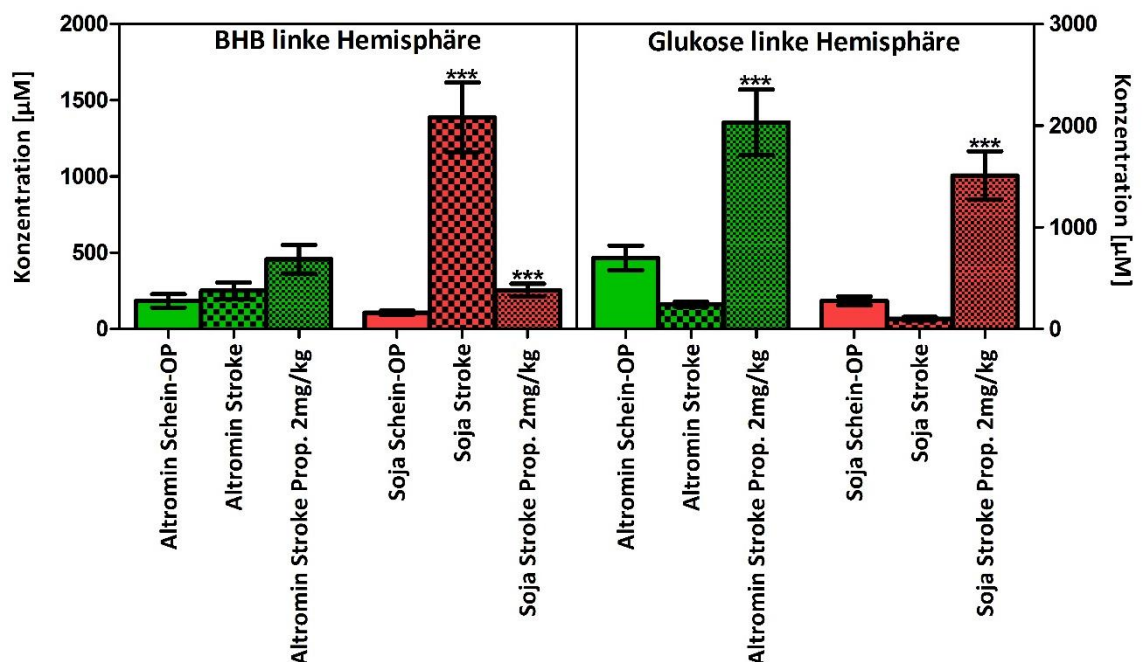


**Abb. 75** Die Auswirkungen einer unselektiven  $\beta$  - Blockade auf die BHB und Glukosekonzentrationen (Mittelwerte  $\pm$  SEM) in der Leber. Die Untergruppen ergeben sich in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten (Altromin; Soja). Schein - OP bedeutet, dass die komplette OP durchgeführt wurde, aber der Faden wurde nicht verwendet.  $\pm$  Propranolol (2 mg/kg KG) wurde i.p., bei Verschluss der mittleren Zerebralarterie injiziert. Die Dauer der Okklusion der mittleren Zerebralarterie entspricht 90 min. Verwendet wurden weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35 g) (N = 6) Statistik links: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{9,09} = 5$  ; \*\*  $p < 0,01$  Soja Schein - OP vs. Soja Stroke und Soja Stroke vs. Soja Stroke Propranolol 2 mg/kg KG; rechts: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{10,1} = 5$  ; Signifikanzlevel: \* $p < 0,05$  Glukose Altromin Stroke vs. Altromin Stroke Propranolol; \*\*  $p < 0,01$  Glukose Soja Stroke vs. Soja Stroke Propranolol 2 mg/kg KG.

Die hepatische Ketogenese (BHB) nach Ischämie wird durch unselektive  $\beta$  - Blockade bei fettreicher Diät (Soja) auf Basalniveau gesenkt. Bei Standarddiät kommt es zu einer nicht signifikanten Senkung der BHB Spiegel. Die Glukosewerte verhalten sich entgegengesetzt (s. **Tab. 26**, **Tab. 27**) in Altromin und Soja - gefütterten Tieren.



**Abb. 76** Die Auswirkungen einer unselektiven  $\beta$  - Blockade auf die BHB und Glukosekonzentrationen (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Plasma. Die Untergruppen ergeben sich in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten (Altromin; Soja). Schein - OP bedeutet, dass die komplette OP durchgeführt wurde, aber der Faden wurde nicht verwendet.  $\pm$  Propranolol (2 mg/kg KG) wurde i.p., bei Verschluss der mittleren Zerebralarterie injiziert. Die Dauer der Okklusion der mittleren Zerebralarterie entspricht 90 min. Verwendet wurden weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35 g) (N = 6). Statistik links: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{11,3} = 5$  ; Signifikanzlevel: \*\*  $p < 0,01$  Soja Schein - OP vs. SojaStroke und Soja Stroke vs. Soja Stroke Propranolol 2 mg/kg KG ; rechts: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{80,9} = 5$  ; Signifikanzlevel: \*\*\*  $p < 0,001$  Altromin / Soja Schein - OP vs. Altromin / Soja Stroke.



**Abb. 77** Die Auswirkungen einer unselektiven  $\beta$  - Blockade auf die BHB und Glukosekonzentrationen (Mittelwerte  $\pm$  SEM) in der ischämischen linken Hemisphäre. Die Untergruppen ergeben sich in

**Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten (Altromin; Soja). Schein - OP bedeutet, dass die komplette OP durchgeführt wurde, aber der Faden wurde nicht verwendet. ± Propranolol (2 mg/kg KG) wurde i.p., bei Verschluss der mittleren Zerebralarterie injiziert. Die Dauer der Okklusion der mittleren Zerebralarterie entspricht 90 min. Verwendet wurden weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35 g) (N = 6). Statistik links: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{20,0} = 5$  ; Signifikanzlevel: \*\*\*  $p < 0,001$  Soja Schein - OP vs. Soja Stroke und Soja Stroke vs. Soja Stroke Propranolol 2 mg/kg KG ; ; rechts: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{18,4} = 5$  ; Signifikanzlevel: \*\*\*  $p < 0,001$  Altromin / Soja Stroke vs. Altromin / Soja Stroke Propranolol 2 mg/kg KG.**

| Gewebe / Metabolit   | Soja Stroke                    | Altromin Stroke                    |
|----------------------|--------------------------------|------------------------------------|
|                      | vs.<br>Soja Stroke Propranolol | vs.<br>Altromin Stroke Propranolol |
| Leber BHB            | ↓↓                             | (↓) n.s.                           |
| Plasma BHB           | ↓↓                             | (↓) n.s.                           |
| Linke Hemisphäre BHB | ↓↓                             | (↑) n.s.                           |

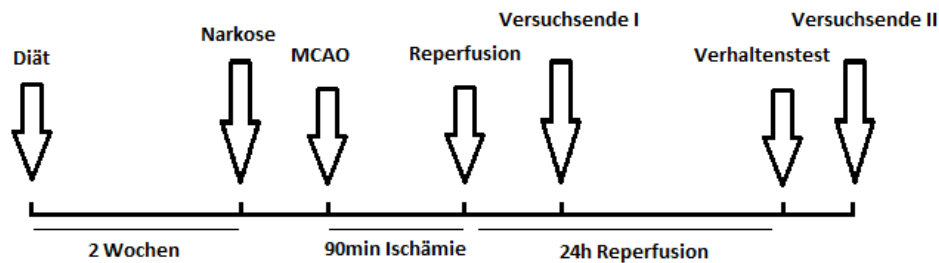
**Tab. 26 BHB Konzentrationsänderungen nach 90 min. Ischämie in unterschiedlichen Geweben bzw. Diätgruppen im Vergleich zu einer Intervention mit ± Propranolol - HCl.**

| Gewebe / Metabolit       | Soja Stroke                    | Altromin Stroke                    |
|--------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
|                          | vs.<br>Soja Stroke Propranolol | vs.<br>Altromin Stroke Propranolol |
| Leber Glukose            | ↑↑                             | ↓                                  |
| Plasma Glukose           | n.s.                           | n.s.                               |
| Linke Hemisphäre Glukose | ↑↑                             | ↑↑                                 |

**Tab. 27 Glukose Konzentrationsänderungen nach 90 min. Ischämie in unterschiedlichen Geweben bzw. Diätgruppen im Vergleich zu einer Intervention mit ± Propranolol – HCl.**

## 3.2. Akutintervention mit dem Ketonkörper BHB bei Reperfusion

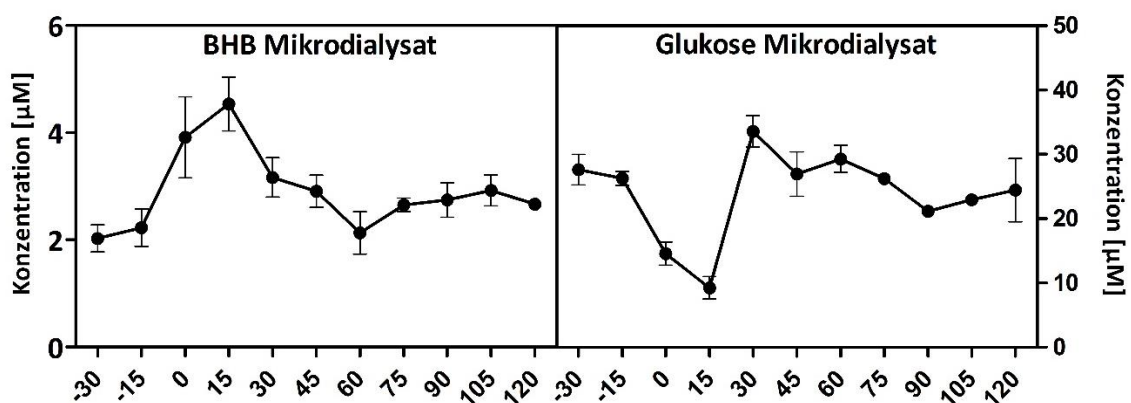
Im Folgenden werden die Ergebnisse für das zweite Projekt „BHB in der Akutintervention bei Reperfusion“ gezeigt. Zur Übersichtlichkeit soll an dieser Stelle vor dem eigentlichen Ergebnisteil eine Übersicht über das experimentelle Vorgehen bei dieser Studie gezeigt werden (s. **Abb. 78**).



**Abb. 78** Studiendesign: BHB in der Akutintervention bei 90 min. t - MCAO

### 3.2.1 BHB und Glukose Spiegel im Mikrodialysat nach intraperitonealer Injektion

Damit BHB die beschriebenen Effekte aus Projekt 1 „Neuroprotektion“ überhaupt erbringen kann, muss es zuerst vom Gehirn aufgenommen werden um dort als Substrat verstoffwechselt zu werden. Um den Nachweis der Aufnahme erbringen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit 24 h vor intraperitonealer Injektion (100 mg/kg KG Natrium BHB) eine Mikrodialysesonde ins linke Striatum implantiert. Nachdem in 15 min. Abständen das Mikrodialysat gesammelt wurde, wurde nach 30 min. (Basalfractionen) ein Bolus von 200  $\mu$ l 100 mg/kg KG BHB der jeweiligen Maus verabreicht. Die Sonde wurde weitere 120 min. mit aCSF (2  $\mu$ l/min Durchflußrate) durchspült. Vermessen wurden mithilfe der GC - MS-Analytik Laktat, BHB und Glukose (s. **Abb. 64**, **Abb. 65**, **Abb. 79**).



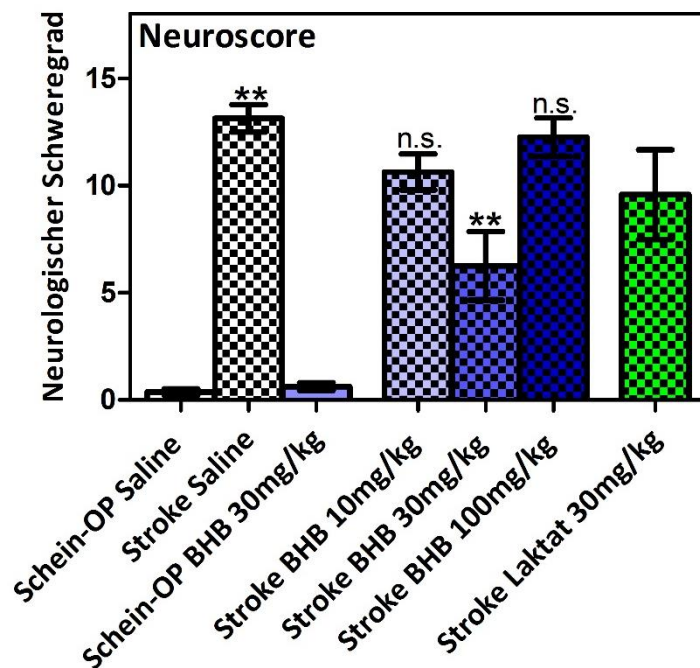
**Abb. 79** links: BHB Spiegel (Mittelwerte  $\pm$  SEM) und rechts: Glukose Spiegel (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Mikrodialysat nach einer i.p.-Injektion von 100 mg/kg KG BHB; Weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35 g) (N = 4); 24 h vor Injektion Implantation der Mikrodialysesonde ins linke Striatum. Daten sind absolute Konzentrationen und ohne Wiederfindungsrate der jeweiligen Sonde berechnet.

Die gemittelten BHB - Konzentrationen in den Basalfractionen liegen bei 2 - 2,5  $\mu$ M BHB und bei Glukose zwischen 20 - 30  $\mu$ M. Nach Injektion von 200  $\mu$ l einer 100 mg/kg KG BHB Lösung steigen die

BHB - Werte zwischen 4 - 5  $\mu\text{M}$  an. Bei den Glukosewerten erkennt man eine Senkung im Minimum auf unter 10  $\mu\text{M}$ , nach Injektion.

### 3.2.2 BHB Effekte auf das Verhalten der Mäuse nach Schlaganfall

Um die pharmakodynamischen Endpunkte einer BHB Injektion bei Reperfusion zu ermitteln, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Fülle an Verhaltenstests (s. **Tab. 13**) durchgeführt. Die bestmögliche Punktzahl ist 0, schlecht möglichst können 14 Punkte erreicht werden.

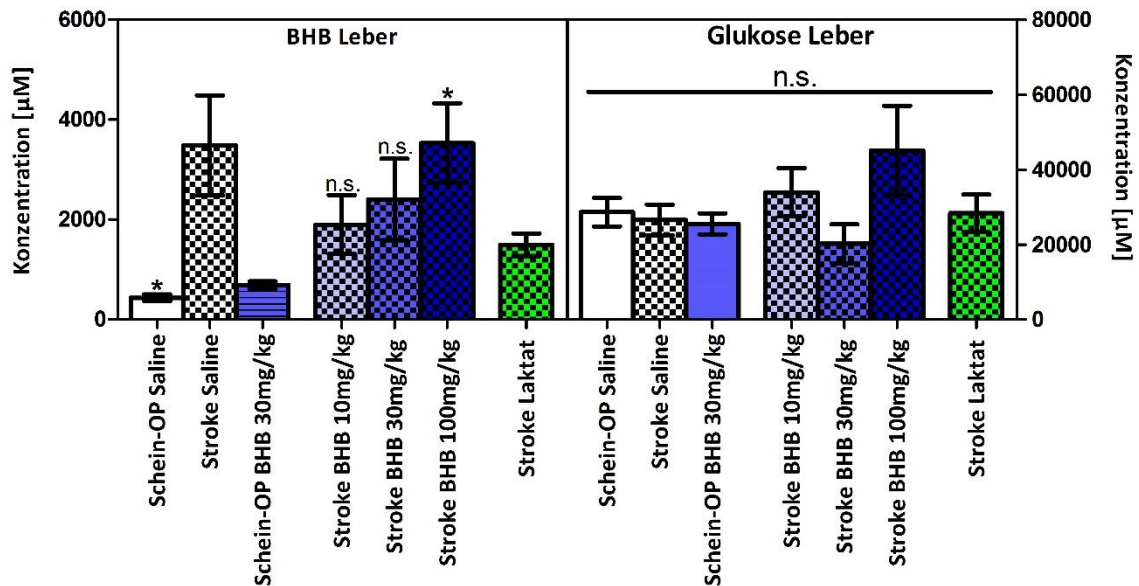


**Abb. 80** Neurologischer Schweregrad von 0 - 14 Punkten, 22 h nach Reperfusion erhoben. (Daten  $\pm$  SEM); Weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35 g) (N = 9); Statistik: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{28,7}$  - Wert: 6; Signifikanzlevel: \*\*  $p < 0,01$  Schein - OP Saline vs. Stroke Saline und Stroke Saline vs. Stroke BHB 30 mg/kg KG.

Nach Induktion eines Schlaganfalls ohne Intervention erhält das betroffene Tier einen neurologischen Schweregrad von gemittelt 13,1. Gesunde Tiere generierten einen Wert von 0,4. Durch eine Injektion mit BHB 30mg/kg KG, gleich nach Reperfusion zeigt sich eine Verbesserung des neurologischen Wertes auf 6,3 ( $p < 0,01$ ). 100 mg/kg KG BHB (NSS: 12,25), sowie Injektion von 30 mg/kg KG Laktat (NSS: 9,6) zeigen im Vergleich zur *Stroke Saline Gruppe* keine signifikante Verbesserung.

### 3.2.3 Metabolitenspiegel nach 24 h Reperfusion

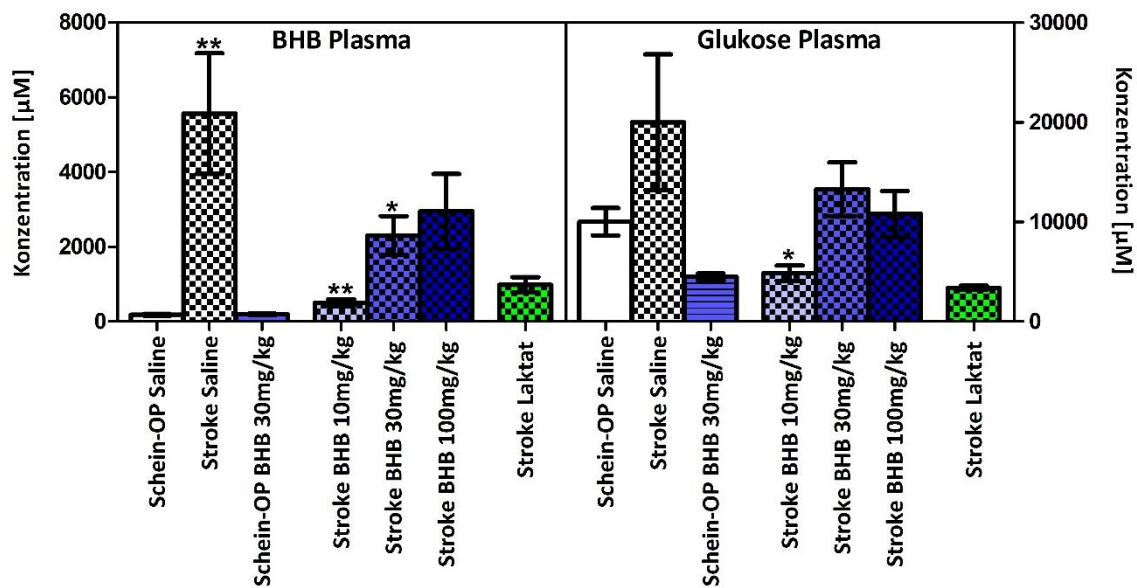
Nachdem die Verhaltenstests 22 h nach Reperfusion durchgeführt wurden, sind die Tiere in ihren Heimkäfig verbracht worden und nach 2 h wurden sie unter Isoflurannarkose dekapitiert. Leberlobi, Plasma, sowie die beiden Hemisphären (ohne Cerebellum) wurden asserviert und Vermessen. Im Folgenden sollen die Metabolite BHB und Glukose, wie auch im Ergebnisteil der Neuroprotektion, einander gegenübergestellt betrachtet werden.



**Abb. 81 links: BHB - Spiegel (Mittelwerte  $\pm$  SEM) und rechts: Glukose - Spiegel (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Leberhomogenat, gemessen nach 24 h Reperfusion. BHB / Laktat wurde bei Reperfusion mit 200  $\mu$ l i.p. verabreicht. Weibliche CD - 1 Mäuse (28 – 35 g) (N = 9); Statistik links: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey – Post - Test, F-Wert<sub>4,34</sub> : 6; Signifikanzlevel: \*  $p < 0,05$  Stroke Saline vs. Schein - OP Saline und Schein - OP Saline vs. Stroke BHB 100 mg/kg KG. Statistik rechts: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test, F-Wert<sub>1,66</sub> : 6.**

Nach 24 h Reperfusion kommt es zu einer ausgeprägten hepatischen Ketose (Stroke Saline:  $\varnothing$  3,48 mM). Die Gabe von BHB bei Reperfusion bedingt eine Senkung der Spiegel in der Leber. Die gesamte Glukosegruppe ergibt keine signifikanten Unterschiede, allerdings zeigt BHB in der 30 mg/kg KG Dosierung eine Tendenz zur Senkung der Gesamtglukose in der Leber.





**Abb. 82 links: BHB - Spiegel (Mittelwert  $\pm$  SEM) und rechts: Glukose - Spiegel (Mittelwert  $\pm$  SEM) gemessen im Plasmakompartiment, nach 24 h Reperfusion. BHB / Laktat wurde bei Reperfusion mit 200  $\mu$ l i.p. verabreicht. Weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35 g) (N = 8); Statistik links: Ein-Wege-ANOVA mit Tukey - Post - Test, F - Wert<sub>7,77</sub> = 6; Signifikanzlevel: \*\* p < 0,01 Schein - OP Saline vs. Stroke Saline und Stroke Saline vs. Stroke BHB 10 mg/kg KG; \* p < 0,05 Stroke Saline vs. Stroke BHB 30 mg/kg KG; Statistik rechts: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test, F<sub>3,89</sub> - Wert = 6; Signifikanzlevel: \* p < 0,05 Stroke Saline vs. Stroke BHB 10 mg/kg KG.**

Die hepatische Ketose nach 24 h Ischämie spiegelt sich auch in den Plasmaproben wieder (Stroke Saline:  $\varnothing$  5,5 mM). Eine Intervention mit BHB / Laktat supprimiert die auftretende Ketose auch im Plasma. Die Gesamtglukose in der Leber ist nach 24 h Ischämie erhöht und wird mit einer Intervention mit BHB / Laktat auf Basallevelniveau angepasst.

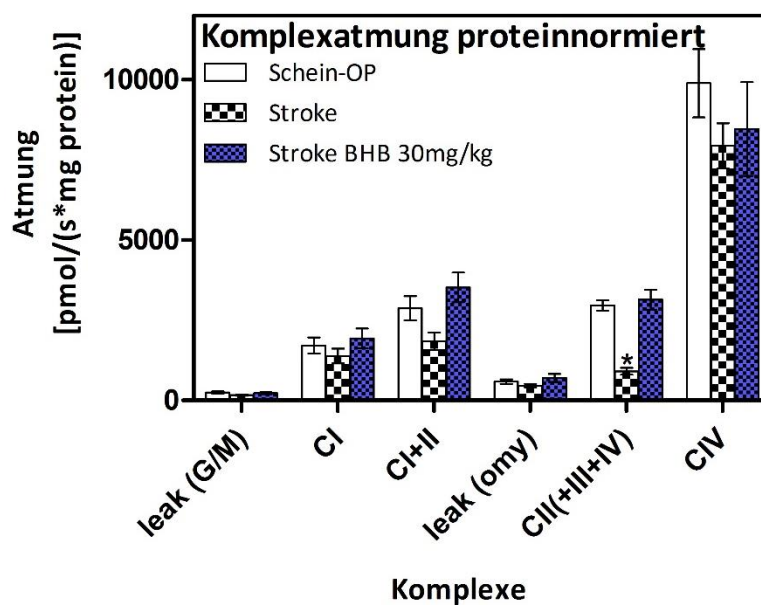
In der betroffenen linken Hemisphäre (Daten nicht illustriert) steigen die BHB - Spiegel von  $111,7 \pm 77,3 \mu\text{M}$  Schein - OP Saline auf  $583,4 \pm 219,0 \mu\text{M}$  Stroke Saline an. Bei Intervention mit BHB 30 mg/kg KG verbleiben die BHB - Spiegel leicht über dem Ausgangsniveau der Stroke Salinegruppe mit  $658,5 \pm 180,0 \mu\text{M}$ .

Die Glukosewerte in der betroffenen linken Hemisphäre (Daten nicht illustriert) verhalten sich in ähnlicher Weise wie die BHB - Spiegel. Initial haben die jeweiligen Tiere ein Basallevel an Glukose von  $233,9 \pm 60,4 \mu\text{M}$ , die nach 24 h nach Reperfusion auf  $692,5 \pm 484,8 \mu\text{M}$  ansteigen. Eine Intervention mit BHB 30 mg/kg KG, injiziert bei Reperfusion, bedingt mit  $770,5 \pm 696,0 \mu\text{M}$  keine signifikante Erhöhung oder Erniedrigung der Gesamtglukosewerte in der linken Hemisphäre.

### 3.2.4 Effekte von BHB auf Mitochondrien

Um die Effekte einer Akutintervention mit BHB mechanistisch besser verstehen zu können, wurde eine Folgestudie mit Hauptaugenmerk auf Mitochondrien und den Energiestoffwechsel der Zelle, durchgeführt. Hierzu wurde die Dosierung an BHB gewählt (30 mg/kg KG), die in den Verhaltenstests am besten abgeschnitten hat. Die Tiere wurden wie in **Abb. 78** gezeigt, nach 24 h dekapitiert und die beiden Hirnhemisphären wurden direkt der Probenaufbereitung unterzogen (s. **Kap. 3.2.4.1 Citratsynthese bei Ischämie**)

In **Abb. 83** soll zu Beginn des Kapitels eine Übersicht über die Effekte einer BHB Lösung mit einer Dosierung von 30 mg/kg KG gegeben werden. Im weiteren Verlauf sollen die beteiligten Enzyme bzw. Atmungskettenkomplexe, die an der Verstoffwechslung von BHB beteiligt sind, gezeigt werden.

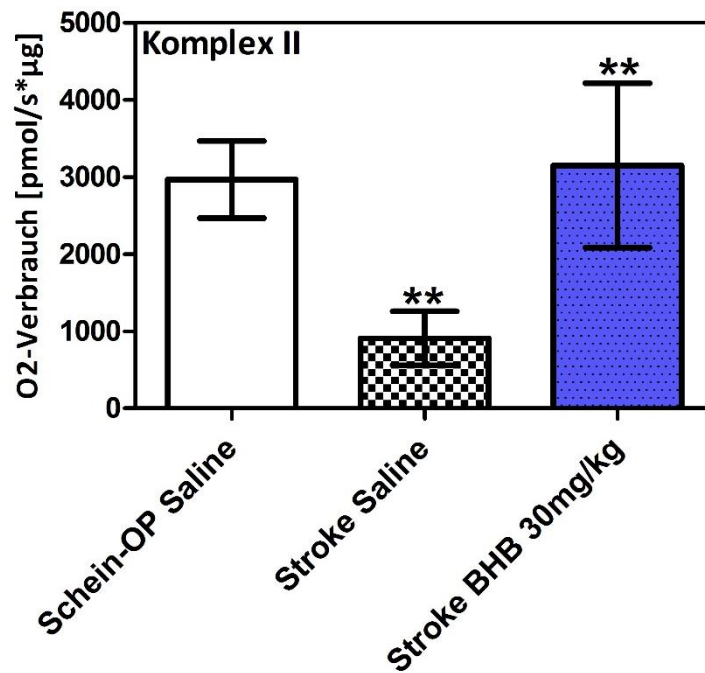


**Abb. 83** Atmungskettenkomplexe 24 h nach Reperfusion mit einer Intervention von 30 mg/kg KG BHB Lösung ( Mittelwerte  $\pm$  SEM); Weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35 g) (N = 10); Statistik: Zwei - Wege - ANOVA mit Bonferroni Post - Test. Signifikanzlevel: \* $p < 0,05$  CII (+ III + IV) Stroke vs. Stroke BHB 30 mg/kg KG.

Ein ischämischer Schlaganfall bedingt eine verminderte Aktivität der Succinatdehydrogenase, auch als Komplex - II der Atmungskette bekannt. Durch eine Intervention mit BHB 30 mg/kg KG wird ein Absinken der Komplexatmung in Bezug auf die Succinatdehydrogenase verhindert. Ebenfalls zu erkennen, ist die Verbesserung des Atmungskettenkomplexes C – I + II, der bei einem ischämischen Schlaganfall ebenfalls Aktivitätseinbußen zu verzeichnen hat.



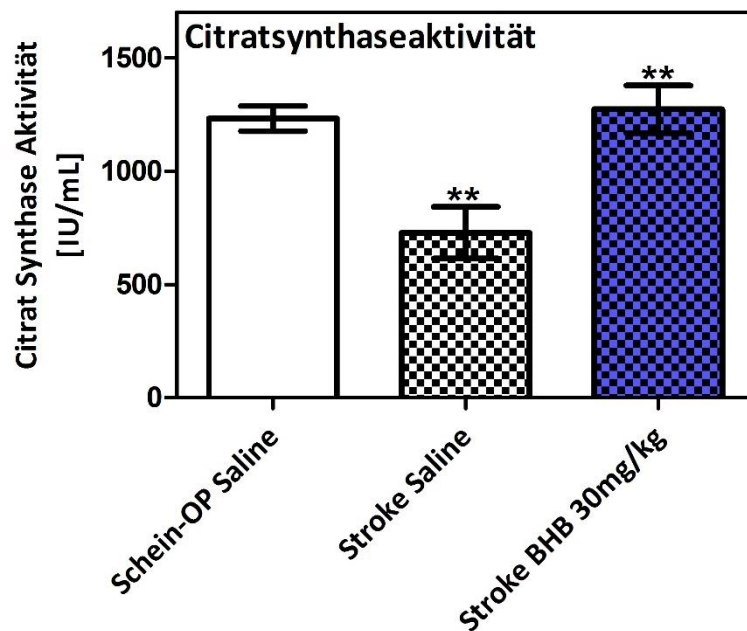
Die Aktivität der *Succinatdehydrogenase* soll in der folgenden Abbildung nochmals detaillierter gezeigt werden.



**Abb. 84** Verhalten der *Succinatdehydrogenase* (Komplex - II) nach 24 h Reperfusion mit und ohne BHB 30 mg/kg KG Bolusgabe (Mittelwerte  $\pm$  SEM); Weibliche CD - 1 Mäuse (28 – 35 g) (N = 10); Statistik: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{10,32}$  - Wert = 2 ; Signifikanzlevel: **\*\*p < 0,01** Schein - OP vs. Stroke Saline; Stroke Saline vs. Stroke BHB 30 mg/kg KG.

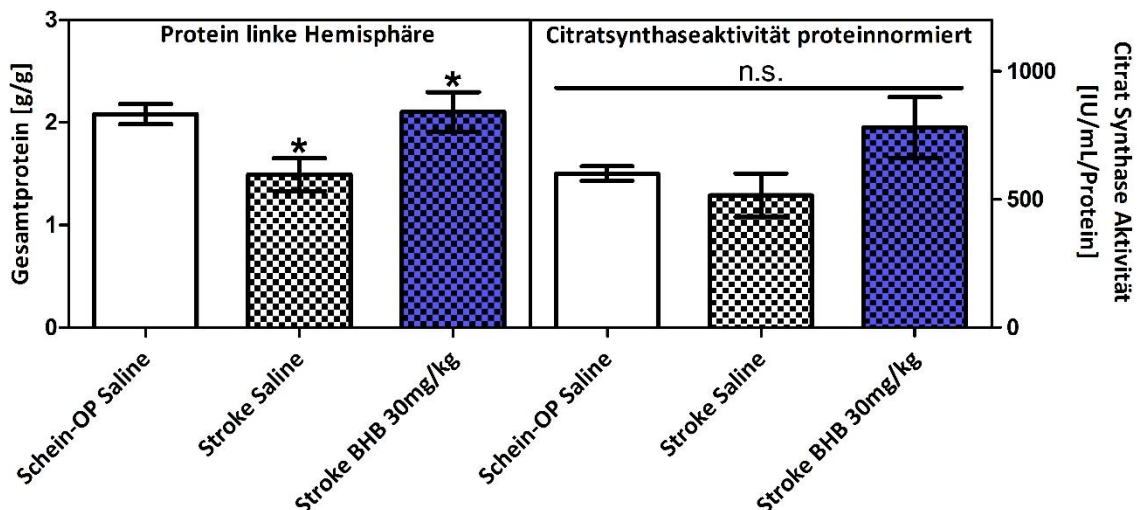
Eine 90 min. Ischämie bedingt 24 h nach Reperfusion eine Aktivitätsminderung der *Succinatdehydrogenase*aktivität (Komplex - II). Durch eine Bolusgabe von 200 µl einer 30 mg/kg KG BHB Lösung bei Reperfusion sinkt die Aktivität der Citratsynthase nicht ab.

### 3.2.4.1 Citratsynthese bei Ischämie



**Abb. 85** Ex situ Citratsyntheseaktivität (Mittelwert  $\pm$  SEM) ohne Proteinnormierung nach 90 min. Ischämie mit anschließender 24 h Reperfusionsdauer, mit und ohne Gabe von BHB. Weibliche CD - 1 Mäuse (28 – 35 g) (N = 10); Statistik: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test,  $F_{3,2}$  - Wert: 2; Signifikanzlevel:  $**p < 0,01$  Schein - OP vs. Stroke Saline und Stroke Saline vs. Stroke BHB 30 mg/kg KG.

Die Citratsyntheseaktivität sinkt unter einer 90 min. Ischämiedauer signifikant. Wenn BHB bei Reperfusion injiziert wird, kann ein Absinken der Citratsynthaseaktivität nach 24 h verhindert werden.

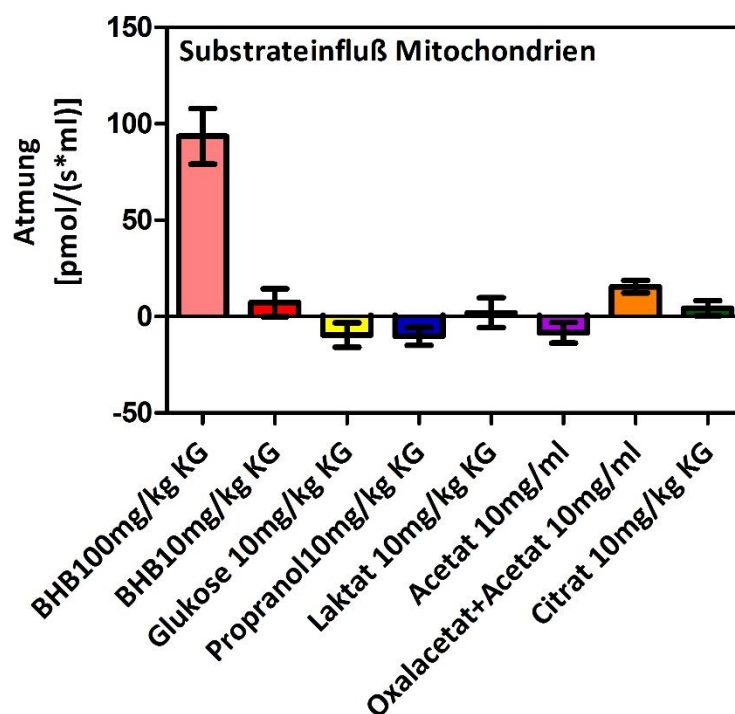


**Abb. 86** Links: Gesamtprotein (Mittelwerte  $\pm$  SEM) und rechts: Ex situ Citratsyntheseaktivität (Mittelwerte  $\pm$  SEM) auf Protein normiert; beide nach 90 min. Ischämie mit anschließender 24 h Reperfusionsdauer, mit und ohne Gabe von BHB. Weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35 g) (N = 10); Statistik beide Abb.: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test, links  $F_{4,83}$  - Wert: 2; Signifikanzlevel:  $*p < 0,05$  Schein - OP Saline vs. Stroke Saline; Stroke Saline vs. Stroke BHB 30 mg/kg KG; rechts  $q = 3,08$  Stroke Saline vs. Stroke BHB 30 mg/kg KG.

Der mit einem handelsüblichen BCA - Assay gemessene Proteingehalt in der linken ischämischen Hemisphäre, sinkt signifikant gegenüber einer Kontrollgruppe mit Saline. Wenn eine BHB - Lösung verabreicht wird, ist ein erhöhter Gesamtproteingehalt in der linken Hemisphäre messbar. In der rechten Abbildung kann man eine erhöhte proteinnormierte Citratsynthaseaktivität erkennen, allerdings ohne statistische Signifikanz zwischen den Gruppen.

### 3.2.4.2 Einfluss unterschiedlicher Substrate auf die Atmung isolierter Mitochondrien

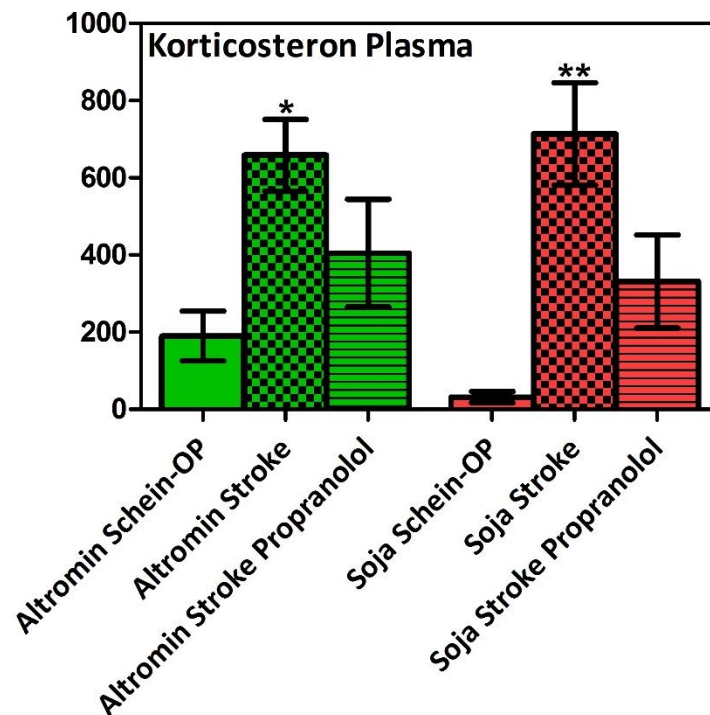
In diesem Kapitel sollen unterschiedliche Substrateinflüsse auf isolierte Mitochondrien dargestellt werden. Die verwendeten Substrate sind alles potentielle Energieträger, die unmittelbar etwas mit dem Energiestoffwechsel der Zelle zu tun haben. Propranolol wurde verwendet, da der Einfluss in der Literatur auf isolierte Mitochondrien, unzureichend erforscht wurde und Propranolol in der Lage ist, den Energiestoffwechsel zu beeinflussen (s. **Kap. 3.1.5 Effekte von Propranolol auf die hepatische Ketogenese**). Verwendet wurden die Dosierungen, die auch an den Versuchstieren Verwendung fanden. In **Abb. 87** ist aus diesem Grund die Dimension mit mg/kg KG angegeben. Alle mg/ml Angaben beziehen sich auf Arbeitslösungen, die auch im Sauerstoffelektrodenprotokoll selbst Verwendung finden. Die aus dieser Dosierung resultierenden Konzentrationen in der Kammer der Sauerstoffelektrode sind in dem zugehörigen Diskussionsteil angegeben (s. **Kap 4.2.4.3 Substrateinflüsse auf isolierte Mitochondrien**).



**Abb. 87** Substrateinflüsse auf die mitochondriale Atmung (Mittelwerte  $\pm$  SEM) unter basalen Bedingungen. Weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35 g) (N = 7)

Wenn man isolierten Mitochondrien BHB in hohen Dosierungen anbietet (100 mg/kg KG), sind sie in der Lage, das angebotene Substrat BHB zu verstoffwechseln. Endpunkt hierbei ist die mitochondriale Atmung. Auch bei Oxalacetat und Acetat bzw. Citrat ist in der Lage, die Atmung zu erhöhen. Glukose bzw. Propranolol lässt die Atmung isolierter Mitochondrien sinken.

### 3.2.4.3 Veränderungen der Korticosteronkonzentration bei zerebraler Ischämie



*Abb. 88 Anstieg der Korticoosteronlevel (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Plasma nach 90 min. Ischämie und Verhalten bei Gabe von 2 mg/kgKG  $\pm$  Propranolol - HCl i.p. bei Induktion des Schlaganfalls in Abhängigkeit von zwei unterschiedlichen Diäten (Altromin, Soja). Weibliche CD - 1 Mäuse (28 - 35 g) (N = 6) Statistik: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test, F - Wert : 6,171 Signifikanzlevel: \*p < 0,05 Altromin Schein - OP vs. Altromin Stroke; \*\* p < 0,01 Soja Schein - OP vs. Soja Stroke.*

Die Korticoosteronspiegel steigen in beiden Gruppen (Altromin, Soja) nach 90 min. Ischämie an. Eine Intervention mit 2 mg/kg KG  $\pm$  Propranolol bedingt eine Senkung der Korticoosteronspiegel. Es sind keine Unterschiede zwischen den beiden Diätgruppen detektierbar.

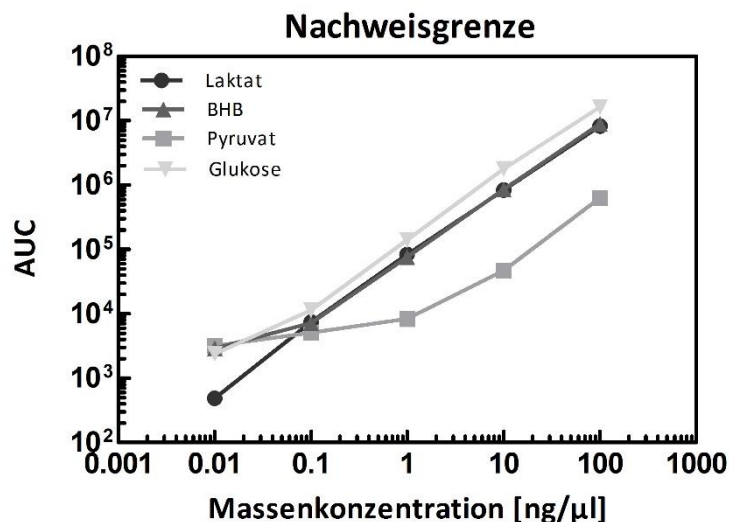
### 3.3 Etablierung und Validierung der Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometer

Um die prinzipielle Messbarkeit von Analyten in einem bestimmten Kompartiment abschätzen zu können, sollte die Detektionsgrenze des Massendetektors für den zu bestimmenden Analyten, bekannt sein. Außerdem benötigt man Literaturangaben über absolute Konzentrationen in bestimmten Organen der Versuchstiere. Als hilfreich in der täglichen Laborpraxis hat sich die Datenbank der Keio Universität herausgestellt [223]. In dieser Datenbank findet man für jeden Metaboliten eine absolute Konzentration in dem jeweiligen Kompartiment.

#### 3.3.1 Nachweisgrenze und Linearität

Im Folgenden werden die verschiedenen Nachweisgrenzen der messbaren Metabolite inklusive ihrer internen Standardverbindungen illustriert. Um die Darstellung übersichtlicher zu gestalten, werden 4 Kategorien im Folgenden vorgestellt:

- Metabolite Energiestoffwechsel
- Intermediate des Zitronensäurezyklus
- Neurotransmitter
- Interne Standards



**Abb. 89** Nachweisgrenze für die Energiestoffwechselintermediate Laktat, BHB, Pyruvat und Glukose. Anzahl Messungen  $N = 1$ ; Laktat  $R^2 = 1,000$ ; BHB  $R^2 = 1,000$ ; Pyruvat  $R^2 = 0,913$ ; Glukose  $R^2 = 0,999$ ;  $p < 0,001$  für alle Gruppen.

Die Nachweisgrenze für Laktat, BHB und Glukose liegen zwischen 0,01 - 0,1 ng/μl ( $\cong$  0,55 - 0,97 μM); für Pyruvat zwischen 0,1 - 1 ng/μl ( $\cong$  11,49 μM). In der instrumentellen Analytik werden vorwiegend Massenkonzentrationen verwendet. In der pharmakologischen Literatur sind absolute Stoffmengenkonzentrationen die vergleichbareren Größen. Aus diesem Grund sollen die Massen - an dieser Stelle in Stoffmengenkonzentrationen umgerechnet werden (s. **Tab. 28**). Alle Stoffmengenkonzentrationen werden mit der höheren Massenkonzentration gerechnet (0,1 ng/μl bzw. 1 ng/μl für Pyruvat).

|   | Laktat | BHB    | Pyruvat | Glukose |
|---|--------|--------|---------|---------|
| <b>Molekulargewicht Anion</b><br>[g/mol]    | 89,08  | 103,10 | 87,06   | 180,16  |
| <b>Massenkonzentration</b><br>[ng/μl]       | 0,1    | 0,1    | 1       | 0,1     |
| <b>Stoffmengenkonzentration</b><br>[μmol/l] | 0,79   | 0,97   | 11,49   | 0,55    |
| <b>Bestimmungsgrenzen</b><br>[μmol/l]       | 2      | 2      | 25      | 1,5     |

Tab. 28 Umrechnung der Nachweisgrenzen der Energiemetabolite von Massen - in Stoffmengenkonzentrationen.

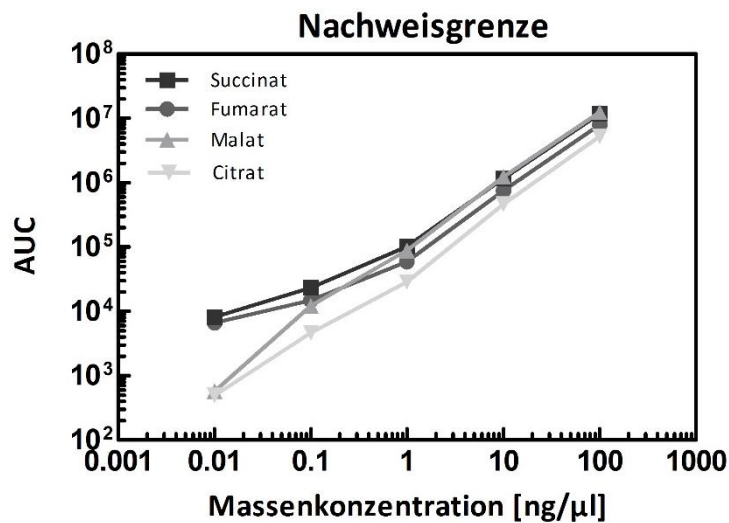
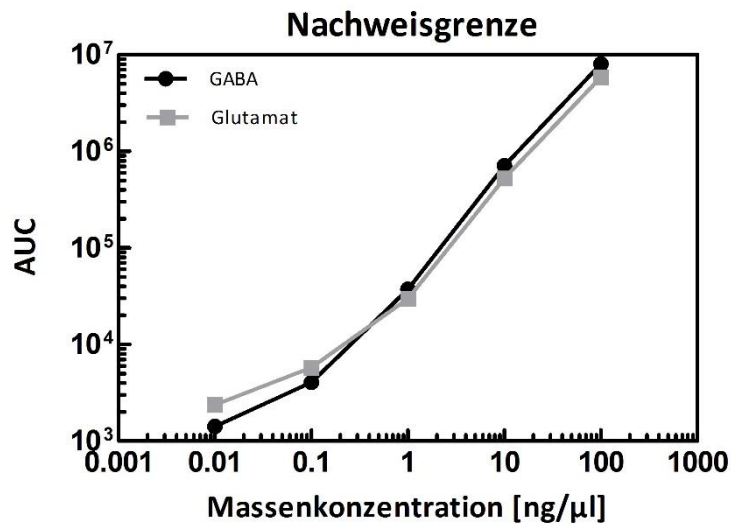


Abb. 90 Nachweisgrenze für die Intermediate des Zitronensäurezyklus Succinat, Fumarat, Malat und Citrat. Anzahl Messungen  $N = 1$ ; Succinat  $R^2 = 1,000$ ; Fumarat  $R^2 = 1,000$ ; Malat  $R^2 = 1,000$ ; Citrat  $R^2 = 0,999$ ;  $p < 0,001$  für alle Gruppen.

Alle Intermediate des Zitronensäurezyklus haben eine Nachweisgrenze von 0,1 ng/μl. Umgerechnet in Stoffmengenkonzentrationen ergeben sich aus Tab. 29 folgende Werte:

|   | Succinat | Fumarat | Malat  | Citrat |
|---|----------|---------|--------|--------|
| <b>Molekulargewicht Anion</b><br>[g/mol]    | 116,09   | 114,07  | 132,09 | 189,13 |
| <b>Massenkonzentration</b><br>[ng/μl]       | 0,1      | 0,1     | 0,1    | 0,1    |
| <b>Stoffmengenkonzentration</b><br>[μmol/l] | 0,86     | 0,88    | 0,76   | 0,53   |
| <b>Bestimmungsgrenzen</b><br>[μmol/l]       | 2        | 2       | 2      | 1,5    |

Tab. 29 Umrechnung der Nachweisgrenzen der Intermediate des Zitronensäurezyklus von Massen- in Stoffmengenkonzentrationen.

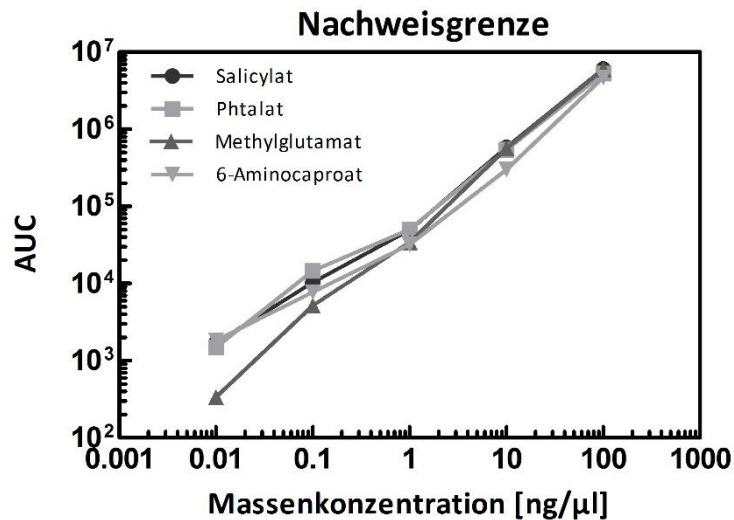


**Abb. 91** Nachweisgrenze für  $\gamma$  - Aminobutyrat (GABA) und Glutamat. Anzahl Messungen  $N = 1$ ; GABA  $R^2 = 0,999$ ; Glutamat  $R^2 = 0,999$ ;  $p < 0,001$  für alle Gruppen.

GABA und Glutamat liegen in Bezug auf ihre Nachweisgrenze zwischen 0,1 - 1 ng/μl. In **Tab. 30** wird die höhere Nachweisgrenze von 1 ng/μl veranschlagt.

|   | GABA   | Glutamat |
|---|--------|----------|
| <b>Molekulargewicht Anion</b><br>[g/mol]    | 102,12 | 145,13   |
| <b>Massenkonzentration</b><br>[ng/μl]       | 1      | 1        |
| <b>Stoffmengenkonzentration</b><br>[μmol/l] | 9,80   | 6,90     |
| <b>Bestimmungsgrenzen</b><br>[μmol/l]       | 20     | 15       |

**Tab. 30** Umrechnung der Nachweisgrenzen von GABA und Glutamat von Massen - in Stoffmengenkonzentrationen.



**Abb. 92** Nachweisgrenze für die internen Standardverbindungen Salicylat, Phtalat, Methylglutamat und 6 - Aminocaproat. Anzahl Messungen  $N = 1$ ; Salicylat  $R^2 = 1,000$ ; Phtalat  $R^2 = 1,000$ ; Methylglutamat  $R^2 = 1,000$ ; 6 - Aminocaproat  $R^2 = 0,9987$   $p < 0,001$  für alle Gruppen.

Die Nachweisgrenzen der internen Standardverbindungen liegen zwischen 0,01 - 0,1 ng/μl. Für die in Tab. 31 illustrierten Werte, wird die höhere Nachweisgrenze von 0,1 ng/μl gewählt.

|   | Salicylat | Phtalat | Methylglutamat | 6-Aminocaproat |
|---|-----------|---------|----------------|----------------|
| <b>Molekulargewicht Anion</b><br>[g/mol]    | 136,12    | 164,14  | 145,02         | 116,07         |
| <b>Massenkonzentration</b><br>[ng/μl]       | 0,1       | 0,1     | 0,1            | 0,1            |
| <b>Stoffmengenkonzentration</b><br>[μmol/l] | 0,73      | 0,61    | 0,69           | 0,86           |

**Tab. 31** Umrechnung der Nachweisgrenzen der internen Standardverbindungen von Massen - in Stoffmengenkonzentrationen.

Zusammenfassend liegen die Nachweisgrenzen für Intermediate des Stoffwechsels bzw. des Zitronensäurezyklus zwischen 0,5 - 1 μM. Neurotransmitter können zwischen 7 - 10 μM nachgewiesen werden. Pyruvat als α - Ketosäure hat die mit 11,5 μM höchste Nachweisgrenze und ist nur unter optimalen Bedingungen (keine Matrixeffekte durch Probenmaterial) mit der GC - MS Analytik zugänglich.

Anhand dieses Kapitels lässt sich das Potential der GC - MS Analytik ableiten. Von Vorteil ist die hohe Fülle an parallel nachweisbaren Metaboliten in einem Lauf. Von Nachteil gestaltet sich die hohe Nachweisgrenze im Vergleich zu anderen analytischen Methoden, wie zum Bsp. die Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC - MS - MS).

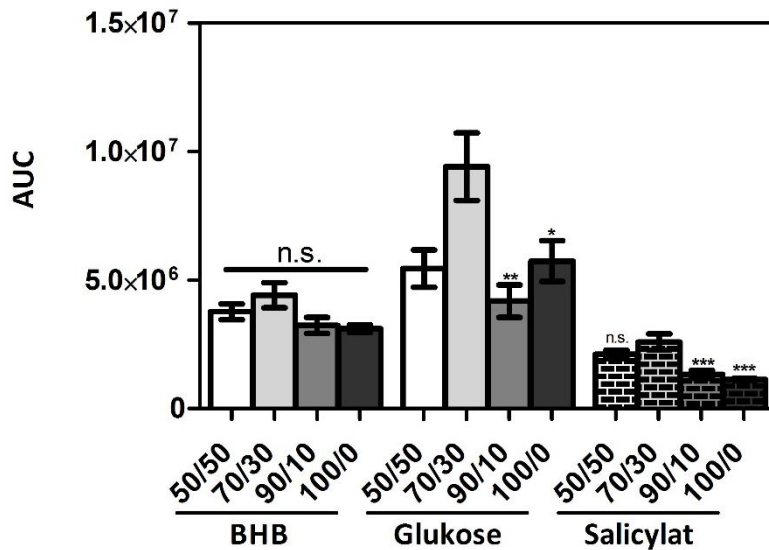


### 3.3.2 N,N - Diisopropylethylamin (Hünig Base) als Zusatz in der Silylierungsreaktion

Bei der Hünig - Base handelt es sich um ein tertiäres Amin, was normalerweise als Base in Alkylierungsreaktionen zum Einsatz kommt [224]. Bei einer Silylierungsreaktion entstehen 2 Protonen für jedes umgesetzte Molekül BSTFA. Aufgrund der sterischen Struktur der Hünig - Base kann diese Verbindung nur einfach protoniert werden. Da die säurekatalysierte Hydrolyse im Vergleich zur basenkatalysierten Hydrolyse irreversibel ist [225], können hydrolyseempfindliche Analyte irreversibel gespalten werden. Aus diesem Grund wird in diesem Kapitel der Effekt der Hünig - Base (in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen mit Pyridin) auf die „*area-under-the-curve*“ (AUC) dargestellt.

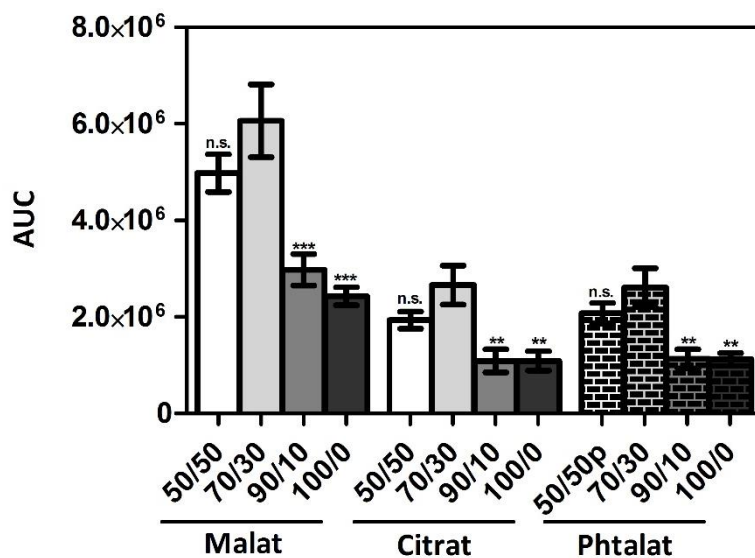
Bei der Probenvorbereitung wurden alle Referenzsubstanzen eingewogen und auf eine abschließende Konzentration von 100 ng/μl verdünnt. Nach erfolgter Trocknung unter Stickstoffgas wurde der Rückstand in 100 μl Lösungsmittel (Pyridin + Hünig-Base, Ausnahme: Mischungsverhältnis 100/0) aufgenommen und dispergiert. Nach Zugabe von BSTFA / TMCS im Verhältnis 99 : 1 ( $V_{\text{BSTFA/TMCS}} = 100 \mu\text{l}$  ;  $V_{\text{ges.}} = 200 \mu\text{l}$ ) wurde die Silylierungsreaktion für 50 min. bei 70 °C durchgeführt.

Der zugrundeliegende Versuchsaufbau berücksichtigt ebenfalls unterschiedliche Messzeitpunkte der ermittelten Daten. Die einzelnen Fraktionen wurden in einer Zeitspanne von 18 h vermessen, wobei die einzelnen *Vials* zufallsverteilt in den Autosampler gestellt wurden und somit jede Fraktion zu einem anderen Zeitpunkt vermessen wurde. Am darauffolgenden Tag wurde das Protokoll wiederholt (Gesamtstichprobenanzahl = 8), wobei auch hier die Proben zufallsverteilt wurden. Aus diesem Grund ist die Beständigkeit der silylierten Endprodukte bereits in den **Abb. 14 – 16** enthalten.



**Abb. 93** Auswirkungen von unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Hünig - Base und Pyridin auf die AUC von BHB, Glukose und dem internen Standard Salicylat. Nach Trocknung der biologischen Probe wurden Pyridin und Hünig - Base (zusammen 100 µl) hinzugegeben. Die erste Zahl entspricht dem Pyridinanteil, die zweite Zahl dem Anteil an Hünig - Base. Die Darstellung der einzelnen Fraktionen entspricht Mittelwerten ± SEM; N = 8; Statistik: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test;  $F_{11,95} = 16,0$ ; Signifikanzlevel: \*\*\*  $p < 0,001$  70 / 30 vs. 90 / 10 und 100 / 0; \*\*  $p < 0,01$  70 / 30 vs. 90 / 10; \*  $p < 0,05$  70 / 30 vs. 100 / 0.

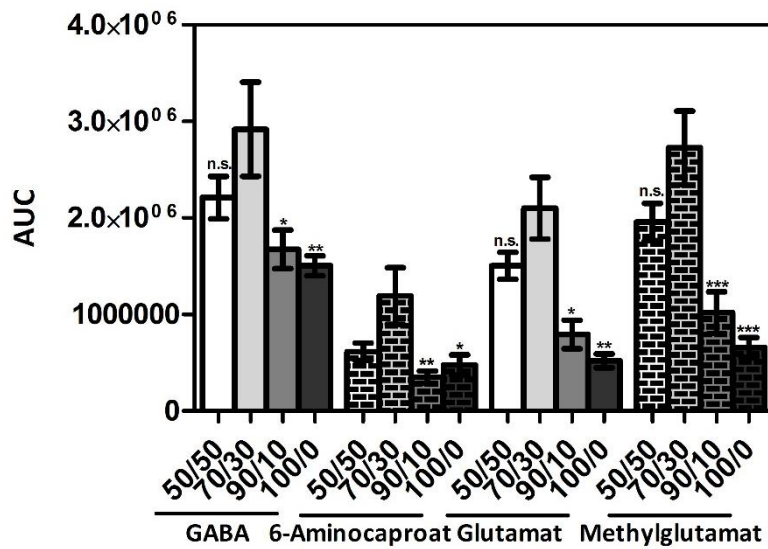
In **Abb. 93** erkennt man die Erhöhung der AUC durch die Zugabe von Pyridin und Hünig - Base im Verhältnis 70 / 30 im Vergleich zum ursprünglichen Arbeitsprotokoll. Im ursprünglichen Arbeitsprotokoll war keine Zugabe der Hünig - Base vorgesehen. Die anderen Mischungsverhältnisse von 50 / 50 bzw. 90 / 10 sind in allen Fraktionen dem Mischungsverhältnis von 70 / 30 in Bezug auf die AUC unterlegen.



**Abb. 94** Auswirkungen von unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Hünig - Base und Pyridin auf die AUC von Malat, Citrat und dem internen Standard Phtalat. Nach Trocknung der biologischen Probe wurden Pyridin und Hünig - Base (zusammen 100 µl) hinzugegeben. Die erste

Zahl entspricht dem Pyridinanteil, die zweite Zahl dem Anteil an Hünig - Base. Die Darstellung der einzelnen Fraktionen entspricht Mittelwerten  $\pm$  SEM; N = 8; Statistik: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test;  $F_{11,95} = 8,20$ ; Signifikanzlevel: \*\*\*  $p < 0,001$  70 / 30 vs. 90 / 10 und 100 / 0; \*\*  $p < 0,01$  70 / 30 vs. 90 / 10 und 100 / 0.

Malat und Citrat als Vertreter der Intermediate des Zitronensäurezyklus zeigen in einem Mischungsverhältnis von Pyridin und Hünig - Base von 70 / 30 die höchste AUC im Vergleich zu allen anderen Mischungsverhältnissen. Im Vergleich zum 50 / 50 Mischungsverhältnis ergibt sich kein signifikanter Unterschied zum 70 / 30 Mischungsverhältnis.



**Abb. 95** Auswirkungen von unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Hünig - Base und Pyridin auf die AUC von GABA, 6 - Aminocaproat (iStd von GABA), Glutamat und Methylglutamat (iStd von Glutamat). Nach Trocknung der Proben wurde Pyridin und Hünig - Base (zusammen 100  $\mu$ l) hinzugegeben. Die erste Zahl entspricht dem Pyridinanteil, die zweite Zahl dem Anteil an Hünig - Base. Die Darstellung der einzelnen Fraktionen entspricht Mittelwerten  $\pm$  SEM; N = 8; Statistik: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test;  $F_{15,12} = 12,8$ ; Signifikanzlevel: \*\*\*  $p < 0,001$  70 / 30 vs. 90 / 10 und 100 / 0; \*\*  $p < 0,01$  70 / 30 vs. 100 / 0; \*  $p < 0,05$  70 / 30 vs. 90 / 10 und 100 / 0

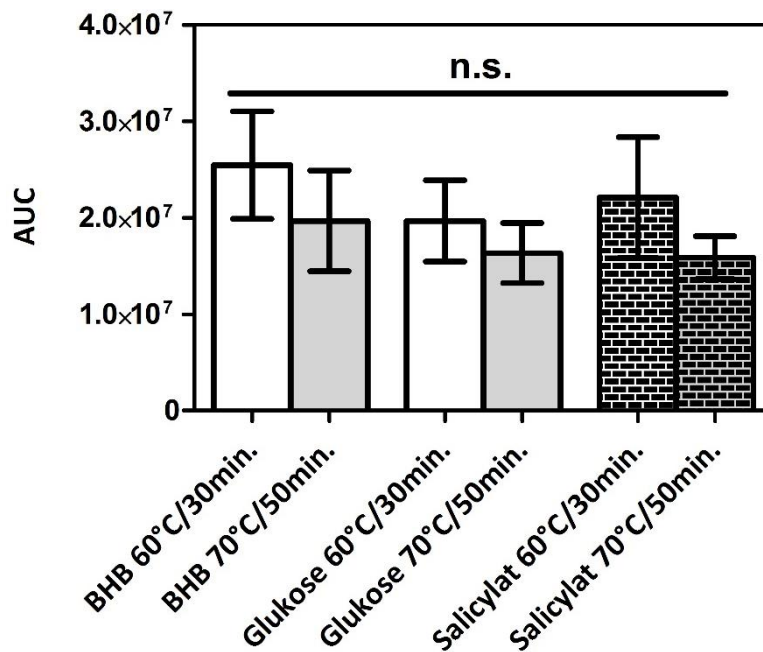
In Bezug auf die AUC der Neurotransmitter GABA und Glutamat (und ihrer internen Standardverbindungen, iStd) hat sich auch hier das Mischungsverhältnis von 70 / 30 als erhöhend auf die AUC herausgestellt.

Die **Abb. 14 - 16** veranschaulichen, dass ein Mischungsverhältnis von Pyridin zu Hünig - Base von 70 / 30 in Bezug auf die AUC aller gemessenen Analyte, sich als erhöhend herausgestellt hat. Aufgrund der positiven Effekte der Hünig - Base auf die AUC, wurde das Mischungsverhältnis von 70 / 30 ab diesem Zeitpunkt in das bestehende Protokoll aufgenommen.

### 3.3.3 Temperatur - und Zeitabhängigkeit der Silylierungsreaktion

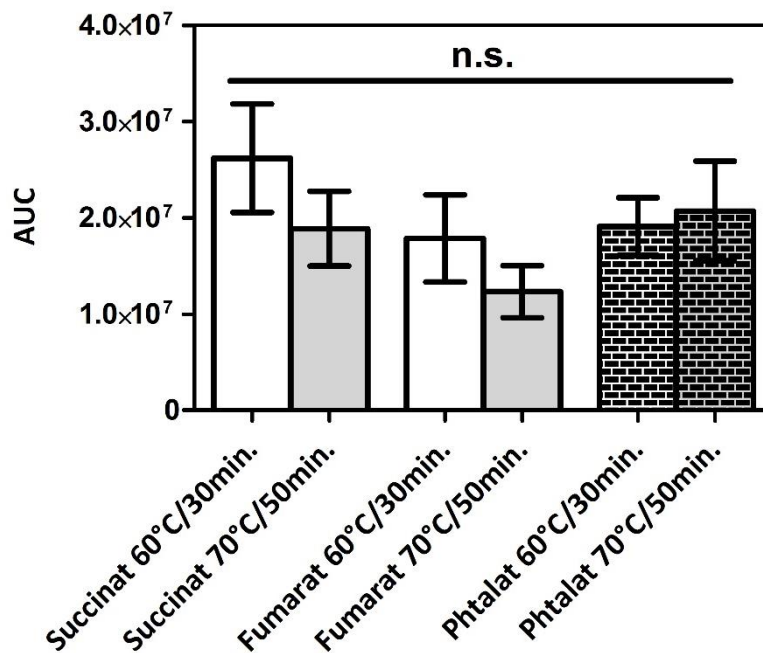
Die Silylierungsreaktion ist bei Basen eine elektrophile Additionsreaktion [225], bei der Hydroxy -, Amino - und Carboxylatfunktionen silyliert werden. Da die Gesamtreaktion grundsätzlich im Gleichgewicht mit ihren nicht silylierten Derivaten steht, ist die größte Herausforderung, über den Messzeitraum ( $\approx$  18 h) eine konstante und somit reproduzierbare *Abundance* zu generieren.

Außerdem muss durch die Reaktionsbedingungen eine nahezu quantitative Umsetzung der im Reaktionsgefäß enthaltenen Analyte angestrebt werden, da die silylierten Derivate zur quantitativen Bestimmung herangezogen werden. Nach dem *Le - Chatelier-Prinzip* bedingt eine Erhöhung der Temperatur (Silylierung leicht endergon [226]) bzw. eine Zugabe von Silylierungsmittel im Überschuß, eine gesteigerte Ausbeute an Produkt. Um den Effekt der Temperaturerhöhung auf die bestehende Analytik zu untersuchen, wurde die Temperatur - bzw. Zeitabhängigkeit der Silylierung getestet (s. **Abb. 96**). Basierend auf der Publikation von Saravia et al. 2011 [213] wird die Temperatur - bzw. Zeitabhängigkeit auf das bestehende Protokoll gezeigt.



**Abb. 96** AUC in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur bei der Silylierungsreaktion für die Analyten BHB und Glukose mit Salicylat als internem Standard. Nachdem die Proben bis zur Trockne eingedampft worden sind, wurde Pyridin, Hünig - Base (70 / 30), BSTFA und TMCS (99 : 1) hinzugegeben. Die Umsetzungsreaktion zu den silylierten Derivaten wurde einmal mit 60 °C für 30 min. bzw. mit 70 °C für 50 min. vorgenommen und anschließend vermessen. Die Darstellung der einzelnen Fraktionen entspricht Mittelwerten  $\pm$  SEM; N = 2 ; Statistik: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test;  $F_{5,11} = 1,19$ .

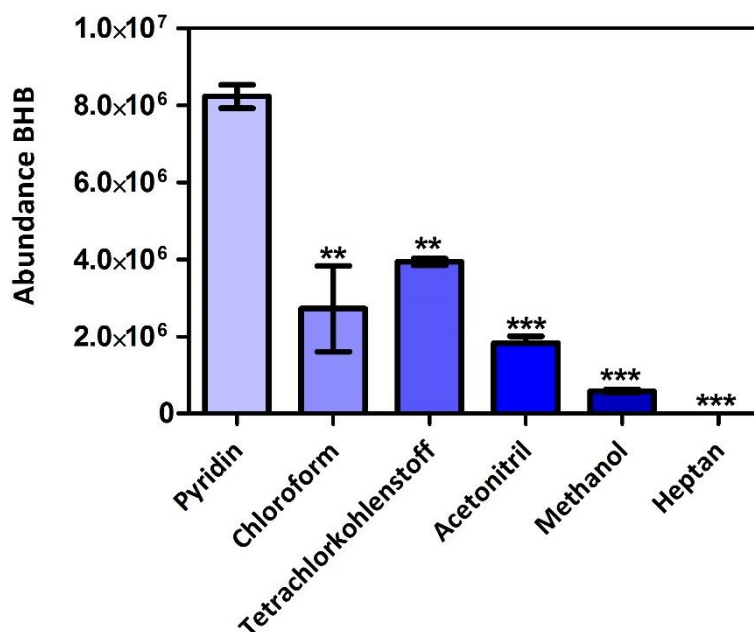
Die Einflussfaktoren Zeit und Temperatur bedingen keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die ermittelten AUC's. Von Interesse ist eher die Beständigkeit der silylierten Analyte über die gemessene Zeit. Ein Lauf dauert im Mittel 18 h. Silylderivate werden in der organischen Chemie gerne als Schutzgruppen eingesetzt [176], [177], [226]. Charakteristisch für Schutzgruppen ist die leichte Abspaltbarkeit, welche sich in niedrigerer AUC über die Zeit ausdrücken würde. Aus diesem Grund wird im nächsten Kapitel die Beständigkeit der silylierten Analyte über die Messzeit dargestellt.



3

**Abb. 97** AUC in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur bei der Silylierungsreaktion für die Analyten Succinat und Fumarat mit Phtalat als internem Standard. Nachdem die Proben bis zur Trockne eingedampft worden sind, wurde Pyridin, Hünig-Base (70 / 30), BSTFA und TMCS (99 : 1) hinzugegeben. Die Umsetzungsreaktion zu den silylierten Derivaten wurde einmal mit 60 °C für 30 min. bzw. mit 70 °C für 50 min. vorgenommen und anschließend vermessen. Die Darstellung der einzelnen Fraktionen entspricht Mittelwerten  $\pm$  SEM; N = 2; Statistik: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test;  $F_{5,11} = 2,18$ .

### 3.3.4 Lösungsmiteleinfluss auf die Silylierungsreaktion



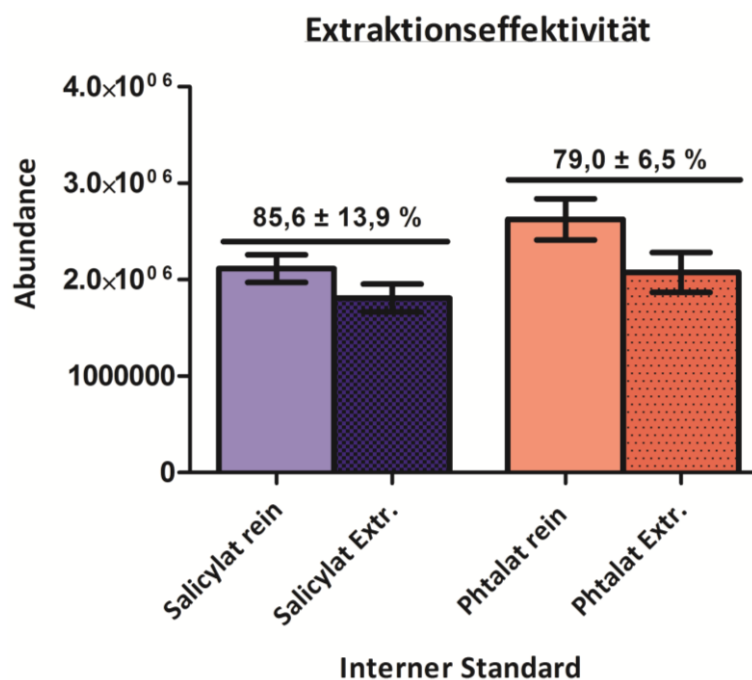
**Abb. 98** Lösungsmiteleinfluss auf die Abundance von BHB mit einer Massenkonzentration von 100ng/ $\mu$ l. Nachdem die Proben bis zur Trockne eingedampft worden sind, wurde der Rückstand mit jeweils 100  $\mu$ l (ohne Hünig - Base) der oben dargestellten Lösungsmittel gelöst. Danach wurden die gelösten Proben mit BSTFA und TMCS (99 : 1) auf ein Endvolumen von 200  $\mu$ l aufgestockt und bei

70 °C für 50 min. zu den silylierten Derivaten umgesetzt. Die Darstellung der einzelnen Fraktionen entspricht Mittelwerten  $\pm$  SEM; N = 2; Statistik: Ein - Wege - ANOVA mit Tukey - Post - Test;  $F_{5,11} = 38,8$  ; Signifikanzlevel: \*\*  $p < 0,01$  Pyridin vs. Chloroform / Tetrachlorkohlenstoff; \*\*\*  $p < 0,001$  Pyridin vs. Acetonitril / Methanol / Heptan.

In der Silylierungsreaktion stellt sich Pyridin als das Lösungsmittel heraus, welches die höchste Abundance für BHB generiert. Auch alle anderen Analyte zeigen dieses Verhalten mit Pyridin (Daten nicht illustriert). Desto höher die gemessene Abundance für ein Analyt ist, desto niedriger erweist sich auch die daraus folgende Nachweisgrenze. Nach dieser Messreihe wurde Pyridin als Standardlösungsmittel für die Silylierungsreaktion gewählt.

### 3.3.5 Extraktionseffektivität

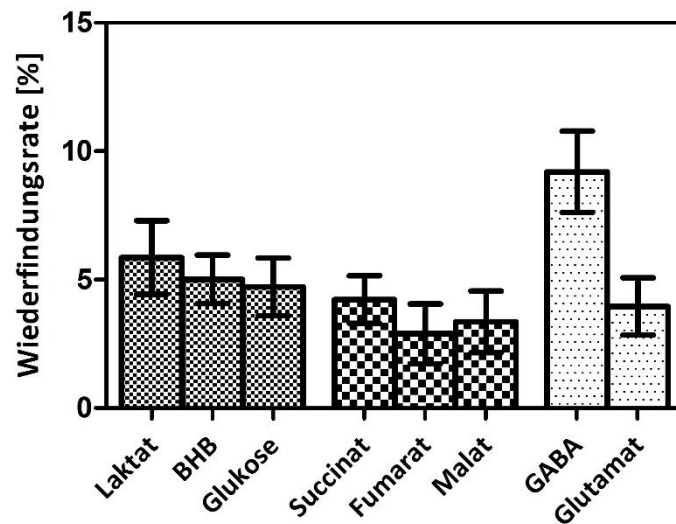
Die Extraktionseffektivität beschreibt die Ausbeute an Massen einer einzelnen Substanz, die nach der Extraktion erhalten werden im Verhältnis mit einem Standard der nicht extrahiert wurde. Im Folgenden wird die Extraktionseffektivität anhand der zwei wichtigsten internen Standardverbindungen Salicylat und Phtalat gezeigt. Anhand dieser zwei Verbindungen (s. **Tab. 16**) wurden die wichtigsten Metabolite in der vorliegenden Arbeit quantifiziert.



**Abb. 99** Die Extraktionseffektivität von Salicylat und Phtalat. Die einzelnen Substanzen wurden eingewogen (Zielkonzentration: 100 ng/ $\mu$ l), gelöst und bis zur Trockne eingedampft. Danach wurde Pyridin, Hünig - Base (70 / 30), BSTFA und TMCS (99 : 1) hinzugegeben. Die Umsetzungsreaktion zu den silylierten Derivaten wurde bei 70 °C für 50 min. vorgenommen und anschließend vermessen. Die Extraktionsfraktionen wurden dreimal mit Lösungsmittel (Methanol / Chloroform / Wasser) extrahiert. Danach wurde bis zur Trockne eingedampft und wie oben beschrieben gelöst und silyliert. Die Darstellung der einzelnen Fraktionen entspricht Mittelwerten  $\pm$  SEM; N = 23.

### 3.3.6 In vitro Wiederfindungsrate

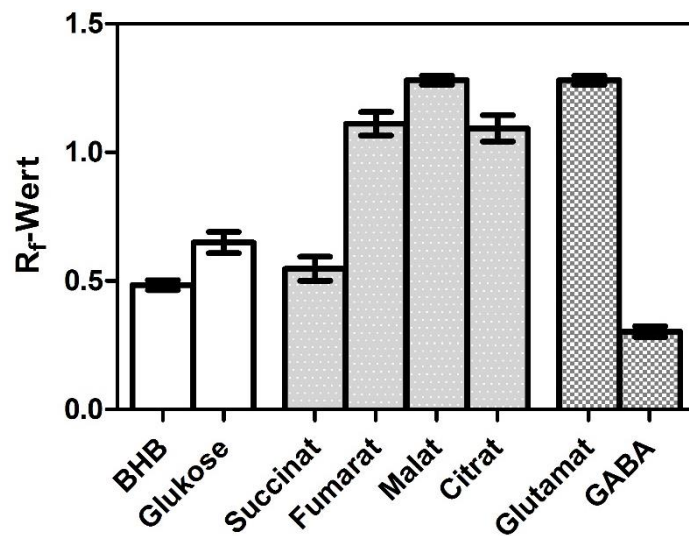
Um die absolute Konzentration eines Analyten im Gehirn der Maus / Ratte bestimmen zu können, bedarf es der Wiederfindungsrate der Mikrodialyse-sonde. Hierzu stellt man eine Stammlösung mit bekannter Konzentration her. Danach nimmt man eine Dialyse-sonde aus der bestehenden *Charge* und dialysiert die Stammlösung. Dabei wird die Sonde mit *aCSF* durchspült (Durchflußgeschwindigkeit: 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Um nun die Wiederfindungsrate zu bestimmen, wird das gesammelte Dialysat vermessen und ins Verhältnis mit der Konzentration der Stammlösung gesetzt.



**Abb. 100** *In vitro* Wiederfindungsrate für die wichtigsten Analyte. Die einzelnen Substanzen wurden eingewogen (Zielkonzentration: 1000  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) und gelöst. Danach wurde eine selbstgebaute Dialyse-sonde in die Stammlösung getaucht und die Lösung wurde dialysiert. Die gesammelten Dialysatproben wurden mit der Stammlösung vermessen und die resultierenden Werte wurden ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der einzelnen Fraktionen entspricht Mittelwerten  $\pm$  SEM; N = 3.

### 3.6 Responsefaktoren der Analyte

Bei der Quantifizierung mithilfe der internen Standardmethode entspricht die AUC des zu quantifizierenden Analyten nicht der des internen Standards (Ausnahme: isotope markierte interne Standards). Nach **Gleichung 10** würde sich bei gleicher AUC ein  $R_f$ -Wert von eins ergeben. Um die ungleichen AUC's zwischen Analyt und internem Standard zu berücksichtigen, wird der  $R_f$ -Wert bei jeder Messung neu bestimmt und in die Berechnung der Stoffmengenkonzentration mit einbezogen. Der  $R_f$ -Wert sollte über viele Wiederholungsmessungen konstant bleiben, da ansonsten falsch positive bzw. negative Gesamtkonzentrationen daraus resultieren würden.



*Abb. 101 Responsefaktoren ( $R_f$  - Werte) für die wichtigsten Analyte. Die Substanzen wurden eingewogen (Zielkonzentration: 100 ng /  $\mu$ l), gelöst und eingedampft. Nach Resuspendierung in Pyridin und Hünig - Base (100  $\mu$ l; 70 / 30) wurden die Silylderivate der einzelnen Analyte mit BSTFA / TMCS (99 : 1) bei 70 °C für 50 min. hergestellt. Nach der Vermessung wurden die erhaltenen AUC's eines jeden Analyten ins Verhältnis mit dem jeweiligen internen Standard (s. Tab. 16) gesetzt (s. Gleichung 10). Die Darstellung der einzelnen Fraktionen entspricht Mittelwerten  $\pm$  SEM; N = 24.*

Die  $R_f$  - Werte der zu quantifizierenden Analyte liegen zwischen 0,32 und 1,31. Über 24 Wiederholungsmessungen bleiben die  $R_f$ - Werte sehr konstant, was für die Reproduzierbarkeit der GC - MS Analytik spricht. Um aber diesen kleinen Fehler noch zu kompensieren, wird an jedem Messtag ein „Tages  $R_f$ - Wert“ ermittelt, der zur Quantifizierung herangezogen wird. Optimalerweise benutzt man in der GC - MS Analytik isotope markierte Verbindungen, die einen  $R_f$ - Wert nahe 1 aufweisen. Bei der Etablierung konnte nicht jede Substanz als isotope markiert bezogen werden.



## 4. Diskussion

In diesem Kapitel werden die zur Anwendung gekommenen Methoden und die damit generierten Ergebnisse diskutiert, interpretiert und in den aktuellen Kontext der Forschung eingeordnet.

Zuerst wird das Projekt der hepatischen Ketogenese näher betrachtet, wobei hier der Schwerpunkt auf den beiden Energielieferanten BHB und Glukose liegt. Zusätzlich werden auch die Intermediate des Citratzyklus in Abhängigkeit der Diäten diskutiert und interpretiert. Für alle Ausführungen werden dabei die vier Kompartimente Leber- und Hirnhomogenate, Plasma und Mikrodialysat einander gegenübergestellt bzw. in einen Gesamtkontext gesetzt.

Das zweite Projekt wurde durchgeführt um die Hypothese („hepatische Ketogenese als protektiver Ansatz im Schlaganfallgeschehen“), die aus dem ersten Projekt abgeleitet wurde, zu überprüfen. Die Idee hierzu erfolgte aus den stark angestiegenen BHB Konzentrationen bei Induktion eines Schlaganfalls. Das Studiendesign (s. **Abb. 78**) wurde auf Basis einer Akutintervention, wie sie in einem Herzkatheterlabor täglich anzutreffen ist, gewählt. Hierbei wurden unterschiedliche Konzentrationen einer BHB Lösung bei Entfernung des Fadens injiziert, was im klinischen Alltag einer Injektion bei bzw. nach einer Lysetherapie entsprechen würde. Dieser klinisch translationale Ansatz wurde mit den Endpunkten Funktion der Atmungskettenkomplexe, Aktivität der *Citratsynthase*, Metabolitenspiegel von Glukose und BHB in den vier angesprochenen Kompartimenten, die sensorischen und motorischen Eigenschaften der Mäuse überprüft.

Im letzten Abschnitt der Diskussion wird die Etablierung und Validierung der GC - MS Analytik anhand der geltenden Regelwerke für die Validierung in der pharmazeutischen Industrie vollzogen. Auch hier wird die bestehende Methode in den wissenschaftlichen Gesamtkontext eingebettet.

Zu Beginn dieses Kapitels wird die Reproduzierbarkeit der angewendeten Methodik erläutert und interpretiert. Anschließend werden die eigentlichen Daten des Projekts der „hepatischen Ketogenese in Abhängigkeit unterschiedlicher Diäten“ erläutert und deren Plausibilität anhand aktueller Literatur geprüft.

### 4.1 Die hepatische Ketogenese bei Induktion eines Schlaganfalls

#### 4.1.1 Laser - Doppler Flussmessung und Okklusion der mittleren Zerebralarterie

Bringt eine Methode keinen ausreichenden Nachweis in Bezug auf ihre Effektivität und ihre Reproduzierbarkeit, ist die Methode grundsätzlich ungeeignet für die zu klärenden Fragestellungen. Aus diesem Grund wird im Folgenden die MCAO-Methode in Bezug auf die Effektivität und Reproduzierbarkeit der gemessenen Werte näher betrachtet. In **Abb. 63** erkennt man den starken Abfall der Zählungen durch die Laser Doppler Sonde, während der Silikonfaden den Blutfluss der mittleren Zerebralarterie blockiert. Durch die Okklusion kommt es zu einer Senkung der Perfusion in der mittleren Zerebralarterie auf  $< 15\%$  des Ausgangswertes. Die mit der Flussmessung erhaltenen Muster stimmen mit den Mustern, die andere Arbeitsgruppen gemessen haben, überein [201]; [202]. Ein physiologischer Blutfluss in einem Rattenhirn im Bereich des *fronto-parietalen Cortex* liegt bei  $1,58 \pm 0,25$  ml/g/min. [229]. Um eine adäquate Minderdurchblutung des versorgenden Gebietes zu

erhalten, sollte der Blutfluss  $< 0,12 \text{ ml/g/min}$  sein [204]; [205]. Wenn man die Zählungen der Laser-Doppler Sonde mit den in der Literatur angegebenen Werten umrechnet, erhält man eine initiale Senkung der Perfusion auf  $0,207 \text{ ml/g/min}$ . Da die Perfusion der MCA mit der Zeit abnimmt, kann man von einer suffizienten Abnahme der Perfusion durch den Silikonfaden ausgehen [231]. Die Eignung der Laser-Doppler Flussmessung für die Bestätigung der Okklusion kann somit als bestätigt gewertet werden. Die Kontrolle des Blutflusses mittels Laser-Doppler Flussmessung lässt aber auch erkennen, dass der Verschluss der mittleren Zerebralarterie nicht zu 100 % erfolgt, wie bei permanenten Modellen, wo entweder eine Kraniektomie, Embolisierung mit koagulierten Thromben bzw. Mikrosphären oder eine Anoxie vollzogen wird [203] – [207]. In 80 – 85 % der auftretenden menschlichen Schlaganfälle handelt es sich um ischämische Genesen, die oftmals die mittlere Zerebralarterie betreffen [25]; [211]. Durch eine Embolisierung der Gehirnarterien wird der Blutfluss ebenfalls nicht zu 100 % gesenkt und dadurch kann das Modell der *Core* und *Penumbra* Region als mögliche Genese des Schlaganfalls angenommen werden [238]. Die angewendete MCAO-Methode ist aufgrund der Analogie zum menschlichen Schlaganfall sehr gut geeignet um die ablaufenden Pathomechanismen zu studieren. Ein weiterer Vorteil der Fadenmethode ist die Möglichkeit, sowohl transiente als auch permanente Schlaganfälle zu induzieren. Die beschriebene Fadenmethode zeigt bei einer mittleren Okklusionsdauer von 60 min. neuronalen Zelltod, gliale Aktivierung und den Untergang der Integrität der Bluhirnschranke [239].

Nachteil der Fadenmethode ist die fehlende Untersuchung auf Lysetherapeutika, da durch den Faden eine mechanische Thromboisierung vollzogen wird und keine Embolisierung der Endstrombahn erfolgt [232]. Ein wesentlicher Punkt, der diese Methodik limitiert, ist die extrazerebrale Operation, da hierbei wesentliche Arterien und Nerven zerstört werden können. Im Falle der Zerstörung der Thyreoidalarterie und der Arteria communicans posterior hat dies direkten Einfluss auf die hypothalamische Temperaturkontrolle und die Schilddrüsenhormone [240].

Zusammenfassend kann die beschriebene Fadenmethode in Kombination mit der Laser-Doppler Flussmessung als geeignete Methode für die vorliegende Fragestellung betrachtet werden. Auch die sehr häufige Anwendung der Fadenmethode (43 % von 2852 Experimenten) in Fragestellungen von neuroprotektiven Ansätzen beim Schlaganfall rechtfertigt die Anwendung dieser Methode für die vorliegende Fragestellung [213]; [206].

#### **4.1.2 Die Metabolitenspiegel von Glukose, Laktat und BHB im Mikrodialysat**

Eine zweite Möglichkeit zur Überprüfung der Effektivität der fadenbasierten Methodik der MCAO, ist die Veränderung der Konzentrationen von Glukose und Laktat im Extrazellularraum. Die Konzentrationsänderungen sind durch die anaerobe Glykolyse begründet [32]. Der oxidative Abbau von Glukose kann nur über die Glykolyse stattfinden, wobei als Endprodukt Pyruvat gebildet wird. Falls kein ausreichender Sauerstoff vorhanden ist, wird Pyruvat zu Laktat reduziert. Die starke Laktatbildung bedingt ein Absinken des pH - Wertes auf bis zu 6,0. Die Reduktion von Pyruvat zu Laktat wird durch die Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert. Somit kann die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl – CoA durch die *Pyruvatdehydrogenase* und die anschließende Versoffwechslung über den Citratzyklus nicht stattfinden [36]; [81]; [113]; [134]; [158]. Aus diesem Grund steigen die Konzentrationen von Laktat im Extrazellularraum im Schlaganfallgeschehen an, wobei die vorhandene Glukose aufgrund der fehlenden Perfusion abnimmt (s. *Abb. 64*). Dieser Umstellung von aerober zu anaerober Stoffwechsellage, geht eine erhöhte Sauerstoffextraktion und ein erhöhter Phosphocreatinverbrauch der distal gelegenen Gewebe voraus [32]. Wenn diese frühen endogenen

Kompensationsmechanismen nicht ausreichen, wird die ATP-Resynthese nur noch unter anaeroben und somit ineffizienten Bedingungen vollzogen [36]; [81]. Die beschriebenen Kompensationsmechanismen können das drohende Energiedefizit für bis zu zwei Minuten aufrechterhalten, bis die anaerobe Glykolyse einsetzt [81]; [212]; [215] – [217]. Da die Zeitauflösung der GC - MS Analytik mit 15 min. (maximal unterste Grenze) nicht ausreichend niedrig ist, können die in **Abb. 65** gezeigten Konzentrationsänderungen diesen Mechanismus nicht abbilden. Die gezeigten Konzentrationsänderungen bilden in der gezeigten Form die anaerobe Glykolyse ab.

Die Änderungen der Konzentrationen von Glukose und BHB nehmen in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle ein. Die Konzentrationsänderungen verhalten sich entgegengesetzt zueinander, wenn das Primärsubstrat Glukose nicht ausreichend bereitgestellt werden kann, steigen umgekehrt die Konzentrationen des Alternativsubstrats BHB in den jeweiligen Kompartimenten an. Diese Beobachtung lässt sich auch im Mikrodialysat zeigen (s. **Abb. 65**). An dieser Stelle soll auf **Kap 1.9 Ketogenese** verwiesen werden, wo die grundlegende Physiologie und die Regulation der Ketogenese erläutert wird. Eine mögliche Erklärung für das beobachtete Phänomen kann die Arbeit von Zhang et al. 2013 geben [244]. Im Rahmen einer Meta - Analyse wurde in dieser Arbeit die Glukoseeinsparung des Gehirns in Abhängigkeit von einer milden Ketose (1 mM) bis hin zu einer starken Ketose (6 mM) im Plasma untersucht. Als Fazit berechnete Zhang et al. 2013 eine Abnahme des zerebralen Glukoseverbrauchs von 9 % für jeden Anstieg von Ketonkörpern im Plasma um 1 mM [244]. Das Mikrodialysat zeigt diese Tendenzen ebenfalls.

Neben den Änderungen der Konzentration von Glukose und Laktat lässt sich bereits an dieser Stelle eine erste Aussage zu den unterschiedlichen Diäten treffen. Unter einer Standarddiät mit Altromin liegen die basalen Glukosewerte im Vergleich mit den fettreichen Diäten bereits hier höher, was eine ausreichende Versorgung des Gehirns mit Glukose anzeigt. Die basalen Konzentrationen im Mikrodialysat von BHB unter einer fettreichen Diät weichen nicht voneinander ab, was auch konform mit den BHB Konzentrationen der Messungen von Prof. Borges und Kollegen einhergeht [245]. Wenn man die Bedingungen bei fehlender Sauerstoffzufuhr betrachtet, fällt auf, dass die Laktatwerte bei einer Altromin Diät tendenziell höher liegen als bei fettreich gefütterten Tieren. Diese Beobachtung ist damit erklärbar, dass unter basalen Bedingungen Glukose in einer „normalen“ Diät als Primärsubstrat dient und somit durch die Glykolyse zu Pyruvat verstoffwechselt wird. Da unter anaeroben Bedingungen die LDH Pyruvat zu Laktat abbaut, entsteht bei initial höheren Glukosekonzentrationen auch mehr Laktat, was deutlich in **Abb. 64** erkennbar ist.

### **4.1.3 Hepatische Ketogenese in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten und zerebraler Ischämie**

In **Kap 1.2.3** ist die Regulation sowie die Physiologie der hepatischen Ketogenese näher beschrieben worden. Die erhaltenen Daten aus dem Projekt „hepatische Ketogenese“ werden im weiteren Verlauf dieses Kapitels in diesen aktuellen Kontext der Literatur gesetzt.

Eine normale Labormaus benötigt pro Tag bei 24 °C 673 kJ , was umgerechnet 161 kcal/Tag entspricht [246]. Die Standarddiät von der Firma Altromin hat einen Anteil von 64 % Kohlenhydraten, mit einem Fettanteil von 12 % und 17 % Protein (s. **Kap. 2.1.1.3 Verwendete Diäten**). Die verwendete Soja bzw. Triheptanoindiät Diät hat einen Kohlenhydratanteil von 48 % sowie einen Fettanteil von 35 % und 17 % Protein (s. **Kap. 2.1.1.3 Verwendete Diäten**).

#### 4.1.3.1 Hypothesen für die Veränderungen der Metabolitenspiegel in unterschiedlichen Kompartimenten

Auf Basis der gemessenen Daten (s. **Kap. 3.1 Hepatische Ketogenese in Abhängigkeit unterschiedlicher Diäten**) kann man in allen Kompartimenten (Leber- und Hirnhomogenat, Plasma und Mikrodialysat) eine Erhöhung der BHB Spiegel bei gleichzeitiger Senkung der Glukose erkennen [247]. Aufgrund des geringeren Kohlenhydratanteil und einem höheren Fettanteil in den unterschiedlichen Diäten, wird das Glykogen in der Leber schneller aufgebraucht und die peripheren Zellen gerade noch ausreichend mit Kohlenhydraten versorgt. Es ist mit einer niedrigeren Maximalkonzentration (weniger Kohlenhydratzufuhr) von Insulin und einem schnelleren Abflachen der Konzentrationen von Insulin zu rechnen [248]. Gemeinsamkeit eines ketogenen Stoffwechselstatus ist der Mangel an Insulin bzw. die Wirkung von Insulin. In den hier gezeigten Messungen resultiert dieser Mangel / Wirkung mit hoher Wahrscheinlichkeit aus einer verminderten Kohlenhydratzufuhr [227]; [228]. Der Gesamtorganismus Mensch und auch die Maus ist ohne Glukose nicht überlebensfähig [250]. Bei einem auftretenden Insulindefizit regelt der Körper mit einer erhöhten Freisetzung von Glukagon aus dem Pankreas einer Hypoglykämie entgegen [227]; [230]. Dieser Anstieg an Glukagon entspricht nach McGarry et al. 1980 einer Erhöhung des Glukagon / Insulin Verhältnisses [248]. Die freie Konzentration von Fettsäuren im Plasma steigt an und die Leber wird mit Fettsäuren, die für die Ketogenese gebraucht werden, versorgt. Durch diese Effekte können trotz Glukosedefizit bzw. einer Verarmung an Glykogen in der Leber, extrahepatische Gewebe mit Acetyl - CoA versorgt werden und so die Energiegewinnung in Form von ATP durch die oxidative Phosphorylierung aufrechterhalten.

Die basalen Konzentrationen von Glukose und BHB unterscheiden sich nicht signifikant (s. **Abb. 71**). Zu diesem Zeitpunkt (ohne Intervention) kann die Verarmung an Glukose in peripheren Zellen noch ausreichend durch die Glukoneogenese kompensiert werden. Im Projekt „hepatische Ketogenese“ wurden Diäten gefüttert, die einer fettreichen Diät (nicht ketogen) entsprechen (s. **Tab. 7**). Die Tatsache, dass die basalen Konzentrationen der Metabolite Glukose und BHB bei fettreich gefütterten Tieren sich nicht voneinander unterscheiden, stehen im Einklang mit anderen Arbeitsgruppen, die ebenfalls gleiche Diäten wie die hier Vorliegende verwendet haben [191].

Die massive Erhöhung der Ketonkörper bei Induktion eines Schlaganfalls kann folgendermaßen erklärbar werden. Der induzierte Schlaganfall bedingt eine Stressreaktion, bei der die Korticosteron -konzentrationen massiv ansteigen (s. **Abb. 88**). Auch andere an der Stressreaktion beteiligte Neurotransmitter bzw. Hormone wie Adrenalin und Noradrenalin steigen weit über ihr Ausgangsniveau an [252]. Adrenalin selbst steigert in Adipozyten die Lipolyse indem es die Hormon-sensitive-Lipase (HSL) aktiviert und dadurch die Lipolyse gesteigert wird [253]. Alle beteiligten Mechanismen bedingen eine Erhöhung der freien Glukose im Plasma, was wiederum die Glykogenspeicher bei einer fettreich gefütterten Maus schneller aufbraucht. Kompensatorisch kommt es zu einer Erhöhung des Glukagon Insulin Verhältnisses, was wiederum die Ketogenese in der Leber ansteigen lässt. Mit diesem Mechanismus ist eine globale Erhöhung in allen beschriebenen Kompartimenten erklärbar.

Die ausgeführten Erläuterungen zum globalen Anstieg des Ketonkörpers BHB zeigen keine Erklärungen, wie die Zelle, die an Glukose verarmt, auf die sinkenden Glukosewerte reagiert bzw. die durch Ketogenese gewonnen Ketonkörper verstoffwechseln kann. Hierfür wurde in **Kap. 1.5.1**

**Regulation der Pyruvat-Dehydrogenase** die Regulation der *Pyruvatdehydrogenase* einleitend erklärt. Wenn die verfügbare Glukose in den Hirnzellen sinkt, und die verfügbare Menge an BHB steigt, muss die Zelle in der Lage sein sich an die veränderten Substratbedingungen anzupassen. Bei diesem Wechsel spielt die *Pyruvatdehydrogenase* eine entscheidende Rolle. Durch den Lynen-Zyklus wird BHB bzw. Acetoacetat in extrahepatischen Geweben zu Acetyl - CoA abgebaut [254]. Durch einen Anstieg an Acetyl - CoA wird wiederum die PDH Aktivität durch drei Mechanismen verringert [36]; [83]. Diese drei Mechanismen werden an dieser Stelle erläutert. Der Anstieg an Acetyl - CoA bedingt eine Bindung von Acetyl - CoA an die Transacetylase Komponente ( $E_2$ ) der PDH. Die Bindung erfolgt zwar, allerdings wird Acetyl - CoA nicht umgesetzt, sondern blockiert die  $E_2$  Einheit. Der zweite inhibitorische Effekt kommt durch eine Erhöhung der NADH +  $H^+$  Konzentrationen zustande. Durch das Einschleusen von Acetyl - CoA in den Citratzyklus steigen die Konzentrationen an NADH +  $H^+$  so stark an, dass die *Dihydrolipoyldehydrogenase* ( $E_3$ ) inhibiert wird. Biochemisch wird hierbei die Regenerierung der Sulfhydrylgruppe zum Disulfid unterbunden, was einen anschließenden Zyklus der PDH verhindert. Als dritten und letzten hemmenden Mechanismus auf die PDH kann die Inhibierung durch ATP, Acetyl - CoA und NADH +  $H^+$  angesehen werden. Im Detail ist hierfür die *PDH-Phosphatase* verantwortlich, die bei erhöhter Aktivität durch Dephosphorylierung die PDH Aktivität steigert und so als Gegenspieler der *PDH-Kinase* angesehen werden kann [255]. Durch fehlende Dephosphorylierung sinkt die PDH Aktivität. Alle beschriebenen Mechanismen senken die PDH-Aktivität auf ein Minimum und erlauben der Zelle auf den vorhandenen Wechsel des Substrates Glukose zu BHB zu reagieren. Die PDH-Aktivität wird auf ein Minimum gedrosselt und hilft somit die noch vorhandene bzw. durch Glukoneogenese neu generierte Glukose zu sparen. Die ATP Spiegel und alle beteiligten Reaktion im Citratzyklus werden durch Verstoffwechslung der Ketonkörper erhalten.

Zusammenfassend **steigen die BHB Konzentrationen** in allen gemessenen Kompartimenten bei Induktion eines Schlaganfalls **stark an**. Vermutlich spielt das Verhältnis von **Insulin, Glukagon, Korticosteron, Noradrenalin und Adrenalin** bei der hepatischen Ketogenese eine entscheidende Rolle bei der Versorgung des Organismus mit Energiesubstraten. Die PDH stellt ein zentrales Enzym bei der **intrazellulären Regulation des Energiehaushaltes** der Nervenzellen dar.

#### 4.1.3.2 Hypothese über die Distribution von BHB zwischen den Kompartimenten

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Distribution von Ketonkörpern in Abhängigkeit der vorhandenen Transporter im Organismus. Wenn Neuronen die durch das Gehirn aufgenommenen Ketonkörper nicht aufnehmen können, können sie auch nicht die vorhandene Energie in den Ketonkörpern nutzen, um ihre ATP Spiegel aufrecht zu erhalten. Die wichtigste Familie an Transportern, die Monocarboxylate und Hydroxysäuren über Membranen transportieren können, stellen die Monocarboxylattransporter Typ 1 – 5 dar [256]. Der Monocarboxylattransporter Typ 1 ist allgegenwärtig in Geweben vorhanden und entspricht einem protonenabhängigen Cotransporter für Monocarboxylate und Hydroxysäuren [237]; [238]. Dieser Transporter besitzt eine Michaelis - Menten Konstante für L - 3 - Hydroxybutyrat von  $12,7 \pm 1,4$  mM und für D - 3 - Hydroxybutyrat von  $24,7 \pm 2,2$  mM [259]. Durch die beiden Werte kann die höhere Konzentration in der Leber gegenüber dem Plasma erklärt werden (s. **Abb. 67; Abb. 68**). In der Literatur findet sich keine Quelle, die eine Induktion der Expression von MCT – 1 in der Leber beschreibt. Falls es zu einer Induktion der Expression kommt, käme es zu einem schnelleren Angleich der Konzentrationen zwischen Lebergewebe und Plasma. Das Gehirn kann unter normoglykämischen Bedingungen normalerweise nicht Ketonkörper in mM Konzentrationen transportieren. Die Arbeiten unter der Leitung von M.

Puchowicz, Drewes und Vabucci weisen darauf hin, dass die Dichte von MCT-1 an der Bluthirnschranke proportional mit der vorherrschenden Plasmakonzentration an Ketonkörpern und der vorherrschenden Dauer der Ketose korreliert [244], [260], [261]. Die im vorherigen Satz erläuterten Erkenntnisse wurden alle an Ratten vollzogen, die eine hohe Vergleichbarkeit zu Mäusen aufweisen. Die hohe Michaelis - Menten Konstante des MCT-1 für BHB wird also durch eine vermehrte Expression von MCT - 1 Transportern an der Bluthirnschranke kompensiert und bedingt so einen Konzentrationsausgleich in den beschriebenen Kompartimenten. Bezogen auf die hier vorgestellten Daten, kann man die die Aussage treffen, dass die Werte im Plasma und im Hirnhomogenat sich gleichen, wohingegen die Werte zwischen den Leberhomogenaten und dem Plasma sich um den Faktor 2 unterscheiden (s. **Abb. 67, Abb. 68, Abb. 71**). Der MCT – 1 wurde hier ausführlicher besprochen, da dieser eine wesentliche Beteiligung an der Distribution der in dieser Arbeit behandelten Kompartimente übernimmt. Die Expressionsmuster der MCT 2 – 4 an Neuronen, Glia und Astrozyten sind in diesem Kontext nicht ausreichend mit Daten belegbar. Aus diesem Grund soll für die intrazerebrale Distribution von Ketonkörpern bzw. Laktat durch die unterschiedlichen MCT, auf **Abb. 12** verwiesen werden.

Die gemessenen BHB Werte im Mikrodialysat lassen ebenfalls eine Ketose in der Tierfraktion, die eine 90 min. Ischämie erfahren hat, erkennen (s. **Abb. 65**). Unter basalen Bedingungen jedoch ist kein statistischer Unterschied bei den drei unterschiedlichen Diäten zu verzeichnen. Ausgehend von diesen beiden Beobachtungen kann der Extrazellularraum als reiner Verteilungsraum angesehen werden, in dem BHB aus dem Plasma äquilibriert, aber genauso schnell auch von den Zellen aufgenommen werden kann.

Die **Distribution des Ketonkörpers BHB** innerhalb der Kompartimente **entspricht** den bisher **publizierten Arbeiten** über MCT - 1 / 4. Es findet in Abhängigkeit der vorherrschenden Konzentration eine **Äquilibrierung zwischen** den unterschiedlichen **Geweben** statt.

#### **4.1.3.3 Hypothesen für die gemessenen Änderungen der Glukosekonzentrationen in unterschiedlichen Kompartimenten**

Eine weitere wichtige Tatsache ist, dass das Gehirn bis zu 70 % an Glukose einsparen kann, aber ohne Glukose ist der Gesamtorganismus nicht überlebensfähig und bei prolongierter Hypoglykämie (< 15 mg/dl) resultiert ein neuronaler Zelltod [244]; [250]; [262]. Betrachtet man die Glukosewerte in der Leber, erkennt man die deutliche Verarmung der Leber an Glukose bzw. Glykogen (s. **Abb. 69**). Die Probenaufbereitung von Leberhomogenaten findet in unserem Protokoll bei einem pH - Wert von  $9,50 \pm 0,01$  statt, was definitiv Hydrolysereaktionen begünstigt. Dieser Punkt kann die Konzentrationen im mittleren mM Bereich erklären. In der Literatur gibt es keine Referenzwerte für absolute Glukosekonzentration in der Leber. Da die Probenvorbereitung bei allen Mäusen auch zeitlich vergleichbar vollzogen worden ist, sind die Werte trotz allem miteinander vergleichbar. Der Gesamtglukoseanteil in der Leber ist bei Fütterung einer Standarddiät um den Faktor 2 höher im Vergleich zu einer fettreichen Soja Diät (s. **Abb. 69**). Nach Induktion eines Schlaganfalls steigt bei Fütterung einer Altromin Diät die Gesamtglukose auf > 25 mM an. Ebenfalls steigen die Adrenalin und Noradrenalin Konzentrationen im Plasma massiv an [252], [263]. Die Folge ist eine Mobilisierung des Leberglykogens durch Adrenalin [264]. Adrenalin steigert in den  $\alpha$  - Zellen des Pankreas die Glukagonfreisetzung [265]. Beide Hormone zusammen bedingen eine Mobilisierung von Glykogen sowie eine Erhöhung der Plasmaglukose [252], [263], [265]. Da durch die fettreiche Diät der

Organismus der Maus ein intermittierendes Fasten erfährt, scheint die Konsequenz eine verminderte Konzentration an Glykogen und Glukose in der Leber zu sein. Die Daten im Plasmakompartiment (s. **Abb. 69**) sind in den basalen Fraktionen sehr ähnlich. In Bezug auf die Höhe der Glukosewerte im Plasma gibt es sehr unterschiedliche absolute Messwerte. Der dokumentierte Bereich in der Literatur reicht von 5 mM bis 11 mM unter basalen Bedingungen bei der Maus bzw. der Ratte [244]; [266]; [267]. Die Umrechnung der gebräuchlicheren Dimension mg / dl erhält man durch eine Umrechnung mit dem Faktor 18. Das heißt bei einem gemittelten Wert von 10 mM (s. **Abb. 69**) kann man eine Glukosekonzentration von 180 mg / dl postulieren, was definitiv einem erhöhten (prädiabetischen) Blutglukosespiegel entspricht [268], [269]. Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich terminale Versuche vorgenommen worden sind, die mit erhöhter Stressreaktion einhergehen (hohe Adrenalin- und Korticosteronspiegel), erscheinen die gemessenen Blutglukosekonzentrationen plausibel. Auch hier soll darauf hingewiesen werden, dass die Vergleichbarkeit der Tierversuche in allen Gruppen gewährleistet war.

Im Hirnhomogenat unterscheiden sich die Glukosekonzentrationen signifikant voneinander, wenn man die Altromin mit den Soja Öl gefütterten Tieren vergleicht (s. **Abb. 70**). Die möglichen biochemischen Hintergründe wurden bereits mit der *Pyruvatdehydrogenase* sowie den steigenden Glukagonspiegeln im vorherigen Absatz erklärt. Ein wesentlicher Punkt ist die Beobachtung von Kante et al. 1990, dass die *BHB - Dehydrogenase* unter einer fettreichen Diät über 10 Tage ebenfalls ansteigt und so eine „ketogene Präkonditionierung“ des Organismus stattgefunden haben kann [270]. Bei der Dekapitation der Tiere muss an dieser Stelle daraufhin gewiesen werden, dass keine Perfusion des Gehirns vorgenommen wurde und dadurch auch die blutversorgenden Gefäße der Probenvorbereitung unterzogen wurden. Dadurch entsprechen die Glukosekonzentrationen im Hirnhomogenat nicht den tatsächlichen Konzentrationen von perfundierten Hirnen. Die Daten suggerieren eine ketogene Stoffwechsellage im Gehirn der Mäuse.

Die **Glukosekonzentrationen** zeigen im Leber- und Hirnhomogenat ein **Absinken** der Gesamtspiegel bei Fütterung mit einer **fettreichen Soja Diät**. Die **Plasmakonzentrationen von Glukose** bleiben unter basalen Bedingungen sehr **konstant**.

#### **4.1.4 Citratspiegel in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten und zerebraler Ischämie**

In diesem Kapitel werden die Citratspiegel in den biochemischen Kontext der Fettsäure und Glukosephysiologie gebracht, sowie die Veränderungen der gemessenen Daten diskutiert. Citrat als Molekül im Citratzyklus soll an dieser Stelle nur nebensächlich behandelt werden. Vielmehr wird Citrat in den gemessenen Kompartimenten Leber, Plasma und Hirnhomogenat als Regulationsmolekül für die *Acetyl - CoA Carboxylase* diskutiert. Citrat fungiert in der Fettsäuresynthese als Transporter für Acetyl - CoA aus der mitochondrialen Matrix ins Cytosol [36]; [83]. Sowohl die Verstoffwechslung von Glukose als auch von Ketonkörpern lässt Acetyl - CoA in der mitochondrialen Matrix entstehen. Wenn die Konzentrationen von Acetyl - CoA und ATP in der Zelle steigen, signalisieren diese Konzentrationsänderungen dem Organismus, dass er genügend Substrate für die Fettsäuresynthese bereitgestellt hat [271], [272]. Die *AMP-abhängige Proteinkinase* (AMPK) phosphoryliert die *Acetyl - CoA Carboxylase*, wodurch sie in ihre inaktive Form übergeht und die Fettsäuresynthese blockt [271]. Die Fettsäuresynthese findet bekanntlich im Cytosol statt, was Citrat als entscheidendes Transportmolekül ins Spiel bringt. Citrat agiert in diesem Kontext als

Transportmolekül für Acetyl - CoA zwischen der mitochondrialen Matrix und dem Cytosol, indem die Acetyl - CoA Gruppe auf Oxalacetat übertragen wird [36]. Das gebildete Citrat transloziert über den *Acyl-Carnitin-Carrier* ins Cytoplasma und wird dort von der *ATP-Citrat-Lyase* wieder zu Oxalacetat und Acetyl - CoA hydrolysiert [83].

Wenn man diesen biochemischen Sachverhalt auf die gemessenen Daten bezieht, fällt sofort auf, dass sich unter einer fettreichen Diät bereits in der basalen Fraktion (Schein - OP) die Citratkonzentrationen statistisch signifikant voneinander unterscheiden ( $p < 0,01$ ) (s. **Abb. 73; Abb. 74**). Die Citrat Spiegel korrelieren mit der vorhandenen Konzentration an Acetyl - CoA und ATP [271]–[273]. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung sind die unter einer fettreichen Diät erhöhten Mengen an Ketonkörpern, die pro Molekül BHB zwei Moleküle Acetyl - CoA generieren und so das gebildete Citrat in den Citratzyklus einschleusen können. Die generierte Menge an Citrat unter einer normalen Kohlenhydratdiät scheint niedriger zu sein als die generierte Menge an Acetyl - CoA bei einem ketotischen Stoffwechsel. Interessant an dieser Stelle wären vor allem die Mengen an Palmitoyl - CoA, da dieses Endprodukt einen hemmenden Effekt auf die *Acetyl - CoA Carboxylase* ausübt und so dem Körper das Signal gibt, ausreichend Fettsäuren generiert zu haben [253].

Unter einer **fettreichen Diät steigen** die Konzentrationen bereits in den **basalen Fraktionen** von **Citrat** in allen Kompartimenten **an**. Hinweise aus der Literatur weisen auf eine **Erhöhung durch BHB** hin.

#### 4.1.5 BHB und Glukosespiegel bei Reperfusion

In diesem Kapitel werden die Konzentrationsänderungen von BHB und Glukose in den Leber- sowie in den Gehirnhomogenaten in der Reperfraktionsfraktion näher betrachtet und diskutiert. Grundsätzlich ist in den Leberhomogenaten ein gegenläufiges Verhalten von Glukose und BHB in den beiden unterschiedlichen Diäten (Altromin, fettreiche Soja Öl Diät) beobachtbar. Innerhalb der *Stroke - fraktion* sinken die BHB Spiegel bei Reperfusion ab, wobei die Glukose Spiegel nach 90 min. Okklusion steigen (s. **Abb. 71**).

Bei Induktion eines Schlaganfalls steigen in der Altromin Gruppe die BHB Konzentrationen auf 1 mM an. Bei einer fettreichen Diät auf Basis von Soja Öl erreichen die Konzentrationen bis zu 4 mM. In der Altromin Gruppe ist eine leichte Erhöhung der BHB Konzentrationen im Vergleich zu den basalen Spiegeln erkennbar (s. **Abb. 67**).

##### 4.1.5.1 Hypothesen für die Konzentrationsänderungen von BHB nach Reperfusion

Eine Erklärung für diesen Befund findet man in der Stoffwechselaktivität zwischen Mäusen und Menschen. Mäuse haben pro Gramm Gewebe bezogen auf das Körpergewicht (gewebebezogener Metabolismus) einen ca. 7 erhöhten Stoffwechsel [274]. Die Körperoberfläche im Verhältnis zur vorhandenen Körpermasse ist um ein Vielfaches höher ( $2,16 \times 10^{-5} \text{ m}^2 / \text{g} = \text{Mensch}$ ;  $2,18 \times 10^{-4} \text{ m}^2 / \text{g} = \text{Maus}$ ) [275]. Basierend auf diesen Ausführungen kühlt die Maus pro Zeiteinheit schneller aus im Vergleich zu einem Menschen. Die Operation dauert 90 min., in der die Maus keine Zufuhr an Kalorien bekommt. Auf Basis des schnelleren Stoffwechsels pro Gramm Gewebe und der erhöhten Oberfläche, verbrennt die Maus sehr viel schneller ihre Glykogenvorräte. Wenn die Glykogenvorräte zuneige gehen und somit der Glukagonspiegel weiter steigen müsste, haben wir biochemisch betrachtet eine Induktion der Ketogenese und schlussfolgernd einen erhöhten Gesamt



Ketonkörpergehalt in der Leber. Der Unterschied in den beiden Diätgruppen müsste in dem Gesamtglykogengehalt der Leber begründet liegen. Ein weiteres Argument für diese Hypothese liegt in den wesentlich niedrigeren Glukosekonzentrationen in der Leber bei fettreich gefütterten Tieren im Vergleich zu Altromin gefütterten Tieren (s. **Abb. 71**).

Die im vorherigen Abschnitt diskutierten Veränderungen der BHB und Glukosespiegel in der Leber finden sich so auch in den Hirnhomogenaten wieder und reflektieren so die Distribution der Ketonkörper durch MCT – 1 ( $H^+$  / Monocarboxylat<sup>-</sup> im Symport) im Organismus (s. **Kap. 4.1.3 Hepatische Ketogenese in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten**).

Wenn man die betrachteten Argumente nun auf die Reperfraktionsfraktionen anwendet, sind die Veränderungen auch hier erklärbar. Der Organismus hat bei einer fettreich gefütterten Diät die volle Umstellung zur Ketose bereits erreicht und kann somit die vorhandenen Ketonkörper **effektiver verstoffwechseln**. Die Leber von fettreich gefütterten Tieren kann **über MCT – 1 BHB** ins Plasma freisetzen und die extrahepatischen Gewebe auf dem in **Kap. 4.1.3** beschriebenen Weg mit Ketonkörpern versorgen. Die **Konzentrationen von BHB** in der Leber **sinken in beiden Gruppen** (s. **Abb. 71**).

#### **4.1.5.2 Hypothesen für die Konzentrationsänderungen von Glukose nach Reperfusion**

Die Glukosekonzentrationen in der Leber zeigen entgegengesetztes Verhalten zu den jeweiligen BHB Konzentrationen. Die Leber selbst verarmt während der 90 min. Schlaganfalldauer an Glykogen / Glukose. Bei Reperfusion der zerebralen Ischämie kommt es zu einem massiven Anstieg der beiden Energieträger im Leberhomogenat, was mit einem erhöhten Korticonsteronspiegel, Adrenalin und Noradrenalinspiegel erklärbar wird [265]; [264]. Der Hungerstoffwechsel wird weiter vorangetrieben, da die Maus während der gesamten 90 min. Schlaganfalldauer nicht isst und trinkt. In Bezug auf die Veränderungen der Hormone im Organismus ist davon auszugehen, dass die Maus initial ausreichend Glykogen in der Leber besitzt, dieser Vorrat aber durch zweimalige Narkose und kompletter Nahrungskarenz durch die massive Stressreaktion des Körpers aufgebraucht wird. Die Spiegel von Insulin und Glukagon sollten initial physiologische Werte annehmen, nach der ersten Narkose steigt der Spiegel an Korticoosteron, Noradrenalin und Adrenalin stark an, was auch einen erhöhten Glukagonspiegel zur Folge hat [263]; [252]. Durch die steigenden Glukagonspiegel wird verstärkt Glukose aus Glykogen mobilisiert. Bei einer kurzen Rehabilitationsdauer zwischen erster und zweiter Operation können die Glykogenspeicher im Rahmen des Glykogenaufbaus wieder regeneriert werden (niedrigerer Verbrauch an Glukose) [263]. Im Anschluß erfolgt die erneute Narkose, bei der der Faden aus der MCA entfernt wird. Die Glykogenreserven werden im Rahmen des zweiten Eingriffs wieder mobilisiert und bedingen den reaktiven Anstieg der Glukose in der Leber. An dieser Stelle soll auf die fettreich gefütterten Tiere näher eingegangen werden. Durch die kohlenhydratarme Ernährung sind die Glykogenspeicher sehr viel häufiger erschöpft und bedingen bereits bei der ersten Phase der Narkose eine notwendige Umstellung hin zu einem ketogenen / hungernden Stoffwechsel.

Im vorherigen Abschnitt wurde die Leberphysiologie in Abhängigkeit der unterschiedlichen Diäten und der zerebralen Ischämie erklärt. Die Leber versucht auf die wechselnden Anforderungen den Stoffwechsel so konstant zu halten, dass die normale Zellphysiologie aufrechterhalten werden kann.

Betrachtet man sich nun die mit der Zeit zunehmende neuronale Apoptose in der linken Hemisphäre, erkennt man deutliche Unterschiede im Vergleich mit der Leberphysiologie (s. **Abb. 72**). Die von der Hypoxie betroffene linke Hirnhemisphäre zeigt bei fettreich gefütterten Tieren eine deutliche Einsparung von Glukose (bis zu 70 %) auf Basis der von La Manna und Puchowicz erbrachten Daten (s. **Abb. 72**) [244]; [261]; [276]. Der Unterschied liegt in der verabreichten Diät. Während die genannten Forschungsgruppen rein ketogene Diäten bei Ratten verwendet haben, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine fettreiche Diät verwendet (s. **Kap. 2.1.1.3 Verwendete Diäten**). Die Plasmaspiegel bei rein ketogenen Tieren liegen im Bereich von 3 – 5 mM bei Ratten, während fettreich gefütterte Mäuse Spiegel im Bereich von 1 – 1,5 mM erreichen. Das Gehirn eines fettreich gefütterten Tieres verhält sich in ähnlicher Weise wie ein Tier, welches kohlenhydratfrei ernährt wurde. Die Glukosewerte bei fettreich gefütterten Tieren sind in den basalen Fraktionen weit unter den Konzentrationen, die bei normaler Diät erreicht werden (s. **Abb. 72**). Die Konzentrationen der beiden wichtigen Energieträger Glukose und BHB verändern sich bei Altromin - gefütterten Tieren nur minimal, wobei die Glukosespiegel bei Reperfusion leicht sinken und die BHB Spiegel leicht ansteigen. Beide Veränderungen sind statistisch nicht signifikant. Auf der Seite der fettreich gefütterten Tiere erkennt man einen klaren und scharfen Wechsel in der Reperfraktion hin zu einer ketogenen Stoffwechsellage. Die vorhandenen Enzyme für die Umwandlung von BHB in Acetyl - CoA wie zum Beispiel die 3 – *Ketothiolase* scheinen an dieser Stelle bereits voll translatiert und funktionsbereit zu sein, da sonst das massive Absinken der BHB Spiegel nicht erklärbar ist [270]. Ein weiterer Hinweis für die ketogene Stoffwechsellage ist die Beobachtung, dass die Glukose als primäres Energiesubstrat nach Reperfusion in der betroffenen linken Hemisphäre stark ansteigt (s. **Abb. 72**).

Ein essentieller Punkt der an dieser Stelle Erwähnung finden muss, betrifft die sehr niedrige Zeitauflösung der etablierten GC - MS Analytik sowie die Notwendigkeit der terminalen Versuche. Dadurch sind nur sehr starke Veränderungen detektierbar, die im Rahmen von 15 – 90 min. stattfinden. Wenn man sich die Veränderungen auf Neurotransmitterebene verinnerlicht, wird die große Schwäche der verwendeten Analytik ersichtlich. Die ablaufenden neuronalen Prozesse verändern sich im Sekundenbereich. Diese Veränderungen sind mit der GC - MS Analytik nur bedingt detektierbar.

Abschließend wird an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass in Folgeprojekten unbedingt die Hormonspiegel von Glukagon, Insulin, Noradrenalin und Adrenalin zumindest im Plasma zu bestimmen sind, da die Ausführungen in den oberen Abschnitten an der geltenden Literatur angelehnt sind, aber nicht selbst im experimentellen *Design* berücksichtigt wurden. Die absoluten Spiegel der genannten Hormone haben bei der mechanistischen Aufklärung der biochemisch ablaufenden Prozesse wesentlichen Anteil.

Die **Konzentrationen von BHB und Glukose verhalten sich in der Leber und im Gehirn umgekehrt proportional** zueinander. Wenn der Faden aus der mittleren Zerebralarterie entfernt wird, scheint ein **Verbrauch von BHB als Energiesubstrat** wahrscheinlich. Bei fettreicher Diät zeigt sich **im Gehirn** von Mäusen bereits unter basalen Bedingungen eine **Einsparung von Glukose** im Hirnhomogenat. Die **Glukosekonzentrationen im Plasma** bleiben **konstant**.

#### 4.1.6 Effekte einer Propranololgabe auf die Energieträger Glukose und BHB

Im Folgenden werden die Effekte einer Gabe eines unselektiven  $\beta$  - Blockers (Propranolol, 2 mg/kg KG) auf die Konzentrationen der beiden Energieträger Glukose und BHB diskutiert. Dabei werden die Kompartimente Leber- sowie Hirnhomogenate und Plasmaproben besprochen. Die Gabe von Propranolol erfolgte unmittelbar im Anschluß an die Okklusion der mittleren Zerebralarterie. Die Dekapitation erfolgte nach 90 min. Gesamtdauer.

Als problematisch bei der Auswertung der Daten hat sich die Dauer des Schlaganfalles über 90 min. und die Gabe eines unselektiven  $\beta$  - Blockers in Kombination mit einer normalen bzw. fettreichen Diät. Die gemessenen Werte sind bei drei Interventionen / Ereignissen nicht mehr klar voneinander zu trennen. Die erhaltenen Werte können nur schwierig einer Intervention / eines Ereignisses zugeordnet werden. Im Folgenden wird auf die Gabe des  $\beta$  - Blockers Propranolol und die Diäteneffekte näher eingegangen.

Bei der Recherche der biochemischen Zusammenhänge nach Propranololgabe haben sich zwei Ansätze als plausibel gezeigt, welche im Folgenden erläutert werden. Der erste Ansatz betrifft den Wirkungsmechanismus von Propranolol auf den Stoffwechsel, wobei der zweite Ansatz die inhibitorische Wirkungsweise von Ketonkörpern auf den Sympathikustonus behandelt. In einem etablierten Rattenmodell hat Rizza et al. 1980 die Gabe von Epinephrin in Kombination mit Propranolol bzw. Phentolamin untersucht [277]. Wenn die Ratten eine 180 min. lange Dauerinfusion bestehend aus Epinephrin erhielten, die mit einer anschließenden Gabe von Propranolol (4 mg/kg KG) kombiniert wurde, stiegen die Insulinspiegel stark an, wobei die Glukagonspiegel unverändert blieben. Die Glukosekonzentrationen im Plasma sanken nach der Gabe von Propranolol, wahrscheinlich durch die Erhöhung des Insulinspiegels. Einen Insulinanstieg fand auch Krentz et al. 1990 bei einer Phäochromozytompantin, die sowohl Propranolol als auch Phenoxybenzamin erhielt [278]. Interessanterweise sank die Konzentration des Ketonkörpers BHB im Plasma nach der Gabe der beiden Arzneimittel ab. Es kann abschließend leider keine Aussage getroffen werden, ob die  $\alpha$ - oder  $\beta$  - Blockade hierfür verantwortlich ist. Diese beiden Erkenntnisse gehen konform mit der Senkung der beiden wichtigen Energieträger im Plasma sowie der Leber (s. **Abb. 75**, **Abb. 76**). Eine Ausnahme bildet hier die Erhöhung der Glukosekonzentration im Leberhomogenat unter einer fettreichen Soja-Diät. Wenn die Glukagonspiegel konstant bleiben und die Insulinspiegel steigen, steigt automatisch der Glykogengehalt in der Leber, was eine Erhöhung plausibel erscheinen lässt [263]. Die Probenaufbereitung findet bei  $\text{pH } 9,50 \pm 0,01$  statt. Wie bereits angemerkt ist eine Differenzierung zwischen Glukose und Glykogen unmöglich. Dies betrifft auch die Hirnhomogenate. Da das Gehirn nur geringe Glykogenspeicher besitzt, ist auch hier eine Differenzierung nicht möglich [279]. Allerdings zeigt sich ein vergleichbares Muster wie bei den Leberhomogenaten (**Abb. 75**, **Abb. 77**). Auch hier kann die Glukagon / Insulinhypothese eine mögliche Erklärung für die Konzentrationsänderungen sein.

Der zweite Ansatz betrifft die inhibitorische Wirkungsweise von BHB im Bereich des *Locus coeruleus*, der wesentliche Efferenzen des sympathischen Nervensystems enthält. Die Gruppe von Kimura et al. 2011 hat herausgefunden, dass ungeradzahlige kurzkettige Fettsäuren wie Propionat stimulierend auf die postganglionären Neurone einwirken und so den Sympathikustonus erhöhen können [280]. Interessanterweise bedingen kurzkettige Hydroxycarbonsäuren wie BHB eine inhibitorische Wirkung auf den Sympathikustonus. Bei einer fettreichen Soja Diät kommt es in unseren Versuchen zu einer

Ketose, die im Bereich von 3 – 4 mM liegt. Diese Konzentrationen reichen aus um das postulierte Rezeptorsystem GPR 41 (FFA 3) zu inhibieren [281]. Im Falle des BHB's würde der beschriebene Mechanismus die postganglionäre Freisetzung von Noradrenalin unterdrücken. Zusätzlich kommt es durch die Gabe von Propranolol zu einer kompetitiven Hemmung an  $\beta_1$  und  $\beta_2$ -Rezeptoren, was zusammengenommen eine permissive Hemmung von prä- als auch postganglionären Neuronen des Sympathikus zur Folge hat. Wenn man die Effekte aus **Tab. 32** betrachtet, würde die Hemmung durch BHB an sympathischen Ganglien und die Wirkungen von Propranolol sowohl eine Senkung der Glukose als auch der Ketonkörper im Plasma erklären.

| Organsystem   | Sympathikuswirkung | Adrenerger Rezeptor |
|---------------|--------------------|---------------------|
| Leber         | Glykogenolyse ↑    | $\beta_2$           |
|               | Gluconeogenese ↑   | $\beta_2$           |
| Adipozyten    | Lipolyse ↑         | $\beta_2$           |
| Skelettmuskel | Glykogenolyse ↑    | $\beta_2$           |

**Tab. 32** *Sympathikuswirkungen an den wichtigen Stoffwechselorganen mit ihren jeweiligen adrenergen Rezeptoren [265]; [281].*

Die Antwort auf die Frage der Erhöhung der Glukosekonzentration bei einer fettreichen Soja Diät im Leber- als auch im Hirnhomogenat bleiben offen.

Wie einleitend erklärt, sind die unterschiedlichen Modalitäten wie Schlaganfall, Diät, Propranololgabe in einem Studienansatz zu ehrgeizig gewählt, da die Effekte der einzelnen Interventionen nicht mehr eindeutig auf eine Modalität zurückzuführen sind. Zumindest kann mit der beschriebenen Ausführung ein Grundverständnis über die ablaufenden biochemischen Prozesse vermittelt werden.

#### 4.1.7 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit ist die erste Untersuchung von fettreichen Diäten im Vergleich zu Standarddiäten, die sich mit der Kinetik in vier unterschiedlichen Kompartimenten bei Induktion eines Schlaganfalls beschäftigt. Zur Induktion des Schlaganfalls wurde die Fadenmethode nach Longa et al. 1989 verwendet [201]. Diese Methode wurde unabhängig von anderen Arbeitsgruppen als geeignet validiert. Der Nachweis für die Eignung der Methode erfolgt auf der einen Seite über die Inprozesskontrolle mithilfe der *Laser* - Flussmessung und auf der anderen Seite über die Veränderungen der Metabolitenkonzentration von Glukose (Absinken auf 10 % des Ausgangswertes) und Laktat (Erhöhung in Abhängigkeit mit der Zeit) im Mikrodialysat.

Bei fettreich gefütterten Tieren lässt sich eine „ketogene Präkonditionierung“ aufgrund der Verarmung von Glykogenreserven in der Leber beobachten. Aufgrund der hepatischen und peripheren Präkonditionierung kann im Falle eines Schlaganfalles das alternative Substrat BHB schneller in essentielle Stoffwechselwege eingespeist werden. Ein bioenergetisches Defizit kann im Rahmen des Schlaganfalles (Glykogenverarmung in der Leber) durch eine fettreiche Diät kompensiert werden. Die induzierbaren Enzyme wie z. Bsp. die BHB Dehydrogenase (BDH) sind zu diesem Zeitpunkt bereits voll exprimiert und translatiert worden, sodass keine zeitliche Lücke entsteht. Die Basis dieser Hypothese wird durch das Absinken der BHB Spiegel bei Reperfusion weiter untermauert. Die beobachtete hepatische Ketogenese wird durch Veränderungen der beiden wichtigen Hormone des Stoffwechsels Insulin und Glukagon initiiert. Bei einem Absinken von Insulin und einem gleichzeitigen Anstieg von Glukagon bekommt die Leber ein Signal zur vermehrten Ketogenese. In peripheren Zellen wird die vermehrte Bildung von BHB durch eine Regulation der PDH (Aktivität sinkt), die Exprimierung von MCT – 1 und die Bildung wichtiger Enzyme (z.Bsp. BDH) zum Abbau von Ketonkörpern, beantwortet. Um weitere Einblicke in die ablaufenden Prozesse zu erhalten, können weitere Studien mit Fokus auf die Hormonspiegel durchgeführt werden. Ebenfalls würden sich weitere Studien, in denen die Adipozyten als wichtige Regulationsgewebe betrachtet werden, als gewinnbringend erweisen.

Die vorhandenen Glykogenreserven werden durch verminderte Zufuhr von Kohlenhydraten verringert und durch Stresshormone wie Adrenalin, Noradrenalin und Korticosteron weiter aufgebraucht, sodass die Leber Signale für die Bildung von Ketonkörpern bekommt. Die Gabe eines unselektiven  $\beta$  – Blockers wie Propranolol bedingt eine Verminderung der Konzentrationen von BHB im Plasma und in der Leber. Diese Effekte werden wahrscheinlich über  $\beta_2$  – Rezeptoren vermittelt. Weitere Tierstudien mit selektiven Inhibitoren auf die adrenergen Rezeptoren können Klarheit über den biochemischen Ablauf dieser Reaktion beitragen. Ein Vorschlag für dieses Studiendesign wäre eine Gruppe von Mäusen rein ketogen zu ernähren. Im Anschluß werden die Adrenalin und Noradrenalin Konzentrationen im Plasma bestimmt und in Abhängigkeit von selektiven Inhibitoren für das adrenerge System untersucht. Als problematisch hat sich bei Mäusen die rein ketogene Ernährung herausgestellt, da diese Tiere sogar cellulosehaltiges Einstreu im Falle einer kohlenhydratfreien Diät fressen. Aus diesem Grund kann auf Ratten als Versuchstiere umgestellt werden, da hier die Toleranz gegenüber kohlenhydratfreien Diäten bestätigt ist.

## 4.2 Akutintervention mit dem Ketonkörper BHB bei Reperfusion

Im zweiten Projekt der vorliegenden Arbeit wurde die akute Intervention mit dem Ketonkörper BHB untersucht. Der Zeitpunkt der Injektion von BHB wurde unmittelbar nach dem Herausziehen des Fadens gewählt. Da BHB eine sehr kurze Plasmahalbwertszeit besitzt (2h), wurde die Injektion so vollzogen, dass  $\frac{1}{4}$  i.v und  $\frac{3}{4}$  i.p. appliziert wurde [282]. Im ersten Teil wird der Nachweis erbracht, dass BHB bei Injektion ins Gehirn gelangt. Hierfür wurde die Mikrodialyse als Nachweismethode gewählt. Im Anschluss wird die Wirksamkeit einer Akutintervention mit BHB im Rahmen von unterschiedlichen Verhaltenstests überprüft. Zur Vollständigkeit werden auch in diesem Projekt die Metabolitenspiegel von Glukose und BHB vorgestellt. Um die Pharmakodynamik des Ketonkörpers BHB besser verstehen zu können werden am Ende des Projekts die Veränderungen durch BHB auf die Atmungskettenkomplexe sowie die Effekte auf die *Citratsynthase* diskutiert. Bei allen Versuchen in diesem Projekt wurde eine Dauer nach Schlaganfall von 24 h als zeitlicher Endpunkt für die Erhebung der Daten definiert.

### 4.2.1 Glukose und BHB Konzentrationen im Mikrodialysat nach Injektion einer Einzeldosis BHB

Im Rahmen des zweiten Projektes, bei dem BHB in der Akutintervention bei Reperfusion (10, 30 und 100 mg/kg KG) verabreicht wurde, erfolgte zu Beginn des Projektes der Nachweis, dass BHB überhaupt die Bluthirnschranke überwinden kann. In der Literatur wurde vielfach der verantwortliche Transporter (Monocarboxylattransporter Typ – 1) beschrieben und charakterisiert [256]–[260], [283]. Um die bereits vorhandene Erkenntnis der Distribution von BHB im extrazellulären Raum (EZR) zu bestätigen, wurde nach einer Sondenimplantation 24 h vor Verabreichung der BHB - Lösung (s. **Kap. 2.1.1.4.2 Bau der Mikrodialysesonde, 2.1.1.4.6 Sondenimplantation in das linke Striatum**) das Anströmungsverhalten von BHB (100 mg/kg KG) im Mikrodialysat untersucht. Die Verabreichung der BHB Lösung erfolgte intraperitoneal nach einer Vorlaufzeit der Mikrodialysesonde von 30 min. (s. **Abb. 79**). Wie bereits im ersten Projekt, wurde Glukose als Primärs substrat den Konzentrationen von BHB im EZR gegenübergestellt. Nach Verabreichung einer BHB Lösung (100 mg/kg KG) steigen die Konzentrationen von BHB im EZR auf das Doppelte des Initialwertes an, wobei das Primärs substrat Glukose auf ein Drittel des Ausgangswertes abfällt (s. **Abb. 79**). Die Publikationen von La Manna und Zhang können für diese Beobachtung eine Erklärung bereitstellen [244], [276]. Die Beobachtung der beiden Autoren ist, dass das Gehirn auf die Verbrennung von Ketonkörpern (bis zu 70 %) umschalten kann und zwar in Abhängigkeit von der Höhe der Konzentration von Ketonkörpern im Plasma. Ein einfaches Rechenbeispiel soll die Höhe der Konzentration an Ketonkörpern im Plasma verdeutlichen. Eine normale Labormaus besitzt im Mittel 77 - 80  $\mu\text{l/g}$  Blut das heisst eine Maus mit 32 g hat ein Blutvolumen von 2,56 ml [284]. Wenn man einer Maus eine Dosierung von 100 mg/kg KG verabreicht, ist die gesamte Menge an BHB 3,2 mg. Betrachtet man das gesamte Blutvolumen, resultiert hieraus eine Blutkonzentration von 12,1 mM. Dieser Wert ist sehr hoch und bedingt aufgrund der Kinetik des MCT – 1 eine Transportrichtung von BHB vom Plasma ins Gehirn. Die Konzentrationen an Glukose korrelieren invers mit der Höhe der BHB Konzentrationen. Auf Basis von statistischen Analysen (Gjedde Patlak Analyse) hat Zheng et al. 2013 postuliert, dass eine Zunahme von 1 mM BHB im Plasma eine 9 % ige Reduzierung des zerebralen Glukoseverbrauchs bedingt [244]. In dem angesprochenen Rechenbeispiel würde eine Konzentration von 12,1 mM eine Reduzierung

des zerebralen Glukoseverbrauchs um 109 % bedingen (Linearität vorausgesetzt). Viele Publikationen gehen davon aus, dass bis zu 70 % des normalen Glukoseverbrauchs im Gehirn durch Ketonkörper ersetzt werden können [243], [284] – [287].

#### **4.2.2 Auswirkungen einer Akutintervention mit BHB auf das Verhalten der Mäuse nach 24 h**

Verhaltenstests bieten in der experimentellen Pharmakologie die Möglichkeit der Überprüfung der pharmakodynamischen Wirksamkeit unterschiedlicher Substanzen. Von Vorteil dabei ist die Nicht-Invasivität der Versuche, die somit pro Maus wesentlich mehr Datenmaterial zur Aufklärung von verschiedenen Fragestellungen bieten als rein terminale Versuche. Der Grundsatz der 3R Regel von Russell und Burch (Vermeidung, Verringerung, Verfeinerung) wird dabei berücksichtigt, wobei der Punkt der Vermeidung nicht gänzlich erfüllt ist [289]. Damit nicht nur isolierte Verhaltenstests wie der Corner-Test bzw. der Chimney-Test zum Einsatz kommen, wurde auf Basis der Publikationen von Stahel und Chen und eigener Tests eine ganze Batterie von Verhaltenstests durchgeführt [207], [209] (s. **Kap. 2.2.9 Verhaltenstests**). Um die Verhaltenstests erfolgreich zu absolvieren, bedarf es funktionierender Sensorik und Motorik, die durch den Verschluss der mittleren Zerebralarterie beeinträchtigt ist [290]. Zusätzlich zu den sensomotorischen Tests wurden auch Reflexe getestet, wie der Pinna - Reflex und den Schreckreflex. Bei der Bepunktung gibt es eine Spanne von 1 bis 14 Punkten. Der Schreckreflex wurde aus der Auswertung gestrichen, da die Haltungsbedingungen eine Beurteilung nicht erlaubt haben. Manche gesunden Tiere zeigten auch bei mehrmaligem Händeklatschen keinerlei Reaktion. Die endgültig durchgeführten Verhaltenstests zeigen ein hohes Diskriminierungspotential, bei dem ein Tier mit Schlaganfall gemittelt 13 Punkte aufweist und ein gesundes Tier 0 – 1 Punkt erhält (s. **Abb. 80**). Auf Basis der Untersuchungen von Suzuki et al. 2001 und Smith et al. 2005 wurden die Dosierungen für die akute Intervention mit 10, 30 und 100 mg/kg KG ausgewählt und im Rahmen der Verhaltenstests erneut überprüft [282], [291]. Das neurologische Verhalten nach 24 h war bei einer Dosierung von 30 mg/kg KG deutlich besser als die Dosierungen mit 10 und 100 mg/kg KG BHB bzw. 30 mg/kg KG Laktat. Bei einer Dosierung von 100 mg/kg KG BHB zeigten sich negative Effekte auf die Blutgerinnung, was auch mit Untersuchungen von Suzuki et al. 2001 übereinstimmt [291]. Wenn man Dosierungen von 10 mg/kg KG BHB betrachtet, scheint diese keine ausreichende Ketose auszulösen, zeigt aber positive Effekte bei den Verhaltenstests. Bei allen Interventionslösungen wurden immer die Osmolalität und der pH - Wert in einen schmerzfreien Bereich titriert, sodass die Wahrscheinlichkeit für Hypervolämien, Alkalosen und Azidosen gering gehalten wurde.

30 mg/kg KG BHB sind in Bezug auf die Verhaltenstests die Dosis, bei der ein maximaler Effekt erreicht wurde (s. **Abb. 80**). Diese Beobachtung stimmt mit der Literatur überein [290] – [293]. In den genannten Veröffentlichungen wurden die akuten Interventionen entweder mit einer Dauerinfusion (konstantere Ketose) oder mit einer Einmalgabe von BHB vollzogen. Die Dauerinfusion von BHB wird auf Basis der kurzen Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 32$  min. vollzogen. Die gesamte Verweildauer im Blut einer oral zugeführten 30 mg/kg KG Dosierung von reinem BHB liegt bei ca. 2 h [282]. Der Nachweis, dass BHB die Bluthirnschranke überwindet, ist bereits in vorherigen Kapiteln erfolgt (s. **Kap. 4.1.3 Hepatische Ketogenese in Abhängigkeit von unterschiedlichen Diäten und zerebraler Ischämie, 4.2.1 Glukose und BHB Konzentrationen im Mikrodialysat nach Injektion einer Einzeldosis BHB**). Die Metabolisierungsrate für BHB im Gehirn wurde bei Menschen ermittelt und betrug 0,03 mmol/kg/min. [295]. Wenn man diese Metabolisierungsrate für die Maus adaptiert, müsste man den

Faktor 7 einrechnen und erhält eine Zeitdauer von ca. 3 h in der BHB als Energiesubstrat für das Gehirn bereitgestellt werden kann [274]. In dieser Zeit müssen die endogenen Energiereserven wie Glykogen bzw. Fettreserven nicht in Anspruch genommen werden. Bei einer Dauer von 90 min. MCAO ist die Symptomatik des Schlaganfalles sehr profund, was die Regeneration der Maus erschwert. Sowohl die Futterpellets als auch das Trinkwasser sind *ad libitum* verfügbar. Allerdings ist die Symptomatik so profund, dass von keinem eigenständigen Essen bzw. Trinken auszugehen ist. Aus diesem Grund muss eine reine Flüssigkeits- bzw. Kalorienzugabe, die das Verhalten der Mäuse nach 24 h verbessert, bedingt durch die Gabe von BHB, in Betracht gezogen werden. Diese Betrachtung ist rein bioenergetisch und umfasst noch nicht die biochemische Ausführung anhand von definierten Zielstrukturen.

Die Diskussion über die pharmakodynamischen Zielstrukturen, die eine akute Gabe von BHB bzw. eine ketogene Diät adressiert, gestaltet sich ebenfalls sehr interessant. Um diese Diskussion übersichtlicher zu gestalten wird im Folgenden eine Übersichtstabelle (s. **Tab. 33**) über die potentiellen Effekte und Mechanismen von Ketonkörpern vorgestellt.

| Autor und Jahr              | Postulierte Effekte / Mechanismen  | Bemerkung  |
|-----------------------------|--|--|
| Amilpas et al. 2015         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• ROS im Hippocampus ↓</li> <li>• ATP Spiegel ↑</li> <li>• Laktat ↓</li> </ul>  | Versuche an Wistar Ratten, ATP und Laktat in vitro gemessen  |
| Hmiel-Perzynska et al. 2010 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kynureninsäure Synthese ↑</li> <li>• Proteinkinase A Expression ↑</li> </ul>  | Kynureninsäure ist ein endogener Agonist an Glutamatrezeptoren und Agonist an $\alpha 7$ - nikotinergen Rezeptoren |
| Maalouf et al. 2007         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>NAD^+/NADH+H^+</math> Verhältnis ↑</li> <li>• Gluthation bleibt unverändert</li> <li>• Glutamat-Exzitotoxizität ↓</li> </ul>  |  |
| Mu et al. 2003              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Expressionsteigerung von HIF - 1<math>\alpha</math> und VEGF</li> </ul>   | Entspricht einem rein neuroprotektiven Ansatz Grund: mRNA von HIF - 1 $\alpha$ und VEGF bei 7,5 – 8 h              |
| Rahman et al. 2014          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Neuroinflammation über HCA<sub>2</sub> Rezeptoren supprimiert</li> <li>• Makrophagen/Monozyten die HCA<sub>2</sub> Rezeptor haben transferieren antineuroinflammatorisches Signal ins Gehirn</li> </ul> | Versuche mit Hca2 <sup>-/-</sup> Mäusen und Nikotinsäure als BHB Mimetikum   |



|                    |   |  |
|--------------------|---|--|
|                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Infarkt volumen ↓</li> </ul>   |  |
| Suzuki et al. 2001 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwellung ↓</li> <li>• Ödembildung ↓</li> <li>• Natriumgehalt ↓</li> <li>• Laktat ↓</li> </ul>  | Versuche mit ddY Mäusen und Wistar Ratten mit Anoxie, Hypoxie und Ischämie                             |
| Suzuki et al. 2002 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lipid-Peroxidation nach Reperfusion ↓ (Malondialdehyd)</li> <li>• Infarkt volumen ↓</li> <li>• Ödeme ↓</li> <li>• Verhaltenstest ↑</li> </ul>                                  | Versuche mit Wistar Ratten t-MCAO  |
| Yin et al. 2015    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sirtuin 3 – FoxO3a – SOD – 2 Kaskade wird beeinflusst</li> <li>• <i>Open-field</i> Laufstrecke ↑</li> <li>• Infarkt volumen ↓</li> <li>• Komplex I + II Aktivität ↑</li> </ul> | Sirtuine sind Histon – Deacetylasen die neuroprotektive Effekte auf ischämische Diathesen haben sollen |
| Zheng et al. 2013  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Erhöhung der Citratzyklusintermediate durch BHB → durch Anaplerose Erhöhung der Konzentrationen von GABA</li> </ul>  | Inhibitorischer Effekt durch GABA entscheidend laut Autor bei Epilepsie                                |

Tab. 33 In der Literatur postulierte Zielstrukturen von Ketonkörpern.

#### 4.2.3 Metabolitenspiegel von Glukose und BHB im Leberhomogenat nach 24 h bei akuter BHB Gabe zur Reperfusion

Das erste Projekt der vorliegenden Arbeit hat sich vor allem mit den pharmakokinetischen Aspekten von fettreichen Diäten im Vergleich zu normalen Haltungsdiäten beschäftigt. Hierzu wurde für die Beurteilung der Kinetik die GC - MS Analytik etabliert. Um diesen Aspekt der Pharmakokinetik auch in dem zweiten Projekt beizubehalten, wurden die Metabolitenspiegel nach 24 h Reperfusion ebenfalls vermessen (s. **Abb. 81**, **Abb. 82**). Um ein besseres Verständnis für die zugrundeliegenden möglichen Mechanismen zu erhalten, wird im Folgenden eine Interpretation erfolgen, die zeitlich direkt nach der Injektion der jeweiligen Interventionslösungen ansetzt.

Nach einem transienten als auch nach einem fulminanten Schlaganfall steigen die Plasmakonzentrationen von Catecholaminen der Probanden gegenüber der Kontrollgruppe massiv an [252]. Wenn man die Effekte einer Injektion von BHB betrachtet, findet man in der Literatur, dass Ketonkörper die Anzahl an Depolarisationen des Sympathikus im *Locus coeruleus* ebenfalls ansteigen lassen [296]. Beide Mechanismen steigern somit den Sympathikustonus additiv. Die

Konzentrationen an Noradrenalin steigen beim Schlaganfall sehr stark an [252]. Diese additive Erhöhung von Noradrenalin bedingt wiederum eine starke Lipolyse aus Adipozyten und eine hepatische Ketogenese, die über  $\alpha$  bzw.  $\beta$  – Rezeptoren vermittelt wird [297]. Parallel zu den beschriebenen Mechanismen steigt auch die Konzentration an Adrenalin stark an [252]. Das im Plasma zirkulierende Adrenalin stimuliert die Freisetzung von Glukagon aus  $\alpha$  – Zellen des Pankreas [263], [265]. Wie bereits in vorherigen Abschnitten erläutert, wird die Ketogenese bzw. die Erhöhung der Ketonkörper im Plasma durch eine Erhöhung des Verhältnisses von Glukagon zu Insulin initiiert [248], [251], [298]. Die genannten Mechanismen führen zu einer Ketogenese, die auch nach 24 h im Leberhomogenat ersichtlich ist (s. **Abb. 81**). Führt man exogen BHB zu, sinken die Gesamtkonzentrationen an BHB in der Leber nach 24 h ab. Vorstellbar ist ein dynamisches Gleichgewicht, welches zwischen Leber, Plasma und Gehirn besteht. Bei einer exogenen Gabe von BHB werden die Plasmakonzentrationen unmittelbar stark angehoben und die Leber produziert direkt bei Absinken des BHB Spiegels im Plasma Ketonkörper nach, während das Gehirn BHB als Energiesubstrat nutzt. Das beschriebene Gleichgewicht wird somit durch die Gabe initiiert und durch den Körper aufrechterhalten. Der Organismus kann praktisch direkt die Energie des alternativen Substrates zugänglich machen, ohne, dass er die wertvollen Glykogenreserven in der Leber mobilisieren muss.

In Bezug auf die Glukosespiegel in den Leberhomogenaten kann keinerlei statistisch signifikante Aussage über die Veränderungen der Konzentrationen unter den verschiedenen Gruppen getroffen werden. Der Gesamtgehalt an Glukose / Glykogen in der Leber scheint bei Mäusen in einem engen Bereich kontrolliert zu werden und nur extreme Stimuli wie eine 90 min. Schlaganfalldauer bzw. eine fettreiche Diät bedingen eine Veränderung der Spiegel, die nach 24 h nicht mehr detektierbar ist (s. **Abb. 81**).

Die in diesem Kapitel beschriebenen Ausführungen betreffen vor allem die hormonelle Regulation der Energiesubstrate im Organismus unter physiologischen bzw. unter ketogenen Zuständen und die Effekte, die ein transients Schlaganfall auf diese Stoffwechselintermediate und Energiesubstrate zeigen. Um auch einem biochemisch pharmakologischen Anspruch gerecht zu werden, werden die Auswirkungen der akuten Gabe von BHB bzw. einer ketogenen Diät auf neuroinflammatorische und neuroprotektive Parameter betrachtet.

In den letzten Jahren haben Sirtuine (*silent information regulator two like protein*) (Klasse – III Histondeacetylasen; HDAC) großes Interesse in der Schlaganfallforschung aber auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Huntington, Parkinson und der amyotropen Lateralsklerose erlangt [299]. Es wurden bereits sieben unterschiedliche Sirtuine in Säugerorganismen entdeckt [300]. An dieser Stelle wird vor allem auf die Rolle von Sirt – 3 als Zielstruktur eingegangen, da dieses Protein eine potentielle Zielstruktur für BHB darstellt [299], [301]. BHB steigert das Verhältnis von  $\text{NAD}^+ / \text{NADH} + \text{H}^+$  und bedingt so eine Expressionssteigerung von Sirt – 3, die ebenfalls  $\text{NAD}^+$  abhängig ist [301]. Sowohl der Transkriptionsfaktor *FOXO3a* als auch die *Superoxid Dismutase 2* (SOD-2) sind Substrate für *Sirt – 3* und werden über Acetylierungen reguliert [299], [301], [302]. Sowohl die Zielstruktur *FOXO3a* als auch die *SOD – 2* steigern ihre Aktivität und bedingen so einen geringeren oxidativen Schaden an Proteinstrukturen [299]. Zusätzlich konnte die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die durch die Atmungskettenkomplexe produziert werden, durch die Gabe von BHB gesenkt werden, was laut den Autoren kausal mit einer Erhöhung der Aktivität von Komplex - I in Zusammenhang zu bringen ist [301]. Der Komplex I und der

Komplex II der Atmungskette werden als einer der Hauptquellen für ROS angesehen [303], [304]. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Systeme zur Beseitigung von ROS (SOD – 2; *Katalase*; manganhaltige SOD) verstärkt werden und die Produktionsquellen (Komplex - I + II) von ROS durch die Gabe von BHB (30 mg/kg KG) optimiert werden.

Die *Sirtuine*, insbesondere Sirt - 3 haben in aktuellen Studienergebnissen auch negative Ergebnisse auf die neurologischen Parameter generiert. Bei Sirt – 3 *knockout* Mäusen wurde eine Hyperacetylierung der *Ceramid-Synthase 1, 2 und 6* festgestellt, die mit einem verbesserten neurologischen Ergebnis nach einer Ischämie mit anschließender Reperfusion einhergeht [305]. Die Akkumulation von Ceramiden in den Mitochondrien zeigt einen massiven Anstieg von ROS, der durch eine Fehlfunktion von Komplex - III begründet liegt [299], [305]. Die drei Isotypen der *Ceramidsynthase 1, 2 und 6* sind alle in den Mitochondrien lokalisiert.

Abschließend bedarf es weitergehender Forschung, ob und wie BHB Infusionen im Rahmen von zerebralen Ischämien gewinnbringend für das neurologische Ergebnis angewendet werden können bzw. ob es noch weitere Zielstrukturen gibt.

#### **4.2.4 Effekte einer akuten Gabe von BHB auf Mitochondrien**

Die Mitochondrien spielen in der Pathogenese der zerebralen Ischämie eine entscheidende Rolle. Die Atmungskettenkomplexe generieren ein mitochondriales Membranpotential (- 80 – 140 mV), was die treibende Kraft für die Phosphorylierung von ADP zu ATP darstellt und somit die energetische Homöostase der Zellfunktion sicherstellt [306]. Demgegenüber sind die Mitochondrien aber auch die Hauptquelle für ROS, die im Schlaganfallgeschehen neben dem bioenergetischen Defizit einen Hauptanteil an Funktionsstörungen bis hin zur Apoptose der Neuronen zeigen können [307]. Innerhalb einer zerebralen Ischämie durchlaufen die Mitochondrien verschiedene Funktionsänderungen ihrer Komplexe, die bei persistierender Hypoxie in der Apoptose von Zellen, die von der Hypoxie betroffen sind, enden [308]. Die erste Funktionsstörung der Mitochondrien wird durch das Defizit an verfügbarem Sauerstoff hervorgerufen, wodurch es zu Dephosphorylierungen der Enzyme der oxidativen Phosphorylierung kommt (insbesondere die *Cytochrom-C-Oxidase*). Die dephosphorylierten Enzyme können im Falle einer Reperfusion ihre maximale Aktivität bereitstellen, was im Verhältnis zu sehr hohen ROS Mengen zu moderaten ATP Ausbeuten führt [306], [308]. Die Effekte, die zu einer mitochondrialen Dysfunktion und auch zum Absterben von Nervenzellen führen, reichen von Proteinoxidation, Lipidperoxidation bis hin zu oxidativen Schädigungen von mitochondrialer DNA und Polysacchariden [308] – [311]. Falls die Menge an produziertem ROS zu hoch ist oder die Hypoxie weiter voranschreitet, entsteht die sogenannte *mitochondriale Transition Pore*, die den Beginn der Apoptose der Mitochondrien einleitet und schlussendlich zur Apoptose der betroffenen Nervenzellen führt [313]. Im Folgenden werden die erhobenen Daten über die Atmungskettenkomplexe, die *Citratsynthase* und den Einfluss unterschiedlicher Substrate auf die mitochondriale Atmung in den aktuellen Kontext der Literatur gesetzt.

##### **4.2.4.1 Effekte einer akuten Gabe von BHB auf die Atmungskettenkomplexe**

Ein transientscher ischämischer Schlaganfall mit einer Dauer von 90 min. bedingt eine signifikante Schädigung des Komplex II der Atmungskette (s. **Abb. 83**). Auch der Komplex - I der Atmungskette ist beeinträchtigt, zeigt aber bei einer Dauer von 90 min. keine signifikante Aktivitätseinbuße. In Abhängigkeit der Schlaganfalldauer herrscht kein einheitliches Verständnis über die Progression der

Schädigung der einzelnen Atmungskettenkomplexe. Viele Publikationen beschreiben eine Aktivitätsminderung insbesondere von Komplex - I der Atmungskette bei zerebraler Ischämie [303], [306], [308]. Auch Zheng et al. 2015 beschreibt eine Minderung der Komplex - I Aktivität, verweist aber auch auf die Minderung der Komplex - II Aktivität [299]. Die Dauer der Ischämie korreliert unmittelbar mit der Schädigung der Atmungskettenkomplexe.

Die Gabe von BHB (30 mg/kg KG) bei Reperfusion bedingt, dass die Aktivität insbesondere von Komplex - II nicht absinkt, wie im Falle der Okklusion der MCA ohne die Gabe von BHB (s. **Abb. 83**). Ebenfalls konnte ein Absinken der Aktivität von Komplex - I verhindert werden, wobei die Schädigung von Komplex - I sich nicht signifikant unterschieden hat im Vergleich mit den Kontrollgruppen (s. **Abb. 83**). Die erste Ausführung zur Erklärung der erhobenen Daten betrifft die metabolische Komponente der Gabe von BHB. Der Citratzyklus kann durch Glukose und Ketonkörper mit Acetyl - CoA Einheiten gespeist werden. Der Unterschied liegt aber darin, dass im Falle eines Glukosemangels die PDH runterreguliert wird, auf Basis der erhöhten Acetyl - CoA Spiegel durch die Gabe von BHB [249], [314]; [36]. Im Gehirn ist postischämisch ein ähnlicher metabolischer Zustand wie bei einer ketogenen Diät vorherrschend, Glukose ist niedrig und durch die Gabe von BHB steigen die Konzentrationen im Hirnhomogenat an (s. **Abb. 68**). In diesem „Hungerzustand“ wird Glukose eingespart und BHB priorisiert als Substrat für den Citratzyklus verwendet [276]. Der Citratzyklus hat somit ein alternatives Substrat, was die Regenerierung der wichtigen Reduktionsäquivalente  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$  gewährleistet. Damit BHB überhaupt in die wichtigen Acetyl - CoA Einheiten umgewandelt werden kann, bedarf es der *mitochondrialen BHB Dehydrogenase*, die bei Hungerzuständen wie bei Diabetes mellitus, Fasten, aber auch dem Schlaganfallgeschehen auftreten, hochreguliert wird [270]. Der Citratzyklus kann somit weitere Reduktionsäquivalente für die Regenerierung von ATP über die oxidative Phosphorylierung generieren. Sowohl anaplerotische als kataplerotische Prozesse können Intermediate des Citratzyklus als eigene Substrate verwenden, als auch Substrate in den Citratzyklus einspeisen. Der protektive Effekt auf den Komplex - II der Atmungskette kann über einen Anstieg von Succinat erklärt werden, da der Succinat - Q - Reduktasekomplex (Komplex - II) die *Succinat-Dehydrogenase* als Komponente enthält und so die Aktivität des Komplex - II unmittelbar mit der oxidativen Phosphorylierung assoziiert [36]. Zusammenfassend ist zu erwähnen, dass durch die Gabe von BHB Acetyl - CoA Einheiten in den Citratzyklus eingeschleust werden können und somit die Funktion der einzelnen Enzyme aufrechterhalten bleibt. Dieser Funktionserhalt zeigt sich bei der Umsetzung von Succinat zu Fumarat unmittelbar in der Funktion des Komplex - II der Atmungskette (s. **Abb. 84**). Auch der Komplex - I der Atmungskette wurde in den Messungen auf Ausgangsniveau angehoben (s. **Abb. 83**). Durch die Gabe von BHB wird auch das Verhältnis von  $\text{NAD}^+ / \text{NADH} + \text{H}^+$  erhöht, was sich im erhöhten Sauerstoffverbrauch des Komplexes I der Atmungskette wiederfindet (s. **Abb. 83**) [275]; [296]; [297].

#### 4.2.4.2 Effekte einer akuten Gabe von BHB auf die Aktivität der Citratsynthase

Im Rahmen des zweiten Projektes wurde die Aktivität der *Citratsynthase* gemessen, um einen genaueren Einblick in den Wirkmechanismus von BHB zu erhalten. Außerdem wird die *Citratsynthase* im Rahmen der Atmungskettenkomplexe mit vermessen, um eine Aussage über die Funktion bzw. die Anzahl von Mitochondrien zu erhalten. Der theoretische Hintergrund dieser Aussage ergibt sich durch die Tatsache, dass nur intakte Mitochondrien auch eine intakte *Citratsynthase* haben [317]. Die Aktivität der *Citratsynthase* wurde unter optimalen Substratbedingungen (*ex situ*) gemessen und weist eine Minderung der Enzymaktivität bei einem transienten Schlaganfall auf (s. **Abb. 85**). Durch

die Gabe von BHB wird ein Absinken der Enzymaktivität verhindert (s. **Abb. 85**). Betrachtet man die Aktivität der *Citratsynthase* proteinnormiert, sieht man, dass ein ischämischer Schlaganfall den Gesamtproteinanteil im Gehirn verringert (s. **Abb. 86**). Durch die Gabe von BHB sinkt der Gesamtanteil an Proteinen im Gehirn nicht ab. Aus diesem Grund kann man die Aussage treffen, dass die Gabe von BHB protektiv auf die Mitochondrien im ischämischen Gebiet wirkt.

Eine mögliche Erklärung für diesen Befund kann durch den Erhalt der Funktionen des Citratzyklus als Schaltzentrale des Energiestoffwechsels gegeben werden. Wie bereits in **Kap. 4.2.4.1 Effekte einer akuten Gabe von BHB auf die Atmungskettenkomplexe** besprochen, wird durch die BHB Gabe der Quotient zwischen  $\text{NAD}^+ / \text{NADH} + \text{H}^+$  erhöht, was auf eine verbesserte Substratverfügbarkeit der einzelnen Intermediate des Citratzyklus hinweist. Die Funktion der oxidativen Phosphorylierung kann somit aufrechterhalten werden [263]; [272]; [273]; [296]. Das bioenergetische Defizit was durch eine zerebrale Hypoxie induziert wird, kann durch die Gabe von BHB verzögert werden, was mit einem verbesserten neurologischen Status nach 24 h einhergeht. Diese These wird durch die Tatsache unterstrichen, dass bei einem ischämischen Schlaganfall die ATP Konzentrationen im Hirnhomogenat nicht absinken, wie bei einer Intervention mit Kochsalzlösung [272]; [273]; [274].

#### **4.2.4.3 Substrateinflüsse auf isolierte Mitochondrien**

In diesem Kapitel wird der Substrateinfluss von verschiedenen für den Energiestoffwechsel relevanten Substanzen auf die mitochondriale Atmung diskutiert. In der Meßkammer des OROBOROS Gerätes wurden nur Mitochondrien vermessen, die aus Hirnhomogenaten isoliert wurden und mit einem etablierten Protokoll aufgereinigt wurden. Somit sind andere Organellen so gut wie nicht mehr in der Zellsuspension vorhanden (s. **Kap.2.2.5 Isolation von Mitochondrien**). In **Abb. 87** sind die unterschiedlichen Substrateinflüsse auf die mitochondriale Atmung zusammengestellt.

#### 4.2.4.3.1 Einfluss von BHB auf isolierte Mitochondrien

Als erstes werden die beiden BHB Gaben betrachtet und diskutiert. Es gibt drei wesentliche extrahepatische Enzyme, die die Umwandlung von BHB bzw. von Acetoacetat in zwei Acetyl - CoA Moleküle katalysieren, die *BHB Dehydrogenase*, die *3-Ketosäure-CoA-Transferase* (SCOT) und als letztes die *Acetyl - CoA Acetyltransferase (m-Thiolase)* [36]. Zwar sind die Enzyme der Verstoffwechslung von BHB zu Acetyl - CoA bekannt, aber wie BHB zu diesen Enzymen in die Mitochondrien gelangt, bleibt in der Literatur bisher unbeantwortet. Wenn zwei Moleküle Acetyl - CoA aus BHB entstehen, können sie über die *Citratsynthase* in den Citratzyklus eintreten. Durch den Eintritt in den Citratzyklus erhöht sich das Verhältnis von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und auch das Verhältnis von  $\text{FAD}^+$  zu  $\text{FADH}_2$ . Die regenerierten Reduktionsäquivalente  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$  können ihre Elektronen bzw. Protonen über die Komplexe - I und - II der Atmungskette einschleusen und somit die Reduktion von Sauerstoff fördern. Durch diesen physiologischen Sachverhalt können die isolierten Mitochondrien den Citratzyklus und die Atmungskette weiterhin betreiben, um ATP aus ADP zu regenerieren. Um die Effekte in der Kammer der Sauerstoffelektrode besser verstehen zu können, werden die resultierenden Konzentrationen nach Zugabe der jeweiligen Dosierungen an BHB genannt. Bei einer Dosierung von 100 mg/kg KG BHB erhält man in der Kammer der Sauerstoffelektrode eine resultierende Konzentrationen von 6,9 mM BHB, gegenüber 0,7 mM bei einer Dosierung von 10 mg/kg KG. Die 100 mg/kg KG Dosierung entspricht somit einer relativ starken Ketose gegenüber einer Ketose unter 1 mM. Anzumerken ist allerdings, dass die vorherrschende Konzentration im Gesamtorganismus in den Mitochondrien nicht bekannt ist.

#### 4.2.4.3.2 Einfluss von Glukose auf isolierte Mitochondrien

Das zweite Substrat, das zur näheren Untersuchung an isolierten Mitochondrien verwendet wurde, ist Glukose (s. **Abb. 87**). Die Enzyme, die im Rahmen der Glykolyse Glukose zu Pyruvat verstoffwechseln, sind alle im Cytosol lokalisiert [36]; [83]. Es gibt Enzyme, wie zum Beispiel die *Hexokinase - I*, die an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind und dort ebenfalls die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose - 6 - Phosphat katalysieren können [318]. Allerdings müssen alle zehn Enzyme der Glykolyse vorhanden sein, um Pyruvat zu generieren. Dieses wird wiederum in die Mitochondrien transportiert, um entweder zu Oxalacetat, Laktat oder Acetyl - CoA metabolisiert zu werden [36]; [83]; [319]. Die Reaktionen der Glykolyse beinhalten auch die Umsetzung von Glycerinaldehyd - 3 - Phosphat zu 1, 3 - Bisphosphoglycerat durch das Enzym *Glycerinaldehyd - 3 - Phosphat - Dehydrogenase*. Bei dieser Reaktion wird  $\text{NADH} + \text{H}^+$  regeneriert, was in diesem Experiment den Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien erhöhen sollte. Entgegen der beschriebenen These sinkt der Sauerstoffverbrauch bei Zugabe von Glukose (s. **Abb. 87**). Desweiteren befindet sich in dem Nährmedium für Mitochondrien ein Überschuss an Saccharose (s. **Kap. 2.2.4 MiRO (Mitochondrial Respiration Medium)**).

### 2.2.4 MiRO (Mitochondrial Respiration Medium)

Diese Saccharose stellt laut dem Hersteller eine physiologische Umgebung für die isolierten Mitochondrien dar [320]. Wenn die Enzymsysteme der Glykolyse also nicht durch die Aufarbeitung denaturiert bzw. aus der Zellsuspension herauszentrifugiert werden, ist in der Zellsuspension bereits ausreichend Substrat in Form von Glukose vorhanden, um einen erhöhten Sauerstoffverbrauch zu bedingen. Aus den genannten Gründen sowie den durchgeführten Experimenten ist es

wahrscheinlich, dass die angebotene Glukose von den isolierten Mitochondrien nicht in verstoffwechselbare Zwischenprodukte umgewandelt wird und die Mitochondrien keinen erhöhten Sauerstoffverbrauch zeigen.

#### **4.2.4.3.3 Einfluss von Propranolol auf isolierte Mitochondrien**

Die Zugabe von Propranolol ins Reaktionsmedium der Sauerstoffelektrode lässt den Sauerstoffverbrauch der isolierten Mitochondrien leicht sinken (s. **Abb. 87**). Propranolol selbst ist ein unselektiver  $\beta$  – Blocker [321]. Alle adrenergen Rezeptoren sind an der Außenseite der Zellmembran lokalisiert [93]. Somit kann Propranolol nicht an seine Zielstruktur binden, da durch die Aufreinigung der Mitochondrien die Rezeptoren nicht mehr in der Zellsuspension vorhanden sind (s. **Kap. 2.2.5 Isolation von Mitochondrien**). Propranolol selbst kann in hohen Konzentrationen membranstabilisierend wirken und somit eventuell auch einen Effekt auf isolierte Mitochondrien zeigen [322]. In einer Kasuistik, in der eine Frau in Selbstmordabsicht 3,12 g Propranolol oral aufgenommen hat, wurde nach 12 h eine maximale Plasmakonzentration von 1475 ng/ml gemessen [323]. Wenn man 10  $\mu$ l einer Propranolollösung (10 mg/kg KG) in die Kammer der Sauerstoffelektrode gibt, resultiert daraus eine Konzentration von 50  $\mu$ M. Aus den oben genannten Daten kann man von einer imaginären Konzentration (Plasmakonzentration des Patientenfalls) in der Kammer von 2,4  $\mu$ M ausgehen. Die Konzentration in der Kammer weist somit eine zu hohe Konzentration auf, als das von keiner membranstabilisierenden Wirkung von Propranolol ausgegangen werden kann. Diese Rechnung geht davon aus, dass die Konzentration intrazellulär genauso hoch ist wie im Plasma. Propranolol selbst ist sehr lipophil und kann durch passive Diffusion leicht Membranen überwinden. Somit müsste eine erneute Versuchsreihe konzipiert werden, die eine geringere Konzentration von Propranolol in der Kammer der Sauerstoffelektrode enthält.

#### **4.2.4.3.4 Einfluss von Acetat auf isolierte Mitochondrien**

Bei einer Zugabe von Laktat (10 mg/kg KG) in die Kammer der Sauerstoffelektrode verändert sich der Sauerstoffverbrauch der isolierten Mitochondrien nicht. Im Rahmen dieser Studie wurden alle Lösungen in einem pH – Bereich zwischen 7,35 – 7,45 und die Osmolalität auf 288 mosmol/kg eingestellt. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass die resultierende Zellsuspension in der Kammer der Sauerstoffelektrode keiner Azidose bzw. Alkalose ausgesetzt war. Eine wesentliche Arbeit zum Verständnis für Laktat als mitochondriales Substrat hat Rasmussen et al. 2002 beigetragen [324]. In dieser Arbeit wurden Muskelzellen von Menschen und Mäusen entnommen und die jeweiligen Mitochondrien isoliert. Danach wurde auf die Anwesenheit des Enzyms *Laktatdehydrogenase* (LDH) getestet und es wurde ein negativer Befund festgestellt. Nach Zugabe von Laktat in die Zellsuspension, wurde, wie auch in unserer Arbeit keine Respiration der Mitochondrien festgestellt. Unter hypoxischen Zuständen in der Muskulatur (v.a. Herzmuskulatur) kann die LDH aus Laktat auch Pyruvat generieren, da diese Reaktion umkehrbar ist und bei der Rückführung von Laktat in Pyruvat ein Äquivalent  $\text{NADH} + \text{H}^+$  entsteht. Dieses kann wiederum schnell ATP regenerieren [325]. Die LDH wird aus diesem Grund auch gerne als diagnostischer Marker für Herzinfarkte und für die Leistungsbestimmung von Sportlern oder anderen hypoxischen Zuständen benutzt [326]. Physiologisch begründbar für die fehlende Respiration bei Zugabe von Laktat kann die Lokalisation der LDH herangezogen werden, da es ein cytosolisches Enzym ist und sehr wahrscheinlich durch das Aufreinigungsprotokoll verloren geht [36].

#### 4.2.4.3.5 Einfluss von Acetat auf isolierte Mitochondrien

Wenn man anstatt Laktat Acetat in die Zellsuspension gibt, sinkt der Sauerstoffverbrauch der isolierten Mitochondrien leicht ab (s. **Abb. 87**). Auf Basis der Physiologie der Mitochondrien ist es wahrscheinlich, dass Acetat durch die *Acetyl - CoA - Synthetase* in Acetyl - CoA umgewandelt wird und so den Citratzyklus speisen kann [36]. Im Gegensatz zur LDH befindet sich die *Acetyl - CoA - Synthetase* in der mitochondrialen Matrix und würde dadurch nicht bei dem Aufreinigungsprotokoll verloren gehen (s. **Kap. 2.2.5 Isolation von Mitochondrien**) [327]. Auf Basis der transkriptionellen Regulation der *Acetyl - CoA - Synthetase* ist bekannt, dass dieses Enzym nur transkribiert und translatiert wird, wenn Acetyl - CoA für die Fettsäuresynthese oder für den Citratzyklus benötigt wird [328]. Das Medium MirO hat aber alle notwendigen Substrate enthalten und die Tiere wurden keiner Intervention unterzogen. Vor allem die bereits angesprochenen *Sirtuine 1* und *3* sind potentielle Transkriptionsfaktoren die die Regulation der *Acetyl - CoA - Synthetase* positiv beeinflussen können [327], [328]. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass dieses Enzym zum Messzeitpunkt (normale Kontrolltiere ohne Hypoxie) nicht in der mitochondrialen Matrix vorhanden war und aus diesem Grund keine Zunahme der Respiration beobachtbar war.

#### 4.2.4.3.6 Einfluss von Oxalacetat und Acetat auf isolierte Mitochondrien

Wenn man die Kombination aus Oxalacetat und Acetat zu der Zellsuspension hinzugibt, erkennt man eine Zunahme der Respiration (s. **Abb. 87**). Aus diesem Ansatz kann geschlossen werden, dass die Erhöhung der Respiration auf Oxalacetat zurückzuführen ist, da bei alleiniger Gabe von Acetat die Respiration sinkt. In **Kap. 1.7.3 Malat - Aspartat - Shuttle** wurde die mögliche Erklärung für die Erhöhung der Respiration angeboten. Die in der Glykolyse (Cytosol) generierten  $\text{NADH} + \text{H}^+$  Äquivalente können nicht durch die Mitochondrienmembran diffundieren. Aus diesem Grund benutzen Eukaryonten das Malat - Aspartat - Shuttle (s. **Abb. 14**). Bedingung für den Anstieg der Respiration durch Oxalacetat ist die Umwandlung von Oxalacetat in Malat, was wiederum durch einen Transporter in die Mitochondrien gelangen kann. Das Enzym was diese Reaktion katalysiert ist die *cytosolische Malatdehydrogenase* (c - MDH) (s. **Kap. 1.7.3 Malat - Aspartat - Shuttle**). Die cytosolische Form dieses Enzyms sollte wie alle anderen cytosolischen Enzyme nach Aufreinigung nicht mehr in der Zellsuspension vorhanden sein. Eine mögliche Erklärung für die ansteigende Respiration nach Zugabe von Oxalacetat und Acetat liegt in einem Transporter an der äußeren Mitochondrienmembran [329], [330]. Dieser Transporter hat einen  $K_m$  - Wert von 80 - 140  $\mu\text{M}$  für Oxalacetat, was in dem vorliegenden Versuch auch im Bereich der resultierenden Konzentration von Oxalacetat in der Kammer der Sauerstoffelektrode lag. Somit ist ein Transport in die Mitochondrien vorstellbar. Der weitere Weg des Oxalacetats liegt in der Einschleusung in den Citratzyklus, wo die Reduktionsäquivalente  $\text{NADH} + \text{H}^+$   $\text{FADH}_2$  für die Atmungskette regeneriert werden. Durch ein Mehr an Oxalacetat ergibt sich somit ein Mehr an Respiration in isolierten Mitochondrien.

#### 4.2.4.3.7 Einfluss von Citrat auf isolierte Mitochondrien

Als letztes Substrat in dieser Versuchsreihe wurde Citrat verwendet, was die Respiration der isolierten Mitochondrien leicht gesteigert hat (s. **Abb. 87**). Citrat kann bis in die mitochondriale Matrix aufgenommen werden, sogar ausgehend vom Plasma [331]. Citrat gelangt durch die äußere Mitochondrienmembran durch freie Diffusion in das Mitochondrium, über sogenannte Anionen selektive Kanäle [332]. Um die mitochondriale Matrix zu erreichen bedarf es eines selektiven Citrat Transporters (CTP = citrate transport protein), der in Abhängigkeit der benötigten Energie einer Zelle



in beide Richtungen arbeiten kann [331]. Somit kann das zugegebene Citrat als Substrat im Citratzyklus verstoffwechselt werden und somit auch Reduktionsäquivalente generieren, die über die Atmungskette zur Regenerierung von ATP aus ADP benutzt werden können [331], [332]. Die einzige Aussage die aus der Versuchsreihe getroffen werden kann ist, dass das Protokoll zur Aufreinigung von Mitochondrien so konzipiert wurde, dass die Mitochondrien keinen wesentlichen Energiemangel bis zum Ende der Vermessung in der Kammer der Sauerstoffelektrode unterliegen.

#### 4.2.5 Zusammenfassung und Ausblick

Bei einer exogenen Gabe einer BHB Lösung kann eine suffiziente Ketose induziert werden. Die Ketose, die durch eine Dosierung von 30 mg/kg KG BHB induziert wird, entspricht einer Plasmakonzentration von ungefähr 3 – 4 mM. Die höchste gewählte Dosierung von 100 mg/kg KG bedingt eine weitaus höhere Ketose mit ca. 11 – 12 mM. Mithilfe der Mikrodialyse konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Gabe von BHB eine Erhöhung im Mikrodialysat bedingt. Aus physiologischer Sicht sind die MCT - 1 verantwortlich für den Transport von BHB über die Bluthirnschranke. Die Aufnahme von BHB korreliert dabei mit der vorherrschenden Konzentration im Plasma. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von BHB kann eine Dauerinfusion bzw. eine Mehrfachgabe in Betracht gezogen werden. Die Dauerinfusion bzw. die Mehrfachgabe besitzen den Vorteil, langanhaltende und konstantere Ketosen zu induzieren.

Die Tiere, die im Rahmen des Schlaganfalls eine BHB Lösung verabreicht bekommen haben, konnten nach 24 h die Verhaltenstests besser bewältigen. Die Kontrollgruppen haben eine Kochsalzlösung erhalten. Von den drei möglichen Dosierungen hat die Gabe von 30 mg/kg KG einen signifikanten Unterschied zu der Kontrollgruppe erbracht. Die aufgeführten Ergebnisse spiegeln die Erholung der Tiere nach 24 h wieder. Die STAIR Richtlinien sowie mehrere Studien zum Ausgang eines Schlaganfalls weisen daraufhin, dass sich die positiven Effekte einer Intervention innerhalb einer Woche nahezu nivellieren können [301]; [314]. Aus diesem Grund sollten weitere Untersuchungen mit Zeitpunkten zwischen 48 bis 168 h nach dem Schlaganfall durchgeführt werden. Nur mithilfe dieser Maßnahme kann eine Aussage über die Wirksamkeit von BHB Lösungen auf die Regeneration nach Schlaganfällen getroffen werden.

Die positiven Effekte, die BHB auf das Verhalten der Mäuse gezeigt hat, können durch hormonelle, metabolische oder biochemische Effekte pharmakodynamisch beschrieben werden. Auf metabolischer Ebene generiert ein Molekül BHB zwei Moleküle Acetyl – CoA, die den Citratzyklus weiter betreiben können. Die *Citratsynthase* unterliegt im Schlaganfallgeschehen einer Schädigung, die durch eine Gabe von BHB vermieden werden kann. Die Substratverfügbarkeit scheint ein wichtiger Aspekt für die Funktion der *Citratsynthase* zu sein. Auf hormoneller Ebene ist nachgewiesen, dass BHB die Anzahl an Depolarisationen im *Locus coeruleus* erhöht [296]. Während des Schlaganfalls steigen die Konzentrationen an Catecholaminen und Korticosteron an [252]. Dieser permissive Effekt auf den Sympathikustonus bedingt eine erhöhte Lipolyse und eine Steigerung der hepatischen Ketogenese [263], [265]. Außerdem steigert der erhöhte Sympathikustonus auch die Freisetzung von Glukagon aus den  $\alpha$  – Zellen des Pankreas [263]. Durch den Anstieg an Glukagon verändert sich das Verhältnis von Insulin zu Glukagon, was zu einer erhöhten Ketogenese führen kann [248]. Die beschriebenen Effekte können erhöhte Konzentrationen von Ketonkörpern 24 h nach dem Schlaganfall erklären. Die *Sirtuine* beschreiben eine Klasse von Histondeacetylasen, die durch ein erhöhtes Verhältnis von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  aktiviert werden können. Vor allem *Sirtuin 3* scheint

eine Histondeactylase zu sein, die beim Schlaganfall involviert ist und der sowohl positive als auch negative Eigenschaften zugeschrieben werden [280]; [282]. Im Rahmen der positiven Effekte werden zwei Ursachen für verringerte Schädigung von Proteinstrukturen durch ROS postuliert. Die erste Zielstruktur ist die *Superoxid – Dismutase II*, die freie Sauerstoffradikale zu Wasserstoffperoxid umsetzt. Als zweite Zielstruktur wird der Transkriptionsfaktor FOXO3a genannt. Die Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress wird durch eine vermehrte Expression FOXO3a gesteigert. Alle drei beschriebenen Mechanismen, über die BHB wirken kann, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit parallel ablaufende Prozesse, die die erhöhte Widerstandsfähigkeit von Neuronen gegenüber hypoxischen Perioden erklären können.

Die Substrateinflüsse auf die mitochondriale Respiration werden in **Tab. 34** zusammengefasst.

| <b>Substrat / Agens</b>    | <b>Effekt auf die mitochondriale Respiration</b> | <b>Bemerkung</b>  |
|----------------------------|--|---|
| <b>BHB</b>                 | ↑  | Enzyme zur Umwandlung in Mitochondrien vorhanden → Acetyl – CoA kann in den Citratzyklus eingeschleust werden |
| <b>Glukose</b>             | ↓  | Saccharose im Überschuß im Medium für isolierte Mitochondrien enthalten                                       |
| <b>Propranolol</b>         | ↓  | Membranstabilisierung durch erhöhte Konzentrationen möglich   |
| <b>Laktat</b>              | →  | Das Enzym LDH ist cytosolisch   |
| <b>Acetat</b>              | ↓  | Mitochondrien haben durch Medium kein Hungersignal → Acetyl –CoA Carboxylase wird nicht induziert             |
| <b>Oxalacetat + Acetat</b> | ↑  | Transfer von Oxalacetat ins Mitochondrium durch Malat – Aspartat Shuttle möglich                              |
| <b>Citrat</b>              | ↑  | Transporter bis in die mitochondriale Matrix vorhanden (CPT) → Metabolisierung möglich                        |

*Tab. 34 Substrateinflüsse auf die mitochondriale Respiration*

## 4.3 Etablierung und Validierung der Gaschromatographie gekoppelt mit einem Massenspektrometer (GC - MS)

In der pharmazeutischen Analytik werden hohe Anforderungen an die zugrundeliegende Analytik gestellt. Das an dieser Stelle beschriebene Analyseverfahren hat zur Aufgabe, einzelne Organsysteme systematisch auf metabolische Veränderungen zu untersuchen. Es wurden Protokolle zur Vermessung etabliert, die es erlauben, Leber- und Hirnhomogenate, Plasma und Mikrodialysate als Probenmaterial zu vermessen. Mithilfe dieser Methodik können Aussagen über die Pharmakokinetik von Arzneistoffen, von verabreichten Diäten aber auch Nachweise über Arzneimittelkonzentrationen in bestimmten Kompartimenten getroffen werden. Das Messverfahren kann zu jeder Zeit auch auf andere Organsysteme ausgeweitet werden, solange die zu vermessenden Konzentrationen über der Bestimmungsgrenze liegen.

Der Begriff der Validierung ist laut Definition von Kromidas der Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer Methode [334]. Im Folgenden wird die Validierung der GC - MS Analytik angelehnt an die geltenden Standards in der pharmazeutischen Industrie näher ausgeführt. Vor allem die GMP – konforme (*good manufacturing practice*) Etablierung und Validierung nach ICH Q2 (R1) Richtlinien, die *aide memoire* der Regierungspräsidien, der EMA (*European Medicines Agency*) sowie die DIN ISO 8402 und 32645 werden als Hilfestellung benutzt [334] – [336]. Die genannten Regelwerke stellen die verbindliche Grundlage für die Etablierung und Validierung von analytischen Messverfahren nach GMP Richtlinien dar. Die wichtigsten sechs Säulen der Validierung von analytischen Messverfahren sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt.

1. Richtigkeit und Selektivität
2. Präzision
3. Linearität
4. Nachweis – und Bestimmungsgrenze
5. Robustheit
6. Wiederfindungsrate

Anhand dieser sechs Punkte wird die Validierung der GC - MS Analytik diskutiert.

### 4.3.1 Richtigkeit und Selektivität

Um die Richtigkeit eines analytischen Messverfahrens nachzuweisen, gibt es unterschiedliche Verfahren, die im Folgenden aufgeführt sind [176], [334], [336], [337]:

- Vergleich mit einer Referenzsubstanz
- Vergleich mit bestehender validierter Methode
- Aufstocken einer Probe („Spiken“)
- Nachweise der Richtigkeit über die Selektivität

Alle Analyte, die in **Tab. 16** aufgeführt sind, wurden im chemischen Großhandel als Reinsubstanz bestellt, wobei der Reinheitsanspruch bei > 99,5 % gelegen hat. Die bestellten Referenzsubstanzen wurden zuerst einem qualitativen Nachweis mithilfe der N.I.S.T. (National Institute for Standard and Technology) Datenbank für Massenspektren unterzogen [180]. Hierzu wurden sehr hohe Massenkonzentrationen (500 - 1000 ng/μl) der Substanzen einzeln vermessen (Spektren nicht

gezeigt) und das entstandene Massenspektrum mithilfe der N.I.S.T. Datenbank verglichen. Das verwendete Computerprogramm (ChemStation) beinhaltet die Datenbank und besitzt hinterlegte Algorithmen, mit denen der Grad der Übereinstimmung (*Quality-Index*) des hinterlegten Spektrums und des vermessenen Spektrums bestimmt werden kann (s. **Abb. 53**). Nur wenn der *Quality - Index* bei > 95 % liegt, wurde die Substanz als qualitativ nachgewiesen deklariert. Über Mehrfachbestimmungen (3 - 5 Wiederholungen) wurde eine falsche Interpretation nahezu ausgeschlossen. Die Retentionszeiten der vermessenen Substanzen lag immer im vorgesehenen Bereich (Retentionszeit  $\pm$  0,02 s.) (s. **Abb. 54 Total-Ionen-Chromatogramm (TIC)**). Ein weiterer aussagekräftiger Parameter ist die relative Retentionszeit, die das Verhältnis zwischen internem Standard und zu vermessender Referenzsubstanz wiedergibt [180]. Da die Retentionszeiten der unterschiedlichen Referenzsubstanzen eine sehr kleine zeitliche Abweichung besitzen, liegen auch die relativen Retentionszeiten nahe beieinander (Daten nicht gezeigt). Das beschriebene Vorgehen wurde für jede Substanz angewendet. Anschließend wurde die Auflösung der einzelnen Peaks im Gesamtkontext bestimmt (s. **Abb. 54**). Dieses Verfahren wird auch als aufstockende Methode beschrieben („Spiken“) [334].

Die Richtigkeit eines Analyseverfahrens kann auch über die Selektivität nachgewiesen werden [336]. Die GC - MS Analytik in der vorliegenden Arbeit ist dann selektiv, wenn alle Substanzen aus **Abb. 54** nebeneinander ohne Verfälschung des Ergebnisses (Basislinientrennung aller Substanzen) in einem Lauf nachgewiesen werden können. Mit diesen zwei Methoden kann die Richtigkeit des qualitativen Nachweises als erbracht angesehen werden.

Ein wesentlicher Punkt der Richtigkeit beschreibt die quantitative Analyse, die in dem beschriebenen Verfahren nur über einschlägige Literatur bzw. mithilfe des CMA 600 für ausgewählte Substanzen erbracht werden kann. Die Substanzen Laktat, Pyruvat, Glukose und Glutamat können mit dem CMA 600 verglichen werden. Die absoluten Konzentrationen von Laktat und Glukose liegen im unteren  $\mu$ M Bereich, sowohl Ergebnisse die mit dem CMA 600 vermessen wurden als auch Ergebnisse die mit der GC - MS Analytik vermessen wurden, zeigen Übereinstimmung in den erhaltenen Konzentrationen [211], [338]. Während Horn et al. 2010 für Laktat absolute Konzentrationen (CMA 600) im Bereich zwischen 0,1 - 0,4 mM im Mikrodialysat erhalten hat, wurden mit der GC - MS Methodik absolute Werte im Bereich zwischen 0,1 - 0,5 mM gemessen (s. **Abb. 64**). Die absoluten Konzentrationen von Glukose im Mikrodialysat wurden von Berressem et al. 2016 im Bereich zwischen 0,05 - 0,15 mM gemessen, während die GC - MS Methodik Messwerte zwischen 0,1 - 0,2 mM aufwies [211]. Um die Richtigkeit der Messmethode weiter zu stärken, werden an dieser Stelle die absoluten Plasmawerte für Glukose und Laktat mit den Werten aktueller Literatur bzw. Referenzwerten aus Datenbanken verglichen [323]; [324]. Die absoluten Plasmawerte für Glukose bei Mäusen liegen zwischen 3,5 - 9,8 mM ( $\triangleq$  62 - 175 mg/dl). Die mit der GC - MS Analytik gemessenen Werte liegen bei 2 - 12 mM. Diese gemessenen Werte weichen von den Werten in der Literatur ab. Allerdings soll an dieser Stelle auf die unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Referenzwerte und deren Variation verwiesen werden [341]. In Bezug auf die absoluten Laktatwerte liegen die Literaturwerte zwischen 0,8 - 2,0 mM [339] - [341]. Im Vergleich erhält man Werte zwischen 0,5 - 3 mM mit der etablierten GC - MS Analytik (Daten nicht gezeigt). Abschließend kann in Bezug auf die absoluten Werte von Glukose und Laktat im Mikrodialysat bzw. im Plasma festgehalten werden, dass die erhaltenen Werte und die abschließende Berechnung als richtig definiert werden dürfen.

Die zentrale chemische Struktur in dieser Arbeit ist BHB. Der qualitative Nachweis erfolgte wie im oberen Absatz beschrieben über die N.I.S.T Datenbank sowohl in einem Einzellauf, als auch im Gesamtkontext aller Substanzen (s. **Abb. 53**). Um auch einen Nachweis der quantitativen Richtigkeit der Bestimmung mithilfe der GC - MS Analytik zu erbringen wird ein Vergleich mit bestehender Literatur herangezogen. Dazu werden vor allem Plasmakonzentrationen von BHB als Vergleich herangezogen. Vor allem die Arbeiten von Puchowicz und Zheng sind aufgrund der Äquivalenz der verwendeten Methodik geeignet, um diesen Nachweis zu erbringen [223]; [256]; [296]. Die Literatur gibt die Konzentrationen von BHB im Plasma bei Kontrolltieren zwischen 0,1 – 0,5 mM an, während bei fastenden Tieren Konzentrationen von bis zu 5 mM erreicht werden. Mit der hier verwendeten GC - MS Analytik wurden sowohl in Kontrolltieren, als auch fettreich gefütterten Tieren vergleichbare Konzentrationen festgestellt (s. **Abb. 68**). Die Maximalkonzentration von BHB in der vorliegenden Arbeit liegt im Plasma bei bis zu 1,2 mM, während die niedrigen Konzentrationen von BHB mit der Literatur übereinstimmen. Ursächlich ist hier die gewählte fettreiche Diät, die noch einen geringen Anteil an Kohlenhydraten enthält, im Vergleich zu rein ketogenen Diät bei den Arbeiten von Puchowicz und Zheng. Somit kann die Quantifizierung von BHB mit der hier beschriebenen Methodik vollzogen werden.

Die Messwerte von Pyruvat und Glutamat werden an dieser Stelle als Beispiele genannt, wo die GC - MS Analytik nicht geeignet ist, um eine adäquate Quantifizierung (ohne deuterierte interne Standards) in unterschiedlichen Kompartimenten zu ermöglichen. Sowohl Pyruvat als auch Glutamat haben aufgrund ihrer chemischen Struktur die Eigenschaft, relativ leicht zu decarboxylieren. Pyruvat ist eine  $\alpha$  - Ketosäure und Glutamat eine  $\alpha$  - Aminosäure, die durch ihre Funktionalitäten in beiden Fällen mit geringer Aktivierungsenergie decarboxylieren [225]. Bei einer Inlet Temperatur von 270 °C und einer Ionisationsenergie von 70 eV wird den beiden Strukturen soviel Energie zugefügt, dass man im Vergleich zu thermostabilen Substanzen wie BHB eine deutliche Abnahme der *Abundance* beobachten kann (s. **Abb. 54**). Eine Möglichkeit, um beide Analyte trotzdem mit der GC - MS Analytik zugänglich zu machen, ist der Einsatz von deuterierten Standards. Bei diesen deuterierten Standards kann aufgrund vergleichbarer physikochemischer Eigenschaften von einer vergleichbaren Decarboxylierung ausgegangen werden. Allerdings erhöht sich aufgrund der Decarboxylierung auch die Nachweisgrenze um den Faktor 10 - 100, was einer absoluten Konzentration von 10 – 20  $\mu$ M entspricht (s. **Abb. 89, Abb. 91**). Diese Nachweisgrenzen sind im pharmakologischen Kontext so hoch, dass besser mit spektrometrischen Methoden gearbeitet werden sollte. Allgemein sind Substanzen, die chemisch oder thermisch nicht stabil sind, grundsätzlich zugänglich mit der GC - MS Analytik [342]. Diese Substanzen müssen mit einem deuterierten Standard vermessen werden, da die Instabilität nur mit einer vergleichbaren physiko - chemischen Substanz gewährleistet und somit quantifizierbar ist.

### 4.3.2 Linearität

Eine Methode ist dann linear, wenn das vom Detektor erhaltene Messsignal direkt proportional zur Analytkonzentration ist [334]. Der lineare Bereich der vorliegenden Methode wurde im Bereich zwischen 0,01 – 100 ng/ $\mu$ l für alle zu bestimmenden Substanzen gezeigt (s. **Abb. 89, Abb. 90, Abb. 91, Abb. 92**). Aufgrund des Grundrauschens des Detektors verläuft die *Abundance* der Analyte nicht durch den Nullpunkt. Aus diesem Grund wurde eine Kalibrierung mit 5 bzw. 6 unterschiedlichen Konzentrationen gewählt, die sich jeweils um eine Zehnerpotenz unterschieden haben. Es wurden Konzentrationen im Bereich zwischen 100 – 10000 ng/ $\mu$ l vermessen (Daten nicht gezeigt), die ab

einer Massenkonzentration zwischen 5000 – 10000 ng/μl keine Linearität mehr aufwiesen. Somit lässt sich ein Arbeitsbereich für die meisten Analyte im Bereich zwischen 0,1 – 1000 ng/μl definieren. Die Analyte Pyruvat und Glutamat weichen von diesem Arbeitsbereich ab. Sie liegen zwischen 1 – 1000 ng/μl. Möchte man einen genaueren Arbeitsbereich definieren, müssen die oberen bzw. unteren Bereiche der linearen Regression mit kleineren Konzentrationsschritten (0,1 – 0,25 – 0,5 – 0,75 – 1) vermessen werden. Hierzu sollten Konzentrationen im unteren (0,01 – 0,1 ng/μl) bzw. im oberen Konzentrationsbereich (1000 – 5000 ng/μl) verwendet werden. Als anderer Nachweis der Methode kann eine Einpunktkalibrierung durchgeführt werden. Dabei muss ein Referenzspektrum (nur Matrix) aufgenommen werden und dieses anschließend von den erhaltenen Spektren subtrahiert wird. Mit dieser Maßnahme verläuft das Detektorsignal durch den Nullpunkt und ermöglicht so eine Einpunktkalibrierung [315]; [317]. Der Detektor selbst wird mit einer Kalibrierlösung, bestehend aus PFTBA (Per - flour - tetra - butyl - amin) jede Woche neu kalibriert. Die Substanz PFTBA besitzt typische Zerfallsfragmente, mit denen die detektierten Massen 69, 131, 219, 414 und 502 kalibriert werden. Nur bei regelmäßiger Kalibrierung des Detektors kann eine adäquate Messgenauigkeit über den linearen Bereich gewährleistet werden.

### 4.3.3 Nachweis – und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze beschreibt die kleinste noch qualitativ nachzuweisende Konzentration eines Analyten [334]. In der vorliegenden Arbeit werden zwei Möglichkeiten zur Bestimmung der Nachweis – bzw. Bestimmungsgrenze vorgestellt. Die erste Methode beschreibt ein Verfahren, was basierend auf der DIN 32645 entstanden ist [343]. Bei diesem Verfahren wird die Nachweisgrenze als unterste noch zu detektierende Konzentration angegeben und die Bestimmungsgrenze als der Bereich der Kurve, der noch einen adäquaten Korrelationskoeffizienten besitzt. Es gibt keine Angabe wie Werte von einem Korrelationskoeffizienten von 1 abweichen dürfen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Korrelationskoeffizient von  $< 0,998$  als nicht mehr quantifizierbar definiert. Für eine bessere Darstellbarkeit der Daten, wurden die erhaltenen Konzentrationen doppellogarithmisch aufgetragen und anschließend linear angepasst (s. **Abb. 89**, **Abb. 90**, **Abb. 91**). Gezeigt sind nur Konzentrationen, die noch einen Regressionskoeffizienten ( $R^2$ ) von mindestens 0,998 aufgewiesen haben. Die Ausnahme stellt Pyruvat, Glutamat und GABA dar, die höhere Nachweisgrenzen besitzen. Um den eigentlichen Arbeitsbereich der Methode darzustellen, wurde auf die unteren Konzentrationen (0,001 – 0,0001 ng/μl) verzichtet. Stattdessen wurde ein Bereich definiert, indem die Methode mit hoher Wahrscheinlichkeit linear arbeitet. Abschließend können die Nachweisgrenzen aus den **Tab. 28**, **Tab. 29**, **Tab. 30** **Tab. 31** als Massen – bzw. Stoffmengenkonzentrationen abgelesen werden. Die Bestimmungsgrenzen können vereinfacht als doppelte Nachweisgrenzen definiert werden [334]. In der Praxis ist es oftmals so, dass man den 5 – 10 fachen Wert des Grundrauschens als Bestimmungsgrenze definiert [334]. Die Bestimmungsgrenzen können so vereinfacht aus den oben genannten Werten bestimmt werden und liegen im Bereich zwischen 1 – 20 μM (s. **Tab. 28**, **Tab. 29**, **Tab. 30**, **Tab. 31**). Wenn man das Grundrauschen als Bezugsgröße zur Bestimmung der Nachweis – bzw. Bestimmungsgrenze benutzt, erhält man niedrigere Werte, die im Bereich zwischen 0,1 – 5 μM liegen (Daten nicht gezeigt) [334].

#### 4.3.4 Robustheit

Die Robustheit eines Systems beschreibt die Konstanz in einem Messsystem bei Veränderungen der Testbedingungen. Die Ergebnisse dürfen bei einer Veränderung der Testbedingungen nur unwesentlich von den ursprünglichen Ergebnissen abweichen. Im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit wurden alle Veränderungen der einzelnen Schritte der Etablierung dargestellt. Die Etablierung beinhaltete die Temperatur - und Zeitabhängigkeit der Silylierung, die Extraktionseffektivität, die Lösungsmittelabhängigkeit und der Zusatz von Hünig - Base.

Die Robustheit der GC - MS Analytik wurde über die Messergebnisse am Anfang und am Ende einer Analysenserie erhoben. Hierzu wurde ein festgelegter Mix mit allen Substanzen inkl. der internen Standardverbindungen (alle 100 ng/μl) vermessen. Dieser Mix wurde nach jeder dritten Probe vermessen. Diese Maßnahme wurde aufgrund der sehr umfassenden Probenvorbereitungen als sinnvoll erachtet. Die in dieser Arbeit gezeigten Messergebnisse verhalten sich über den Messzeitraum konstant. Im Falle von Pyruvat, Glutamat und GABA verhielten sich diese Standardsubstanzen unterschiedlich. Während die *Abundance* von Pyruvat und Glutamat über die Zeit abgenommen haben, verhielt sich die *Abundance* von GABA konstant. Allerdings gibt es bei der Silylierung von GABA zwei potentielle Produkte, nämlich einmal das di-TMS GABA und das tri-TMS GABA. Verantwortlich hierfür ist die Aminogruppe in der chemischen Struktur von GABA, die in Abhängigkeit mit der Zeit einmal einfach und mit der Zeit zweifach silyliert wird. Das zweifach silylierte Produkt wandelt sich später in das scheinbar stabilere dreifach silylierte Produkt um. Wenn man die *Abundance* des zweifach und des dreifach silylierten Derivates von GABA addiert, erhält man einen konstanten Wert über die Zeit. Der interne Standard 6 – Aminocaproat zeigt im Vergleich mit GABA das gleiche Verhalten in Bezug auf die Umwandlung. Aus dem beschriebenen Sachverhalt lässt sich ableiten, dass interne Standardverbindungen (am besten deuterierte Substanzen) für die gesamte GC - MS Analytik dringend erforderlich sind.

Die Temperatur und Zeitabhängigkeit der Silylierung wurde auf Basis der Publikation von Saraiva et al. 2011 vorgenommen und für das bestehende Protokoll überprüft [213]. Die vorgeschlagene Temperatur zur Derivatisierung mit BSTFA/TMCS wurde mit 60 °C und 30 min. Dauer vorgeschlagen. In der Publikation wurden Sterolgrundgerüste vermessen, wobei die hier verwendete Temperatur und Zeit für die Silylierung vor allem für Hydroxycarbonsäuren und einfache aliphatische Carbonsäuren angepasst wurden. In **Abb. 60** ist die Temperatur und die Dauer der Silylierung grafisch dargestellt. Aus diesen Ergebnissen wurde eine Temperatur von 70 °C bei einer Dauer von 50 min. abgeleitet. Bei diesem Protokoll ist immer der Gesamtkontext an Analyten in einem Lauf zu berücksichtigen. Die Substanzen müssen in jedem Lauf Basislinientrennung aufweisen.

Die Effektivität der Extraktion wird in **Kap. 4.3.5 Wiederfindungsrate** detailliert beschrieben und diskutiert. Neben der Extraktion spielt auch die Wahl des Lösungsmittels eine entscheidende Rolle für die Leistungsfähigkeit der GC - MS Analytik. Die Extraktionen wurden nach einer klassischen Folch Extraktion vollzogen [217]. Die wäßrigen Phasen wurden nach drei Extraktionsschritten (s. **Abb. 59**) vereint. Diese vereinte Phase wurde bis zur Trockne eingedampft. Der feste Rückstand hat eine hohe Masse, die nicht, wie von Brunengraber postuliert, alleine mithilfe der Silylierungsreagenzien in Lösung zu bringen ist [214]. Aus diesem Grund benötigt man ein potentes Lösungsmittel, was im optimalen Fall auch weitere Funktionen bei der Silylierung übernimmt. Das optimale Lösungsmittel für das bestehende Protokoll ist Pyridin (s. **Kap. 2.3.2.5.1 Pyridin**) Pyridin hat sowohl eine ausserordentlich gute Löslichkeit für die meisten polaren Substanzen als auch eine Hilfsfunktion bei



der Silylierung [342]. Es bildet mit TMCS ein elektrophiles Zwischenprodukt, was die Ausbeute an silylierten Produkten erhöht und die Umsetzungsgeschwindigkeit steigert [226]. Zusätzlich dient es als Protonenfänger und bedingt so nach dem *Le - Chatelier* Prinzip eine höhere Ausbeute. Außerdem sind saure Hydrolysereaktionen irreversibel, was im Rahmen der Probenvorbereitung hydrolyseempfindliche Substanzen zerstören kann [225]. Die Wahl des Lösungsmittels wie auch die Wahl des Silylierungsmittels stellt im pharmakologischen Kontext immer ein Kompromiss dar. Die Metaboliten variieren chemisch stark, sodass unterschiedliche funktionelle Gruppen nebeneinander vorliegen und silyliert werden müssen.

Der Zusatz von Hünig - Base erfolgt ebenfalls auf dem Prinzip der höheren Ausbeute. Im Unterschied zu Pyridin gibt die Hünig - Base das gebundene Proton aus sterischen Gründen nicht ab und bedingt somit eine konstantere Ausbeute an Derivaten. Im Rahmen von Testreihen wurde das optimale Verhältnis zu Pyridin untersucht (s. **Abb. 93, Abb. 94, Abb. 95**). Ein Verhältnis von 70 / 30 Pyridin zu Hünig – Base hat sich gemittelt über alle Analyte als förderlich in Bezug auf die Steigerung der *Abundance* gezeigt.

### 4.3.5 Wiederfindungsrate

Die Extraktionseffektivität wurde für die beiden internen Standardverbindungen Salicylat und Phtalat untersucht (s. **Abb. 99**). Mithilfe dieser Versuchsreihe wird untersucht, ob bzw. mit welchem Prozentanteil die Substanzen mit dem bestehenden Extraktionsverfahren am Ende der Extraktion in den Reaktionsgefäßen vorzufinden sind. Aufgrund der Komplexität der verwendeten Gewebe wurde Salicylat und Phtalat als Surrogat für die zu extrahierenden Substanzen ausgewählt. Diese Annahme würde einer industriellen Validierung nicht standhalten. Normalerweise müsste man ein Medium entwickeln, in dem alle Komponenten der jeweiligen Gewebe enthalten sind, jedoch nicht die zu quantifizierenden Analyte. In dieses Medium müsste man eine bekannte Konzentration der zu quantifizierenden Analyte zusetzen und die Versuchsreihe wiederholen. Diese Aufgabe würde jeden zeitlichen Rahmen dieser Arbeit überschreiten. Aus diesem Grund wurden die beiden internen Standardverbindungen unter der Annahme untersucht, dass die Analyte sich bei der Extraktion gleich den internen Standardverbindungen verhalten. Optimalerweise muss man für diese Annahme deuterierte Verbindungen verwenden, da diese Verbindungen sich gleich bei dem etablierten Verfahren verhalten würden. Allerdings übersteigt dieser Anspruch den finanziellen Rahmen. Abschließend kann man die Empfehlung geben, in den folgenden Projekten, in Abhängigkeit der Fragestellung, für die zu analysierenden Substanzen vorher deuterierte Standards zu etablieren und die Projekte auf Basis dieser Ergebnisse durchzuführen.

Auch die Mikrodialyse weist eine Wiederfindungsrate auf. Die verwendeten Dialysemembranen weisen eine selektive Durchlässigkeit für polare Substanzen auf. Damit man die absoluten Konzentrationen eines Analyten im Gehirn, auf Basis der Konzentrationen im Mikrodialysat, zurückrechnen kann, benötigt man die Wiederfindung der Substanz im Mikrodialysat. Die verwendeten Mikrodialysesonden wurden wie in **Kap 2.1.1.4.2 Bau der Mikrodialysesonde** beschrieben, in Eigenbau angefertigt. Aufgrund der selbst gefertigten Sonden gibt es im Vergleich zu industriell gefertigten Sonden mehrere Problemstellungen. Insbesondere die Festlegung der Austauschfläche mit Silikonkleber stellt eine besondere Herausforderung dar. Die Austauschfläche kann selbst bei einheitlicher Bauweise von Sonde zu Sonde unterschiedlich sein. Um diese Variabilität so gering wie möglich zu halten, wurden für die Mikrodialysestudien in der vorliegenden Arbeit die Wiederfindungsraten für jede Sonde separat bestimmt. Durch die Bestimmung der

Wiederfindungsrate für jedes einzelne Tier, kann der Fehler am Ende der Analysenserie verringert werden. Die verwendeten CD - 1 Mäuse sind Auszuchtstämme und haben genetisch begründet unterschiedliche Konzentrationen der verschiedenen Metabolite im Gehirn. Die ermittelten Werte für die Wiederfindungsrate liegen im Bereich zwischen 4 – 14 % (s. **Abb. 100**). Kiewert et al. 2010 hat im Rahmen einer Schlaganfallstudie die Wiederfindungsraten für Glukose, Laktat, und Glutamat mit den gleichen Sonden erhoben [344]. Die Messwerte wurden mit einem CMA 600 bestimmt und liegen für Glukose bei 6,3 %, für Laktat bei 9,2 % und für Glutamat bei 22 %. Mit der etablierten GC – MS Analytik liegen diese Werte für Glukose zwischen 4 - 6 %, für Laktat bei 5 – 7 % und für Glutamat bei 4 – 5 %. Für die beiden Intermediate des Stoffwechsels Glukose und Laktat erscheinen die Wiederfindungsraten plausibel. Im Falle des Glutamats, unterschreiten die Werte deutlich den von Kiewert et al. 2010 gemessenen Wert. Glutamat als chemische Struktur kann unter den Analysenbedingungen der GC - MS decarboxylieren, was die niedrigere Wiederfindung erklären kann. Ein weiterer Punkt betrifft die Beständigkeit der verwendeten Membran. Die Produktion des Sondenmaterials wurde von Seiten des Herstellers eingestellt. Der Arbeitskreis hat im Rahmen der Einstellung ein Vorratslager an Membranen angelegt. Dieser Vorrat wird unter Schutzatmosphäre gelagert. Allerdings kann eine Abnahme der Wiederfindung nicht ausgeschlossen werden. Im Vergleich zu den Wiederfindungsraten von GABA kann dieses Ergebnis nicht endgültig erklärt werden.

#### **4.3.6 Zusammenfassung und Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Messverfahren auf Basis der GC – MS entwickelt und in Anlehnung der gängigen Richtlinien für die pharmazeutische Industrie validiert. Mit diesem System ist es möglich, vier unterschiedliche Kompartimente (Mikrodialysate, Plasma, Leber – und Hirnhomogenate) mit theoretisch 15 unterschiedlichen Metaboliten zu untersuchen. Aufgrund der enormen Fülle an Metaboliten in den einzelnen Kompartimenten, können ohne Probleme weitere Metaboliten bzw. Kompartimente erschlossen werden (Bsp. Urin oder Aminosäuren). Die Ansprüche der industriellen Validierung von Messverfahren konnten in der vorliegenden Arbeit nicht alle umgesetzt werden. Allerdings wurde die Etablierung und Validierung der GC – MS Analytik so umgesetzt, dass die Messergebnisse in einem akzeptablen Vertrauensbereich liegen. In Zukunft sollte der Anspruch erhoben werden, isotonenmarkierte Verbindungen als interne Standardverbindungen zu etablieren. Begründet liegt diese Aussage in dem sehr ähnlichen Verhalten dieser Verbindungen zu ihren nicht isotonenmarkierten Verwandten. Alleine diese Maßnahme würde die Fehleranfälligkeit des Messverfahrens drastisch senken.

Im Folgenden werden die sechs Hauptsäulen der Validierung der GC – MS in tabellarischer Form zusammengefasst.

| Hauptpunkt                              | Maßnahme  | Bemerkung   |
|---|---|---|
| <b>Richtigkeit und Selektivität</b>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Quality – index für qualitativen Nachweis &gt; 95 %</li> <li>• „Spiken“ der Probe um Gesamtkontext zu erhalten</li> <li>• Nachweis der Richtigkeit über die Selektivität</li> <li>• Vergleich mit absoluten Werten in der Literatur</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alle etablierten Substanzen haben Quality – Index &gt; 95 %</li> <li>• Die Substanzen können mit Basislinientrennung im Gesamtkontext nachgewiesen werden</li> <li>• Die absoluten und relativen Retentionszeiten bleiben konstant</li> <li>• Vergleich der absoluten Werte anhand Glukose, Laktat ergab Übereinstimmung mit dem CMA 600</li> <li>• Der Vergleich von absoluten Konzentrationen mit bestehender Literatur ergab Übereinstimmung</li> </ul> |
| <b>Linearität</b>                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Massengenauigkeit des Detektors mithilfe eines Kalibrierstandards</li> <li>• Konzentrationsbereich angeben</li> <li>• Mehrpunktkalibrierung über Messbereich definieren</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wöchentliche Kalibrierung des Detektors mit PFTBA</li> <li>• Konzentrationsbereich Bereich zwischen 0,01 – 1000 ng/µl linear</li> <li>• Mehrpunktkalibrierung mit Korrelationskoeffizient &gt; 0,998</li> <li>• Bei Pyruvat, Glutamat ist isotopenmarkierter interner Standard zwingend notwendig</li> <li>• Subtraktionsmethode möglich</li> </ul>  |
| <b>Nachweis – und Bestimmungsgrenze</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nachweis – und Bestimmungsgrenze anhand von Grundrauschen oder Korrelationskoeffizient definieren</li> <li>• Silylierungsmuster bedenken (2x – 3x Silylierungen je nach chemischer Struktur)</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nachweisgrenze definiert</li> <li>• Bestimmungsgrenze definiert</li> <li>• Bei Pyruvat, Glutamat, GABA höhere Nachweis und Bestimmungsgrenze</li> </ul>  |

|   |  |   |
|---|--|---|
| <p style="text-align: center;"><b>Robustheit</b></p>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alle Einzelschritte auf Robustheit untersuchen</li> <li>• Robustheit über die Messzeit kontrollieren</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alle neu etablierten Maßnahmen wurden mit unterschiedlichen Modalitäten untersucht (Lösungsmittel, Temperatur und Zeit der Silylierung, Extraktionseffektivität, Hünig – Base)</li> <li>• Mix aller Substanzen plus internem Standard alle drei Proben wiederholend vermessen</li> </ul> |
| <p style="text-align: center;"><b>Wiederholungsrate</b></p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Extraktionseffektivität der einzelnen Substanzen</li> <li>• Mikro dialyse Wiederfindung konstant?</li> </ul>    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wiederfindung mit Salicylat und Phtalat als Surrogat für die Extraktionseffektivität</li> <li>• Wiederfindungsrate bei der Mikro dialyse konstant und vergleichbar mit bestehenden Publikationen</li> </ul>  |

**Tab. 35 Zusammenfassung der Anforderungen und Maßnahmen innerhalb der Validierung der GC - MS**

Die GC - MS Analytik bietet die Möglichkeit eine Fülle an parallel bestimmbar Metaboliten aus unterschiedlichsten Geweben zu bestimmen und zu quantifizieren. Mithilfe der beschriebenen Anleitung zur Messung und neuen Etablierung von unbekannt Substanzen kann die GC – MS Analytik auf nahezu alle pharmakokinetischen Fragestellungen angewendet werden. Die vorliegende Arbeit soll eine Anleitung geben, wie man mithilfe der GC - MS valide und vertrauenswürdige Daten generieren kann. Um diesen Anspruch in Zukunft noch besser gerecht zu werden, müssen Änderungen im Ablauf des Protokolls wissenschaftlich untersucht werden und anschließend auf Durchführbarkeit beurteilt werden. Für die Quantifizierung sollte immer die Anwendung von isoto penmarkierten Verbindungen in Betracht gezogen werden. Die Güte der erhobenen Messwerte korreliert mit dem technischen Verständnis für das Messverfahren.

## 5 Literaturverzeichnis

- [1] WHO, "Global status report on noncommunicable diseases 2014," *World Heal. Organ.*, p. 176, 2014.
- [2] R. Lozano *et al.*, "Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010," *Lancet*, vol. 380, no. 9859, pp. 2095–2128, 2012.
- [3] D. Mozaffarian *et al.*, "Executive summary: Heart disease and stroke statistics-2016 update: A Report from the American Heart Association," *Circulation*, vol. 133, no. 4, pp. 447–454, 2016.
- [4] P. L. Kolominsky-Rabas *et al.*, "Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: Results and national projections from a population-based stroke registry - The Erlangen Stroke Project," *Stroke*, vol. 37, no. 5, pp. 1179–1183, 2006.
- [5] N. Kärcher, "[http://www.ifak-kindermedien.de/redaktion/zukunft/beitrag.html?beitrag\\_ID=1770](http://www.ifak-kindermedien.de/redaktion/zukunft/beitrag.html?beitrag_ID=1770)," *IfAK - Institut für Automation und Kommunikation*, 2014. .
- [6] <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Bevoelkerung/Sterbefaelle/Tabellen/LebenserwartungDeutschland.html>. 2016.
- [7] "<http://www.gbe-bund.de/>," *Bund, GBE*, pp. 1–16, 2015.
- [8] M. A. Busch, A. Schienkiewitz, E. Nowossadeck, and A. Gößwald, "Prävalenz des Schlaganfalls bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1)," *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz*, vol. 56, no. 5–6, pp. 656–660, 2013.
- [9] A. E. Kunst, M. Amiri, and F. Janssen, "The decline in stroke mortality: Exploration of future trends in 7 Western European Countries," *Stroke*, vol. 42, no. 8, pp. 2126–2130, 2011.
- [10] P. U. Heuschmann *et al.*, "Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland," *Aktuelle Neurol.*, vol. 37, no. 7, pp. 333–340, 2010.
- [11] R. Schmiedel and H. Behrendt, *Leistungen des Rettungsdienstes 2008/2009*. 2011.
- [12] J. P. Mohr, P. A. Wolf, J. C. Grotta, M. A. Moskowitz, M. Mayberg, and R. Kummer von, "Stroke - Pathophysiology, Diagnosis and Management," .
- [13] P. A. Wolf, R. B. D'Agostino, A. J. Belanger, and W. B. Kannel, "Probability of stroke: a risk profile from the Framingham Study," *Stroke*, vol. 22, no. 3, pp. 312–318, 1991.
- [14] J. R. Romero, J. Morris, and A. Pikula, "Stroke prevention: modifying risk factors 26," *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.*, vol. 2, no. 1753–9447 (Print), pp. 287–303, 2008.
- [15] P. A. Wolf, "Stroke Risk Profiles," *Stroke*, vol. 40, no. 3, pp. 73–74, 2009.
- [16] W. B. Kannel, "Risk stratification in hypertension: new insights from the Framingham Study," *Am. J. Hypertens.*, vol. 13, no. 1 Pt 2, p. 3S–10S, 2000.
- [17] D. L. Blackwell, J. W. Lucas, and T. C. Clarke, "Summary Health Statistics for U . S . Adults : National Health Interview Survey ," *U.S. Dep. Heal. Hum. Serv.*, vol. 10, no. 235, p. 53, 2012.

- [18] B. M. Psaty *et al.*, "Health outcomes associated with antihypertensive therapies used as first-line agents," *J. Am. Med. Assoc.*, vol. 277, no. January, pp. 739–745, 1997.
- [19] H. Lund-andersen, H. Parving, and O. Pedersen, "Effect of a Multifactorial Intervention on Mortality in Type 2 Diabetes," *N. Engl. J. Med.*, vol. 358, no. 6, pp. 580–591, 2008.
- [20] E. Panel, "Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III).," *JAMA*, vol. 285, no. 19, pp. 2486–2497, 2001.
- [21] D. Lloyd-Jones *et al.*, "Heart disease and stroke statistics - 2010 update: A report from the American heart association," *Circulation*, vol. 121, no. 7, pp. 948–954, 2010.
- [22] L. B. Goldstein *et al.*, "Guidelines for the primary prevention of stroke: A Guideline for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association," *Stroke*, vol. 42, no. 2, pp. 517–584, 2011.
- [23] W. Pschyrembel, *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 267. Auflage*. 2017.
- [24] D. M. Hermann, T. Steiner, and C. H. Diener, *Vaskuläre Neurologie: Zerebrale Ischämien, Hämorrhagien, Gefäßmissbildungen, Vaskulitiden und vaskuläre Demenz*. 2010.
- [25] G. Donnan, M. Fisher, M. Macleod, and S. Davis, "Stroke," in *Handbook of clinical Neurology*, 2009, pp. 1612–1623.
- [26] R. Brouns and P. P. De Deyn, "The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke," *Clin. Neurol. Neurosurg.*, vol. 111, no. 6, pp. 483–495, 2009.
- [27] J. Astrup, B. K. Siesjö, and L. Symon, "Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra.," *Stroke*, vol. 12, pp. 723–725, 1981.
- [28] T. Obrenovitch, "The ischaemic penumbra: twenty years on.," *Cerebrovasc Brain Metab Rev.*, vol. 7, no. 4, pp. 297–323, 1995.
- [29] K. Hossmann, "Viability Thresholds and the Penumbra of Focal Ischemia," *Ann. Neurol.*, vol. 36, no. 4, 1994.
- [30] M. Krueger, I. Bechmann, K. Immig, A. Reichenbach, W. Härtig, and D. Michalski, "Blood—Brain Barrier Breakdown Involves Four Distinct Stages of Vascular Damage in Various Models of Experimental Focal Cerebral Ischemia," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 35, no. 2, pp. 292–303, 2015.
- [31] P. Deb, S. Sharma, and K. M. Hassan, "Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis," *Pathophysiology*, vol. 17, no. 3, pp. 197–218, 2010.
- [32] C. Calcagno, M. E. Lobatto, P. M. Robson, and A. Millon, "Dynamic correlations between hemodynamic, metabolic, and neuronal responses to acute whole-brain ischemia," *NMR Biomed.*, vol. 28, no. 10, pp. 1304–1314, 2016.
- [33] R. Brouns, R. Sheorajpanday, A. Wauters, D. De Surgeloose, P. Mariën, and P. P. De Deyn, "Evaluation of lactate as a marker of metabolic stress and cause of secondary damage in acute ischemic stroke or TIA," *Clin. Chim. Acta*, vol. 397, no. 1–2, pp. 27–31, 2008.
- [34] S. Schneweis *et al.*, "Middle Cerebral Artery Infarction," *Stroke*, vol. 32, pp. 1863–1867, 2001.

- [35] K. Saita *et al.*, "Imaging the Ischemic Penumbra with 18F-Fluoromisonidazole in a Rat Model of Ischemic Stroke," *Stroke*, vol. 35, no. 4, pp. 975–980, 2004.
- [36] J. M. Berg, L. Stryer, and J. L. Tymoczko, *Stryer - Biochemie*. 2013.
- [37] M. Tymianski, "Emerging mechanisms of disrupted cellular signaling in brain ischemia," *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 11, pp. 1369–1373, 2011.
- [38] C. Culmsee, "Apoptosis-Inducing Factor Triggered by Poly(ADP-Ribose) Polymerase and Bid Mediates Neuronal Cell Death after Oxygen-Glucose Deprivation and Focal Cerebral Ischemia," *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 44, pp. 10262–10272, 2005.
- [39] O. Yermolaieva, a S. Leonard, M. K. Schnizler, F. M. Abboud, and M. J. Welsh, "Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 17, pp. 6752–6757, 2004.
- [40] R. Dingledine, K. Borghers, D. Bowie, and S. F. Traynelis, "The glutamate receptor ion channels," *Pharmacol. Rev.*, vol. 51, no. 1, pp. 7–61, 1999.
- [41] J. F. MacDonald and M. F. Jackson, "Transient receptor potential channels of the melastatin family and ischemic responses of central neurons," *Stroke*, vol. 38, no. 2 PART 2, pp. 665–669, 2007.
- [42] S. L. B. Group, "<http://www.tcdb.org/search/result.php?tc=2.A.19>," 2011. .
- [43] K. N. Jeffs GJ1, Meloni BP, Bakker AJ, "The role of the Na(+)/Ca(2+) exchanger (NCX) in neurons following ischaemia.," *J Clin Neurosci.*, vol. 14, no. 6, pp. 517–14, 2007.
- [44] K. Szydłowska and M. Tymianski, "Calcium, ischemia and excitotoxicity," *Cell Calcium*, vol. 47, no. 2, pp. 122–129, 2010.
- [45] J. Puyal, V. Ginet, and P. G. H. Clarke, "Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: A challenge for neuroprotection," *Prog. Neurobiol.*, vol. 105, no. February, pp. 24–28, 2013.
- [46] M. S. Z. Xu, "Cross-talk Between Calpain and Caspase-3 in Penumbra and Core During Focal Cerebral Ischemia-reperfusion.," *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 28, no. 1, pp. 71–85, 2008.
- [47] K. Kunchithapautham and B. Rohrer, "Apoptosis and autophagy in photoreceptors exposed to oxidative stress," *Autophagy*, vol. 3, no. 5, pp. 433–441, 2007.
- [48] S. M. Davis *et al.*, "Selfotel in acute ischemic stroke : possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist," *Stroke*, vol. 31, no. 2, pp. 347–354, 2000.
- [49] R. Veltkamp *et al.*, "S1 Leitlinie Akuttherapie des Ischämischen Schlaganfalls 2012," p. AWMF Nummer 030/46, 2012.
- [50] P. Ringleb and R. Veltkamp, "Rekanalisierende Therapie ○," *Dtsch. Gesellschaft für Neurol.*, p. 3, 2016.
- [51] DGN, "<https://www.dgn.org/leitlinien/2310-II-22-2012-akuttherapie-des-ischämischen-schlaganfalls>," AWMF, 2016. .
- [52] A. Alonso, A. D. Ebert, R. Kern, S. Rapp, M. G. Hennerici, and M. Fatar, "Outcome Predictors of Acute Stroke Patients in Need of Intensive Care Treatment," *Cerebrovasc. Dis.*, vol. 40, no. 1–2, pp. 10–17, 2015.

- [53] R. OM and B. Guldvog, "Stroke unit versus general medical wards, II: neurological deficits and activities of daily living: a quasi-randomized controlled trial.," *Stroke (00392499)*, vol. 29, no. 3, pp. 586–590, 1998.
- [54] W. Hacke *et al.*, "Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke," *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, no. 3, pp. 1317–1329, 2008.
- [55] S. T. S. Troke and S. T. G. Roup, "Ninds Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke," *N. Engl. J. Med.*, vol. 333, no. 24, 1995.
- [56] B. B. Melsungen, *Actilyse® Alteplase*. 2015, pp. 1–3.
- [57] M. Goyal *et al.*, "Randomized Assessment of Rapid Endovascular Treatment of Ischemic Stroke," *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, no. 11, pp. 1019–1030, 2015.
- [58] B. C. V. Campbell *et al.*, "Endovascular Therapy for Ischemic Stroke with Perfusion-Imaging Selection," *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, no. 11, pp. 1009–1018, 2015.
- [59] J. H. Rha and J. L. Saver, "The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: A meta-analysis," *Stroke*, vol. 38, no. 3, pp. 967–973, 2007.
- [60] M. Endres *et al.*, "» Sekundärprophylaxe ischämischer Schlaganfall und transitorische ischämische Attacke «," *AWMF*, vol. 1, no. 30, pp. 1–60, 2015.
- [61] R. Chou, T. Dana, I. Blazina, M. Daeges, and T. L. Jeanne, "Statins for Prevention of Cardiovascular Disease in Adults," *Jama*, vol. 316, no. 19, p. 2008, 2016.
- [62] P. Rashid, L.-B. Jo, and P. Bath, "Blood Pressure Reduction and Secondary Prevention of Stroke and Other Vascular Events A Systematic Review," *Stroke*, vol. 34, pp. 2741–2750, 2003.
- [63] W. A. Lawton *et al.*, "Aspirin and Extended-Release Dipyridamole versus Clopidogrel for Recurrent Stroke," *new Engl. J. Med. Orig.*, vol. 359, no. 12 [www.nejm.org](http://www.nejm.org), pp. 1238–1251, 2008.
- [64] R. L. Sacco *et al.*, "Telmisartan to Prevent Recurrent Stroke and Cardiovascular Events," *new Engl. J. Med. Orig.*, vol. 359, no. 12, pp. 1225–1237, 2008.
- [65] C. T. T. (CTT) Collaboration\* and Lancet, "Effi cacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol : a meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials," *Lancet*, vol. 376, no. 9753, pp. 1670–1681, 2010.
- [66] M. D. . Vergouwen, M. Vermeulen, Y. Roos, and R. J. Haan, "Statin Treatment and the Occurrence of Hemorrhagic Cerebrovascular Disease," *Stroke*, vol. 39, pp. 497–502, 2008.
- [67] E. Bruckert, J. Labreuch, and P. Amarenco, "Meta-analysis of the effect of nicotinic acid alone or in combination on cardiovascular events and atherosclerosis," *Atherosclerosis*, vol. 210, no. 2, pp. 353–361, 2010.
- [68] B. N. Manktelow and J. F. Potter, "Interventions in the management of serum lipids for preventing stroke recurrence," *Cochrane Libr.*, 2008.
- [69] W. Hacke *et al.*, "Rivaroxaban versus Warfarin in Nonvalvular Atrial Fibrillation," *N. Engl. J. Med.*, vol. 365, no. 10, pp. 883–891, 2011.
- [70] S. J. Connolly *et al.*, "The Long Term Multi-Center Observational Study of Dabigatran Treatment in Patients with Atrial Fibrillation : ( RELY-ABLE ) Study Running title : Connolly et al .; RELY-ABLE Address for Correspondence : Stuart Connolly , MD Population Health Research



- Inst," *Circulation*, pp. 1–25, 2013.
- [71] H. Diener *et al.*, "Apixaban versus aspirin in patients with atrial fi brillation and previous stroke or transient ischaemic attack : a predefi ned subgroup analysis from AVERROES , a randomised trial," *Lancet Neurol.*, vol. 11, no. 3, pp. 225–231, 2012.
- [72] P. C. Group, "Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack.," *Lancet*, vol. 358, no. 9287, pp. 1033–1041, 2001.
- [73] H. A. Krebs and W. A. Johnson, "The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues.," *Enzymologia*, vol. 4, pp. 148–156, 1937.
- [74] M. S. Patel, N. S. Nemeria, W. Furey, and F. Jordan, "The pyruvate dehydrogenase complexes: Structure-based function and regulation," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 24, pp. 16615–16623, 2014.
- [75] T. C. Linn, F. H. Pettit, and L. J. Reed, "Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 62, pp. 234–241, 1969.
- [76] M. M. Bowker-kinley, W. I. Davis, P. Wu, R. A. Harris, and K. M. Popov, "pyruvate dehydrogenase complex," *Biochem. J*, vol. 329, pp. 191–196, 1998.
- [77] L. G. Korotschkina and M. S. Patel, "Mutagenesis studies of the P sites of recombinant human pyruvate Deh.pdf," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 24, pp. 14297–14304, 1995.
- [78] M. Piccinini *et al.*, "Down-regulation of Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase in Obese Subjects is a Defect that Signals Insulin Resistance," *Obes. Res.*, vol. 13, no. 4, pp. 678–686, 2005.
- [79] Hucho F, R. DD, R. TE, B. MW, P. JW, and R. LJ., "alpha-Keto acid dehydrogenase complexes. XVII. Kinetic and regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and pyruvate dehydrogenase phosphatase from bovine kidney and heart.," *Arch Biochem Biophys.*, vol. 151, no. 1, pp. 328–340, 1972.
- [80] S. Biology, J. Kato, and M. Kato, "crystallization communications Crystallization and preliminary crystallographic studies of the catalytic subunits of human pyruvate dehydrogenase phosphatase isoforms 1 and 2 crystallization communications," *Acta Crystallogr. Sect. F*, vol. 66, pp. 342–345, 2010.
- [81] A. J. Physiol, E. Metab, E. E, M. C. Sugden, and M. J. Holness, "Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs," *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 284, pp. E855–E862, 2003.
- [82] M. W. Gray, M. W. Gray, G. Burger, and B. F. Lang, "Mitochondrial Evolution," *Science (80- )*, vol. 283, p. 1476, 1999.
- [83] D. Nelson and M. Cox, *Lehninger Biochemie*. 2009.
- [84] Law V *et al.*, "Drugbank 5.0," *Nucleic Acids Res.* 45, vol. 42, no. 1, pp. 1091–1097, 2014.
- [85] E. Gnaiger, *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis*. 2012.

- [86] F. ERBSLOH, A. BERNISMEIER, and H. HILLESHEIM, "The glucose consumption of the brain & its dependence on the liver," *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr.*, vol. 196, no. 6, pp. 611–626, 1958.
- [87] C. Howarth, P. Gleeson, and D. Attwell, "Updated Energy Budgets for Neural Computation in the Neocortex and Cerebellum," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 32, no. 7, pp. 1222–1232, 2012.
- [88] P. Mergenthaler, U. Lindauer, G. A. Dienel, and A. Meisel, "Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function," *Trends Neurosci.*, vol. 36, no. 10, pp. 587–597, 2013.
- [89] J. J. Harris, R. Jolivet, and D. Attwell, "Synaptic Energy Use and Supply," *Neuron*, vol. 75, no. 5, pp. 762–777, 2012.
- [90] L. Sokkoloff, "Energetics of functional activation in neural tissues.," *Neurochem Res.*, vol. 24, pp. 321–329, 1999.
- [91] A. M. Brown and B. R. Ransom, "Astrocyte glycogen and brain energy metabolism," *Glia*, vol. 55, no. 12, pp. 1263–1271, 2007.
- [92] J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker, and R. Deutzmann, *Biochemie 2. Auflage*. 2008.
- [93] P. Vaupel, H.-P. Schaible, and E. Mutschler, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 2015.
- [94] I. A. Simpson, A. Carruthers, and S. J. Vannucci, "Supply and Demand in Cerebral Energy Metabolism: The Role of Nutrient Transporters," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 27, no. 11, pp. 1766–1791, 2007.
- [95] J. E. Wilson, "Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function," *J. Exp. Biol.*, vol. 206, no. 12, pp. 2049–2057, 2003.
- [96] G. Dienel A., K. Ball K., and N. Cruz F., "A glycogen phosphorylase inhibitor selectively enhances local rates of glucose utilization in brain during sensory stimulation of conscious rats: implications for glycogen turnover," *J Neurochem.*, vol. 102, no. 2, pp. 1–22, 2007.
- [97] R. C. Vannucci, J. Towfighi, R. M. Brucklacher, and S. J. Vannucci, "Effect of Extreme Hypercapnia on Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Immature Rat," *Pediatr. Res.*, vol. 49, no. 6, pp. 799–803, 2001.
- [98] O. H. Lowry and D. W. Schulz, "Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain," *J Biol Chem*, vol. 239, no. 1, pp. 18–30, 1964.
- [99] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemie*. 2007.
- [100] W. M. Pardridge, "Brain Metabolism: A Perspective From the Blood-Brain Barrier," *Physiol. Rev.*, vol. 63, pp. 1481–1491, 1983.
- [101] L. Pellerin and P. J. Magistretti, "Sweet Sixteen for ANLS," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 32, no. 7, pp. 1152–1166, 2012.
- [102] C. N. Hall, M. C. Klein-Flugge, C. Howarth, and D. Attwell, "Oxidative Phosphorylation, Not Glycolysis, Powers Presynaptic and Postsynaptic Mechanisms Underlying Brain Information Processing," *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 26, pp. 8940–8951, 2012.
- [103] G. A. Dienel, "Brain Lactate Metabolism: The Discoveries and the Controversies," *J. Cereb.*

*Blood Flow Metab.*, vol. 32, no. 7, pp. 1107–1138, 2012.

- [104] J. H. Quastel and H. S. Centre, "Locations of Amino Acids in Brain Slices from the Rat," pp. 631–646, 1972.
- [105] B. C. J. V. A. N. D. E. N. Berg and D. Garfinkel, "A Simulation Study of Brain Compartments," pp. 211–218, 1971.
- [106] L. Pellerin and P. J. Magistretti, "Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 91, no. 22, pp. 10625–10629, 1994.
- [107] H. McLennan, "The autoradiographic localization of L-[3 H] glutamate in rat brain tissue," *Brain Res.*, 1976.
- [108] A. Schousboe, G. Svenneby, and L. Hertz, "UPTAKE AND METABOLISM OF GLUTAMATE IN ASTROCYTES CULTURED FROM DISSOCIATED MOUSE BRAIN HEMISPHERES," *J. Neurochem.*, vol. 29, no. 6, pp. 999–1005, 1977.
- [109] L. Hertz, "The glutamate – glutamine ( GABA ) cycle : importance of late postnatal development and potential reciprocal interactions between biosynthesis and degradation," *Front. Endocrinology*, vol. 4, no. May, pp. 1–16, 2013.
- [110] A. D. L. R. JUN SHEN<sup>††</sup>, KITT F. PETERSEN<sup>§</sup>, KEVIN L. BEHAR<sup>¶</sup>, PETER BROWN<sup>?</sup>, TERRENCE W. NIXON<sup>?</sup>, GRAEME F. MASON<sup>\*\*</sup>, OGNEN A. C. PETROFF<sup>¶</sup>, GERALD I. SHULMAN<sup>§††</sup>, ROBERT G. SHULMAN<sup>††</sup>, "Determination of the rate of the glutamate–glutamine cycle in the human brain by in vivo 13 C NMR," *PNAS*, vol. 96, no. July, pp. 8235–8240, 1999.
- [111] L. P. Hertz, L. Peng, and G. A. Dienel, "Energy metabolism in astrocytes : high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis / glycogenolysis," *JCBFM*, vol. 27, no. 2, pp. 219–249, 2007.
- [112] N. Danboldt, "Glutamate uptake," *Prog. Neurobiol.*, vol. 65, no. 1, pp. 1–105, 2001.
- [113] L. Hertz, "EVIDENCE FOR NET UPTAKE OF GABA INTO MOUSE ASTROCYTES IN PRIMARY CULTURES ITS SODIUM D E P E N D E N C E," *Neurochem. Res.*, vol. 323, no. 3, pp. 313–314, 1978.
- [114] G. M. Kurz, H. Wiesinger, and B. Hamprecht, "Purification of Cytosolic Malic Enzyme from Bovine Brain, Generation of Monoclonal Antibodies, and Immunocytochemical Localization of the Enzyme in Glial Cells of Neural Primary Cultures," *J. Neurochem.*, vol. 60, no. 4, pp. 1467–1474, 1993.
- [115] M. C. McKenna, "Substrate Competition Studies Demonstrate Oxidative Metabolism of Glucose, Glutamate, Glutamine, Lactate and 3- Hydroxybutyrate in Cortical Astrocytes from Rat Brain," *Neurochem Res.*, vol. 37, no. 11, pp. 2613–2626, 2013.
- [116] M. C. McKenna, U. Sonnewald, X. Huang, J. Stevenson, and H. R. Zielke, "Exogenous Glutamate Concentration Regulates the Metabolic Fate of Glutamate in Astrocytes," *J. Neurochem.*, vol. 66, no. 1, pp. 386–387, 1996.
- [117] S. M. Hutson;, J. T. Cole;, A. J. Sweatt, and K. F. LaNoue, "IS THE ANAPLEROTIC ENZYME PYRUVATE CARBOXYLASE (PC) ONLY EXPRESSED IN ASTROCYTES?," *J. Neurochem.*, vol. 104, pp. 58–59, 2008.
- [118] S. RP, B. GS, F. SO, and G. Campbell, "Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme

- implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools.," *Brain Res.*, vol. 11, pp. 364–36, 1985.
- [119] N. MD and A. Martinez-Hernandez, "Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain .," *Brain Res.*, vol. 161, no. 2, pp. 303–310, 1979.
- [120] D. L. Rothman, K. L. Behar, F. Hyder, and R. G. Shulman, "In vivo NMR Studies of the Glutamate Neurotransmitter Flux and Neuroenergetics: Implications for Brain Function," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 65, pp. 401–427, 2003.
- [121] Y. Lin, M. C. Stephenson, L. Xin, A. Napolitano, and P. G. Morris, "Investigating the metabolic changes due to visual stimulation using functional proton magnetic resonance spectroscopy at 7 T," *J. Cereb. Blood Flow & Metab.*, vol. 32, no. 8, pp. 1484–1495, 2012.
- [122] G. A. Dienel, R. Y. Wang, and N. F. Cruz, "Generalized Sensory Stimulation of Conscious Rats Increases Labeling of Oxidative Pathways of Glucose Metabolism When the Brain Glucose – Oxygen Uptake Ratio Rises," *J. Cereb. Blood Flow & Metab.*, vol. 2, pp. 1490–1502, 1999.
- [123] S. Mangia, F. Giove, and M. DiNuzzo, "Metabolic pathways and activity-dependent modulation of glutamate concentration in the human brain," *Neurochem Res.*, vol. 37, no. 11, pp. 2554–2561, 2012.
- [124] B. Pardo *et al.*, "Brain Glutamine Synthesis Requires Neuronal-Born Aspartate as Amino Donor for Glial Glutamate Formation," *JCBFM*, vol. 31, no. 1, pp. 90–101, 2010.
- [125] S. Mangia and P. Henry, "Metabolic and hemodynamic events after changes in neuronal activity : Current hypotheses , theoretical ... NIH Public Access," *JCBFM*, vol. 29, no. 3, pp. 441–463, 2009.
- [126] HGNC, "[http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?q=data/hgnc\\_data.php&hgnc\\_id=6970](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&hgnc_id=6970)," *MDH1*, 2008. .
- [127] Consortium UniProt, "UniProt: the universal protein knowledgebase," *Nucleic Acids Res.* 45, 2017. .
- [128] HGNC, "[http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?q=data/hgnc\\_data.php&hgnc\\_id=6971](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&hgnc_id=6971)," *MDH-2*, 2008. .
- [129] HGNC, "[http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?q=data/hgnc\\_data.php&match=GOT2](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&match=GOT2)," 2008. .
- [130] M. Panteghini, "Aspartate aminotransferase isoenzymes," *Clin. Biochem.*, vol. 23, no. 4, pp. 311–319, 1990.
- [131] R. Ansell, K. Granath, S. Hohmann, J. M. Thevelein, and L. Adler, "The Two Isoenzymes for Yeast NAD<sup>+</sup>-dependent Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase Encoded by GPD1 and GPD2 Have Distinct Roles in Osmoadaptation and Redox Regulation," *EMBO J*, vol. 16, no. 9, pp. 2179–2187, 1997.
- [132] W. Shen *et al.*, "Involvement of a Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase in Modulating the NADH / NAD<sup>+</sup> Ratio Provides Evidence of a Mitochondrial Glycerol-3-Phosphate Shuttle in Arabidopsis," vol. 18, no. February, pp. 422–441, 2006.
- [133] H. Montz, H. Althaus, P. Gebicke-Haerter, and N. V., "Glycerol Phosphate Dehydrogenase Activity of Oligodendrocytes Isolated from Adult Pig Brain: Its Inducibility by Hydrocortisone," *J. Neurochem*, vol. 45, no. 4, pp. 1201–1204, 1985.

- [134] J. D. V. PJ Leveille, JF McGinnis, DS Maxwell, "Immunocytochemical localization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in rat oligodendrocytes," *Brain Res.*, vol. 196, no. 2, pp. 287–305, 1980.
- [135] N. Huynh, T. Nguyen, and A. Bra, "Neuronal uptake and metabolism of glycerol and the neuronal expression of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase," *J. Neurochem.*, vol. 85, pp. 831–842, 2003.
- [136] P. Puchalska and P. A. Crawford, "Review Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel," *Cell Metab.*, vol. 25, no. 2, pp. 262–284, 2016.
- [137] G. F. Cahill, "FUEL METABOLISM IN STARVATION," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 26, pp. 1–22, 2006.
- [138] J. D. McGarry and D. W. Foster, "Regulation of Hepatic Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Production," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 49, no. 3, pp. 395–420, 1980.
- [139] A. M. Robinson and D. H. Williamson, "Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues," *Physiol. Rev.*, vol. 60, no. 1, pp. 143–187, 1980.
- [140] D. G. Mensink, *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Was essen wir heute?* 2002.
- [141] K. E. Wildenhoff, J. P. Johansen, H. Karstoft, H. Yde, and N. S. Sørensen, "DIURNAL VARIATIONS IN THE CONCENTRATIONS OF BLOOD ACETOACETATE AND 3-HYDROXYBUTYRATE: The Ketone Body Peak around Midnight and its Relationship to Free Fatty Acids, Glycerol, Insulin, Growth Hormone and Glucose in Serum and Plasma," *Acta Med. Scand.*, vol. 195, no. 1–6, pp. 25–28, 1974.
- [142] R. H. Johnson, J. L. Walton, H. A. Krebs, and D. H. Williamson, "POST-EXERCISE KETOSIS," *Lancet*, vol. 294, no. 7635, pp. 1383–1385, 1969.
- [143] P. J. Cox *et al.*, "Nutritional Ketosis Alters Fuel Preference and Thereby Endurance Performance in Athletes," *Cell Metab.*, vol. 24, no. 2, pp. 256–268, Jul. 2017.
- [144] E. O. Balasse and F. Féry, "Ketone body production and disposal: Effects of fasting, diabetes, and exercise," *Diabetes Metab.*, vol. 3, no. 5, pp. 247–270, 1989.
- [145] A. Lass, R. Zimmermann, M. Oberer, and R. Zechner, "Lipolysis – A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores," *Prog. Lipid Res.*, vol. 50, no. 1–4, pp. 14–27, 2011.
- [146] D. L. Brasaemle, "The perilipin family of structural lipid droplet proteins : stabilization of lipid droplets and control of lipolysis," *J. Lipid Res.*, vol. 48, pp. 2547–2559, 2007.
- [147] P. Arner, "Human fat cell lipolysis: Biochemistry, regulation and clinical role," *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 19, no. 4, pp. 471–482, 2005.
- [148] H. Schulz, "Beta oxidation of fatty acids," *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.*, vol. 1081, no. 2, pp. 109–120, 1991.
- [149] Y. Uchidas, K. Izais, T. Oriis, and T. Hashimotos, "Novel Fatty Acid & Oxidation Enzymes in Rat Liver Mitochondria," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 2, pp. 1034–1041, 1992.
- [150] G. M. Liebhaber, "Ketogene Diät zur Behandlung von pharmakoresistenten Epilepsien und Stoffwechseldefekten im Kindesalter," 2003.
- [151] N. H. Jeoung, Y. Rahimi, P. Wu, W. N. P. Lee, and R. A. Harris, "Fasting induces ketoacidosis

- and hypothermia in PDHK2 / PDHK4-double-knockout mice,” vol. 839, pp. 829–839, 2012.
- [152] M. E. Merritt, C. Harrison, A. D. Sherry, C. R. Malloy, and S. C. Burgess, “Flux through hepatic pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase detected by hyperpolarized <sup>13</sup>C magnetic resonance,” *PNAS*, vol. 108, no. 47, pp. 19084–19089, 2011.
- [153] O. E. Owen, S. C. Kalhan, and R. W. Hanson, “The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function \*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 34, pp. 30409–30412, 2002.
- [154] M. C. SCRUTTON and M. F. UTTER, “Pyruvate Carboxylase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 242, no. 8, pp. 1723–1735, 1967.
- [155] R. M. COOPER, RONALD H. , RANDLE, PHILIP J. DENTON, “Stimulation of phosphorylation and inactivation of pyruvate dehydrogenase by physiological inhibitors of the pyruvate dehydrogenase reaction,” *Nature*, vol. 257, pp. 808–809, 1975.
- [156] D. MCGARRY, D. W. FOSTER, and I. Introduction, “Regulation of Ketogenesis and the Renaissance of Carnitine Palmitoyltransferase,” *Diabetes Metab. Rev.*, vol. 5, no. 3, pp. 271–284, 1989.
- [157] Aktories, Klaus and K. Förstermann, Ulrich Hofmann, Franz Bernhard, Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2013.
- [158] J. Bonnefont, F. Djouadi, C. Prip-buus, S. Gobin, A. Munnich, and J. Bastin, “Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2 : biochemical , molecular and medical aspects,” *Mol. Aspects Med.*, vol. 25, pp. 495–520, 2004.
- [159] J. D. MCGARRY, C. ROBLES-VALDES, and D. W. FOSTER, “Role of carnitine in hepatic ketogenesis,” *Proc. Nat. Acad. Sci.*, vol. 72, no. 11, pp. 4385–4388, 1975.
- [160] M. Beylot, “Regulation of in vivo ketogenesis: role of free fatty acids and control by epinephrine, thyroid hormones, insulin and glucagon.,” *Diabetes Metab.*, vol. 22, no. 5, pp. 299–304, 1996.
- [161] H. C. Harrison and C. N. . Long, “The Dros. inf. serv.tribution of ketone bodies in tissues.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 133, pp. 209–218, 1940.
- [162] M. J. Geerlings *et al.*, “Monocarboxylate Transporter 1 Deficiency and Ketone Utilization,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 371, pp. 1900–1907, 2014.
- [163] D. G. Cotter, R. C. Schugar, and P. A. Crawford, “Ketone body metabolism and cardiovascular disease,” *Am J Physiol Hear. Circ Physiol*, vol. 304, pp. 1060–1076, 2013.
- [164] M. Ohgami, N. Takahashi, M. Yamasaki, and T. Fukui, “Expression of acetoacetyl-CoA synthetase, a novel cytosolic ketone body-utilizing enzyme, in human brain,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 65, no. 6, pp. 989–994, 2003.
- [165] A. A. M. Morris, “Cerebral ketone body metabolism,” *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 28, no. 2, pp. 109–121, 2005.
- [166] J. D. Bergstroms, G. A. Wong, P. A. Edwardsj, and J. Edmondsy, “The Regulation of Acetoacetyl-CoA Synthetase Activity by Modulators of Cholesterol Synthesis i n Vivo and the Utilization of Acetoacetate for Cholesterogenesis \*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 259, no. 23, pp. 14548–14553, 1984.
- [167] O. F. Biological and J. Edmond, “Ketone Bodies as Precursors Fatty Acids in the Developing of Sterols Rat \* and,” no. 1, 1974.

- [168] G. Endemann, G. Goetz, J. Edmonds, and H. Brunengraber, "Lipogenesis from Ketone Bodies in the Isolated Perfused Rat Liver," vol. 257, no. 7, pp. 3434–3440, 1982.
- [169] G. Rücker, M. Neugebauer, and G. G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. 2008.
- [170] H. J. Hübschmann, *Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications*. 2015.
- [171] D. Harvey,  
["https://chem.libretexts.org/Textbook\\_Maps/Analytical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Map%3A\\_Analytical\\_Chemistry\\_2.0\\_\(Harvey\)/12\\_Chromatographic\\_and\\_Electrophoretic\\_Methods/12.4%3A\\_Gas\\_Chromatography,"](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/12_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12.4%3A_Gas_Chromatography) UC University, 2017. .
- [172] Agilent, "Agilent J&W GC Column Selection Guide," 2016.
- [173] B. Kolb, *Gaschromatographie in Bildern*. 1999.
- [174] IUPAC, "[http://old.iupac.org/reports/2001/colloid\\_2001/manual\\_of\\_s\\_and\\_t/node16.html](http://old.iupac.org/reports/2001/colloid_2001/manual_of_s_and_t/node16.html)," 2002. .
- [175] A. Technologies, "Performance summary," 2016.
- [176] B. Kolb, *Gaschromatographie in Bildern: Eine Einführung*. 2012.
- [177] ChemgaRoo, "<http://www.chemgapedia.de>," Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. .
- [178] NIST, "<https://www.nist.gov/srd/nist-standard-reference-database-1a-v17>," 2017. .
- [179] Agilent Technologies, "Cleaning-Quad 597X." pp. 1–15, 2008.
- [180] N. I. for S. and Technology, "<http://chemdata.nist.gov/>," US Department of Commerce, 2004. .
- [181] F. W. McLafferty and F. Turecek, *Interpretation von Massenspektren*. 1995.
- [182] Rücker, Neugebauer, and Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. 2007.
- [183] N. Crl and C. D. Icr, "CD-1<sup>®</sup> IGS Mice CD-1<sup>®</sup> IGS Mice," *Clin. Chem.*, vol. 1, p. 1959, 1959.
- [184] C. River, "<https://www.criver.com/products-services/find-model/cd-1-igs-mouse?region=23>," Charles River, 2017. .
- [185] M. Larabi *et al.*, "Study of the toxicity of a new lipid complex formulation of amphotericin B," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 53, no. 1, pp. 81–88, 2004.
- [186] C. J. Wolf *et al.*, "Developmental toxicity of perfluorooctanoic acid in the CD-1 mouse after cross-foster and restricted gestational exposures," *Toxicol. Sci.*, vol. 95, no. 2, pp. 462–473, 2007.
- [187] E. J. Tokar, B. A. Diwan, J. M. Ward, D. A. Delker, and M. P. Waalkes, "Carcinogenic Effects of 'Whole-Life' exposure to inorganic arsenic in CD1 mice," *Toxicol. Sci.*, vol. 119, no. 1, pp. 73–83, 2011.
- [188] C. River, "CD-1 Mouse Hematology CD-1 and Mouse Biochemistry," vol. 1, no. January 2008, pp. 1–2, 2011.
- [189] A. Lage, "Altromindiät Zusammensetzung." p. 5.
- [190] T. M. Schwarzkopf, "Transiente cerebrale ischämie -," *UB Uni Frankfurt am Main*, no. April, 2013.

- [191] T. McMahon, P. C. M. Van Zijl, and A. A. Gilad, "Triheptanoin - a medium chain triglyceride with odd chain fatty acids: a new anaplerotic anticonvulsant treatment?," *Epilepsy Res.*, vol. 100, no. 3, pp. 239–244, 2012.
- [192] T. Schwarzkopf, K. Koch, and J. Klein, "Reduced severity of ischemic stroke and improvement of mitochondrial function after dietary treatment with the anaplerotic substance triheptanoin," *Neuroscience*, vol. 300, pp. 201–205, 2015.
- [193] CMA, "Products for microdialysis research," 2001.
- [194] M. Santiago and B. H. C. Westerink, "Characterization of the in vivo release of dopamine as recorded by different types of intracerebral microdialysis probes," *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, vol. 342, no. 4, pp. 407–414, 1990.
- [195] W. M., M. A. Renno, F. G. Mullet, A. Williams, and J. Beitz, "Construction of 1 mm microdialysis probe for amino acids dialysis in rats," *Chronic Dis. Biol.*, vol. 79, no. 2, pp. 217–228, 1998.
- [196] M. Y.-T. Globus, R. Busto, W. D. Dietrich, E. Martinez, I. Valdes, and M. D. Ginsberg, "Effect of Ischemia on the In Vivo Release of Striatal Dopamine, Glutamate, and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Studied by Intracerebral Microdialysis," *J. Neurochem.*, vol. 51, no. 5, pp. 1455–1464, 1988.
- [197] J. Lietsche, J. Gorka, S. Hardt, M. Karas, and J. Klein, "Self-built microdialysis probes with improved recoveries of ATP and neuropeptides," *J Neurosci Methods*, vol. 237, pp. 1–8, 2014.
- [198] K. Franklin and G. Paxinos, *A stereotaxic atlas of the mouse brain*. 1997.
- [199] P. Sadana, L. Coughlin, J. Burke, R. Woods, and A. Mdzinarishvili, "Anti-edema action of thyroid hormone in MCAO model of ischemic brain stroke: Possible association with AQP4 modulation," *J. Neurol. Sci.*, vol. 354, no. 1–2, pp. 37–45, 2015.
- [200] D. J. Langford *et al.*, "Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse," *Nat Methods*, vol. 7, no. 6, pp. 447–449, 2010.
- [201] E. Z. Longa, P. R. Weinstein, S. Carlson, and R. Cummins, "Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats," *Stroke*, vol. 20, no. 1, pp. 84–91, 1989.
- [202] M. A. Rynkowski *et al.*, "A mouse model of intracerebral hemorrhage using autologous blood infusion," *Nat. Protoc.*, vol. 3, no. 1, pp. 122–8, Jan. 2008.
- [203] E. C. Steele, Q. Guo, and S. Namura, "Filamentous middle cerebral artery occlusion causes ischemic damage to the retina in mice," *Stroke*, vol. 39, no. 7, pp. 2099–2104, 2008.
- [204] H. Harada, Y. Wang, Y. Mishima, N. Uehara, T. Makaya, and T. Kano, "A novel method of detecting rCBF with laser-Doppler flowmetry without cranial window through the skull for a MCAO rat model," *Brain Res. Protoc.*, vol. 14, no. 3, pp. 165–170, 2005.
- [205] D. C. K. P.K. Smith 2, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, "Measurement of protein using bicinchoninic acid.," *Anal. Biochem.*, vol. 177, no. 1, pp. 75–86, 1985.
- [206] Thermo Fisher, "Pierce BCA Protein Assay Kit," 2000.
- [207] P. F. Stahel *et al.*, "Experimental Closed Head Injury : Analysis of Neurological Outcome , Blood-Brain Barrier Dysfunction , Intracranial Neutrophil Infiltration , and Neuronal Cell Death in Mice Deficient in Genes for Pro-Inflammatory Cytokines," *JCBFM*, vol. 20, pp. 369–380,



- 1999.
- [208] T. Schallert, L. Zhang, T. Schallert, Z. Gang, Q. Jiang, and P. Arniago, "A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia," *J. Neurosci. Methods*, vol. 117, no. June 2002, pp. 207–214, 2002.
- [209] J. Chen *et al.*, "Therapeutic Benefit of Intravenous Administration of Bone Marrow Stromal Cells After Cerebral Ischemia in Rats," *Stroke*, vol. 32, no. 4, pp. 1005–1011, Apr. 2001.
- [210] M. L. Seghier, "Laterality index in functional MRI: methodological issues," *Magn. Reson. Imaging*, vol. 26, no. 5, pp. 594–601, 2007.
- [211] D. Berresse, K. Koch, N. Franke, J. Klein, and G. P. Eckert, "Intravenous treatment with a long-chain omega-3 lipid emulsion provides neuroprotection in a murine model of ischemic stroke - A pilot study," *PLoS One*, vol. 11, no. 11, pp. 1–18, 2016.
- [212] D. R. Knapp, "Handbook of Derivatization Reactions," in *Handbook of Derivatization Reactions*, John Wiley & Sons, New York/ Chichester/ Brisbane/ Toronto, 1979.
- [213] D. Saraiva, R. Semedo, M. Conceic, J. Manuel, and F. Ramos, "Selection of the derivatization reagent — The case of human blood cholesterol , its precursors and phytosterols GC – MS analyses," *J. Chromatogr. B*, vol. 879, pp. 3806–3811, 2011.
- [214] R. S. Kombu, H. Brunengraber, and M. A. Puchowicz, "Chapter 8 Analysis of the Citric Acid Cycle Intermediates Using Gas," *Methods Mol. Biol.*, vol. 708, pp. 147–157, 2011.
- [215] M. Millet, "Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC / MS analysis," *Talanta*, vol. 77, no. July, pp. 1473–1482, 2014.
- [216] D. R. Lide, "Physical Constants of Organic Compounds," in *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 2010, pp. 3–448.
- [217] J. Folch; M. Lees; G.H.S. Stanley, "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.," *J. Biol. Chem.*, vol. 226, no. 3, pp. 497–509, 1957.
- [218] Chemgapedia, "Mobile Phase in der GC - Gase und Fließgeschwindigkeit," [http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/gaschromatographie\\_1.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/gc/mob\\_phase/mobphasgcm64ht0600.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/gaschromatographie_1.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/gc/mob_phase/mobphasgcm64ht0600.vscml.html), 2007. .
- [219] S. De Souza and J. Dobbing, "Cerebral edema in developing brain: I. Normal water and cation content in developing rat brain and postmortem changes," *Exp. Neurol.*, vol. 32, no. 3, pp. 431–438, 1971.
- [220] R. F. Reinoso, B. A. Telfer, and M. Rowland, "Tissue water content in rats measured by desiccation," *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 38, no. 2, pp. 87–92, 1997.
- [221] D. Virley, "Choice, Methodology, and Characterization of Focal Ischemic Stroke Models," *Methods Mol. Med.*, vol. 104, pp. 19–48, 2014.
- [222] G. Avenue, "Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development.," *Stroke.*, vol. 30, no. 12, pp. 2752–2758, 1999.
- [223] K. U. Advanced Biosciences, "<http://mmmdb.iab.keio.ac.jp/download.html>," 2008. .
- [224] T. Verlag, *Römpf Chemie*. 2015.

- [225] Peter Sykes, *Reaktionsmechanismen der organischen Chemie*. 2011.
- [226] F. Michel, "Derivatization of polar compounds for GC," 2010.
- [227] K. T. Harada H , Wang Y , Mishima Y , Uehara N , Makaya T, "novel method of detecting rCBF with laser-Doppler flowmetry ... cranial window through the skull for a MCAO rat model," *Brain Res. Protoc.*, vol. 14, pp. 165–170, 2005.
- [228] S. Ansari, H. Azari, D. J. Mcconnell, A. Afzal, and J. Mocco, "Intraluminal Middle Cerebral Artery Occlusion ( MCAO ) Model for Ischemic Stroke with Laser Doppler Flowmetry Guidance in Mice," *J. Vis. Exp.*, no. May, pp. 8–11, 2011.
- [229] H. Nagasawa and K. Kogure, "Correlation Between Cerebral Blood Flow and Histologic Changes in a New Rat Model of Middle Cerebral Artery Occlusion," *Stroke*, vol. 20, no. 8, pp. 1037–1043, 1989.
- [230] J. Astrup, B. K. Siesjö, and L. Symon, "Thresholds in Cerebral Ischemia — The Ischemic Penumbra," *Stroke a J. Cereb. Circ.*, vol. 12, no. 6, pp. 723–725, 1981.
- [231] M. Sakoh *et al.*, "Relationship between residual cerebral blood flow and oxygen metabolism as predictive of ischemic tissue viability: sequential multitracer positron emission tomography scanning of middle cerebral artery occlusion during the critical first 6 hours after st," *J. Neurosurg.*, vol. 93, no. 4, pp. 647–657, 2000.
- [232] D. W. Howells *et al.*, "Different strokes for different folks : the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 30, no. 8, pp. 1412–1431, 2010.
- [233] A. K. I. R. A. Tamura, T. Tsumagari, and A. Nakajima, "Protection from Cerebral Ischemia by a New Imidazole Derivative ( Y-9179 ) and Pentobarbital . A Comparative Study in Chronic Middle Cerebral Artery Occlusion in Cats," *Stroke*, vol. 10, no. 2, pp. 126–132, 1979.
- [234] R. M. Crowell, F. W. Marcoux, and D. U., "Variability and reversibility of focal cerebral ischemia in unanesthetized monkeys," *Neurology*, vol. 31, no. 10, p. 1295, 1981.
- [235] N. Hill, C. Millikan, K. Wakim, and G. Sayre, "Studies in cerebrovascular disease. VII. Experimental production of cerebral infarction by intracarotid injection of homologous blood clot; preliminary report.," *Proc Staff Meet Mayo Clin.*, vol. 30, no. 26, pp. 625–633, 1955.
- [236] W. A. Pulsinelli and J. B. Brierley, "A New Model of Bilateral Hemispheric Ischemia in the Unanesthetized Rat," *Stroke*, vol. 10, no. 3, pp. 54–60, 1976.
- [237] E. B. Sriver and M. Herning, "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*, vol. 16, no. 3, pp. 459–466, 1985.
- [238] A. M. Kaufmann, A. D. Firlik, M. B. Fukui, L. R. Wechsler, C. A. Jungries, and H. Yonas, "Ischemic Core and Penumbra in Human Stroke," *Stroke*, vol. 30, pp. 93–99, 1999.
- [239] M. Kuraoka, T. Furuta, T. Matsuwaki, and T. Omatsu, "Direct Experimental Occlusion of the Distal Middle Cerebral Artery Induces High Reproducibility of Brain Ischemia in Mice," *Exp. Anim.*, vol. 58, no. April 2008, pp. 19–29, 2009.
- [240] A. Canazza, L. Minati, C. Boffano, E. Parati, and S. Binks, "Experimental models of brain ischemia : a review of techniques , magnetic resonance imaging , and investigational cell-based therapies," *Front. Neurol.*, vol. 5, no. February, pp. 1–15, 2014.

- [241] R. Martin, H. Lloyd, and A. Cowan, "The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?," *Trends Neurosci.*, vol. 17, no. 6, pp. 251–257, 1994.
- [242] L. Hertz, "Bioenergetics of cerebral ischemia: A cellular perspective," *Neuropharmacology*, vol. 55, no. 3, pp. 289–309, 2008.
- [243] G. Donnan, M. Fisher, M. Macleod, and S. Davis, "Stroke.," *Lancet*, vol. 371, no. 9624, pp. 1612–1623, 2008.
- [244] Y. Zhang *et al.*, "Ketosis proportionately spares glucose utilization in brain.," *J. Cereb. blood flow Metab.*, vol. 33, no. 8, pp. 1307–11, 2013.
- [245] K. N. Tan, C. Carrasco-pozo, T. S. McDonald, M. Puchowicz, and K. Borges, "Tridecanoin is anticonvulsant, antioxidant, and improves mitochondrial function," *J. Cerebral Blood Flow Metab.*, vol. 37, no. 6, pp. 2035–2048, 2017.
- [246] H. Böhme *et al.*, "Tiergerechte Haltung: Labormäuse," *Gesellschaft für Versuchstierkunde, Ausschuss für tiergerechte Labortierhaltung*, p. 21, 2007.
- [247] K. Koch, D. Berressem, J. Konietzka, A. Thinner, G. Eckert, and J. Klein, "Hepatic ketogenesis induced by middle cerebral artery occlusion in mice," *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 7, no. 3, pp. 1–9, 2017.
- [248] J. D. McGarry and D. W. Foster, "Regulation of Hepatic Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Production," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 49, no. 1, pp. 395–420, 1980.
- [249] D. Rothman, I. Magnusson, L. Katz, R. Shulman, and G. Shulman, "Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with <sup>13</sup>C NMR," *Science (80- )*, vol. 254, no. 5031, pp. 573–576, 1991.
- [250] P. E. Cryer, "Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death," *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 4, pp. 868–870, 2007.
- [251] L. A. Menahan and O. Wieland, "The Role of Endogenous Lipid in Gluconeogenesis and Ketogenesis of Perfused Rat Liver," *Eur. J. Biochem.*, vol. 9, no. 2, pp. 182–188, 1969.
- [252] M. G. Myers, J. W. Norris, V. C. Hachniski, and M. J. Sole, "Plasma norepinephrine in stroke.," *Stroke.*, vol. 12, no. 2, pp. 200–204, 2015.
- [253] F. MOORE, J. WEEKES, and D. G. HARDIE, "Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase: A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion," *Eur. J. Biochem.*, vol. 199, no. 3, pp. 691–697, 1991.
- [254] F. Lynen, "Acetyl coenzyme A and the fatty acid cycle.," *Harvey Lect.*, vol. 48, pp. 210–244.
- [255] F. Hucho, D. Randall, T. E. Roche, M. W. Burgett, W. Pelley, and J. Lester, "α-Keto acid dehydrogenase complexes: XVII. Kinetic and regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and pyruvate dehydrogenase phosphatase from bovine kidney and heart," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 151, no. 1, pp. 328–340, 1972.
- [256] S. Bro, H. Schneider, A. Bro, B. Rahman, B. Hamprecht, and J. W. Deitmer, "Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH," *Biochem. J.*, vol. 174, pp. 167–174, 1998.
- [257] A. P. Halestrap and M. C. Wilson, "The monocarboxylate transporter family—Role and regulation," *IUBMB Life*, vol. 64, no. 2, pp. 109–119, 2012.

- [258] A. Bonen, M. Heynen, and H. Hatta, "Distribution of monocarboxylate transporters MCT1 – MCT8 in rat tissues and humans skeletal muscle," *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, vol. 39, pp. 31–39, 2006.
- [259] V. N. Jackson and A. P. Halestrap, "The Kinetics, Substrate, and Inhibitor Specificity of the Monocarboxylate (Lactate) Transporter of Rat Liver Cells Determined Using the Fluorescent Intracellular pH Indicator," vol. 271, no. 2, pp. 861–868, 1996.
- [260] S. J. Vannucci and I. A. Simpson, "Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat," *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, vol. 285, no. 5, pp. E1127–E1134, 2003.
- [261] R. L. Leino, D. Z. Gerhart, R. Duelli, B. E. Enerson, and L. R. Drewes, "Diet-induced ketosis increases monocarboxylate transporter (MCT1) levels in rat brain," *Neurochem. Int.*, vol. 38, no. 6, pp. 519–527, 2001.
- [262] K. J. Kahn and R. E. Myers, "Insulin-induced hypoglycaemia in the non-human primate. Clinical consequences of brain hypoxia," in *William Heinemann Medical Books Ltd. London*, 1971, pp. 185–194.
- [263] J. Iversen, "Adrenergic receptors and the secretion of glucagon and insulin from the isolated, perfused canine pancreas," *J. Clin. Invest.*, vol. 52, no. 9, pp. 2102–2116, 1973.
- [264] J. Franch, R. Aslesen, and J. Jensen, "Regulation of glycogen synthesis in rat skeletal muscle after glycogen-depleting contractile activity: effects of adrenaline on glycogen synthesis and activation of glycogen synthase and glycogen phosphorylase," *Biochem. J.*, vol. 344, no. 1, p. 231, 1999.
- [265] J. Gromada *et al.*, "Adrenaline stimulates glucagon secretion in pancreatic A-cells by increasing the Ca<sup>2+</sup> current and the number of granules close to the L-type Ca<sup>2+</sup> channels," *J. Gen. Physiol.*, vol. 110, no. 3, pp. 217–228, 1997.
- [266] P. S. Schein and R. W. Bates, "Plasma glucose levels in normal and adrenalectomized mice treated with streptozotocin and nicotinamide," *Diabetes*, vol. 17, no. 12, pp. 760–765, 1968.
- [267] J. C. Parker *et al.*, "Plasma glucose levels are reduced in rats and mice treated an inhibitor of glucose-6-phosphate translocase," *Diabetes*, vol. 47, no. 10, pp. 1630–1636, 1998.
- [268] Schlichting Anja, "Stressbelastung durch die von der GV-SOLAS empfohlenen Blutentnahmemethoden bei der Maus," *Masterarbeit*, 2010.
- [269] B. Zur, "Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse," 2005.
- [270] A. Kante, M. Cherkaoui Malki, C. Coquard, and N. Latruffe, "Metabolic control of the expression of mitochondrial D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, a ketone body converting enzyme," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1033, pp. 291–297, 1990.
- [271] K. H. Kim, F. López-Casillas, D. H. Bai, X. Luo, and M. E. Pape, "Role of reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in long-chain fatty acid synthesis," *FASEB J.*, vol. 3, no. 11, pp. 2250–2256, 1989.
- [272] R. W. Brownsey and R. M. Denton, "REGULATION OF MAMMALIAN ACETYL-COENZYME A CARBOXYLASE," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 17, pp. 77–99, 1997.
- [273] G. Mabrouk, I. Helmy, K. Thampy, and S. Wakil, "Control of Acetyl-CoA Carboxylase," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 11, pp. 6330–6338, 1990.

- [274] L. Demetrius, "Of mice and men," *EMBO Rep.*, vol. 6, pp. S39–S44, 2005.
- [275] A. Nair and S. Jacob, "A simple practice guide for dose conversion between animals and human," *J. Basic Clin. Pharm.*, vol. 7, no. 2, p. 27, 2016.
- [276] J. C. Lamanna, N. Salem, M. Puchowicz, B. Erokwu, C. Flask, and Z. Lee, "KETONES SUPPRESS BRAIN GLUCOSE CONSUMPTION," *Adv Exp Med Biol.*, vol. 645, pp. 301–306, 2009.
- [277] R. A. Rizza, P. E. Cryer, M. W. Haymond, and J. E. Gerich, "Adrenergic mechanisms for the effects of epinephrine on glucose production and clearance in man," *J. Clin. Invest.*, vol. 65, no. 3, pp. 682–689, 1980.
- [278] A. J. Krentz *et al.*, "Metabolic effects of pharmacological adrenergic blockade in pheochromocytoma," *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 34, no. 2, pp. 139–145, 1991.
- [279] A. M. Brown and B. R. Ransom, "Astrocyte Glycogen and Brain Energy Metabolism ANGUS," *Glia*, vol. 55, pp. 1263–1271, 2007.
- [280] I. Kimura, D. Inoue, T. Maeda, T. Hara, A. Ichimura, and S. Miyauchi, "Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled," *PNAS*, vol. 108, no. 19, pp. 8030–8035, 2011.
- [281] A. J. Brown *et al.*, "The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 13, pp. 11312–11319, 2003.
- [282] S. L. Smith, D. J. Heal, and K. F. Martin, "KTX 0101: A potential metabolic approach to cytoprotection in major surgery and neurological disorders.," *CNS Drug Rev.*, vol. 11, no. 2, pp. 113–40, 2005.
- [283] K. Pierre and L. Pellerin, "Monocarboxylate transporters in the central nervous system : distribution , regulation and function," pp. 1–14, 2005.
- [284] B. M., Mitruka;, H. M. Rawnsley;, and Mitruka, *Clinical Biochemical and Haematological Reference Values in Normal Experimental Animals and Normal Humans*. 1981.
- [285] J. C. Newman and E. Verdin, "Ketone bodies as signaling metabolites," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 25, no. 1, pp. 42–52, 2014.
- [286] S. C. Cunnane *et al.*, "Can ketones compensate for deteriorating brain glucose uptake during aging? Implications for the risk and treatment of Alzheimer's disease," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1367, no. 1, pp. 12–20, 2016.
- [287] M. Maalouf, J. M. Rho, and M. P. Mattson, "The Neuroprotective Properties of Calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies," *Brain Res. Rev.*, vol. 59, pp. 293–315, 2009.
- [288] A. Nehlig, "Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models," *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 70, no. 3, pp. 265–275, 2004.
- [289] W. M. S. Russell and R. L. Burch, *The Principles of Humane Experimental Technique*. 1959.
- [290] C. G. Markgraf *et al.*, "Sensorimotor and cognitive consequences of middle cerebral artery occlusion in rats," *Brain Res.*, vol. 575, no. 2, pp. 238–246, 1992.
- [291] M. Suzuki, M. Suzuki, K. Sato, S. Dohi, and T. Sato, "Effect of  $\beta$ -Hydroxybutyrate, a Cerebral Function Improving Agent, on Cerebral Hypoxia, Anoxia and Ischemia in Mice and Rats," *Jpn. J.*

*Pharmacol.*, vol. 87, pp. 143–150, 2001.

- [292] M. Suzuki, M. Suzuki, Y. Kitamura, S. Mori, K. Sato, and S. Dohi, “ $\beta$ -Hydroxybutyrate, a Cerebral Function Improving Agent, Protects Rat Brain Against Ischemic Damage Caused by Permanent and Transient Focal Cerebral Ischemia,” *Jpn. J. Pharmacol.*, vol. 89, pp. 36–43, 2002.
- [293] M. L. Prins, S. M. Lee, L. S. Fujima, and D. A. Hovda, “Increased cerebral uptake and oxidation of exogenous  $\beta$  HB improves ATP following traumatic brain injury in adult rats,” pp. 666–672, 2004.
- [294] M. Maalouf, P. G. Sullivan, L. Davis, D. Y. Kim, S. Cord, and B. Injury, “KETONES INHIBIT MITOCHONDRIAL PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION FOLLOWING GLUTAMATE EXCITOTOXICITY BY INCREASING NADH OXIDATION,” vol. 145, no. 1, pp. 256–264, 2007.
- [295] H. P. Hetherington, J. W. Pan, and D. D. Spencer, “ $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  spectroscopy and bioenergetics in the lateralization of seizures in temporal lobe epilepsy,” *J. Magn. Reson. Imaging*, vol. 16, no. 4, pp. 477–483, 2002.
- [296] T. Sakaguchi, K. Arase, and G. A. Bray, “Effect of intrahypothalamic hydroxybutyrate on sympathetic firing rate,” *Metabolism*, vol. 37, no. 8, pp. 732–735, 1988.
- [297] U. Keller, M. Weiss, and W. Stauffacher, “Contribution of alpha- and beta-receptors to ketogenic and lipolytic effects of norepinephrine in humans,” *Diabetes*, vol. 38, no. 4, pp. 454–459, 1989.
- [298] M. Heimberg, I. Weinstein, and M. Kohout, “The Effects of Glucagon, Dibutyryl Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate, and Concentration of Free Fatty Acid on Hepatic Lipid Metabolism,” *J. Biol. Chem.*, vol. 244, no. 19, pp. 5131–5139, 1969.
- [299] D. T. She, D. G. Jo, and T. V. Arumugam, “Emerging Roles of Sirtuins in Ischemic Stroke,” *Transl. Stroke Res.*, pp. 1–19, 2017.
- [300] A. Peserico *et al.*, “A novel AMPK-dependent FoxO3A-SIRT3 intramitochondrial complex sensing glucose levels,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 70, no. 11, pp. 2015–2029, 2013.
- [301] J. Yin, P. Han, Z. Tang, Q. Liu, and J. Shi, “Sirtuin 3 mediates neuroprotection of ketones against ischemic stroke,” *J. Cereb. blood flow Metab.*, vol. 35, no. 11, pp. 1783–1789, 2015.
- [302] H. Daitoku, J. Sakamaki, and A. Fukamizu, “Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein – protein interactions ☆,” *BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1813, no. 11, pp. 1954–1960, 2011.
- [303] C. L. Quinlan, A. L. Orr, I. V. Perevoshchikova, J. R. Treberg, B. A. Ackrell, and M. D. Brand, “Mitochondrial Complex II Can Generate Reactive Oxygen Species at High Rates in Both the Forward and Reverse,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 32, pp. 27255–27264, 2012.
- [304] J. Hirst, M. S. King, and K. R. Pryde, “The production of reactive oxygen species by complex I,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 36, pp. 976–980, 2008.
- [305] S. A. Novgorodov *et al.*, “SIRT3 Deacetylates Ceramide Synthases Implications for mitochondrial dysfunction and brain injury,” *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 4, pp. 1957–1973, 2016.
- [306] R. Kumar *et al.*, “Mitochondrial Dynamics Following Global Cerebral Ischemia,” *Mol Cell*

- Neurosci*, vol. 76, pp. 68–75, 2017.
- [307] M. P. Murphy, “How mitochondria produce reactive oxygen species,” *Biochem. J.*, vol. 13, pp. 1–13, 2009.
- [308] T. H. Sanderson, C. A. Reynolds, R. Kumar, K. Przyklenk, and M. Hüttemann, “Molecular Mechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury in Brain: Pivotal Role of the Mitochondrial Membrane Potential in Reactive Oxygen Species Generation,” *Mol Neurobiol.*, vol. 47, no. 1, pp. 9–23, 2014.
- [309] H. Rubbosi *et al.*, “Nitric Oxide Regulation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 42, pp. 26066–26075, 1994.
- [310] E. R. Stadtman and R. L. Levine, “Protein Oxidation,” *Ann. NEW YORK Acad. Sci.*, vol. 434, no. 3, pp. 191–208, 1999.
- [311] S. P. Ledoux, W. J. Driggers, B. S. Hollensworth, and G. L. Wilson, “Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA,” *Mutat. Res.*, vol. 434, pp. 149–159, 1999.
- [312] C. Freit and B. Richter, “Ca<sup>2+</sup> RELEASE FROM MITOCHONDRIA INDUCED BY PROOXIDANTS CHRISTOPH,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 4, pp. 365–375, 1988.
- [313] Y. Tsujimoto and S. Shimizu, “Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death,” *Apoptosis*, vol. 12, pp. 835–840, 2007.
- [314] E. R. Bongarzone, M. I. Givogri, D. C. De Vivo, and S. Dimauro, *Inborn Metabolic Defects of Lysosomes, Peroxisomes, Carbohydrates, Fatty Acids and Mitochondria*, Eighth Edi. Elsevier Inc., 2012.
- [315] Y. Zhang, S. Zhang, I. Marin-Valencia, and M. A. Puchowicz, “Decreased carbon shunting from glucose toward oxidative metabolism in diet-induced ketotic rat brain,” *J. Neurochem.*, vol. 132, pp. 301–312, 2015.
- [316] A. Julio-amilpas, T. Montiel, E. Soto-tinoco, C. Gerónimo-olvera, and L. Massieu, “Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by  $\beta$ -hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species,” *J. Cereb. blood flow Metab.*, vol. 35, pp. 851–860, 2015.
- [317] I. R. Lanza and K. Sreekumaran Nair, “Functional Assessment of Isolated Mitochondria In Vitro,” *Methods Enzym.*, vol. 457, pp. 349–372, 2009.
- [318] R. B. John S., Weiss JN., “Subcellular localization of hexokinases I and II directs the metabolic fate of glucose,” *PLoS One*, vol. 6, no. 3, 2011.
- [319] K. S. McCommis and B. N. Finck, “Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions,” *Biochem. J.*, vol. 466, no. 3, pp. 443–454, 2015.
- [320] Fontana-Ayoub, M. Fasching, and E. Gnaiger, “O<sub>2</sub>k-Protocols selected media and chemicals for respirometry with mitochondrial preparations,” *Mitochondrial Physiol. Netw.*, vol. 2, no. 17, pp. 1–9, 2014.
- [321] E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, S. Menzel, and P. Ruth, *Mutschler Arzneimittelwirkungen 10. Auflage*. 2013.
- [322] D. SA., “The membrane stabilizing and beta 1-adrenoceptor blocking activity of (+)- and (-)-propranolol on the rat left atria,” *Gen Pharmacol.*, vol. 21, no. 5, pp. 677–680, 1990.

- [323] C. B. Hong CY, Yang WC, "Importance of membrane stabilizing effect in massive overdose of propranolol: plasma level study in a fatal case.," *Hum Toxicol.*, vol. 2, no. 3, pp. 511–517, 1983.
- [324] H. N. Rasmussen, G. van Hall, and U. F. Rasmussen, "Lactate dehydrogenase is not a mitochondrial enzyme in human and mouse vastus lateralis muscle," *J. Physiol.*, vol. 541, no. 2, pp. 575–580, 2002.
- [325] S. Lukacova, B. S. Sørensen, J. Alsner, J. Overgaard, and M. R. Horsman, "The impact of hypoxia on the activity of lactate dehydrogenase in two different pre-clinical tumour models," *Acta Oncol. (Madr.)*, vol. 47, no. 5, pp. 941–947, 2008.
- [326] D. med. O. Hagemann, "[http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infoframe/l/LDH\\_Gesamt.htm](http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infoframe/l/LDH_Gesamt.htm)," 2010. .
- [327] Y. Ikeda *et al.*, "Transcriptional Regulation of the Murine Acetyl-CoA Synthetase 1 Gene through Multiple Clustered Binding Sites for Sterol Regulatory Element-binding Proteins and a Single Neighboring Site for Sp1," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 36, pp. 34259–34269, 2001.
- [328] B. Schwer, J. Bunkenborg, R. O. Verdin, J. S. Andersen, and E. Verdin, "Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2," *PNAS*, vol. 103, no. 27, pp. 10224–10229, 2006.
- [329] S. Passarella, F. Palmieri, and E. Quagliariello, "The transport of oxaloacetate in isolated mitochondria," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 180, no. 1, pp. 160–168, 1977.
- [330] J. A. Gimpel, E. J. De Haan, and J. M. Tager, "Permeability of isolated mitochondria to oxaloacetate," *BBA - Bioenerg.*, vol. 292, no. 3, pp. 582–591, 1973.
- [331] J. Sun, S. Aluvila, R. Kotaria, J. A. Mayor, D. E. Walters, and R. S. Kaplan, "Mitochondrial and Plasma Membrane Citrate Transporters: Discovery of Selective Inhibitors and Application to Structure/Function Analysis.," *Mol. Cell. Pharmacol.*, vol. 2, no. 3, pp. 101–110, 2010.
- [332] R. S. Kaplan and J. A. Mayor, "Structure, function and regulation of the tricarboxylate transport protein from rat liver mitochondria," *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 25, no. 5, pp. 503–514, 1993.
- [333] M. D. Ginsberg, "NEUROPROTECTION FOR ISCHEMIC STROKE: PAST, PRESENT AND FUTURE," *Neuropharmacology*, vol. 55, no. 3, pp. 363–389, 2009.
- [334] S. Kromidas, "Methodenvalidierung in der Analytik," *Novia*, vol. 49, no. 0, p. 33, 2008.
- [335] E. M. Agency, "European Medicines Agency: An unacceptable choice," *Prescrire Int.*, vol. 20, no. 121, p. 278, 2011.
- [336] ICH, "Guidance for industry: Q2B validation of analytical procedures: methodology," *Int. Conf. Harmon. Tech. Requir. Regist. Tripart. Guidel.*, no. November, p. 13, 1996.
- [337] ZLG, "Inspektion von Qualifizierung und Validierung in pharmazeutischer Herstellung und Qualitätskontrolle," pp. 1–52, 2009.
- [338] T. Horn and J. Klein, "Lactate levels in the brain are elevated upon exposure to volatile anesthetics: A microdialysis study," *Neurochem. Int.*, vol. 57, no. 8, pp. 940–947, 2010.
- [339] Y. Chen, B. Varasteh, and G. Reaven, "Plasma lactate concentration in obesity and type 2 diabetes.," *Diabete Metab.*, vol. 19, no. 4, p. 348–54., 1993.



- [340] S. Wolfensohn and M. Lloyd, *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 4th Edition*. 2013.
- [341] W. D. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, Sinelnikov I, Krishnamurthy R, Eisner R, Gautam B, Young N, Xia J, Knox C, Dong E, Huang P, Hollander Z, Pedersen TL, Smith SR, Bamforth F, Greiner R, McManus B, Newman JW, Goodfriend T, "The human serum metabolome.," *PLoS ONE*, 2011. .
- [342] R. Samuelsson, C. Nilsson, and J. Burvall, "Sampling and GC-MS as a method for analysis of volatile organic compounds (VOC) emitted during oven drying of biomass materials," *Biomass and Bioenergy*, vol. 30, no. 11, pp. 923–928, 2006.
- [343] W. Müller, "Kalibrierung nach DIN 32645," pp. 1–27, 2010.
- [344] C. Kiewerta, A. Mdzinarishvilia, J. Hartmann, U. Bickel, and J. Klein, "Metabolic and transmitter changes in core and penumbra after middle cerebral artery occlusion in mice," *Brain Res.*, vol. 1312C, pp. 101–107, 2011.

## 6 Zusammenfassung

Im ersten Projekt der vorliegenden Arbeit wurden CD - 1 Mäuse mit drei unterschiedlichen Diäten für zwei Wochen *ad libitum* gefüttert. Die Diäten bestanden aus zwei kohlenhydratarmen, fettreichen Diäten und einer Standard Haltungsdät. Die kohlenhydratarmen, fettreichen Diäten enthielten entweder Triheptanoin (dreifach mit Heptanoat verestertes Glycerol) oder Soja - Öl als Fettkomponente (jeweils 35 % der Gesamtkalorien). Nach zwei Wochen wurde ein ischämischer Schlaganfall für 90 min. mithilfe eines Silikonfadens induziert. Die Leber, das Blut und das Gehirn wurden nach dem Schlaganfall entnommen und die Konzentrationen der Metabolite  $\beta$  - Hydroxybutyrat, Glukose, Laktat und Citrat wurden mit der zuvor etablierten GC - MS-Methode ermittelt. Unter gleichen Bedingungen wurde eine Mikrodialysestudie durchgeführt.

Bei den Tieren, die die kohlenhydratarmen, fettreichen Diäten erhielten, konnte in den Leber - und Hirnhomogenaten, im Plasma sowie im Mikrodialysat eine Ketose festgestellt werden. Die BHB Konzentrationen durch eine Soja Diät erreichten im Leberhomogenat bis zu 4 mM, im Plasma bis zu 1,5 mM, im Hirnhomogenat bis zu 1,5 mM und im Mikrodialysat bis zu 30  $\mu$ M. Um eine Aussage treffen zu können, ob das Gehirn die von der Leber produzierten Ketonkörper als Energiesubstrate nutzen kann, wurde eine Folgestudie (unter gleichen Bedingungen) durchgeführt. Bei dieser Studie wurde der Zeitpunkt der Gewebeentnahme 60 min. nach Entfernen des Fadens (Reperfusion) gewählt. In den Leber – und Hirnhomogenaten konnten erniedrigte Konzentrationen des Ketonkörpers BHB nachgewiesen werden. Die nicht operierten Tiere, die eine fettreiche Diät erhielten, hatten erhöhte Konzentrationen an Citrat in den genannten Geweben. Durch den Abbau des Ketonkörpers BHB können bei Verstoffwechslung in Geweben außerhalb der Leber, zwei Moleküle Acetyl - CoA gebildet werden. Diese gebildeten Acetyl - CoA Moleküle können in den Citratzyklus eingespeist werden.

Um diesen Befund mechanistisch besser verstehen zu können, wurde den Mäusen Propranolol (ein unselektiver  $\beta$  - Blocker) verabreicht, und zwar kurz nachdem der Faden die mittlere Zerebralarterie verschlossen hatte. Als Folge blieb bei den fettreich gefütterten Tieren die zuvor beobachtete Ketose, aus. Daraus wurde geschlossen, dass die auftretende Ketose bei den fettreich gefütterten Tieren durch adrenerge  $\beta$  - Rezeptoren vermittelt wurde. Zusammengefasst kann eine fettreiche bzw. ketogene Ernährung im Falle einer Ischämie die Versorgung des Gehirns durch die Bildung von Ketonkörpern gewährleisten.

Die zu beobachtende hepatische Ketogenese aus dem ersten Projekt hat die Frage entstehen lassen, ob eine akute Gabe von  $\beta$  - Hydroxybutyrat (BHB) bei Entfernen des Fadens schützende Effekte auf das Verhalten bzw. die Mitochondrien als Kraftwerke der Zelle hat. Hierzu wurde BHB bei Reperfusion gegeben und die Wirkungen dieser Einmalgabe nach 24 h untersucht. Als erster Schritt wurde der Nachweis erbracht, dass eine exogene Gabe von BHB das Gehirn erreicht. Im zweiten Schritt wurde das Verhalten der Mäuse nach 24 h untersucht. Hierbei erbrachte die Gabe von BHB eine signifikante Verbesserung der sensorischen und motorischen Fähigkeiten der Mäuse. Die metabolischen Veränderungen nach 24 h wurden erneut in Leberhomogenaten und Plasma vermessen. Eine Einzelgabe von BHB bewirkte eine milde Ketose auch 24 h nach Reperfusion der mittleren Zerebralarterie. Um eine detailliertere Erkenntnis über die Wirkung von BHB zu erlangen, wurden die Mitochondrien als potentiell Ziel für BHB in den Fokus genommen. Die Einmalgabe von BHB verhinderte ein Absinken der Komplex – II Aktivität. Außerdem kann die Aktivität der

*Citratsynthase* unter der Gabe von BHB erhalten werden, sodass die Mitochondrien vor allem im wichtigen Zeitraum nach der Reperfusion geschützt werden. Im Rahmen der Untersuchungen der Mitochondrien wurden unterschiedliche Substrateinflüsse auf die Respiration der isolierten Mitochondrien getestet. Bei Zugabe von BHB, Oxalacetat + Acetat oder Citrat zu dem Respirationsmedium stieg die Respiration der Mitochondrien an. Im Falle von Glukose, Propranolol oder Acetat wird die Respiration verringert. Bei Zugabe von Laktat, verbleibt die Respiration auf Ausgangsniveau. Abschließend ist festzustellen, dass die Einzelgabe von BHB nach 24 h das Verhalten der Mäuse verbessert, eine milde Ketose induziert, sowie Mitochondrien und die *Citratsynthase* gegen ischämische Ereignisse schützt.

Um die in dieser Arbeit gezeigten Daten über metabolische Veränderungen zeigen zu können, musste eine vorherige Etablierung der GC – MS Analytik vollzogen werden. Auf der einen Seite musste die Probenvorbereitung, aber auch die gesamte Vermessung der Proben aufgebaut werden. Es wurden insgesamt 11 Analyte in vier unterschiedlichen Kompartimenten quantifiziert. Die Nachweisgrenze lag bei diesen 11 Analyten bei 0,01 - 1 ng/µl, was einer umgerechneten Stoffmengenkonzentration von 0,5 - 10 µM entspricht. Mithilfe dieser Methode können optional weitere Substanzen aus verschiedenen Geweben zugänglich gemacht werden. Diese Arbeit bietet hierzu eine Anleitung, wie die Etablierung erfolgen kann. Im Rahmen der Probenvorbereitung wurden alle Schritte systematisch verbessert. Dazu wurden Wiederholungsmessungen für unterschiedliche Modalitäten vollzogen. Die *Abundance* und die Zeitbeständigkeit waren die wesentlichen Beurteilungskriterien. So wurden die Daten für die Extraktionseffektivität, die Lösungsmittelabhängigkeit der Silylierung, der Zusatz von Hünig - Base sowie die Temperatur und Zeitabhängigkeit der Silylierung in dieser Arbeit erarbeitet. Die Quantifizierung wurde anhand von internen Standardverbindungen durchgeführt. Die jeweiligen *Response – Faktoren* blieben über die gesamte Zeit nach der Etablierung konstant und erlaubten die Quantifizierung mit geringen Fehlern. Die Beurteilung der ermittelten Daten über die Validierung wurden anhand von geltenden Regelwerken der pharmazeutischen Industrie entschieden. Es wurde ein Protokoll entwickelt, das im Rahmen der universitären Forschung eine vertrauenswürdige Aussage über Veränderungen von Metabolitenspiegeln in vielen Geweben der Maus und der Ratte geben kann.

## 7 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Fernere Lebenserwartung in Deutschland von 1960 - 2060 nach Geschlecht.
- Abb. 2** Lebenszeitprävalenz des Schlaganfalls nach sozialem Status.
- Abb. 3** Zeitliches Profil der ablaufenden Pathomechanismen des ischämischen Schlaganfalls.
- Abb. 4** Transporter und Kanäle, die an der Erhöhung des cytosolischen Calciums ( $[Ca^{2+}]_{\text{cyt.}}$ ) beteiligt sind.
- Abb. 5** Citratzyklus mit den wichtigsten anaplerotischen und kataplerotischen Reaktionen.
- Abb. 6** Das Reaktionsschema der Pyruvatdehydrogenase (PDH).
- Abb. 7** Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl - CoA durch die Pyruvat - Dehydrogenase - Komponente ( $E_1$ )
- Abb. 8** Oxidation der OH - Gruppe des Hydroxy - TPP und nachfolgende Konjugation mit Liponamid
- Abb. 9** Transferierung der Acetylgruppe von Liponamid auf Coenzym A durch die Dihydrolipoyl-Transacetylase ( $E_2$ )
- Abb. 10** Die Atmungskette mit den beteiligten Komplexen und den Einspeisungswegen des Stoffwechsels.
- Abb. 11** Glukoseaufnahme in die Zelle und weitere Möglichkeiten der Metabolisierung.
- Abb. 12** Astrozyten - Neuronen - Laktat - Shuttle (ANLS) und Neuronen - Astrozyten - Laktat - Shuttle (NALS).
- Abb. 13** GABA-Glutamat-Glutamin-Zyklus zwischen Astrozyten, glutamatergen und GABAergen Neuronen.
- Abb. 14** Malat - Aspartat - Shuttle zur Transferierung des durch die Glykolyse regenerierten  $NADH + H^+$  vom Cytosol ins Mitochondrium.
- Abb. 15** Die drei Ketonkörper in Eukaryonten, Bakterien und Archaeen.
- Abb. 16** Aktivierung der Fettsäuren mit Coenzym - A (CoA) durch die Acyl - CoA - Synthetase.
- Abb. 17** Bildung der Acylcarnitin - Derivate durch die Carnitin - Palmitoyltransferase - I (CPT - I).
- Abb. 18** Chemische Nomenklatur für benachbarte C-Atome ausgehend von der Ketogruppe.
- Abb. 19** Reaktionsreihenfolge am C - Atom in  $\beta$  - Position bei der  $\beta$  - Oxidation.
- Abb. 20** Oxidation des Acyl - CoA.
- Abb. 21** Hydratisierung des Enoyl - CoA.
- Abb. 22** Oxidation des Hydroxyacyl - CoA.
- Abb. 23** Thiolyse des 3 - Ketoacyl - CoA.
- Abb. 24** Bildung von 3 - Hydroxymethylglutaryl - CoA (HMG - CoA) aus drei Molekülen Acetyl - CoA.
- Abb. 25** Bildung der 3 möglichen Ketonkörper  $\beta$  - Hydroxybutyrat, Acetoacetat und Aceton aus dem Stoffwechselintermediat 3 - Hydroxymethylglutaryl - CoA.
- Abb. 26** Verstoffwechslung von BHB in extrahepatischen Geweben bis zum AcetoAcetyl - CoA.
- Abb. 27** Verstoffwechslung von AcetoAcetyl - CoA bis zum Acetyl - CoA mit anschließender Einschleußung in den Citratzyklus (CZ) durch die Citratsynthase (CS).
- Abb. 28** Gaschromatograph mit gekoppeltem Massenspektrometer (GC - MS).
- Abb. 29** Injektoreinheit mit kombiniertem Splitventil.
- Abb. 30** Aufbau einer modernen Kapillarsäule.
- Abb. 31** Agilent Kapillarsäule VF - 5ms (60 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  + 10 m Vorsäule).
- Abb. 32** Prinzip und Aufbau der Elektronenstoßionisation (EI)
- Abb. 33** Aufbau und Prinzip eines Quadrupol
- Abb. 34** Massenfragmente der Masse 73
- Abb. 35** Möglichkeiten der Fragmentierung nach erfolgter Ionisierung durch Elektronenstoßionisation
- Abb. 36** Reihenfolge der Stabilisierung von Alkylresten nach Ionisierung
- Abb. 37** Stabilisierung des Radikalkation mit Allylstruktur.
- Abb. 38** Umlagerung des Benzylum - Ion zum Tropylium - Ion
- Abb. 39**  $\beta$  - Spaltung mit Heteroatomen
- Abb. 40** Reihenfolge der Stabilisierung von Kationen in Abhängigkeit des Heteroatoms
- Abb. 41**  $\alpha$  - Spaltung bei Carbonylverbindungen
- Abb. 42** Reihenfolge der Stabilisierungskapazität von Carbonylverbindungen
- Abb. 43** Mikrodialysesonde modifiziert nach Lietsche et al. 2014
- Abb. 44** Sondenimplantation ins linke Striatum mit folgenden Koordination:

- Abb. 45** Faden zur Induktion des transienten Schlaganfalls mit Silikoncoating im vorderen Bereich.
- Abb. 46** Roter Punkt entspricht dem Messpunkt zur Bestimmung der mittleren Zerebralarterienperfusion mit Laser-Doppler Messsonde.
- Abb. 47** Anatomischer Aufbau und Lage der hauptversorgenden Blutgefäße im Bereich des Halses bei Ratten und Mäusen. Modifiziert nach Schenk & Smith: *Dissection Guide & Atlas to the Rat*
- Abb. 48** Schematische Darstellung des circulus arteriosus cerebri mit der optimalen Positionierung des beschichteten Fadens an der Abzweigung der mittleren Zerebralarterie.
- Abb. 49** Zeitskala des Versuchsaufbaus
- Abb. 50** Sauerstofffluss in Abhängigkeit von Substraten / Inhibitoren
- Abb. 51** Corner Test nach Zhang et al. 2002
- Abb. 52** Motortest modifiziert nach Berressem et al. 2016
- Abb. 53** Qualitativer Nachweis mithilfe der N.I.S.T. Datenbank von  $\beta$  - Hydroxybutyrat (BHB)
- Abb. 54** Total-Ionen-Chromatogramm (TIC)
- Abb. 55** Pyridin
- Abb. 56** N,O - Bis(trimethylsilyl)trifluoacetamid (BSTFA)
- Abb. 57** Trimethylchlorsilan (TMCS)
- Abb. 58** N, N - Diisopropylethylamin (Hünig - Base)
- Abb. 59** Biphasische Extraktion mit Chloroform / Methanol / Wasser. links: nach Homogenisierung; rechts: nach Zentrifugation.
- Abb. 60** Graphische Darstellung der Temperaturprogramme
- Abb. 61** Sequenzmodul
- Abb. 62** Studiendesign Mikrodialyse
- Abb. 63** Illustriert sind Laser - Doppler Sonographie Messwerte (Mittelwerte  $\pm$  SEM) für die Perfusion der mittleren Zerebralarterie.
- Abb. 64** Absolute Mikrodialysatspiegel von Glukose (links) und Laktat (rechts) (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im linken Striatum.
- Abb. 65** Illustriert sind absolute Mikrodialysatspiegel von BHB (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im linken Striatum.
- Abb. 66** Studiendesign für das Projekt Neuroprotektion.
- Abb. 67** Illustriert werden absolute Konzentrationen von BHB (Mittelwerte  $\pm$  SEM) links: im Leberhomogenat und rechts: im Plasma.
- Abb. 68** Illustriert werden absolute Konzentrationen von BHB (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Hirnhomogenat der linken ischämischen Hemisphäre..
- Abb. 69** Illustriert werden absolute Konzentrationen von Glukose (Mittelwerte  $\pm$  SEM) links: im Leberhomogenat und rechts: im Plasma.
- Abb. 70** Illustriert werden absolute Konzentrationen von Glukose (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Hirnhomogenat der linken ischämischen Hemisphäre.
- Abb. 71** Illustriert werden absolute Konzentrationen von BHB (links) und Glukose (rechts) (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Leberhomogenat.
- Abb. 72** Illustriert werden absolute Konzentrationen von BHB (links) und Glukose (rechts) (Mittelwerte  $\pm$  SEM) in der ischämischen linken Hirnhemisphäre..
- Abb. 73** Illustriert werden absolute Konzentrationen von Citrat (Mittelwerte  $\pm$  SEM) links: im Leberhomogenat und rechts: im Plasma.
- Abb. 74** Illustriert werden absolute Konzentrationen von Citrat (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Hirnhomogenat der linken ischämischen Hemisphäre.
- Abb. 75** Die Auswirkungen einer unselektiven  $\beta$  - Blockade auf die BHB und Glukosekonzentrationen (Mittelwerte  $\pm$  SEM) in der Leber.
- Abb. 76** Die Auswirkungen einer unselektiven  $\beta$  - Blockade auf die BHB und Glukosekonzentrationen (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Plasma.
- Abb. 77** Die Auswirkungen einer unselektiven  $\beta$  - Blockade auf die BHB und Glukosekonzentrationen (Mittelwerte  $\pm$  SEM) in der ischämischen linken Hemisphäre.

- Abb. 78** Studiendesign: BHB in der Akutintervention bei 90 min. t - MCAO
- Abb. 79** links: BHB Spiegel (Daten  $\pm$  SEM) und rechts: Glukose Spiegel (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Mikrodialysat nach einer i.p.-Injektion von 100 mg/kg KG - BHB.
- Abb. 80** Neurologischer Schweregrad von 0 - 14 Punkten, 22 h nach Reperfusion erhoben.
- Abb. 81** links: BHB - Spiegel (Mittelwerte  $\pm$  SEM) und rechts: Glukose - Spiegel (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Leberhomogenat, gemessen nach 24 h Reperfusion.
- Abb. 82** links: BHB - Spiegel (Mittelwert  $\pm$  SEM) und rechts: Glukose - Spiegel (Mittelwert  $\pm$  SEM) gemessen im Plasmakompartiment, nach 24 h Reperfusion.
- Abb. 83** Atmungskettenkomplexe 24 h nach Reperfusion mit einer Intervention von 30 mg/kg KG BHB Lösung/
- Abb. 84** Verhalten der Succinatdehydrogenase (Komplex - II) nach 24 h Reperfusion mit und ohne BHB 30 mg/kg KG Bolusgabe
- Abb. 85** Ex situ Citratsynthaseaktivität (Mittelwert  $\pm$  SEM) ohne Proteinnormierung nach 90 min. Ischämie mit anschließender 24 h Reperfusionsdauer, mit und ohne Gabe von BHB.
- Abb. 86** Links: Gesamtprotein (Mittelwerte  $\pm$  SEM) und rechts: Ex situ Citratsynthaseaktivität (Mittelwerte  $\pm$  SEM) auf Protein normiert.
- Abb. 87** SubstratEinflüsse auf die mitochondriale Atmung (Daten  $\pm$  SEM) unter basalen Bedingungen.
- Abb. 88** Anstieg der Korticosteronlevel (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Plasma nach 90 min. Ischämie und Verhalten bei Gabe von 2 mg/kgKG  $\pm$  Propranolol -
- Abb. 89** Nachweisgrenze für die Energiestoffwechselintermediate Laktat, BHB, Pyruvat und Glukose.
- Abb. 90** Nachweisgrenze für die Intermediate des Zitronensäurezyklus Succinat, Fumarat, Malat und Citrat.
- Abb. 91** Nachweisgrenze für  $\gamma$  - Aminobutyrat (GABA) und Glutamat.
- Abb. 92** Nachweisgrenze für die internen Standardverbindungen Salicylat, Phtalat, Methylglutamat und 6 - Aminocaproat..
- Abb. 93** Auswirkungen von unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Hünig - Base und Pyridin auf die AUC von BHB, Glukose und dem internen Standard Salicylat.
- Abb. 94** Auswirkungen von unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Hünig - Base und Pyridin auf die AUC von Malat, Citrat und dem internen Standard Phtalat.
- Abb. 95** Auswirkungen von unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Hünig - Base und Pyridin auf die AUC von GABA, 6 - Aminocaproat (iStd von GABA), Glutamat und Methylglutamat (iStd von Glutamat).
- Abb. 96** AUC in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur bei der Silylierungsreaktion für die Analyten BHB und Glukose mit Salicylat als internem Standard.
- Abb. 97** AUC in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur bei der Silylierungsreaktion für die Analyten Succinat und Fumarat mit Phtalat als internem Standard.
- Abb. 98** Lösungsmiteleinfluss auf die Abundance von BHB mit einer Massenkonzentration von 100ng/ $\mu$ l.
- Abb. 99** Die Extraktionseffektivität von Salicylat und Phtalat.
- Abb. 100** In vitro Wiederfindungsrate für die wichtigsten Analyte.
- Abb. 101** Responsefaktoren ( $R_f$  - Werte) für die wichtigsten Analyte.

## 8 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1** Risikofaktoren des ischämischen Schlaganfalls und die sich daraus ergebenden Faktoren Prävalenz, relatives Risiko und abzuleitende Maßnahmen.
- Tab. 2** Hemmstoffe der Atmungskette
- Tab. 3** Entkoppler der Atmungskette
- Tab. 4** Eigenschaften in Abhängigkeit der Wechselwirkung von Adsorbatmolekülen und stationärer Phase
- Tab. 5** Berechnung der theoretischen Trennstufen (Böden)
- Tab. 6** Verwendete Geräte
- Tab. 7** Diätzusammensetzung
- Tab. 8** Zusammensetzung der artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeit (acsf)
- Tab. 9** Studiendesign
- Tab. 10** Verwendete Geräte
- Tab. 11** Verwendete Chemikalien
- Tab. 12** Pipettierschema zur Herstellung des BSA Stocks
- Tab. 13** Übersicht der Verhaltenstests des neurological severity score
- Tab. 14** Geräte, Chemikalien und Lösungsmittel für die GC – MS Analytik
- Tab. 15** Silylierte Metabolite mit m / z-Fragmenten und Retentionszeiten in Abhängigkeit der Säulenlänge
- Tab. 16** Chemische Strukturen der Metabolite mit ihren internen Standards und dem messbaren Kompartiment.
- Tab. 17** Endvolumina der zuzugebenden Reagenzien nach Kompartimenten
- Tab. 18** Temperaturprogramm Agilent VF-5 ms 60 m x 25 mm x 0,25 µm + 10 m Vorsäule
- Tab. 19** Temperaturprogramm Agilent VF - 5 30 m x 25 mm x 0,25 µm + 5 m Vorsäule
- Tab. 20** Splitverhältnisse der einzelnen Kompartimente
- Tab. 21** Vor - und Nachspülung der Spritze
- Tab. 22** Änderung der Konzentrationen von BHB in unterschiedlichen Geweben bzw. Diätgruppen
- Tab. 23** Änderung der Konzentrationen von Glukose in unterschiedlichen Geweben bzw. Diätgruppen
- Tab. 24** Änderung der Konzentrationen von BHB in unterschiedlichen Geweben bzw. Diätgruppen
- Tab. 25** Änderung der Konzentrationen von Glukose in unterschiedlichen Geweben bzw. Diätgruppen
- Tab. 26** BHB Konzentrationsänderungen nach 90 min. Ischämie in unterschiedlichen Geweben bzw. Diätgruppen im Vergleich zu einer Intervention mit ± Propranolol - HCl.
- Tab. 27** Glukose Konzentrationsänderungen nach 90 min. Ischämie in unterschiedlichen Geweben bzw. Diätgruppen im Vergleich zu einer Intervention mit ± Propranolol – HCl.
- Tab. 28** Umrechnung der nachweisgrenzen der energiemetabolite von massen - in Stoffmengenkonzentrationen.
- Tab. 29** Umrechnung der Nachweisgrenzen der Intermediate des Zitronensäurezyklus von Massen- in Stoffmengenkonzentrationen.
- Tab. 30** Umrechnung der Nachweisgrenzen von GABA und Glutamat von Massen - in Stoffmengenkonzentrationen.
- Tab. 31** Umrechnung der Nachweisgrenzen der internen Standardverbindungen von Massen - in Stoffmengenkonzentrationen.
- Tab. 32** Sympathikuswirkungen an den wichtigen Stoffwechselorganen mit ihren jeweiligen adrenergen Rezeptoren
- Tab. 33** In der literatur postulierte zielstrukturen von ketonkörpern.
- Tab. 34** Substrateinflüsse auf die mitochondriale Respiration
- Tab. 35** Zusammenfassung der Anforderungen und Massnahmen innerhalb der Validierung der GC -MS

## 9 Abkürzungsverzeichnis

|                  |  |
|------------------|--|
| ACC              | Arteria communis   |
| ACE              | Arteria carotis externa  |
| AcAc             | Acetoacetat  |
| Acetyl – CoA     | Acetyl - Coenzym A   |
| ACI              | Arteria communis interna   |
| aCSF             | artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit                                    |
| AMPA             | $\alpha$ - Amino - 3 - hydroxyl - 5-methyl - 4 - isoxazol - Propionsäure |
| AMPK             | AMP abhängige Proteinkinase  |
| ANLS             | Astrozyten - Neuronen - Laktat - Shuttle                                 |
| ASIC - 1a Kanäle | Acid - Sensing - Ion - Channels-1a                                       |
| Asp              | Aspartat   |
| ASS              | Acetylsalicylsäure   |
| AST              | Aspartat - Amino - Transferase   |
| ATGL             | Adipozyten - Triglycerid - Lipase  |
| ATP              | Adenosintriphosphat  |
| BDH              | $\beta$ - Hydroxybutyrat - Dehydrogenase                                 |
| BHB              | ( $\pm$ ) - Sodium 3 - Hydroxybutyrat                                    |
| BHS              | Blut - Hirn - Schranke   |
| BOLD-Effekt      | Blood - Oxygenation - Level Dependent Effekt                             |
| BSA              | Bovine - Serum - Albumin   |
| BSTFA            | Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid                                     |
| c - AAT          | cytosolische - Aspartat - Aminotransferase                               |
| c – MDH          | cytosolische Malatdehydrogenase  |
| CPT - I / II     | Carnitin - Palmitoyltransferase - I / II                                 |
| CRP              | C - reaktives Protein  |
| CS               | Citratsynthase   |



|             |  |
|-------------|--|
| Cyt c       | Cytochrom c  |
| CZ          | Citratzyklus   |
| DGN         | Deutsche Gesellschaft für Neurologie   |
| DGNR        | Deutsche Gesellschaft für Neuroradiologie  |
| DHAP        | Di - Hydroxy - Aceton - Phosphat   |
| DSG         | Deutsche Schlaganfall - Gesellschaft   |
| DTNB        | Dinatrium 5,5' - Dithiobis (2 - nitrobenzoat)  |
| ECASS – III | European Cooperative Acute Stroke Study III  |
| ESCAPE      | Evaluation <i>Study</i> of Congestive Heart Failure and Pulmonary Artery Catheterization Effectiveness |
| ESI         | Elektronenstoßionisation   |
| ETF         | Elektronentransferierendes Flavoprotein  |
| EXTEND - 1A | Extending the Time for Thrombolysis in Emergency Neurological Deficits - Intra - arterial              |
| EZR         | Extrazellularraum  |
| FAD         | Flavin - Adenin - Dinukleotid  |
| Fe - S      | Eisen - Schwefel - Verbindungen  |
| FMN         | Flavinhaltige Nukleotide   |
| FOXO3a      | Forkhead - Box - Protein O3  |
| FSRP        | Framingham Stroke Risk Profile   |
| GABA        | Gamma - Amino - Buttersäure  |
| GABA – T    | GABA - Transaminase  |
| GAD         | Glutamat - Decarboxylase   |
| GC – MS     | Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie   |
| GDH         | Glutamat - Dehydrogenase   |
| Glc         | Glukose  |
| Gln         | Glutamin   |
| Glu         | Glutamat   |
| GLUT-1 / 3  | Glukosetransporter Typ 1 / 3   |

|                         |  |
|-------------------------|--|
| GPR 41 / FFA - 3        | G - Protein gekoppelter Rezeptor der durch Hydroxysäuren aktiviert werden kann |
| GS                      | Glutamin - Synthetase  |
| HCAR                    | Hydroxycarboxylic acid receptor  |
| HDAC                    | Histondeacetylasen   |
| HIF - 1 $\alpha$        | Hypoxie induzierter Faktor - 1 $\alpha$  |
| HMGCS - 1               | 3 - Hydroxymethylglutaryl - CoA - Synthase                                     |
| HSI                     | Hormon - sensitive - Lipase  |
| K <sub>m</sub>          | Michaelis - Menten Konstante   |
| LDH                     | Laktatdehydrogenase  |
| MDH - 1                 | Malatdehydrogenase - 1   |
| m - MDH                 | mitochondriale Malatdehydrogenase  |
| MDH - 2                 | Malatdehydrogenase - 2   |
| MAS                     | Malat - Aspartat - Shuttle   |
| MCAO                    | Mittlere Zerebralarterienokklusion   |
| MCA                     | Mittlere Zerebralaterie  |
| MGL                     | Monoglyceridlipase   |
| MCT 1 – 4               | Monocarboxylattransporter  |
| <i>M / Z Verhältnis</i> | Masse zu Ladungsverhältnis im Ionenchromatogramm gängige Einheit               |
| NADH + H <sup>+</sup>   | Nicotinamidadenindinukleotid in der reduzierten Form                           |
| NAD <sup>+</sup>        | Nicotinamidadenindinukleotid in der oxidierten Form                            |
| NADPH                   | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat   |
| NALS                    | Neuronen - Astrozyten - Laktat - Shuttle                                       |
| NCX                     | Natrium - Calcium - Austauschers   |
| N.I.S.T                 | Nationales Institut für Standards und Technologie                              |
| NMDA                    | N - Methyl - D – Aspartat  |
| NOAK                    | Nicht - Vitamin - K - antagonistische - orale - Antikoagulanzen                |
| NSS                     | Neurological Severity Score  |

|                   |   |
|-------------------|---|
| oP                | oxidative Phosphorylierung  |
| OAA               | Oxalacetat  |
| PDH               | Pyruvatdehydrogenase  |
| PDH – Phosphatase | Pyruvatdehydrogenase - Phosphatase spaltet von PDH Phosphatgruppen ab |
| PDH – Kinase      | Pyruvatdehydrogenase - Kinase phosphoryliert die PDH                  |
| Pyr               | Pyruvat   |
| PDHK              | Pyruvat - Dehydrogenase - Kinase                                      |
| PMCA              | Plasma Membran Ca <sup>2+</sup> ATPase                                |
| PPI               | Protonenpumpeninhibitoren   |
| Q                 | Ubichinon   |
| ROS               | Reaktive Sauerstoffspezies  |
| rt - Pa           | Rekombinante - Gewebe - Plasminogen - Aktivatoren                     |
| Sn2t Mechanismus  | nukleophile Substitutionsreaktion mit tetraedrischer Zwischenstufe    |
| SCAN – Modus      | Detektor rastert Massen zwischen 50 – 400 Da ab                       |
| SCOT              | Support Coated Open Tubular Column                                    |
| SIM – Modus       | Single-Ion-Mode   |
| Sirtuine          | Silent information regulator two like protein                         |
| SOD – 2           | Superoxiddismutase - 2  |
| SSADH             | Succinat - Semi - Aldehyd - Dehydrogenase                             |
| t <sub>1/2</sub>  | Halbwertszeit   |
| TG                | Triacylglyceride  |
| TIC               | Total – Ionen - Chromatogramm   |
| TMCS              | Trimethylchlorsilan   |
| TNB               | Natrium 5 - thio - 2 - nitrobenzoat                                   |
| TRPM              | Transient - Receptor - Potential - Channels                           |
| VEGF              | Vascular Endothelial Growth Factor                                    |
| 2 - OG            | 2 - Oxo - Glutarat  |

## 10 Anhang

### 10.2 Publikationen und Poster

#### 10.2.1 Publikationen

- [1] K. Koch, D. Berressem, J. Konietzka, A. Thinnies, G. Eckert, and J. Klein, "Hepatic ketogenesis induced by middle cerebral artery occlusion in mice," *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 7, no. 3, 2017.
- [2] D. Berressem, K. Koch, N. Franke, J. Klein, and G. P. Eckert, "Intravenous treatment with a long-chain omega-3 lipid emulsion provides neuroprotection in a murine model of ischemic stroke - A pilot study," *PLoS One*, vol. 11, no. 11, pp. 1–18, 2016.
- [3] TM. Schwarzkopf, K Koch, J Klein "Reduced severity of ischemic stroke and improvement of mitochondrial function after dietary treatment with the anaplerotic substance triheptanoin," *Neuroscience*, vol. 300, pp. 201–209, 2015.
- [4] TM. Schwarzkopf, K. A. Koch, and J. Klein, "Neurodegeneration after transient brain ischemia in aged mice: Beneficial effects of bilobalide," *Brain Res.*, vol. 1529, pp. 178–187, 2013.
- [5] I. Imran, K. Koch, H. Schöfer, H. Lau and J. Klein "Effects of three anticonvulsive drugs on cholinergic and metabolic activity in experimental status epilepticus," *Brain Res.*, **eingereicht**
- [6] C. Stein, K. Koch, J. Hopfeld and J. Klein "Central cholinergic dysfunction in P301L tau – transgenic mice", *PLoS One*, **eingereicht**

#### 10.2.2 Poster

- [1] K. Koch, A. Thinnies, J. Barnstorf - Brandes, D. Berressem, G. P. Eckert, J. Klein „Acute effects of  $\beta$  - hydroxybutyrate (bhb) in cd-1 mice after experimental stroke" *Neuroscience*, Chicago 2015
- [2] Koch K., Berressem D., Konietzka J., Eckert G.P., Klein J. „Distribution of  $\beta$  - hydroxybutyrate (BHB) in CD - 1 mice after experimental stroke" *Neuroscience*, Washington DC 2014

## 10.4 Erklärung

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

Frankfurt am Main, den 12.12.2017

Konrad Koch

## 10.5 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation über

**„Ketonkörper im Schlaganfallgeschehen – Eine neuroprotektive und akute Interventionsstudie“**

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

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet, und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den 12.12.2017

Konrad Koch