

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neuroprotektion bei fokaler zerebraler Ischämie der
Ratte durch präkonditionierenden oxidativen Stress

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Melanie Bleiss-Ahrens, geb. Ahrens
aus Potsdam

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. U. Dirnagl
 2. Prof. Dr. U. Heinemann
 3. Prof. Dr. med. M. Schwaninger

Datum der Promotion: 16.05.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Klinischer Hintergrund	6
1.2. Neuroprotektion und Ischämietoleranz	7
1.3. Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie	9
1.3.1. Fokale zerebrale Ischämie: Infarktkern und Penumbra	9
1.3.2. Fokale zerebrale Ischämie: Schadensmechanismen	11
1.3.2.1. Exzitotoxizität	12
1.3.2.2. Periinfarktdepolarisationen	12
1.3.2.3. Inflammation	13
1.3.2.4. Apoptose	14
1.4. Oxidativer Stress	14
1.4.1. Hyperbare Sauerstofftherapie	15
1.4.2. Freie Radikale	16
1.4.3. Antioxidative Mechanismen	17
2. Zielstellung dieser Arbeit	19
3. Methoden	20
3.1. Tierhaltung und Versuchsanordnung	20
3.2. Präkonditionierung	20
3.3. Permanente fokale zerebrale Ischämie	21
3.4. Postoperative Untersuchungen und Beurteilung der funktionellen Beeinträchtigung	22
3.5. Quantitative Analyse des Infarktvolumens	22
3.6. Messung der freien Radikale	23
3.7. Messung der antioxidativen Enzyme	23
3.8. Histologische Beurteilung des Hirngewebes nach hyperbarer Sauerstofftherapie	24
3.9. Statistik	24

4. Ergebnisse	25
4.1. Sicherheit der Präkonditionierung	25
4.2. Ausschluss und Letalität von Tieren	25
4.3. Physiologische Parameter	26
4.4. Operationsdauer und Narkosetiefe	26
4.5. Funktionelle Beeinträchtigung	27
4.6. Infarkt volumetrie	27
4.6.1. Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff	28
4.6.2. Reiner Sauerstoff bzw. Behandlung mit Dimethylthiourea	28
4.7. Messung freier Radikale	29
4.8. Enzymatische Radikalfänger	30
4.9. Schädigung durch hyperbare Sauerstofftherapie?	30
5. Diskussion	32
6. Zusammenfassung und Ausblick	41
7. Literaturverzeichnis	42
8. Anhang	51
8.1. Abkürzungsverzeichnis	51
8.2. Lebenslauf	53
8.3. Selbständigkeitserklärung	54
8.4. Danksagung	55

1.□. Einleitung

Diese Arbeit ist einer besonderen Form der Neuroprotektion dediziert: der Ischämietoleranz bei zerebraler Ischämie. Ischämietoleranz existiert bei globaler und fokaler zerebraler Ischämie. Ischämietoleranz bezeichnet die Fähigkeit von Zellen und Geweben durch einen subletalen, ischämie-induzierenden Reiz mehr Widerstandskraft gegen einen darauffolgenden stärkeren ischämischen Reiz zu erlangen. Dabei wird ein zelleigenes Überlebensprogramm aktiviert. Unsere Hoffnung ist es, den Prozess dieses endogen aktivierten Schutzes detailliert zu verstehen und dadurch eine effektive Neuroprotektion beim Menschen umzusetzen.

Ziel der Neuroprotektion bei zerebraler Ischämie ist die Bewahrung der Nervenzelle vor dem Zelltod. Durch Interaktion mit den am ischämischen Zellschaden beteiligten pathophysiologischen Abläufen wird deshalb versucht, den Zelltod zu vermindern. In den letzten zwei Dekaden wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen und Methoden identifiziert, die im Tierversuch eine Reduktion des durch die Ischämie bedingten morphologischen Schadens bewirken. Beim Menschen fehlt bisher die Umsetzung dieses Therapiekonzeptes. Unsere Hoffnung jedoch ist, dass durch die weitere Erforschung der Pathophysiologie der zerebralen Ischämie und der Ischämietoleranz und konsekutiv durch die Beeinflussung der Schadensmechanismen der zerebralen Ischämie neue Therapiemöglichkeiten entstehen. Unsere Hoffnung ist es, Hirninfarktpatienten durch neue Erkenntnisse aus dieser Forschung in naher Zukunft besser behandeln zu können.

Im Folgenden möchte ich deshalb zuerst auf die sozialmedizinische Bedeutung des Schlaganfalls als einer der führenden Gründe für Morbidität, bleibende Behinderung und Mortalität eingehen. Danach werde ich den bisherigen Wissensstand zur Neuroprotektion und Ischämietoleranz bei Mensch und Tier zusammenfassend darstellen. Darauffolgend wende ich mich der Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie zu, da es ohne ein Verständnis dieser unmöglich ist, effektivere neuroprotektive Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln. Abschließen möchte ich die Einleitung mit einem Überblick über oxidativen Stress und die in unserem Schlaganfallmodell angewandte Methode zur Erzeugung einer Ischämietoleranz – die hyperbare Sauerstofftherapie

1.2. Klinischer Hintergrund

Von dem häufig gravierenden Ereignis Schlaganfall sind jährlich etwa 2,5 – 4/1000 Patienten betroffen. Etwa 20-25% dieser Patienten erleiden eine intrazerebrale oder subarachnoidale Blutung. Bei etwa 75-80% der Patienten handelt es sich um eine (meist) fokale zerebrale Ischämie (Hirnfarkt). Die Sterblichkeitsrate der Patienten mit Schlaganfall beträgt etwa 30% im ersten Jahr. Der überwiegende Teil der Betroffenen überlebt die Erkrankung. Die Prävalenz beträgt etwa 5 – 8/1000 Patienten. In der Bundesrepublik Deutschland sind demzufolge etwa 400000 – 600000 Menschen von einem Schlaganfall betroffen. 50 – 60% der betroffenen Patienten müssen mit Behinderungen leben, etwa die Hälfte davon bleibt dauerhaft invalide und pflegebedürftig. 10% der betroffenen Patienten erleiden innerhalb von 2 Jahren und 24% der Patienten innerhalb von 5 Jahren einen erneuten Hirnfarkt (Kolominsky-Rabas 2001 und 2006). 7 – 40% der Patienten hatten vor dem Hirnfarkt mindestens eine transiente ischämische Attacke (Weih 1999, Arboix 2004, Schaller 2005). Das Risiko einen Hirnfarkt zu erleiden ist nach einer oder sogar mehreren transienten ischämischen Attacken etwa um 10% erhöht (Johnston 2000).

Die frühe und gezielte Behandlung des Hirnfarktes kann heutzutage bei nur etwa 5% der Patienten in der Akutphase mit einer systemischen oder intraarteriellen Thrombolyse beginnen. Grund dafür ist das enge Zeitfenster, das es nur innerhalb von 3 bis maximal 6 Stunden erlaubt, eine systemische oder intraarterielle Thrombolyse durchzuführen. Außerhalb dieses Zeitfensters ist die Schadenskaskade der zerebralen Ischämie bereits zu weit fortgeschritten. Komplikationen, vor allem Blutungen, wären die Folge. Eine Prophylaxe bzw. neuroprotektive Therapie in der Frühphase der Erkrankung steht derzeit nicht zur Verfügung.

Wünschenswert wäre auch der Einsatz einer prophylaktischen Therapie bei Hochrisikopatienten, z.B. bei Interventionen und Eingriffen, die einen Hirnfarkt verursachen können und bei Patienten mit einer transienten ischämischen Attacke. Für Deutschland liegen keine genauen Daten zum Hirnfarkt-Risiko bei Patienten mit transientscher ischämischer Attacke vor. Eine epidemiologische Bevölkerungsstudie aus Rochester, Minnesota zeigte, dass 36% der Patienten mit transientscher ischämischer Attacke innerhalb von 7 Jahren, 21% davon bereits innerhalb eines Monats einen Hirnfarkt erlitten (Brown 1998). Einer neueren Studie entsprechend wird von einem Hirnfarkt-Risiko von 5% innerhalb einer Woche und 10-15% innerhalb von 3 Monaten nach transientscher ischämischer Attacke ausgegangen (Giles 2009).

Diese Zahlen machen deutlich, dass neuroprotektive Therapien mit Behandlungsbeginn vor dem Akutereignis sinnvoll wären.

Im Folgenden möchte ich nun den derzeitigen Wissensstand zur Neuroprotektion und Ischämietoleranz ausführlicher darstellen. Dabei konzentriere ich mich auf die fokale zerebrale Ischämie, da dieses Schlaganfallmodell dem ischämischen Hirninfarkt des Menschen entspricht und in unseren Versuchen angewandt wurde.

1.2. Neuroprotektion und Ischämietoleranz

Neuroprotektion hat den Schutz der Nervenzelle vor dem Zelltod zum Ziel. Dieser Schutz kann durch von außen zugeführte Substanzen und Stimuli und durch die Aktivierung von zelleigenen Überlebensprogrammen hervorgerufen werden. Dieser Vorgang wird bei der Erzeugung einer Ischämietoleranz genutzt. Dabei führt eine Vorbehandlung, die sogenannte Präkonditionierung zum Schutz vor den Auswirkungen eines späteren ischämischen Schadens. Präkonditionierung bedeutet, dass man vor der schädigenden Ischämie einen milderen Reiz zur Toleranzerzeugung einsetzt.

Die Entstehung einer Toleranz bei zerebraler Ischämie wurde erstmals 1990 von Kazuo Kitagawa in einem globalen Ischämiemodell bei Wüstenrennmäusen beschrieben (Kitagawa 1990). Die Arbeitsgruppe konnte durch einen wiederholten kurzen und nicht-schädigenden ischämischen Reiz vor der schädigenden zerebralen Ischämie einen Schutz der Nervenzellen des Hippokampus erzeugen. 1991 konnte dieselbe Arbeitsgruppe zeigen, dass diese Ischämietoleranz nicht nur im Hippokampus, sondern auch im zerebralen Kortex, in den Stammganglien und dem Thalamus existiert (Kitagawa 1991). 1993 gelang es der Arbeitsgruppe von Simon die Methode auf die fokale zerebrale Ischämie zu übertragen (Simon 1993). Seither konnten weitere Arbeitsgruppen bei globaler und fokaler zerebraler Ischämie mit verschiedensten Reizen die Entstehung einer Ischämietoleranz demonstrieren. Außer dem subletalen ischämischen Reiz wurden beispielsweise folgende präkonditionierenden Reize untersucht:

- Apoptose-regulierend: Kaspase-Inhibition (Schulz 1999, Ferrer 2003, Shioda 2007);
- inflammatorisch: Tumornekrosefaktor-alpha (Nawashiro 1997), Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten (Lucas 2006), Lipopolysaccharide (Rosenzweig 2007), Antikörper gegen leukozytär-endotheliale Adhäsionsmoleküle (Wang 2007);
- metabolisch: Hypoxie (Sharp 2004);

- pharmakologisch: z.B. 2-Deoxyglucose, 3-NPA, Erythromycin (Rejdak 2001); Anästhetika (Kapinya 2002, Wang 2008).
- physikalisch: Hyperthermie (Steiger 2007), Hypothermie (Ren 2004), Spreading Depression (Thompson 2005);

Im Tierversuch kann die Schadensreduktion bei der globalen zerebralen Ischämie 60% bis 90% und bei der fokalen zerebralen Ischämie zwischen 20 und 60 % erreichen (Weih 2004). Was aber der oder die zugrundeliegenden endogenen Mechanismen der Ischämietoleranz sind, ist weiter nur unzureichend verstanden. Vermutet wird, dass denen der Schadenskaskade bei fokaler zerebraler Ischämie zugrunde liegenden Prozessen eine entscheidende Funktion zukommt. Sämtliche präkonditionierenden Reize greifen in die Schadensmechanismen ein und führen zu Veränderungen unterschiedlicher, evtl. sogar gleichzeitig mehrerer pathophysiologischer Vorgänge der fokalen zerebralen Ischämie. Auf zellulärer und molekularer Ebene werden Schutzmechanismen aktiviert, die letztendlich zur Neuroprotektion führen. Bestandteil der Signalübertragung ist dabei die Veränderung von Transkriptionsvorgängen mit darauffolgend veränderter Genexpression und veränderter Proteinbiosynthese. Einerseits ist hier die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu nennen, die zur Umschreibung eines definierten Genabschnittes der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Synthese von einsträngiger Ribonukleinsäure (RNA) führt. Diese fungiert dann als Boten-RNA und bewirkt die Translation der kodierten Proteine in den Ribosomen. Einige der bei der Ischämietoleranz bedeutsamen Gene und entstehenden Proteine wurden bereits identifiziert. Dazu gehören rasch aktivierbare Gene, die sog. „immediate early genes“, Hitzeschock-Proteine, Radikalfänger, antiinflammatorische Mediatoren, Wachstumsfaktoren und Anti-Apoptosegene (Ginsberg 2003). Andererseits kommt es zur Inhibition von Transkriptions- (Dhodda 2004) und Translationsvorgängen. Dabei werden Proteine, die zur Zellschädigung bei zerebraler Ischämie führen, vermindert gebildet. Beispiele sind die veränderte Expression von Rezeptoren nach globaler und fokaler zerebraler Ischämie (Pellegrini-Giampietro 1992; Wahlestedt 1993) und die veränderte Funktion von Ionenkanälen (Stenzel-Poore 2004).

Im Hinblick auf den Menschen konnte zwar bisher mit keiner der potentiell einsetzbaren Therapien eine zuverlässige Neuroprotektion erreicht werden. So wurden z.B. mehr als 49 neuroprotektive Substanzen in 209 abgeschlossenen klinischen Studien untersucht, von denen keine einen neuroprotektiven Effekt beim Menschen zeigte (Gladstone 2002, Young 2007). Demgegenüber finden sich aber bei Patienten mit transienten ischämischen Attacken (TIA) sehr

wohl Hinweise auf eine existierende Ischämietoleranz beim Menschen: So wurde z.B. in einer retrospektiven Fall-Kontrollstudie gezeigt, dass diese Patienten bei Eintritt eines Hirninfarktes sowohl ein geringeres neurologisches Defizit, als auch ein besseres Langzeitergebnis nach 15 Monaten aufwiesen (Weih 1999 und 2000). Eine andere Arbeitsgruppe fand in einer prospektiven Studie heraus, dass Patienten mit vorheriger transientser ischämischer Attacke geringere neurologische Ausfälle bei Aufnahme in die Klinik und eine geringere funktionelle Beeinträchtigung im weiteren Verlauf zeigten (Moncayo 2000). Bei Patienten, die mit einer intraarteriellen Thrombolyse beim qualifizierenden Hirninfarkt behandelt wurden, wurde eine retrospektive Analyse unterschiedlicher Parameter vorgenommen. Es fand sich ein besseres Outcome im Vergleich zu Patienten ohne vorherige TIA. Zusätzlich zeigte sich eine Abhängigkeit der funktionellen Verbesserung vom Intervall zwischen TIA und Schlaganfall sowie von der Dauer und Anzahl der transienten ischämischen Attacken. Korrelierend ließen sich in einer Untergruppe dieser Patienten kleinere Infarkte in der Bildgebung nachweisen (Schaller 2005). Eine Infarktverkleinerung, gemessen in der T2- und Diffusionswichtung im MRT, wurde auch in einer weiteren retrospektiven Studie bei Patienten mit territorialem Hirninfarkt und vorheriger TIA gefunden (Wegener 2004).

Aufgrund der oben erwähnten Tatsache, dass die Übertragung tierexperimenteller Daten auf den Menschen bisher nicht gelang, möchte ich im Folgenden einen Überblick über die Pathomechanismen der fokalen zerebralen Ischämie im Tiermodell geben. Die Grundvoraussetzung für effektive neuroprotektive Therapien ist das Verständnis der komplexen pathophysiologischen Vorgänge. Gelingt es uns z.B. protektive und destruktive Gene und Genprodukte, sowie die zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen der Signalkaskade genauer zu charakterisieren, lassen sich vielleicht sinnvolle Ansätze zur prophylaktischen und früh beginnenden Therapie des Hirninfarktes eröffnen.

1.3. Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie

1.3.1. Fokale zerebrale Ischämie: Infarktkern und Penumbra

Die Funktion des Gehirns ist aufgrund seines hohen Energieverbrauchs und der fehlenden Energiereserven in besonderer Weise von einer ausreichenden Versorgung mit Sauerstoff und Glukose abhängig. Eine Unterbrechung der Substratzufuhr durch eine Mangel durchblutung führt innerhalb sehr kurzer Zeit zunächst zu reversiblen (funktionellen), später zu irreversiblen

(strukturellen) Schäden des Hirnparenchyms. Bei der fokalen zerebralen Ischämie resultiert die Mangel durchblutung aus dem thrombotischen oder thrombembolischen Verschluss einer Hirnarterie. Dieser Verschluss kann permanent oder transient (bei Rekanalisation und Reperfusion) sein. Dauert die Unterbrechung der Durchblutung bzw. die Mangel durchblutung lange genug an, kommt es zur Ausbildung eines Hirninfarktes.

Normal durchblutetes Hirngewebe weist einen Blutfluss von mehr als 100 ml/100g/min auf. Bereits bei geringer Reduktion des Blutflusses beginnen metabolische und funktionelle Veränderungen im Gewebe (Hossmann 1994 und 2006).

Metabolisch ist bereits bei Reduktion auf 55 ml/100mg/min die Proteinbiosynthese auf ca. 50% vermindert (Mies 1991). Ab einem Blutfluss von etwa 35 ml/100g/min ist die Proteinbiosynthese erloschen (Paschen 1992). Bei Werten von etwa 25 - 35 ml/100g/min beginnt die Anhäufung von Laktat durch vermehrte anaerobe Glykolyse mit konsekutiver Azidose im ischämischen Gewebe. Gleichzeitig lässt sich eine Abnahme des ATP-Gehaltes im Gewebe finden (Obrenovitch 1988). Letztendlich findet sich dann der Zusammenbruch der Ionenhomöostase und die anoxische Depolarisation der Zellen bei Flusswerten unter 15 ml/100g/min (Hossmann 1994).

Funktionell lässt sich beim Menschen eine Beeinträchtigung der elektrischen Aktivität bei einer Herabsetzung des Blutflusses auf Werte zwischen 15 und 25 ml/100g/min finden (Morawetz 1979). Bei Wiederherstellung des Blutflusses und damit normaler Sauerstoff- und Glucoseversorgung lässt sich eine Wiederherstellung der elektrischen Aktivität im betroffenen Gewebe nachweisen (Astrup 1977). Bei Primaten lässt sich eine noch reversible Hemiparese bei Werten von 23 ml/100g/min nachweisen. Die Reversibilität der fokalneurologischen Symptomatik verliert sich bei einer Reduktion des Blutflusses unter 18 ml/100g/min (Morawetz 1979).

Histologisch tritt die Gewebenekrose bei der permanenten zerebralen Ischämie bei Blutflussraten unter 24 ml/100g/min und bei der transienten zerebralen Ischämie unter 12 ml/100g/min ein (Jones 1981).

Die Zellschädigung bei der fokalen zerebralen Ischämie entwickelt sich zeitlich in einer komplexen Abfolge von Schadensmechanismen, auf die ich in den folgenden Erläuterungen noch ausführlich eingehen werde. Auch räumlich entwickelt sich der Zellschaden im Infarktkern

und die eher funktionelle Beeinträchtigung in der Infarktperipherie unterschiedlich. Während im Infarktkern die Durchblutung stark herabgesetzt oder ganz zum Erliegen gekommen ist, weist die Peripherie über Kollateralen noch eine ausreichende Durchblutung zur Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität auf. Dieser Bereich zwischen Infarktkern und normal durchblutetem Hirngewebe wird Penumbra (= Halbschatten) genannt. Die Ischämieschwelle ist entsprechend den vorherigen Ausführungen bei einem kritischen Blutfluss von etwa 20 ml/100mg/min definiert. Die Penumbra hingegen weist einen Blutfluss zwischen 20 und 40 ml/100mg/min auf (Ginsberg 2003). Im Gegensatz zum Kerngebiet, das bei ausreichend langer Dauer und Intensität der Mangeldurchblutung (Unterschreitung der Ischämieschwelle) dem Untergang geweiht ist und neuroprotektiven Therapien nicht zugänglich ist, ist die Penumbra der potentielle Angriffsort von neuroprotektiven Therapien. Der Funktionsverlust der Penumbra ist teilweise oder vollständig reversibel, wenn der Blutfluss durch Reperfusion wiederhergestellt oder die Schadensmechanismen der zerebralen Ischämie beeinflusst werden. Die Penumbra infarziert, wenn die schädigenden Prozesse ununterbrochen einwirken und es ebenso zur Unterschreitung des kritischen Blutflusses kommt.

Beim Menschen kann das Existieren der Penumbra mittels PET- und SPECT-Untersuchungen und anhand neuerer Studien auch im Computer- und Kernspintomogramm durch ein Missverhältnis zwischen Diffusion und Perfusion belegt werden (Lövlblad 2003, Muir 2006, Ebinger 2009).

1.3.2. Fokale zerebrale Ischämie: Schadensmechanismen

Hirngewebe ist stärker als andere Gewebe von einer ausreichenden Versorgung mit Sauerstoff und Glukose abhängig. Die Energie-Gewinnung (ATP-Synthese) erfolgt hauptsächlich über die oxidative Phosphorylierung. Kommt es durchblutungsbedingt zum Substratmangel erliegen die ATP-Produktion und damit die ATP-abhängigen Ionenpumpen der Zellmembran. Die Ionengradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum können nicht aufrechterhalten werden. Das Membranpotential bricht zusammen. Es resultiert die anoxische Depolarisation von Nerven- und Gliazellen. Bei einer kritischen Minderung des Blutflusses im betroffenen Gewebe kommt es also zum Erliegen des normalen Substrat- und Energiehaushaltes. Zeitlich überlappend und teilweise aufeinanderfolgend setzen dann die Phasen der Exzitotoxizität, der Periinfarktdepolarisationen, der Inflammation und der Apoptose ein.

1.3.2.1. Exzitotoxizität

Die Exzitotoxizität beschreibt eine sich selbst erhaltende und verstärkende Übererregung von Nerven- und Gliazellen. Nach der anoxischen Depolarisation der Zellen werden exzitatorische Aminosäuren, allen voran Glutamat, in den Extrazellularraum ausgeschüttet. Durch den Ausfall der energieabhängigen Ionenpumpen und den Verlust des Natriumgradienten können diese nicht reabsorbiert werden. Sie unterhalten den exzitatorischen Prozess. Es werden spezifische Rezeptoren (NMDA, AMPA, Kainat) und spannungsabhängige Kalziumkanäle aktiviert. Kalzium aus dem Extrazellularraum und aus intrazellulären Speichern akkumuliert in der Zelle. Gleichzeitig strömt Natriumchlorid in die Zelle ein. Kalium verlässt die Zelle. Sekundär resultiert durch die Veränderung des osmotischen Gradienten ein zytotoxisches Hirnödem, das weitere negative Effekte über die Erhöhung des intrakraniellen Druckes, die Kompression von Hirngefäßen und letztendlich die Herniation von Hirnteilen haben kann. Extrazelluläres Kalium wird teilweise von Gliazellen aufgenommen und führt osmotisch in diesen zur Zellschwellung. Das massiv erhöhte intrazelluläre Kalzium fungiert unreguliert als sekundärer Botenstoff und aktiviert eine Vielzahl von destruktiven Prozessen. Proteinkinasen, Endonukleasen, Proteasen und Lipasen gehören zu den beteiligten Enzymen. Es resultiert die Schädigung von DNA und Mitochondrien (Endonukleasen), des Zytoskeletts (Proteasen) und die Zerstörung neuronaler Membranen und des Endothels von Gefäßen (Phospholipasen). Proteinkinasen führen darüber hinaus durch Phosphorylierung zur veränderten Funktion von Rezeptoren und Membrankanälen. Es werden zum Beispiel weitere Kalziumkanäle aktiviert. Bereits in dieser ersten Phase kommt es auch zur vermehrten Bildung von freien Sauerstoffradikalen, auf die ich im letzten Kapitel der Einleitung noch ausführlicher eingehen werde. Freie Radikale ihrerseits fungieren als zusätzliche Aktivatoren entzündlicher Prozesse und der Apoptose.

1.3.2.2. Periinfarktdepolarisationen

In der Penumbra besitzen die Zellen zunächst noch ausreichend Energie zur Wiederherstellung des Ionengleichgewichtes. Sie können repolarisieren. Durch extrazellulär angereichertes Kalium und Glutamat der benachbarten Zellen werden aber weitere Depolarisationen, die Periinfarktdepolarisationen ausgelöst. Als Folge dieser kommt es zu einem fortschreitenden Energieverlust der angrenzenden Zellen, bis diese nicht mehr in der Lage sind zu repolarisieren. Dieser Vorgang setzt sich unaufhaltsam, wellenartig immer weiter in die Peripherie des

Infarktkerns fort und führt im Verlauf von Stunden dazu, dass auch die zunächst nur reversibel geschädigten Randbereiche des Infarktes irreversibel geschädigt werden. Neben dem Verlust der funktionellen Integrität kommt es auch zum Verlust der strukturellen Integrität. Die Penumbra wird zunehmend ein Bestandteil des ischämischen Areals. Die Arbeitsgruppe von Mies konnte tierexperimentell einen linearen Zusammenhang zwischen Anzahl der Periinfarktdepolarisationen und Infarktgröße zeigen (Mies 1993). Hartings und Kollegen wiesen nach, dass dieser Prozess bis zu 2 Tagen anhält und zur Infarktausdehnung führt (Hartings 2003). Hinweise auf die Existenz von Periinfarktdepolarisationen beim Menschen fanden sich in zwei aktuelleren Studien. Diese untersuchten transiente Depolarisationen nach traumatischen Hirnverletzungen und Blutungen bzw. nach Subarachnoidalblutungen (SAB). In beiden Studien wurden transiente Depolarisationen bei mindestens 50% der Patienten gefunden (Fabricius 2006; Dreier 2006). Etwa die Hälfte der Patienten (7 Patienten) mit SAB hatten ein klinisches Korrelat dieser transienten Depolarisationen und 4 dieser Patienten entwickelten ischämische Infarkte (Dreier 2006).

1.3.2.3. Inflammation

Entzündungsmediatoren (z.B. Tumornekrosefaktor-alpha, Interleukin-1, Interleukin-6) werden innerhalb von Stunden nach dem Infarkt durch Kalzium-abhängige sekundäre Botenstoffe, durch freie Radikale und durch die Hypoxie getriggert. Durch sie werden Adhäsionsmoleküle in den Endothelzellen aktiviert, die mit den komplementären Rezeptoren der Neutrophilen interagieren (Kato 1996). Neutrophile heften sich an die Endothelwand an und durchdringen diese, um in das Hirnparenchym einzudringen. Getriggert durch Chemokine folgen Makrophagen und Monozyten. Diese Zellen unterhalten den Entzündungsprozess durch die Freisetzung von weiteren Zytokinen, zytotoxischen Enzymen und freien Radikalen. Der Entzündungsvorgang führt zur Verschlechterung der Mikrozirkulation durch die Penetration der Entzündungszellen und Endothelzerstörung sowie durch eine Vasokonstriktion ausgelöst durch die Mediatoren. Durch Zytokine werden unzählige toxische Mediatoren, Zelladhäsionsproteine und Apoptose-induzierende Faktoren aktiviert (Tomita 1996). Außerdem kommt es bereits in der Frühphase der fokalen zerebralen Ischämie zur Aktivierung von ortsständigen Astrozyten und Mikroglia. Diese unterhalten den Prozess und führen ebenso wie die Blutzellen zur Produktion toxischer Mediatoren, von Zytokinen und von Enzymen (Stoll 1998).

1.3.2.4. Apoptose

Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose ein Zelluntergangsphänomen, das nicht unkontrolliert als Antwort auf einen letalen Schaden abläuft. Die Apoptose ist ein programmierter Zelltod, der durch verschiedene Faktoren moduliert und gesteuert werden kann. Apoptotische Vorgänge werden nach mehreren Stunden, teilweise nach Tagen bis Wochen in der Infarktperipherie bei der fokalen zerebralen Ischämie beobachtet (Li 1995, Andersson 2006). Über eine intrinsische oder extrinsische Aktivierung von Prokaspasen, den sog. Initiator-Kaspasen 2, 8, 9 und 10 entstehen die Exekutoren der Apoptose: Zystein-Proteasen, zusammengefasst in der Gruppe der Kaspasen. Dabei kommt es extrinsisch zur rezeptorvermittelten Bindung und Aktivierung der Prokaspasen 8 und 10 und intrinsisch über diverse Stimuli zur Freisetzung von Zytochrom C in das Zytosol, das zur Aktivierung der Prokaspase 9 führt. Die sog. Effektor-Kaspasen 3, 6 und 7 bewirken dann die Elimination der Zelle. Die Kaspase 3 zum Beispiel inaktiviert die DNA-Reparaturenzyme Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase (PARP) und DNA-abhängige Proteinkinase (Chan 2004, Sugawara 2004). Andere Kaspasen führen zur Inhibition der Transkription von Boten-RNA und degradieren zytoskeletale und nukleäre Strukturproteine (MacManus 1997). Bei der Apoptose spielen modulierende Faktoren, wie z.B. (1) die kompetitive Hemmung auf Rezeptorebene oder der Einsatz falscher Rezeptoren, (2) Veränderungen der Gegenspieler der Bcl-Familie, die die Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran für Zytochrom C beeinflussen und (3) virale Kaspase-inhibierende Proteine und synthetische Kaspase-Inhibitoren eine entscheidende Rolle.

Nachdem ich nun die Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie etwas ausführlicher dargestellt habe, möchte ich zum Abschluss meiner Einleitung auf die hyperbare Sauerstofftherapie eingehen. Gleichzeitig gebe ich einen Überblick über freie Radikale und antioxidative Mechanismen und ihre Rolle in der fokalen zerebralen Ischämie.

1.4. Oxidativer Stress

Oxidativer Stress bezeichnet das Missverhältnis resultierend aus einer vermehrten Bildung freier Radikale und der verminderten Kompetenz der Zelle, diese wieder abzubauen. Bei fokaler zerebraler Ischämie kommt es als Folge der Schadensmechanismen zur vermehrten Bildung freier Radikale. Gleichzeitig ist der Gehalt des Gehirns an antioxidativen Enzymen und

nichtenzymatischen Antioxidantien vergleichsweise zu anderen Organen gering.

Zu einer vermehrten Bildung freier Radikale kann es aber nicht nur durch endogene Vorgänge (z.B. Infektionen, chronische Entzündungen, Ischämie), sondern auch durch unterschiedliche externe Veränderungen kommen. Ein Beispiel hierfür ist die hyperbare Sauerstofftherapie. Diese bezeichnet die Behandlung in einer Überdruckkammer mit reinem Sauerstoff bei erhöhten Umgebungsdrücken. Die hyperbare Sauerstofftherapie ist nach den bisherigen Erkenntnissen eine sichere Methode, erhöhte Konzentrationen freier Radikale zu erzeugen.

1.4.1. Hyperbare Sauerstofftherapie

Hyperbare Sauerstofftherapie wird seit etwa 1960 medizinisch angewandt: zuerst bei Gasbrand, später auch bei Kohlenmonoxid-Vergiftungen, Tauchunfällen, Bestrahlungsschäden, nekrotisierender Faszitis, therapierefraktärer Osteomyelitis, schweren traumatischen Gewebsschäden, Brandwunden und Abstoßungsreaktionen bei Hauttransplantaten. Es wurden bisher Druckwerte von 1 bis 3 Atmosphären über dem normalen Luftdruck mit einer maximalen Behandlungsdauer von 120 Minuten angewandt, ohne dass dabei schwerwiegende Nebenwirkungen beim Menschen auftraten. Zu den häufigsten Nebenwirkungen unter diesen Bedingungen zählen eine reversible Myopie, Barotraumen bei zu schneller Druckänderung und gelegentlich epileptische Anfälle (Wang 2003). Bei wiederholter Therapie kann es zu tracheo-bronchialen Symptomen mit reversibler Lungenfunktionseinschränkung kommen.

Viele Effekte der hyperbaren Sauerstofftherapie sind bereits gut beschrieben: Die hyperbare Sauerstofftherapie normalisiert den Wassergehalt des Gehirns und vermindert das Hirnödem (Al-Waili 2005). Außerdem wird bei fokaler zerebraler Ischämie die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke vermindert (Veltkamp 2005). Weiter konnte in Gefäßendothelien nach hyperbarer Sauerstofftherapie eine veränderte Leukozytenfunktion und -anheftung während der Entzündungsphase im ischämischen Skelettmuskel gezeigt werden (Zamboni 1993). Auch im Gehirn wurde eine veränderte Leukozytenfunktion durch hyperbaren Sauerstoff nach Kohlenmonoxidvergiftung beschrieben (Thom 1993). Untersuchungen bei Mensch und Tier konnten auch zeigen, dass es in bestrahltem Gewebe nach Sauerstoffexposition zur Neubildung von Kapillargefäßen kommt (Marx 1990). Inwiefern es in gesundem Gewebe und speziell im Gehirn nach Exposition mit hyperbarem Sauerstoff zur Angiogenese kommt ist unklar. Blutflussalterationen unter hyperbarer Sauerstofftherapie bei fokaler zerebraler Ischämie sind kaum untersucht. In einem globalen Ischämiemodell wird bei Hasen eine Abnahme des

zerebralen Blutflusses beschrieben (Mink 1995). Bei gesunden Tieren und Menschen führt hyperbare Sauerstofftherapie zur Reduktion des zerebralen Blutflusses (Omae 1998). Gleichzeitig steigt aber der Sauerstoffpartialdruck an, was zur Konstriktion von Arteriolen führen könnte und somit die Reduktion des zerebralen Blutflusses erklären würde.

Hyperbarer Sauerstoff erhöht weiter die Menge freier Radikale in allen Geweben (Yusa 1987, Ay 2007). Korrelierend lässt sich eine erhöhte Menge an Lipidperoxiden nach hyperbarer Sauerstofftherapie im Tierexperiment nachweisen. Die Lipidperoxidation ist ein indirektes Maß für die anfallende Menge freier Radikale. Der Anstieg der Lipidperoxide ist direkt nach Exposition mit hyperbarem Sauerstoff am größten, um dann bereits nach 3 Stunden wieder abzufallen und nach 24 Stunden Normalwerte zu erreichen (Noda 1983). Gleichzeitig werden im Hirngewebe von Ratten die antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase und Gluthationperoxidase nach einmaliger Exposition vermehrt gebildet (Ay 2007). Dieser Effekt verändert sich ebenso mit der Zeit. Ein Maximum wird bei einer Stunde beschrieben (Korkmaz 2007). Bei Rückenmarks- oder kardialer Ischämie ist auch nach hyperbarem Sauerstoff als präkonditionierender Stimulus eine vermehrte Bildung antioxidativer Enzyme nachgewiesen worden (Nie 2006; Kim 2001).

1.4.2. Freie Radikale

Freie Radikale spielen eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie. In der Schadenskaskade der fokalen zerebralen Ischämie werden freie Radikale bereits in der ersten Phase der Exzitotoxizität durch den destruktiven Abbau unterschiedlicher Substrate exzessiv gebildet. Auch durch das Fortschreiten der Schadenskaskade entstehen weitere freie Radikale. Von Bedeutung ist die Bildung freier Radikale besonders in den Regionen in denen Sauerstoff ausreichend zur Verfügung steht: in der Penumbra und nach Reperfusion.

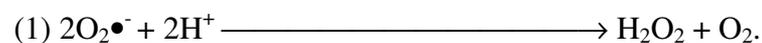
Bei der fokalen zerebralen Ischämie werden vor allem Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) und Hydrogenperoxid (H_2O_2) gebildet. Diese entstehen einerseits durch Elektronenverlust aus der mitochondrialen Atmungskette und dem Elektronentransport des endoplasmatischen Retikulums und der Kernmembran bei nekrotischer Zellschädigung, andererseits aus der Aktivierung einer Vielzahl von Enzymen bei der Zellschädigung. In Anwesenheit von katalytisch wirkenden Eisen- oder Kupferionen, die intrazerebral ausreichend vorhanden sind und bei zerebraler Ischämie vermehrt in ungebundener Form vorliegen, entsteht aus diesen beiden Radikalen das hochreaktive

Hydroxyl-Radikal (OH•). Zusätzlich wird durch eine hohe Konzentration von Protonen an der Zellmembran durch Reaktion mit Superoxid das reaktivere und besser Membran-permeable Perhydroxyl-Radikal (HO₂•) gebildet. Die Kalzium-Kalmodulin-abhängige Aktivierung der Stickoxid-Synthasen 1 und 3 und im Verlauf von Stunden auch erfolgende Aktivierung der Stickoxid-Synthase 2 durch ortsständige und infiltrierende Entzündungszellen lässt weiter Stickoxid (NO•) entstehen. Superoxid und Stickoxid bilden das hochreaktive Peroxynitrit-Radikal. Bei physiologischen pH-Wert zerfällt dieses zu Hydroxyl- und Nitroendioxid (NO₂•)-Radikalen.

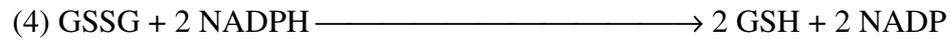
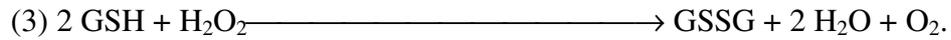
Die hochreaktiven Peroxynitrit- und Hydroxyl-Radikale führen zu Einzelstrangbrüchen und Basenmodifikationen der DNA mit konsekutiver Aktivierung der Poly(ADP)-Ribose-Synthetase, die zur Erschöpfung der intrazellulären NAD-Menge führen kann und damit Rückwirkungen auf den Energiestoffwechsel und die intrazelluläre Kalziumkonzentration zeigt. Stickoxid bewirkt zusätzlich die Desaminierung und Nitration von DNA-Bestandteilen. Weitere Schädigung durch Radikale bestehen in der Störung der Atmungskette, der Lipidperoxidation und der Oxidation von Strukturproteinen und daraus resultierender Membranschädigung mit veränderter Permeabilität und Rezeptorveränderungen.

1.4.3. Antioxidative Mechanismen

Die Entgiftung freier Radikale geschieht unter physiologischen Bedingungen durch verschiedene Enzyme. Die zytosolische Superoxiddismutase, die Kupfer und Zink als Kofaktoren benötigt, und die mitochondriale Superoxiddismutase, die Mangan als Kofaktor benötigt, metabolisieren Superoxid entsprechend der Gleichung 1:



Das Endprodukt Hydrogenperoxid kann über zwei Stoffwechselwege eliminiert werden: zum einen erfolgt durch das Enzym Katalase die Umwandlung zu Sauerstoff und Wasser (Gleichung 2); zum anderen baut das Enzym Gluthationperoxidase Hydrogenperoxid zu den gleichen Endprodukten (Gleichung 3) ab. Diese Reaktion ist an das Vorhandensein von Gluthation in reduzierter Form gebunden. Die erneute Bereitstellung des Glutathions erfolgt NADPH-abhängig über das Enzym Gluthationreduktase (Gleichung 4).



Nicht-enzymatische Radikalfänger umfassen die Oxidationen von Vitamin E zum Endprodukt Tocopherylquinon und von Vitamin C zum Endprodukt Dehydroascorbinsäure. Weitere Antioxidantien sind Gluthation, L-Methionin, Zystein, Zoeruloplasmin und Transferrin.

Pharmakologisch kann die Menge freier Radikale z.B. durch Allopurinol, durch Dimethylsulfoxid und Dimethylthiourea, sowie durch Deferoxamin, Mannitol und Barbiturate vermindert werden.

2. Zielstellung dieser Arbeit

Oxidativer Stress spielt in der Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie eine wichtige Rolle. Einerseits werden freie Radikale bereits sehr früh in der Schadenskaskade der zerebralen Ischämie gebildet. Sie haben selbst eine schädigende Wirkung und aktivieren und unterhalten darüber hinausgehend destruktive Prozesse. Besonders betroffen sind davon Hirnbereiche, die eine kollaterale Blutversorgung erhalten (Penumbra) bzw. reperfundiert werden (z.B. nach Thrombolyse). Diese Bereiche sind potentiell einer Neuroprotektion zuzuführen. Andererseits können freie Radikale möglicherweise aber auch eine Schutzfunktion haben. Sie fungieren in vielen Bereichen als Signaltransduktoren. Beispiele hierfür sind die Beeinflussung der Wirkung und Sekretion von Zytokinen, von Wachstumsfaktoren und Hormonen, sowie die Modulation von Ionenkanälen, der Apoptose und der Transkription.

Die hyperbare Sauerstofftherapie führt zur vermehrten Bildung freier Radikale. Gleichzeitig ist die hyperbare Sauerstofftherapie im Vergleich zu anderen präkonditionierenden Reizen eine milde Form der Präkonditionierung. Wir wählten diese Methode, da sie auch beim Menschen ohne gravierende Nebenwirkungen therapeutisch einsetzbar ist.

Präkonditionierung durch hyperbaren Sauerstoff war bisher nur in einem globalen Ischämiemodell untersucht worden. Die globale Ischämie entspricht aber nicht dem Hirninfarkt des Patienten, so dass eine Erzeugung dieser Ischämietoleranz im fokalen Ischämiemodell untersuchenswert war.

Demzufolge sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- 1.) Führt die Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff auch bei permanenter fokaler zerebraler Ischämie der Ratte zur Schadensreduktion?
- 2.) Spielen freie Radikale eine Rolle bei dieser Präkonditionierung?
- 3.) Kommt es zu Veränderungen der antioxidativen Enzyme?
- 4.) Hat die hyperbare Sauerstofftherapie per se eine schädigende Wirkung?

3. Methoden

3.1. Tierhaltung und Versuchsanordnung

Die Tierversuche wurden unter strenger Einhaltung des Tierschutzgesetzes und nach Genehmigung durch die Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales Berlin durchgeführt. Die Experimente wurden von Landesamt für Gesundheit und Arbeitssicherheit genehmigt. Die Tiere wurden präoperativ gemeinschaftlich gehalten und hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser. 12 Stunden vor der Operation bestand Nahrungskarenz. Die Experimente erfolgten an 119 männlichen Wistar-Ratten. 85 der Versuchstiere wurden in die einzelnen Versuchsgruppen aufgeteilt (s. Abb. 1). Bei weiteren 28 Tieren erfolgte die Bestimmung der freien Radikale und der Enzymaktivitäten. Außerdem wurde bei 6 Tieren das Hirngewebes hinsichtlich schädigender Wirkungen der hyperbaren Sauerstofftherapie beurteilt.

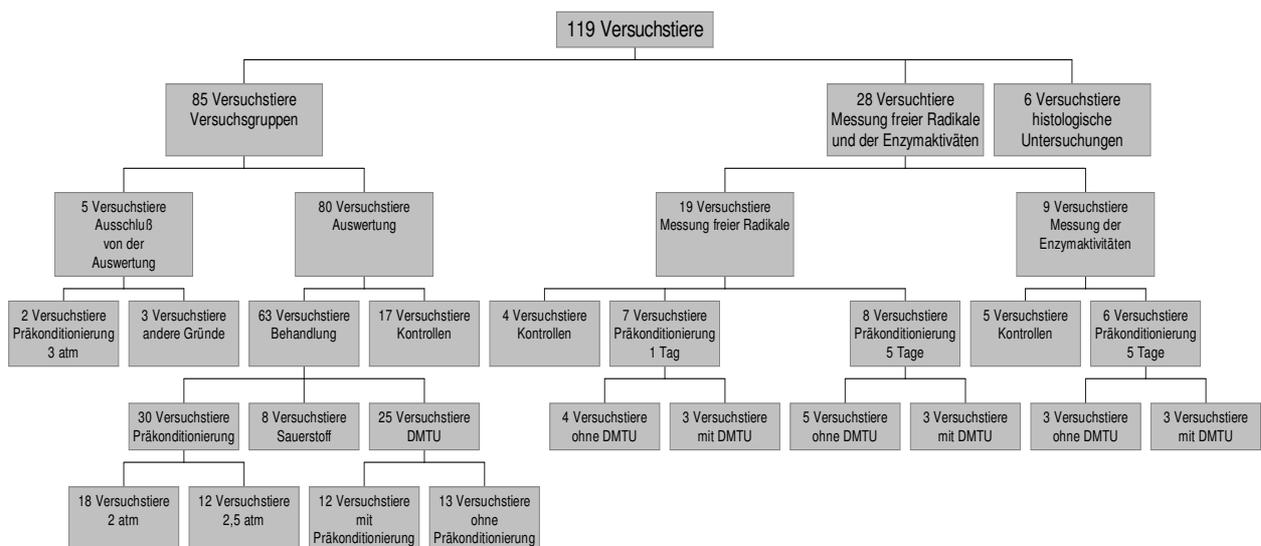


Abbildung 1: Flussdiagramm der Versuchsanordnung.

3.2. Präkonditionierung

Die Versuchstiere der beiden Präkonditionierungs-Gruppen wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen in einer luftdicht abgeschlossenen Kammer behandelt. Es wurden jeweils zwei Tiere gleichzeitig behandelt. Die Vorbehandlung unter hyperbaren Bedingungen und 100% Sauerstoff dauerte jeweils eine Stunde. Die ersten Versuche wurden dabei mit einem Druck von 3 Atmosphären über dem normalen Luftdruck durchgeführt. Da sich darunter zeigte,

dass diese Versuchsreihe aufgrund von gravierenden Nebenwirkungen nicht sicher zu Ende geführt werden könnte, wurde die hyperbare Kammer darauffolgend nur unter einen Druck von 2 bzw. 2,5 Atmosphären über dem normalen Luftdruck gesetzt und kontinuierlich mit reinem Sauerstoff durchflutet. Die Druckerhöhung und der Druckablass erfolgten dabei langsam zu- bzw. abnehmend, da bei einer zu raschen Druckänderung Nebenwirkungen zu erwarten waren. Am 6. Tag erfolgte dann die Operation entsprechend dem unten beschriebenen Schlaganfallmodell. Das Intervall zwischen letzter Behandlung und Operation betrug 24 Stunden.

3.3. Permanente fokale zerebrale Ischämie

Die Narkose wurde mit 4%igem Halothan in reinem Sauerstoff initiiert und anschließend in einer Kopfmaske mit 0,5 – 1% Halothan in einem Gemisch aus 70% Stick- und 30% Sauerstoff intraoperativ fortgeführt. Die Körpertemperatur der Tiere wurde bei 37,5 °Celsius +/- 0,5 mittels einer Heizmatte konstant gehalten. Blutdruck und Temperatur wurden kontinuierlich überwacht. Regelmäßige Blutgasanalysen und Blutzuckerbestimmungen erfolgten. Für das Blutdruckmonitoring und für die Blutabnahmen wurde die Schwanzarterie mit einem Silikonschlauch kanüliert. Alle Wunden wurden mit 2%igem Xylocain-Gel versorgt.

Zur Erzeugung der Ischämie benutzten wir das gering modifizierte Hakenmodell nach Brint (Brint 1988). Die A. cerebri media rechts wurde permanent verschlossen. Zusätzlich wurde die rechte A. carotis communis permanent und die linke A. carotis communis temporär verschlossen. Durch den temporären bilateralen Verschluss gelingt es, konstantere Infarkt volumina durch Reduktion der kollateralen Versorgung des ischämischen Areals aus der gegenüberliegenden Hemisphäre bei der Wistar-Ratte zu erzeugen (Chen 1986).

Zur Darstellung der Karotiden wurden die Tiere auf dem Rücken gelagert und längs in der Mitte des Halses eine Inzision vorgenommen. Mittels stumpfer Präparation wurde die Muskulatur bis zur Trachea durchtrennt. Dann wurden jeweils die A. carotis communis im seitlich der Trachea verlaufenden Gefäß-Nervenstrang dargestellt. Der ventrolateral verlaufende N. vagus und die V. jugularis interna wurden freipräpariert und die rechte A. carotis communis mit einem Faden umschlungen und permanent ligiert. Die linke A. carotis communis wurde mit einem Silikonschlauch, der mit einer Klemmvorrichtung versehen war, umschlungen und zunächst offen gelassen. Als nächster Schritt wurde die rechtsseitige A. cerebri media dargestellt. Dazu

wurden die Ratten in einer Kopfhaltung fixiert und der Knochen durch Längsinzision der Galea freigelegt. Dann wurde der M. temporalis bis hinunter zum Kieferfortsatz durchtrennt und der Kieferfortsatz entfernt. Nachdem so der Knochen im Bereich des hinteren Jochbogens ausreichend dargestellt ist, erfolgte die Kraniotomie. Durch ein 2-4 mm großes Bohrloch wurde die Dura dargestellt und vorsichtig gefenstert. Die darunter liegende A. cerebri media wurde kurz oberhalb der Kreuzungsstelle mit der inferioren Hirnvene in der Fissura rhinalis mit einem beweglichen Haken aufgenommen, etwa 1 mm angehoben und dann thermisch distal des Abgangs der lentikulosträren Äste durchtrennt. Anschließend wurde sofort die im Bereich der linken A. carotis communis liegende Schlinge für 1 Stunde verschlossen. Die Kopfwunde wurde verschlossen. Die Tiere wurden aus der Kopfhaltung befreit und für die restliche Zeit in leichter Narkose gehalten. Nach Ende der 1stündigen Okklusionszeit wurde die Halswunde verschlossen und die Narkose beendet. Die Tiere wurden nach dem Erwachen in ihre Unterbringung gebracht.

3.4. Postoperative Untersuchung und Beurteilung der funktionellen Beeinträchtigung

24 Stunden und 4 Tage nach der Operation wurden die Tiere klinisch-neurologisch von einem verblindeten Untersucher beurteilt. Entsprechend der Beschreibung von Bederson erfolgte eine Beurteilung des neurologischen Defizits durch Einteilung in folgende Schweregrade: Grad 0: kein funktionelles Defizit, Grad 1: Parese des Vorderfusses mit Streckdefizit, Grad 2: Parese des Vorderfusses mit Streckdefizit und verminderter Widerstand gegenüber seitlicher Bewegung, Grad 3: entsprechend Grad 2 mit zusätzlichen Torsionsbewegungen des Rumpfes (Bederson 1986). Täglich wurden das Gewicht, die Körpertemperatur und der Blutglukosegehalt der Tiere erfasst. Sie erhielten Nahrung und frisches Wasser.

3.5. Quantitative Analyse des Infarktolumens

4 Tage nach der Operation wurden die Tiere mit 4 %igem Halothan in reinem Sauerstoff tief narkotisiert und rasch dekapitiert. Das Gehirn wurde entfernt und in 2-Methylbutan bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, gefolgt von flüssigem Stickstoff bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefroren und zunächst gelagert. Nach wenigen Tagen wurden im Mikrotom bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fortlaufende Schnitte von 20-40 μm Dicke in 400 μm Intervallen angefertigt und einen Tag später mit Vanadium Acid Fuchsin gefärbt (Victorov 1993). Die Infarktareale von 30-35 seriellen Hirnschnitten wurden von einem verblindeten

Untersucher computergestützt mit einem Bildverarbeitungsprogramm berechnet. Das Gesamtinfarktvolumen wurde direkt durch Aufsummierung der einzelnen Infarktareale und Multiplikation mit dem Abstand der Schnitte ermittelt. Eine Korrektur des Infarktareals hinsichtlich des Hirnödems war nicht notwendig, da sich dieses bereits nach 3 Tagen zurückbildet (Lin 1993).

3.6. Messung der freien Radikale

Die Messung freier Radikale auf direktem Wege ist schwierig, da diese in der Regel keine stabilen Produkte sind. Als indirekte Methode hat sich die Messung über die Lipidperoxidation etabliert. Als ein Endprodukt ist Malondialdehyd zu nennen. Malondialdehyd ist ein sehr flüchtiges Nebenprodukt der Peroxidation ungesättigter Fettsäuren. Malondialdehyd bildet mit Thiobarbitursäure ein Reaktionsprodukt, das aufgrund seiner roten Farbe spektralphotometrisch bei 534 nm quantifiziert werden kann. Die Menge des entstehenden Malondialdehyd-Thiobarbitursäure-Reaktionsproduktes wurde im Flüssigchromatographen entsprechend der Methode von Wong und Mitarbeitern bestimmt (Wong 1987). Entgegen der Methode von Wong erfolgte die Bestimmung nicht in Protein-freien Proben. Deshalb wurde der Proteingehalt entsprechend der von Bradford beschriebenen Methode bestimmt (Bradford 1976) und der MDA-Gehalt in pMol/mg Protein angegeben. Die Werte wurden bei insgesamt 19 Tieren (4 Kontrollen, 4 Tiere nach eintägiger Präkonditionierung, 3 Tiere nach eintägiger Präkonditionierung mit vorheriger DMTU-Behandlung, 5 Tiere mit 5-tägiger Präkonditionierung, 3 Tiere nach 5-tägiger Präkonditionierung mit vorheriger DMTU-Behandlung) bestimmt. Die Bestimmung erfolgte in jeder Probe genau zweimal. Da es sich um sehr flüchtige Reaktionsprodukte handelt, wurden die Proben zur Bestimmung der freien Radikale und der antioxidativen Enzyme sehr rasch nach der letzten Behandlung entnommen. Dazu wurden die Tiere sofort nach der Präkonditionierung dekapitiert, der Kopf in flüssigem Stickstoff gefroren und die Proben bei – 20 bis – 30°C in einem Kryostat entnommen und aufbereitet.

3.7. Messung der antioxidativen Enzyme

Die Aktivitäten der Kupfer-Zink- und Mangan-Superoxiddismutase wurden, gemessen am Abbau von Superoxid-Radikalen, spektralphotometrisch entsprechend der Methode von Bolann

und Mitarbeitern bestimmt (Bolann 1991 und 1996). Die Aktivität der Katalase wurde, gemessen an der Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff, spektralphotometrisch bei 280 nm entsprechend einer Methode von Aebi bestimmt (Aebi 1984 und 1986). Die Werte wurden in Unit pro Liter gemessen und die Messwerte der Kontrolltiere als 100% der Enzymaktivität angesehen. Die Messwerte der Versuchsgruppen wurden dann dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte bei insgesamt 9 Tieren (5 Kontrollen, 3 Tiere nach 5-tägiger Präkonditionierung, 3 Tiere nach 5-tägiger Präkonditionierung und vorheriger DMTU-Behandlung).

3.8. Histologische Beurteilung des Hirngewebes nach hyperbarer Sauerstofftherapie

Zur histologischen Beurteilung wurden 6 Gehirne von hyperbar präkonditionierten Tieren nach transkardialer Perfusion und Fixation untersucht. Dazu wurden 20 µm dicke Schnitte des gesamten Gehirns im Mikrotom angefertigt und mit Hämatoxylin/Eosin, Vanadium-Acid-Fuchsin- oder Nissl-Färbung aufbereitet. Danach erfolgte die Beurteilung unter dem Lichtmikroskop von einem erfahrenen Untersucher.

3.9. Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert und zugehörige Standardabweichung angegeben. Die statistische Analyse der physiologischen Parameter und Infarkt volumina sowie der freien Radikale erfolgte mittels Student's t-test oder ANOVA gefolgt vom Tukey post hoc Test. Die funktionellen Parameter wurden mittels Mann-Whitney U-Test verglichen. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert < 0,05 angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Sicherheit der Präkonditionierung

Zwei Versuchstiere wurden zu Beginn der Versuchsreihen mit einem anderen Präkonditionierungsmodell bei 3 Atmosphären über dem normalen Luftdruck behandelt. Eines dieser Tiere erlitt am 4. Präkonditionierungstag einen generalisierten Krampfanfall, so dass die Präkonditionierung abgebrochen werden musste. Das zweite der Tiere entwickelte am 2. Präkonditionierungstag ein Lungenödem und verstarb noch während des Druckablasses. Aufgrund dieser gravierenden Nebenwirkungen der hyperbaren Sauerstofftherapie bei 3 Atmosphären über dem normalen Luftdruck wurden alle darauf folgenden Versuche mit 2,5 bzw. 2 Atmosphären über dem normalen Luftdruck durchgeführt. Dabei beobachteten wir nur bei einem Tier der gesamten Versuchsreihe geringe und zunächst reversible Atemprobleme während der Präkonditionierung. Dieses Tier verstarb aber intraoperativ nach einem Atemstillstand. Weitere Nebenwirkungen wurden während und nach der Präkonditionierung nicht beobachtet. Die Tiere zeigten alle während der schrittweise vorgenommenen Druckerhöhung und noch kurze Zeit danach in der hyperbaren Kammer eine deutliche Antriebssteigerung mit Fluchtversuchen, vermehrtem Putzen und Kopfschütteln. Nach Gewöhnung an die veränderten Umgebungsbedingungen war bei allen Tieren eine überwiegende Lethargie mit gehäuften oromandibulären Bewegungen und Putzbewegungen bis zum Ende der Präkonditionierung zu beobachten.

4.2. Ausschluss und Letalität von Tieren.

Insgesamt 5 Tiere wurden nicht in die Bewertung aufgenommen. Zwei Tiere aus der anfänglichen Versuchsplanung mit 3 Atmosphären über normalem Luftdruck, bei denen gravierende Nebenwirkungen auftraten. Ein Tier, das intraoperativ verstarb und nicht ausgewertet werden konnte. Zwei Tiere, die postoperativ infolge einer Nahrungsverweigerung und Kachexie vor Beendigung des 4. Tages verstarben. Die Infarkt volumina wurden ausgewertet aber bei ungewöhnlich großen Infarktarealen nicht in die Auswertung mit einbezogen, da methodische Fehler vorlagen: bei einem Tier ein persistierender bilateraler Karotisverschluss und bei dem anderen eine zu weit proximale Okklusion vor Abgang der lentikulosträren Arterien.

4.3. Physiologische Parameter

Die physiologischen Parameter der Versuchsgruppen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen in den einzelnen untersuchten Parametern. Untersucht wurden präoperativ das Gewicht sowohl vor der Präkonditionierung als auch vor der Operation, intraoperativ der Blutdruck, die Temperatur, der Säure-Basen-Haushalt und die Blutglukosewerte sowie postoperativ die Temperatur, der Hämatokrit und die Blutglukosewerte.

Gruppe	Kontrollen	2 atm	2,5 atm	Sauerstoff	DMTU+HBO	DMTU
Anzahl	n=17	n=18	n=12	n=8	n=12	n=13
Prä- bzw. intraoperative Werte						
Gewicht [g]		291 ± 19	283 ± 19	283 ± 23	299 ± 22	302 ± 16
Gewicht [g]	302 ± 19	301 ± 28	315 ± 27	307 ± 27	288 ± 18	295 ± 22
Blutdruck [mmHg]	85 ± 15	89 ± 19	101 ± 18	89 ± 15	91 ± 12	89 ± 19
Temperatur [°C]	37,5 ± 0,4	37,5 ± 0,5	37,5 ± 0,3	37,5 ± 0,4	37,5 ± 0,5	37,5 ± 0,4
Glukose [mmol/l]	7,6 ± 1,4	7,8 ± 1,5	7,7 ± 1,2	6,6 ± 1,5	8,0 ± 2,3	6,3 ± 2,4
pH	7,364 ± 0,047	7,363 ± 0,053	7,337 ± 0,057	7,383 ± 0,048	7,390 ± 0,045	7,353 ± 0,059
pCO² [kPa]	52,45 ± 7,59	48,35 ± 7,75	48,81 ± 7,87	45,74 ± 8,28	53,61 ± 7,04	59,99 ± 9,60
pO² [kPa]	186,01 ± 29,18	201,38 ± 40,86	202,35 ± 21,92	189,02 ± 45,32	190,49 ± 21,87	178,98 ±
BE	2,7 ± 2,8	0,8 ± 2,4	2,2 ± 3,4	1,0 ± 2,4	5,8 ± 2,3	4,8 ± 2,5
Postoperative Werte						
Temperatur [°C]	37,5 ± 0,5	37,5 ± 0,6	37,5 ± 0,5	37,5 ± 0,6	37,5 ± 0,9	37,5 ± 0,6
Hämatokrit [%]	48 ± 6	50 ± 5	48 ± 4	48 ± 7	50 ± 5	51 ± 5
Glukose [mmol/l]	3,4 ± 0,6	3,6 ± 0,6	3,7 ± 0,4	3,9 ± 0,3	3,6 ± 0,8	3,3 ± 0,7

Tabelle 1: Physiologische Werte der einzelnen Versuchsgruppen; prä- bzw. intraoperativ: Gewicht vor Präkonditionierung und vor Operation, Blutdruck, Temperatur, Glukose, pH-Wert, Kohlendioxid- und Sauerstoffpartialdruck, Baseexzess sowie postoperativ: Temperatur, Hämatokrit, Glukose; Mittelwerte und Standardabweichung sind angegeben.

4.4. Operationsdauer und Narkosetiefe

Die Operationsdauer betrug 2 bis 3 Stunden (im Mittel 2,3 bis 2,9) ohne wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Dabei ließen sich die niedrigsten Narkosetiefen während der 1-stündigen Okklusionszeit verzeichnen. Zu Beginn und am Ende der Operationen wurde bedingt durch die Manipulationen am Tier eine höhere Narkosetiefe benötigt.

4.5. Funktionelle Beeinträchtigung

Alle Versuchstiere zeigten nach der Operation ein sehr geringes fokal-neurologisches Defizit mit einem Medianwert von 1 in allen Gruppen. Die Verteilung der Schweregrade ist in Abbildung 2 dargestellt. Eine statistische Signifikanz ließ sich bei dem Vergleich der Versuchsgruppen nicht nachweisen.

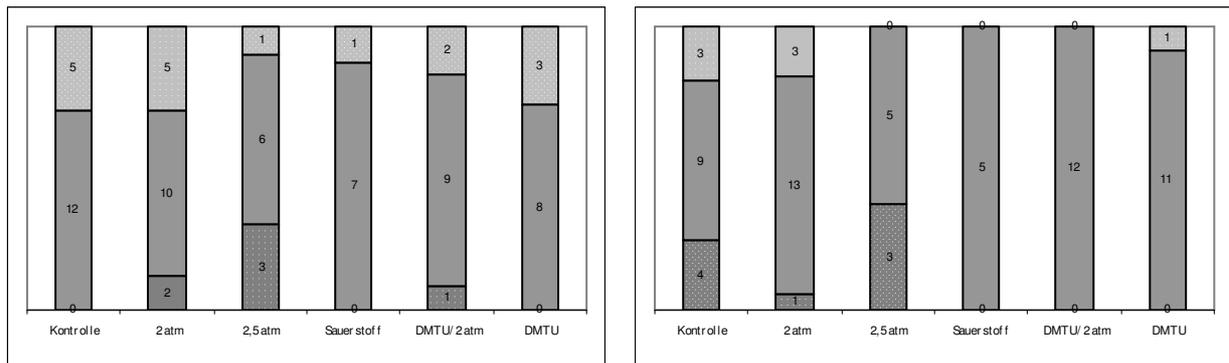


Abbildung 2: Säulendiagramme der funktionellen Beeinträchtigung, Schweregrade nach Bederson am ersten postoperativen Tag (rechts) und am vierten postoperativen Tag (links); Flächen: oben (hellgrau gepunktet) = Schweregrad 2, Mitte (mittelgrau) = Schweregrad 1, unten (dunkelgrau gepunktet) = Schweregrad 0.

4.6. Infarktmetrie

Bei der Auswertung der Infarktvolumina zeigten sich nach Färbung mit Vanadium Acid Fuchsin ganz überwiegend kortikale Infarkte. Bei insgesamt 12 Versuchstieren (5 Kontrollen, 5 präkonditionierte Tiere und je ein Tier in der mit DMTU-behandelten bzw. mit DMTU-behandelten und präkonditionierten Gruppe) ließen sich striatale Infarktanteile finden. Diese wurden in die Infarktvolumenmessung mit einbezogen.

Nach Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff zeigte sich in den beiden Versuchsgruppen ein signifikant geringeres Infarktvolumen. Dieser Effekt ließ sich durch die Vorbehandlung mit dem nichtenzymatischen Radikalfängers Dimethylthiourea (DMTU) antagonisieren. Dimethylthiourea selbst führte in der entsprechenden Kontrollgruppe zu keiner Veränderung des Infarktvolumens, insbesondere zu keiner Volumenzunahme. Zusätzlich wurde der Effekt von reinem Sauerstoff bei atmosphärischem Luftdruck beurteilt. Reiner Sauerstoff führte zu keiner Veränderung des Infarktvolumens, insbesondere zu keiner Volumenabnahme. Die Ergebnisse sind zusammengefasst in Abbildung 3 dargestellt.

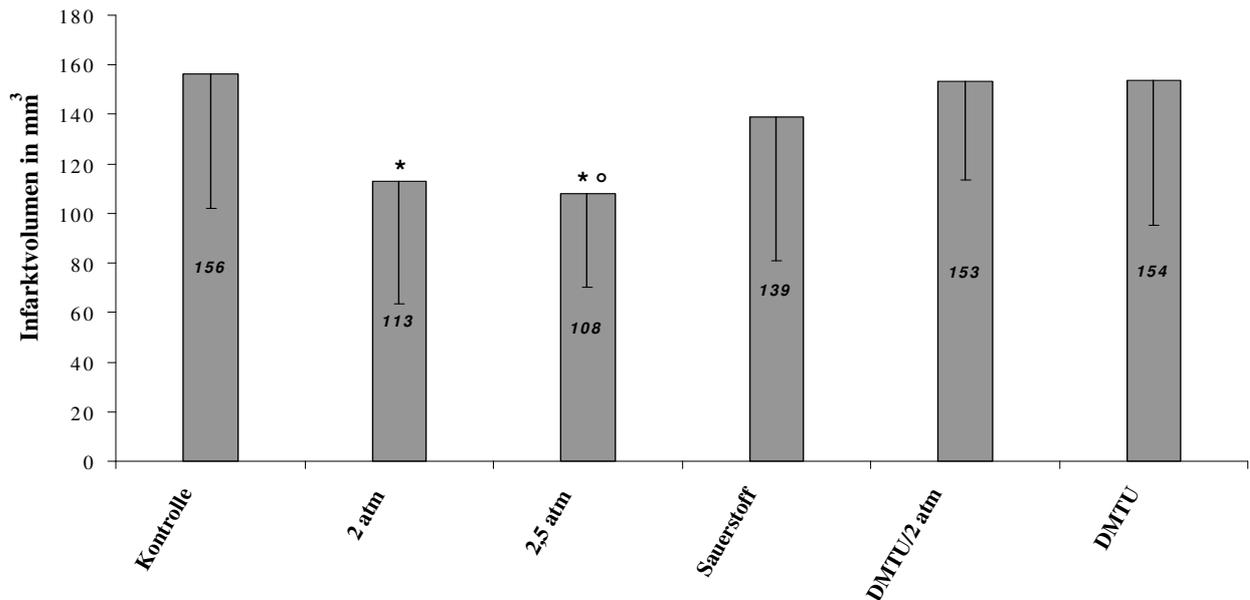


Abbildung 3: Infarkt volumina der einzelnen Versuchsgruppen (Kontrollen n=17, 2 atm n=18, 2,5 atm n= 12, Sauerstoff n=8, DMTU/2 atm n=12, DMTU n=13); dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. * p < 0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie im Vergleich zur mit DMTU vorbehandelten und mit 2 Atmosphären präkonditionierten Gruppe (DMTU/2 atm). o p < 0,05 im Vergleich zur mit DMTU-behandelten Gruppe.

4.6.1. Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff

Nach Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff an fünf aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils eine Stunde zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ein signifikant geringeres Infarktvolumen von 28 % in der mit 2 Atmosphären behandelten Gruppe und von 31 % in der mit 2,5 Atmosphären behandelten Gruppe ($113 \pm 50 \text{ mm}^3$ bzw. $108 \pm 38 \text{ mm}^3$ vs. $156 \pm 54 \text{ mm}^3$ in der Kontrollgruppe, $p < 0,05$). Ebenso zeigt sich eine signifikante Abnahme des Infarktvolumens dieser beiden Gruppen im Vergleich mit der hyperbar präkonditionierten und vorher mit dem Radikalfänger DMTU behandelten Gruppe ($113 \pm 50 \text{ mm}^3$ bzw. $108 \pm 38 \text{ mm}^3$ vs. $153 \pm 40 \text{ mm}^3$ in der Kontrollgruppe, $p < 0,05$) sowie der mit 2,5 Atmosphären präkonditionierten Gruppe im Vergleich zu den mit DMTU-behandelten Tieren ohne vorherige hyperbare Sauerstoffbehandlung ($108 \pm 38 \text{ mm}^3$ vs. $154 \pm 58 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$).

4.6.2. Reiner Sauerstoff bzw. Behandlung mit Dimethylthiourea

Die Behandlung mit reinem Sauerstoff unter atmosphärischen Luftdruck zeigte im Gegensatz zu den hyperbar präkonditionierten Tieren keinen Unterschied des Infarktvolumens im Vergleich zu den Kontrolltieren ($139 \pm 58 \text{ mm}^3$ bzw. $156 \pm 54 \text{ mm}^3$, $p = 0,48$). Tendenziell findet sich zwar im

Mittel ein geringeres Infarktvolume als bei den Kontrolltieren, eine statistische Signifikanz lässt sich hier aber bei Vergleich der Gruppen nicht finden.

Die mit Dimethylthiourea vor der hyperbaren Präkonditionierung behandelten Tiere zeigten ähnliche Infarktvolume wie die Kontrolltiere ($153 \pm 40 \text{ mm}^3$ bzw. $156 \pm 54 \text{ mm}^3$, $p = 0,87$). Die Infarktvolume der beiden DMTU-Gruppen war im Mittel nahezu gleich ($153 \pm 40 \text{ mm}^3$ und $154 \pm 58 \text{ mm}^3$, $p = 0,98$).

4.7. Messung freier Radikale

Mittels der indirekten Messung freier Radikale lässt sich ein Anstieg der Menge an Malondialdehyd im Gewebe der Tiere finden, die einmalig mit hyperbarem Sauerstoff behandelt wurden ($56 \pm 5 \text{ pMol/mg}$ vs. $44 \pm 5 \text{ pMol/mg}$, $p < 0,05$). Nach fünf Tagen sind die Werte wieder vergleichsweise zu den Kontrollen abgefallen ($49 \pm 6 \text{ pMol/mg}$ bzw. $44 \pm 5 \text{ pMol/mg}$, $p = 0,30$) (s. Abbildung 4).

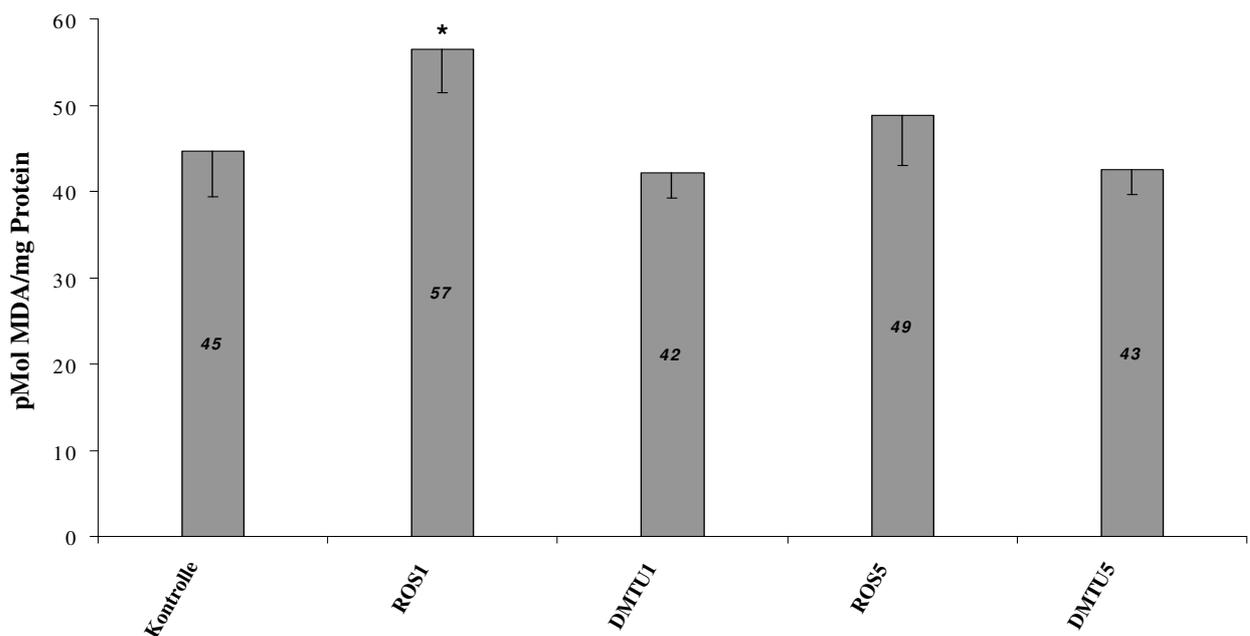


Abbildung 4: Freie Radikale gemessen anhand der Entstehung von Malondialdehyd (MDA) aus der Peroxidation freier Fettsäuren, Werte sind in pMol Malondialdehyd pro mg Protein angegeben; Kontrollen (n=4), ROS 1: über 1 Tag mit hyperbarem Sauerstoff behandelte Tiere (n=4), ROS 5: über 5 Tage mit hyperbarem Sauerstoff behandelte Tiere (n=5), DMTU1: über 1 Tag mit DMTU behandelte Tiere (n=3), DMTU5: über 5 Tage mit DMTU behandelte Tiere (n=3). * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe und $p < 0,01$ im Vergleich zur DMTU1-Gruppe.

Die Behandlung mit dem nichtenzymatischen Radikalfänger Dimethylthiourea lässt nach einem Tag und nach 5 Tagen keinen Anstieg der Radikalmenge im Gewebe erkennen. Die

Radikalmenge ist in beiden Gruppen nahezu gleich und ähnlich denen der Kontrollgruppe (42 ± 3 pMol/mg bzw. 44 ± 5 pMol/mg, $p = 0,48$ bzw. $0,14$ für die beiden DMTU-Gruppen). Der zeitliche Verlauf kann anhand dieser Daten nicht genauer beurteilt werden, da wir nur am Tag 1 und am Tag 5 untersuchten.

4.8. Enzymatische Radikalfänger

Die Messung enzymatischer Radikalfänger im Hirngewebe präkonditionierter Tiere ergab einen leichten Anstieg der Mangan-Superoxiddismutase und der Katalase. Die Kupfer/Zink-Superoxiddismutase zeigte keine Veränderung der Enzymaktivität im Vergleich zu den Kontrollen. Eine weitere Versuchsgruppe sollte auch hier den Effekt der Gabe von Dimethylthiourea beurteilen. Bezüglich der Mangan-Superoxiddismutase erfolgten hier keine Enzymaktivitätsbestimmungen, die Kupfer/Zink-Superoxiddismutase zeigte keine Veränderung und die Katalase einen deutlichen Anstieg der Enzymaktivität nach Gabe von Dimethylthiourea vor der hyperbaren Präkonditionierung (s. Tabelle 2). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen in den untersuchten Enzymaktivitäten.

Gruppe (n)	Kontrolle (5)	2 atm (3)	DMTU/2 atm(3)
Mn-SOD	100 ± 9	112 ± 25	n.d.
Cu/Zn-SOD	100 ± 6	96 ± 6	96 ± 18
Katalase	100 ± 34	113 ± 16	165 ± 36

Tabelle 2: Relative Aktivität enzymatischer Radikalfänger im Hirngewebe von Ratten, Enzymaktivitäten der Kontrollen entsprechen 100%; Kontrollen (n= 5), 2 atm (n=3), DMTU/2 atm (n=3).

4.9. Schädigung durch hyperbare Sauerstofftherapie?

Lichtmikroskopische Untersuchungen unterschiedlicher Gehirnregionen (Kortex, Striatum, Hippokampus, Kleinhirn und Medulla oblongata) hyperbar präkonditionierter Tiere ergaben keine Hinweise auf strukturelle Läsionen des Hirngewebes. Die Abbildung 5 zeigt ausgewählte Schnitte im Bereich des Hippokampus und des Kortex mit unterschiedlichen Färbungen und Vergrößerungen.

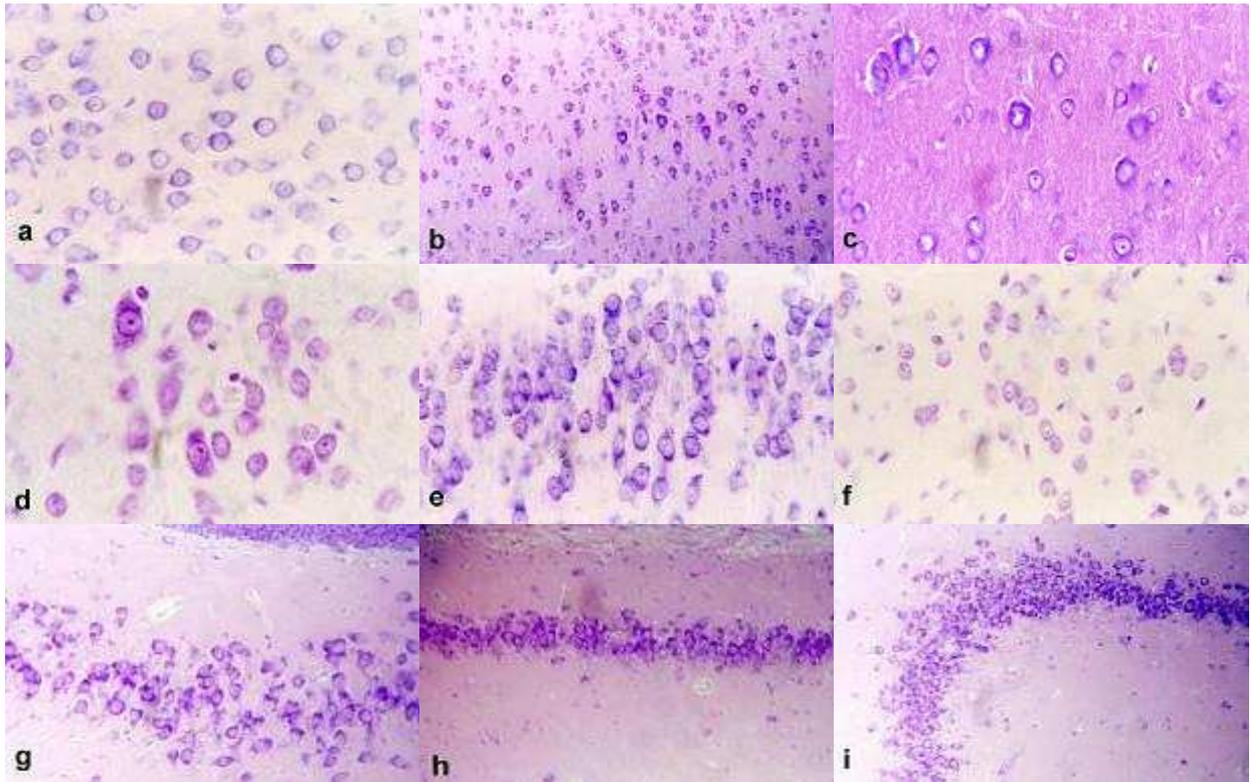


Abbildung 5: a) frontaler Kortex, tiefe Layer, HE-Färbung, 25fache Vergrößerung; b) Kortex in Höhe des Hippokampus, tiefe Layer, HE-Färbung, 10fache Vergrößerung; c) Kortex, tiefe Layer, VAF-Färbung, 25fache Vergrößerung; d) Kortex, Nissl-Färbung, 40fache Vergrößerung; e) Kortex, Layer 1 & 2, HE-Färbung, 25fache Vergrößerung; f) Striatum, Nissl-Färbung, 25fache Vergrößerung; g) Hippokampus in Höhe des Hilus und der Fa. dentata, HE-Färbung, 16fache Vergrößerung; h) Hippokampus, CA 1, HE-Färbung, 10fache Vergrößerung; i) Hippokampus CA 2/3, HE-Färbung, 10fache Vergrößerung.

5. Diskussion

Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff führte bereits im globalen Ischämiemodell zur Ischämietoleranz im Hippokampus von Wüstenrennmäusen (Wada 1996). In der vorliegenden Arbeit können wir erstmals zeigen, dass diese Form der endogenen Neuroprotektion auch im fokalen Ischämiemodell bei permanenter zerebraler Ischämie der Ratte existiert.

Als Grundlage der nun folgenden Diskussion fasse ich die Ergebnisse dieser Arbeit nochmals zusammen:

- (1) Die Präkonditionierung der Wistar-Ratte mit hyperbarem Sauerstoff an 5 aufeinanderfolgenden Tagen führt zu einer Reduktion des Infarktvolumens um ca. 30 %.
- (2) Dabei ist am 1. Tag der Präkonditionierung ein Anstieg freier Radikale zu beobachten, der am 5. Tag der Präkonditionierung wieder auf Normalwerte abgefallen war.
- (3) Der Effekt der Präkonditionierung wird durch die Gabe des Radikalfängers Dimethylthiourea aufgehoben. Dimethylthiourea führt zu keinen größeren Infarktvolumina.
- (4) Es fanden sich keine Hinweise auf eine strukturelle Schädigung des Gehirns nach 5-tägiger hyperbarer Sauerstofftherapie bei 2 bzw. 2,5 Atmosphären bei unbehandelten Tieren.
- (5) Als Trend finden sich am Tag 5 der Präkonditionierung erhöhte Enzymaktivitäten der Mangan-Superoxiddismutase und der Katalase.

Der präkonditionierende Effekt von hyperbarem Sauerstoff (bezogen auf die Infarktgröße und funktionelles Outcome) wurde tierexperimentell auch in weiteren Studien untersucht. Dabei wurden sowohl unterschiedliche Spezies genutzt, als auch verschiedene Ischämie Modelle angewandt. Mehrere Studien untersuchten zusätzlich den Effekt bei Anwendung unmittelbar nach fokaler zerebraler Ischämie im Tierexperiment.

Unsere eigene Arbeitsgruppe konnte bei SV129-Mäusen eine Präkonditionierung durch hyperbare Sauerstofftherapie in einem fokalen Ischämie Modell bei permanenter zerebraler Ischämie zeigen (Prass 2000). Im Gegensatz dazu fand sich jedoch bei transienter zerebraler Ischämie der SV129-Mäusen keine Reduktion des Infarktvolumens nach Präkonditionierung mit

hyperbarem Sauerstoff. Ebenso ließ sich bei C57BL/6-Mäusen weder bei der permanenten, noch bei der transienten fokalen zerebralen Ischämie eine Infarktvolumenreduktion nachweisen. Im letztgenannten Mäuse-Stamm wurden verschiedene Ischämiezeiten und Präkonditionierungsprotokolle von uns untersucht, die keine anderen Ergebnisse erbrachten.

Xiong und Mitarbeiter zeigten eine Infarktvolumenreduktion und Besserung des neurologischen Defizits bei Ratten, die nach 3 bzw. 5 Tagen Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff einer transienten fokalen zerebralen Ischämie unterzogen wurden. Hingegen zeigte sich bei permanenter fokaler Ischämie kein Effekt auf das Infarktvolumen und das neurologische Defizit (Xiong 2000). Diese Arbeitsgruppe untersuchte weiter die Abhängigkeit des Effektes von der Anzahl der Tage der hyperbaren Präkonditionierung. Es stellte sich heraus, dass die Therapie über 5 Tage wirksamer war, als eine Therapie über 3 Tage.

Ostrowski und Kollegen untersuchten den präkonditionierenden Effekt von hyperbarem Sauerstoff in einem globalen Ischämiemodell bei Ratten. Sie fanden heraus, dass die Präkonditionierung in ihrem Modell ebenso zur Ischämietoleranz führt. Darüber hinaus fand sich eine funktionelle Verbesserung und eine geringere Mortalität der Tiere (Ostrowski 2007).

Ebenfalls in einem globalen Ischämiemodell zeigten Hirata und Kollegen eine Toleranzentwicklung durch Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff. Interessanterweise wandten diese genau dasselbe Präkonditionierungsprotokoll wie wir an und untersuchten die Neuronendichte im Hippokampus nach unterschiedlichen Intervallen zwischen Präkonditionierung und schädigender Ischämie. Es fand sich ein Maximum der Ischämietoleranz bei einem Intervall von 12 Stunden. Bei einem Intervall von 72 Stunden hingegen fand sich kein Effekt mehr (Hirata 2007).

Eine Studie bei der spinalen Ischämie bei Kaninchen zeigte, dass sowohl ein geringeres neurologisches Defizit als auch eine größere Anzahl normaler spinaler Neurone nach vorheriger Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff zu finden sind. Zusätzlich wurde in dieser Studie gezeigt, dass kein solcher Effekt bei hyperbarer Behandlung unter normalem Sauerstoffgehalt vorhanden ist (Dong 2002).

Bei der postischämischen Anwendung von hyperbarem Sauerstoff bei transientser fokaler zerebraler Ischämie der Ratte, zeigt sich eine Reduktion des Infarktvolumens und eine Verbesserung des funktionellen Outcomes. Diese Wirkung existiert bei Exposition 3 bzw. 6 Stunden nach Beginn der Reperfusionischämie. Bei Anwendung später als 6 Stunden nach dem ischämischen Ereignis und Reperfusion konnte keine Wirkung mehr nachgewiesen werden. Eine Wirksamkeit bei permanenter fokaler zerebraler Ischämie fand sich überhaupt nicht (Lou 2004;

Badr 2001).

In einer anderen tierexperimentellen Studie konnte hingegen mittels Magnetresonanztomographie gezeigt werden, dass die postischämische Anwendung von hyperbarem Sauerstoff auch in einem permanenten Ischämiemodell die Infarktgröße reduziert und das funktionelle Outcome verbessert (Schäbitz 2004).

Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte den Effekt von normo- und hyperbarem Sauerstoff nach permanenter fokaler zerebraler Ischämie von Mäusen (Veltkamp 2006). Dabei wurden zwei unterschiedliche Techniken zur Ischämieerzeugung genutzt. Im Ergebnis führte hyperbarer, geringer auch normobarer Sauerstoff zwar zur Infarktvolumenreduktion bei lokaler Koagulation der A. cerebri media. Bei Verschluss der A. cerebri media durch ein Fadenmodell zeigte sich jedoch kein Effekt in diesem permanenten Ischämiemodell. Daraufhin wurde in einer Versuchsgruppe eine Reperfusion durchgeführt, die wieder zur Infarktvolumenreduktion führte. Die Autoren diskutierten schlussfolgernd, dass der Unterschied durch die unterschiedlichen Techniken (Astverschluss versus kompletter Verschluss der A. cerebri media) zu erklären sein kann. Kritisch anzumerken ist jedoch, dass unterschiedliche Endpunkte (7 Tage versus 24 Stunden) zur Infarktvolumenmessung in den beiden Ischämie modellen angewandt wurden.

Zusammengefasst ist den obigen Untersuchungen und unseren Ergebnissen folgend zu vermuten, dass hyperbarer Sauerstoff durchaus zur Ischämietoleranz führt. Diese kann nach bisheriger Studienlage sowohl durch hyperbaren Sauerstoff als präkonditionierender Stimulus, als auch bei Anwendung nach der Ischämie mit einem Zeitfenster von maximal 6 Stunden hervorgerufen werden. Dieser Effekt scheint aber bisher nur inkonstant und eher gering ausgeprägt zu sein. Er scheint darüber hinaus von vielen unterschiedlichen Faktoren (z.B. Spezies und Rasse, Ischämiemodell, Dauer und Intensität der Präkonditionierung, Intervall zur schädigenden Ischämie) beeinflusst zu werden.

Weitere unterschiedliche Präkonditionierungsintervalle und Veränderungen der Präkonditionierungsdauer sowie -parameter wurden weder von uns, noch von anderen Arbeitsgruppen untersucht. Ebenso findet sich derzeit keine weitere Literatur zum Einfluss unterschiedlicher Ischämie Modelle und unterschiedlicher Intervalle zwischen Präkonditionierung und schädigender Ischämie. Weiterführende Studien unter Beachtung dieser Aspekte könnten eine Optimierung des Konzeptes der Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff mit sich bringen.

Da es sich bei der hyperbaren Sauerstoffbehandlung – im Vergleich zu anderen Modellen - um eine milde Form des präkonditionierenden Stresses handelt und die Wirksamkeit ausreichend gut belegt ist, stellte sich uns die Frage der zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen. Wie lässt sich die Entstehung der Ischämietoleranz bei hyperbarer Sauerstofftherapie erklären? Spielt oxidativer Stress eine Rolle und welche weiteren Transduktoren bzw. Effektoren der Ischämietoleranz lassen sich möglicherweise finden?

Hyperbarer Sauerstoff führt zu einem Anstieg freier Sauerstoffradikale (Yusa 1987). Jerret beschrieb bereits 1973 die vermehrte Bildung von Hydrogenperoxid bei Exposition mit hyperbarem Sauerstoff (Jerrett 1973). Piantadosi und Tatro bestimmten die Hydrogenperoxidkonzentration in unterschiedlichen Hirnregionen nach Exposition mit hyperbarem Sauerstoff anhand der Katalase-Aktivität und fanden einen Anstieg der Hydrogenperoxidformation als Ausdruck vermehrt entstehender freier Radikale (Superoxid-Radikal) bei exponierten Ratten (Piantadosi und Tatro 1990). Oter und Kollegen untersuchten den Effekt von hyperbarem Sauerstoff in unterschiedlichen Geweben. In der Lunge, in Erythrozyten und im Gehirn fand sich ein Anstieg von Thiobarbiturat-Reaktionsprodukten bereits bei 100% Sauerstoff unter atmosphärischem Luftdruck und darauffolgend bei bis zu 3 Atmosphären ansteigenden Druckwerten. Vermehrte Thiobarbitursäure-Reaktionsprodukte als Marker für freie Radikale fanden sich auch bei hyperbaren Bedingungen (3 Atmosphären) und Raumluft im Gehirn. Zusätzlich fand sich ein Anstieg der Aktivität der Superoxiddismutase in allen 3 Geweben unter hyperbarem Sauerstoff (Oter 2005). In den folgenden Studien zeigte die Arbeitsgruppe weiter, dass diese Effekte von hyperbarem Sauerstoff in Abhängigkeit zur Expositionsdauer stehen (Oter 2007, Korkmaz 2008).

Dass hyperbarer Sauerstoff zur Bildung freier Radikale führt, ließ sich auch in unseren Versuchen bestätigen: bereits am Tag 1 der Präkonditionierung zeigte sich ein deutlicher Anstieg des Malondialdehydgehalts, der dann am Tag 5 der hyperbaren Sauerstoffbehandlung wieder nahezu auf Normalwerte abgefallen war. Möglicherweise findet sich ein Maximum des Anstiegs zwischen dem ersten und dem fünften Präkonditionierungstag. Auch hier existieren bisher leider keine Untersuchungen zum genauen zeitlichen Verlauf des Anstiegs freier Radikale. Ebenso fanden sich in der Literatur keine ausführlichen Angaben zur entstehenden Menge freier Radikale bei Anwendung unterschiedlicher Präkonditionierungsprotokolle (z.B. Variationen des Drucks, der Zeit und der Frequenz). Nur die oben bereits angeführte Untersuchung von Korkmaz zeigte einen Einfluss der Expositionsdauer auf die Menge entstehender freier Radikale und antioxidativer Enzyme (Anstieg der Superoxiddismutase).

Als weiterer Schritt wurde auch von uns die antioxidative Kapazität nach der Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstofftherapie untersucht. Es fand sich in unseren Versuchen, leider nur als Trend, eine vermehrte Aktivität der Mangan-Superoxiddismutase und Katalase bei den präkonditionierten Tieren. Die Relevanz dieser beiden Enzyme in der Entstehung der Ischämietoleranz in unserem Modell und der zeitliche Verlauf veränderter Enzymaktivitäten sind aber noch vollkommen unklar. Zur genaueren Beurteilung wären hier ebenfalls weitere Untersuchungen notwendig. Die Aktivität der Kupfer/Zink-Superoxiddismutase hingegen wurde durch hyperbaren Sauerstoff in unserem Modell nicht beeinflusst.

Ähnliche Ergebnisse konnte auch die Arbeitsgruppe von Wada zeigen. Sie fanden nach Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff nur eine veränderte Expression der Mangan-Superoxiddismutase in ihrem globalen Ischämiemodell (Wada 2000). In der fokalen zerebralen Ischämie steht dieser Nachweis bisher aus.

Weitere Hinweise auf eine Veränderung antioxidativer Mechanismen nach hyperbarer Sauerstofftherapie ergeben sich aus anderen Organen bzw. Geweben: In einem Modell der spinalen Ischämie bei Hasen fand sich nach Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff eine verstärkte Aktivität der Katalase und Superoxiddismutase (Nie 2005). Bei myokardialer Ischämie von Ratten wurde eine erhöhte Genexpression und Enzymaktivität der Katalase nach Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff nachgewiesen (Kim 2001). In beiden Versuchen konnte der Effekt durch einen Katalase-Inhibitor und bei dem spinalen Ischämiemodell zusätzlich durch Gabe von Dimethylthiourea, einem unspezifischen Radikalfänger antagonisiert werden. Insgesamt könnten unsere und die Ergebnisse anderer Versuchsgruppen somit auf die mögliche Funktion antioxidativer Enzyme als ein weiterer Schritt der Signalübertragung in der Entstehung einer Ischämietoleranz hinweisen.

Die wichtige Funktion freier Radikale und antioxidativer Mechanismen bei der Toleranzentstehung bei zerebraler Ischämie wird auch durch weitere Präkonditionierungsversuche unterstützt. Weisbrot-Lefkowitz und Mitarbeiter konnten in einem Reperfuisionsmodell bei transgenen Mäusen, die die intrazelluläre Gluthationperoxidase überexprimieren zeigen, dass eine Ischämietoleranz entsteht. Dabei wurden zudem ein verminderter nekrotischer sowie apoptotischer Zelltod und eine verminderte Gliaaktivierung beobachtet (Weisbrot-Lefkowitz 1998, Ishibashi 2002). Durch eine exogene, speziell konjugierte Superoxiddismutase und durch die vermehrte Expression dieses enzymatischen Radikalfängers in transgenen Mäusen lässt sich ebenso bei transientser fokaler zerebraler Ischämie

(Reperfusionischämie) eine Neuroprotektion im Tierexperiment erreichen (Chan 1996). Bei permanenter fokaler zerebraler Ischämie hingegen konnte kein neuroprotektiver Effekt der Kupfer-Zink-Superoxiddismutase nachgewiesen werden (Chan 1996; Fujimura 2001). Warner schlussfolgerte in einem Review-Artikel, dass die Kupfer-Zink-Superoxiddismutase eher eine Rolle in der Reperfusionischämie zu spielen scheint, was auch den fehlenden Anstieg der Enzymaktivität in unseren Versuchen erklären kann (Warner 2004). Demgegenüber scheint die Mangan-Superoxiddismutase sowohl eine Rolle in der Reperfusion- (Kim 2002) als auch in der permanenten fokalen zerebralen Ischämie (Murakimi 1998) zu spielen.

Weiter unterstützt wird diese Rolle des oxidativen Stresses in der Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie und der Entstehung einer Ischämietoleranz durch Versuche an Knockout-Tieren. Bei Fehlen genetischer Informationen zur Bildung der Superoxiddismutasen kommt es zur Infarktvergrößerung und Verschlechterung des neurologischen Defizits (Mikawa 1995, Kondo 1997). Auch hier scheint bzgl. der Kupfer-Zink-Superoxiddismutase die Reperfusionischämie eine entscheidende Voraussetzung zu sein, da der Effekt im permanenten fokalen zerebralen Ischämiemodell nicht nachweisbar ist (Fujimura 2001).

Fujimura et al. konnten weiter zeigen, dass die zytosolische Kupfer-Zink-Superoxiddismutase eine Rolle bei der Membranpermeabilität der Mitochondrienmembran für Zytochrom C, das seinerseits als Aktivator der intrinsischen Signalgebung der Apoptose wirkt, bei der Reperfusionischämie zu spielen scheint (Fujimura 2000). Existieren möglicherweise ähnliche Interaktionen für andere Antioxidantien bzw. besteht eine Interaktion zwischen freien Radikalen und der Apoptose und finden sich diese Phänomene auch bei fehlender Reperfusion?

Auf der Ebene der Antioxidantien konnte Fujimuras Arbeitsgruppe bei transienter (Noshita 2001) und permanenter (Fujimura 1999) fokaler zerebraler Ischämie bei knockout-Mäusen, denen das Gen für die Mangan-Superoxiddismutase fehlte, eine vermehrte Freisetzung von Zytochrom C und konsekutiv verstärkte DNA-Fragmentierung bzw. Kaspase 9-Inaktivierung nachweisen. Dementsprechend scheint auch die Mangan-Superoxiddismutase im transienten und permanenten Ischämiemodell die Zytochrom C-Freisetzung in das Zytosol und damit die Apoptose zu regulieren. In kultivierten Neuronen transgener Mäuse und in der Leber von transgenen Tieren selbst wurde nachgewiesen, dass eine vermehrte Expression der Gluthationperoxidase zur verminderten Aktivierung der Kaspase 3 und zur Inhibition der Apoptose führt (Ran 2004 und 2006). Dabei scheint vorhergehend auch die veränderte Freisetzung von Zytochrom C eine Rolle zu spielen (Ran 2004). Die enzymatischen Radikalfänger Kupfer-Zink- und Mangan-Superoxiddismutase sowie die Gluthationperoxidase

scheinen demzufolge einen regulierenden Einfluss über die veränderte Zytochrom C-Freisetzung bei der intrinsischen Aktivierung der Apoptose zu haben.

Auf der Ebene nichtenzymatischer möglicher Interaktionen konnte für Peroxynitrit gezeigt werden, dass es in geringer Konzentration einen neuroprotektiven Effekt über die Veränderung an den Todesrezeptoren bei der extrinsischen Aktivierung der Apoptose ausübt (Bolanos 2004). In einem Modell der traumatischen Hirnschädigung hingegen fanden sich Hinweise auf eine Kaspase-3-Inhibierung durch direkte chemische Veränderung an der Protease (Lau 2006).

Inwiefern es durch Präkonditionierung mit hyperbarem Sauerstoff durch die erhöhte Aktivität der Mangan-Superoxiddismutase und Katalase zur möglichen Inhibition der intrinsischen Aktivierung der Apoptose kommt ist von uns nicht untersucht worden. Hingegen beschäftigten sich Wada und Mitarbeiter in ihrem globalen Ischämiemodell der Wüstenrennmaus etwas ausführlicher mit den zugrunde liegenden Mechanismen der Ischämietoleranz nach hyperbarer Präkonditionierung. Sie fanden nach der Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff nicht nur einen Anstieg der Immunreaktivität für die Mangan-Superoxiddismutase sondern zusätzlich eine vermehrte Expression des antiapoptotischen Gens Bcl-2 (Wada 2000 und 2001). Weitere Untersuchungen zur möglicherweise veränderten Expression der Bcl-Genfamilie nach hyperbarer Sauerstoff-Präkonditionierung und daraus eventuell resultierenden Veränderungen der Signalkaskade bei zerebraler Ischämie fanden sich in der Literatur nicht. Eine aktuelle Studie untersuchte aber die Wirkung von hyperbarem Sauerstoff auf diese Gene bei postischämischer Anwendung. Sie fanden eine vermehrte Expression von Bcl-2 im Hippokampus von Ratten nach fokaler zerebraler Ischämie (Huang 2007). Zusätzlich fand sich eine verminderte Expression der HIF-1 alpha-Untereinheit, die in der Regulation von Transkriptionsvorgängen verschiedener Enzyme eine Rolle spielt. Andere Arbeitsgruppen konnten in Zelllinien zeigen, dass Bcl-2 und Bcl-x ähnlich den Superoxiddismutasen einen regulierenden Einfluss auf die Apoptose-Aktivierung ausüben (Yang 1997, Rosse 1998). Dabei scheint die Apoptose-inhibierende Wirkung des Bcl-x durch direkte Bindung an Zytochrom C im Mitochondrium (Kharbanda 1997) und des Bcl-2 durch Veränderungen an einem für Zytochrom C durchlässigen Ionenkanal der Mitochondrien (Marzo 1998) zu entstehen. Ein weiterer Effekt von hyperbarem Sauerstoff hinsichtlich der Beeinflussung apoptotischer Vorgänge bei globaler zerebraler Ischämie wurde von Ostrowski und Mitarbeitern untersucht. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es zu einer verminderten p38-Immunreaktivität und erhöhter Expression von BDNF kommt. Zusätzlich fanden sie Hinweise auf eine Beeinflussung früher apoptotischer Vorgänge (Ostrowski 2007).

Aus den oben genannten Erkenntnissen leitet sich die Frage her, ob die Beeinflussung apoptotischer Vorgänge der oder ein möglicher gemeinsamer Endweg neuroprotektiver Mechanismen sein könnte? Fungiert z.B. oxidativer Stress als die oder eine mögliche Schaltstelle zwischen Zelltod und Überleben der Zelle bei der Apoptose-Aktivierung? Diese Fragen bleiben zunächst noch unbeantwortet. Da aber die Entstehung einer Ischämietoleranz bzw. die Neuroprotektion vor allem in der Penumbra eine große Rolle spielt, ist es sehr gut möglich, dass Neuroprotektion durch Apoptose-regulierende Mechanismen hervorgerufen wird.

Li und Mitarbeiter untersuchten nämlich den zeitlichen Verlauf apoptotischer Vorgänge nach transienter fokaler Ischämie der Ratte und fanden dabei heraus, dass in der Grenzzone des ischämischen Infarktes eine vermehrte DNA-Fragmentierung und zunehmende Anzahl apoptotischer Zellen bereits ½ Stunde nach dem Infarkt, mit einem Maximum bei 24 bis 48 Stunden und dann anhaltend bis zu 4 Wochen auftritt. Dabei handelte es sich in der überwiegenden Anzahl um apoptotische Neuronen, geringer um Astrozyten und Endothelzellen (Li 1995). Auch die der Apoptose vorausgehende Kaspase-Aktivierung ist in der Literatur ausreichend für die zerebrale Ischämie belegt (Benchoua 2001). Dabei spielen sowohl die ex- und intrinsische Kaspase-Aktivierung als auch Kaspase-unabhängige Signalkaskaden eine Rolle (Ferrer 2003). Bei der ex- und intrinsischen Kaspase-Aktivierung kommt der Kaspase 3 eine entscheidende Rolle zu, deren vermehrte Expression zu größeren Infarktvolumina führt und deren Inhibition zur Infarktvolumenreduktion führt (Kerr 2004; Endres 1998). In einem Präkonditionierungsmodell konnte gezeigt werden, dass der Kaspase 3 eine zentrale Rolle in der Induktion der Ischämietoleranz in diesem Modell zukommt und das darüber hinaus die Aktivierung der Kaspase 3 durch einen Radikalfänger aufgehoben wurde (McLaughlin 2003). Freie Radikale und die antioxidative Kapazität einer Zelle könnten eine solche Regulatorfunktion in den Signalkaskaden des Zelltodes innehaben. Versuche mit transgenen Tieren erhärten diese Vermutung, da es bei Superoxiddismutase-überexprimierenden Tieren zu einem Schutz durch Beeinflussung der Kaspase-Aktivierung und bei Superoxiddismutase-defizienten Tieren zu einer Verstärkung des ischämischen Schadens kommt. (Sugawara 2002; Murakami 1998).

Abschließend möchte ich festhalten, dass freie Radikale und antioxidative Mechanismen nicht nur in unseren Untersuchungen eine Schlüsselfunktion in der Erzeugung der Ischämietoleranz innehaben. Welche weiteren Signalwege, Gene und Genprodukte und letztendlich Effektoren jedoch in der Toleranzentstehung eine Rolle spielen ist weiter nur inkomplett entschlüsselt. Anhand unserer Daten und der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen scheint die weitere Forschung

auf dem Gebiet der Ischämietoleranz durch Präkonditionierung im Hinblick auf eine effiziente Neuroprotektion sehr sinnvoll. Neuroprotektive Therapien sind trotz bisheriger klinischer Misserfolge weiter ein vielversprechendes Konzept der Zukunft. Grundlage dieser Therapien ist die fortgehende Untersuchung der Pathomechanismen der zerebralen Ischämie sowie die genauere Charakterisierung protektiver und destruktiver Prozesse. Obwohl bereits deutliche Fortschritte in den letzten Dekaden zu verzeichnen sind, bleibt die Pathophysiologie der zerebralen Ischämie ein komplexer Prozess, der weiterer Forschung zur Aufdeckung der Signalkaskaden bedarf. Das Verständnis von Zelltod und Überleben der Zelle setzt die Dechiffrierung der letztendlich zur Neuroprotektion führenden intrazellulären Signale und Signalwege voraus. Gelingt es diese exakter zu charakterisieren, gelingt es uns hoffentlich in der Zukunft effektivere Therapien für Hirninfarktpatienten zu entwickeln.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die effektive Behandlung von Hirninfarktpatienten bereits vor oder während des Akutereignisses hat entscheidenden Einfluss auf die Prognose der Patienten. Vor dem klinischen Hintergrund, dass die frühzeitige Behandlung des Hirninfarktes limitiert ist, wurden in den letzten Jahrzehnten die Pathomechanismen der zerebralen Ischämie sowie neuroprotektive Mechanismen intensiv erforscht.

In dieser Arbeit wurde tierexperimentell untersucht, ob eine hyperbare Sauerstofftherapie im fokalen zerebralen Ischämiemodell eine Ischämietoleranz hervorruft und was die zugrundeliegenden Mechanismen sind. Deshalb wurden Wistar-Ratten einer permanenten fokalen zerebralen Ischämie unterzogen, nachdem sie an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit hyperbarem Sauerstoff präkonditioniert wurden. Verglichen wurden dabei unbehandelte Kontrollen und hyperbar präkonditionierte Tiere. Weiter beurteilt wurde der Effekt von reinem Sauerstoff und der Effekt des nichtenzymatischen Radikalfängers Dimethylthiourea. Ausgewertet wurden das Infarktvolumen, die Entstehung freier Radikale und das Verhalten enzymatischer Radikalfänger. Als Ergebnis fand sich eine ca. 30%ige Reduktion des Infarktvolumens bei den hyperbar präkonditionierten Tieren. Zusätzlich kam es zu einem Anstieg freier Radikale im Hirngewebe der präkonditionierten Tiere und zu einem tendenziellen Anstieg der enzymatischen Radikalfänger Mangan-Superoxiddismutase und Katalase. Dieser Effekt konnte durch den nichtenzymatischen Radikalfänger komplett aufgehoben werden, was für die entscheidende Rolle der freien Radikale in diesem Modell spricht. Eine Schädigung durch hyperbare Sauerstofftherapie im Hirngewebe unbehandelter Ratten fand sich nicht.

Wir konnten somit in diesem Tiermodell der fokalen zerebralen Ischämie erstmals zeigen, dass die Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff zur vermehrten Bildung freier Radikale führt. Über weitere, uns bisher noch unbekannte Mechanismen kommt es initiiert durch den oxidativen Stress zur Ischämietoleranz und damit Neuroprotektion in diesem Modell. In Zusammenschau unserer Ergebnisse und der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen spielen hier außer oxidativem Stress vermutlich weitere Signalgeber und Signalwege eine Rolle. Vorstellbar ist, dass durch verschiedene Mechanismen ein gemeinsamer Endweg aktiviert wird, der zur Neuroprotektion führt. Möglicherweise spielen hier apoptose-regulierende Vorgänge gefolgt von einer Inhibition apoptotischer Vorgänge, vor allem in der Penumbra der zerebralen Ischämie, eine wichtige Rolle. Die weitere Erforschung dieser komplexen Kaskade von Ereignissen, die zur Ischämietoleranz und Neuroprotektion führen, ist eine Herausforderung für die Zukunft.

7. Literaturverzeichnis

Aebi H: Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **1984**;105: 121-126.

Aebi, H: Catalase in: Bergmeyer, H. U (Ed.): *Methods of enzymatic analysis*, 3. Edition, Band 3, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1986**; 273-286.

Al-Waili NS, Butler GJ, Beale J, et al.: Hyperbaric oxygen in the treatment of patients with cerebral stroke, brain trauma, and neurologic disease. *Adv Ther.* **2005**; 22(6):659-678.

M. Astrup J, Symon L, Branston NM: Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* **1977**; 8: 51-57.

Badr AE, Yin W, Mychaskiw G, Zhang J H: Dual effect of HBO on cerebral infarction in MCAO rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **2001**; 280: R766–R770.

Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H: Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke.* **1986**; 17(3): 472-476.

Benchoua A, Guegan C, Couriaud C, et al.: Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci.* **2001**; 21(18):7127-7134.

Bolann BJ, Ulvik RJ: Improvement of a direct spectrophotometric assay for routine determination of superoxide dismutase activity. *Clin Chem.* **1991**; 37(11): 1993-1999.

Bolann BJ, Tangeras A, Ulvik RJ: Determination of manganese superoxide dismutase activity by direct spectrophotometry. *Free Radic Res.* **1996**; 25(6): 541-546.

Bordet R, Deplanque D, Maboudou P, et al.: Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *J Cerebr Blood Flow Metabol.* **2000**; 20: 1190-1196.

Bougousslavsky J, van Melle G, Regli F: The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1000 consecutive patients with first stroke. *Stroke* **1988**; 19: 1083-1092

Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **1976**; 72: 248-254.

Brambrink AM, Koerner IP, Diehl K, Strobel G, Noppens R, Kempinski O: The antibiotic erythromycin induces tolerance against transient global cerebral ischemia in rats (pharmacologic preconditioning). *Anesthesiology.* **2006**;104(6):1208-1215.

Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, Tanabe J, Pulsinelli W: Focal brain ischemia in the rat. Methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J. Cerebr. Blood Flow Metabol.* **1988**; 8: 474-485.

Brown RD Jr, Petty GW, O'Fallon WM, Wiebers DO, Whisnant JP: Incidence of transient ischemic attack in Rochester, Minnesota, 1985-1989. *Stroke.* **1998**; 29(10): 2109-13.

Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD: A Model of Focal Ischemic Stroke in the Rat: Reproducible Extensive Cortical Infarction. *Stroke* **1986**; 17: 738-743.

Chopp M, Chen H, Ho KL: Transient hyperthermia protect against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat. *Neurology.* **1989**; 39: 1396-1398.

Dennis M, Bamford J, Sandercock P, Warlow C: Prognosis of transient ischemic attacks in the Oxfordshire Community Stroke Project. *Stroke* **1990**; 21: 848-853.

Dong H, Xiong L, Zhu Z, Chen S, Hou L, Sakabe T: Preconditioning with hyperbaric oxygen and hyperoxia induces tolerance against spinal cord ischemia in rabbits. *Anesthesiology* **2002**; 96 (4):907-912.

Dreier JP, Woitzik J, Fabricius M, et al.: Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations. *Brain* **2006**; 129(12): 3224-3237.

Ebinger M, De Silva DA, Christensen S, et al.: Imaging the penumbra - strategies to detect tissue at risk after ischemic stroke. *J Clin Neurosci.* **2009**; 16(2): 178-87.

Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, et al.: Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* **1998**; 18: 238-247.

Fabricius M, Fuhr S, Bhatia R, et al.: Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. *Brain*. **2006**; 129(3): 778-790.

Ferrer I, Planas AM: Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol*. **2003**; 62(4):329-339.

Giles MF, Rothwell PM: Transient ischaemic attack: clinical relevance, risk prediction and urgency of secondary prevention. *Curr Opin Neurol*. **2009**; 22(1): 46-53.

Ginsberg MD: Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke*. **2003**; 34(1): 214-223.

Gladstone DJ, Black SE, Hakim AM: Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke*. **2002**; 33(8): 2123-2136.

Gorgias N, Maidatsi P, Tsolaki M, et al.: Hypoxic pretreatment protects against neuronal damage of the rat hippocampus induced by severe hypoxia. *Brain Res*. **1996**; 714(1-2): 215-25.

Harris RJ, Symon L: Extracellular pH, potassium, and calcium activities in progressive ischemia of rat cortex. *J. Cerebr. Blood Flow Metabol*. **1984**; 4: 178-186.

Huang ZX, Kang ZM, Gu GJ, et al.: Therapeutic effects of hyperbaric oxygen in a rat model of endothelin-1-induced focal cerebral ischemia. *Brain Res*. **2007**; 1153: 204-213.

Jerrett SA, Jefferson D, Mengel CE: Seizures, H₂O₂ formation and lipid peroxides in brain during exposure to oxygen under high pressure. *Aerosp Med*. **1973**; 44(1):40-44.

Johnston SC, Gress DR, Browner WS, Sidney S: Short-term prognosis after emergency department diagnosis of TIA. *JAMA* **2000**; 284: 2901–2906

Jones TH, Morawetz RB, Crowell RM, et al.: Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J. Neurosurg*. **1981**; 54: 773-782

Kerr LE, McGregor AL, Amet LE, et al.: Mice overexpressing human caspase 3 appear phenotypically normal but exhibit increased apoptosis and larger lesion volumes in response to transient focal cerebral ischaemia. *Cell Death Differ*. **2004**; 11(10):1102-1111.

Kim CH, Choi H, Chun YS, Kim GT, Park JW, Kim MS: Hyperbaric oxygenation pretreatment induces catalase and reduces infarct size in ischemic rat myocardium. *Pflugers Arch.* **2001**; 442(4):519-525.

Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al.: 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res.* **1990**; 528: 21-24.

Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, et al.: 'Ischemic tolerance' phenomenon found in various brain regions. *Brain Res.* **1991**; 561: 203-211.

Kobayashi S, Harris VA, Welsh FA: Spreading depression induces tolerance of cortical neurons to ischemia in rat brain. *J Cerebr Blood Flow Metabol.* **1995**; 15: 721-727.

Kolominsky-Raba PL, Weber M, Gefeller O, Neundoerfer B, Heuschmann PU: Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria. Incidence, Recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. *Stroke* **2001**; 32: 2735-2740.

Korkmaz A, Oter S, Sadir S, et al.: Exposure time related oxidative action of hyperbaric oxygen in rat brain. *Neurochem Res.* **2008**; 33(1): 160-166. Epub 2007 Aug 21.

Li Y, Chopp M, Yao F, Zaloga C: Temporal Profile of In Situ DANN Fragmentation After Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. *Jcereb Blood Flow Metab* **1995**; 15 (3): 389-397.

Lin TN, He YY, Wu G, Khan M, Hsu CY: Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke.* **1993**; 24(1): 117-121.

Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD: Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia. *Stroke* **1993**; 24:2002-2009.

Lou M, Eschenfelder CC, Herdegen T, Brecht S, Deuschl G: Therapeutic window fort the use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats. *Stroke* **2004** Feb; 35 (2): 578-83.

Lovblad KO, El-Koussy M, Oswald H, Baird AE, Schroth G, Mattle H: Magnetic resonance imaging of the ischaemic penumbra. *Swiss Med Wkly* **2003**; 133(41-42): 551-559.

MacManus JP, Linnik MD: Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab* **1997**; 17: 815-832.

Marx RE, Ehler WJ, Zayapongsak P, Pierce LW: Relationship of oxygen dose to angiogenesis induction in irradiated tissue. *Am J Surg* **1990**; 160: 519-524.

McLaughlin B, Hartnett KA, Erhardt JA, et al.: Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2003**; 100(2):715-720.

Mies G, Ishimaru S, Xie Y, Seo K, Hossmann KA: Ischemic threshold of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion in rat. *J. Cerebr. Blood Flow Metabol.* **1991**; 11: 753-761.

Mies G, Kohno K, Hossmann KA: Correlation between periinfarct DC shifts and ischemic neuronal damage in rat. *Nueroreport* **1993**; 4: 709-711.

Mink RB, Dutka AJ: Hyperbaric oxygen after global cerebral ischemia in rabbits reduces brain vascular permeability and blood flow. *Stroke*. **1995**; 26(12):2307-2312.

Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J, Altieri M, van Melle G: Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology*. **2000**; 54: 2089–2094.

Morawetz RB, Crowell RH, DeGirolami U, Marcoux FW, Jones TH, Halsey JH: Regional cerebral blood flow thresholds during cerebral ischemia. *Fed. Proc.* **1979**; 38(11): 2493-2494.

Murakami K, Kondo T, Kawase M, et al.: Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J Neurosci.* **1998**; 18: 205–213.

Nawashiro H, Tasaki K, Ruetzler CA, Hallenbeck JM: TNF-alpha pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J Cerebr Blood Flow Metabol.* **1997**; 17: 483-490.

Nie H, Xiong L, Lao N, Chen S, Xu N, Zhu Z: Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against spinal cord ischemia by upregulation of antioxidant enzymes in rabbits. *J Cerebr Blood Flow Metab.* **2006**;26(5):666-674.

Nishio S, Yunoki M, Chen ZTF, Anzivino MJ, Lee KS: Ischemic tolerance in the rat neocortex following hypothermic preconditioning. *J Neurosurg.* **2000**; 93: 845-851.

Noda Y, McGeer PL, McGeer EG: Lipid peroxide distribution in brain and the effect of hyperbaric oxygen. *J Neurochem* **1983**; 40: 1329-1332.

Obrenovitch TP, Garofalo O, Harris R, et al.: Brain tissue concentrations of ATP, phosphocreatine, lactate, and tissue pH in relation to reduced cerebral blood flow following experimental acute middle cerebral artery occlusion. *J. Cerebr. Blood Flow Metabol.* **1988**; 8: 866-874.

Ohtsuki T, Ruetzier CA, Tasaki M, Hallenbeck JM: Interleukin-1 mediates induction of tolerance to global ischemia in gerbil hippocampal CA1 neurons. *J Cerebr. Blood Flow Metab.* **1996**; 16: 1137-1142.

Omae T, Ibayashi S, Kusuda K, Nakamura H, Yagi H, Fujishima M: Effects of high atmospheric pressure and oxygen on middle cerebral blood flow velocity in humans measured by transcranial Doppler. *Stroke.* **1998**; 29(1):94-97.

Ostrowski RP, Graupner G, Titova E, et al.: The hyperbaric oxygen preconditioning-induced brain protection is mediated by a reduction of early apoptosis after transient global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis.* **2008**; 29(1): 1-13.

Oter S, Korkmaz A, Topal T, et al.: Correlation between hyperbaric oxygen exposure pressures and oxidative parameters in rat lung, brain, and erythrocytes. *Clin Biochem.* **2005**; 38(8): 706-711.

Oter S, Topal T, Sadir S, et al.: Oxidative stress levels in rats following exposure to oxygen at 3 atm for 0-120 min. *Aviat Space Environ Med.* **2007**; 78(12): 1108-1113.

Paschen W, Mies G, Hossmann KA: Threshold relationship between cerebral blood-flow, glucose utilization, and energy metabolites during development of stroke in gerbils. *Exp. Neurol.* **1992**; 117: 325-333.

Pellegrini-Giampietro DE, Zukin RS, Bennett MV, Cho S, Pulsinelli WA: Switch in glutamate receptor subunit gene expression in CA1 subfield of hippocampus following global ischemia in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* **1992**; 89: 10499-10503.

Piantadosi CA, Tatro LG: Regional H₂O₂ concentration in rat brain after hyperoxic convulsions. *J Appl Physiol.* **1990**;69(5):1761-1766.

Schäbitz WR, Schade H, Heiland S, et al.: Neuroprotection by hyperbaric oxygenation after experimental focal cerebral ischemia monitored by MRI. *Stroke* **2004** May; 35 (5): 1175-1179.

Schaller B: Ischemic preconditioning as induction of ischemic tolerance after transient ischemic attacks in human brain: its clinical relevance. *Neurosci Lett.* 2005; 377(3): 206-211.

Schulz JB, Weller M, Moskowitz MA: Caspases as treatment targets in Stroke and neurodegenerative disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* **1999**; 45: 421-429.

Shioda N, Ishigami T, Han F, et al.: Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway by a vanadyl compound mediates its neuroprotective effect in mouse brain ischemia. *Neuroscience.* **2007**; 148(1): 221-229.

Simon RP, Niuro M, Gwinn R: Prior ischemic stress protects against experimental stroke. *Neurosci Lett* **1993**; 163: 135-137.

Sugawara T, Noshita N, Lewen A, et al.: Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J Neurosci.* **2002**; 22: 209 –217.

Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **1995**; 267: 1456-1462.

Tibbles PM, Edelsberg JS: Hyperbaric oxagen therapy. *The New England J of Med* **1996**; 20: 1642-1647.

Toyoda T, Lee KS: Differential induction of superoxide dismutase in core and penumbra regions after transient focal ischemia in the rat neocortex. *Neurosci Lett.* **1997**; 235(1-2): 29-32.

Veltkamp R, Siebing DA, Sun L, et al.: Hyperbaric oxygen reduces blood-brain barrier damage and edema after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* **2005**; 36(8):1679-1683.

Victorov IV, Barskov IV: Selective staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. In: A Method for Staining ischemic neurons in the rat brain and spinal cord. *Pathol Physiol Exp Therap.* **1993**, N2; 53

Wada K, Ito M, Miyazawa T, et al.: Repeated hyperbaric oxygen induces ischemic tolerance in gerbil hippocampus. *Brain Res.* **1996**; 740: 15-20.

Wada K, Miyazawa T, Nomura N, Yano A, Nawashiro H, Shima K: Mn-SOD and Bcl-2 expression after repeated hyperbaric oxygenation. *Acta Neurochir Suppl.* **2000**; 76: 285-290.

Wada K, Miyazawa T, Nomura N, Tsuzuki N, Nawashiro H, Shima K: Preferential conditions for and possible mechanisms of induction of ischemic tolerance by repeated hyperbaric oxygenation in gerbil hippocampus. *Neurosurgery* **2001**; 49 (1): 160-166.

Wahlestedt C, Golanov E, Yamamoto S, et al.: Antisense oligodeoxynucleotides to NMDA-R1 receptor channel protect cortical neurons from excitotoxicity and reduce focal ischaemic infarctions. *Nature* **1993**; 363: 260-263.

Wang L, Traystman RJ, Murphy SJ: Inhalational anesthetics as preconditioning agents in ischemic brain. *Curr Opin Pharmacol.* **2008**; 8(1): 104-110.

Warner DS, Sheng H, Batinic-Haberle I: Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol.* **2004**; 207(Pt 18): 3221-3231.

Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V, et al.: Transient ischemic attacks before ischemic stroke: Preconditioning the human brain ? *Stroke* **2004**; 35: 616.

Weih M, Kallenberg K, Bergk A, et al.: Attenuated stroke severity after prodromal TIA: A role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke* **1999**; 30: 1851-1854.

Weih M, Amberger N, Villringer A, et al.: Prior transient ischemic attacks and hemispheric stroke size: neuroradiologic findings in ischemic tolerance. *Eur. J. Neurosci.* **2000**; 12 (Suppl. 11): 233.

Weih M, Prass K, Ruscher K, et al.: Ischämietoleranz. *Der Nervenarzt.* **2004**; 72(4): 255-260.

Wiegand F, Liao W, Busch C, et al.: Respiratory chain inhibition induces tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* **199**;19(11): 1229-1237.

Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN Jr, Sunderman FW Jr: Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem.* **1987**; 33(2 Pt 1): 214-220.

Xiong L, Zhu Z, Dong H, Hu W, Hou L, Chen S: Hyperbaric oxygen preconditioning induces neuroprotection against ischemia in transient not permanent middle cerebral artery occlusion rat model. *Chin Med J* **2000**; 113 (9):836-839.

Yao H, Markgraf CG, Dietrich WD, Prado R, Watson BD, Ginsberg MD: Glutamate antagonist MK-801 attenuates incomplete but not complete infarction in thrombotic distal middle cerebral artery occlusion in Wistar rats. *Brain Res.* **1994**; 642: 117-122.

Young AR, Ali C, Duretête A, Vivien D: Neuroprotection and stroke: time for a compromise. *J Neurochem.* **2007**; 103(4): 1302-1309.

Yu ZF, Mattson MP: Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration reduce focal ischemic brain damage and improve behavioral outcome: evidence for a preconditioning mechanism. *J Neurosci Res.* **1999**; 57: 830-839

Yusa T, Beckman JS, Crapo JD, Freeman BA: Hyperoxia increases H₂O₂ production by brain in vivo. *J Appl Physiol* **1987**; 63: 353-358.

Zamboni WA, Roth AC, Russell RC, Graham B, Suchy H, Kucan JO: Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. *Plast Reconstruct Surg* **1993**; 91: 1110-1123.

Zhang RL, Chopp M, Jiang N, et al.: Anti-ICAM-1 antibody (IA 29) reduces ischemic tissue damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* **1995**; 26(8): 1438-4142.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

3-NPA	3-Nitropropionsäure
A.	Arteria
ANOVA	analysis of variance
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure
ATA	technische Atmosphäre mit dem Bezugspunkt Null
ATM	Atmosphäre mit dem Bezugspunkt des Luftdrucks
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
C	Celsius
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMTU	Dimethylthiourea
GSH	Gluthation
GSSG	Glutathiondisulfid
H ⁺	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
HO ₂ •	Perhydroxyl-Radikal
HBO	hyperbaric oxygenation
HIF	hypoxia inducible factor
N.	Nervus
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP, NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO•	Stickoxid
NO ₂ •	Nitrogendioxid
M.	Musculus
MDA	Malondialdehyd
MRT	Magnetresonanztomographie
O ₂	Sauerstoff

O ₂ • ⁻	Superoxid
OH•	Hydroxyl-Radikal
PARP	Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RNA	Ribonukleinsäure
SAB	Subarachnoidalblutung
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
V.	Vena
vs.	versus

8.2. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8.3. Selbständigkeitserklärung

„Ich, Melanie Bleiss-Ahrens, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Neuroprotektion bei fokaler zerebraler Ischämie der Ratte durch präkonditionierenden oxidativen Stress“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

8.4. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Dirnagl für die Unterstützung im Labor der experimentellen Neurologie während des experimentellen Teils dieser Promotionsarbeit.

Herrn Dr. med. Frank Wiegand danke ich besonders für die Überlassung des Promotionsthemas und für die gute Unterstützung während meiner Zeit in der experimentellen Neurologie in Berlin.

Gewidmet ist diese Arbeit meiner Familie, die mich während meines gesamten Studiums gefördert und unterstützt hat.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann Alexander und meiner kleinen Tochter Josefine, die mich auf dem langen Weg bis zur Abgabe dieser Arbeit begleitet haben.