

5. Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass sich neuronale Zellen in der Primärkultur *in vitro* durch eine Vorbehandlung mit pharmakologisch unterschiedlich wirkenden Substanzen gegen einen hypoxischen Schaden präkonditionieren lassen. Das bedeutet, dass sie in die Lage versetzt werden konnten, eine endogene Toleranz gegen einen potentiell letalen hypoxischen Stimulus zu entwickeln.

Im einzelnen konnte diese Wirkung für den Hemmer des Komplexes II der Atmungskette 3-NPA, für das freie Hydroxylradikale produzierende System von Eisen und Ascorbat und für den NO-Donor SPER/NO nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich eine neuroprotektive Wirkung und eine Potenzierung der präkonditionierenden Wirkung einer hypoxischen Präkonditionierung durch Flupirtin. Für diese Substanzen sind sowohl differierende als auch gemeinsame Wirkmechanismen bekannt.

Nach der Applikation von 3-NPA in einer Konzentration von 0,01µM ließ sich nach einem Intervall von 48 Stunden zur potentiell letalen OGD eine maximale Schadensreduktion von 66% erreichen. Direkt anschließend an die 3-NPA-Gabe war eine gesteigerte Konzentration der Lipidperoxidationsproduktes MDA nachweisbar, was einer erhöhten Freisetzung freier Radikale entspricht. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus verschiedenen *in vivo*-Untersuchungen [47, 104], die eine Beteiligung von freien Radikalen an der Präkonditionierung durch 3-NPA nachwies. Die beiden höchsten nichttoxischen 3-NPA-Dosen (0,01µM und 0,1µM) unterschieden sich nicht signifikant in der Freisetzung freier Radikale, jedoch war der ausgeprägteste Präkonditionierungseffekt durch die geringere Konzentration von 0,01µM 3-NPA auslösbar. Dies werteten wir als Hinweis gegen die alleinige signaltransduzierende Rolle von freien Radikalen in der 3-NPA-induzierten Präkonditionierung. Wurde während der Einwirkung von 3-NPA die Radikalproduktion durch den Radikalfänger DMTU nahezu vollständig unterdrückt, wurde die präkonditionierende Wirkung reduziert, aber nicht vollständig aufgehoben.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass 3-NPA sowohl über radikalische als auch über nicht radikalische Signalkaskaden seine präkonditionierende Wirkung entfaltet. Betrachtet man die möglichen Ansatzpunkte von 3-NPA, so greift es an mindestens zwei Stellen in den Energiemetabolismus ein. Das von 3-NPA durch kovalente Bindung gehemmte Enzym Succinat-Dehydrogenase ist ein Enzym des

Citratzyklus und entspricht dem Komplex II der mitochondrialen Atmungskette. Die daraus resultierende Reduktion des Energiemetabolismus hält bis zur Neusynthese von Succinat-Dehydrogenase an. Obwohl ein geringerer Energieverbrauch während einer Hypoxie bekanntermaßen *per se* neuroprotektiv wirkt, ist davon auszugehen, dass diese Wirkung von 3-NPA nach 48 Stunden wieder abgeklungen ist und der kurzzeitige Energiemangel und die konsekutive Störung ATP-abhängiger Ionenaustauschprozesse eher ein Trigger einer Toleranzinduktion ist. So konnte an akuten Hirnschnitten von Ratten gezeigt werden, dass der Metabolismus nach einer Vorbehandlung mit 3-NPA im 48h-Intervall direkt vor der anschließenden potentiell letalen Ischämie denen der unvorbehandelten Kontrollen entsprach [105].

Andere nachgewiesene Wirkungen von 3-NPA sind die Hemmung von Fumarase, Isocitratlyase und Acetylcholinesterase [106, 107, 108] sowie die Verringerung der Dopaminaufnahme im Mesencephalon [109]. Inwieweit eine solche Minderung der Transmitteraufnahme auch bei ischämischen Läsionen im Cortex eine Rolle spielt, ist noch unklar, obwohl eine Energie- und Glutamatabhängigkeit nachgewiesen wurde [78]. Eine erhöhte Ischämie-Toleranz durch verminderte Transmitteraufnahme und –wirkung wäre durchaus plausibel, falls beispielsweise die Aufnahme exzitatorischer Transmitter wie Glutamat und Aspartat auch in kortikalen Neuronen-Kulturen in hypoxischen und hypoglykämischen Situationen vermindert wäre.

Zusätzlich wurden von anderen Arbeitsgruppen Hinweise auf weitere involvierte Signalkaskaden nach 3-NPA-Applikation wie die Aktivierung von Adenosinrezeptoren und ATP-abhängigen Kaliumkanälen gefunden [48, 110, 111], eine vermutete Wirkung über den Wachstumsfaktor NGF [112] bestätigte sich nicht.

3-NPA zeigte in unserem Modell keinen rein dosisabhängigen Effekt bei der Präkonditionierung. Dass höhere Konzentrationen *per se* einen toxischen Effekt auf unsere Zellkultur haben könnten, wurde zuvor durch Toxizitätskurven weitestgehend ausgeschlossen. Allerdings ist denkbar, dass durch höhere Konzentrationen die Hemmung anderer Enzyme wie die bereits erwähnte Fumarase, Isocitratlyase und Acetylcholinesterase an Bedeutung gewinnt und eine Präkonditionierung blockiert oder antagonisiert.

Letztlich könnte eine gemeinsame Endstrecke der Signaltransduktion der Präkonditionierung die Induktion von bcl-2 und bcl-xl oder Hitzeschockproteinen sein, deren Aktivierung durch 3-NPA nachgewiesen wurde [45, 47, 113, 114]. Dabei gibt

es Hinweise, dass 3-NPA indirekt sowohl die akute Nekrose, als auch die verspätete Apoptose beeinflusst [79].

Das radikalgenerierende Redoxsystem von Eisenascorbat zeigte eine direkt dosisabhängige Induktion einer protektiven Präkonditionierung. Die gerade unter der toxischen Grenze liegende Konzentration von 250µM Eisensulfat und 5µM Ascorbat bewirkte eine Schadensreduktion von 59% im 48- und 72-Stunden Intervall. Dabei konnte ebenso dosisabhängig eine steigende Freisetzung von freien Radikalen, gemessen an der MDA-Konzentration, nachgewiesen werden. Durch die Addition von DMTU als Radikalfänger wurde die Freisetzung von freien Radikalen vollständig blockiert und die präkonditionierende Wirkung ebenso vollständig aufgehoben. Daraus läßt sich schlussfolgern, dass im Rahmen der Präkonditionierung durch Eisenascorbat die Freisetzung von Radikalen die entscheidende Schlüsselrolle spielt.

Aussagefähige *in vivo*-Experimente zur direkten Applikation von freien Radikalen fehlen methodenbedingt. Allerdings konnten kürzlich *in vitro* unsere Ergebnisse untermauert werden, da durch zwei andere radikalgenerierende Systeme (Xanthin/Xanthinoxidase und Wasserstoffperoxid) ebenfalls eine erfolgreiche Präkonditionierung nachgewiesen werden konnte [115]. Dabei konnte wie in unseren Experimenten die Wirkung durch Radikalfänger (in diesem Fall Katalase, Glutathion und Glycin) blockiert werden.

Der spermine NO-Komplex SPER/NO setzt mit NO ein Molekül frei, das sehr leicht selbst in ein Radikal umgewandelt wird und von dem demzufolge ähnliche Mechanismen wie bei der Applikation von Eisenascorbat vermutet werden können. Die Präkonditionierung mit SPER/NO induzierte nicht linear dosisabhängig eine Protektion der kultivierten Neuronen, obwohl in der MDA-Messung eine streng dosisabhängige Freisetzung freier Radikale nachweisbar war. Nach gleichzeitiger Behandlung mit DMTU wurde die präkonditionierende Wirkung nur teilweise aufgehoben. Damit ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei der Applikation von 3-NPA: SPER/NO scheint zum Teil über radikalische und zum Teil über nicht radikalische Signaltransduktionskaskaden seine präkonditionierende Wirkung zu entfalten. Denkbar wäre als nicht radikalvermittelter Weg beispielsweise die Aktivierung von cGMP, das bekanntermaßen als second messenger bei NO dient [116].

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wurde *in vivo* nachgewiesen, dass auch bei einer klassischen ischämischen Präkonditionierung die Aktivität der neuronalen NO-Synthetase (nNOS) hochreguliert und demzufolge vermehrt NO produziert wird [116, 117]. Analog konnte bei genetisch veränderten Mäusen, denen die nNOS fehlt, durch ischämische Präkonditionierung keine Protektion erreicht werden [118], obwohl bezüglich der Beteiligung der verschiedenen NOS-Isoformen (induzierbare = iNOS, neuronale = nNOS und endotheliale = eNOS) widersprüchliche Ergebnisse vorliegen, die eher die Bedeutung der eNOS unterstreichen [117, 118, 119, 120, 121]. Ebenso konnte *in vitro* durch die Applikation anderer NO-Donoren in hippokampalen Slices und neuronalen Zellkulturen eine Protektion durch Präkonditionierung ausgelöst werden [122, 123].

Für Flupirtin konnte auch in der höchsten herstellbaren Konzentration in unseren Experimenten keine Neuroprotektion durch kurzzeitige zweistündige Applikation 24 bis 96 Stunden vor einer potentiell letalen OGD nachgewiesen werden. Aus *in vivo* Experimenten war allerdings eine Protektion vor den Schäden einer globalen Ischämie an Neuronen und Retinazellen bekannt, wenn Flupirtin sehr kurz (20 Minuten) zuvor intraperitoneal oder intraokulär appliziert wurde [90, 91, 124]. Daher wurde das Applikationsschema in unseren Experimenten um eine Gabe kurz vor und während der potentiell letalen OGD erweitert. Dabei zeigte sich in der Tat ebenfalls *in vitro* ein protektiver Effekt mit einer maximalen Schadensreduktion von 37% bei Zugabe eine Stunde vor, während und nach der OGD. Die in der Literatur beschriebenen und möglicherweise für diesen Effekt verantwortlich zu machenden Wirkmechanismen reichen von einem antioxidativen Potential [125, 126, 127] mit Abschwächung der Wirkung von freien Radikalen [128, 129] über die Aktivierung von G-Protein-regulierten einwärts gerichteten Kalium-Kanälen [130], einem funktionellen NMDA-Rezeptor-Antagonismus [92, 93, 94, 95, 131, 132, 133] mit Abschwächung des resultierenden Calcium-Einstroms [91, 94, 134], einer gesteigerten mitochondrialen Calcium-Aufnahme und ATP-Produktion [135] bis zur Induktion von antiapoptotischen Proto-Onkogenen wie bcl-2 [126, 127].

Wir untersuchten ferner die Auswirkung einer Flupirtin-Gabe während einer hypoxischen Präkonditionierung durch eine kurzdauernde 90-minütige OGD auf die Induktion einer Hypoxietoleranz. Vermutet wurde dabei zunächst eine Verminderung der präkonditionierenden Wirkung, da durch die oben genannten Wirkmechanismen

von Flupirtin von einer Abschwächung der toleranzinduzierenden Potenz des applizierten Stimulus ausgegangen wurde. Im Gegensatz zu den Erwartungen potenzierte sich jedoch die Hypoxietoleranz der hypoxisch präkonditionierten und parallel mit Flupirtin behandelten Zellen im Gegensatz zu nur hypoxisch präkonditionierten Zellen. Die Schadensreduktion bei den kombiniert präkonditionierten Kulturen erhöhte sich im Vergleich mit den ausschließlich hypoxisch präkonditionierten Kulturen von 39% auf 63%.

Da Flupirtin als Einzelgabe keine präkonditionierende Wirkung hat, ist diese Wirkungsverstärkung nur schwer zu erklären. Offenbar wird durch Flupirtin die letale Wirkung einer langdauernden OGD abgemildert, ein Effekt, der vermutlich auch schon während einer milden OGD vorhanden ist. Allerdings scheint diese Abmilderung nicht den Mechanismus zu beeinflussen, der für die Induktion einer Toleranzentwicklung verantwortlich ist und scheint ebenso nicht in der antioxidativen Wirkung zu liegen. Diese Hypothese wird gestützt durch unsere Messungen von MDA direkt im Anschluß an eine hypoxische Präkonditionierung mit und ohne Zugabe von Flupirtin. In allen Konditionen konnte eine deutlich gesteigerte Freisetzung an freien Radikalen gemessen werden, die sich jedoch durch Flupirtinapplikation nicht signifikant reduzierte. Demzufolge verändert Flupirtin die Menge freigesetzter Radikale nicht, sondern führt auf anderem Wege zu einer Abschwächung einer potentiell letalen OGD und zur Potenzierung der Toleranzinduktion einer hypoxischen Präkonditionierung. Die Rezeption der Hypoxie als potentiell letaler Stimulus funktioniert auf der Zellebene also weiterhin, obwohl die Auswirkung derselben durch Flupirtin abgeschwächt wird. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Flupirtin an einer nachgeschalteten Position in die entsprechende Signaltransduktionskaskade eingreift, beispielsweise durch die in anderen Experimenten nachgewiesene Induktion des antiapoptotisch wirkenden bcl-2 oder bcl-xl.

Flupirtin ist ebenfalls in der Lage isolierte Zellorganellen wie Mitochondrien durch Membranpotentialstabilisierung und Erhöhung der ATP-Produktion in hypoxischen Situationen zu schützen [135]. Über diesen Weg ist ebenfalls eine Beeinflussung des NMDA-Rezeptors erklärbar, da nachgewiesen wurde, dass intrazelluläres ATP die Öffnung des NMDA-Rezeptors hemmt, also *de facto* NMDA-antagonistisch wirkt [136].

Vergleicht man die vier verschiedenen applizierten Substanzen, so stellt sich die Frage, ob die schützende Wirkung durch unterschiedliche Mechanismen induziert wird, oder ob ein zentraler Signaltransduktionsweg existiert, der eine Steigerung der Überlebensfähigkeit der neuronalen Zellkulturen bewirkt.

Dazu lässt sich erstens feststellen, dass sich die Effektivität des erzielten Schutzes nur geringfügig unterscheidet. Durch Titrierung des maximal erreichbaren Effektes durch Dosis-Wirkungs- und Zeitintervallstudien konnte bei einer hypoxischen Präkonditionierung ein maximaler Effekt von 57 % erzielt werden, bei 3-NPA von 66%, bei Eisenascorbat von 59%, bei SPER/NO von 58% und bei der kombinierten Gabe von Eisenascorbat und SPER/NO von 61%. Flupirtin hingegen stellt eine Besonderheit dar, da es nicht in einem klassischen präkonditionierenden Zeitfenster wirksam war und bei Applikation während der OGD nur einen maximalen Schutz von 37% erreichte.

Die erstgenannten Ergebnisse decken sich nicht vollständig mit früheren vergleichenden *in vivo* Experimenten, die zur Schlussfolgerung führten, dass die durch Kreuztoleranz zu erreichende Wirkung geringer war als die einer hypoxischen bzw. ischämischen Präkonditionierung; hier jedoch zeigte sich ein umgekehrtes Verhältnis. Dieser Unterschied kann einerseits darauf zurückzuführen sein, dass die *in vivo* maximal erreichbare Protektion durch ischämische Präkonditionierung mit 85% wesentlich ausgeprägter ist, als die der hypoxischen Präkonditionierung *in vitro*. Andererseits wurde bei uns durch die Suche nach dem optimalen Zeit- und Dosis-Intervall der pharmakologischen Vorbehandlung der protektive Effekt größtmöglich maximiert.

Jedoch zeigte sich bei direktem Vergleich, dass durch eine gleichzeitige Gabe von Eisenascorbat und SPER/NO der präkonditionierende Effekt noch einmal signifikant erhöht werden konnte, obwohl für die Einzelsubstanzen bereits das Wirkungsmaximum erreicht war. Dabei stellt sich die Frage, ob dies dadurch bedingt ist, dass eine gleichzeitige Präkonditionierung durch zwei verschiedene Wirkmechanismen vorliegt, oder ob beide Substanzen ähnlich wirken. Insbesondere aufgrund der MDA-Messung als Maß für die Menge freigesetzter Radikale muss davon ausgegangen werden, dass die Zunahme des präkonditionierenden Effekts nicht auf einer erneut gesteigerten Freisetzung derselben beruht: die MDA-Werte der kombinierten Eisenascorbat und SPER/NO-Gabe unterschieden sich nicht signifikant von den Werten bei alleiniger Eisenascorbat- oder SPER/NO-Gabe. Entsprechend

war die Präkonditionierung durch Eisenascorbat durch den Radikalfänger DMTU vollständig und die Präkonditionierung durch SPER/NO nur teilweise blockierbar.

Beim direkten Vergleich der kombinierten Eisenascorbat- und SPER/NO-Gabe mit den entsprechenden Einzelbehandlungen muss zusätzlich ebenfalls berücksichtigt werden, dass die beiden Einzelgaben nach einem geringfügig verschiedenen Zeitintervall ihre maximale präkonditionierende Wirkung entfalten. So wurde die maximale Hypoxie-Toleranz bei Eisenascorbat durch ein 48h- und 72h-Intervall zwischen Präkonditionierung und OGD erreicht, während bei SPER/NO diese aber bereits nach einem 24h- und 48h-Intervall zu finden war. Möglicherweise könnte also der Nachweis einer nochmals leicht gesteigerten Wirkung auch auf der Überlappung von zwei zeitlich versetzt ablaufenden Schutzmechanismen beruhen.

Wie bereits beschrieben ist es unumstritten, dass der NMDA-Rezeptor eine zentrale Rolle in der glutamatinduzierten Exzitotoxizität bei hypoxischen und hypoglykämische Schädigungen spielt [137]. So können sowohl hypoxische als auch hypoglykämische [138] Schädigungen durch die Gabe eines NMDA-Rezeptorantagonisten verhindert werden. Man geht davon aus, dass bei der kurzzeitigen hypoxischen Präkonditionierung eine kurze und milde Aktivierung dieser NMDA-Rezeptoren zu einer Toleranzentwicklung führt. Die grundlegende Frage ist nun, ob die hier zur Präkonditionierung verwendeten Substanzen ebenfalls eventuell in der Lage sind, eine ebensolche milde Aktivierung des NMDA-Rezeptors hervorzurufen und ihre Wirkungsweise somit über diesen Mechanismus erklärt werden kann.

Der NMDA-Rezeptor ist ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - Ionenkanal mit einer sehr hohen Calciumleitfähigkeit. Am Rezeptor liegt ein spannungsabhängiger Magnesium-Block an [139] und die Aktivierung des Rezeptors durch Glutamat kann durch Glycin potenziert werden [140]. Verschiedene Liganden wie Zink, Polyamine und PCP können den Rezeptor allosterisch verändern. Besonders interessant im Hinblick auf unsere Experimente ist die Tatsache, dass der Rezeptor auch durch Redox-Veränderungen und Phosphorylierung derart chemisch verändert werden kann, dass die Calciumleitfähigkeit herabgesetzt wird [136, 141]. Für die Redox-Veränderungen sind vermutlich insbesondere Thiol-Gruppen, die sich im extrazellulären Abschnitt des Rezeptor-Komplexes befinden und reversibel oxidiert und reduziert werden können, von Bedeutung [133].

Eine komplette Blockade des NMDA-Rezeptors wird am effektivsten erreicht durch kompetitiv antagonistische Substanzen, die direkt an der Glutamat-Bindungsstelle ansetzen, kann jedoch auch durch nichtkompetitive Antagonisten (MK-801) erzeugt werden.

Die verwendeten Substanzen bis auf Flupirtin führen, wie wir in unserem Modell durch die MDA-Messung nachgewiesen haben, direkt oder indirekt zur Entstehung freier Radikale. Diese haben naturgemäß ein hohes Oxidationspotential und könnten so die oben erwähnten Thiolgruppen des NMDA-Rezeptors oxidieren, was eventuell einen Erklärungsansatz für die nachgewiesene Toleranzentwicklung darstellt. Flupirtin hingegen wirkt als funktioneller NMDA-Antagonist ohne an eine der bekannten Bindungsstellen zu binden, so dass auch für Flupirtin eine Beeinflussung des NMDA-Rezeptors als neuroprotektiver Wirkmechanismus vermutet wird [94].

Eine Oxidation des Rezeptors führt zu einer verringerten Calciumleitfähigkeit nach dem Einwirken von Glutamat. Während einer Situation mit vermehrter Glutamatfreisetzung wie bei einer Hypoxie oder Ischämie könnte so ein exzitotoxischer Schaden abgemildert werden.

Als andere gemeinsame Wirkung freier Radikale wird ebenso der zeitweilige Verbrauch reduzierender Substanzen wie Glutathion diskutiert, der zu einer gegenregulatorischen Mehrproduktion dieser Substanzen führt, sowie die Induktion von Radikalfängern wie Katalase, Superoxiddismutase oder Glutathion-Peroxidase bewirkt [58]. Allerdings kann in unserem Modell keine Aussage zu der Höhe von Glutathion und anderen Antioxidantien kurz vor der letalen OGD getroffen werden, so dass eine Aktivierung antioxidativer Mechanismen eine weitere mögliche Signaltransduktionkaskade darstellt.

Ebenfalls aus dem zeitlichen Ablauf der Toleranzinduktion lassen sich Rückschlüsse auf die involvierten Mechanismen ziehen. Sowohl bei der pharmakologischen als auch bei der hypoxischen Präkonditionierung ist nach 24 Stunden nur ein geringer oder kein präkonditionierender Effekt nachweisbar. Das Wirkungsmaximum tritt nach 48 bis 72 Stunden ein, um nach 96 Stunden wieder bereits deutlich reduziert zu sein. Obwohl die Detektion des präkonditionierenden Stimulus folglich beispielsweise in kurzfristigen Rezeptorveränderungen liegen kann, spricht dies für eine Beteiligung von genomischen Mechanismen bei der zur Toleranz führenden Zellreaktion, da der

Effekt des genetischen Remodelings durch die notwendige Transkription und Translation nicht sofort nachweisbar ist, sondern verzögert auftritt. In kürzlich veröffentlichten Arbeiten, die mittels serieller Analyse der Gene-Expression (SAGE) und Microarray-Analysen die genomischen Veränderungen nach hypoxischer Präkonditionierung *in vivo* untersuchten, konnte eine Vielzahl von herauf- und herunterregulierten Genen nachgewiesen werden [142, 143]. Von den überexprimierten Genen zeigte in der SAGE-Analyse das Metallothionein-II-Gen die stärkste Aktivierung [144]. Die Frage, ob die Mechanismen der hypoxischen Toleranzinduktion *in vivo* denen der pharmakologischen Toleranzinduktion *in vitro* entsprechen, bedarf weiterer Untersuchungen.

Nicht zuletzt muss darauf hingewiesen werden, dass während aller hypoxischen und chemischen Präkonditionierungen das neurobasale Medium sowohl bei den präkonditionierten Zellen als auch bei den Kontrollen durch eine bilanzierte Salzlösung ersetzt wurde. Demzufolge kann ebenso eine zusätzliche Modifikation durch den Entzug von neurotrophen Wachstumsfaktoren wie beispielsweise BDNF nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Schlußendlich muss die Aussagekraft der durchgeführten Experimente beachtet werden.

Für die Experimente bezüglich der OGD wurde eine Mindestzahl von N=14 aus mindestens 3-4 verschiedenen Experimenten in jeder einzelnen Untergruppe nicht unterschritten. Es liegt somit im Vergleich zu den internationalen zitierten Publikationen über primäre neuronale Kulturen aus anderen Arbeitsgruppen bei denen ein kleineres N benutzt wurde eine sehr umfangreiche und aussagekräftige Untersuchung vor. Es konnte zwischen der neuronalen Überlebensrate nach OGD an unvorbehandelten Zellen und der jeweils wirksamsten präkonditionierenden Vorbehandlung aufgrund der großen Zahl an untersuchten Zellkulturen (N=24-26 in den einzelnen Gruppen) jeweils eine statistisches Signifikanzniveau von $p < 0,01$ erzielt werden. In den Experimenten zur Wirkungsblockierung durch den Radikalfänger DMTU wurde aufgrund der dennoch vorhandenen Schwankungen ein N in jeder Gruppe von N=18-85 benutzt, um eine solche Signifikanz zu erreichen.

Insbesondere im Gegensatz zu Vorarbeiten aus der Zellkultur, in denen die Anzahl vitaler Neurone anhand von Einzelzellzählungen pro Gesichtsfeld

durchgeführt wurden und jedes einzelne Gesichtsfeld als N=1 gewertet wurde, bietet die objektiv quantifizierbare Analyse der LDH-Freisetzung und des MTT-Umsatzes deutliche Vorteile.

Prinzipiell ist dabei allerdings zu beachten, dass es sich jeweils um Schwesterkulturen von Geschwister-Embryonen der selben trächtigen Ratte handelte, die somit sowohl genetisch als auch bezüglich der Zellpräparations- und -kulturbedingungen als sehr ähnlich eingestuft werden müssen. Im Gegensatz zu tierexperimentellen Untersuchungen, bei denen die zugrundeliegenden Fallzahlen zur statistische Analyse durch die Anzahl der Tiere, bzw. die Anzahl der Experimente pro Tier eindeutig definiert ist, kann diskutiert werden, ob eine Zellkulturvertiefung als N=1 angesehen werden kann. Gerade aufgrund der Möglichkeiten der parallelen Mehrfachexperimente an Schwesterkulturen und der damit verbundenen Reduktion ethisch jeweils streng abzuwägender Tierexperimente hat sich jedoch diese Praxis durchgesetzt.

Zur statistischen Auswertung der Experimente wurde durchgehend der Vergleich von Mittelwerten verwendet. Da es sich dabei um einen Vergleich von mehr als 2 unabhängigen und ungepaarten Stichproben handelte, wurde zunächst eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ und von $p < 0,01$ gewählt wurde. Die Varianzanalysen ergaben dabei homogene normalverteilte Gruppen mit den jeweils angegebenen Mittelwerten, Standardabweichungen und Standardfehlern des Mittelwertes. Als *post hoc* Test wurde der Bonferroni Test als multipler t-Test mit Alpha-Korrektur genutzt.

Die statistische Aussagekraft liegt zusammengefaßt unter der Annahme von als einzeln zu betrachtenden Zellkultur-Vertiefungen beim Vergleich der präkonditionierten und unvorbehandelten Zellen in einem sehr signifikanten Bereich. Der Vergleich zwischen einzelnen Dosierungen einer Substanz oder den verschiedenen Zeitintervallen erreicht jedoch nur ein einfaches Signifikanzniveau oder blieb darunter. Eine auf andere Experimente übertragbare absolute Aussage zum besten Präkonditionierungsmodus ist daher sicher nicht ableitbar. Eindeutig konnte jedoch das Konzept der Präkonditionierung in der neuronalen Zellkultur bestätigt werden.