

4 Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der neuronal angereicherten Zellkultur

Durch eine tägliche Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellkulturmedium unter zusätzlicher phasenkontrastmikroskopischer Kontrolle war erkennbar, dass ein Untergang der kultivierten neuronalen Zellen nach circa 3 Wochen einsetzte (Abbildung 13). Der Zeitpunkt des Beginns dieses Absterbens variierte mit der Dichte der Zellen bei der Aussaat und mit der Häufigkeit des Mediumwechsels.

Daher wurde als Zeitpunkt für die Experimente der 10. bis 15. DIV gewählt, der noch ausreichend vor diesem beginnenden Absterben lag, um eine Verzerrung durch den dadurch bedingten langsamen LDH-Anstieg zu verhindern. Die konformen Schwankungen alle 3 bis 4 Tage ergaben sich aus dem Zusatz von neuem Zellkulturmedium. Ab dem Zeitpunkt der Experimentbeginns wurde auf eine Zugabe von neuem Medium verzichtet, um diese Schwankungen zu vermeiden. Da es sich dabei um maximal 5 Tage handelte, entstand dadurch keine zusätzliche Zellschädigung.

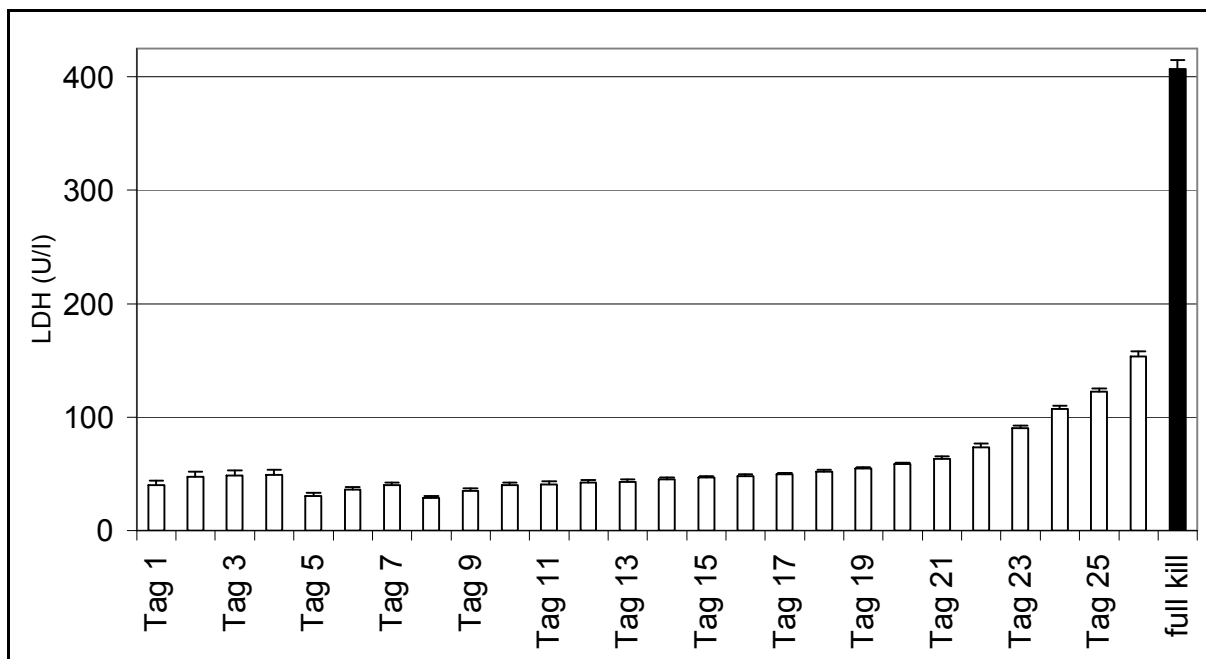


Abbildung 1: LDH-Aktivität im Zellkulturmedium bis zum 26. DIV. Mittelwerte in U/l \pm SEM. Jeweils N=8.

4.2. Charakterisierung des Schadens durch kombinierten Sauerstoff- und Glukose-Entzug

Eine zweistündige OGD führte in den kortikalen Kulturen zu einer raschen LDH-Freisetzung bis 24 Stunden nach der Hypoxie (Abbildung 14). Danach war nur noch ein langsamer Anstieg zu verzeichnen, vergleichbar mit dem vorbeschriebenen Absterben der Kultur. Die LDH-Aktivität lag jedoch jeweils noch unter der LDH-Aktivität nach der totalen Zellschädigung, die wir mit einer exzessiven Glutamatdosis (5 mM, „full kill“) erreichten. Aufgrund dieser Kinetik führten wir die Schadensevaluation anhand der LDH-Freisetzung 24h nach der OGD und die abschließende Beurteilung anhand des MTT-Umsatzes 72h nach der OGD durch.

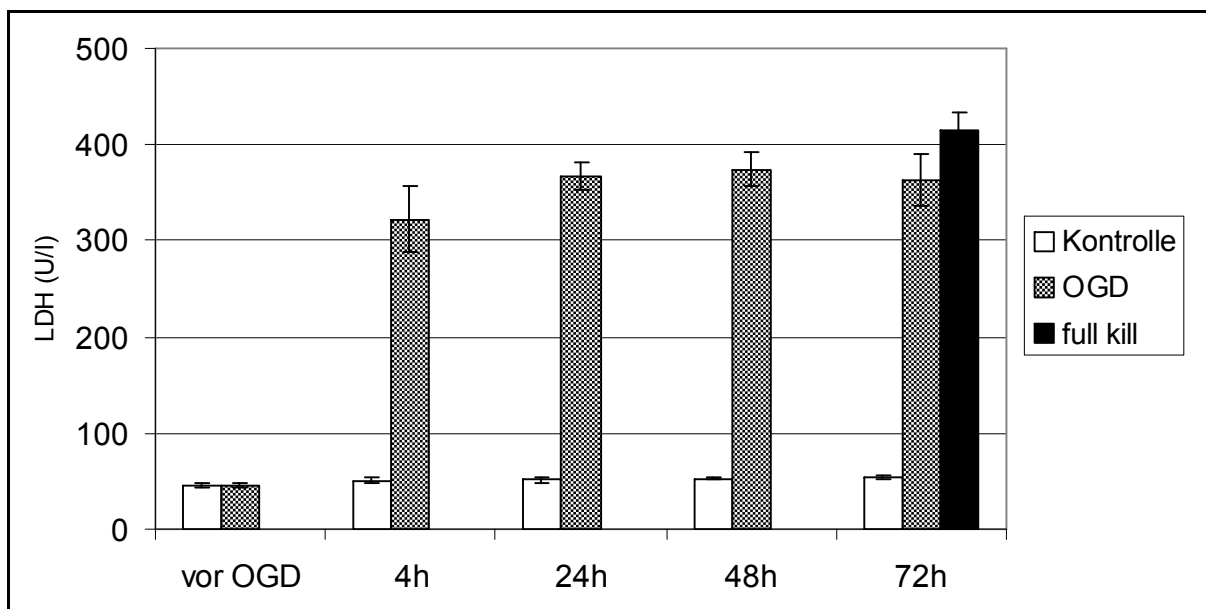


Abbildung 2: LDH-Freisetzung bis 72h nach OGD. Mittelwerte in U/ml \pm SEM. N=16, je 3 Experimente.

Bei phasenkontrastmikroskopischer Beobachtung (Abbildung 15-18) fiel bereits nach 4 Stunden eine vermutlich nekrotische Schwellung der Neuronen (schwarze Pfeile) auf, wohingegen die Astrozyten auch im Verlauf kaum morphologische Veränderungen zeigten. Daher erklärt sich der LDH-Anstieg offenbar hauptsächlich aus dem Untergang der Neuronen, die ihre Zytoplasmabestandteile ins Medium abgaben. Der Vergleich mit einem selektiven neuronalen Toxin, wie Glutamat als 100% Kontrolle (full kill) erlaubt die Abschätzung des neuronalen Unterganges [141].

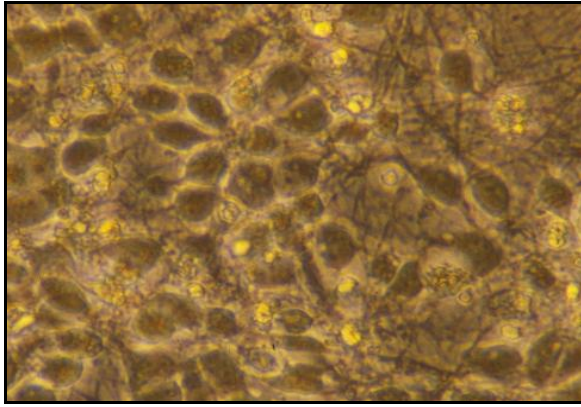


Abbildung 3: vor OGD

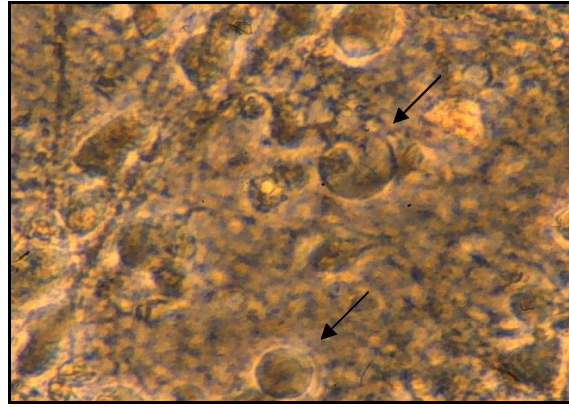


Abbildung 4: 4h nach OGD

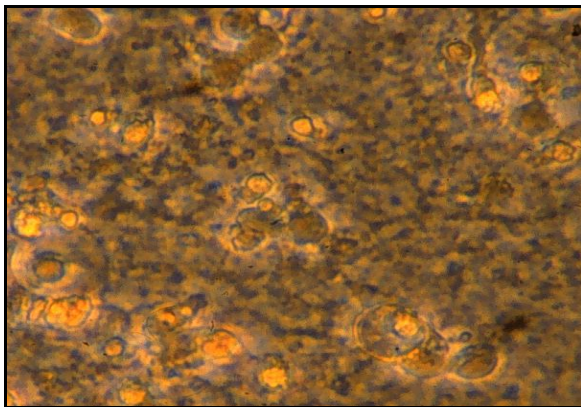


Abbildung 5: 24h nach OGD

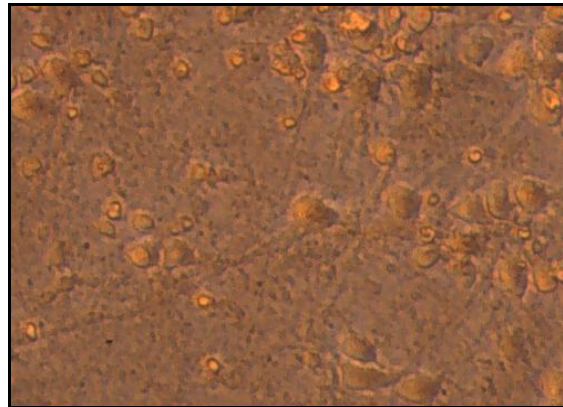


Abbildung 6: 72h nach OGD

Abbildung 15-18: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen vor OGD sowie 4h, 24h und 72h nach OGD bei 400-facher Vergrößerung.

4.3. Präkonditionierung durch 3-Nitropropionsäure

4.3.1. Basale Toxizität

Nach zweistündiger Applikation von 3-NPA stieg die LDH-Ausschüttung ab einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ dosisabhängig an (Abbildung 19). Ebenso war nach 5 Tagen erst ab einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ eine Verringerung des MTT-Metabolismus messbar (Tabelle 12). Daher wurden für die weiteren Experimente nur Konzentrationen unterhalb dieser toxischen Grenze gewählt.

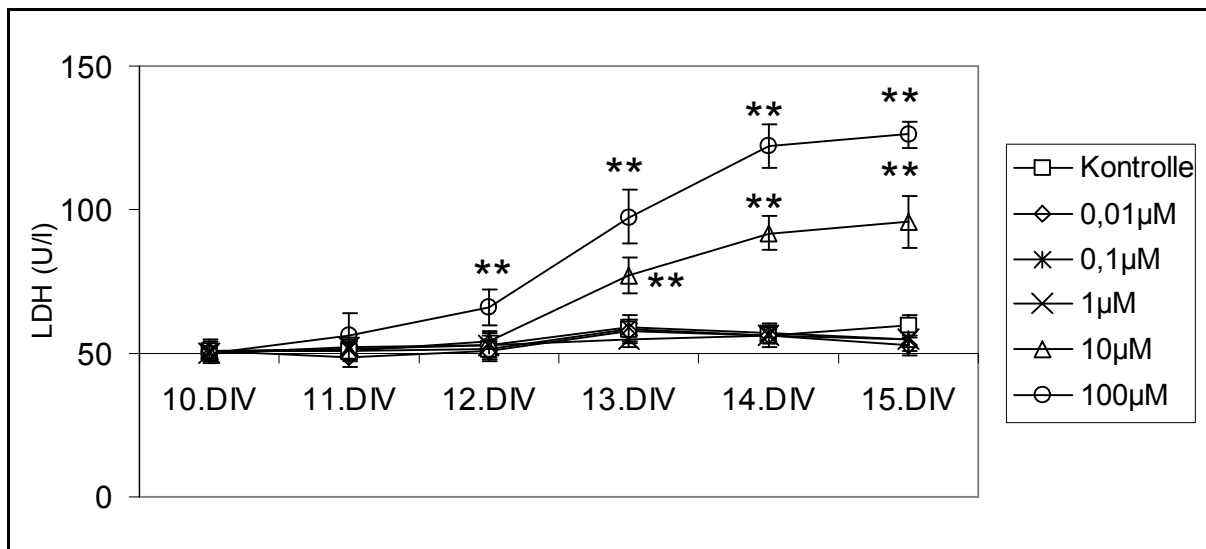


Abbildung 7: LDH-Freisetzung bis 5 Tage nach zweistündiger Applikation von 3-NPA. Mittelwerte in U/l \pm SEM. N=8. ** $p < 0,001$ versus Kontrolle.

Kontrolle	full kill			
1850 \pm 54	391 \pm 49			
0,01µM	0,1µM	1µM	10µM	100µM
1854 \pm 94	1848 \pm 65	1823 \pm 67	1568 \pm 47 **	1363 \pm 59 **

Tabelle 12: MTT-Metabolismus 5 Tage nach Applikation verschiedener Dosen von 3-NPA, Mittelwerte \pm SEM. N=8. ** $p < 0,001$ versus Kontrolle.

4.3.2. Dosis- und Zeit-Wirkungs-Beziehung

Durch die vorherige Gabe von 3-NPA in Konzentrationen von 0,1nM bis 1µM wurde die Schädigung durch eine OGD signifikant verringert. Den maximalen Effekt zeigte jeweils eine Konzentration von 0,01µM. Bei der zusätzlichen Variation des Zeitintervalls zwischen der Vorbehandlung mit 3-NPA und der Hypoxie zeigte sich, dass eine maximale Protektion durch ein Intervall von 48 Stunden zwischen Präkonditionierung und OGD (Schadensreduktion um 66%) erzeugt werden konnte. Auch nach einem Intervall von 24 Stunden (25%) und 72 Stunden (23%) war ein geringerer Erfolg messbar, der sich jedoch nach 96 Stunden nicht reproduzieren ließ (Abbildung 20, Tabelle 13).

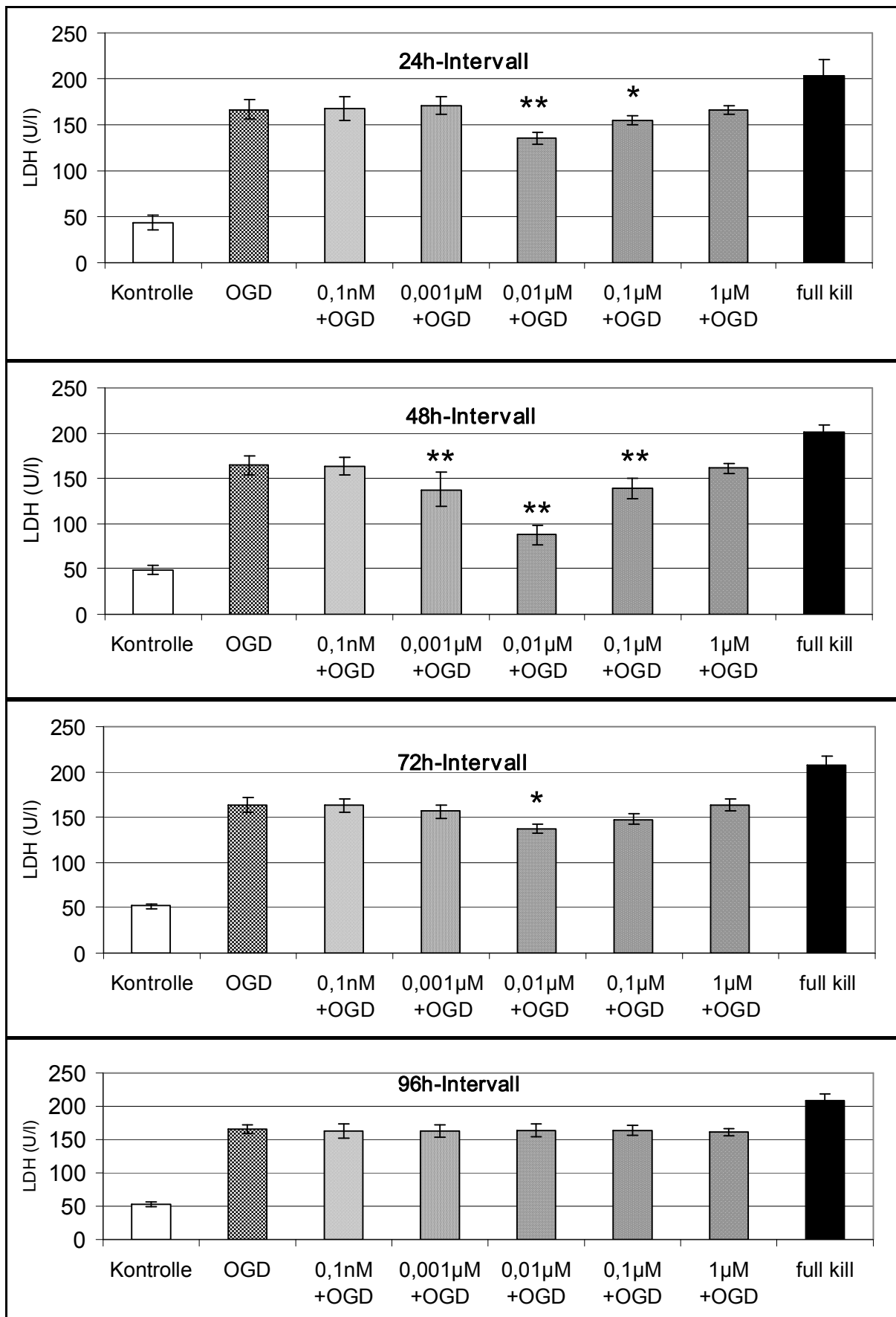


Abbildung 8: LDH-Freisetzung 24h nach OGD nach Präkonditionierung mit 3-NPA. Mittelwerte in U/l \pm SEM. N=16-30, je 3-4 Experimente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ versus OGD ohne Vorbehandlung.

	24h-Intervall	48h-Intervall	72h-Intervall	96h-Intervall
Kontrolle	1832 ± 29	1844 ± 39	1851 ± 35	1855 ± 42
OGD	747 ± 33	745 ± 28	749 ± 24	735 ± 28
0,1nM + OGD	737 ± 57	757 ± 24	751 ± 30	751 ± 27
0,001µM + OGD	938 ± 34 **	1060 ± 52 **	957 ± 33 **	740 ± 27
0,01µM + OGD	1230 ± 37 **	1634 ± 48 **	1101 ± 31 **	754 ± 33
0,1µM + OGD	948 ± 32 **	1065 ± 42 **	764 ± 62	745 ± 30
1µM + OGD	752 ± 41	739 ± 29	737 ± 16	738 ± 22
full kill	403 ± 24	399 ± 16	410 ± 20	405 ± 29

Tabelle 13: MTT-Metabolismus 72h nach OGD nach 3-NPA-Vorbehandlung in unterschiedlichen Intervallen. Mittelwerte ± SEM. N=12-15, je 3 Experimente. *p<0,05; **p<0,001 *versus* OGD ohne Vorbehandlung.

4.3.3. Wirkungsblockierung

Da 3-NPA eine irreversible Blockade der Succinat-Dehydrogenase, dem Komplex II der Atmungskette bewirkt, entstehen durch diese Substanz durch einen gestörten Elektronenfluss freie Sauerstoffradikale in der betroffenen Zelle. Zur Blockierung dieses Effekts wurde DMTU, ein unspezifischer Radikalfänger eingesetzt. Die höchstmögliche Konzentration, die in der Zellkultur keine morphologisch oder über die LDH-Aktivität nachweisbaren Schäden verursachte, war 10µM. Unter den Konditionen, unter denen der beste Schutz durch 3-NPA erzielt worden war, das heißt im 48h-Intervall mit Dosen von 0,001µM – 0,1µM, wurde diese Dosis DMTU gleichzeitig mit 3-NPA appliziert und bewirkte eine Verringerung der protektiven präkonditionierenden Wirkung, jedoch keine komplette Aufhebung (Abbildung 21 und Tabelle 14).

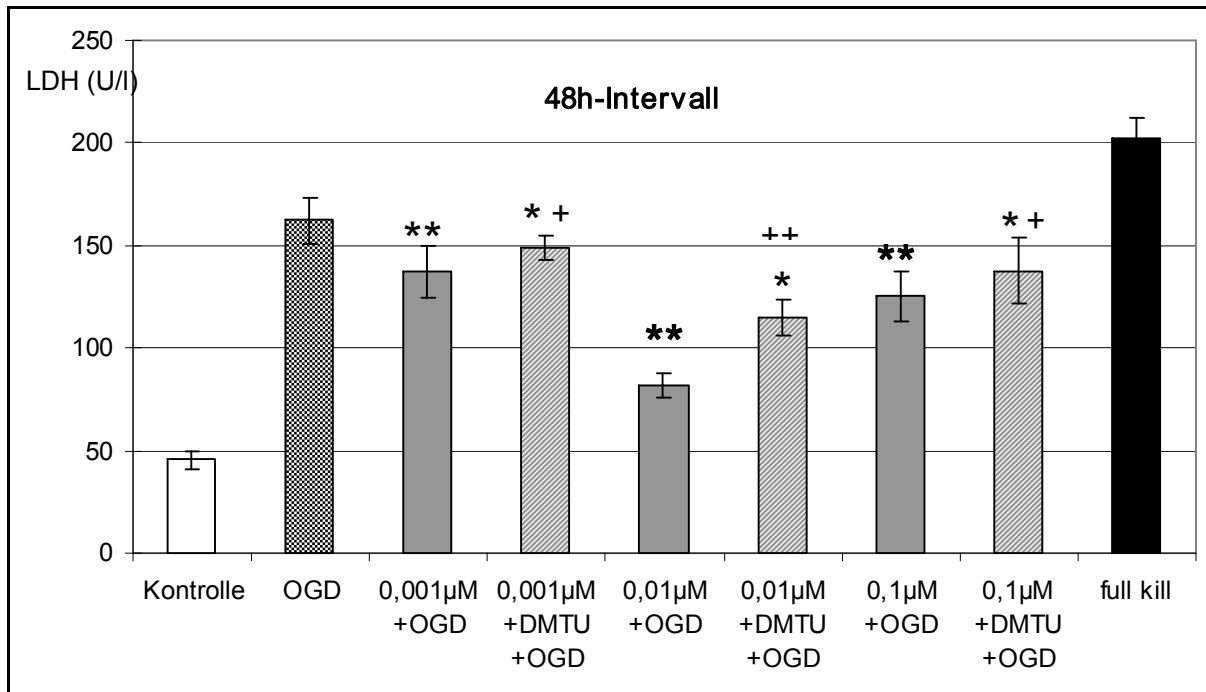


Abbildung 9: LDH-Freisetzung 24h nach OGD nach Präkonditionierung mit 3-NPA +/-DMTU (10µM). Mittelwerte in U/l ± SEM. N=48-85, je mindestens 3 Experimente. * p<0,05, ** p<0,001 *versus* OGD ohne Vorbehandlung. + p<0,05, ++ p<0,001 *versus* äquimolare 3-NPA-Dosis ohne DMTU

	ohne DMTU	+10µM DMTU
Kontrolle	1849 ± 41,9	
OGD	740 ± 25,2	
full kill	403 ± 12,8	
0,001µM 3-NPA	1057 ± 27,5 **	855 ± 18,3 ++
0,01µM 3-NPA	1632 ± 32,2 **	1400 ± 33,4 ** ++
0,1µM 3-NPA	1070 ± 30,2 **	860 ± 26,7 * ++

Tabelle 14: MTT-Metabolismus 72h nach OGD nach Präkonditionierung mit 3-NPA +DMTU im 48h-Intervall. Mittelwerte ± SEM. N=48-85, je 3-4 Experimente. **p<0,001 *versus* OGD ohne Vorbehandlung, ++p<0,001 *versus* äquimolare 3-NPA-Dosis ohne DMTU.

4.3.4. Lipidperoxidation

In den mit 3-NPA behandelten Zellen war direkt nach der Präkonditionierung eine erhöhte Konzentration an MDA, entsprechend einer erhöhten Radikalbelastung nachweisbar (Abbildung 22). 48 Stunden später, also kurz vor der Hypoxie, war in der höchsten NPA-Konzentration noch eine leicht erhöhte MDA-Konzentration messbar (Tabelle 15).

In den gleichzeitig mit DMTU inkubierten Proben entsprach die MDA-Konzentration jedoch derjenigen der Kontrollen, so dass von einer kompletten Absorption der freien Radikale ausgegangen werden muss. Das bedeutet, dass die Wirkung von 3-NPA nicht allein auf die Freisetzung der Sauerstoff-Radikale zurückgeführt werden kann.

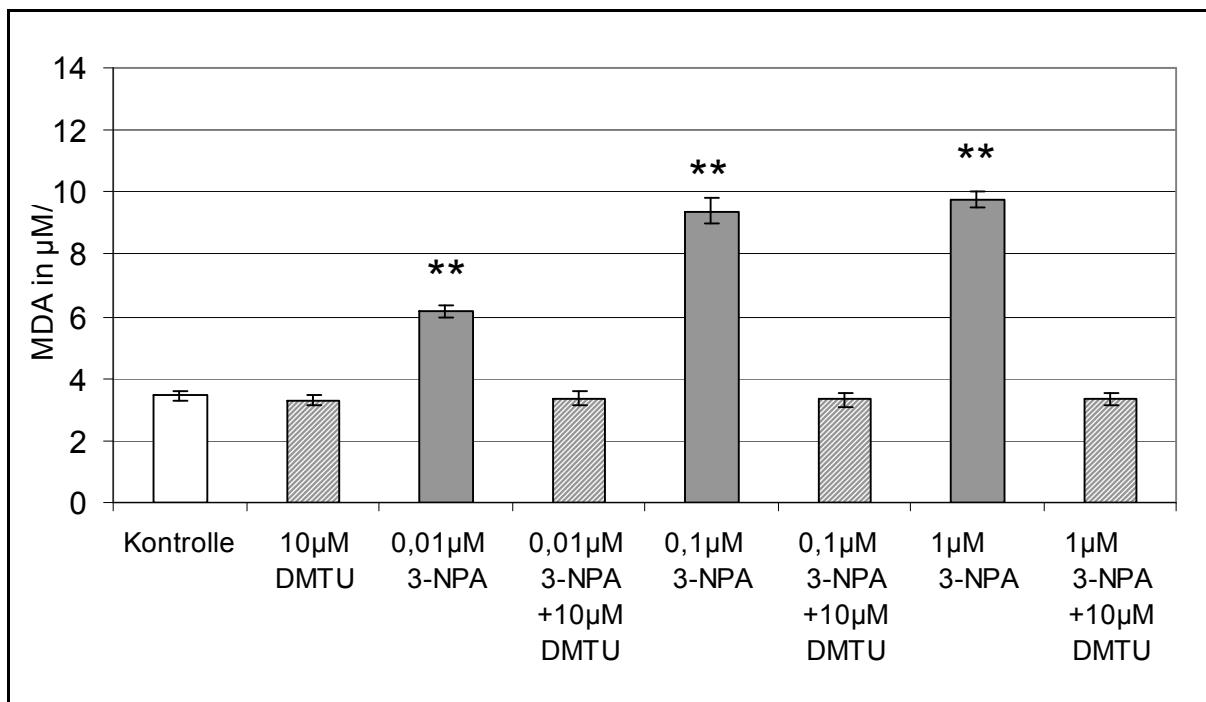


Abbildung 10: MDA-Messung nach zweistündiger Inkubation mit 3-NPA ±10µM DMTU. Mittelwerte in µM/l ± SEM. N=16, je 3 Experimente. ** p<0,001 *versus* Kontrolle.

	ohne DMTU	+ 10µM DMTU
Kontrolle	3,29 ± 0,14	3,3 ± 0,16
0,01µM	3,26 ± 0,12	3,38 ± 0,1
0,1µM	3,32 ± 0,15	3,25 ± 0,17
1µM	4,24 ± 0,24 **	3,36 ± 0,15

Tabelle 15: MDA-Messung 48h nach zweistündiger Inkubation mit 3-NPA; direkt vor OGD. Mittelwerte in µM/l ± SEM. N=16. ** p<0,001 *versus* Kontrolle.

4.4. Präkonditionierung durch Eisen-Ascorbat

4.4.1. Basale Toxizität

Um auszuschließen, dass die verwendeten Konzentrationen von Eisensulfat und Ascorbat einen toxischen Effekt auf die Zellkulturen haben, wurden nach zweistündiger Applikation über 5 Tage hinweg die LDH-Aktivität (Abbildung 23) und anschließend der MTT-Metabolismus (Tabelle 16) gemessen, sowie die Morphologie der Zellen kontrolliert. Dabei zeigten sich unterhalb einer Dosis von 300µM keine Unterschiede zu den Kontrollkulturen. Daher fanden anschließend in den Experimenten nur Konzentrationen bis 250µM Eisensulfat, entsprechend 5µM Ascorbat Verwendung.

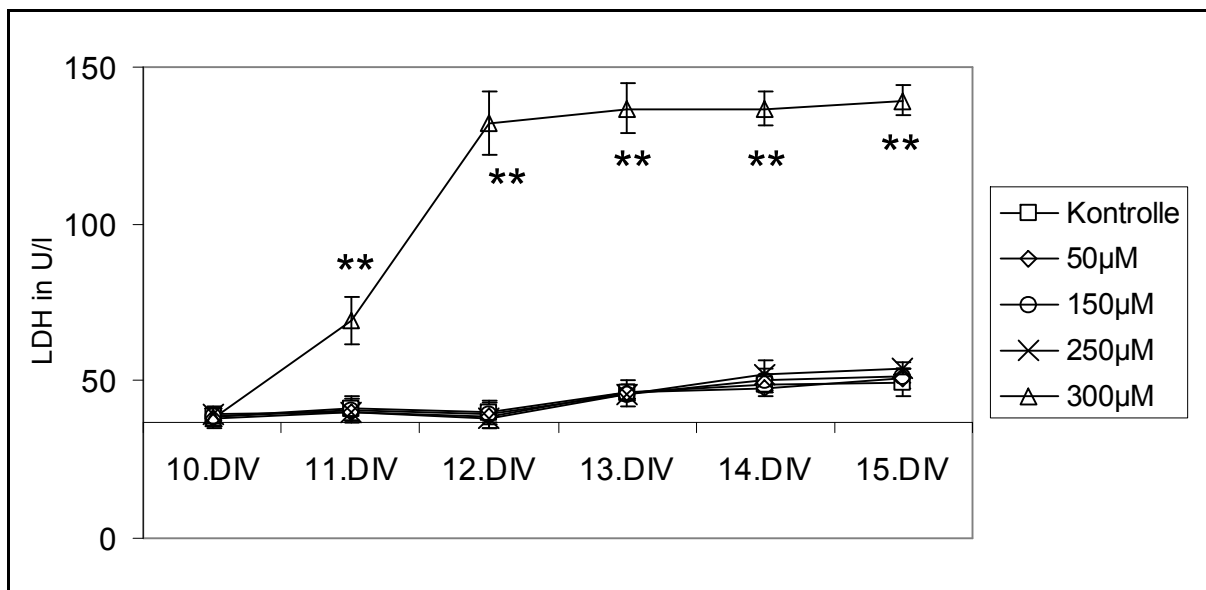


Abbildung 11: LDH-Freisetzung bis 120h nach zweistündiger Präkonditionierung mit verschiedenen Konzentrationen Eisen-Ascorbat. Mittelwerte in U/l \pm SEM. N=12. **p<0,001 *versus* Kontrolle.

Kontrolle	50µM	150µM	250µM	300µM	full kill
1867 \pm 58	1881 \pm 64	1864 \pm 56	1870 \pm 30	945 \pm 55 **	450 \pm 45 **

Tabelle 16: MTT-Umsetzung 120h nach zweistündiger Applikation von Eisen-Ascorbat. Mittelwerte \pm SEM. N=12. ** p<0,001 *versus* Kontrolle.

4.4.2. Dosis- und Zeit-Wirkungs-Beziehung

Für die Ermittlung des optimalen Zeitpunkts der Vorbehandlung wurden Intervalle von 24, 48, 72 und 96 Stunden zwischen der Präkonditionierung und der OGD gewählt. Die größtmögliche Reduktion des hypoxischen Schadens fand sich nach einem Zeitintervall von 48 Stunden (Abbildung 24, Tabelle 17).

Dabei konnte eine Dosis von 250 μ M Eisensulfat in Kombination mit einer 5 μ M Ascorbatlösung eine maximale Reduktion der hypoxischen Schädigung um 59,3% erzielen. In den geringeren Konzentrationen war ebenfalls ein signifikanter Schutz nachzuweisen, der jedoch nur 39,0%, beziehungsweise 27,5% betrug.

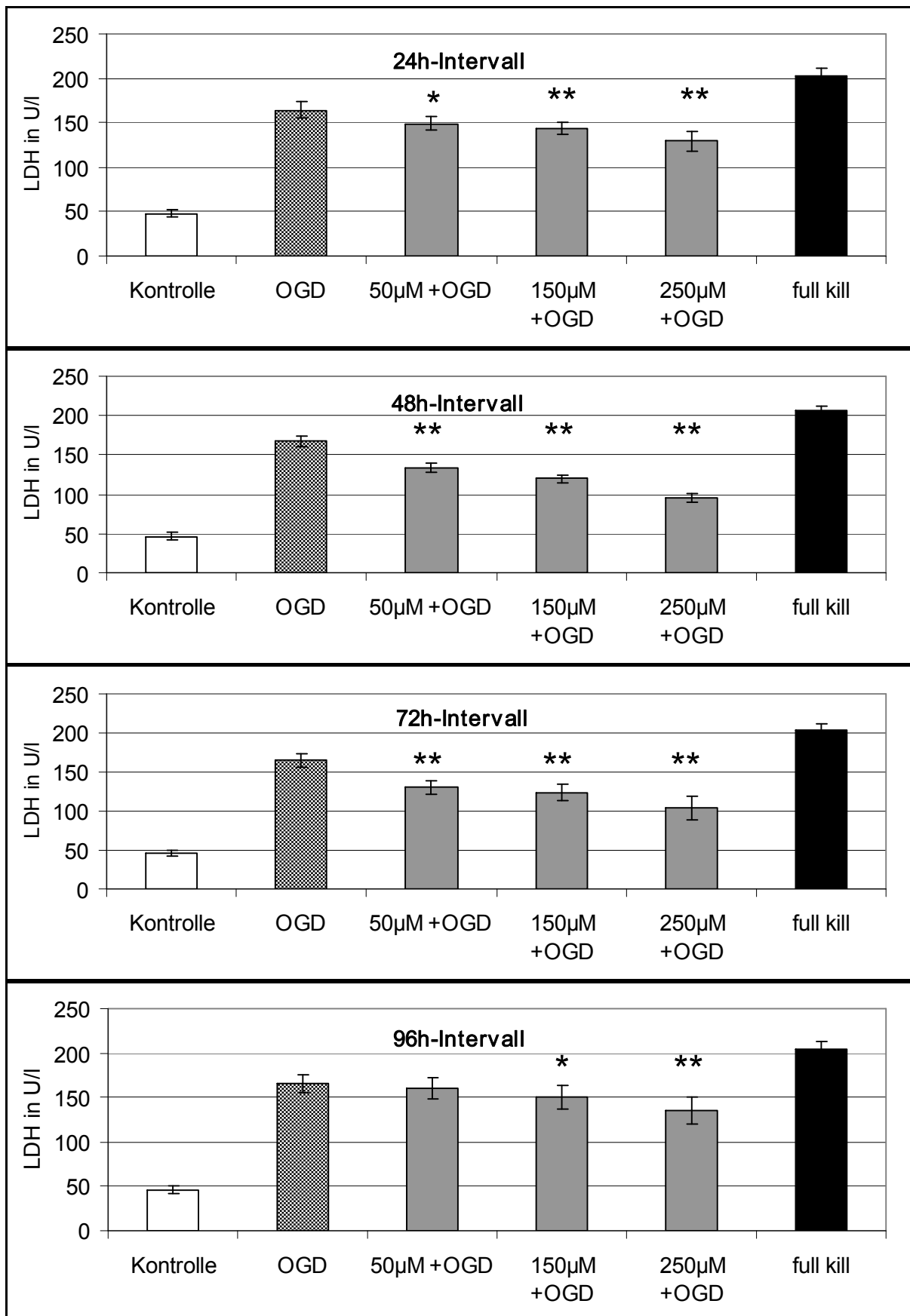


Abbildung 12: LDH-Freisetzung 24h nach OGD nach Präkonditionierung mit Eisen-Ascorbat. Mittelwerte in U/l \pm SEM. N=14-34, je 3-4 Experimente. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ versus OGD ohne Vorbehandlung.

	24h Intervall	48h Intervall	72h Intervall	96h Intervall
Kontrolle	1802 ± 61	1768 ± 49	1809 ± 67	1771 ± 57
OGD	802 ± 53	799 ± 75	774 ± 55	765 ± 52
full kill	399 ± 30	397 ± 19	406 ± 18	405 ± 28
50µM	897 ± 89 **	978 ± 73 **	1205 ± 84 **	956 ± 75 *
150µM	973 ± 73 **	1053 ± 93 **	1303 ± 1084 **	1030 ± 76 **
250µM	1003 ± 86 **	1191 ± 112 **	1377 ± 111 **	1084 ± 82 **

Tabelle 17: MTT-Metabolismus 72h nach OGD nach Prækonditionierung mit Eisen-Ascorbat in unterschiedlichen Intervallen. Mittelwerte ± SEM. N=14-34 aus je 3-4 Experimenten. *p<0,05, **p<0,001 *versus* OGD ohne Vorbehandlung.

Um auszuschließen, dass eine der beiden Substanzen allein und nicht die durch die Kombination freigesetzten Radikale des Systems prækonditionierend wirken, wurden beide Substanzen einzeln im besten prækonditionierenden Zeitschema getestet. Dabei konnten weder Eisensulfat noch Ascorbat allein gemessen anhand der LDH-Freisetzung und des MTT-Metabolismus das Überleben der Zellen nach der OGD verbessern (Tabellen 18 und 19).

	LDH	MTT
Kontrolle	48,3 ± 3,9	1820 ± 58
OGD	165,7 ± 8,5	754 ± 37
full kill	204,3 ± 7,5	401 ± 15
50µM	168,0 ± 7,8	763 ± 37
150µM	166,2 ± 7,5	764 ± 50
250µM	167,3 ± 7,8	778 ± 42

Tabelle 18: LDH-Freisetzung 24h und MTT-Metabolismus 72h nach OGD nach Prækonditionierung mit *Eisensulfat* im 48h-Intervall. Mittelwerte in U/l ± SEM. N=17-28, je 3-4 Experimente. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den prækonditionierten Zellen und den Kontrollzellen.

	LDH	MTT
Kontrolle	47,9 ± 3,1	1822 ± 52
OGD	165,1 ± 8,5	741 ± 36
full kill	202,3 ± 8,1	401 ± 14
1µM	167,7 ± 7,3	734 ± 33
3µM	166,9 ± 10,9	747 ± 28
5µM	165,4 ± 6,6	756 ± 39

Tabelle 19: LDH-Freisetzung 24h und MTT-Metabolismus 72h nach OGD nach Präkonditionierung mit *Natriumascorbat* im 48h-Intervall. Mittelwerte in U/l ± SEM. N=16-28, je 3-4 Experimente. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den präkonditionierten Zellen und den Kontrollzellen.

4.4.3. Wirkungsblockierung

Durch Fe^{2+} und O_2 entsteht Fe^{3+} und O_2^- . Dabei dismutiert O_2^- sehr schnell zu H_2O_2 , einem freien Radikal. Da durch Ascorbat Fe^{3+} wieder zu Fe^{2+} reduziert wird, ist dieser Prozess nicht selbstlimitiert. Um diese freien Radikale zu neutralisieren, wurde zusätzlich 10µM DMTU in die Lösung gegeben.

Bei einer darauffolgenden OGD konnte im Zeitintervall von 48 Stunden in keiner Konzentration ein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten Schwesterkulturen und den mit Eisen-Ascorbat und 10µM DMTU behandelten Zellen festgestellt werden (Tabelle 20). Somit konnte die schützende Wirkung von Eisen-Ascorbat durch DMTU vollständig aufgehoben werden.

	LDH		MTT	
	ohne DMTU	+10µM DMTU	ohne DMTU	+10µM DMTU
Kontrolle	52 ± 5		1853 ± 28	
OGD	168 ± 9		751 ± 29	
full kill	203 ± 8		408 ± 26	
50µM	134 ± 10 **	162 ± 11 ++	1006 ± 33 **	831 ± 50 ++
150µM	125 ± 7 **	164 ± 8 ++	1285 ± 79 **	845 ± 48 ++
250µM	105 ± 9 **	158 ± 9 ++	1604 ± 104 **	863 ± 74 ++

Tabelle 20: LDH-Freisetzung und MTT-Metabolismus nach Präkonditionierung mit Eisen-Ascorbat und DMTU-Zugabe von 10µM und anschließender OGD nach 48h Intervall. N=18-32, je 3-4 unabhängige Experimente. **p<0,001 *versus* OGD ohne Vorbehandlung, ++p<0,001 *versus* äquimolare Dosis Eisen-Ascorbat ohne DMTU.

4.5.4. Lipidperoxidation

Wie in der Abbildung (Abbildung 25) gezeigt, war direkt nach der Behandlung dosisabhängig oxidativer Stress in Form von MDA nachweisbar. Bei den additiv mit 10µM DMTU behandelten Zellen war die Konzentration an MDA sogar unwesentlich geringer als in den unbehandelten Kontrollkulturen. Direkt vor der OGD unterschieden sich die unterschiedlichen Konditionen nicht mehr in ihrem MDA-Gehalt (Tabelle 21).

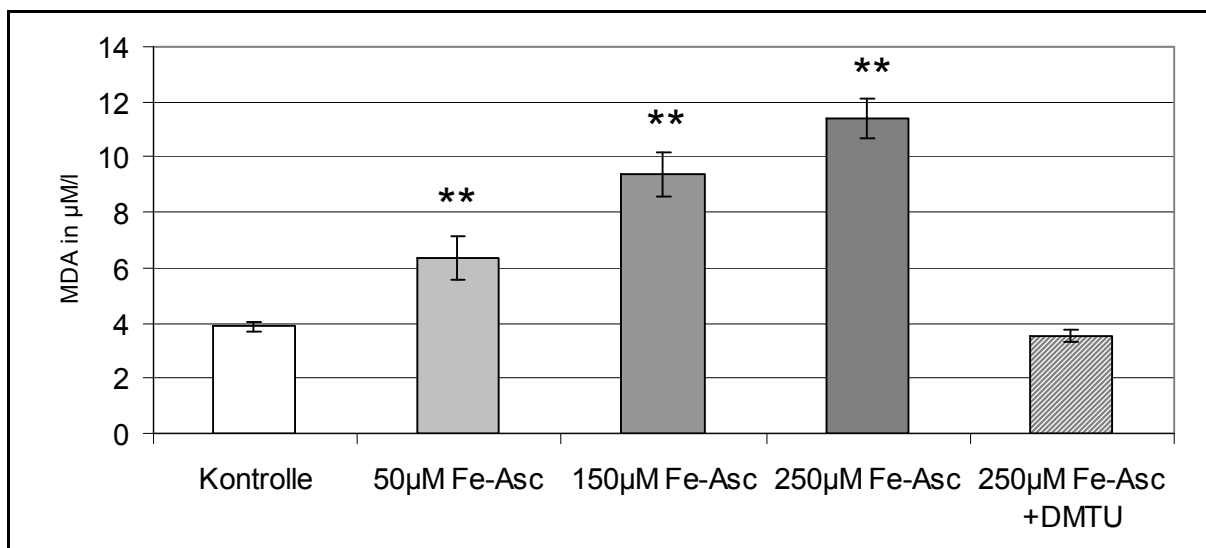


Abbildung 13: MDA-Konzentration in µM direkt nach zweistündiger Applikation von Eisen-Ascorbat und DMTU. Mittelwerte in µM ± SEM. N=12-16, je 3 Experimente. **p<0,001 *versus* Kontrolle.

Kontrolle	50µM	150µM	250µM	250µM+DMTU
3,93 ± 0,32	3,89 ± 0,22	3,87 ± 0,23	3,95 ± 0,27	3,72 ± 0,21

Tabelle 21: MDA-Konzentration in µM/l 48h nach Präkonditionierung mit Eisen-Ascorbat und 10µM DMTU direkt vor OGD. Mittelwerte in µM/l ± SEM, jeweils N=12. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den präkonditionierten Zellen und den Kontrollzellen.

Da sowohl die schützende Wirkung als auch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch DMTU vollständig blockierbar war, kann davon ausgegangen werden, dass freie Radikale hauptsächlich an der Induktion der Ischämietoleranz durch Eisen-Ascorbat beteiligt sind.

4.5. Präkonditionierung durch sperminen NO-Komplex

4.5.1. Basale Toxizität

Nachdem SPER/NO-Lösungen in Konzentrationen von 10nM bis 1mM zwei Stunden appliziert wurden, wurden die Kulturen 5 Tage mittels LDH-Aktivitätsbestimmung, MTT-Metabolismus und Morphologie beobachtet. Dabei zeigten sich erst ab einer Konzentration von 1mM signifikante Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollschwesterkulturen, so dass nicht von einer toxischen Wirkung unterhalb dieser Dosis ausgegangen werden muss (Abbildung 26, Tabelle 22).

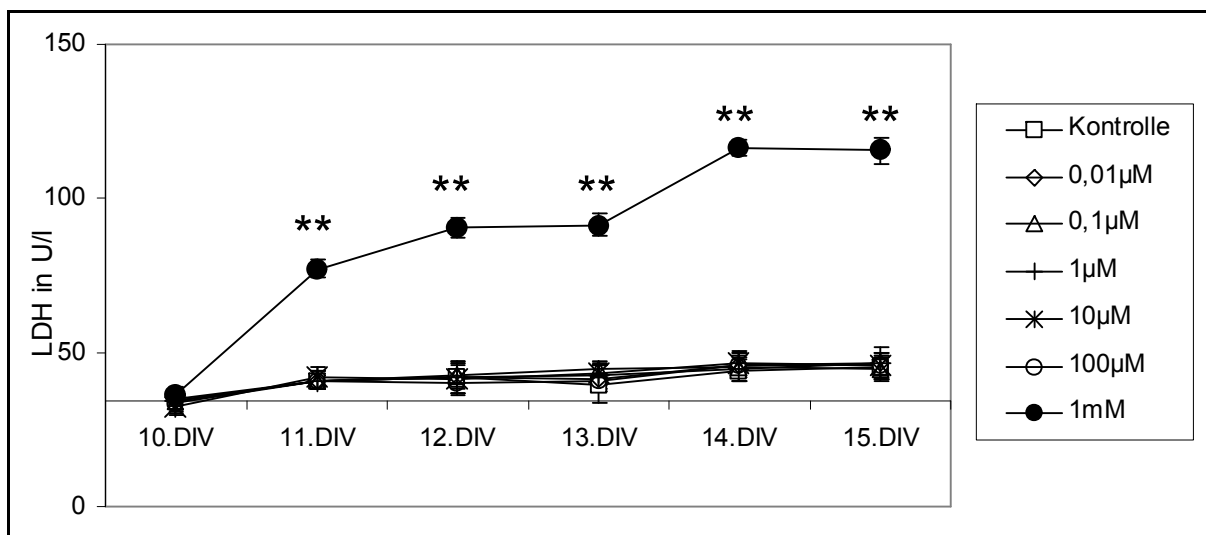


Abbildung 14: LDH-Freisetzung bis 120h nach zweistündiger Applikation von SPER/NO. Mittelwerte in U/l \pm SEM. N=8-10. **p<0,001 *versus* Kontrolle.

Kontrolle	0,01µM	0,1µM	1µM
1856,2 \pm 69,8	1871,1 \pm 52,9	1870,3 \pm 45,9	1880,3 \pm 49,6
full kill	10µM	100µM	1mM
415,1 \pm 34,4	1866,4 \pm 46,5	1875,3 \pm 28,5	1391,1 \pm 57,0 **

Tabelle 22: MTT-Umsetzung 120h nach zweistündiger Applikation von SPER/NO. Mittelwerte \pm SEM. N=8-10. **p<0,001 *versus* Kontrolle.

4.5.2. Dosis- und Zeit-Wirkungs-Beziehung

Eine Präkonditionierung mit SPER/NO vermochte die Zellschädigung durch OGD um maximal 58% zu senken. Die besten Ergebnisse wurden dabei (wie aus Abbildung 27 und Tabelle 23 ersichtlich) durch eine Konzentration von 100nM bei einem Intervall zwischen Präkonditionierung und OGD von 48 Stunden erreicht.

Auch in den anderen Konzentrationen und im 72- und 24-Stunden-Intervall konnte eine signifikante Verbesserung (maximal 38%, beziehungsweise 40%) beobachtet werden, die jedoch weniger ausgeprägt war.

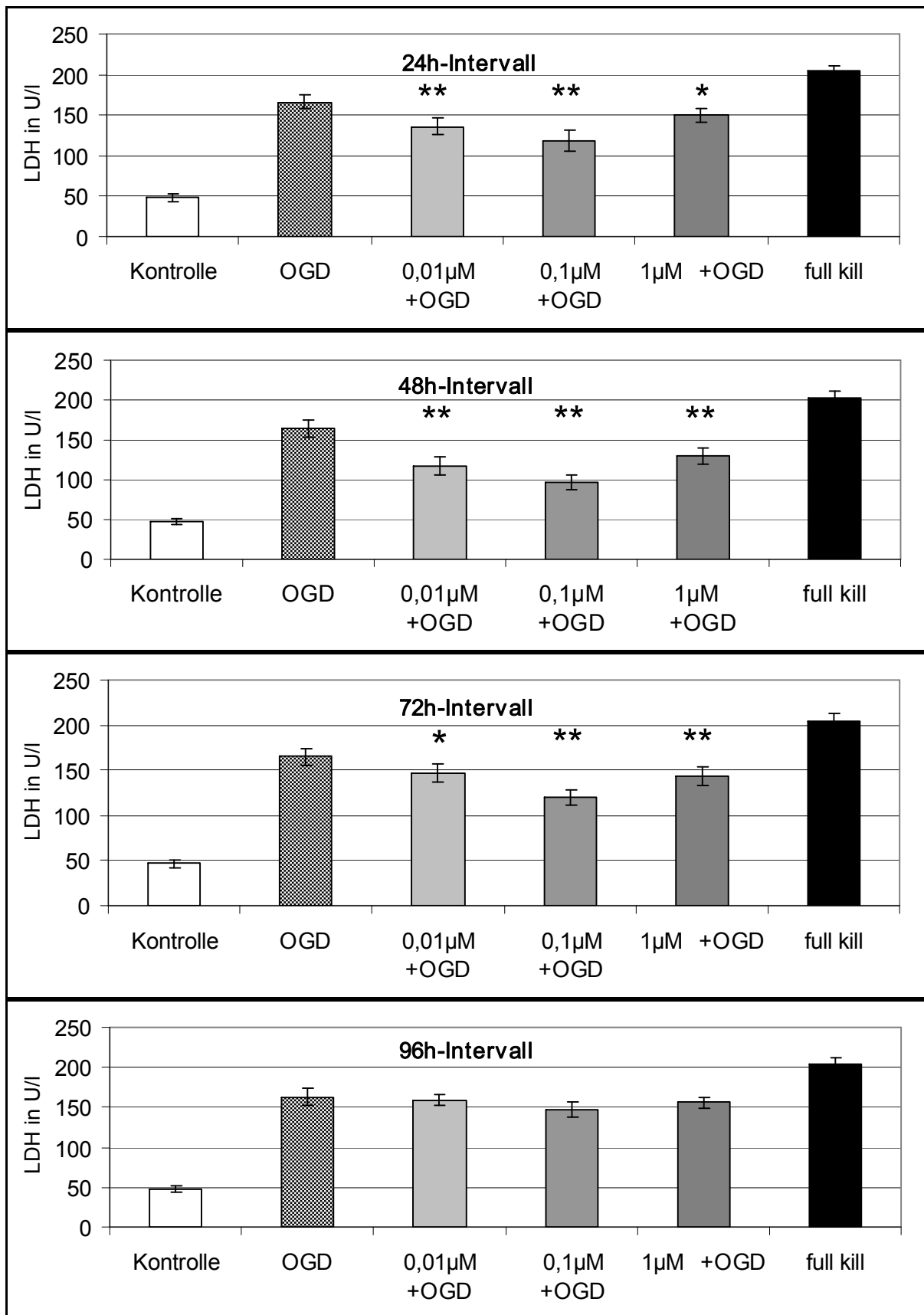


Abbildung 15: LDH-Freisetzung 24h nach OGD nach Präkonditionierung mit SPER/NO. Mittelwerte in U/l \pm SEM. N=14-26, 3-4 Experimente. *p<0,05, **p<0,001 *versus* OGD ohne Vorbehandlung.

	24h Intervall	48h Intervall	72h Intervall	96h Intervall
Kontrolle	1792 ± 74	1805 ± 58	1798 ± 60	1806 ± 37
OGD	768 ± 53	782 ± 68	770 ± 54	713 ± 41
full kill	397 ± 21	403 ± 19	401 ± 24	401 ± 25
0,01µM SPER/NO	981 ± 64 **	1098 ± 57 **	1016 ± 61 **	747 ± 69
0,1µM SPER/NO	1048 ± 73 **	1227 ± 82 **	1201 ± 73 **	722 ± 84
1µM SPER/NO	958 ± 61 **	1123 ± 58 **	1018 ± 97 **	717 ± 63

Tabelle 23: MTT-Metabolismus 72h nach OGD nach Präkonditionierung mit SPER/NO. Mittelwerte ± SEM. N=14-26, je mindestens 3 Experimente. **p<0,001 *versus* OGD ohne Vorbehandlung.

4.5.3. Wirkungsblockierung

Durch Addition von DMTU in einer Konzentration von 10µM sollte die radikalische Komponente der Präkonditionierung durch SPER/NO reduziert werden (Abbildung 28, Tabelle 24). Dabei konnte nur eine geringfügige Reduktion der schützenden Wirkung von SPER/NO im 48h-Intervall erzielt werden, die nicht in allen Konzentrationen statistisch signifikant war.

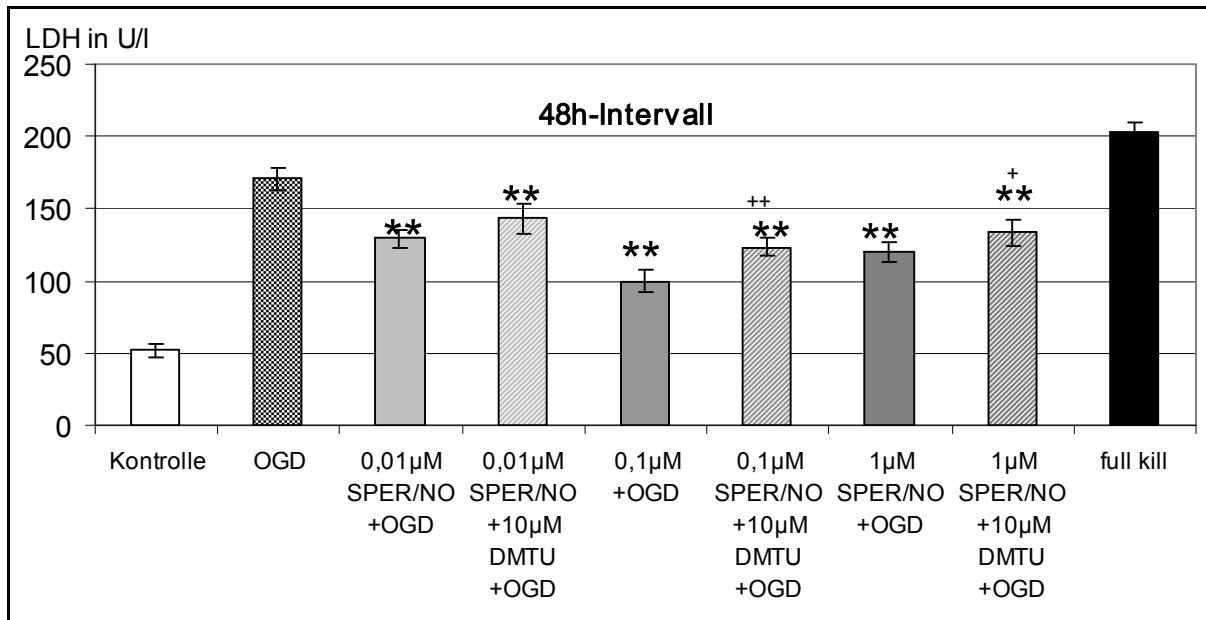


Abbildung 16: LDH-Freisetzung 24h nach OGD nach Präkonditionierung mit SPER/NO ±10µM DMTU. Mittelwerte in U/l ± SEM. N=18-20, je 3 Experimente. **p<0,001 versus OGD ohne Vorbehandlung; *p<0,05, **p<0,001 versus äquimolare Dosis SPER/NO ohne DMTU.

	ohne DMTU	+10µM DMTU
Kontrolle	1843 ± 25	
OGD	762 ± 33	
full kill	401 ± 19	
0,01µM	1072 ± 34 **	905 ± 34****
0,1µM	1242 ± 49 **	994 ± 28****
1µM	1131 ± 29 **	914 ± 40****

Tabelle 24: MTT-Umsetzung 72h nach OGD nach Präkonditionierung mit SPER/NO ±10µM DMTU. Mittelwerte ± SEM. N=18-20, je 3 Experimente. **p<0,001 versus OGD ohne Vorbehandlung; **p<0,001 versus äquimolare Dosis SPER/NO ohne DMTU.

4.5.4. Lipidperoxidation

Direkt nach der zweistündigen Applikation von SPER/NO unterschieden sich die Konditionen deutlich und statistisch signifikant in ihrem Gehalt an MDA. Dabei lagen in allen behandelten Kulturen die MDA-Konzentrationen über denen der unbehandelten Kontrollkulturen (Abbildung 29). Nach additiver Gabe von DMTU waren in keiner behandelten Kultur erhöhte Lipidperoxidationsprodukte nachweisbar. (Tabelle 25)

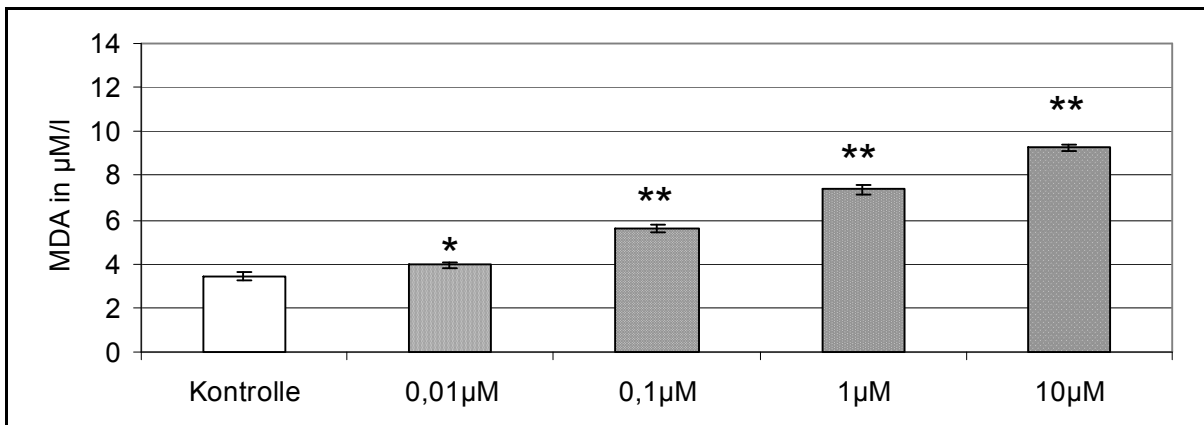


Abbildung 17: MDA-Konzentrationen unmittelbar nach zweistündiger Applikation von SPER/NO. Mittelwerte in µM/l ± SEM. N=8. Signifikanzen: *p<0,05, **p<0,001 *versus* Kontrolle.

Kontrolle	10µM DMTU	0,01µM SPER/NO +10µM DMTU	0,1µM SPER/NO +10µM DMTU	1µM SPER/NO +10µM DMTU	10µM SPER/NO +10µM DMTU
3,43 ± 0,18	3,19 ± 0,2	3,45 ± 0,15	3,27 ± 0,19	3,23 ± 0,19	3,14 ± 0,17

Tabelle 25: MDA-Konzentrationen unmittelbar nach zweistündiger Applikation von SPER/NO ± 10µM DMTU. Mittelwerte in µM/l ± SEM. N=8.

Da die Freisetzung von Radikalen mit DMTU vollständig verhindert werden konnte, die präkonditionierende Wirkung von SPER/NO jedoch trotzdem weiterhin bestand, kann davon ausgegangen werden, dass obwohl dosisabhängig freie Radikale entstehen, die präkonditionierende Wirkung von SPER/NO hauptsächlich nicht auf der Freisetzung von Radikalen in der Zellkultur beruht.

4.6. Präkonditionierung durch Flupirtin

4.6.1. Basale Toxizität

Nach einer zweistündigen Applikation der maximal löslichen Konzentration von 50µM Flupirtin waren 5 Tage keine Unterschiede zu unbehandelten Kontrollkulturen in LDH-Aktivität (Abbildung 30), MTT-Metabolismus (Tabelle 26) und Zellmorphologie erkennbar. Sowohl die bekannten antioxidativen als auch die vermuteten NMDA-antagonistischen Eigenschaften zeigten keinen Einfluss auf die Absterberate der kultivierten Neuronen.

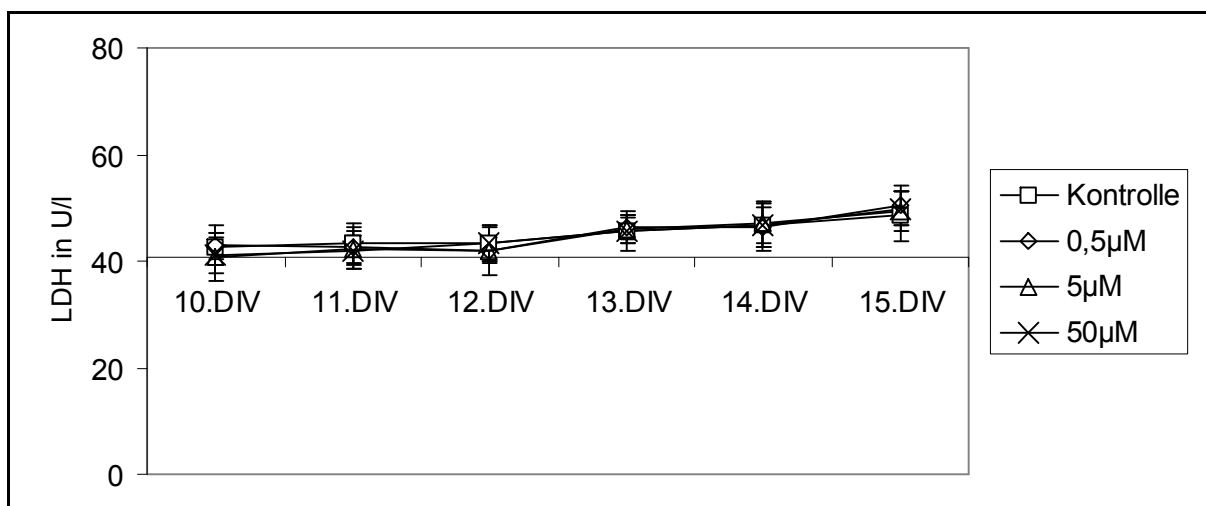


Abbildung 18: LDH-Aktivität bis 120h nach zweistündiger Applikation von Flupirtin in verschiedenen Dosen. Mittelwerte in U/l \pm SEM. N=8-12. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten Zellen und der Kontrolle.

Kontrolle	0,5µM	5µM	50µM	full kill
1881 \pm 47	1862 \pm 43	1865 \pm 25	1870 \pm 30	403 \pm 28

Tabelle 26: MTT-Metabolismus 120h nach zweistündiger Applikation verschiedener Dosen von Flupirtin. Mittelwerte \pm SEM. N=8-12. Auch im MTT-Metabolismus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten Zellen und der Kontrolle.

Für die Untersuchung der Langzeiteffekte nach Dauergabe von Flupirtin wurde die Substanz nicht nach 2 Stunden entfernt, sondern auf den Zellen belassen und die Zellkulturen ebenfalls 5 Tage beobachtet. Dabei zeigte sich weder ein Trend zur Verbesserung noch zur Verschlechterung des Langzeitüberlebens der Neuronen-Kultur. Daher muss nicht von einer protektiven Wirkung einer Langzeitapplikation von Flupirtin in unseren Zellkulturen ausgegangen werden (Abbildung 31, Tabelle 27).

Auch eine Schädigung konnte bis zu diesen applizierten Dosen nicht nachgewiesen werden. Höhere Konzentrationen konnten zu einer Ermittlung der Toxizitätskurve jedoch nicht hergestellt werden, da bei einer Konzentration von über 50µM das Löslichkeitsprodukt überschritten wurde.

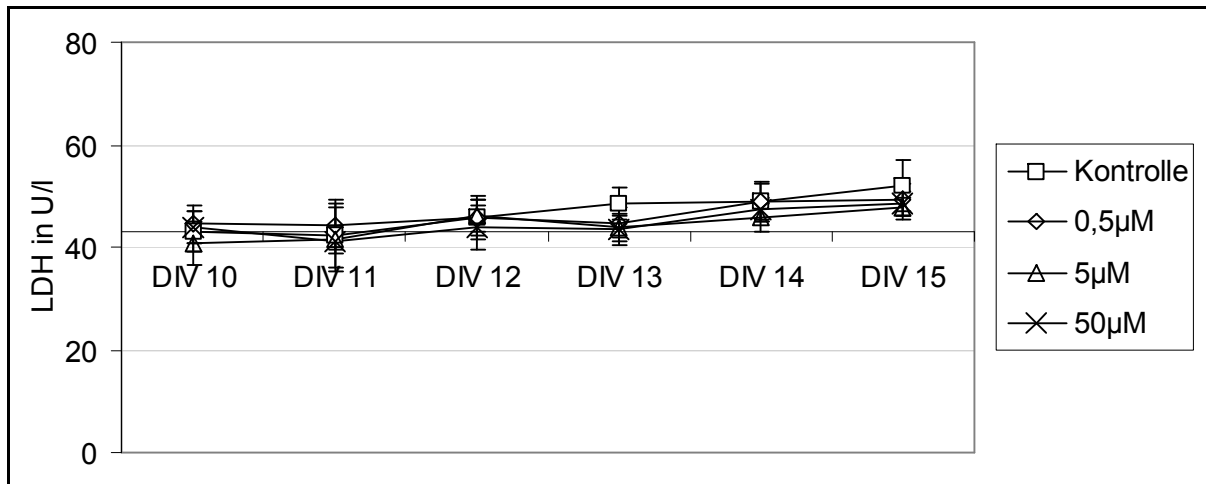


Abbildung 19: LDH-Aktivität im Überstand bis 120h nach Langzeitapplikation von Flupirtin. Mittelwerte in U/l \pm SEM. N=12.

Kontrolle	0,5µM	5µM	50µM
1806 \pm 56	1823 \pm 47	1864 \pm 51	1868 \pm 48

Tabelle 27: MTT-Umsetzung 120h nach Langzeitapplikation von Flupirtin. Mittelwerte \pm SEM. N=12.

4.6.2. Dosis- und Zeit-Wirkungs-Beziehung

Nach einer zweistündigen Applikation von Flupirtin bis zu einer Konzentration von 50µM war in keiner Dosierung und keinem Zeitintervall nach 24 Stunden in der LDH-Freisetzung oder nach 72h im MTT-Metabolismus ein Schutz vor der Wirkung der 120-minütigen OGD nachweisbar (Tabelle 28 und 29).

	24h Intervall	48h Intervall	72h Intervall	96h Intervall
Kontrolle	49 ± 6	48 ± 5	48 ± 6	47 ± 6
OGD	168 ± 8	171 ± 12	169 ± 7	170 ± 7
full kill	211 ± 15	213 ± 12	208 ± 7	210 ± 10
0,5µM Flupirtin	165 ± 8	163 ± 8	165 ± 8	167 ± 7
5µM Flupirtin	165 ± 11	169 ± 11	171 ± 12	170 ± 7
50µM Flupirtin	167 ± 16	168 ± 10	167 ± 7	164 ± 10

Tabelle 28: LDH-Freisetzung 24h nach OGD nach Präkonditionierung mit Flupirtin. Mittelwerte in UI ± SEM. N=14-23, je 3-4 Experimente. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten und den Kontroll-Kulturen nachgewiesen werden.

	24h Intervall	48h Intervall	72h Intervall	96h Intervall
Kontrolle	1813 ± 43	1808 ± 48	1797 ± 49	1798 ± 45
OGD	740 ± 38	742 ± 39	748 ± 35	742 ± 31
full kill	394 ± 15	398 ± 14	400 ± 12	405 ± 12
0,5µM Flupirtin	744 ± 43	744 ± 40	742 ± 43	741 ± 35
5µM Flupirtin	743 ± 33	746 ± 42	739 ± 36	763 ± 35
50µM Flupirtin	730 ± 43	748 ± 48	755 ± 33	797 ± 52

Tabelle 29: MTT-Umsetzung 72h nach OGD nach Präkonditionierung mit Flupirtin. Mittelwerte ± SEM. N=14-23, je 3-4 Experimente. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten und den Kontroll-Kulturen nachgewiesen werden.

Wurde Flupirtin jedoch kurz vor, während und nach der Hypoxie appliziert, so war ein dosis- und zeitabhängiger protektiver Effekt nachweisbar. Die besten Ergebnisse wurden durch eine 50µM Flupirtin-Behandlung erzielt, die bereits eine Stunde vor der OGD begann und kontinuierlich fortgesetzt wurde. Die Schadensevaluierung erfolgte wiederum mittels LDH-Aktivitätsmessung (Abbildung 32) und MTT-Metabolismus (Tabelle 30) sowie morphologischer Begutachtung der Zellen.

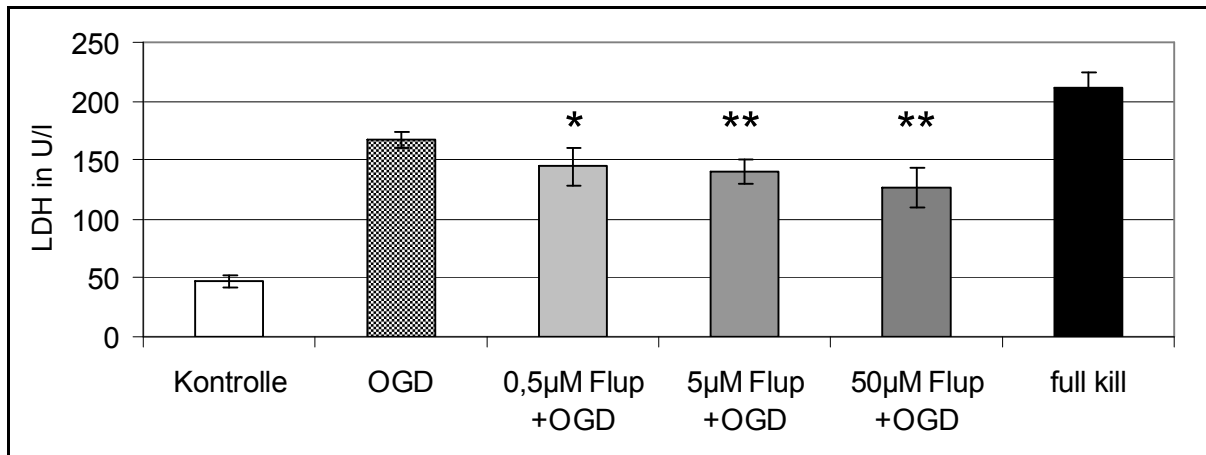


Abbildung 20: LDH-Freisetzung 24h nach OGD unter Protektion durch maximal 50µM Flupirtin, das bereits eine Stunde vor der OGD appliziert wurde. Mittelwerte in U/l ± SEM. N=18-21, je 3 Experimente. **p<0,001, *p<0,05 *versus* OGD ohne Vorbehandlung.

Kontrolle	OGD	full kill
1834 ± 59	744 ± 40	401 ± 15
0,5µM	5µM	50µM
769 ± 47	801 ± 36 *	908 ± 67 **

Tabelle 30: MTT-Umsetzung 72h nach OGD unter Protektion durch Flupirtin. Mittelwerte ± SEM. N=16-21, je 3 Experimente. **p<0,001, *p<0,05 *versus* OGD ohne Vorbehandlung.

4.6.3. Wirkungsverstärkung

Da Flupirtin den Schaden einer OGD reduzieren konnte, stellte sich die Frage, ob es auch die präkonditionierende Wirkung einer subletalen hypoxischen Präkonditionierung beeinflussen kann. Es wurde dabei während einer präkonditionierenden 90-minütigen OGD verabreicht (Abbildung 33, Tabelle 31). Damit verglichen wurden einerseits Schwesterkulturen, die ebenfalls Flupirtin für 90 Minuten erhielten, jedoch keiner Hypoxie ausgesetzt wurden, sondern im Brutschrank verblieben und andererseits Zellen, die lediglich die hypoxische Präkonditionierung ohne Flupirtin erhielten sowie zusätzlich Zellen, die lediglich wie Kontrollen behandelt wurden.

Dabei war eine Potenzierung des protektiven Effekts nachweisbar, das heißt, Zellen, die während der hypoxischen Präkonditionierung zusätzlich Flupirtin erhielten, zeigten 24 Stunden nach der 120-minütigen OGD eine noch geringere LDH-Freisetzung als hypoxisch präkonditionierte Zellen und auch weniger, als Zellen, die

lediglich Flupirtin erhalten hatten, die im übrigen entsprechend den vorangegangenen Experimenten in der LDH-Freisetzung nach OGD den unvorbehandelten Zellen entsprachen.

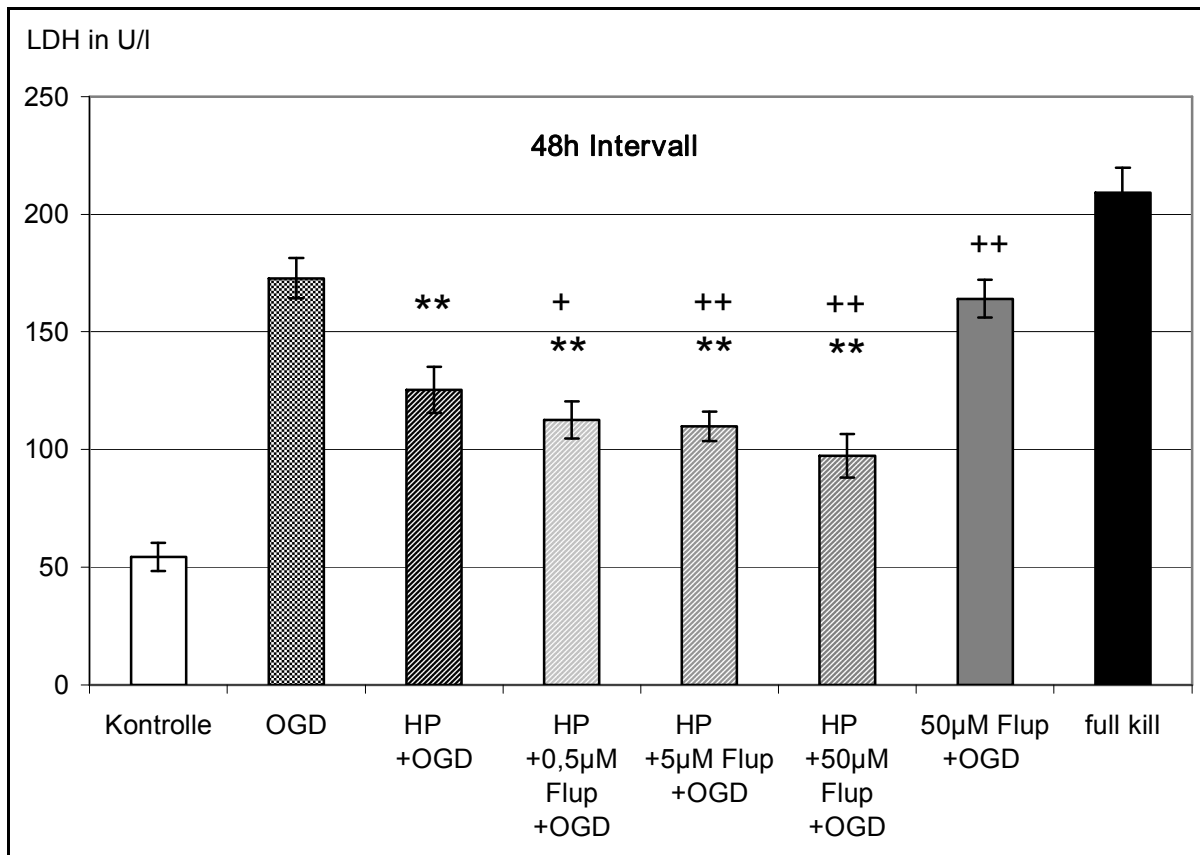


Abbildung 21: LDH-Freisetzung 24h nach OGD nach alleiniger und kombinierter hypoxischer und pharmakologischer Präkonditionierung mit Flupirtin. Mittelwerte in U/l ± SEM, N=17-33, je 3 Experimente. **p<0,001 *versus* OGD ohne Vorbehandlung; *p<0,05, ++p<0,001 *versus* hypoxische Präkonditionierung (HP).

Kontrolle	OGD	50µM Flup	full kill
1827 ± 34	768 ± 42	783 ± 45 ++	402 ± 16
HP	HP + 0,5µM Flup	HP + 5µM Flup	HP + 50µM Flup
1220 ± 40 **	1258 ± 44 **	1295 ± 53 ****	1374 ± 78****

Tabelle 31: MTT-Umsatz 72 Stunden nach OGD nach alleiniger und kombinierter hypoxischer und pharmakologischer Präkonditionierung mit Flupirtin. Mittelwerte ± SEM, N=17-33, je 3 Experimente. **p<0,001 *versus* OGD ohne Vorbehandlung; ++p<0,001 *versus* hypoxische Präkonditionierung (HP).

Da Flupirtin selbst keinen präkonditionierenden Effekt im 48h Intervall hat und dennoch die präkonditionierende Wirkung der subletalen OGD verstärkt, kann nicht von einer additiven Wirkung gesprochen werden, sondern es muß davon ausgegangen werden, dass der Effekt der hypoxischen Präkonditionierung durch Flupirtin potenziert wird.

4.7.1. Lipidperoxidation

Nach einer alleinigen zweistündigen Flupirtin-Applikation waren keine erhöhten MDA-Konzentrationen in den Zellkulturen messbar (Tabelle 32). Ebenfalls beim Vergleich der MDA-Konzentrationen nach alleiniger hypoxischer Präkonditionierung und nach hypoxischer Präkonditionierung mit Flupirtin-Zusatz ergibt sich in den mit Flupirtin behandelten Proben kein Anstieg der MDA-Konzentration (Abbildung 34).

Flupirtin verstärkt also in Kombination mit einer hypoxischen Präkonditionierung nicht die Freisetzung von Radikalen, aber dennoch ihre präkonditionierende Wirkung.

Kontrolle	0,5µM	5µM	50µM
3,49 ± 0,15	3,44 ± 0,23	3,36 ± 0,12	3,31 ± 0,19

Tabelle 32: MDA-Konzentrationen nach zweistündiger Applikation von Flupirtin. Mittelwerte in µM/l ± SEM. N=12, je 3 Experimente.

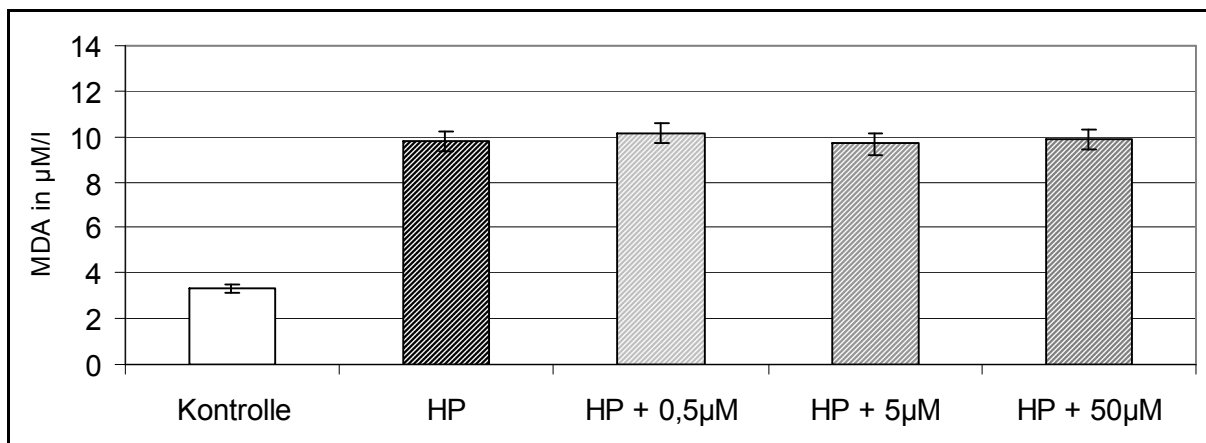


Abbildung 22: MDA-Konzentration nach 90-minütiger kombinierter hypoxischer und pharmakologischer Präkonditionierung mit Flupirtin. Mittelwerte in µM/l ± SEM. N=8-16, 3 Experimente.

4.7. Additive Wirkung von Eisen-Ascorbat und sperminem NO-Komplex

Da durch einige der getesteten Substanzen eine Präkonditionierung auslösbar war, den einzelnen Stoffe jedoch eine unterschiedliche bekannte Wirkung zugrunde lag, stellte sich die Frage, ob durch eine gemeinsame Applikation von 2 verschiedenen präkonditionierenden Substanzen ein additiver Effekt zu erzielen ist.

Daher untersuchten wir abschließend die gemeinsame Gabe von SPER/NO als NO-Donor und Eisenascorbat als Sauerstoff-Radikal-Generator. Bei unverändertem Zeitschema konnte im 72h Intervall ein statistisch nicht signifikanter Trend und im 48h Intervall sogar eine signifikante Verbesserung des Überlebens von neuronalen Zellen im Vergleich zur Präkonditionierung durch die Einzelsubstanzen nachgewiesen werden (Abbildung 35, Tabelle 33).

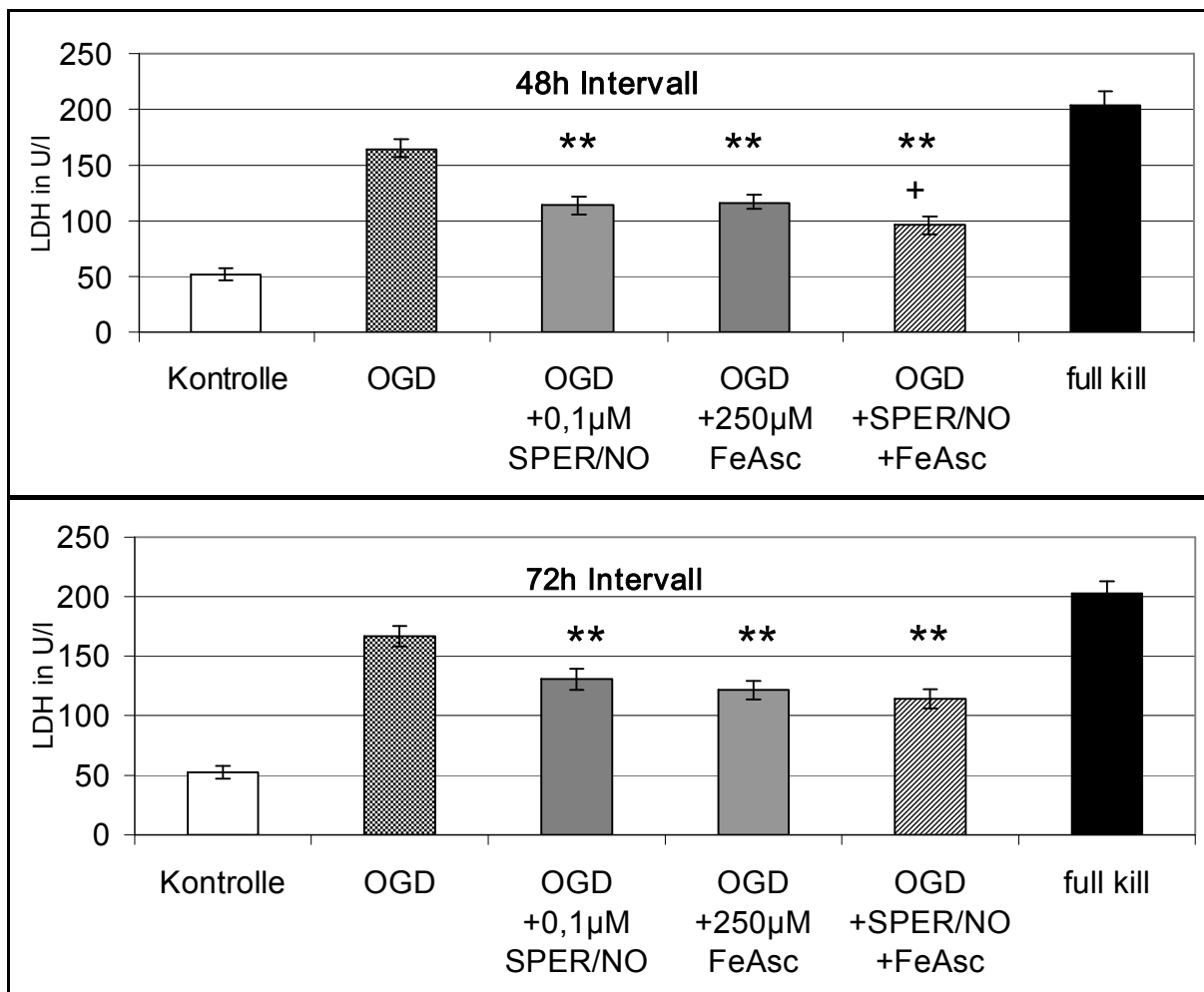


Abbildung 23: LDH-Freisetzung 24h nach OGD nach Präkonditionierung mit SPER/NO, Eisen-Ascorbat und der Kombination aus beidem. Mittelwerte in U/l \pm SEM. Je 3 Experimente, N=18-27. **p<0,001 versus OGD ohne Vorbehandlung, +p<0,05 versus 0,1µM SPER/NO und 250µM FeAsc.

	48h Intervall	72h Intervall
Kontrolle	1847 ± 34	1863 ± 33
OGD	785 ± 23	769 ± 20
full kill	401 ± 22	411 ± 35
0,1µM SPER/NO	1602 ± 27 **	1530 ± 34 **
250µM FeAsc	1639 ± 33 **	1559 ± 27 **
0,1µM SPER/NO +250µM FeAsc	1696 ± 36 ** ++	1611 ± 26 **

Tabelle 33: MTT-Umsetzung 72h nach OGD nach Präkonditionierung mit SPER/NO, Eisen-Ascorbat und der Kombination. Mittelwerte ± SEM. Je 3 Experimente. N=18-27. **p<0,001 *versus* OGD ohne Vorbehandlung, ++p<0,001 *versus* 0,1µM SPER/NO und 250µM FeAsc.

4.6.4. Lipidperoxidation

Sowohl durch Eisenascorbat, als auch durch SPER/NO war bei alleiniger Applikation eine dosisabhängige Freisetzung von Radikalen nachweisbar, wobei durch Eisenascorbat in präkonditionierenden Dosen wesentlich mehr Lipidperoxidationsprodukte erzeugt wurden. Wurden beide Substanzen gemeinsam appliziert, so zeigte sich eine MDA-Konzentration in einer Größenordnung, in der sie auch bei alleiniger Gabe von Eisenascorbat nachweisbar war (Abbildung 36).

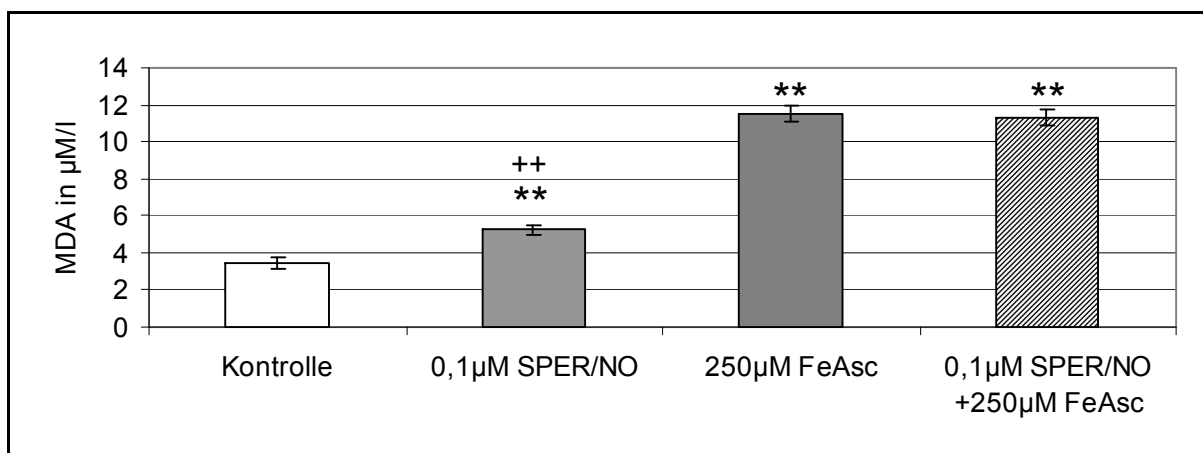


Abbildung 24: Malondialdehydkonzentration nach zweistündiger Applikation von SPER/NO, Eisen-Ascorbat und einer Kombination aus beidem. Mittelwerte in µM/l ± SEM. N=8. **p<0,001 *versus* Kontrolle; ++p<0,001 *versus* 0,1µM SPER/NO und 250µM FeAsc.