

### 3 Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

Produkt	Herkunft
3-NPA	Sigma, Deisenhofen
Ascorbinsäure	Sigma, Deisenhofen
$\beta$ -NADH	Sigma, Deisenhofen
B-27 Supplement	Gibco; Eggenstein
BCA-Protein Assay	Pierce
$\text{CaCl}_2$	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylthiourea (DMTU)	Sigma, Deisenhofen
Eisensulfat ( $\text{FeSO}_4$ )	Sigma, Deisenhofen
ELISA-Platten 96-Loch	Falcon, Heidelberg
Enzyme-standard control-2-E	Sigma, Deisenhofen
GFAP-Antikörper	DAKO, Hamburg
D-Glukose	Merck, Darmstadt
Glutamat	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
Glycin	Sigma, Deisenhofen
Insulin	Berlin-Chemie
HEPES	Biochrom KG, Berlin
Flupirtin	Asta medica, Frankfurt a.M.
Fetales Kälberserum	Biochrom KG, Berlin
Filme	Kodak
KCl	Merck, Darmstadt
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (MW: 174,2g/mol)	Merck, Darmstadt
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (MW: 136,1g/mol)	Merck, Darmstadt
Kollagen G	Gibco, Eggenstein
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
MTT	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Merck, Darmstadt

NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
NBM: Neurobasales Medium	Gibco, Eggenstein
NSE-Antikörper	DAKO, Hamburg
OX-42-Antikörper	Laboserv GmbH, Giessen
Penicillin / Streptomycin	Biochrom KG, Berlin
PBS; Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	Gibco, Eggenstein
Poly-L-Lysin	Biochrom KG, Berlin
SPER/NO	Sigma, Deisenhofen
Tris-HCl	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Biochrom KG, Berlin
Trypsin	Biochrom KG, Berlin
Wistarratten	BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin)
Zellkulturplatten mit 24 und 6 Vertiefungen	Falcon, Heidelberg
Inkubator; CO <sub>2</sub> water-jacked Incubator	Nu Aire
Phasenkontrast-Mikroskop DM IL	Leitz, Wetzlar
Reader MR5000	Dynatech

## Lösungen

## Zusammensetzung

Angereichertes NBM	490ml NBM, 10 ml B27-supplement, 100 IE Penicillin/ Streptomycin/ ml, 0,5 mM L-Glutamin
BSL <sub>0</sub>	Na <sup>+</sup> 143,8 mM; K <sup>+</sup> 5,5 mM; Ca <sup>2+</sup> 0,8 mM; Mg <sup>2+</sup> 0,8 mM; Cl <sup>-</sup> 125,3 mM; HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 26,2 mM; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 1,0 mM; SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 0,8 mM; Glycin 0,01 mM; pH= 7,4
BSL <sub>20</sub>	Na <sup>+</sup> 143,8 mM; K <sup>+</sup> 5,5 mM; Ca <sup>2+</sup> 0,8 mM; Mg <sup>2+</sup> 0,8 mM; Cl <sup>-</sup> 125,3 mM; HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 26,2 mM; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 1,0 mM; SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 0,8 mM; Glycin 0,01 mM; <u>D-Glukose 20mM</u> ; pH= 7,4
LDH-Puffer	4,53 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (MW:136,1) und 11,61 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (MW174,2); pH=7,4

Startermedium 490ml NBM, 10 ml B27-supplement, 100 IE Penicillin/ Streptomycin/ ml, 0,5 mM L-Glutamin, 25 µM Glutamat

### 3.2. Primäre, neuronale Zellkulturen

Die primären, neuronalen Zellkulturen der Großhirnrinde (Kortex) wurden aus Embryonen am Embryonaltag E17 von schwangeren Wistarratten gewonnen. Die Kulturen wurden nach einer modifizierten Methode von Akaike und Kollegen [96] mit folgenden Veränderungen präpariert:

Die trächtigen Wistarratten wurden mit Äther in eine tiefe Narkose versetzt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Sofort wurde das Fell mit 70%igem Alkohol desinfiziert, der Uterus entnommen und in eine sterile Glaspetrischale überführt. Die Embryonen wurden aus dem Uterus bicornius herauspräpariert und in kalte phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Calcium/Magnesium (PBS) gegeben. Die äußere Haut des Kopfes und der knöcherne Anteil der Schädelplatte wurden unter dem Mikroskop (Leica 2000) eröffnet und die Gehirne entnommen. Nach Entfernung der Meningen wurde der Kortex herauspräpariert, dreimal mit PBS ohne Calcium/Magnesium gespült und 15 Minuten bei 36,5°C mit Trypsin/EDTA (0,05/0,02%) in PBS ohne Calcium/Magnesium inkubiert. Anschließend wurde wieder mit PBS und mit Nährlösung gespült. Das Gewebe wurde mit einer Glaspasteurpipette in diesem Medium vorsichtig dissoziiert und bei 210 G für 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Das Pellet wurde in Startermedium aufgenommen und gelöst. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Dazu wurde ein Aliquot von 20µl Zellsuspension mit 20µl Trypanblau in PBS 1:10 verdünnt und 4 x 16 Quadrate der Zählkammer ausgezählt. Da Trypanblau tote Zellen anfärbt konnte ein Überblick über das Verhältnis von vitalen zu abgestorbenen Zellen und so eine Aussage zur Qualität der Präparation gewonnen werden.

Die Zellen wurden anschließend in einer Dichte von 200000/cm<sup>2</sup> in Zellkulturplatten mit 6 oder 24 Vertiefungen in Startermedium ausgesät.

Die Zellkulturplatten wurden am Tag der Präparation zuvor in folgender Weise beschichtet: Zunächst erfolgte eine Inkubation mit Poly-L-Lysin 0,5% für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach anschließendem Spülen mit PBS erfolgte eine weitere Beschichtung mit Kollagen G 3% für eine Stunde bei 37°Celsius, dessen Rückstände

durch erneutes zweimaliges Spülen der Zellkulturplatten mit PBS vor der Zellaussaat entfernt wurden.

In die Vertiefungen der Zellkulturplatten wurde daraufhin Startermedium vorgelegt und die Zellen wie beschrieben in einer konstanten Dichte von 200.000/cm<sup>2</sup> ausgesät. Die Kulturen wurden in Brutschränken mit 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt bei 36,5°C aufbewahrt. Ein regelmäßiger Mediumwechsel erfolgte mit dem vierten Tag beginnend zweimal pro Woche, wobei das Medium jeweils zur Hälfte durch frisches angereichertes Neurobasales Medium ersetzt wurde.

### **3.3. Färbungen**

Zur Bestimmung der prozentualen Anteile von Neuronen, Astroglia und Mikroglia in den Zellkulturen wurden am 12. DIV immunhistochemische Färbungen mit NSE (Neuronenspezifische Enolase), GFAP (Glial fibrillary acidic protein) und OX-42 durchgeführt.

Für den immunzytochemischen Nachweis von Gliafaserprotein und neuronenspezifischer Enolase wurden die vorverdünnten, polyklonalen Kaninchen-Antikörper von DAKO, Hamburg verwendet. Der monoklonale Maus-anti-Ratte-Antikörper gegen CD 11b (OX-42) stammt von den Laboserv GmbH, Giessen und wurde in einer Verdünnung von 1:150 in PBS eingesetzt. Alle Antikörper wurden zusammen mit dem LSAB-Universalkit der Firma DAKO, der alle benötigten Substanzen außer dem Puffer enthält, verwendet.

Für die immunzytologischen Untersuchungen wurden die Zellen zunächst wie gewohnt kultiviert, mit eiskaltem Methanol 10 Minuten fixiert und anschließend mit PBS gespült. Die darauffolgenden Arbeitsschritte wurden wie folgt bei Raumtemperatur durchgeführt: 5-minütige Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Spülen mit destilliertem Wasser, 10-minütige Inkubation mit Block-Reagenz, 12-minütige Inkubation mit dem entsprechenden monoklonalen Antikörper, zweimaliges Spülen mit PBS, 10-minütige Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper, erneutes zweimaliges Spülen mit PBS, 10-minütige Inkubation mit Streptavidin-Konjugat, zweimaliges Spülen mit PBS, 10-minütige Inkubation mit Chromogen (AEC-Substrat), letztmaliges Spülen und eindecken in Glycerin. Dabei waren etwa 5-15%

der Zellen durch GFAP (Abbildung 2) und weniger als 2% durch OX-42 anfärbbar (Abbildung 3).

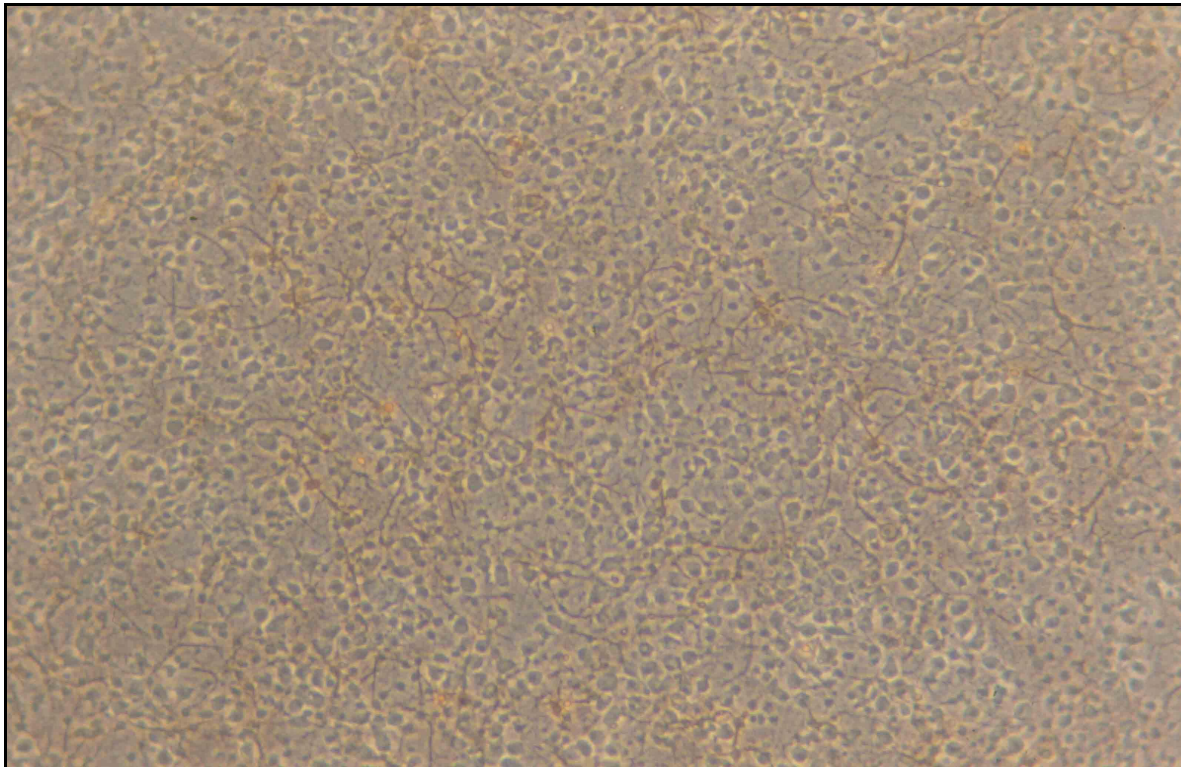


Abbildung 1: Färbung der Zellkulturen mit GFAP.

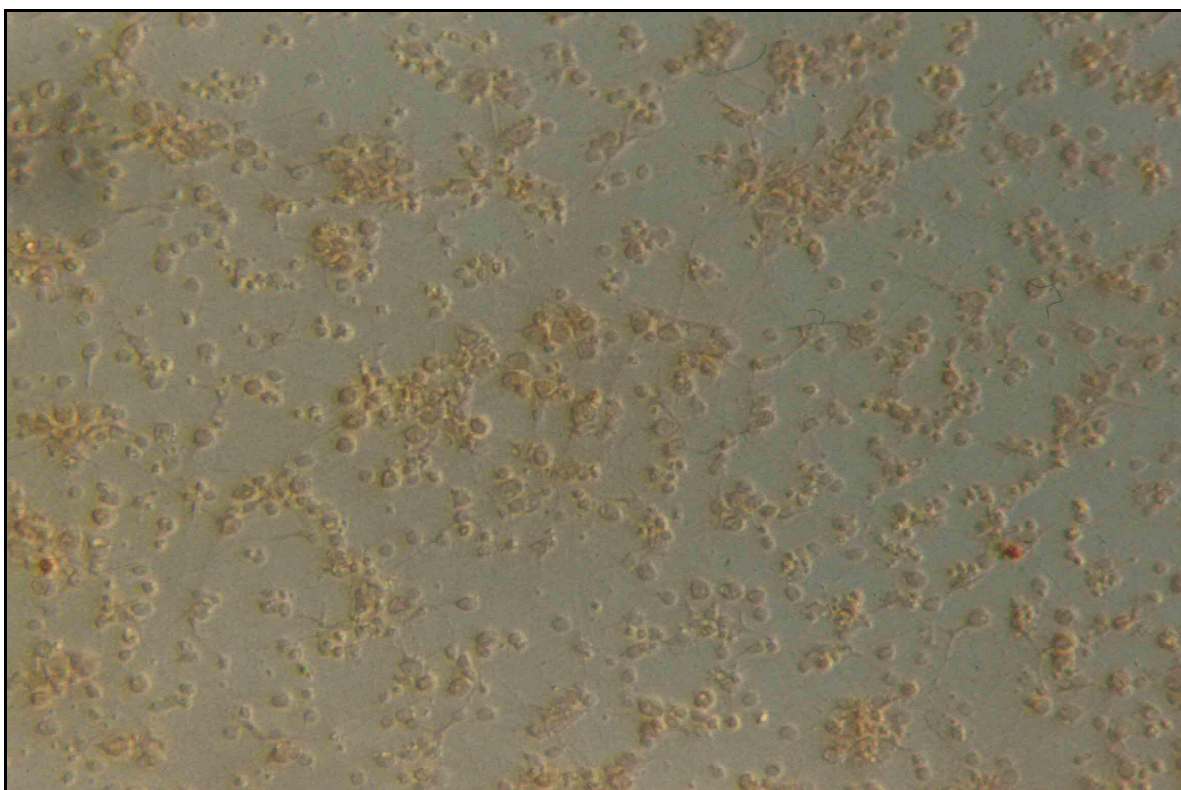


Abbildung 2: Färbung der Zellkulturen mit OX-42, einem Marker für Mikroglia. In den hier dargestellten Übersichtsaufnahmen in der gleichen Vergrößerung finden sich etwa 800 Neuronen (92%), 70 GFAP-positive Astrozyten (8%) und 2 OX-42-positive Mikroglia (0,23%).

### 3.4. Modell der Zellschädigung: Kombiniertes Sauerstoff- und Glukose-Entzug

Am 12. DIV wurde für die Hypoxie das Medium abgenommen und bei 36,5° Celsius asserviert. Die Kulturen wurden zweimal mit PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gespült, um Reste des Neuronenkulturmediums zu entfernen und in einer glukosefreien deoxygenierten balanzierten Salzlösung (BSL<sub>0</sub>) der Hypoxie in einer speziellen Kammer unterzogen (Abbildung 4). Der Sauerstoffpartialdruck pO<sub>2</sub> wurde in dieser Hypoxiekammer unter 2 mmHg (5% CO<sub>2</sub>; 95% N<sub>2</sub>) gehalten und mit einer polarographischen Elektrode (von Licox pO<sub>2</sub>, GMS, Kiel) kontrolliert. Die Temperatur betrug konstant 36,5 ± 0,5° Celsius und die relative Luftfeuchtigkeit über 90%.

Als Kontrollen wurden Schwesterkulturen der selben Präparation für die gleiche Zeit mit der identischen balanzierten Salzlösung inkubiert, die lediglich zusätzlich 20 mM D-Glukose enthielt (BSL<sub>20</sub>) und im Brutschrank bei Normoxie belassen.

Eine Versuchsdauer von 90 min entsprach dabei einer Hypoxischen Präkonditionierung, wohingegen die Zeit einer letalen OGD 120 min betrug. Abschließend wurde das asservierte Medium reappliziert.

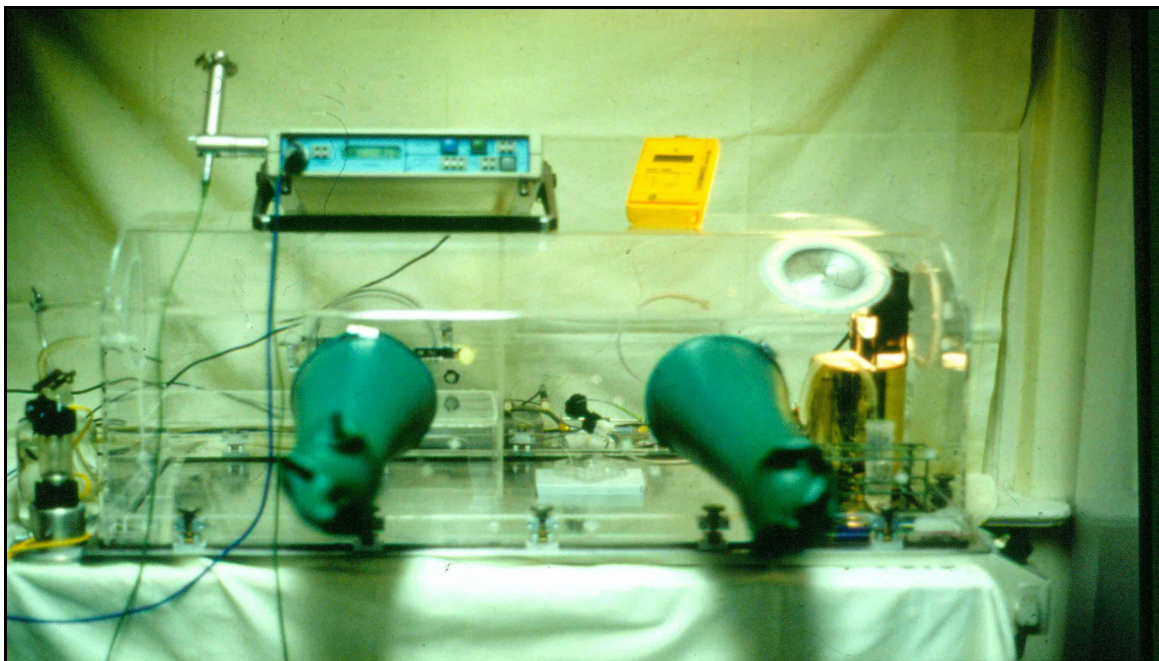


Abbildung 3: Hypoxiekammer

Für eine Standardisierung des Zellschadens (totaler Zelltod = „full kill“) wurde den Zellen 5 mM Glutamat zugesetzt, das aufgrund seiner Exzitotoxizität eine rasche und selektive Nekrose der Neuronen bewirkte.

Die Morphologie wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie dokumentiert und die Aktivität der LDH im Neuronenmedium 24h, 48h und 72h nach Behandlung bestimmt. Zur Einschätzung der verbliebenen mitochondrialen Aktivität wurde am Ende des Experimentes nach 72h die Umsetzung von MTT bestimmt.

### 3.5. Evaluierung der Zellschädigung

Das Ausmaß der Neuronenschädigung durch die OGD wurde sowohl durch tägliche Phasenkontrastmikroskopie bei 100- bzw. 400-facher Vergrößerung, als auch durch tägliche Messungen der Laktatdehydrogenase(LDH)–Konzentration im Neuronenmedium und der mitochondrialen Umwandlung von MTT 72 Stunden nach der OGD beurteilt. Zur Auswertung der MTT-Umsetzung mussten die Zellen lysiert werden, was eine weitere interne Verlaufsbeurteilung verhinderte.

#### 3.5.1. Laktatdehydrogenase

Geschädigte Neuronen geben sowohl im Rahmen eines nekrotischen als auch apoptotischen Zelltodes intrazelluläre Enzyme wie LDH passiv in den Überstand ab. Abgegebenes LDH repräsentiert für Neuronen eine quantitative Meßmethode von Verletzung, Schädigung und Zelltod [97]. Aufgrund ihrer Einfachheit, physikalischen und biologischen Stabilität und wegen der guten Korrelation der LDH-Messwerte zu den Ergebnissen von Zellzählungen wählten wir die LDH-Bestimmung zur objektiven und vergleichbaren Schadensevaluation.

Die LDH wandelt in Gegenwart von NADH Pyruvat zu Lactat um. Um die Enzymkonzentration von LDH im Neuronenmedium zu bestimmen, wird spektrophotometrisch die Absorptionsänderung bei Pyruvatüberschuß bei 340nm gemessen. Diese Absorptionsänderung spiegelt den NADH-Verbrauch wieder, der direkt proportional zur Aktivität des zellulären Enzyms im Kulturmedium ist [97].

Die LDH-Enzymaktivität wurde im Überstand der Zellkulturen nach verschiedenen Zeiten spektrophotometrisch gemessen. Dazu wurden je 2 mal 25µl Medium jeder Vertiefung als Proben für eine Doppelbestimmung entnommen und in eine ELISA-96-Lochplatte pipettiert. Zusätzlich wurden noch 25µl Enzyme-standard control-2-E in Vierfachbestimmung auf jede ELISA-Platte pipettiert. Dieser Standard enthält eine LDH-Aktivität von 500 U/l. Jeder Vertiefung der ELISA-Platte wurde 125µl LDH-Puffer zugefügt, sowie 100µl β-NADH-Lösung, die jeden Tag frisch hergestellt wurde (3mg β-NADH/ 10ml LDH-Puffer). Jeder Probe auf der ELISA-Platte wurde im ELISA-Reader mit einer Multipipette 25µl Pyruvatlösung zugefügt

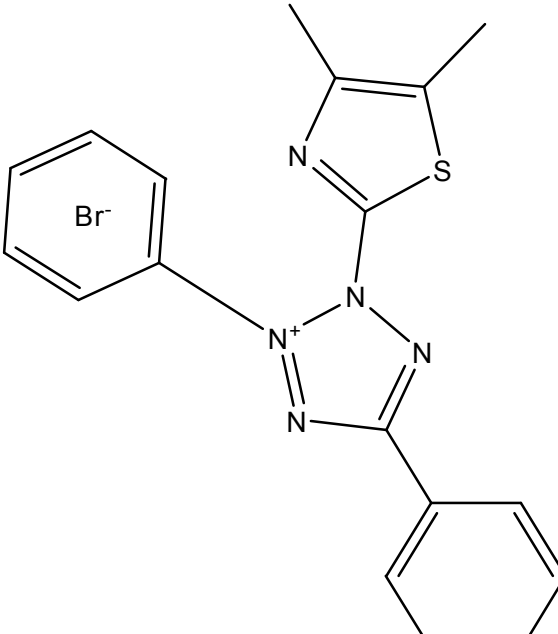
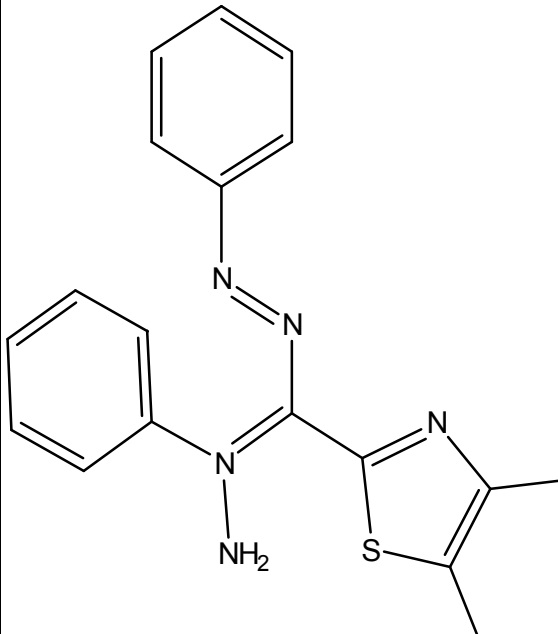


(1,25g Pyruvat/ 500ml LDH-Puffer) und die Absorption sofort anschließend bei 340nm Wellenlänge alle 20 Sekunden für 3 Minuten gemessen.

Die Extinktionsabnahme zeigt die Abnahme von  $\beta$ - NADH (Substrat) in dieser Zeit als annähernd lineare Funktion. Die negative Steigung dieser Funktion kann nun auf die Exktinktionsabnahme des Standards bezogen werden, so dass sich die LDH-Aktivitäten in den Proben errechnen lassen.

### 3.5.2. Evaluierung der mitochondrialen Funktion

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird intra-mitochondrial in intakten Zellen zu dem schwarzen Formazan reduziert, dessen Konzentration dann spektrophotometrisch durch seine Absorption bei 550nm bestimmt werden kann [98, 99, 100].

3-(4,5,-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5,-diphenyltetrazoliumbromid	3-(4,5,-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5,-diphenylformazan
	

Dazu wurde zu jeder Zellkulturvertiefung so viel MTT hinzugegeben, dass eine 0,25%ige Lösung entstand. Die Zellen verblieben damit 60 Minuten bei 37°C im Inkubator und verstoffwechselten das MTT. Anschließend wurde die Reaktion sofort mit 10%iger SDS-Lösung gestoppt und die Absorption bei 550nm im Photometer bestimmt. Als Leerwert diente eine identische Menge an MTT, das in zellfreiem Zellkulturmedium gelöst wurde.

Die Ergebnisse wurden einerseits verglichen mit dem Ergebnis des MTT-Metabolismus von gesunden Schwesterkulturen und andererseits von durch 5mM Glutamat abgetöteten Zellen, wodurch eine nochmalige interne Standardisierung die Vergleichbarkeit mit anderen Experimenten sicherstellte.

### 3.5.3. Phasenkontrast-Mikroskopie

Während die LDH-Freisetzung und MTT-Umsetzung den neuronalen Schaden in seiner Quantität detektiert, kann mit der Mikroskopie auch qualitativ differenziert werden; beispielsweise zwischen zellulärer Apoptose und Nekrose. Die neuronale Morphologie steht hier im Vordergrund. Der Differenzierungsgrad der Neuronen, aber auch der Verzweigungsgrad und Zustand der Dendriten kann grob aufgrund der Menge und Dichte der Dendriten und der Menge des Zelldetritus beurteilt werden. Gleiches gilt für den Zeitverlauf des Schadens. Die Beurteilung der Zellkulturen erfolgte mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie in 100 und 400-facher Vergrößerung.

### 3.6. Applikation von Substanzen

Bevor die Zellkulturen für Experimente verwendet werden konnten, wurde jede einzelne Vertiefung phasenkontrastmikroskopisch auf ihre Intaktheit und Vergleichbarkeit hin untersucht. Dabei wurde das Verhältnis von Astrozyten zu Neuronen, die Dichte der Aussaat, eventuelle Verunreinigungen, Kontaminationen und Ablösungen vom Boden beurteilt.

Die zu testenden Substanzen wurden auf ihre toxische Schwellendosis in unseren Kulturen untersucht. Dazu erfolgte nach einer zweistündigen Applikation eine tägliche LDH-Langzeitmessung über 5 Tage.

Die verwendeten Lösungen wurden mit Ausnahme der Salzlösungen jeweils am Tag des Experiments frisch hergestellt und bis kurz vor der Applikation gekühlt. Direkt vor dem Kontakt mit den Zellkulturen wurden alle Lösungen im Wasserbad auf 36°C erwärmt.

Zur besseren Vergleichbarkeit erfolgten alle Experimente nach dem selben Zeitschema (Abbildung 5):

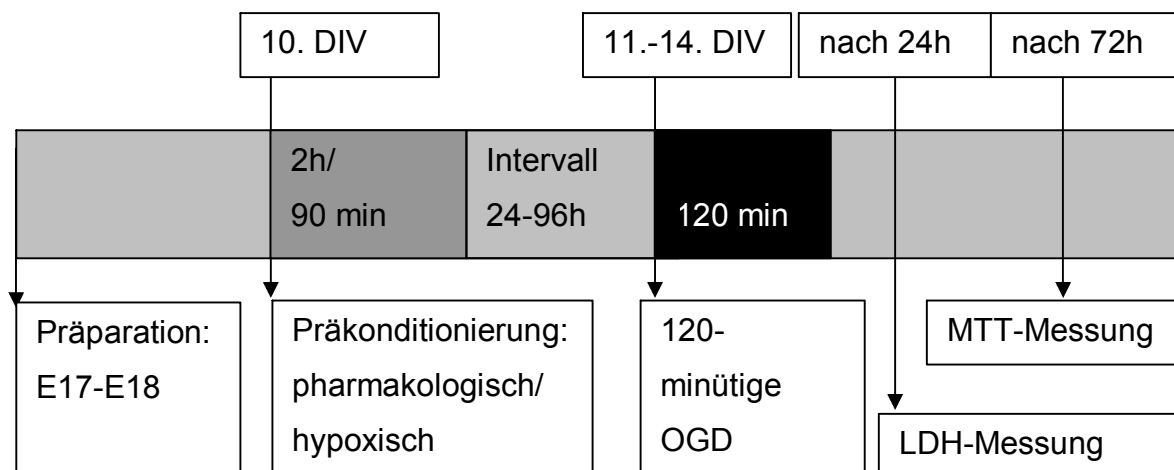


Abbildung 4: Zeitschema von Präkonditionierung und konsekutiver OGD.

### 3.6.1. Behandlung mit 3-Nitropropionsäure

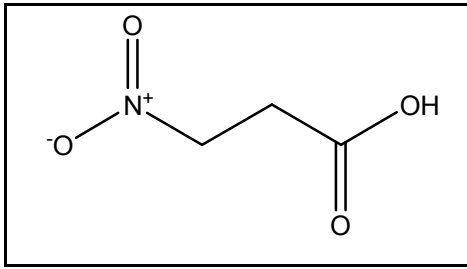


Abbildung 5: Strukturformel von 3-Nitropropionsäure (3-NPA)

Aus 3-NPA wurde zunächst eine 10  $\mu\text{M}$  3-NPA-Ausgangslösung in BSL<sub>20</sub> hergestellt und anschließend steril filtriert. Am 10. DIV wurde das Medium der Zellkulturen asserviert, einmal mit PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gespült, um im Medium enthaltene Antioxidantien zu entfernen und anschließend 3-NPA Lösungen in Konzentrationen von 10 $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$ , 100nM, 10nM, 1nM und 0,1nM zu den Zellkulturen dazugegeben.

Als Kontrollen dienende Schwesterkulturen erhielten nach dem Spülen die selbe BSL<sub>20</sub>-Lösung ohne 3-NPA.

Die Kulturen verblieben für 2 Stunden im Inkubator, die Lösungen wurden wieder entfernt, die Kulturen zweimal mit PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gespült und das asservierte Medium zurückgegeben.

### 3.6.2. Behandlung mit Eisen-Ascorbat

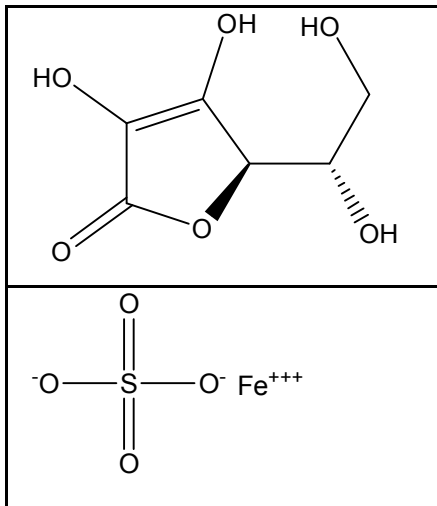


Abbildung 6: Strukturformeln von Ascorbinsäure und Eisensulfat

139,0mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  wurden in 100ml  $\text{BSL}_{20}$  gelöst und filtriert, um eine Ausgangslösung herzustellen. Am 10.DIV wurden 36mg Ascorbinsäure in 2ml dieser Lösung aufgenommen nochmals steril filtriert und anschließend mit  $\text{BSL}_{20}$  so verdünnt, dass sich Konzentrationen von 20 $\mu\text{M}$ , 40 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$ , 150 $\mu\text{M}$ , 250 $\mu\text{M}$  und 350 $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  entsprechend 0,4mM, 0,8mM, 1mM, 3mM, 5mM und 7mM Ascorbat ergaben.

Die Kulturen wurden vor der Applikation einmal mit PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gespült, das Medium gesammelt und die Lösungen auf die Zellen gegeben. Die Platten blieben zusammen mit ebenfalls gespülten und mit  $\text{BSL}_{20}$  versehenen Schwesterkulturen 2 Stunden im Inkubator, bis die Lösungen wieder entfernt und nach erneutem zweimaligem Spülen das ursprüngliche Medium wieder appliziert werden konnte.

### 3.6.4. Behandlung mit sperminem NO-Komplex

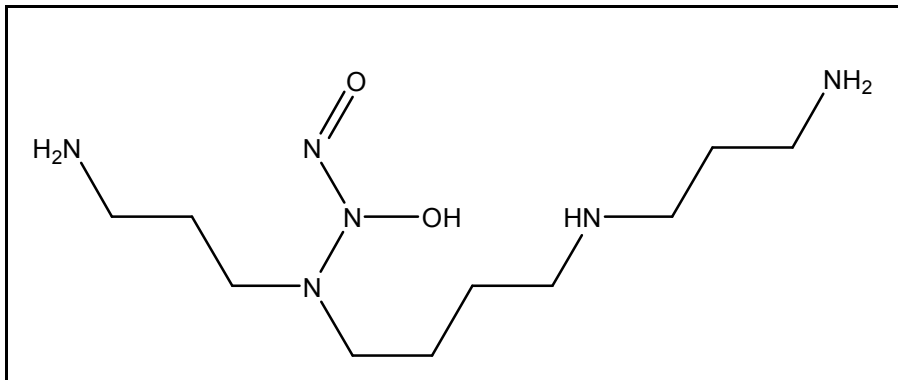


Abbildung 7: Strukturformel von SPER/NO

Der spermine NO-Komplex N-[4-[1-(3-aminopropyl)-2-hydroxy-2-nitrosohydrazino]-butyl]-1,3-propandiamin (262,35 g/mol) ist ein bekannter NO-Donor, der spontan nichtenzymatisch NO abgibt [101]. Durch seine spezielle Struktur mit einer anionischen  $N_2O_2$ -Gruppe ist dieser Komplex in der Lage, bis zu 2mol NO pro mol SPER/NO abzugeben. Die Freisetzung von NO folgt dabei gleichmäßig einer Kinetik erster Ordnung (Halbwertszeit 40min bei 37°C, pH 7,4) [101, 102, 103], bleibt über mindestens eine Stunde konstant und ist lediglich vom pH-Wert und der Temperatur abhängig.

Durch Verdünnung mit BSL<sub>20</sub> und anschließender Sterilfiltration wurden Konzentrationen von 1nM, 10nM, 100nM, 1µM, 10µM und 100µM SPER/NO hergestellt.

Nachdem die Kulturen vor der SPER/NO-Zugabe phasenkontrast-mikroskopisch kontrolliert und das Medium asserviert wurde, erfolgte eine Spülung mit PBS mit  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$ . Die zuvor hergestellten Lösungen SPER/NO sowie eine als Kontrolle dienende BSL<sub>20</sub>-Lösung wurden auf die Zellen gegeben, die anschließend 2 Stunden im Inkubator verblieben.

Nach dem Entfernen der SPER/NO- und BSL<sub>20</sub>-Lösungen wurde das asservierte Medium wieder reappliziert.

### 3.6.4. Behandlung mit Flupirtin

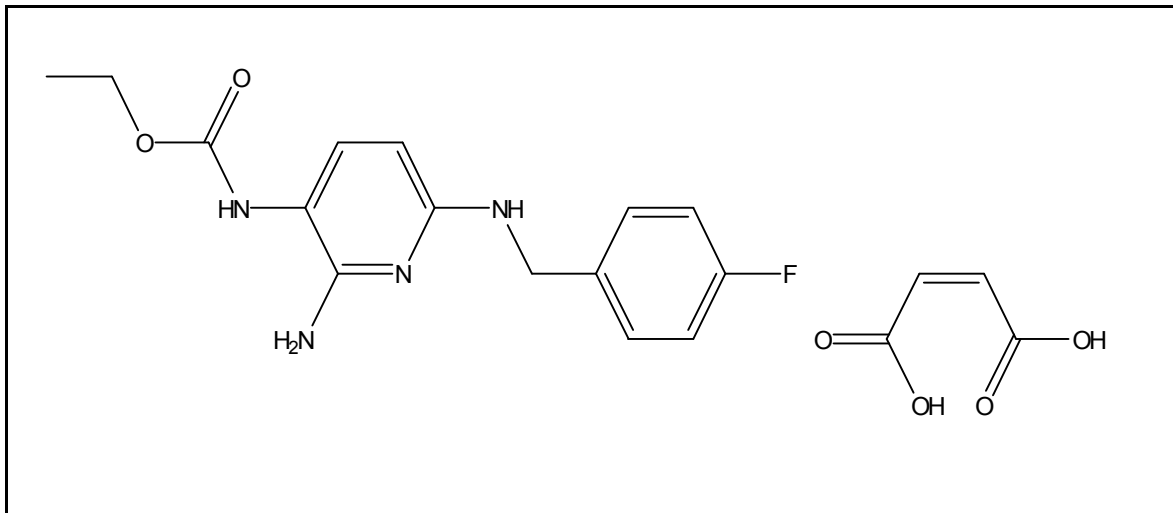


Abbildung 8: Strukturformel von Flupirtin (2-Amino-3-Ethoxycarbonylamino-6,4-fluorbenzylaminopyridinmaleat)

Flupirtin (2- Amino- 3- Ethoxycarbonylamino- 6, 4 -Fluorobenzylaminopyridinmaleat) ist als ein Pyridinderivat eine schlecht lösliche Substanz, die sich in BSL<sub>20</sub> kaum befriedigend lösen lässt. Deshalb wurde für die Behandlung vor der Hypoxie eine Lösung auf der Basis von angereichertem Neurobasalem Medium (NBM) hergestellt, die eine Konzentration von 500µM hatte.

1. Einerseits wurde davon ausgehend weiter mit angereichertem NBM verdünnt, bis auf Konzentrationen von 1µM, 10µM, 50µM und 100µM. Die Lösungen wurden ebenso wie eine Kontrolllösung aus angereichertem NBM nach dem Spülen mit PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> auf die Zellen appliziert. Nach 2 Stunden im Inkubator und erneutem Spülen wurden die Lösungen wieder durch das alte Medium ersetzt.

2. Andererseits wurden beim Mediumwechsel unterschiedliche Mengen der Flupirtinlösung zum neuen Kulturmedium dazugegeben, so dass die Konzentrationen im Medium auf den Zellen ebenfalls 1µM, 10µM, 50µM und 100µM betragen. Da das Medium in diesem experimentellen Ansatz vor der OGD nicht wieder entfernt wurde, betrug die Inkubationszeit bis zum Experiment 48 Stunden.

Für eine konstante Flupirtinkonzentration auch während der OGD wurden 1µM, 10µM und 50µM Lösungen von Flupirtin in BSL<sub>0</sub> angefertigt, deoxygeniert und in der Hypoxiekammer nach zweimaligem Spülen in die Zellkultur-Vertiefungen gegeben. Nach der Hypoxie wurde das getrennt gesammelte Kulturmedium wieder auf die Zellkulturen appliziert, so dass die Konzentration an Flupirtin mit dem prähypoxischen Zustand identisch war.



3. In einem dritten Versuchsaufbau wurde das Flupirtin ausschließlich *nach* der Hypoxie appliziert. Das geschah im selben Modus wie bei einer Langzeitapplikation von 48 Stunden.

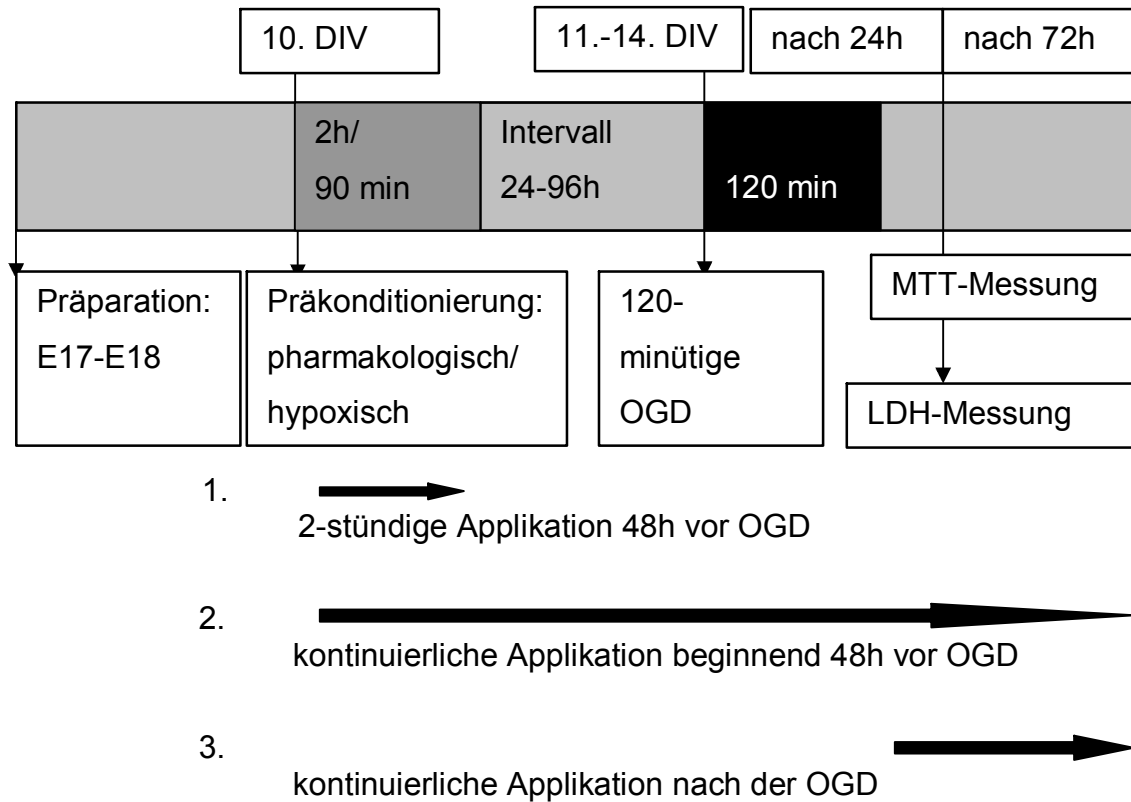


Abbildung 9: Zeitschemata von Flupirtin-Applikation und OGD

### 3.6.5. Behandlung mit Dimethylthiourea

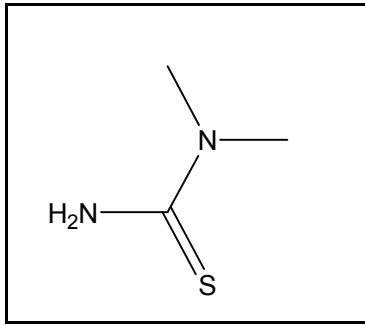


Abbildung 10: Strukturformel von Dimethylthiourea

Dimethylthiourea (DMTU) ist ein unspezifischer Radikalfänger und wurde in BSL<sub>20</sub> gelöst, sterilfiltriert und zu den NPA-, Eisenascorbat-, SPER/NO-beziehungsweise Flupirtin- Lösungen gegeben, so dass eine Endkonzentration von 10µM in den Zellkulturen vorhanden war. Als Kontrollen dienten die mit den entsprechenden Lösungen ohne DMTU-Anteil behandelten Schwesterkulturen. Durch vorausgehende Dosisfindungsexperimente konnte eine Toxizität der von uns verabreichten Konzentration ausgeschlossen werden, da ein Anstieg der LDH-Freisetzung erst ab einer Konzentration von 100µM nachweisbar war (Abbildung 12, Tabelle 3).

Zur Kontrolle der Wirksamkeit der Radikalblockierung wurden direkt nach Ablauf der zweistündigen Inkubationszeit Proben zur Bestimmung der Lipidperoxidation asserviert und verglichen.

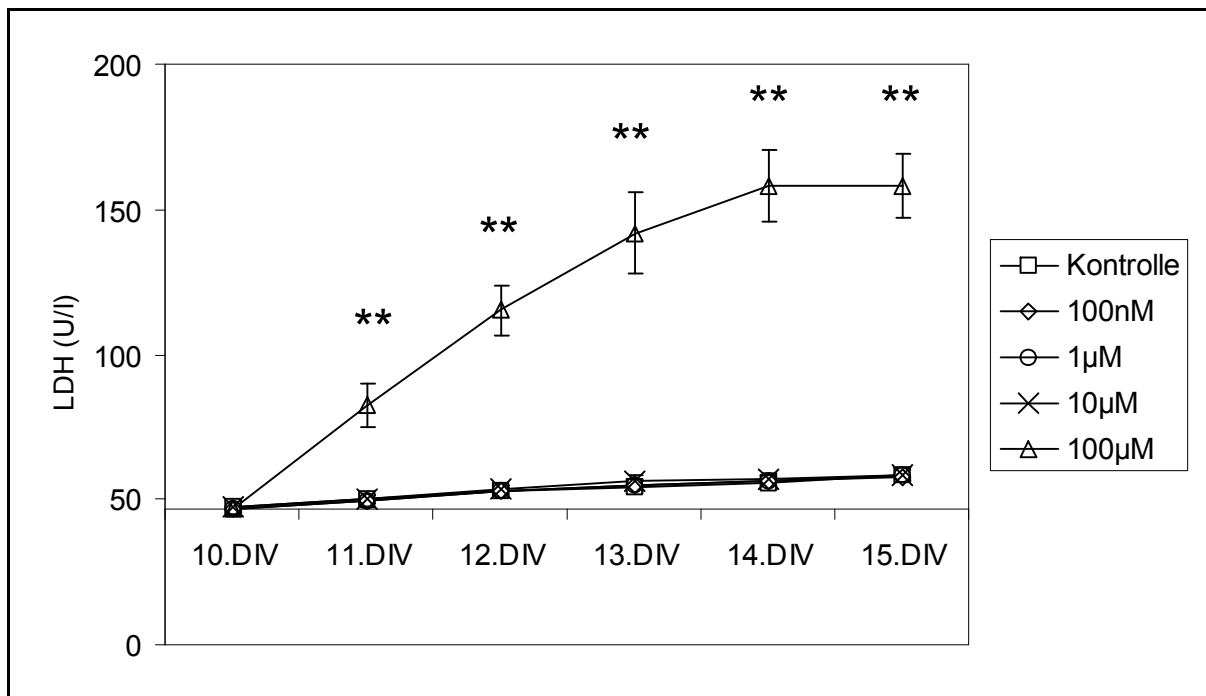


Abbildung 11: LDH-Freisetzung bis 120h nach zweistündiger Applikation von DMTU. Mittelwerte in U/l  $\pm$  SEM. N=12. \*\*p<0,001 *versus* Kontrolle.

Kontrolle	100nM	1µM	10µM	100µM	full kill
1861 $\pm$ 46	1870 $\pm$ 43	1852 $\pm$ 44	1858 $\pm$ 43	1556 $\pm$ 39 (**)	405 $\pm$ 27 (**)

Tabelle 3: MTT-Umsetzung 5 Tage nach zweistündiger Applikation von DMTU. Mittelwerte  $\pm$  SEM. N=12. \*\*p<0,001 *versus* Kontrolle.

### **3.7. Messung der Lipidperoxidation**

Die Lipidperoxidation ist ein Maß für die Menge der freigesetzten Radikale. Zur Messung dient dabei die Zunahme des Malondialdehyds (MDA) als Hydrolyseprodukt der Lipidperoxide. Die Zellen wurden dazu in der üblichen Dichte in 6-well-Platten ausgesät, zu verschiedenen Zeitpunkten einmal mit PBS gewaschen und dann mechanisch vom Boden gelöst und in 1200µl TBA-Reagenz pro Vertiefung geerntet. 30ml TBA-Reagenz bestand dabei aus 15ml 0,7%iger Phosphorsäure, 5ml 0,6%iger TBA-Lösung, 9ml H<sub>2</sub>O und 1ml 1%iger Methanol-Lösung. Für die Herstellung einer Standardkurve wurden 0µM, 2µM, 4µM, 6µM, 8µM und 10µM Lösungen von Tetraethoxypropan verwendet, das bei Erwärmung konzentrationsabhängig Malondialdehyd freisetzt.

Die Proben und die Standardreihe wurden eine Stunde bei 96°C inkubiert und anschließend bei 4°C und 12.000 Umdrehungen/min 5 Minuten zentrifugiert.

Die im Überstand befindliche Konzentration von Malondialdehyd wurde zuerst photometrisch bei 532nm für die Standardkurve ermittelt. In diesem Bereich verlief sie annähernd linear, so dass die Konzentrationen in den anschließend gemessenen Proben, die alle im Bereich der Standardkurve lagen, durch Extrapolation bestimmt werden konnten.

### **3.8. Statistische Auswertung**

Bei allen Experimenten wurden die Zellkulturen in den einzelnen Zellkultur-Vertiefungen als voneinander unabhängige Ansätze gewertet. Zur Vermeidung von statistisch relevanten zufälligen Verschiebungen unter einzelnen Mehrfach-Kulturplatten wurden jeweils die verschiedenen Präkonditionierungsansätze eines Experiments so verteilt, dass auf jeder Kulturplatte jeweils mindestens 2 Kontroll-Ansätze und 2 Ansätze als maximaler Zellschaden (full kill) behandelt wurden und ausgewertet werden konnten. Kulturplatten, bei denen sich diese internen Standardkontrollen deutlich von den vorangegangenen Experimenten und den Schwesterkulturen unterschieden, wurden nicht verwertet.

Zur Bestimmung der toxischen Dosisgrenzen der applizierten Substanzen wurde jeweils eine Anzahl 8 bis 12 Zellkulturansätzen verwendet. Bei den

Experimenten zur OGD betrug pro Substanz und Gruppe die Anzahl mindestens 14, wobei bezüglich der Wirkungshemmung durch DMTU diese Gruppenstärke mindestens 18 betrug. Zur Untersuchung der Malondialdehydfreisetzung wurden pro Substanz bis zu 6 Gruppen untersucht, in denen ebenfalls mindestens 8 unabhängige Ansätze untersucht wurden. Zur Vermeidung von Verzerrungen aufgrund von Einzelexperimenten wurden jeweils mindestens 3-4 Experimenten zusammengefasst. Die Anzahl N in den einzelnen Dosisgruppen ist in Tabelle 4-11 zusammengefasst.

In der gesamten vorliegenden Dissertationsschrift werden in allen Abbildungen und Tabellen diese Daten als Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt. Zur statistischen Analyse wurde ein one-way ANOVA (one-way analysis of variance) mit dem Bonferroni-Test als posthoc-Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden Werte mit  $p < 0,05$  durch \* und  $^+$ , beziehungsweise  $p < 0,01$  durch \*\* und  $^{++}$  gekennzeichnet.

Tabellen 4-11: Anzahl (N) der untersuchten Zellkulturansätze in den durchgeführten Experimenten. Es wurden jeweils mindestens 3-4 unabhängige Experimente zusammengefasst.

Tabelle 4: Untersuchungen zur Toxizität der verwendeten Substanzen

3-NPA	Kontrolle N=8	0,01 $\mu$ M N=8	0,1 $\mu$ M N=8	1 $\mu$ M N=8	10 $\mu$ M N=8	100 $\mu$ M N=8	Full kill N=8	
FeAsc	Kontrolle N=12	50 $\mu$ M N=12	150 $\mu$ M N=12	250 $\mu$ M N=12	300 $\mu$ M N=12	Full kill N=12		
SPER/NO	Kontrolle N=8	0,01 $\mu$ M N=10	0,1 $\mu$ M N=10	1 $\mu$ M N=10	10 $\mu$ M N=10	100 $\mu$ M N=10	1mM N=10	Full kill N=8
Flupirtin	Kontrolle N=8	0,5 $\mu$ M N=8	5 $\mu$ M N=12	50 $\mu$ M N=12	Full kill N=8			

Tabelle 5: LDH-Freisetzung nach Präkonditionierung und OGD im 24 h-Intervall

3-NPA	Kontrolle N=16	OGD N=24	0,1nM N=20	0,001 $\mu$ M N=22	0,01 $\mu$ M N=20	0,1 $\mu$ M N=20	Full kill N=16
FeAsc	Kontrolle N=16	OGD N=32	50 $\mu$ M N=24	150 $\mu$ M N=24	250 $\mu$ M N=24	Full kill N=16	
SPER/NO	Kontrolle N=16	OGD N=24	0,01 $\mu$ M N=20	0,1 $\mu$ M N=24	1 $\mu$ M N=20	Full kill N=20	
Flupirtin	Kontrolle N=16	OGD N=20	0,5 $\mu$ M N=20	5 $\mu$ M N=20	50 $\mu$ M N=20	Full kill N=20	

Tabelle 6: LDH-Freisetzung nach Präkonditionierung und OGD im 48 h-Intervall

3-NPA	Kontrolle N=16	OGD N=28	0,1nM N=28	0,001µM N=28	0,01µM N=28	0,1µM N=28	Full kill N=20
FeAsc	Kontrolle N=14	OGD N=34	50µM N=24	150µM N=24	250µM N=24	Full kill N=22	
FeSO <sub>4</sub>	Kontrolle N=23	OGD N=28	50µM N=24	150µM N=24	250µM N=23	Full kill N=17	
NaAsc	Kontrolle N=16	OGD N=28	1µM N=22	3µM N=24	5µM N=24	Full kill N=16	
SPER/NO	Kontrolle N=15	OGD N=26	0,01µM N=24	0,1µM N=24	1µM N=23	Full kill N=14	
Flupirtin	Kontrolle N=14	OGD N=23	0,5µM N=18	5µM N=18	50µM N=18	Full kill N=18	
SPER/NO +FeAsc	Kontrolle N=18	OGD N=24	FeAsc N=26	SPER/NO N=26	SPER/NO +FeAsc N=27	Full kill N=23	

Tabelle 7: LDH-Freisetzung nach Präkonditionierung und OGD im 72 h-Intervall

3-NPA	Kontrolle N=16	OGD N=28	0,1nM N=32	0,001µM N=32	0,01µM N=32	0,1µM N=28	Full kill N=24
FeAsc	Kontrolle N=16	OGD N=26	50µM N=24	150µM N=24	250µM N=28	Full kill N=26	
SPER/NO	Kontrolle N=16	OGD N=23	0,01µM N=20	0,1µM N=22	1µM N=20	Full kill N=18	
Flupirtin	Kontrolle N=16	OGD N=22	0,5µM N=18	5µM N=18	50µM N=22	Full kill N=16	
SPER/NO +FeAsc	Kontrolle N=24	OGD N=28	FeAsc N=28	SPER/NO N=28	SPER/NO +FeAsc N=28	Full kill N=24	

Tabelle 8: LDH-Freisetzung nach Präkonditionierung und OGD im 96 h-Intervall

3-NPA	Kontrolle N=24	OGD N=26	0,1nM N=24	0,001µM N=25	0,01µM N=25	0,1µM N=24	Full kill N=28
FeAsc	Kontrolle N=16	OGD N=26	50µM N=24	150µM N=25	250µM N=26	Full kill N=26	
SPER/NO	Kontrolle N=16	OGD N=26	0,01µM N=23	0,1µM N=23	1µM N=24	Full kill N=16	
Flupirtin	Kontrolle N=16	OGD N=22	0,5µM N=16	5µM N=18	50µM N=22	Full kill N=18	

Tabelle 9: LDH-Freisetzung nach Flupirtingabe während der OGD bzw. der HP

Während OGD	Kontrolle N=20	OGD N=21	0,5µM N=20	5µM N=20	50µM N=20	Full kill N=18		
Während HP	Kontrolle N=24	OGD N=26	HP N=33	HP +0,5µM N=28	HP +5µM N=28	HP +50µM N=28	50µM N=28	Full kill N=17

Tabelle 10: LDH-Freisetzung nach Prakonditionierung +/- DMTU und OGD

3-NPA	Kontrolle N=48	OGD N=85	0,001µM N=52	0,001µM +DMTU N=48	0,01µM N=52	0,01µM +DMTU N=48	0,1µM N=52	0,1µM +DMTU N=48	Full kill N=56
FeAsc	Kontrolle N=32	OGD N=28	50µM N=18	50µM +DMTU N=18	150µM N=18	150µM +DMTU N=18	250µM N=18	250µM +DMTU N=18	Full kill N=24
SPER/NO	Kontrolle N=20	OGD N=18	0,01µM N=18	0,01µM +DMTU N=18	0,1µM N=18	0,1µM +DMTU N=18	1µM N=18	1µM +DMTU N=18	Full kill N=18

Tabelle 11: MDA-Konzentration nach Prakonditionierung +/- DMTU

3-NPA	Kontrolle N=16	Kontrolle +DMTU N=16	0,01µM N=16	0,01µM +DMTU N=16	0,1µM N=16	0,1µM +DMTU N=16	1µM N=16	1µM +DMTU N=16
FeAsc	Kontrolle N=16	50µM N=12	150µM N=12	250µM N=12	250µM +DMTU N=12			
SPER/NO	Kontrolle N=8	Kontrolle +DMTU N=8	0,01µM N=8	0,01µM +DMTU N=8	0,1µM N=8	0,1µM +DMTU N=8	1µM N=8	1µM +DMTU N=8
HP +Flupirtin	Kontrolle N=8	HP N=16	HP +0,5µM N=15	HP +5µM N=15	HP +50µM N=16			
SPER/NO +FeAsc	Kontrolle N=8	FeAsc N=8	SPER/NO N=8	SPER/NO +FeAsc N=8				