

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

DISSERTATION

Die Rolle von Stickstoffmonoxid in der frühen Phase der ischämischen
Toleranz bei zerebraler Ischämie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lukas Julius Speetzen

aus Kiel

Datum der Promotion: 5.12.2014

meinen Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
KURZFASSUNG	6
ABSTRACT	8
1 EINLEITUNG	10
1.1 GRUNDLAGEN DES SCHLAGANFALLS	10
1.1.1 PATHOPHYSIOLOGIE DES ISCHÄMISCHEN SCHLAGANFALLS	10
1.1.2 THERAPIE DES AKUTEN ISCHÄMISCHEN SCHLAGANFALLS	11
1.1 ISCHÄMISCHE PRÄKONDITIONIERUNG	14
1.2 MECHANISMEN DER ISCHÄMISCHEN TOLERANZ	18
1.3 DIE ROLLE VON NO BEI ISCHÄMISCHER TOLERANZ	19
1.4 AUFGABENSTELLUNG	22
2 METHODEN	23
2.1 VERSUCHSTIERE UND HALTUNG	23
2.1.1 POSTOPERATIVE VERSORGUNG DER VERSUCHSTIERE	24
2.2 PRÄCHIRURGISCHE MAßNAHMEN	25
2.2.1 PRÄPARATION DER MONOFILAMENTE	25
2.2.2 CHIRURGISCHE INSTRUMENTE	26
2.2.3 AUFBAU DES CHIRURGISCHEN ARBEITSPLATZES	26
2.2.4 VORBEREITUNG UND NARKOSE DER VERSUCHSTIERE	28
2.3 CHIRURGISCHE MAßNAHMEN	29
2.3.1 LASER-DOPPLER-FLUSSMESSUNGEN	29
2.3.2 DAS BCCAO-PRÄKONDITIONIERUNGSMODELL	31
2.3.3 SHAM-PRÄKONDITIONIERUNG	33
2.3.4 DAS MCAO-FADENMODELL	33
2.4 POSTCHIRURGISCHE MAßNAHMEN	35
2.4.1 PROBENGEWINNUNG UND AUFBEREITUNG	35
2.4.2 HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN	36

2.4.3	BERECHNUNG DER SCHLAGANFALLVOLUMINA	38
2.5	EXPERIMENTELLE PROTOKOLLE	40
2.6	EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN	43
2.7	STATISTISCHE ANALYSE	43
3	ERGEBNISSE	44
3.1	LASER-DOPPLER-FLUSSMESSUNG BEI BCCAO & MCAO	44
3.2	ZEREBRALE TUNEL-FÄRBUNG NACH BCCAO	47
3.3	ZEITLICHER VERLAUF DER FRÜHEN IT	49
3.4	BEDEUTUNG DER DE-NOVO PROTEINSYNTHESE	51
3.5	UNTERSUCHUNGEN ZU eNOS IM ZEITFENSTER DER FRÜHEN IT	54
3.6	UNTERSUCHUNGEN ZU nNOS IM ZEITFENSTER DER FRÜHEN IT	56
4	DISKUSSION	58
4.1	BCCAO ALS PRÄKONDITIONIERENDER STIMULUS UND TUNEL	59
4.2	ZEITLICHER VERLAUF DER IT	61
4.3	DE-NOVO PROTEINBIOSYNTHESE BEI FRÜHER UND SPÄTER IT	63
4.4	eNOS UND nNOS BEI FRÜHER IT	66
4.5	LIMITATIONEN DER STUDIE	71
4.5.1	ZEREBRALE DURCHBLUTUNG UND LASER-DOPPLER-MESSUNG	71
4.5.2	MCAO-MODELL UND MAUSSTAMM	72
4.5.3	HYPOTHERMIE UND ISOFLURANNARKOSE ALS POTENTIELLE STÖRFAKTOREN	75
4.5.4	AUSBLICK	77
5	LITERATURVERZEICHNIS	79
6	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	93
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	94

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	96
LEBENS LAUF	97
PUBLIKATIONS LISTE	98
DANKSAGUNG	99
ANHANG	100

Kurzfassung

Der ischämische Schlaganfall gehört zu einer der schwerwiegendsten Erkrankungen mit hoher Mortalität und einer immensen sozioökonomischen Belastung. Trotz gewaltiger Anstrengungen in experimenteller und klinischer Forschung bleiben die therapeutischen Möglichkeiten dieses Krankheitsbildes limitiert. Im Gegensatz zu den verfügbaren Therapieoptionen wird die Anzahl der ischämischen Schlaganfälle in den nächsten Jahren aufgrund einer ständig älter werdenden Gesellschaft weiterhin ansteigen. Es ist daher unumgänglich, neue Therapiemöglichkeiten zu erforschen.

Eine der Möglichkeiten liegt dabei in der endogenen Adaptation des Gehirns an schädigende Bedingungen. Diese gehirneigenen Schutzfunktionen werden auch als ischämische Präkonditionierung oder ischämische Toleranz (IT) bezeichnet und beschreiben ein Phänomen, in dem ein nicht schädigender Stimulus im Gehirn zu einem Zustand zeitweilig erhöhter Widerstandsfähigkeit gegen potentiell schädigende Ereignisse führt. IT entwickelt sich innerhalb von Minuten bis Stunden (frühe IT) oder innerhalb von Tagen (späte IT). Im Gegensatz zur späten IT ist das Wissen über die Eigenschaften und Mechanismen der frühen IT deutlich geringer.

Das Ziel dieser Studie war es, die Methode der BCCAO (engl.: bilateral common carotid artery occlusion) als präkonditionierenden Stimulus der frühen IT an einem 45 minütigen MCAO-Schadensmodell (engl.: middle cerebral artery occlusion) an C57Bl6 Mäusen zu etablieren und dabei das optimale Zeitfenster der frühen IT zu finden. Weitere Ziele waren die Testung der Unabhängigkeit der frühen IT von der *de-novo* Proteinsynthese sowie die Untersuchung von Stickstoffmonoxid (NO) innerhalb der frühen IT an eNOS (engl.: endothelial nitric oxide synthase) defizienten Mäusen sowie an Mäusen, welche mit einem Inhibitor der nNOS (engl.: neuronal nitric oxide synthase) behandelt wurden.

Zur Überwachung des rCBF (engl.: regional cerebral blood flow) während BCCAO und MCAO nutzten wir in repräsentativen Gruppen die Laser-Doppler-Fluss Messung (LDF). Zweiundsiebzig Stunden nach MCAO entnahmen wir die Gehirne und verglichen durch Messungen an histologischen Schnitten die Infarktgrößen zwischen BCCAO präkonditi-

onierten Tieren und nicht präkonditionierten Tieren. Um nachzuweisen, dass die Verwendung unseres BCCAO-Protokolls alleine zu keinem zerebralen Schaden auf zellulärer Ebene führt, nutzten wir die TUNEL Färbung (engl.: TdT-mediated dUTP nick end labeling), welche DNA-Schäden als Zeichen für Apoptose markiert.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der BCCAO um einen nicht schädigenden ischämischen Stimulus handelt, der in der Lage ist, frühe IT zu induzieren, deren optimales Zeitfenster bei 30 Minuten nach BCCAO liegt. Darüberhinaus ist die von uns nachgewiesene frühe IT unabhängig von der *de-novo* Proteinsynthese. Die Mechanismen der frühen IT sind dabei abhängig von der eNOS und nNOS, da wir weder in eNOS Knock-out Tieren noch in mit nNOS-Inhibitor behandelten Tieren den Effekt der frühen IT nachweisen konnten.

Abstract

Ischemic stroke is a disease with a high mortality and an enormous socio-economic burden. Despite experimental and clinical scientific efforts throughout recent decades, treatment options for acute ischemic stroke patients remain limited. In contrast to that, increase in the percentage of elderly people in developed countries will increase incidences and prevalences of patients with ischemic stroke in the next decades. Therefore, there is a pressing need for new treatment strategies in patients with ischemic stroke.

One approach is to gain further understanding in mechanisms of endogenous adaptation of brain to cope with a damaging stimulus. This brain-derived neuroprotection is also known as ischemic preconditioning (PC) or ischemic tolerance (IT) and describes a phenomenon in which a non-damaging noxious stimulus applied to the brain induces a transient resistance against a subsequent damaging ischemic insult. IT occurs in two different time windows: early IT, which occurs within minutes to a few hours after PC and delayed IT, which needs hours or days to occur.

So far, research on IT in brain has focused on delayed IT. Much less is known on the mechanisms of early IT. The objective of this study was to establish bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) as an adequate PC stimulus to induce early IT to transient focal cerebral ischemia induced by 45 minutes middle cerebral artery occlusion (MCAO) in C57Bl6 mice.

Furthermore, we looked for the optimal time window to induce early IT and investigated whether endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) derived nitric oxide play crucial roles in establishing this phenomenon using eNOS knock-out mice or a specific nNOS inhibitor. To demonstrate that preconditioning effect was due to early IT we tested also for independency of *de-novo* protein synthesis. During both surgical procedures (BCCAO and MCAO), monitoring of regional cerebral blood flow (rCBF) by laser Doppler flowmetry (LDF) was performed in a representative group of animals. Seventytwo hours after MCAO, we removed brains and compared infarct sizes between preconditioned and non-preconditioned animals. We used TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining to investigate non-damaging characteristics of our BCCAO preconditioning protocol.

Our data indicated that our BCCAO-protocol is a non-damaging ischemic stimulus leading to early IT with the optimal time delay between BCCAO and MCAO of 30 min. Moreover, we could show that early IT is independent of protein *de-novo* synthesis and that eNOS and nNOS are necessary to induce this effect.

1 Einleitung

1.1 Grundlagen des Schlaganfalls

Der Schlaganfall zählt in den Industrienationen weiterhin zu der dritthäufigsten Todesursache und ist einer der wichtigsten Gründe für Behinderung im Erwachsenenalter mit weitreichenden Folgen für ein selbständiges Leben und eine mögliche Erwerbsfähigkeit¹. Auch aus gesundheitsökonomischer Sicht ist der Schlaganfall deshalb eine der relevantesten Erkrankungen weltweit. 2008 beliefen sich die direkten und indirekten Kosten in den USA auf über 65 Milliarden US\$ bzw. 27 Milliarden € in der EU.²

In 87% der Fälle handelt es sich um einen ischämischen Schlaganfall, in 10% ist eine intrakranielle Blutung und in 3% eine subarachnoidale Blutung ursächlich für die Entstehung eines hämorrhagischen Schlaganfalls.¹ Das mit Abstand am häufigsten betroffene Gefäß bei einem ischämischen Schlaganfall ist die Arteria cerebri media.³ Etwa 25% der Patienten verstirbt in den ersten Monaten oder dem ersten Jahr nach dem Ereignis an den primären (z.B. Hirnödem) oder sekundären Folgen (z.B. Pneumonie) des ischämischen Schlaganfalls.⁴

1.1.1 Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls

Ein ischämischer Schlaganfall entsteht, wenn es zu einer Minderperfusion eines begrenzten Gehirnbereiches, meist in Folge eines lokalen Thrombus oder einer Embolie, kommt. Die wichtigsten pathophysiologischen Mechanismen, die in der Zeit nach dem Gefäßverschluss eine Rolle spielen, sind Exzitotoxizität, Peri-Infarktdepolarisation, Entzündungsmechanismen und Apoptose.⁵ Abbildung 1 zeigt das Einsetzen dieser Mechanismen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verschluss des Gefäßes und versucht ihren unterschiedlichen Einfluss auf den finalen Ausgang des ischämischen Schlaganfalls abzubilden.

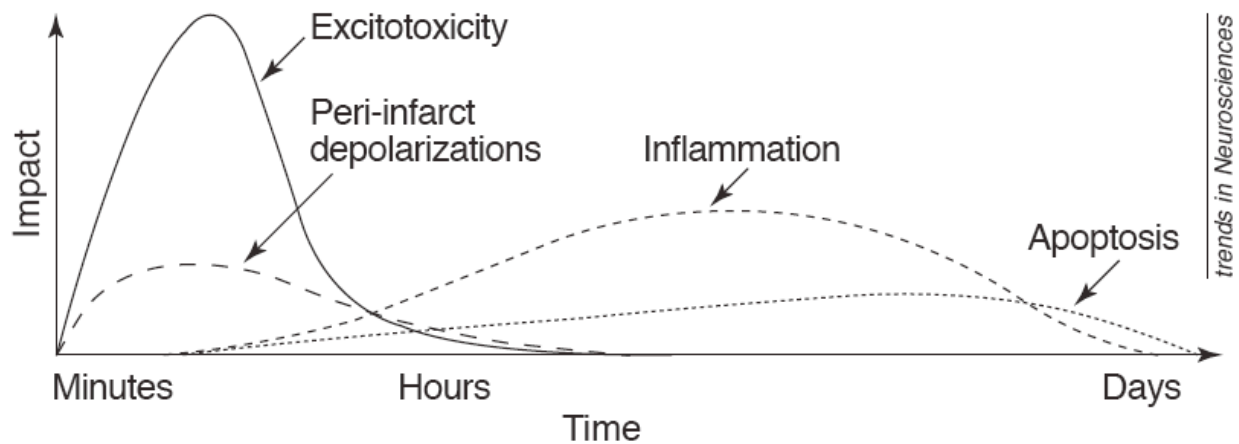


Abbildung 1: Einfluss der Pathomechanismen nach einem ischämischen Schlaganfall in Abhängigkeit von der Zeit, nach Verschluss des versorgenden Gefäßes. Das Schema zeigt, dass in den ersten Minuten bis Stunden nach Verschluss einer versorgenden zerebralen Arterie die Exzitotoxizität den größten Einfluss auf das finale Outcome hat. Exzitotoxizität stößt darüberhinaus weitere Vorgänge wie Peri-Infarkt-Depolarisation an und führt zu Entzündungsprozesse und Apoptose, die erst zu einem späteren Zeitpunkt dominieren. Die X-Achse stellt hier den zeitlichen Verlauf dar, während die Y-Achse den Einfluss der einzelnen Faktoren auf den finalen Ausgang des Schlaganfalls abbilden soll. (Dirnagl et al.1999, Pathobiology of stroke: an integrated view⁵)

1.1.2 Therapie des akuten ischämischen Schlaganfalls

Der ischämische Schlaganfall ist ein medizinischer Notfall und muss dementsprechend behandelt werden. Die rekanalisierende Therapie stellt zurzeit die einzige kausale Therapie des ischämischen Schlaganfalls dar.⁴ Ihr Ziel ist, die Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßabschnitts mit ausreichender Reperfusion des ischämischen Areals.

Um dieses Ziel zu erreichen, stehen sowohl pharmakologische (Lyse) und mechanisch-endovaskuläre Verfahren als auch eine Kombinationen beider zur Verfügung.⁶ Die Therapie des ischämischen Schlaganfalls mittels intravenös applizierter rtPA (engl. reactive tissue plasminogen activator) stellt dabei eine weit verbreitete Behandlungsmöglichkeit dar, deren Anwendung in vielen Fällen zu einem signifikant besseren Outcome der Patienten führt und in zahlreichen, randomisierten und internationalen Studien bewiesen wurde.⁷

Studien von Hacke et. al belegen, dass Patienten vor allem in einem Zeitfenster von 4,5 Stunden zwischen Einsetzen der Symptome und Beginn der Behandlung von einer solchen Thrombolyse profitieren, ohne dass die Nebenwirkungen der Behandlung das Be-

nefit der Patienten übersteigen.⁸ In Deutschland ist seit dem Jahr 2000 rtPA i.v. zur Lyse im 3 Stunden Zeitfenster zugelassen.⁹ Basierend auf den Ergebnissen der ECASS III Studie wurde seit Oktober 2011 die Zulassung zur Behandlung des ischämischen Schlaganfalls auf das 4,5 Stunden Zeitfenster ausgeweitet.¹⁰

Allerdings bestehen für die Anwendung der intravenösen Lyse enge Limitationen, die in vielen Fällen eine Verabreichung verbieten und in den European-Stroke-Organisation-Guidelines (ESO-Guidelines) festgelegt sind.¹¹ Hierzu gehören unter anderem eine Thrombolyse nach mehr als 4,5 Stunden oder eine Thrombolyse bei unsicherem Beginn der Symptomatik sowie ein erhöhtes Blutungsrisiko in der Anamnese oder das Vorliegen gravierender aktueller Blutungen. Desweiteren stellen stattgehabte größere Schlaganfälle in der Vergangenheit (letzte 3 Monate) und unkontrollierbarer, entgleister Bluthochdruck mit systolischen Werten über 185 mmHg (diastolisch über 110 mmHg) Kontraindikationen dar. Darüberhinaus existieren Risikofaktoren für vermehrte Blutungen durch Thrombolyse, die aber im Einzelfall abgewogen werden müssen und -soweit therapierbar- als relative Kontraindikationen gelten.^{4,10-12}

Viele Patienten mit ischämischem Schlaganfall können daher der Behandlung mit rtPA nicht zugeführt werden und haben keine Möglichkeit, eine kausale Therapie zu erhalten. Dies gilt vor allem vor dem Hintergrund, dass die meisten Patienten zu spät in ein Krankenhaus eingeliefert werden und daher nur 10% aller Schlaganfallpatienten für eine Thrombolyse in Frage kommen.¹³ Außerdem zeigen die Ergebnisse der ECAS III Studie, dass ein Teil der lysierten Patienten nicht von der Lysetherapie profitieren und keine Verbesserung des neurologischen Defizits aufweisen.⁸

Die Diskrepanz zwischen einem der häufigsten und schwerwiegendsten Krankheitsbilder überhaupt und den stark eingeschränkten Therapiemöglichkeiten auf der anderen Seite bedingt die intensive Erforschung alternativer Therapie- und Präventionsmöglichkeiten. Dabei spielen die immer besser werdenden Erkenntnisse der Pathophysiologie und ihrer zugrunde liegenden Mechanismen (vergleiche 1.1.1) eine entscheidende Rolle bei der Suche nach weiteren Ansatzpunkten.

In der Vergangenheit wurden eine Vielzahl an experimentellen Studien zur Erforschung dieser Ansatzpunkte betrieben, die auch teilweise in aussichtsreiche klinische Studien überführt wurden. Hierunter sind unter anderem das ICAM-1 Projekt¹⁴, die Entwicklung des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten rhIL-1ra (engl.: recombinant human interleukin

receptor antagonist)¹⁵ und die Entwicklung und Erforschung des freien Radikalfängers NXY-095 zu nennen. Trotz großer Sorgfalt im Studiendesign und der Durchführung dieser Studien blieb ein durchschlagender Erfolg in der Therapie des humanen ischämischen Schlaganfalls aber aus. Deutlich zeigte sich dieses z.B. an der Entwicklung des erwähnten Radikalfängers NXY-095, der in Klein- wie Großtierversuchen gute Ergebnisse hinsichtlich eines verbesserten Outcomes erbrachte. Die nachfolgenden Studien des SAINT I und SAINT II Trials konnten allerdings keinen Benefit von NXY-059 bei Menschen beweisen, wenn NXY-059 innerhalb von sechs Stunden nach Einsetzen der Symptome appliziert wurde.¹⁶ Lediglich der Radikalfänger Edaravone erreichte in Japan die klinische Zulassung zur Behandlung des ischämischen Schlaganfalls und wird dort seit 2001 eingesetzt. Die Effektivität von Edaravone ist aber Gegenstand kontroverser Diskussionen und der Wirkstoff zurzeit außerhalb von Japan nicht zugelassen.¹⁷

Die zitierten Studien zeigen, dass weitere Arbeiten auf dem Gebiet der neuroprotektiven Forschung nötig sind, um weitere und andere Möglichkeiten zu entwickeln, das Gehirn im Falle eines Schlaganfalls effektiv schützen zu können.

Eine Möglichkeit, neue Therapieansätze zu entdecken, ist die Erforschung neuroprotektiver, endogener Schutzmechanismen. Nach ischämischen zerebralen Ereignissen hängt das Überleben oder der Untergang neuronalen Gewebes maßgeblich auch von dem Gleichgewicht zwischen diesen endogenen Schutzmechanismen und den schädigenden Mechanismen ab.¹⁸ Solche Schutzmechanismen wurden in vielen unterschiedlichen Spezies und für unterschiedliche Organe beschrieben. Sie gehören vermutlich phylogenetisch zu sehr alten Mechanismen, die es Organismen ermöglichen, sich an potentiell schädigende Bedingungen anzupassen.¹⁹

Die Erforschung dieser endogenen Mechanismen führt zu einem besseren Verständnis der bei einer Ischämie des zentralen Nervensystems ablaufenden Vorgänge und bietet sodann die Möglichkeit, Substanzen und Konzepte zu entwickeln, um diese Schutzmechanismen zu verstärken bzw. konträr wirkende zu unterbrechen.

Um diese im Organismus angelegten Schutzmechanismen untersuchen zu können, bedarf es folglich einer Methode, diese zu aktivieren. Hierzu findet das Konzept der ischämischen Präkonditionierung eine breite Anwendung.

1.1 **Ischämische Präkonditionierung**

Fast jeder potentiell schädigende Stimulus ist in der Lage, in Organismen Reaktionen auszulösen, die dessen Widerstandsfähigkeit gegen diesen oder ähnliche Stimuli erhöhen. In Abhängigkeit von der Stärke des Stimulus kommt es im Organismus zur Schädigung oder zur Aktivierung protektiver Vorgänge, die den Organismus bei einer erneuten Konfrontation mit dem gleichen Stimulus widerstandsfähiger machen. Dieses Phänomen heißt Toleranz oder im Falle der Ischämieforschung „ischämische Toleranz“ (IT).²⁰

Die in diesem Zusammenhang benutzen Begriffe der Präkonditionierung und Toleranz wurden erstmals 1964 von Janoff et al. aufgrund von Beobachtungen an Lysosomen in einem Schockmodell beschrieben.²¹ Ischämische Präkonditionierung bedeutet demnach, dass der konditionierende Stimulus in einer nicht schädigenden Dosis vor dem Stimulus mit einer potentiell schädigenden Dosis appliziert wird. 1986 konnten Murry et al. am Beispiel des Myokardinfarkts in Hunden zeigen, dass wiederholte, kurze koronare ischämische Episoden zu einer 75-prozentigen Verringerung des irreversibel geschädigten Myokards führten.²² Entsprechende Beobachtungen an Rattengehirnen wurden schon 1964 von Dahl et al. an einem Hypoxiemodell gemacht.²³

Etwa zeitgleich mit Dahl et al. beobachteten auch Schurr et al. an Schnitten von Rattengehirnen, dass diese nach einer längeren Zeit ohne Sauerstoff keine elektrische Aktivität mehr zeigten. Bei Behandlung mit kurzen anoxischen Episoden vor der eigentlich schädigenden anoxischen Episode konnten sie jedoch auch nach dieser Zeit noch elektrische Aktivität messen.²⁴

Entscheidende Schritte zur weiteren Etablierung dieses Phänomens im Gehirn lieferten 1990 Kitagawa et al., die an einem *in-vivo* Modell der Wüstenrennmaus zeigen konnten, dass ischämische Präkonditionierung durch kurze Okklusion beider Arteria carotis communis, in einem bestimmten Intervall und einer bestimmten Dauer, zu endogener Protektion führte.²⁵ Diese Schlüsselarbeit gilt als Nachweis der ischämischen Toleranz im Gehirn. Auch Kirino et al. konnten diesen Effekt nachweisen und bestätigen.²⁶ Das von Kitagawa et al. verwendete Ischämiemodell führte nachweislich zu Störungen im Energiemetabolismus der Zelle, nicht aber zum Zelluntergang. Stattdessen wurden die Zellen dazu veranlasst, eine robuste, protektive Wirkung gegen die im Anschluss applizierte längere Ischämie zu entwickeln.²⁵ Auch neuere Ergebnisse aus *in-vitro* Präparati-

onen von Gehirnschnitten und Studien an neuronalen Zellkulturen belegen die Existenz dieses Phänomens.^{27,28} Heute existieren verschiedene *in-vivo* Modelle der ischämischen Präkonditionierung, die zeigen, dass das Gehirn über ischämische Toleranz verfügt.²⁰

Klinische Studien legen nahe, dass auch im humanen Gehirn ischämische Toleranz existiert. Wegener et al. untersuchten mithilfe eines Magnetresonanztomographen (MRT) und unterschiedlichen Sequenzen Patienten mit erstmaligem ischämischen Hirninfarkt. Sie verglichen diese Daten mit denen von Patienten, die vor dem ersten Schlaganfall eine Transitorische Ischämische Attacke (TIA) erlitten hatten. Obwohl Ausmaß und Grad des Perfusionsdefizits zwischen beiden Gruppen vergleichbar war, fiel das finale Infarktvolume bei Patienten mit TIA im Vorfeld des Infarkts im Vergleich zu Patienten ohne TIA deutlich geringer aus. Patienten mit TIA erzielten darüberhinaus ein signifikant besseres funktionelles Behandlungsergebnis im Vergleich zu Patienten ohne TIA im Vorfeld.^{29;30}

Ischämische Toleranz existiert in zwei verschiedenen Zeitfenstern. Im frühen Zeitfenster setzt der protektive Effekt der Präkonditionierung innerhalb von Minuten ein (schnelle/frühe ischämische Toleranz), während im späten Zeitfenster der Effekt erst nach Stunden bis Tagen einsetzt (verzögerte/späte ischämische Toleranz).¹⁸ Ein wesentlicher Unterschied besteht darin, dass eine *de-novo* Proteinsynthese für die Entstehung der späten IT essentiell zu sein scheint, während diese bei der Entstehung der frühen IT keine Rolle spielen soll.²⁵ Im frühen Zeitfenster scheinen dagegen eher posttranslationale Modifikationen und/oder Änderungen in der Durchlässigkeit von Ionenkanälen wichtig zu sein.³¹ Trotz zahlreicher Studien auf dem Gebiet der ischämischen Präkonditionierung und einiger Erklärungsmodellen zur Wirkungsweise herrscht bis heute immer noch Unklarheit darüber, welches die exakten Mechanismen sind, die dem Phänomen der ischämischen Toleranz zugrunde liegen.

Bekannt ist, dass eine Vielzahl von Stimuli (engl.: Triggers) frühe als auch späte IT auslösen können. Abbildung 2 zeigt die Unterteilung in frühe und späte IT, die sich nicht nur hinsichtlich des Zeitfensters, sondern auch hinsichtlich der beteiligten Sensoren (engl.: Sensors), Signalwandler (engl.: Transducer) und Effektoren (engl.: Effectors) unterscheiden. Dabei können bestimmte Sensoren (z.B. ADO, A1R) und Signalwandler (z.B. NO, K_{ATP}) in beiden IT Formen eine Rolle zur Etablierung der Protektion spielen.

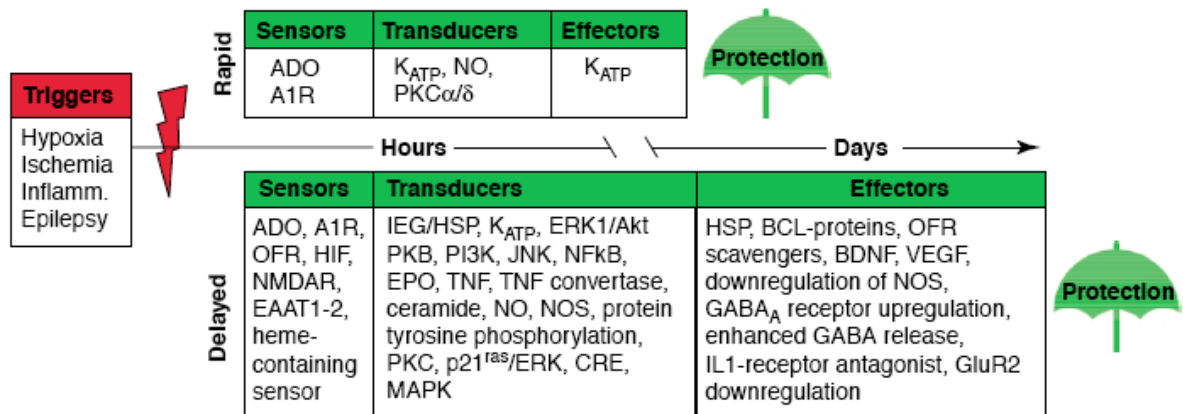


Abbildung 2: Trigger, Sensoren, Transducer und Effektoren von schneller und verzögerter ischämischer Toleranz. Die Abbildung verdeutlicht, dass bestimmte Trigger sowohl frühe als auch späte IT auslösen können. Dabei führt der Weg zur Ausbildung einer Neuroprotektion über verschiedene Sensoren, Transducer und Effektoren, die sich in beiden Zeitfenstern wiederfinden lassen. Deutlich wird durch die Abbildung dabei auch der quantitative Unterschied bekannter und beteiligter Akteure in den jeweiligen Zeitfenstern. (Dirnagl et al. 2003, Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection¹⁸)

In beiden Fällen besteht der protektive Effekt aber nur für einen begrenzten Zeitraum, der sich auch nach wiederholter Applikation des Stimulus nicht länger als maximal einige Wochen hält.³² Auch in den meisten Fällen der späten IT, welche als länger anhaltende angesehen wird, verschwindet die Protektion schon innerhalb von Tagen.³³

Insgesamt existieren zu dem Zeitfenster der frühen IT deutlich weniger Studien als es beim Zeitfenster der späten IT der Fall ist. Bis vor wenigen Jahren wurde angenommen, dass frühe IT eher eine untergeordnete Rolle bei der ischämischen Toleranz des Gehirns einnimmt und eventuell nur zu einem verzögerten Untergang der Neurone führt.³⁴ Ein besseres Verständnis der Vorgänge und Funktion der frühen IT könnte letztendlich in der Entwicklung neuer Medikamente und Therapieverfahren münden, um z.B. Risikopatienten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für ischämische Zustände bessere Behandlungsoptionen anbieten zu können. Mögliche klinische Anwendungen wären z.B. Patienten, die sich einer herz- oder gefäßchirurgischen Maßnahme unterziehen müssen, welche mit einem hohen Risiko für zerebrale Ischämien innerhalb eines begrenzten Zeitraums einher geht, wie es z.B. bei Operationen von Karotisstenosen oder Bypass-Operationen der Fall ist.³⁵ Aufgrund des schnellen Einsetzens der frühen IT könnte gerade diese Form der IT entscheidende Vorteile in der Therapie von akuten zerebralen Ischämien bringen.

Obwohl diese therapeutischen Optionen der ischämischen Präkonditionierung denkbar sind, steht aufgrund des aktuellen Wissensstands und der Invasivität der meisten bisher angewandten präkonditionierenden ischämischen Stimuli die Nutzung der IT in Form von experimentellen Modellen innerhalb der Forschung im Vordergrund.

Die Erforschung der ischämischen Toleranz durch Präkonditionierung führte in den letzten Jahren zur Entdeckung weiterer verwandter Phänomene wie z.B. der Kreuztoleranz und des RIPC (engl.: remote ischemic preconditioning).

Kreuztoleranz beschreibt dabei das Phänomen, dass auch nicht ischämische Stimuli zu ischämischer Toleranz führen.³⁶ Im Tierversuch konnten viele verschiedene, physikalische Reize, Zustände und Substanzen wie z.B. Hypoxie³⁷, Hypothermie³⁸, Hyperthermie³⁹, Epilepsie⁴⁰, Spreading Depression⁴¹, traumatische Hirnschädigung⁴², 3-Nitropropionat⁴³, Diethyldithiocarbamat⁴⁴ und Lipopolysaccharid (LPS)⁴⁵ gefunden werden, die zur Ausprägung von ischämischer Kreuztoleranz führen.

Eine andere Form der ischämischen Toleranz, das „Remote ischemic Preconditioning“ (RIPC), wird bereits ebenfalls in ersten klinischen Studien getestet.⁴⁶ Bei dieser relativ neu entdeckten Form der IT wird durch die kurzzeitige Ischämie einer weiter entfernten Körperregion ein bzgl. Ischämiezuständen toleranterer Organismus geschaffen. Ein häufig genutztes Vorgehen ist dabei die kurzfristig induzierte Ischämie einer Extremität, die unter anderem dem Gehirn ischämische Toleranz verleiht. Studien von Connolly et. al weisen auf einen beobachteten klinischen Zusammenhang hin, bei dem Patienten mit einer bestehenden nicht behandelten peripheren Ateriellen-Verschluss-Krankheit (pAVK) und Schlaganfall ein besseres Outcome haben, als vergleichbare Patienten mit Schlaganfall ohne pAVK in der Vorgeschichte.⁴⁷ Neben den Studien zum Zusammenhang von TIA und Stroke besteht somit ein weiteres Indiz, dass ischämische Toleranz auch in höher entwickelten Organismen wie dem Mensch angelegt ist und durch Präkonditionierung aktiviert werden kann.

1.2 Mechanismen der ischämischen Toleranz

Ischämische Präkonditionierung und Toleranz führen über die Aktivierung von endogenen Schutzfunktionen zu einer Vielzahl von Veränderungen in den Zellen des betroffenen Organismus. Dazu zählen Vorgänge der besseren Zellenergieversorgung, des verminderten Energiebedarfs, der Antagonisierung von schädigenden Mechanismen sowie eine schnellere und bessere Erholung von ischämischen Zuständen.⁴⁸

Bisher ist insbesondere bekannt, dass ischämische Präkonditionierung z.B. zu einer Vielzahl an Veränderungen auf genomischer und molekularer Ebene führt, die die hohe Komplexität dieser Mechanismen widerspiegeln. Es kommt unter anderem zu Änderungen in der Expression von Genen, die eine wichtige Rolle im Stoffwechsel, der Immunantwort und der Blutgerinnung spielen sowie zu Änderungen von Histonkonfigurationen.⁴⁹ Eine zentrale Rolle spielt dabei auch der hypoxia-inducible factor (HIF) als einer der Schlüsselregulatoren der Transkription.⁴⁸ Unter normoxischen Bedingungen wird die alpha Untereinheit HIF-alpha abgebaut, bleibt dagegen aber unter hypoxischen Bedingungen bestehen und dimerisiert mit der HIF-beta Untereinheit. Dieses HIF-Molekül aktiviert dann unter anderem Gene, die zur Herstellung des Erythropoetin (EPO), des Angiogenesefaktors VEGF (engl.: vascular endothelial growth factor), der PH-Regulierung und des Energiemetabolismus nötig sind. Ischämische Präkonditionierung stimuliert die Bildung von HIF-Dimeren und trägt somit unter anderem zur vermehrten Bildung von VEGF und Erythropoetin bei, die letztendlich zu einer erhöhten Angiogenese in der Penumbra und folglich zu einer besseren Perfusion führen.⁵⁰ *In-vitro* Modelle der ischämischen Präkonditionierung konnten zeigen, dass EPO auch schnelle ischämische Präkonditionierung bedingt und neuroprotektiv wirkt.⁵¹

Neben der veränderten Genexpression tragen weitere Mechanismen dazu bei, den Organismus optimal an hypoxische Bedingungen anzupassen. Eine wichtige Rolle in der ischämischen Präkonditionierung des Nervensystem spielen dabei der N-methyl-D-aspartat-Rezeptor (NMDA), die veränderte Regulation von Zell-Signal-Transduktionsvorgängen mit Proteinkinasen wie MAPK (engl.: mitogen-activated-protein-kinase), AKT (engl.: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) und PKC (engl.: protein-kinase-c), sowie Caveolin abhängige Signalwege und die Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren wie CREB (engl.: cAMP-response-element-binding-protein), und NFkB (engl.: nuclear factor kappa of activated B-cells).^{31,52}

Innerhalb einiger dieser Mechanismen scheint Stickstoffmonoxid (NO) eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der ischämischen Präkonditionierung zu spielen und steht daher im Mittelpunkt unseres Interesses.⁵³

1.3 Die Rolle von NO bei ischämischer Toleranz

Generell handelt es sich bei Stickstoffmonoxid um ein leichtflüchtiges Gas mit einer biologischen Halbwertszeit von wenigen Sekunden, welches in Organismen als Vasodilatator den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur reguliert und maßgeblich zur Endothelfunktion beiträgt.⁵⁴ Weitere wichtige Aufgaben hat NO bei der Aufrechterhaltung der Homeostase und bei Zellwachstums- und Entzündungsprozessen.⁵⁵ Stickstoffmonoxid wird in höheren Organismen über die Nahrung in Form von Nitraten und Nitrit zugeführt, entsteht aber auch durch endogene Produktion dreier verschiedener Synthesen aus L-Arginin und Sauerstoff.⁵⁶ Zu einem nicht unerheblichen Teil wird es auch aus den Anionen Nitrat (NO_3^-) und Nitrit (NO_2^-) recycelt, insbesondere in hypoxischen Situationen.⁵⁷

Es existieren drei verschiedene Stickstoffmonoxidsynthesen, von denen zwei konstitutionell vor allem in Neuronen (nNOS oder Typ I) und Endothelzellen (eNOS oder Typ III) vorkommen und kalziumabhängig arbeiten.⁵⁸ Konstitutionell bedeutet in diesem Fall, dass diese beiden Isoformen unter Ruhebedingungen exprimiert werden und in entsprechenden zellulären Strukturen (z.B.: Neuronen bzw. Endothelzellen) vorhanden sind. Eine weitere Isoform (iNOS oder Typ II) kommt vor allem in Makrophagen, Astrozyten und Microglia vor und nur zu einem geringen Anteil in Endothelzellen. iNOS ist kalziumunabhängig und kann in bestimmten Situationen (z.B.: Entzündungsreaktionen) induziert werden, d.h. iNOS ist im Gegensatz zu eNOS und nNOS nicht zu jedem Zeitpunkt vorhanden.⁵⁹

nNOS, iNOS und eNOS sind die ausschlaggebenden Quellen für NO im Gehirn, wobei vor allem eNOS und nNOS eine entscheidende Rolle bei der Kopplung der zerebralen Durchblutung an die neuronale Aktivität, als Neurotransmitter und bei Proliferation und Differenzierung von Neuronen einzunehmen scheinen.^{60,61} Je nach Gewebe, Quelle und Konzentrationen von Stickstoffmonoxid besitzt dieses Molekül protektive als auch toxische Eigenschaften und Auswirkungen auf die Zellen des Nervensystems.⁶⁰ 1993 konnten Malinski et al. erstmals NO-Konzentrationen im Gehirn messen und nachwei-

sen, dass eine Ischämie des Gehirns einen starken Anstieg von NO in selbem bewirkt.⁶² Diese hohen Konzentrationen führen zu einer zerebralen Schädigung, für die die Inaktivierung von Caspasen und mitochondrialer Komplexe, die Bildung von Peroxynitrite sowie die Aktivierung von Poly-ADP-ribose-Polymerase (PARP) und in Folge dessen weiterer Energiereservenabbau verantwortlich gemacht werden.⁶⁰

Durch die Entwicklung selektiver Enzyminhibitoren und Knock-out Tiere wurde während der letzten Jahrzehnte versucht, die drei verschiedenen Isoformen sowohl hinsichtlich ihrer neuroprotektiven als auch toxischen Wirkungen zu charakterisieren. Die Beobachtungen, dass die Inhibition von nNOS⁶³ und iNOS⁶⁴ - sowie die Verwendung entsprechender Knock-out Tiere - zu kleineren Infarkten nach fokaler zerebraler Ischämie führten, stützten die Vorstellung, dass NO aus diesen Synthesen verantwortlich für die schädigende Wirkung von NO sei. Im Gegensatz dazu zeigten eNOS Knock-out Mäuse größere Infarkte, ein Hinweis darauf, dass diese Synthese die protektive Wirkung von NO vermittelt.⁶⁵

Die Verfügbarkeit von speziellen Knock-out Mäusen und spezifischen Inhibitoren der NO-Synthesen führte dazu, die Rolle der drei Stickstoffsynthesen im Rahmen der ischämischen Toleranz des Gehirns zu erforschen. Dabei lag der Schwerpunkt des Interesses auf der späten ischämischen Toleranz, da von dieser Form der Toleranz eine stabilere und länger anhaltende Wirkung angenommen wurde.

Gidday et al. zeigten 1999 an einem Hypoxiemodell neugeborener Ratten, dass eNOS eine protektive Rolle im Zeitfenster der späten Toleranz einnimmt und für die Vermittlung dieser verantwortlich zu sein scheint.⁵³ Dieses wurde durch Experimente von Lin et al. am gleichen Modell, aber mit unterschiedlichem Stimulus (LPS) bestätigt.⁶⁶ Auch in Maus und Wüstenrennmaus wurde der eNOS vermittelte Effekt der späten IT nachgewiesen.^{67,68} Zu ähnlichen Erkenntnissen gelangten Puisieux et. al, die mithilfe des präkonditionierenden Stimulus LPS und transientser MCAO als Schadensmodell, eNOS abhängige Neuroprotektion im späten Zeitfenster zeigten.⁶⁹ Auch die protektive Rolle von iNOS wurde im späten Zeitfenster durch zahlreiche Studien an unterschiedlichen Organismen, mit unterschiedlichen präkonditionierten Stimuli und unter Verwendung diverser Schadensmodelle untersucht. So konnten Zhao et al.⁷⁰ an neonatalen Ratten und Kapinya et al.⁷¹ in adulten Ratten mit dem Stimulus Isofluran eine Beteiligung der iNOS bei später IT zeigen, während Studien von Cho et al.⁷² und Kunz et al.⁷³ mit Hilfe

von LPS bzw. transienten Episoden von BCCAO auf eine Involvierung der iNOS im späten Zeitfenster bei Mäusen hinweisen.

Im frühen Zeitfenster der ischämischen Toleranz ist die Datenlage, wie bereits angedeutet, deutlich eingeschränkter. Lediglich Studien von Atochin et al.⁷⁴ und Orio et al.⁷⁵ untersuchten spezifisch die Rolle der eNOS und nNOS im Rahmen der frühen zerebralen Präkonditionierung. Beide Studien weisen trotz der Verwendung unterschiedlicher Stimuli und Schadensmodelle darauf hin, dass die protektive Wirkung der frühen IT von eNOS und nNOS abhängt.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über ausgewählte *in-vivo* Studien mit den jeweils verwendeten Organismen, präkonditionierenden Stimuli, Schadensmodellen und untersuchten Stickstoffsynthesen.

Table 2. Selected *in vivo* studies on the involvement of NO in ischaemic tolerance

Species	PC stimulus	Type of PC	Injury model	Presumed source of NO	Reference
Mouse	tMCAO	Early (0.5 h)	pMCAO	eNOS nNOS	Atochin et al. 2003
Mouse	LPS	Early (1 h)	NMDA lesion	eNOS nNOS	Orio et al. 2007
Rat, neonatal	Hypoxia	Late (24 h)	pCCAO and hypoxia	eNOS	Gidday, 2006
Rat, neonatal	Isoflurane	Late (24 h)	pCCAO and hypoxia	iNOS	Zhao et al. 2007
Rat, neonatal	LPS	Late (24 h)	pCCAO and hypoxia	eNOS	Lin et al. 2010
Rat neonatal	Prenatal hypoxia	Late (48 h)	pCCAO and hypoxia	iNOS	Zhao & Zuo, 2005
Rat	Isoflurane	Late (6–24 h)	tBCCAO and pMCAO	iNOS	Kapinya et al. 2002
Mouse	tBCCAO or LPS	Late (24 h)	tMCAO	iNOS	Cho et al. 2005
Mouse	tBCCAO or LPS	Late (24 h)	NMDA lesion	iNOS	Kawano et al. 2007
Mouse	LPS	Late (24 h)	tMCAO	iNOS	Kunz et al. 2007
Rat	Isoflurane	Late (24 h)	pMCAO	iNOS	Chi et al. 2010
Mouse	Hypoxia	Late (24 h)	Subarachnoid haemorrhage	eNOS	Vellimana et al. 2011
Rat	tMCAO	Late (36 h)	tMCAO	iNOS	Wen & Chen, 2007
Mouse	tBCCAO	Late (48 h)	pMCAO	iNOS	Pradillo et al. 2009
Rat	LPS	Late (72 h)	tMCAO	n.d.	Puisieux et al. 2000
Rat	t4VO	Late (72 h)	t4VO	n.d.	Liu et al. 2006
Gerbil	tBCCAO	Late (72 h)	tBCCAO	eNOS	Hashiguchi et al. 2004
Rat	CSD	Late (96 h)	tMCAO	n.d.	Horiguchi et al. 2005

4VO: four vessel occlusion; BCCAO: bilateral common carotid artery occlusion; CCAO: common carotid artery occlusion (unilateral); CSD: cortical spreading depression; MCAO: middle cerebral artery occlusion; PC, preconditioning; tMCAO: transient MCAO; pMCAO: permanent MCAO; n.d.: not determined.

Tabelle 1: Auflistung wichtiger *in-vivo* Studien zur Beteiligung der verschiedenen NO-Synthesen bei früher und später ischämischer Toleranz. Die Tabelle listet für frühe und späte IT *in-vivo* Studien auf, die die Rolle von Stickstoffmonoxidsynthesen untersucht haben. Dabei wird die Vielfalt an eingesetzten Stimuli zur Präkonditionierung und die Anzahl benutzter Schadensmodelle in unterschiedlichen Organismen deutlich. Die Tabelle stellt ebenfalls den Fokus auf das Zeitfenster der späten IT dar. (Iadecola et al. 2011, Neurovascular Protection by ischaemic tolerance: role of nitric oxide⁷⁶)

Eine Übersicht gebende Studie, die die Bedeutung der verschiedenen Stickstoffmonoxidsynthesen in einem einheitlichen, ischämischen Präkonditionierungs- und Schadensmodell im Zeitfenster der frühen ischämischen zerebralen Toleranz beleuchtet, existiert hingegen nicht.

1.4 Aufgabenstellung

Aufgrund der stark eingeschränkten Therapiemöglichkeiten des ischämischen Schlaganfalls und der notwendigen Suche nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten war es Aufgabe dieser Arbeit, die Grundlagen der frühen ischämischen Toleranz genauer zu untersuchen und zu charakterisieren. Dafür sollte mithilfe der BCCAO erstmals ein globales, ischämisches Präkonditionierungsmodell im frühen Zeitfenster der IT etabliert und mithilfe einer transienten MCAO an C57BL6 Mäusen getestet werden. Darüberhinaus stand vor allem die Rolle von Stickstoffmonoxid als einem potenziell wichtigen Vermittler dieses Effekts im Mittelpunkt der Arbeit. Hierzu setzten wir den Fokus zunächst auf Untersuchungen zu eNOS und nNOS, da diese Isoformen als konstitutionell beschrieben sind und somit eine Involvierung dieser NO-Synthesen wahrscheinlicher ist, als eine Involvierung der iNOS.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

1. Erfüllt das von uns verwendete Protokoll der BCCAO als Präkonditionierungsmethode die Voraussetzung eines nicht schädigenden Stimulus?
2. Lässt sich durch dieses BCCAO-Protokoll frühe ischämische Toleranz induzieren und wenn dies der Fall ist, welches ist das optimale Zeitfenster zwischen präkonditionierendem und schädigendem Stimulus?
3. Ist frühe ischämische Toleranz in dem gefundenen Zeitfenster unabhängig von der *de-novo* Proteinsynthese?
4. Spielt die endotheliale NO-Synthase (eNOS) eine Rolle im Zeitfenster der frühen IT?
5. Spielt die neuronale NO-Synthase (nNOS) eine Rolle im Zeitfenster der frühen IT?

2 Methoden

Anmerkung: Eine detaillierte, schrittweise Beschreibung sowie ein Video der verwendeten Methoden MCAO, BCCAO und LDF-Messung, befindet sich auch auf der Internetseite des Journal Of Visualized Experiments (JOVE) unter dem Titel: „*Bilateral Common Carotid Artery Occlusion as an Adequate Preconditioning Stimulus to Induce Ischemic Tolerance to Focal Cerebral Ischemia*“ (siehe Publikationsliste).

2.1 Versuchstiere und Haltung

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem aktuellen Tierschutzgesetz und mit Genehmigung des „Landesamtes für Gesundheit und Soziales – Berlin“ (Aktenzeichen G0345/09, genehmigt am 9.12.2009) durchgeführt. Die erforderlichen Tierschutzkurse wurden erfolgreich absolviert. Bei der Durchführung der Versuche wurden die „Standard Operating Procedures“ (SOP) der Klinik für Experimentelle Neurologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin eingehalten.⁷⁷ Die Versuche zu den Fragestellungen 1,2,3 und 5 wurden an C57BL/6 Wildtypmäusen mit einem Gewicht von 21-26g durchgeführt (Lieferant: Charles River, Deutschland). Für die Beantwortung der Fragestellung 4 wurden eNOS Knock-out Mäuse (Nos^{3tm1Unc}/J; Lieferant: Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM), Charité-Universitätsmedizin Berlin, Deutschland) verwendet. Als Kontrolltiere wurden ebenfalls C57BL/6 Wildtypmäuse bzw. eNOS Knock-out Mäuse (Fragestellung 4) benutzt. Alle Tiere wurden rechtzeitig von den Lieferanten bestellt und im Tierstall der Klinik für Experimentelle Neurologie mindestens zwei Wochen vor Verwendung eingeliefert, um eine gute Adaptation der Tiere an die Umgebung des Tierstalls zu gewährleisten.

Die Versuchstiere wurden unter einem kontrollierten 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und hatten jederzeit Zugang zu standardisierter Nahrung (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser. Käfige wurden unter Einhaltung der Vorgaben mit Versuchstieren bestückt und enthielten bis auf einen einfachen Unterschlupf, etwas Nestmaterial und einer kleinen Plastikröhre keine weitere Ausstattung.

2.1.1 Postoperative Versorgung der Versuchstiere

Unmittelbar nach jeder chirurgischen Intervention wurden die Tiere nach Wundverschluss und Applikation der lokalen Analgesie in eine auf 30°C vorgeheizte Aufwachbox transferiert (MediHEAT, Peco Services Ltd. Brough, Cumbria, Großbritannien). Dort erwachten sie aus der Narkose und wurden beobachtet. Sobald die Tiere vollständig aus der Narkose erwacht waren, ihre Bewegungen denen nicht narkotisierter Tiere glichen und sie wieder ihre vollständige Darm- und Blasenkontinenz erlangt hatten, wurden sie in ihren ursprünglichen Käfig zurückgesetzt.

Dort erhielten die Tiere postoperativ vereinfachten, ebenerdigen Zugang zu aufgeweichter Nahrung und einen verlängerten Trinkansatz ihrer Käfigflasche, um das Fress- und Trinkverhalten anzuregen und einen erhöhten Gewichtsverlust zu vermeiden. Nach Durchführung operativer Maßnahmen wurden die Tiere täglich visitiert, gewogen und mithilfe des nach Bederson et al.⁷⁸ modifizierten Tests auf funktionelle Defizite und Abbruchkriterien untersucht.

Die Testung des funktionellen Defizits wurde erstmals von Bederson et al. an Ratten nach MCAO beschrieben. Die Anwendung des Tests an Mäusen ist aber ebenfalls etabliert. Dabei unterteilten wir durch Hochheben der Tiere am Schwanz und Untersuchung der motorischen Reaktion das funktionelle Defizit in Stufen von leicht (1 Punkt) bis schwer (3 Punkte). Bei Flexion der vorderen Extremität erfolgte die Zuordnung eines leichten Defizits (1 Punkt). Ein mittleres Defizit (2 Punkte) wurde den Tieren zugeordnet, wenn sie sich nach dem Erwachen aus der Narkose aufgrund der Hemiparese nur zirkulierend fortbewegten. War neben dem Drehen der Tiere im Kreis zusätzlich zu beobachten, dass ein leichter lateraler Stoß zum Umfallen der Tiere führte, wurde ihnen ein schweres Defizit zugeordnet (3 Punkte).

Tiere, die bei der täglichen Untersuchung einen der folgenden Punkte erfüllten, wurden umgehend und schmerzfrei unter Vollnarkose getötet.

- Gewichtsverlust von mehr als 20% des präoperativ bestimmten Körpergewichts
- Durch Schlaganfall bedingte starke Bewegungslosigkeit
- Offensichtliche Schmerzen

- Prolongierte Apathie oder Nahrungsverweigerung (d.h. länger als 24h nach MCAO anhaltend)
- Wiederholt große epileptische Anfälle

Bei anderen oder weiteren Auffälligkeiten wurde gemäß der „*Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere*“ verfahren (siehe Anhang 1).

2.2 Prächirurgische Maßnahmen

2.2.1 Präparation der Monofilamente

Vor den chirurgischen Interventionen wurden die benötigten Monofilamente für die MCAO eigenhändig nach folgenden Schritten hergestellt:

Ein langes 8-0 Seidenmonofilament (Feuerstein Suprama, Berlin, Deutschland) wurde unter dem Mikroskop (Stemi 2000 C, Zeiss) mithilfe eines Skalpell in mehrere exakt 13mm messende Filamente zugeschnitten.

Die erstellten Monofilamente wurden sodann mit einer Pinzette durch eine Mischung aus Silikonabformmaterial (Xantopren M mucosa, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) und zugehörigem Aktivator (Aktivator Universal Plus, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) gezogen. Dabei wurde genauestens auf eine gleichmäßige Bedeckung der Filamente mit dem Silikon geachtet und überschüssiges Silikon durch gleichmäßiges Ziehen des Monofilaments über eine Papierunterlage abgestreift. Auf diese Weise wurden Monofilamente mit einem Durchmesser von ca. 200 µm erstellt. Die beschichteten Monofilamente wurden anschließend senkrecht mit dem silikonfreien Ende in Modellierknete gesteckt und für mindestens 12 Stunden zum Trocknen und Aushärten der Silikonbeschichtung aufbewahrt.

2.2.2 Chirurgische Instrumente

Für alle chirurgischen Prozeduren wurden folgende Instrumente benutzt:

<i>Name des Instruments</i>	<i>Firma</i>	<i>Katalog-Nr.:</i>
Schere	Fine Science Tools	91460-11
Dumont Pinzette #5	Fine Science Tools	11251-10
Dumont Pinzette #7	Fine Science Tools	11271-30
Mikrogefäßklemme	Fine Science Tools	00398-02
Gefäßklemmenapplikator	Fine Science Tools	00072-14
Mikrochirurgische Federschere	Fine Science Tools	15372-62
Nadelhalter	Fine Science Tools	12010-14
Nadeln	Feuerstein, Suprama	BER 562-20

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten chirurgischen Instrumente.

Alle Instrumente wurden stets in 70% Ethanol aufbewahrt und vor jeder neuen chirurgischen Intervention genauestens mit 70% Ethanol gereinigt, um eine möglichst keimfreie Operation zu gewährleisten.

2.2.3 Aufbau des chirurgischen Arbeitsplatzes

Alle mit Versuchstieren in Zusammenhang stehenden Experimente und Arbeiten wurden im *in-vivo* Labor der Klinik für Experimentelle Neurologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin nach klinikinternen „*Standard Operating Procedures*“⁷⁷ durchgeführt. Die Arbeitsplatzanordnung bestand aus: Operationsmikroskop (Stemi 2000 C, Zeiss) mit externer Lichtquelle (SteReo CL 1500 ECO, Zeiss), Stereotaktischem Rahmen (Model 930, David Kopf, Californien, USA), einer beheizbaren Unterlage (Katalog-Nr. 21061-10, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) mit rektaler Temperatursonde, einem Isofluranvernebler (Dräger, Lübeck, Deutschland) mit zusätzlicher Distickstoffmonoxid und Sauerstoffzufuhr sowie einer Absauganlage für eventuell austretende Narkosegase (vergleiche auch Abbildung 3).

Arbeitsplatz und Geräte wurden vor und nach jeder Benutzung gesäubert und desinfiziert, um eine möglichst keimfreie Umgebung zu garantieren.



Abbildung 3: Tierexperimenteller Arbeitsplatz. Das Foto zeigt eine Übersichtsaufnahme des experimentellen Arbeitsplatzes mit Anordnung der wichtigsten Messeinheiten und Instrumente, wie sie für die Durchführung der Versuche gebraucht wurden. Von oben nach unten sind die Messeinheit für die rektale Temperatur (inklusive des Temperaturreglers für die Heizmatte) (1), die Messeinheit des Laser-Dopplersignals (2), die Narkosegasmischeinheit (3), das Operationsmikroskop (4), die Stoppuhr (5), die Zuführung der Narkosegase zur Gesichtsmaske (6), die Absaugvorrichtung für austretende Narkosegase (7), die Heizmatte (8), der rektale Temperaturfühler (9), der stereotaktische Rahmen (10), sowie die chirurgischen Instrumente (11) zu erkennen.

2.2.4 Vorbereitung und Narkose der Versuchstiere

Für die Experimente wurden immer Gruppen von 10 Tieren aus dem Tierstall entnommen und einem Versuch zugeführt. Der Transfer vom Tierstall in das *in-vivo* Labor erfolgte dabei rechtzeitig, um den Tieren eine möglichst lange Gewöhnung an die Laborumgebung zu ermöglichen. Die Tiere wurden sodann einzeln aus dem Käfig entnommen, gewogen und die Narkose eingeleitet. Als Narkose wurde ein Gasgemisch aus 70% Distickstoffmonoxid (Lachgas), 30% Sauerstoff und 3% Isofluran zur Einleitung bzw. 1,5% Isofluran zur Aufrechterhaltung genutzt. Zur Einleitung wurden das Gasgemisch über eine große Perfusorspritze in welche die Tiere vorsichtig eingelegt wurden zugeführt und das Gas so von den Tieren inhaliert (siehe Abbildung 4).

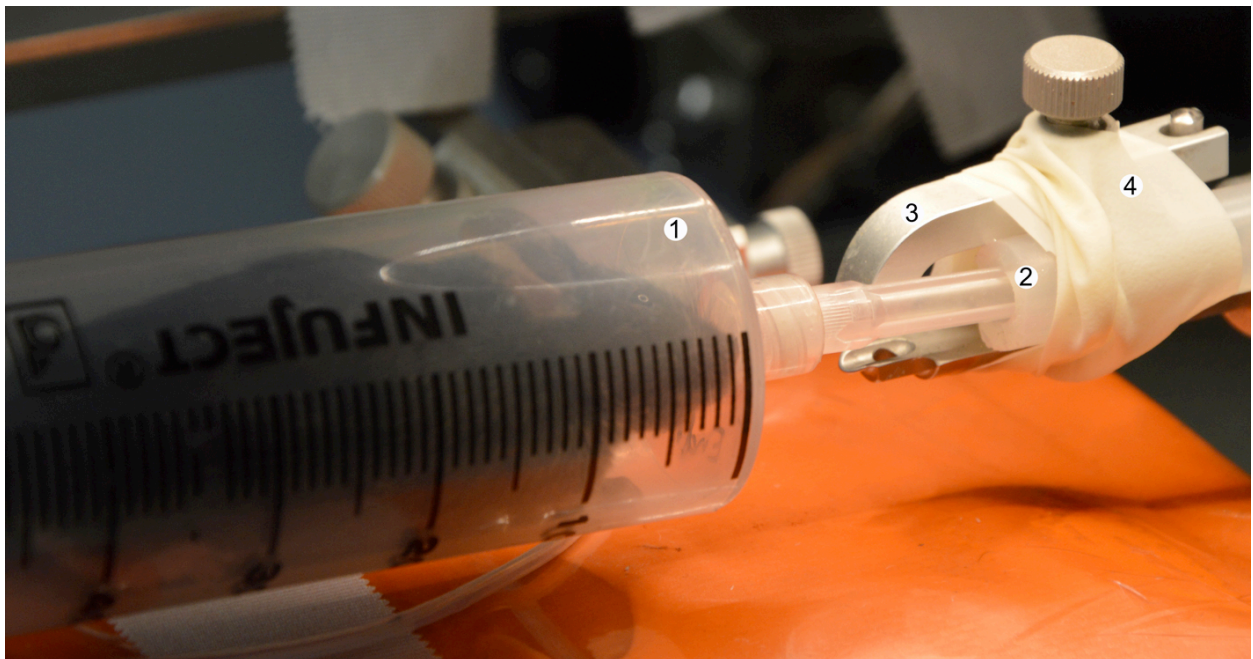


Abbildung 4: Narkoseeinleitung der Versuchstiere. Das Foto zeigt die in die Perfusorspritze (1) eingelegte Maus zur Narkoseeinleitung. Die Narkosegase werden über einen flexiblen Schlauch (2) in den die Spritze eingesteckt wird zugeleitet. Desweiteren sind das Bissgestell des stereotaktischen Rahmens (3), sowie die zurückgeschobene Latexnarkosemaske (4) zu erkennen, welche Nase und Mund der Maus, sowie Bissgestell und Narkosegasschlauch nach Ende der Einleitung und Einspannen der Maus in den stereotaktischen Rahmen umschließt.

Nach der Einleitung wurden die narkotisierten Tiere aus der Spritze entnommen und im stereotaktischen Rahmen auf der Heizmatte in Rückenlage optimal fixiert. Die Narkosegase wurden über eine aus einem Latexfingerling gebastelte Gesichtsmaske direkt vor Mund und Nase des Tieres geleitet. Dabei wurde die Narkose stets so eingestellt, dass eine ausreichende Spontanatmung der Tiere mit einer Atemfrequenz von 90-120 pro Minute sichergestellt war. Das Fell im Operationsgebiet wurde gründlich mit 70% Ethanol gereinigt und desinfiziert, jedoch nicht rasiert, um Mikroläsionen und damit Infektionen der Haut im Operationsgebiet zu vermeiden.⁷⁹

2.3 Chirurgische Maßnahmen

2.3.1 Laser-Doppler-Flussmessungen

Die Laser-Doppler-Flussmessung (LDF) ist heutzutage ein sehr gut etabliertes und anerkanntes Verfahren, um relative, semiquantitative Unterschiede in der Durchblutung regionaler Hirnareale vor und nach Verschluss zuführender Arterien zu untersuchen.⁸⁰ Wir verwendeten LDF an repräsentativen Gruppen von Versuchstieren zur Messung der erfolgreichen Reduktion der relativen zerebralen Durchblutung unter BCCAO und MCAO. Dazu wurden die narkotisierten Tiere in Bauchlage unter dem Mikroskop fixiert (siehe 2.2.4) und mit einem ca. 1cm langen sagittalen Schnitt die Kopfhaut eröffnet. Nach Präparation der Schädelkalotte und Darstellung der Sutura coronalis und Sutura sagittalis wurde eine fiberoptische Sonde (siehe Abbildung 5) ca. 2mm posterior und 5mm lateral des Bregmas mit Hilfe von Zweikomponentenkleber fixiert (siehe Abbildung 6) und mit einem Laser-Doppler-Flussmessgerät (Periflux System 5000, Perimed, Järfälla, Schweden) per Adapter (MasterProbe 418-1, Perimed, Järfälla, Schweden, vergleiche Abbildung 5) verbunden. Die Kopfhaut wurde bestmöglich um die Sonde herum adaptiert, um eine Hypothermie des Gehirns zu verhindern. Zur Messung der regionalen zerebralen Durchblutung unter BCCAO oder MCAO wurde die Maus dann in Rückenlage gebracht und der Verlauf der relativen Durchblutung kontinuierlich mithilfe eines an das Flussmessgerät angeschlossenen Laptops und der Software Perisoft (Perimed, Järfälla, Sweden) aufgezeichnet.

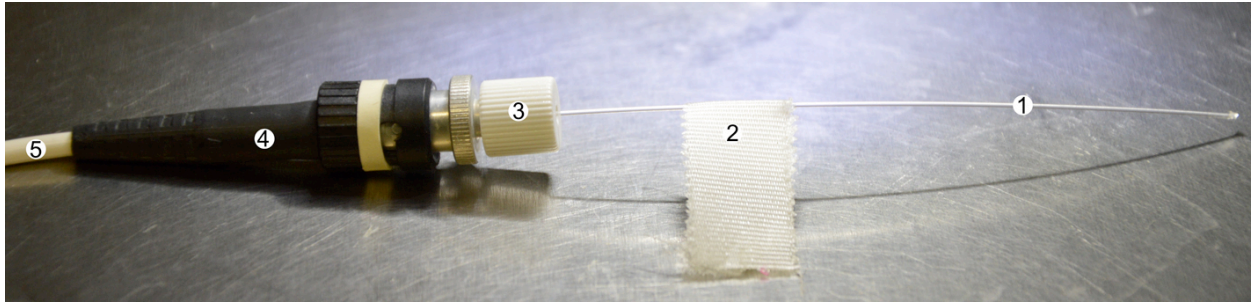


Abbildung 5: Fiberoptische Sonde und Adapter. Das Foto zeigt die fiberoptische Sonde (1), die zur besseren manuellen Positionierung auf der Schädelkalotte mit einem Klebestreifen (2) versehen ist. Die Sonde ist durch den weißen Schraubring (3) im Adapter (4) fixiert, sodass das optische Signal über die Sonde, den Adapter und schließlich das Kabel (5) zur Laser-Doppler-Messeinheit (vergleiche Abbildung 3) geleitet wird.

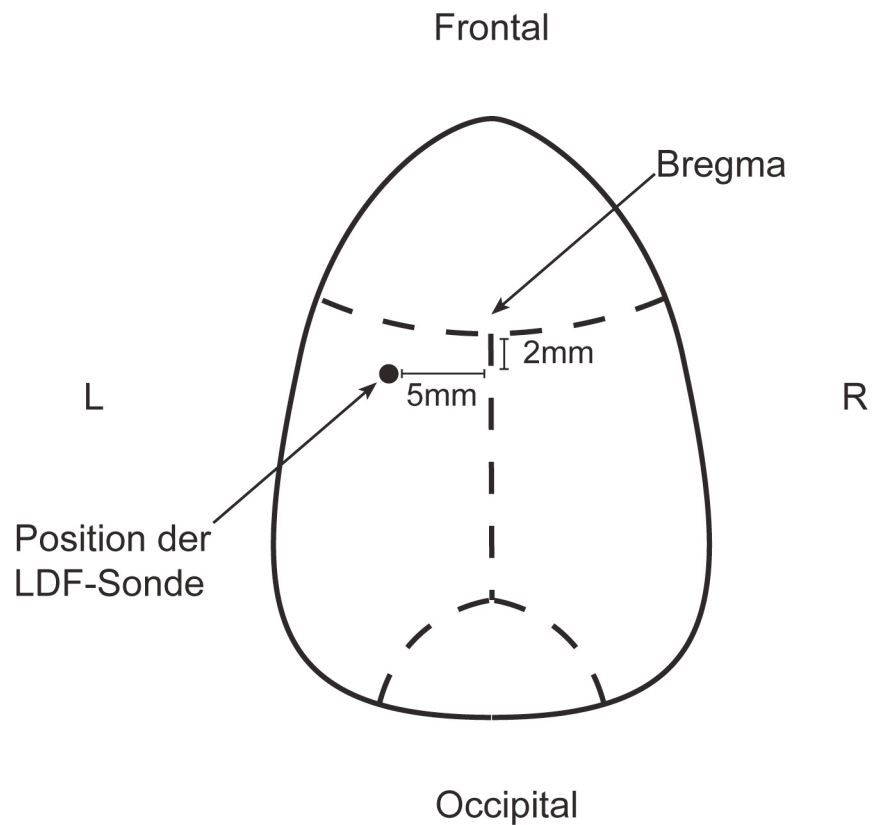


Abbildung 6: Position der fiberoptischen Sonde in Bezug zum Bregma. Die Schemazeichnung skizziert die Position der fiberoptischen LDF-Sonde auf der Schädelkalotte des Versuchstieres in Bezug zum Bregma. Die Blickrichtung des Betrachters ist dabei von oben auf den Schädel gerichtet.

2.3.2 Das BCCAO-Präkonditionierungsmodell

Die Verwendung der BCCAO (engl.: bilateral common carotid artery occlusion) als Technik zur ischämischen Präkonditionierung findet in Studien zur späten IT eine breite und zufriedenstellende Anwendung mit belastbaren Ergebnissen und signifikanter Reduktion des Infarkt volumens.⁷² Aus diesem Grund und aufgrund der Tatsache, dass ein globaler, ischämischer Stimulus im frühen Zeitfenster noch nicht angewendet wurde, entschlossen wir uns zur Erprobung der BCCAO im frühen Zeitfenster der IT.

Zur Durchführung der Präkonditionierung wurden die Tiere narkotisiert und unter dem Mikroskop auf einer Wärmeplatte in einem stereotaktischen Rahmen fixiert (siehe 2.2.4). Über eine mediane längliche Halsinzision von ca. 1,5 cm wurde der Hautmantel eröffnet und das subkutane Bindegewebe gelöst. Beide nun sichtbare Speicheldrüsen wurden in der Medianlinie separiert und mobilisiert, sodass sie nach lateral rotiert werden konnten und damit den Blick auf beide Carotislogen freigaben. Beidseits wurde die Arteria carotis communis unter Schonung des jeweiligen Nervus vagus und der Vena jugularis interna mobilisiert und mit einem Seidenfaden der Stärke 5-0 (alle Fäden Feuerstein-Suprama, Berlin, Deutschland) locker angeschlungen, sodass der Blutfluss nicht unterbrochen wurde. Dabei wurde streng darauf geachtet, eine Manipulation am Nervus vagus zu vermeiden, um keine signifikanten Herzrhythmusstörungen oder einen Herzstillstand zu erzeugen.

Zur Schonung der Arteria carotis communis und zum leichteren Wiedereröffnen des Knotens beim nun folgenden wiederholten Unterbinden des Blutflusses wurde beidseits ein kleiner Silikonschlauch zwischen Arteria carotis communis und Faden eingelegt (Abbildung 7). Die Schlaufen um beide Arterien wurde zugezogen und der Blutfluss somit für eine Minute unterbrochen. Danach erfolgte die Wiedereröffnung des Knotens zur zerebralen Reperfusion für fünf Minuten. Dieses Vorgehen wurde zweimal wiederholt und damit die zerebrale Durchblutung via der Carotiden für insgesamt dreimal eine Minute mit jeweils fünfminütiger Reperfusion unterbrochen.

Während der Operation wurden die Speicheldrüsen und Halsweichteile mit NaCl befeuchtet, um ein Austrocknen zu vermeiden. Abschließend wurden Fäden und Silikonschläuche entfernt, die Speicheldrüsen wieder in ihre anatomisch korrekte Lage gebracht und der Hautschnitt durch Naht verschlossen. Es erfolgte postoperative Analgesie mit lokalem Xylocain (Xylocain Gel 2%, Astra Zeneca GmbH, Wedel, Deutschland). Anschließend wurden die Tiere in die geheizte Aufwachbox gelegt und wie in 2.1.1 verfahren.

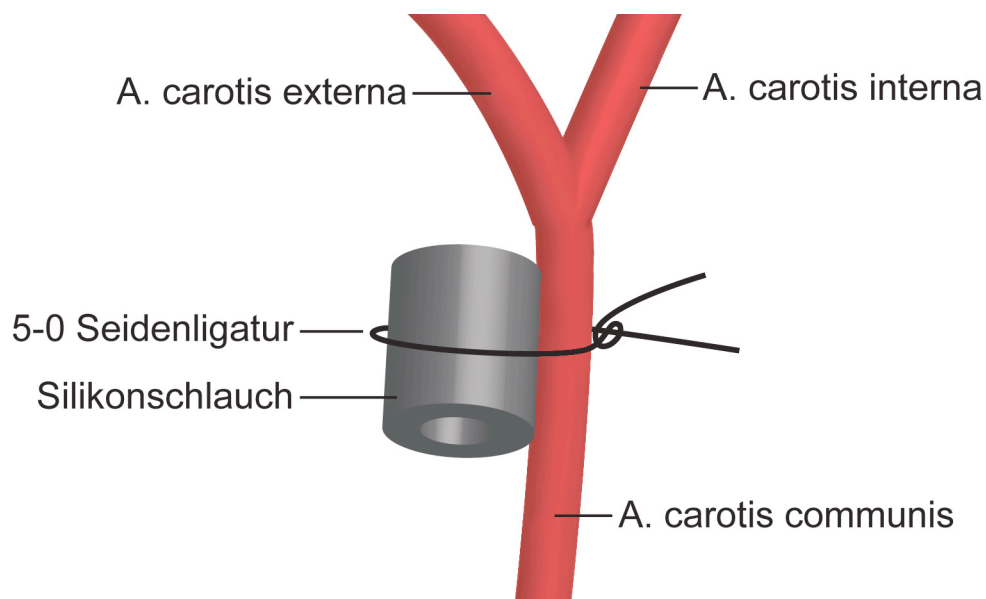


Abbildung 7: Dreidimensionale Darstellung der BCCAO. Die Darstellung zeigt modellhaft die Gabelung der A. carotis communis in A. carotis externa und A. carotis interna sowie den zur Schonung der A. carotis communis eingebrachten Silikonschlauch. A. carotis communis und Silikonschlauch werden von einer 5-0 Seidenligatur umfasst, die durch Schließen des Knotens Silikonschlauch und Gefäß zusammenzieht und so den Blutfluss in der A. carotis communis unterbricht.

2.3.3 Sham-Präkonditionierung

Sham (engl.: Schein)-Präkonditionierungen waren nötig, um den Effekt der BCCAO zu untersuchen und Effekte durch Narkose oder Inzisionstrauma ausschließen zu können. Zur Durchführung einer Sham-Präkonditionierung wurden die Versuchstiere wie bei einer BCCAO vorbereitet und eine mediane Halsinzision vorgenommen. Die Speicheldrüsen wurden ebenfalls nach lateral mobilisiert. Die Carotislogen wurden dagegen nicht berührt, um keine Unterbrechungen der zerebralen Durchblutung hervorzurufen. Die Narkosezeit der Sham-Tiere war identisch mit denen der BCCAO-Tiere. Die Weichteile wurden während der Narkosezeit mit NaCl befeuchtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Am Ende erfolgte der Wundverschluss per Naht und postoperatives Schmerzmanagement mit lokalem Xylocain analog zu 2.3.2. Auch das postoperative Management verlief wie in 2.1.1 beschrieben.

2.3.4 Das MCAO-Fadenmodell

MCAO (engl.: middle cerebral artery occlusion) ist ein in der Schlaganfallforschung bekanntes und viel verwendetes Modell zur Erzeugung fokaler zerebraler Ischämien mit vorhersagbarer Lokalisation und Größe.^{81,82}

Die Anästhesie und Vorbereitung der Mäuse erfolgte wie unter 2.2.4 beschrieben. Die unter 2.3.2 bzw. 2.3.3 beschriebenen Schritte zur Eröffnung des ventralen Halses entfielen, da kurz vor der MCAO eine BCCAO oder Sham-Präkonditionierung durchgeführt wurde, sodass durch erneutes Öffnen der Hautnaht ein schneller Zugang zur Arteria carotis communis gewährleistet war.

Nach Präparation der linken Carotisloge wurde die Arteria carotis communis sowie die Arteria carotis externa dauerhaft mit einer 7-0 Ligatur verschlossen. Der Verlauf der Arteria carotis interna wurde vorsichtig bis zur Abzweigung der Arteria pterygopalatina dargestellt. Mithilfe des mikrovaskulären Gefäßclips (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) wurde die Arteria carotis interna distal der Carotis communis Bifurkation temporär verschlossen. Außerdem wurde ebenfalls eine 5-0 Seidenligatur locker um die Arteria carotis interna geschlungen (Abbildung 8).

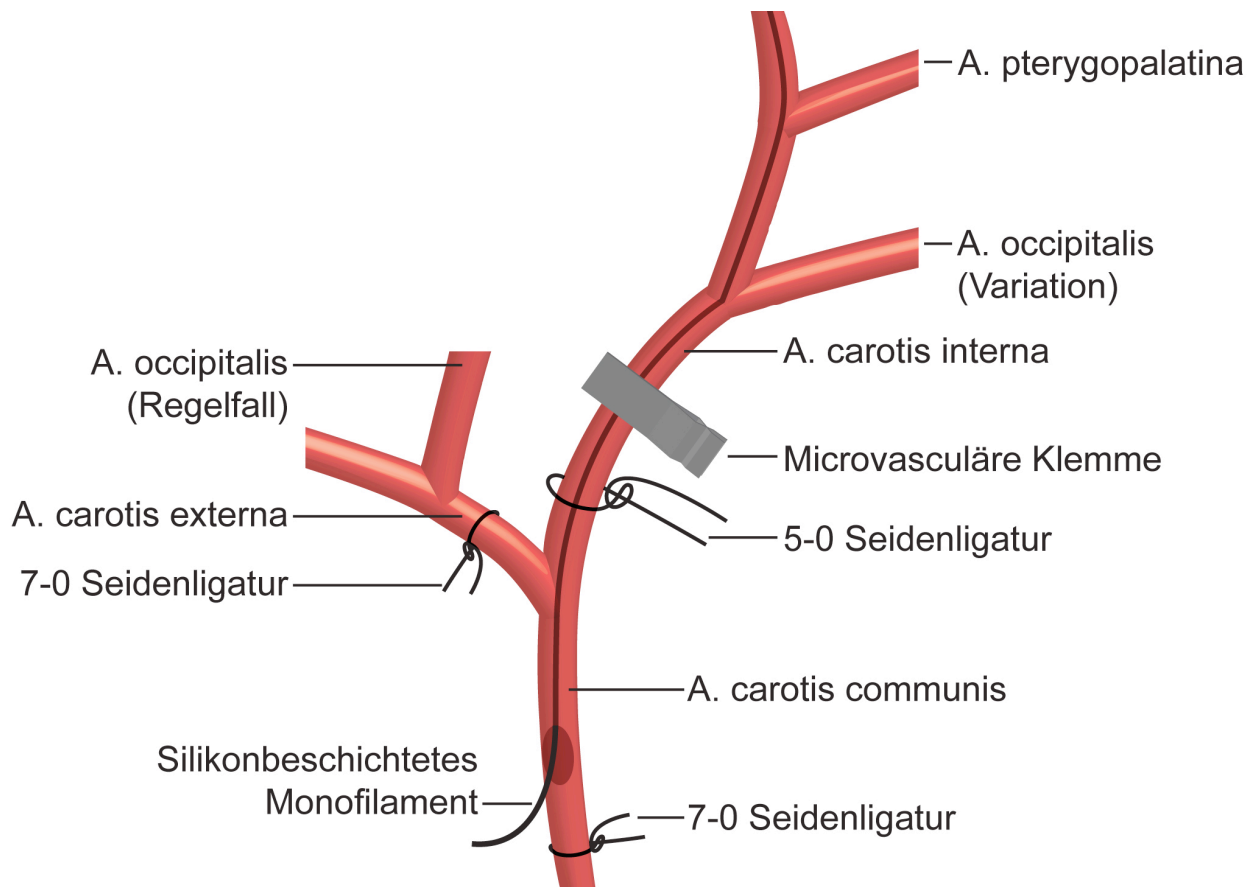


Abbildung 8: Dreidimensionale Darstellung der MCAO. Die Darstellung zeigt die Aufzweigung der A. carotis communis, A. carotis externa und A. carotis interna. Der Abgang der A. occipitalis ist mit dem von uns beobachteten Regelfall und der ebenfalls beobachteten anatomischen Variation gezeigt. Die Inzisionsstelle für das silikonbeschichtete Monofilament liegt proximal der Bifurkation. Dargestellt ist der Verlauf des Filaments durch die A. carotis communis und A. carotis interna zum Circulus willisi (nicht abgebildet), wo es den Abgang der Arteria cerebri media verlegt (nicht abgebildet). Desweiteren sind die permanenten 7-0 Ligaturen um A. carotis communis und A. carotis externa gezeigt sowie die temporäre Unterbindung der A. carotis interna bzw. deren temporäre Unterbindung durch eine microvasculäre Klemme.

Nun erfolgte die Inzision der A. carotis communis leicht proximal der Carotisbifurkation und ein Monofilament wurde intraluminal bis zur Gefäßklemme vorgeschoben. Durch Öffnen des Gefäßclips und gleichzeitiges Vorschieben des intraluminalen Fadens wurde dieser bis zum Erreichen eines Anschlags so weit wie möglich vorgeschoben und mithilfe der 5-0 Ligatur in der proximalen A. carotis interna fixiert. Eine visuelle Kontrolle der Abgänge der Arteria occipitalis und Arteria pterygopalatina stellte sicher, dass das Monofilament über die A. carotis interna in den Circulus willisi eingebracht wurde. War dies nicht der Fall, so wurde das Monofilament durch vorsichtiges Zurückziehen und Vorschieben an den Abgängen der Arteria occipitalis und pterygopalatina vorbei gelenkt, um es sicher in die A. carotis interna einzubringen. Über den Circulus willisi wird auf

diesem Weg der Abgang der Arteria cerebri media durch das Monofilament verschlossen. Die LDF-Messungen an einer repräsentativen Gruppe von Versuchstieren zeigte, dass durch dieses Vorgehen ein sicheres Verschließen der MCA auch ohne visuelle Kontrolle des Abgangs der MCA möglich war und eine ausreichende Reduktion der zerebralen Durchblutung beobachtet werden konnte (vergleiche Abbildung 13).

In dieser Position wurde das fixierte Monofilament für 45 Minuten belassen, die Wunde verschlossen und das Tier in eine auf 30°C vorgeheizte Aufwachbox (vergleiche 2.1.1) transferiert. Nach 45 Minuten erfolgte die erneute Anästhesie des Versuchstieres wie in 2.2.4 beschrieben. Der 5-0 Fixierungsfaden wurde geöffnet und das intraluminale Filament entfernt. Um retrograden Blutverlust über die Inzision der Arteria carotis communis zu verhindern, wurde anschließend die proximale Arteria carotis interna dauerhaft ligiert. Es erfolgte der endgültige Wundverschluss und postoperatives Schmerzmanagement mit lokalem Xylocain, wie in 2.1.1 beschrieben.

2.4 Postchirurgische Maßnahmen

2.4.1 Probengewinnung und Aufbereitung

Zweiundsiebzig Stunden nach MCAO wurden die Versuchstiere in tiefer Narkose durch Dekapitation getötet, die Schädelkalotte entfernt und das Großhirn zusammen mit dem Kleinhirn entnommen. Das entnommene Gewebe wurde bei ca. -40°C in Methylbutan schockgefroren und zur weiteren Bearbeitung im Tiefkühlschrank bei -20°C zwischengelagert. Wir nutzten das 72 Stunden Zeitfenster nach MCAO zur Probengewinnung, da das zerebrale Ödem ab diesem Zeitpunkt maximal ist und dieses zur korrekten Berechnung des Infarktolumens berücksichtigt werden muss (vergleiche 2.4.3).⁸³ Mithilfe eines Kryostaten (CM 1950, Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden 20 µm dicke Gehirnschnitte des Großhirns angefertigt. In einem Kollektionsintervall von 600 µm wurden Schnitte des jeweiligen Mäusegehirns auf Objektträger aufgezogen und zur Färbung bereitgestellt. Angefertigte Schnitte, die nicht umgehend einer Hämatoxylinfärbung zugeführt wurden, wurden zur Aufbewahrung bei -20°C gelagert und somit kryofixiert.

2.4.2 Histologische Färbungen

2.4.2.1 Hämatoxylin-Färbung

Für die Beantwortungen aller Fragestellungen, deren Endpunkt der Vergleich von Schlaganfallvolumina darstellte (alle bis auf Fragestellung 1), wurden die angefertigten Schnitte einer modifizierten Hämatoxylinfärbung nach Papanicolaou unterzogen. Wir verwendeten folgendes Protokoll:

1. Entwässerung der Schnitte in 100% Ethanol für 10 Minuten
2. Spülen der Schnitte in destilliertem Wasser
3. Färbung der Schnitte in Hämatoxylin in Anlehnung an Papanicolaou (Papanicolaou Lösung, 1a Harris´hematoxylin Lösung, Merck, Darmstadt, Deutschland) für 5 Minuten
4. Spülen der Schnitte in destilliertem Wasser
5. Spülen in 0,1 % HCL Lösung
6. Spülen der Schnitte in destilliertem Wasser
7. Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 3 Minuten
8. Spülen der Schnitte in destilliertem Wasser
9. Aufsteigende Entwässerung durch Spülen in 70%, 90% und 100% Ethanol
10. Fixierung mit Rotihistol® (Carl Roth GmbH u. Co KG, Karlsruhe, Deutschland)
11. Eindecken der gefärbten Schnitte mit Vitro-Clud® (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)

Bei 10-facher bis 40-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop stellten sich nach erfolgreicher Färbung intakte, nicht ischämische Hirnareale in der typischen blau-violetten Färbung dar, weil in diesen Bereichen die Zellkerne intakt waren und somit Hämatoxylin binden konnten. Im Bereich der fokalen Ischämie kam es zum Untergang der Zellkerne, sodass Hämatoxylin weniger stark gebunden wurde und diese Areale somit transparenter erschienen. Durch diese einfache Färbung ließ sich folglich eine scharfe Grenze zwischen ischämischen und intakten Gehirnarealen definieren (Abbildung 9).

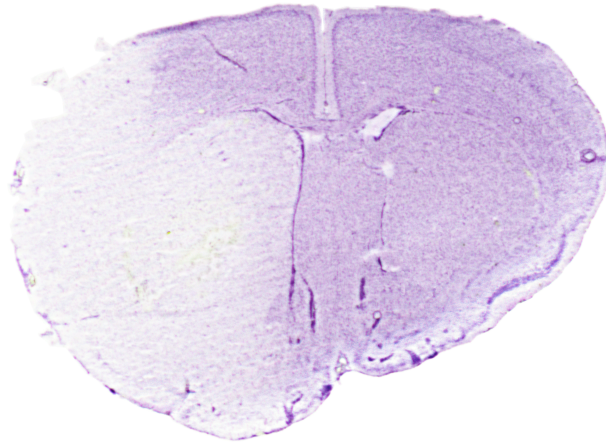


Abbildung 9: Nach Hämatoxylin-Protokoll gefärbter Gehirnschnitt. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen, kryofixierten und mit Hämatoxylin gefärbten Schnitt durch das Gehirn einer MCAO operierten Maus. Es ist deutlich die Grenze zwischen ischämischen (geringere Anfärbbarkeit) und nativen (starke Anfärbbarkeit) Arealen zu erkennen. Die Färbung nach dieser Methode ermöglicht das Vermessen des ischämischen und nativen Gewebes, wie es in 2.4.3 beschrieben wird.

2.4.2.2 TUNEL-Färbung

Zur Beantwortung der ersten Fragestellung benutzten wir die TUNEL-Färbung. TUNEL (engl.: TdT-mediated dUTP nick end labeling) ist eine Färbemethode zur Darstellung apoptotischer Zellen. Das Enzym TdT (engl.: terminal desoxynucleotidyl transferase) knüpft an die durch Apoptose fragmentierten DNA Stränge spezifische dUTP-Nukleotide, welche z.B. mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind und anschließend in weiteren Schritten unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können.⁸⁴ Wir nutzten das Färbeset Apop Tag Red® (Merck Millipore, Billerica, USA) und verwendeten folgendes Protokoll an Kryoschnitten von Tieren (n=10), die einer BCCAO unterzogen wurden, sowie an nativen Gehirnschnitten (n=10).

1. Alle Lösungen aus dem Färbekit auf Eis stellen
2. Kryoschnitte auf Raumtemperatur erwärmen lassen und in 1% Paraformaldehyd (PFA) stellen (10 Minuten)
3. Schnitte in PBS stellen (10 Minuten)
4. Danach für 5 Minuten mit Ethanol-Eisessig (2:1; -20°C) behandeln
5. Schnitte in PBS (engl. Phosphate buffered saline) stellen (10 Minuten)
6. Flüssigkeit von Objektträger abklopfen und Schnitte mit PAP-Stift umfahren

7. Schnitte in Equilibrationspuffer stellen (10 Minuten bei Raumtemperatur)
8. TdT-Enzym (Ansatz 30%TdT-Enzym, 70% Reaktionspuffer) auf die Schnitte geben, mit Coverslips abdecken und für 1 Stunde bei 37°C inkubieren
9. Für Negativkontrollen im Ansatz 30% PBS statt TdT verwenden
10. Stopp-Puffer (Ansatz 68ml Aqua dest., 2ml Stopp-Lösung) für 10 Minuten bei Raumtemperatur dazugeben
11. Schnitte drei Mal in PBS waschen
12. Alpha-Dig hinzugeben (Ansatz 53% Blocking-Lösung, 47% Alpha-Dig) und bei Dunkelheit für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
13. Prolong Diamidinphenylindol (DAPI) auftauen
14. Schnitte drei Mal in PBS waschen
15. Schnitte ein Mal kurz in Aqua dest. waschen
16. Schnitte mit Prolong und DAPI eindecken

2.4.3 Berechnung der Schlaganfallvolumina

Zur Vermessung der Schlaganfallvolumina wurden die Objektträger mit den Hämatoxylin gefärbten Schnitten auf einen Leuchttisch (Northern Light Precision Illuminator, Model R 95, InterFocus Imaging Ltd, Cambridge, Großbritannien) gelegt und mit einer Kamera (Photometrics, Tucson, USA) digitalisiert. Mithilfe der Software MCID CoreTM 7.0 Rev.2.0 (InterFocus Imaging Ltd, Cambridge, Großbritannien) wurden die ischämischen, weniger gefärbten Areale eines jeden Gewebeschnittes manuell umrandet und die Fläche mithilfe der Software berechnet. Durch Eingabe der Schnittdicke und des Kollektionsintervalls (siehe 2.4.1) wurde das Volumen des infarzierten Gewebes berechnet. Analog wurde das Volumen der nichtinfarzierten Gehirnbereiche bestimmt. Da es unter der fokalen zerebralen Ischämie zu einem relevanten Hirnödem im Bereich des ischämischen Gewebes kommt, mussten die ermittelten Volumina des ischämischen Gewebes um das Volumen des Hirnödems korrigiert werden. Aus diesem Grund entnahmen wir die Gehirne erst 72 Stunden nach MCAO, da zu einem früheren Zeitpunkt das zerebrale Ödem noch nicht voll ausgeprägt gewesen wäre. Das Volumen des ischämischen Gewebes wäre ansonsten größer als tatsächlich vorhanden angenommen worden.⁸⁵ Zusammenfassend wurde dabei in Anlehnung an die Methode von Lin et al.⁸⁵ wie folgt berechnet:

1. Rechnung: $V(\text{Ödem}) = V(\text{ILH}) - V(\text{KLH})$
2. Rechnung: $V(\text{IL IA}_k) = V(\text{IL IA}_g) - V(\text{Ödem})$

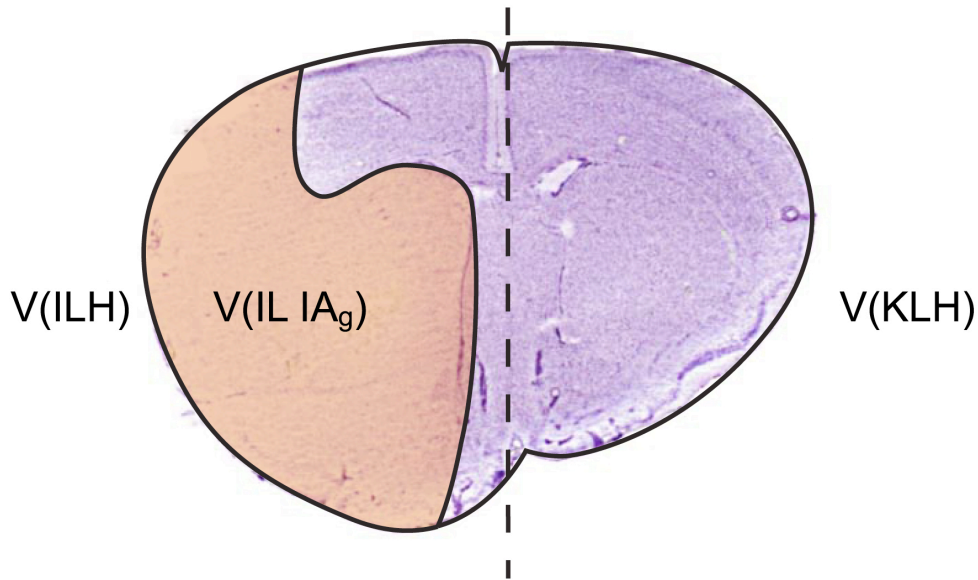


Abbildung 10: Berechnung der ödemkorrigierten Infarktareale. Die Skizze zeigt schematisch einen Gehirnschnitt mit Unterteilung in die einzelnen gemessenen Kompartimente. V= Volumen, ILH= ipsilaterale Hemisphäre, KLH= kontralaterale Hemisphäre, IL IA_k= ipsilaterles ischämisches Areal korrigiert, IL IA_g= ipsilaterales ischämisches Areal gemessen.

In allen Auswertungen wurden stets die Ödem korrigierten Werte (Volumen IL IA_k) miteinander verglichen und gingen in die Statistik ein. Bei sehr kleinen Infarkten ergab sich aufgrund der geringen Ödembildung nur eine unwesentliche Differenz der gemessenen Hemisphärenvolumina. In diesen Fällen fiel eine Korrektur des Schlaganfallvolumens um den Ödemwert geringer als bei großen Schlaganfällen mit großen Ödemen aus.

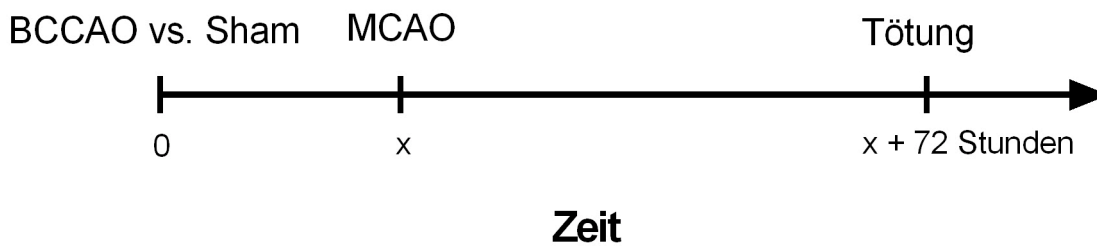
2.5 Experimentelle Protokolle

1. Erfüllt die BCCAO als Präkonditionierungsmethode die Voraussetzung eines nicht schädigenden Stimulus?

Um zu untersuchen, ob unser BCCAO-Protokoll als Präkonditionierungsmethode an sich eine zerebrale Schädigung hervorruft, unterzogen wir repräsentative Gehirnschnitte von Tieren, die lediglich eine BCCAO erhielten, 72 Stunden nach BCCAO einer TUNEL-Färbung. Als Positivkontrollen verwendeten wir Schnitte der gleichen Hirnebene von Tieren mit erfolgreicher 45-minütiger MCAO, deren Gehirne ebenfalls 72 Stunden nach MCAO entnommen wurden. Als Negativkontrollen dienten Schnitte von nativen Gehirnen, die weder einer BCCAO oder MCAO unterzogen wurden.

2. Lässt sich durch kurzzeitigen Verschluss beider Arteriae carotis communis (BCCAO) frühe ischämische Toleranz induzieren und welches ist das optimale Zeitfenster zwischen konditionierendem (BCCAO) und schädigendem (MCAO) Stimulus?

Abbildung 11 zeigt das generelle Protokolldesign, welches in allen Fragestellungen (außer Fragestellung 1) angewendet wurde.



$x = 30 \text{ min}, 1\text{h}, 2\text{hrs}, 24\text{hrs}$

Abbildung 11: Zeitliche Abfolge der experimentellen Teilschritte als Paradigma der durchgeführten Versuche.

Die Skizze zeigt einen Zeitstrahl, der verdeutlicht, wie die Abfolge der verschiedenen Operationen innerhalb der Fragestellungen gestaltet wurde. Zum Zeitpunkt Null wurden BCCAO- oder Sham-Operation durchgeführt. X-Minuten danach erfolgte die MCAO. In Fragestellung 2 wurden verschiedene Zeiten für X getestet und das optimale Zeitfenster dann in allen weiteren Fragestellungen verwendet. Jeweils 72 Stunden nach MCAO wurden die Tiere getötet und die Gehirne entnommen.

Versuchstiere wurden zufällig den Gruppen Sham-Präkonditionierung oder BCCAO-Präkonditionierung zugeordnet. X-Minuten nach Abschluss der Präkonditionierung induzierten wir eine MCAO zur Erzeugung eines ischämischen Schlaganfalls. Zweiund-siebzig Stunden nach Ende der MCAO-Operation wurden die Tiere getötet und die Gehirne entnommen. Zur Beantwortung der Fragestellung 2 wählten wir als unterschiedliche Zeiten zwischen Präkonditionierung und MCAO X=30 Minuten, X=1 Stunde, X=2 Stunden sowie mit X=24 Stunden das Zeitfenster der späten ischämischen Präkonditionierung als positiv Kontrolle. Als negativ Kontrolle dienten Sham Tiere aus allen Zeitfenstern.

3. Ist frühe ischämische Toleranz in dem gefundenen Zeitfenster unabhängig von der *de-novo* Proteinsynthese?

Um die Unabhängigkeit von der *de-novo* Proteinsynthese als Charakteristikum der frühen ischämischen Toleranz im gefundenen, optimalen Zeitfenster zu beweisen, wurde Versuchstieren der Proteinsyntheseinhibitor Anisomycin (20mg/kg i.p., Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) vor Beginn der Präkonditionierung injiziert. Aufgrund der Pharmakodynamik von Anisomycin, welche nach ca. 2 Stunden nur noch zu einer Hemmung der *de-novo* Proteinsynthese von weniger als 90% im Gehirn führt, wurde Tieren aus dem Zeitfenster der späten ischämischen Toleranz Anisomycin vor Präkonditionierung und erneut 2 Stunden nach der ersten Gabe i.p. appliziert, um so eine längere Wirksamkeit von Anisomycin zu erreichen und eine Hemmung der Neusynthese während der Präkonditionierung von mehr als 90% sicherzustellen. Die Verwendung dieser Dosis und dieses Applikationsintervalls zeigte in früheren Studien suffiziente Inhibition der Proteinbiosynthese.⁸⁶ Zur Kontrolle wurden jeweils äquivalente Volumina Trägerlösung i.p. appliziert.

4. Spielt die endotheliale NO-Synthase (eNOS) eine Rolle im Zeitfenster der frühen IT?

In dieser Fragestellung wurde das oben beschriebene Protokoll (Vergleiche Abbildung 11) mit dem gefundenen, optimalen Zeitfenster aus Fragestellung 2 auf eNOS Knock-out Mäuse angewendet und die Schlaganfallvolumina zwischen Sham- und BCCAO-Tieren verglichen.

5. Spielt die neuronale NO-Synthase (nNOS) eine Rolle im Zeitfenster der frühen IT?

Es wurde das oben genannte allgemeine Versuchsprotokoll mit dem in Fragestellung 2 gefundenen, optimalen Zeitfenster für frühe ischämische Konditionierung verwendet. Versuchstieren wurde der selektive nNOS Inhibitor 7-Nitroindazol (50 mg/kg, i.p., Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) zum Zeitpunkt der Präkonditionierung verabreicht, um die Rolle der neuronalen NO-Synthase im frühen Zeitfenster der IT zu untersuchen. Zur besseren Verabreichung wurde der Wirkstoff in Dimethylsulfoxid (DMSO) in Lösung gebracht und mit Natriumchlorid (NaCl) im Verhältnis DMSO : NaCl = 1 : 1 verdünnt. Diese Dosierung und Art der Applikation stellte eine ausreichend hohe und langanhaltende Inhibition der neuronalen NO-Synthase sicher.⁸⁷ Als Vehikel wurden äquivalente Volumen (DMSO : NaCl = 1 : 1) verabreicht.

2.6 Ein- und Ausschlusskriterien

In die Auswertungen unserer Studien schlossen wir nur Tiere ein, die eine komplikationslose BCCAO- bzw. Sham-Präkonditionierung und MCAO durchlaufen hatten. Darüberhinaus gingen nur Tiere in die Auswertung ein, wenn sie nach MCAO mindestens eine Bederson-Score von 1 oder größer erfüllten. Tiere die die Abbruchkriterien innerhalb von 72 Stunden post MCAO erfüllten (vergleiche 2.1.1 und Anhang 1) wurden ausgeschlossen. Ebenso verwendeten wir keine Gehirne von Tieren, die nach Tötung und Eröffnung des Schädels größere intrakranielle Blutansammlungen zeigten, welche z.B. als Hinweis auf eine stattgehabte Penetration zerebraler Gefäße durch Einführen des Monofilaments während MCAO oder andere Komplikationen zu werten waren.

2.7 Statistische Analyse

Um eine Testpower von 0,8 zu erreichen, wurden bei einem Signifikanzniveau von 0,05 eine Anzahl von $n=10$ Tieren pro Versuchsgruppe angestrebt. Die abgebildeten Ergebnisse stellen mithilfe der Boxplotprojektion die 25.- bis 75.-Perzentile, sowie Minimal- und Maximalwerte einer Gruppe dar. Darüberhinaus repräsentiert die horizontale Linie innerhalb der Box den Median, während der jeweilige Mittelwert durch das „+“-Symbol veranschaulicht wird. Die im Text genannten Werte beziehen sich auf den jeweiligen Mittelwert \pm Standardabweichung. Die Variablen wurden auf Normalverteilung getestet. Vergleiche zwischen mehreren Gruppen wurden mithilfe einer ANOVA (engl.: analysis of variance) vorgenommen, gefolgt von einem Bonferroni post-hoc Test. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Laser-Doppler-Flussmessung bei BCCAO & MCAO

In unseren Versuchen setzten wir die BCCAO als Methode zur Präkonditionierung sowie die MCAO als Schadensmodell ein. Um zu kontrollieren, ob diese Verfahren eine ausreichende Reduktion in der regionalen zerebralen Durchblutung hervorrufen, wurde dieser kontinuierlich über die Dauer der BCCAO und MCAO in repräsentativen Gruppen von Versuchstieren (jeweils n=10) gemessen. Hierzu nutzten wir die LDF.

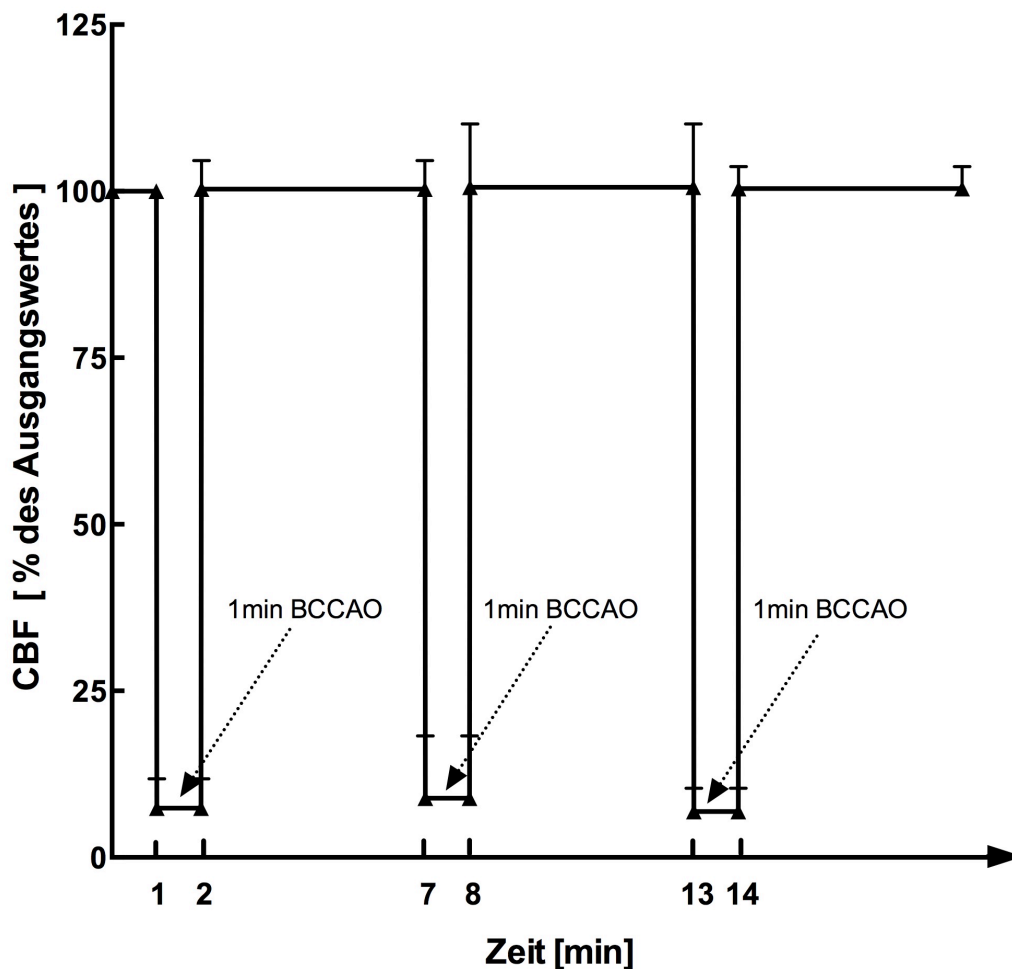


Abbildung 12: Verlauf des CBF während des BCCAO-Protokolls. Auf der X-Achse des Graphen ist die Zeit in Minuten aufgetragen, auf der Y-Achse der CBF in Prozent des Ausgangswertes. Der Verlauf des CBF zeigt eine schnelle Abnahme während der Okklusion beider A. carotis communis auf weniger als 10% des Ausgangswertes und eine ebenso schnelle Reperfusion auf das Niveau des Ausgangswertes nach Öffnen der Carotiden. Alle drei Phasen der Okklusion und der Reperfusion unterscheiden sich nicht. Messpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Messungen an insgesamt n=10 Tieren.

Unsere Ergebnisse zeigen, ausgehend von einer Basislinie von 100%, eine Reduktion der relativen regionalen Durchblutung im Versorgungsgebiet der A. cerebri media von $93\pm 4\%$ während der ersten transienten Ischämie von 1 Minute Dauer. Nach Öffnen der Carotiden und Wiederherstellung der Perfusion erreichte die zerebrale Perfusion umgehend ihr vorheriges Ausgangsniveau von 100% und war während der ersten Reperfusionphase von 5 Minuten stabil (Abbildung 12).

Auch während der zweiten Ischämiephase von erneut 1 Minute Dauer sank die zerebrale Perfusion um $91\pm 9\%$, um sich anschließend bei Reperfusion wieder auf das Ausgangsniveau zu begeben. Die dritte Phase verlief mit einer Reduktion der Durchblutung von $94\pm 3\%$ und einer Reperfusion auf 100% analog den vorausgegangenen Phasen. Die einzelnen Phasen der BCCAO unterschieden sich somit hinsichtlich der Durchblutung während Ischämie und Reperfusion nicht. Während der Ischämiephasen sowie zwischen diesen zeigte die zerebrale Perfusion keine erheblichen Schwankungen, sondern hielt sich konstant. Anstieg und Abfall der zerebralen Perfusion erfolgten ohne Verzögerung nach Schließen oder Öffnen der Carotiden. Die Versuchstiere erholten sich in der Aufwachbox nach Ausleitung der Narkose schnell und zeigten keine Verhaltensauffälligkeiten im Vergleich zu Tieren, die keiner BCCAO unterzogen wurden.

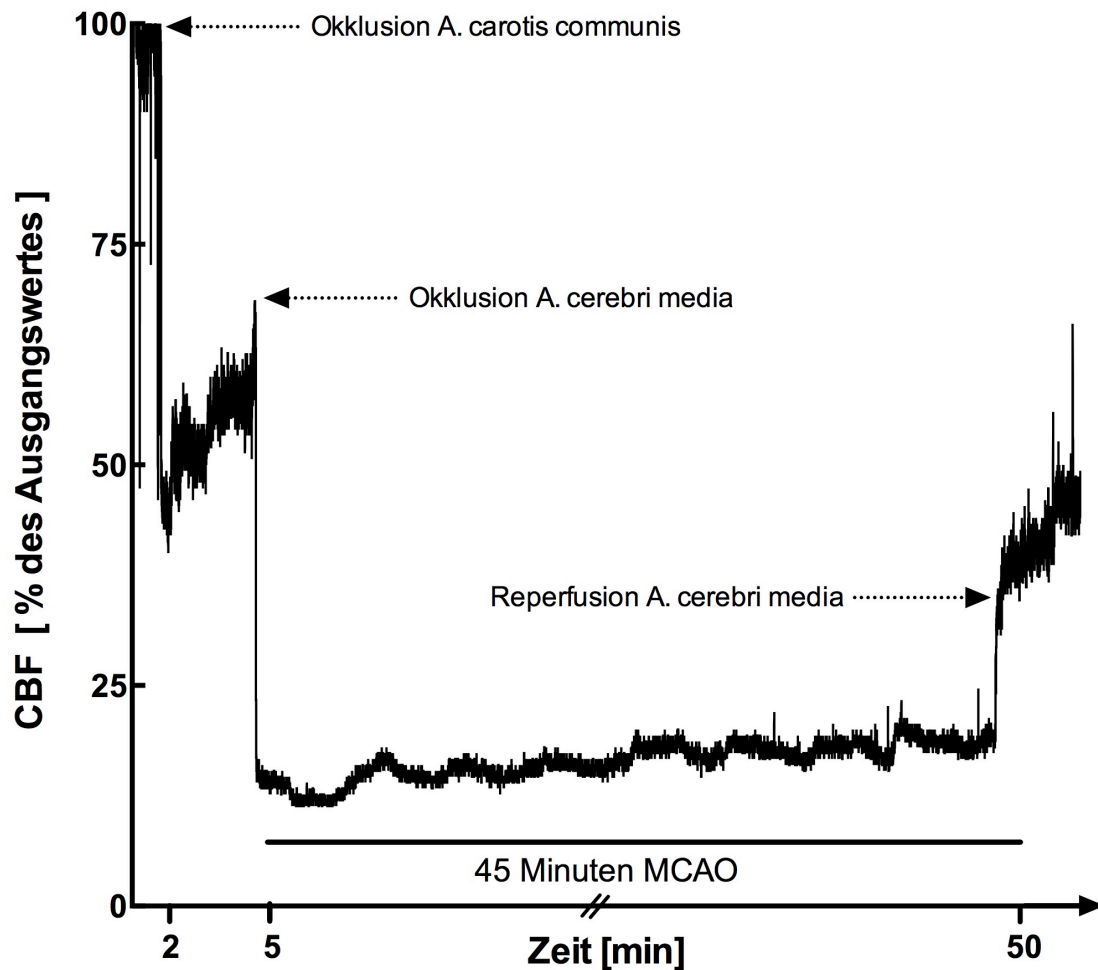


Abbildung 13: Beispielhafter Verlauf des CBF während einer MCAO. Der Graph zeigt den Verlauf des CBF über die Zeit einer MCAO-Operation. Die Y-Achse stellt die relative Durchblutung in % des Ausgangswertes dar. Auf der X-Achse ist die Zeit in Minuten abgetragen. Zu erkennen ist eine erste deutliche Reduktion des CBF bei ca. 2 Minuten durch dauerhafte Ligatur der ipsilateralen A. carotis communis. Die weitere Reduktion des CBF bei 5 Minuten resultiert aus dem Verschluss der A. cerebri media durch Verschieben des Monofilaments. Nach 45 Minuten wird dieses Monofilament entfernt und die A. cerebri media reperfundiert. Der CBF steigt folglich wieder an und erreicht nach einer gewissen Latenz Werte wie vor Verschluss der A. cerebri media (Reperfusion nicht vollständig dargestellt).

Abbildung 13 verdeutlicht, dass durch unser MCAO-Schadensmodell eine starke Reduktion der zerebralen Durchblutung erreicht werden konnte. Der dauerhafte Verschluss der A. carotis communis (vergleiche 2.3.4) führt im dargestellten Beispiel zu einer Reduktion um ca. 50%. Das Verschieben des Monofilaments bei 5 Minuten vor den Abgang der A. cerebri media führt zu einer weiteren Reduktion des CBF um etwa 30%, sodass insgesamt eine Reduktion um ca. 80% der Durchblutung auf 20% des Ausgangswertes durch dieses Verfahren erreicht werden kann.

Durch Entfernen des Monofilaments nach 45 Minuten Verschlusszeit erfolgt die Reperfusion der MCA auf CBF-Level, wie sie vor dem Verschieben des Monofilaments zu messen waren.

Diese Reperfusion ist im Beispiel von Abbildung 13 nur teilweise zu erkennen. Der weitere Verlauf der Reperfusionsphase ist aber hinreichend bekannt, sodass zugunsten einer kürzeren Narkosezeit eine weitere Aufzeichnung des CBF nicht erfolgte.⁸⁸

3.2 Zerebrale TUNEL-Färbung nach BCCAO

Wir untersuchten mit unserer ersten Fragestellung, ob die BCCAO mit dem von uns angewendeten Protokoll einen nichtschädigenden Stimulus für das Gehirn darstellt und so hinsichtlich der Definition der ischämischen Präkonditionierung genutzt werden kann. Die Verwendung dieses Stimulus in anderen Studien macht diese Annahme zwar wahrscheinlich, ist aber in unserem experimentellen Setting noch nicht gezeigt worden.

Unsere Ergebnisse der TUNEL-Färbung 72 Stunden nach BCCAO zeigen kein Signal für vermehrte Apoptose im Bereich des gesamten Gehirns (Abbildung 14 A). Wie erwartet lässt sich hingegen bei der Positivkontrolle im ischämischen Gehirn 72 Stunden nach MCAO eine deutliche Anfärbung von DNA-Fragmenten durch TUNEL als Zeichen geschädigter, apoptotischer Zellen registrieren (Abbildung 14 B). Die Färbung eines nativen Gehirns als Negativkontrolle zeigt hingegen keine Anfärbung von DNA-Fragmenten und somit keinen Hinweis auf vermehrte Apoptose (Abbildung 14 C).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die BCCAO im Rahmen des von uns verwendeten Protokolls, mit Unterbrechung der zerebralen Durchblutung von drei Mal einer Minute und jeweils fünfminütiger Reperfusion, zu keinem positiven TUNEL-Signal führt und wir durch diese Färbung keine Apoptose in BCCAO behandelten Tieren nachweisen konnten.

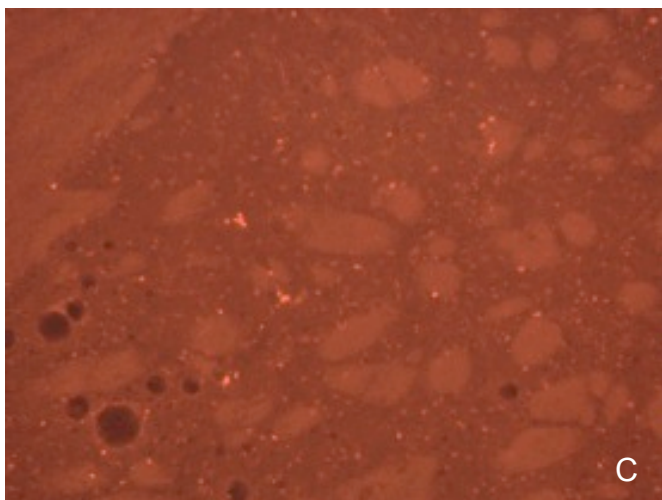
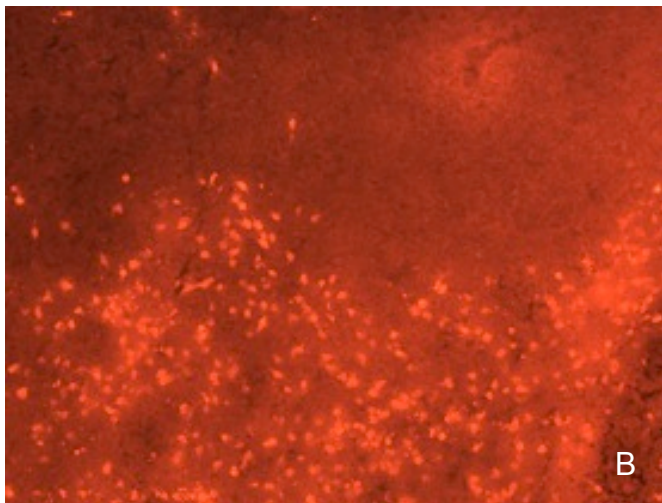
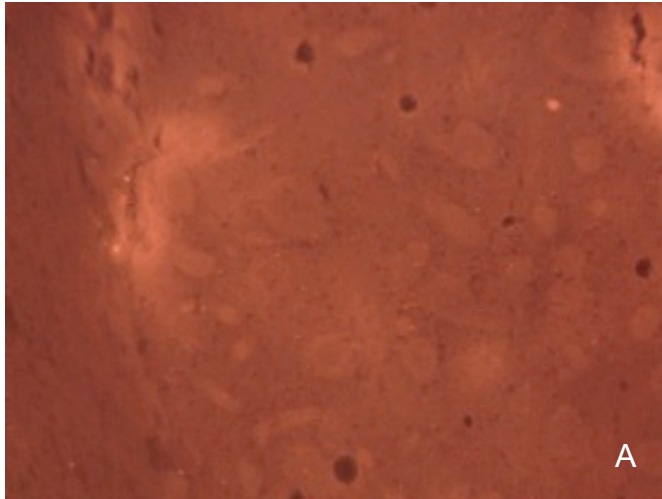


Abbildung 14: Zerebrale TUNEL-Färbungen 20-fach vergrößert. Die Abbildungen zeigen Ausschnitte (Übergang Striatum zu Cortex) aus Apop-Tag-Red[®] immunfluoreszenz gefärbten Gehirnschnitten nach BCCAO (A), MCAO (B) und natives Gehirngewebe (C). Deutlich zu erkennen ist, dass das von uns verwendete BCCAO-Protokoll nicht zur Fragmentation von DNA führt und folglich keine Anfärbung durch TUNEL zu erkennen ist (A). Nach Ischämie durch MCAO kommt es zur Schädigung von Zellen, Fragmentierung von DNA und somit zur deutlichen Anfärbung, erkennbar an hellrot leuchtenden Zellkernen. Eine deutliche Grenze zwischen geschädigtem und intaktem Gewebe ist klar zu erkennen (B). Natives Gehirngewebe zeigt ebenfalls keine Anfärbung durch TUNEL (C) und gleicht dem Bild nach BCCAO (A).

Die Ergebnisse zeigen, dass das von uns verwendete BCCAO-Protokoll zu keinem durch TUNEL-Färbung detektierbaren Zellschaden führt.

3.3 Zeitlicher Verlauf der frühen IT

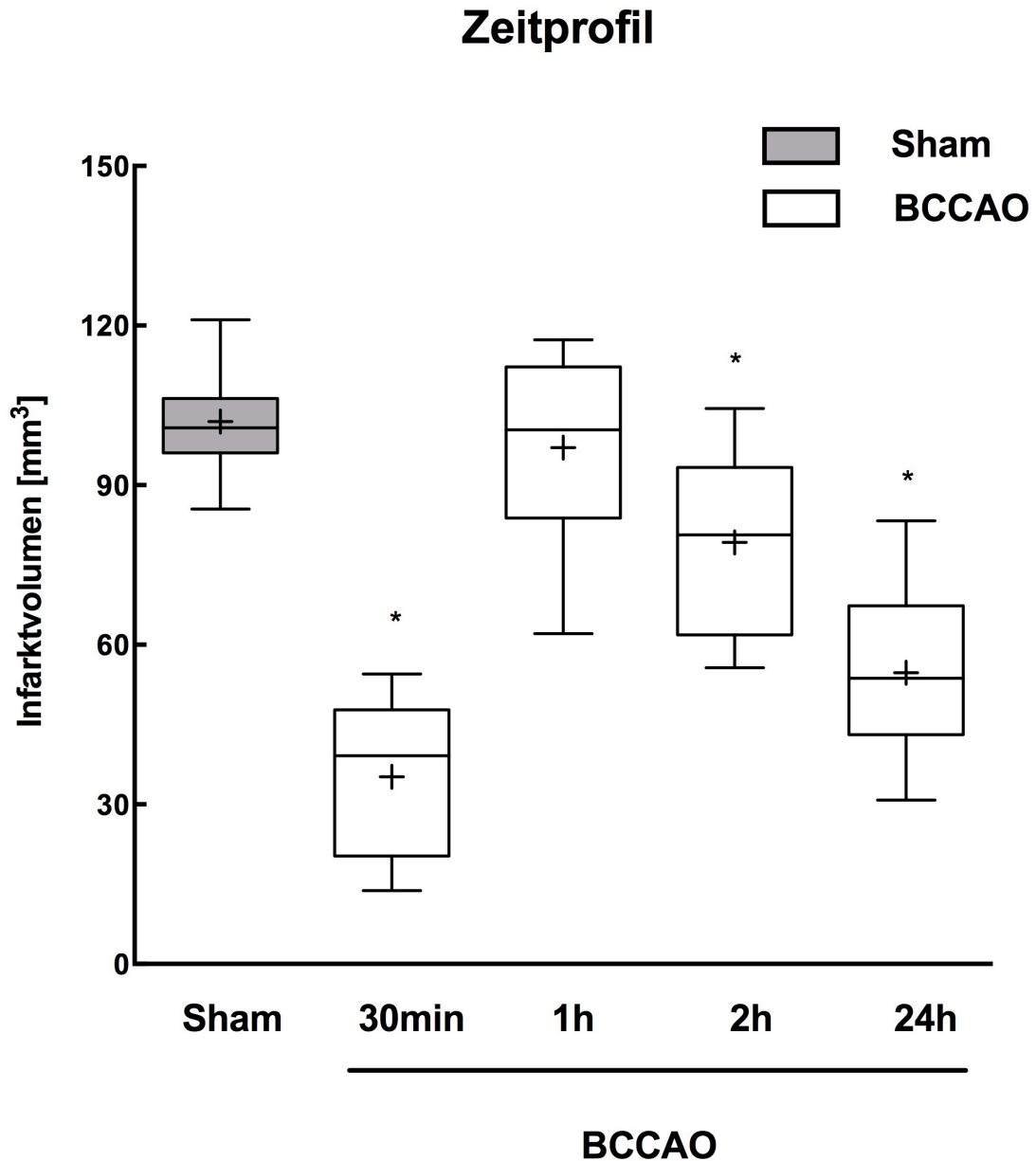


Abbildung 15: Zeitprofil mit unterschiedlichen Abständen zwischen BCCAO und MCAO. Boxplot mit Minimal- und Maximalwerten, 25.- und 75.-Perzentile, Median (horizontale Linie in Box) und Mittelwerte (+) von Infarkt volumina verschiedener Gruppen nach MCAO in mm^3 . Tiere, die 30 Minuten vor MCAO eine BCCAO erhielten, hatten ein signifikant verringertes Infarktvolumen im Vergleich zu Sham-Präkonditionierten Tieren. Diese Neuroprotektion konnten wir bei einem Abstand von 1h zwischen BCCAO und MCAO nicht nachweisen. Tiere, die 2 Stunden nach BCCAO einer MCAO unterzogen wurden, entwickelten ebenfalls signifikant kleinere Infarktvolumina als Sham-Tiere. Auch bei einer Zeitspanne von 24 Stunden zwischen BCCAO und MCAO konnten wir ein verringertes Infarktvolumen im Sinne einer signifikanten Neuroprotektion messen. $n = 10$ pro Gruppe, Ergebnisse nach ANOVA und Bonferroni post-hoc Test, * = $p < 0,05$.

Bei dieser Fragestellung untersuchten wir, ob BCCAO ein adäquater Stimulus zur Erzeugung einer ischämischen Toleranz im frühen Zeitfenster ist und bei welchem Zeitpunkt der beste Effekt der Präkonditionierung eintritt. Dazu unterzogen wir C57Bl/6 Mäuse einer Präkonditionierung mit BCCAO- oder einer Sham-Operation, jeweils gefolgt von einer MCAO. Der zeitliche Abstand zwischen BCCAO bzw. Sham und MCAO betrug entweder 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden oder 24 Stunden. Studien von Cho et al. zeigten bereits eine erfolgreiche Verwendung des BCCAO-Protokolls als präkonditionierenden Stimulus für das späte Zeitfenster der IT beim MCAO Schadensmodell, so dass wir das 24 Stunden Zeitfenster als Positivkontrolle verwendeten.⁷²

Die Ergebnisse zeigen, dass das Volumen des ischämischen Areals bei Sham-Präkonditionierten Tieren (n=10) um die $100 \pm 10 \text{ mm}^3$ bei 45 Minuten MCAO betrug. Im Vergleich dazu konnten wir bei Tieren, die eine halbe Stunde nach der BCCAO einer MCAO unterzogen wurden (n=10), einen Infarkt messen, dessen Volumen mit $35 \pm 15 \text{ mm}^3$ im Mittel um 65% kleiner war. Tiere, bei denen der zeitliche Abstand zwischen dem präkonditionierenden Stimulus der BCCAO und dem schädigenden Ereignis der MCAO eine Stunde betrug (n=10), entwickelten mit $97 \pm 17 \text{ mm}^3$ ein fast gleichgroßes Infarktgebiet wie Tiere der Sham-Gruppe. Hingegen konnte bei der Gruppe der Tiere, bei denen der Abstand zwischen BCCAO und MCAO zwei Stunden betrug (n=10), erneut eine Reduktion des ischämischen Areals gemessen werden, die allerdings mit einem Infarktvolumen von $79 \pm 17 \text{ mm}^3$ deutlich geringer ausfiel (Reduktion um 21%) als es im 30-Minuten Zeitfenster der Fall war. Tiere, die erst 24 Stunden nach der BCCAO mittels MCAO eine fokale Ischämie erfuhren (n=10), zeigten ebenfalls eine Reduktion des ermittelten Schlaganfallareals im Vergleich zur Sham-Gruppe und hatten Infarktvolumina von $63 \pm 14 \text{ mm}^3$.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der einzelnen Gruppen im Vergleich. Bei $p < 0,05$ waren unsere Ergebnisse der 30-Minuten Gruppe, der 2 Stunden und der 24 Stunden Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe signifikant.

Nach diesen Erkenntnissen verwendeten wir das 30 Minuten Intervall zwischen BCCAO und MCAO für alle weiteren Studien als optimales Zeitfenster der frühen ischämischen Toleranz.

3.4 Bedeutung der *de-novo* Proteinsynthese

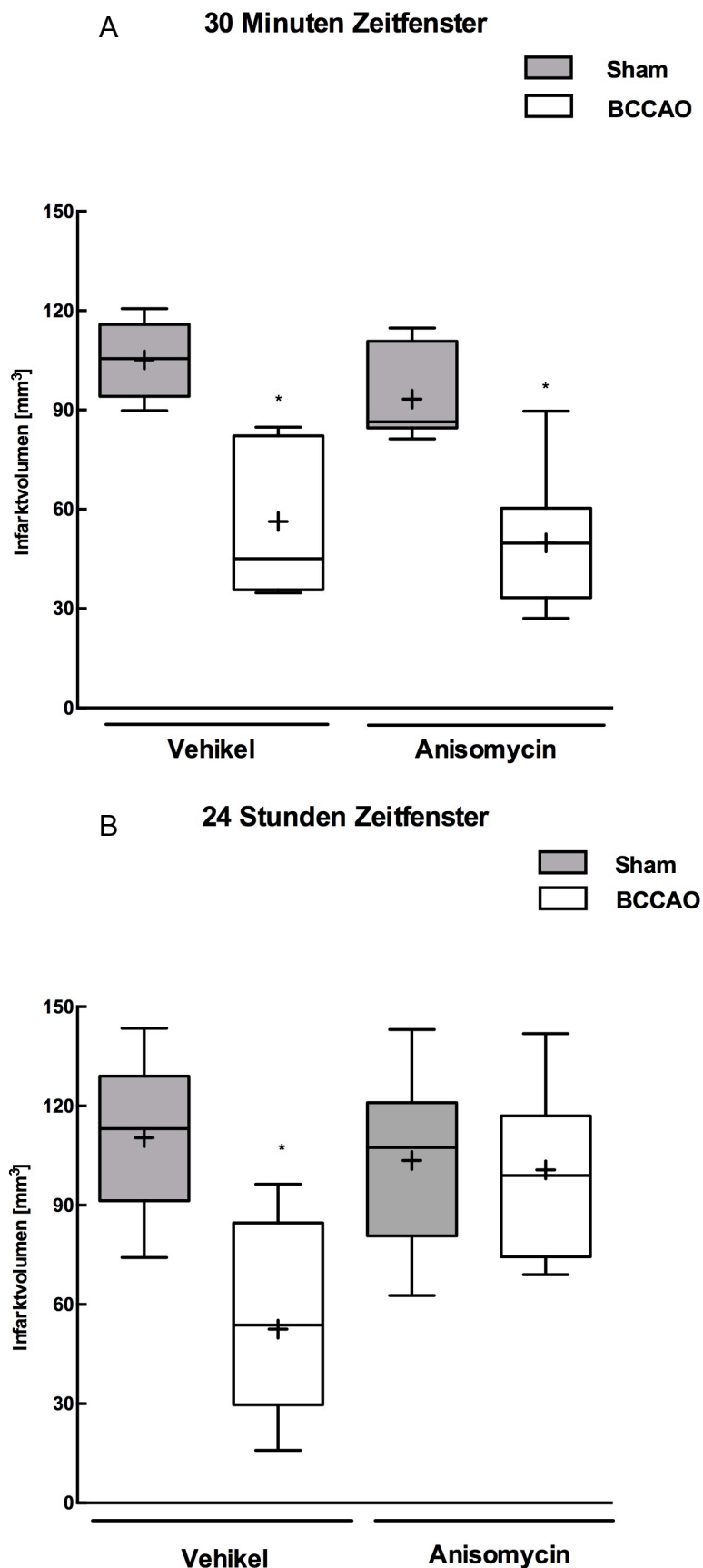


Abbildung 16: Hemmung der *de-novo* Proteinsynthese bei früher & später IT durch Anisomycin. Die Abbildung zeigt Infarkt volumina von Sham- und BCCAO-präkonditionierten Tieren im frühen und späten Zeitfenster der IT, denen der Proteinsynthesen-inhibitor Anisomycin oder Vehikel injiziert wurde. BCCAO führt bei Injektion von Vehikel zur Reduktion des Infarkt volumens im frühen und späten Zeitfenster. Die Applikation von Anisomycin führt im frühen Zeitfenster weiterhin zu einer Neuroprotektion durch BCCAO (A). Im späten Zeitfenster hebt Anisomycin den protektiven Effekt der BCCAO auf (B). Schlaganfall volumina von Anisomycin behandelten Sham- oder BCCAO-Tieren unterscheiden sich im späten Zeitfenster nicht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der neuroprotektive Effekt der BCCAO im frühen Zeitfenster unabhängig von der *de-novo* Proteinbiosynthese ist. Im späten Zeitfenster ist eine *de-novo* Proteinsynthese dagegen notwendig um durch BCCAO Neuroprotektion zu erreichen. $n = 10$ pro Gruppe (außer Vehikel-BCCAO-Gruppe der späten IT, $n = 7$), * = $p < 0,05$ im Vergleich zu korrespondierender Sham-Gruppe.

Während bei der ischämischen Toleranz im späten Zeitfenster Mechanismen der *de-novo* Proteinbiosynthese eine Rolle zu spielen scheinen, ist die Unabhängigkeit von dieser ein Charakteristikum der frühen IT.¹⁸

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem unter 3.3 beschriebenen Effekt wirklich um frühe IT handelt, verabreichten wir Versuchstieren im frühen und späten Zeitfenster der IT den Proteinsyntheseinhibitor Anisomycin oder NaCl als Vehikel.

Im optimalen Zeitfenster der frühen ischämischen Toleranz (30 Minuten Zeitfenster) zeigten Vehikel behandelte, BCCAO-präkonditionierte Tiere (n=10) im Vergleich zu Sham-präkonditionierten Tieren (n=10) eine Reduktion des Infarktvolumens von $105 \pm 12 \text{ mm}^3$ auf $56 \pm 7 \text{ mm}^3$ (Reduktion um 47%). Auch bei BCCAO-präkonditionierten Tieren des frühen Zeitfensters (n=10), denen der Proteinsyntheseinhibitor Anisomycin appliziert wurde, maßen wir eine Reduktion des Infarktvolumens im Vergleich zu Sham-Tieren (n=10) von $93 \pm 14 \text{ mm}^3$ auf $50 \pm 19 \text{ mm}^3$ (Reduktion um 46%).

In Vehikel behandelten Tieren des späten Zeitfensters führte BCCAO (n=7) im Vergleich zu Sham-präkonditionierten Tieren (n=10) ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des Infarktvolumens von $110 \pm 21 \text{ mm}^3$ auf $53 \pm 29 \text{ mm}^3$ (Reduktion um 52%). BCCAO-präkonditionierte Tiere (n=10) des späten Zeitfensters der IT, die mit Anisomycin behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu Sham-präkonditionierten Tieren (n=10) dagegen keine Reduktion des Infarktvolumens ($104 \pm 25 \text{ mm}^3$ vs. $101 \pm 26 \text{ mm}^3$).

Im frühen Zeitfenster ergab sich folglich kein Unterschied zwischen Vehikel und Anisomycin behandelten BCCAO Tieren (Abbildung 16 A). Die Gabe von Anisomycin im Zeitfenster der frühen IT hat daher keinen Einfluss auf die Präkonditionierung durch BCCAO. Tiere, die einer BCCAO unterzogen wurden, zeigen eine stabile Neuroprotektion, unabhängig von der Gabe der Vehikel- oder Verumsubstanz.

Dies trifft nicht für das späte Zeitfenster der ischämischen Toleranz zu, da hier die neuroprotektive Wirkung der BCCAO durch die Gabe von Anisomycin aufgehoben wird (Abbildung 16 B). Mit Vehikel behandelte Tiere des späten Zeitfensters zeigen dagegen weiterhin robuste Neuroprotektion durch BCCAO.

Die Ergebnisse machen darüberhinaus deutlich, dass Anisomycin alleine keine neuroprotektive Wirkung hat, da Sham-präkonditionierte Tiere beider Zeitfenster vergleichbar große Infarktvolumina hatten (Abbildung 16). Die Infarktvolumenreduktion der BCCAO-Gruppen im Vergleich zur jeweiligen Sham-Gruppe war signifikant.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der in 3.3 gefundene protektive Effekt der BCCAO im 30 Minuten Zeitfenster durch frühe ischämische Toleranz entsteht, welche unabhängig von Mechanismen der *de-novo* Proteinbiosynthese ist.

3.5 Untersuchungen zu eNOS im Zeitfenster der frühen IT

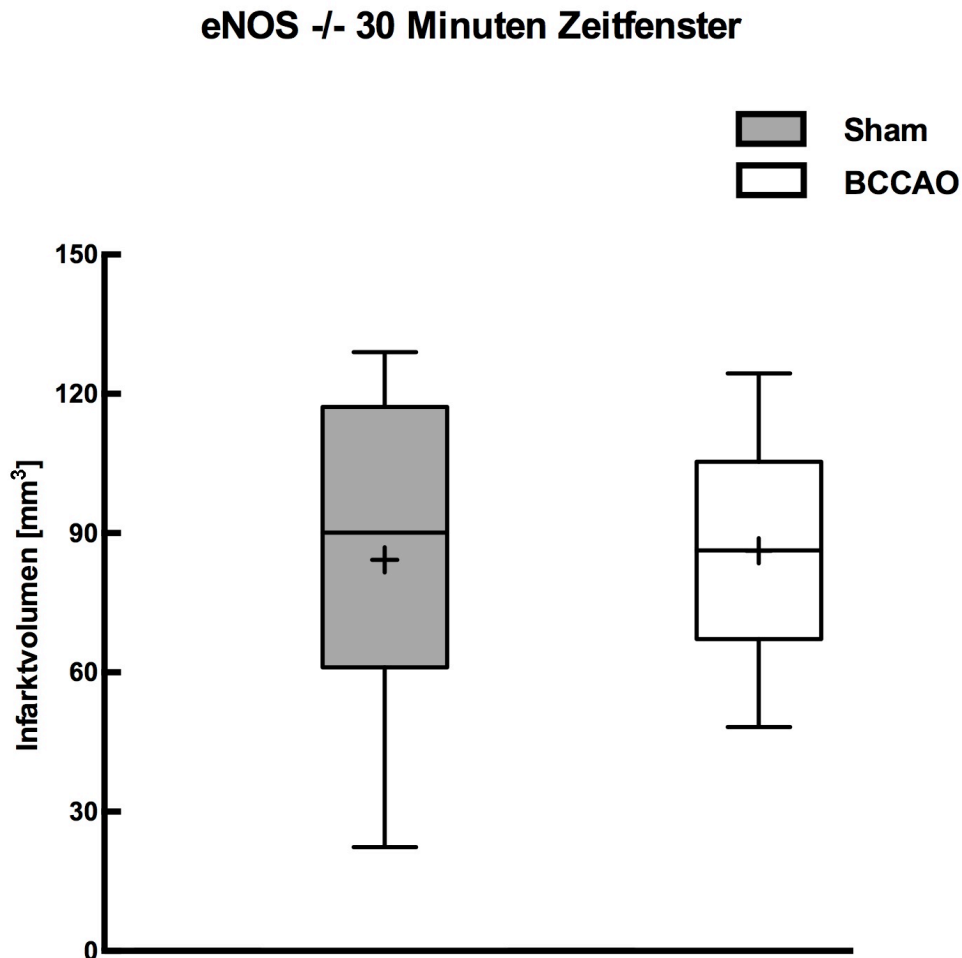


Abbildung 17: Untersuchungen zu eNOS Knock-out ($-/-$) Tieren bei früher IT. Die Abbildung zeigt Infarkt volumina von Sham- oder BCCAO-präkonditionierten eNOS $-/-$ Mäusen im frühen Zeitfenster der IT. Ein Unterschied zwischen BCCAO- und Sham-Präkonditionierung konnte nicht festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Vorhandensein von eNOS eine wichtige Rolle in der Vermittlung des protektiven Effekts durch BCCAO darstellt. n= 11 Sham, n= 9 BCCAO.

Zur näheren Untersuchung des neuroprotektiven Effekts im frühen Zeitfenster der IT und der Klärung eines potentiellen Zusammenhangs zwischen der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthetase (eNOS) und früher IT verwendeten wir eNOS $-/-$ Mäuse und unterzogen diese einer Sham- oder BCCAO-Präkonditionierung, gefolgt von einer 45 minütigen MCAO 30 Minuten danach.

Die Ergebnisse (Abbildung 17) zeigen, dass Sham-Präkonditionierte eNOS $-/-$ Tiere nach 45 Minuten MCAO ein Infarktvolumen von $86 \pm 25 \text{ mm}^3$ aufweisen (n=9). eNOS Knock-out Tiere, die durch eine BCCAO präkonditioniert wurden und ebenfalls 30 Minuten danach mit einer 45 minütigen MCAO behandelt wurden (n=11), hatten ebenfalls ein großes Infarktvolumen von $84 \pm 35 \text{ mm}^3$.

Eine neuroprotektive Wirkung der BCCAO im frühen Zeitfenster konnten wir daher bei eNOS defizienten Tieren nicht nachweisen. Folglich scheint die eNOS eine wesentliche Rolle in der Ausbildung der Neuroprotektion durch BCCAO zu spielen.

3.6 Untersuchungen zu nNOS im Zeitfenster der frühen IT

7-Nitroindazol 30 Minuten Zeitfenster

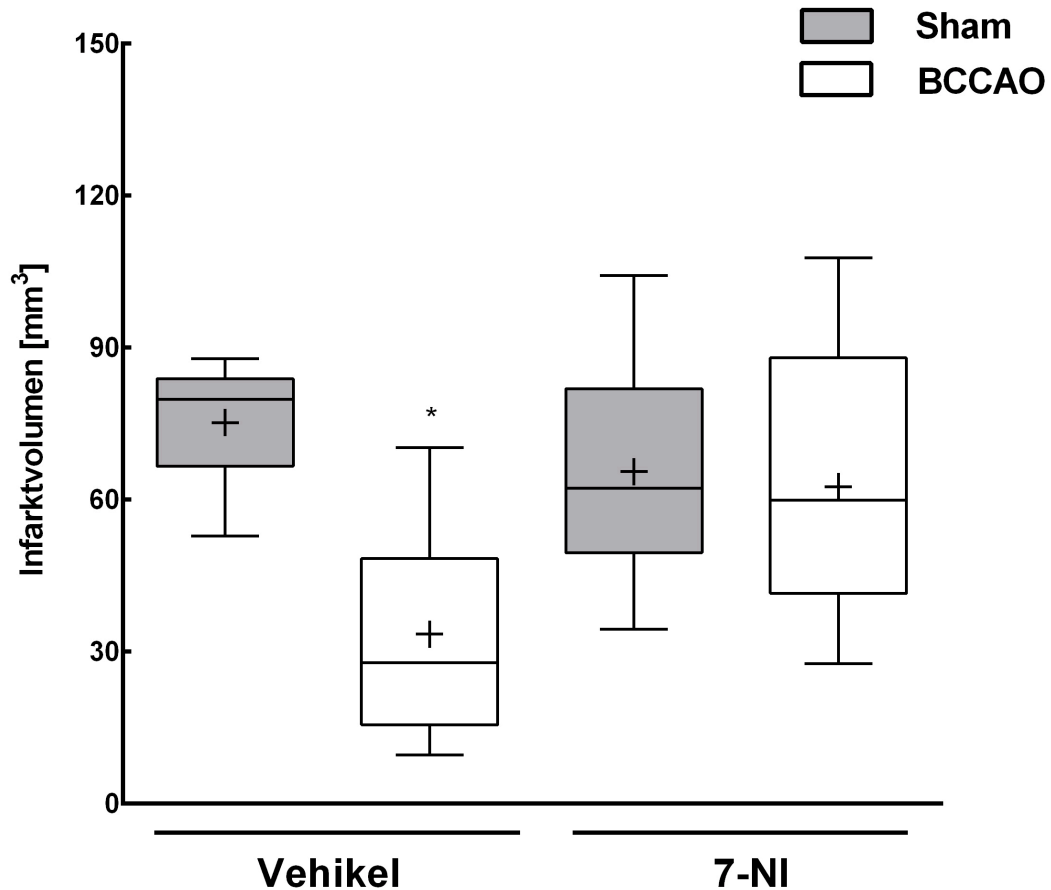


Abbildung 18: Applikation des nNOS-Inhibitors 7-Nitroindazol im Zeitfenster der frühen IT. Die Abbildung zeigt Infarkt volumina von Sham- und BCCAO-präkonditionierten Tieren im frühen Zeitfenster der IT (30 Minuten), denen der nNOS-Inhibitor 7-NI oder Vehikel verabreicht wurde. BCCAO führt zur Reduktion des Infarkt volumens im frühen Zeitfenster, wenn zwischen BCCAO und MCAO ein Intervall von 30 Minuten liegt. Dieser Effekt wird durch die Applikation von 7-NI aufgehoben. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass nNOS bei früher IT eine wichtige Rolle in der Vermittlung des protektiven Effekts durch BCCAO darstellt. n=10 pro Gruppe, bis auf Vehikel-BCCAO-Gruppe (n=9), * = p < 0,05 im Vergleich zu Sham.

Untersuchungen von Yoshida et al. zur Rolle von nNOS konnten zeigen, dass die Ausschaltung der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) neuroprotektiv ist.⁸⁹

Daher untersuchten wir den Einfluss von 7-Nitroindazol (7-NI), einem selektiven Inhibitor der nNOS, in unserem experimentellen Setting zur frühen ischämischen Toleranz.

In der Vehikelgruppe maßen wir bei BCCAO-präkonditionierten Tieren (n=10) im Vergleich zu Sham-präkonditionierten Tieren (n=10) eine Reduktion der Infarktvolumina von $75 \pm 12 \text{ mm}^3$ auf $33 \pm 20 \text{ mm}^3$. Dies entspricht einer signifikanten Reduktion von 56% (Abbildung 18).

Bei Tieren, die den nNOS-Inhibitor 7-NI appliziert bekamen, maßen wir dagegen keinen Unterschied der Infarktvolumina zwischen BCCAO- und Sham-präkonditionierten Tieren ($63 \pm 26 \text{ mm}^3$, n=10 vs. $65 \pm 22 \text{ mm}^3$, n=10). Unsere Versuche zeigen, dass mit Vehikel behandelte Tiere weiterhin von der BCCAO im Vergleich zur Sham-Präkonditionierung im frühen Zeitfenster profitieren.

In der mit dem nNOS-Inhibitor 7-NI behandelten Gruppe konnten wir dagegen keinen Unterschied zwischen der Sham- und der BCCAO-Gruppe feststellen.

Diese Ergebnisse weisen folglich darauf hin, dass die Applikation von 7-NI und damit die Inhibition der nNOS im frühen Zeitfenster der IT den protektiven Effekt der BCCAO-Präkonditionierung aufhebt. Folglich scheint die nNOS maßgeblich bei der Ausbildung früher IT durch BCCAO zu sein.

4 Diskussion

Aufgrund der demographischen Entwicklung und der damit in Zukunft, stark ansteigenden Inzidenz ischämischer Schlaganfälle ist vor dem Hintergrund der geringen Therapiemöglichkeiten eine Erforschung weiterer Therapiemöglichkeiten dieses Krankheitsbildes unumgänglich. Um das bisher wenig untersuchte Gebiet der frühen ischämischen Präkonditionierung besser zu verstehen und daraus in Zukunft alternative Therapiemöglichkeiten ableiten zu können, etablierten wir das Modell der ischämischen Präkonditionierung in diesem Zeitfenster durch BCCAO.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die von uns benutzte BCCAO-Methode zu keinem durch TUNEL-Färbung erkennbaren zerebralen Schaden führt. Das dabei von uns verwendete Protokoll mit drei Zyklen einer einminütigen Ischämie und jeweils fünfminütigen Reperfusion als Methode der ischämischen Präkonditionierung führt zur ischämischen Toleranz. Diese ischämische Toleranz konnten wir im frühen und im späten Zeitfenster nachweisen. Unsere Untersuchungen deuten darauf hin, dass das optimale Zeitfenster der frühen IT bei 30 Minuten nach Applikation des präkonditionierenden Stimulus liegt und eine signifikante Reduktion des Schlaganfallvolumens im Vergleich zu nicht präkonditionierten Tieren bedingt.

Darüberhinaus konnten wir zeigen, dass der Effekt der frühen IT unabhängig von der *de-novo* Proteinsynthese zu sein scheint, während diese im späten Zeitfenster der IT notwendig zur Aktivierung der ischämischen Toleranz ist. Des Weiteren weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) eine zentrale Rolle in der Aktivierung der frühen IT spielt, da Mäuse ohne diese Synthase keine Neuroprotektion durch ischämische Präkonditionierung aufwiesen. Auch die pharmakologische Inhibition der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) führte zum Verlust des neuroprotektiven Effekts durch BCCAO. Diese Ergebnisse führen zu der Erkenntnis, dass die eNOS wie auch die nNOS als konstitutionelle NO-Synthasen eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der frühen IT spielen.

4.1 BCCAO als präkonditionierender Stimulus und TUNEL

Wie in Abschnitt 1.1 beschrieben, existieren unterschiedlichste Stimuli und Verfahren, um ischämische Toleranz in Organismen hervorzurufen.¹⁸ Wir entschieden uns mit der Verwendung eines ischämischen Stimulus für einen Stimulus, welcher ursprünglich zur Etablierung des Phänomens im Gehirn durch Kitagawa et al. genutzt wurde.²⁵ Die Verwendung ischämischer Stimuli zur Induktion ischämischer Toleranz wurde seither in zahlreichen Studien, *in-vivo* und *in-vitro*, nachgewiesen und machte eine erfolgreiche Anwendung zur Erforschung der frühen ischämischen Toleranz wahrscheinlich.³⁴

Die Verwendung der BCCAO als globaler, zerebral konditionierender Stimulus bei früher IT wurde dagegen nach unserem Wissen noch nicht gezeigt und stellt somit eine neue Anwendung dieses Verfahrens dar, dessen Wirksamkeit und Charakteristik bisher nicht untersucht wurden. Ein möglicher Vorteil der BCCAO als globalem Stimulus gegenüber einer sehr kurzen MCAO als fokalem Stimulus, wie sie Atochin et al. benutzte, liegt in der einfacheren Durchführung dieses Verfahrens und der dadurch eventuell geringeren Variabilität des CBF während der Präkonditionierung.⁷⁴

Die Analogie zwischen dem protektiven, konditionierenden Stimulus und dem schädigen Ereignis, deren unterschiedliche Wirkung letztendlich nur durch die Dauer und Art der Gefäßokklusion entsteht, lässt darüberhinaus einen zugrundeliegenden gemeinsamen Mechanismus annehmen, der auch im klinischen Kontext von TIA und Stroke eine Rolle zu spielen scheint. Die Verwendung der BCCAO als ischämischer, präkonditionierender Stimulus ist daher ein etabliertes Verfahren zur Erforschung der späten ischämischen Toleranz. Allerdings spielt die Art der Spezies und vor allem das zeitliche Profil, wie dieser ischämische Stimulus angewendet wird, die entscheidende Rolle dabei, ob es zur Protektion oder zum Zelluntergang kommt. So konnten Kitagawa et al. zeigen, dass zwei einminütige BCCAOs im Abstand von einem Tag appliziert nicht zur Neuroprotektion führen, während zwei zweiminütige BCCAOs im gleichen Abstand eine signifikante Protektion verleihen.²⁵ Die Dosierung des Stimulus ist demnach ein entscheidender Faktor und es muss daher in jedem Versuchsvorhaben nachgewiesen werden, dass die dort verwendete Dosis des Stimulus an sich keinen Zelluntergang bewirkt.

Aus diesem Grund färbten wir repräsentative Gehirnschnitte mithilfe der TUNEL-Färbung und konnten durch diese Methode keinen Hinweis auf Zelluntergang feststellen. Die Vermutung, dass es sich bei der zeitlich begrenzten BCCAO um einen nicht schädigenden Stimulus handelt, äußern auch Wu et al., deren TUNEL-Färbungen 72 Stunden nach Anwendung einer sechsminütigen transienten Ischämie durch BCCAO ebenfalls keine Hinweise für Zelluntergang lieferten.⁹⁰ Diese Ergebnisse decken sich also mit den unseren und bestärken unsere Annahme, dass bei noch kürzeren BCCAO-Zeiten in dem von uns verwendeten Protokoll (3mal 1 Minute) im Vergleich zu Wu et al. (6 Minuten) ischämische Schäden durch den konditionierenden Stimulus nicht auftreten.

Dabei ist allerdings zu beachten, dass die TUNEL-Färbung hinsichtlich Sensitivität und Spezifität kritisch betrachtet werden muss.⁹¹ Einer der Hauptkritikpunkte ist dabei, dass nicht nur Apoptose zur Fragmentierung von DNA und damit zur Anfärbbarkeit durch TUNEL existiert, sondern auch viele andere Prozesse, wie z.B. Nekrose.⁹² Auch konnte gezeigt werden, dass die Art der Fixierung Einfluss auf die Anfärbung hat.⁹² Diese Kritikpunkte spielen aber bei unseren Betrachtungen eine untergeordnete Rolle, da wir keine in Paraffin fixierten Schnitte zur Auswertung benutzten, sondern lediglich Kryokonservierung verwendeten, die nach unserem Wissen keinen Einfluss auf die TUNEL-Färbung hat. Des Weiteren war es für unsere Auswertungen nicht von Bedeutung, exakt zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden zu müssen, da es vielmehr um den generellen Nachweis von geschädigten oder nicht geschädigten Zellen in nativen, ischämischen oder präkonditionierten Gewebeschnitten ging. Die vor allem in der Abbildung 14A und 14C zu erkennenden hellen Hintergrundflecken sind in diesem Zusammenhang als Artefakte zu bewerten.

Generell existiert aber theoretisch die Möglichkeit, dass apoptotische oder nekrotische Prozesse noch nach dem von uns untersuchten Zeitpunkt von 72 Stunden auftreten und so die maximale Nachweisbarkeit TUNEL-positiver Zellen noch nicht erreicht sein könnte. Untersuchungen von Endres et al. zeigen aber, dass dies wahrscheinlich nicht der Fall ist und die Reifung des Infarkts und damit die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen 72 Stunden nach Infarkt ihrem Maximum zustrebt.⁸³ Dennoch können wir nicht mit Sicherheit ausschließen, dass die Verwendung unseres BCCAO-Präkonditionierungsmodells nicht doch zu einem zellulären Schaden führt, da kleinere Schäden eventuell nicht durch TUNEL erkannt werden können und nicht klar ist, welche Quantität an DNA-Strangbrüchen zu einem positiven TUNEL-Signal führt.⁹³ Kleinere,

ultrastrukturelle Veränderungen der Zelle könnten diesem Nachweis entgehen und nur mithilfe weiterer Verfahren, wie z.B. der Elektronenmikroskopie, nachgewiesen werden. Ob also doch eine gewisse bleibende Schädigung durch BCCAO hervorgerufen wird und wie groß dieser eventuelle Schaden tatsächlich ist, muss in weiteren Studien durch die Verwendung weiterer Untersuchungsmethoden, wie z.B. der Elektronenmikroskopie, beleuchtet werden. Festzuhalten bleibt allerdings, dass keines der von uns mithilfe der BCCAO präkonditionierten Tiere nach der Operation neurologische Defizite oder Verhaltensauffälligkeiten aufwies.

4.2 Zeitlicher Verlauf der IT

Mithilfe unseres BCCAO-Protokolls konnten wir demnach ischämische Toleranz erzeugen, die wir anhand des Zeitverlaufs den unterschiedlichen Zeitfenstern der IT zusprechen. Das 24 Stunden Zeitfenster repräsentiert dabei klar den Zeitraum der späten IT.²⁰ Studien von Kirino et al., die eine BCCAO als konditionierenden Stimulus einsetzten, konnten ebenfalls eine protektive Wirkung in diesem Zeitraum nachweisen, allerdings in einer anderen Spezies, der Wüstenrennmaus.²⁶ Darüberhinaus konnten Wu et al. ebenfalls an einem BCCAO-Präkonditionierungsmodell zeigen, dass späte ischämische Toleranz im Zeitfenster von 24 Stunden oder mehr zwischen konditionierendem und schädigendem Stimulus auch in C57Bl-Mäusen existiert.⁹⁰ Durch zahlreiche weitere Studien in diesem Zeitfenster gilt sowohl der Nachweis, als auch der Zeitpunkt der späten ischämischen Toleranz im Gehirn als sehr wahrscheinlich.^{20,94} Auch unsere Ergebnisse bestätigen diese Annahme.

Beachtenswert ist, dass wir im 30 Minuten Zeitfenster im Vergleich zum 24 Stundenfenster eine noch stärkere Neuroprotektion gegenüber einer fokalen zerebralen Ischämie nachweisen konnten, die aufgrund des Zeitraums klar in das Zeitfenster der frühen ischämischen Toleranz fällt. Dass innerhalb eines so kurzen Zeitraums ischämische Toleranz entstehen kann, zeigen auch die Studien von Schurr et al.²⁴, Pérez-Pinzón et al.⁹⁵ sowie von Stagliano et al.⁹⁶, die hinsichtlich des Zeitraums von 30 Minuten mit unseren Ergebnissen exakt übereinstimmen. Allerdings untersuchten nur Pérez-Pinzón et al. und Stagliano et al. dieses Zeitfenster in einem *in-vivo* Modell, wobei nur Stagliano et al. mit C57Bl6-Mäusen arbeitete. Weitere Studien an Mäusen von Atochin et al. bestätigen aber ebenfalls das von uns gefundene protektive Zeitfenster der frühen IT 30 Minuten nach präkonditionierendem Stimulus.⁷⁴

Es ist aber festzuhalten, dass Stagliano et al. und Atochin et al. mittels einer sehr kurzen transienten MCAO (5 Minuten) einen fokalen ischämischen Stimulus als präkonditionierende Maßnahme benutzten und daher ein direkter Vergleich zu unseren Ergebnissen, die auf der Verwendung eines globalen ischämischen Stimulus (BCCAO) beruhen, nicht gezogen werden kann. Trotz unterschiedlicher Präkonditionierungs- und Schadensmodelle existieren dennoch ähnliche Beobachtungen, die einen gewissen Vergleich zulassen. So konnten Atochin et al., welcher als schädigenden Stimulus eine permanente MCAO verwendete, ebenfalls eine signifikante Reduktion des Schlaganfallvolumens um ca. 30 mm³ nachweisen. In den von uns durchgeführten Experimenten konnten wir, trotz kleinerer Schlaganfallvolumina der Sham-Tiere, die sich durch die im Vergleich kürzere MCAO-Zeit erklärt (45 Minuten MCAO vs. permanente MCAO bei Atochin), einen noch stärkeren protektiven Effekt der frühen IT von ca. 60 mm³ Infarktvolumenreduktion nachweisen. Dies erklärt sich wohlmöglich aus der von uns gewählten längeren Überlebenszeit der Tiere nach MCAO (in unserer Studie 72 Stunden statt 24 Stunden bei Stagliano et al. und Atochin et al.), wodurch Unterschiede zwischen den Gruppen durch die Zunahme an ischämischer Hirnschädigung über die Zeit deutlicher herausgestellt werden.^{96,74} Eventuell ist der Unterschied aber auch einem Vorteil des von uns verwendeten BCCAO-Protokolls gegenüber einer sehr kurzen MCAO als präkonditionierendem Stimulus geschuldet.

Interessanterweise konnten wir im Einstunden-Zeitfenster keinen protektiven Effekt der BCCAO nachweisen und auch das Zweistunden-Fenster zeigte nur eine geringe messbare Neuroprotektion. In Zusammenschau mit den anderen Studien zum 30 Minuten Zeitfenster lassen diese Beobachtungen den Schluss zu, dass es sich beim 30 Minuten Zeitfenster um den Zeitpunkt handelt, in dem der Effekt der frühen IT die optimale Wirkung erzielt. Dem gegenüber stehen Studien von Orio et al.⁷⁵, die das optimale Zeitfenster der frühen IT bei einer Stunde nach konditionierendem Stimulus sehen. Die Vergleichbarkeit dieser Studie mit unseren Ergebnissen ist aber begrenzt, da Orio et al. mit der LPS-Applikation sowohl einen anderen Stimulus als auch mit der intrazerebralen NMDA-Injektion ein anderes Schadensmodell an C57Bl6 Mäusen verwendeten. Neben der gezeigten Neuroprotektion im Einstunden-Zeitfenster ist aber auch bei Orio et al. eine leichte Verringerung des exzytotoxischen Schadens im 30-Minuten-Zeitfenster festzustellen, die aber nicht signifikant waren. Aufgrund mehrerer Wiederholungen der Zeitreihenversuche im 30-Minuten und Einstunden-Intervall unsererseits (Daten nicht

abgebildet), die immer wieder gleiche Ergebnisse erbrachten, gehen wir aber davon aus, dass es sich bei dem von uns beobachteten Effekt um robuste und reproduzierbare frühe IT im 30-Minuten Zeitfenster handelt.

Insgesamt war die Neuroprotektion der frühen IT deutlicher ausgeprägt als die der späten IT. Der beste protektive Effekt der BCCAO kommt also wahrscheinlich eine halbe Stunde nach Ende dieser Art der Präkonditionierung zum Tragen, scheint aber insgesamt einen biphasischen Verlauf aufzuweisen, da im Einstundenzeitfenster kein Effekt mehr zu beobachten ist, dafür aber wieder im späten 24-Stunden Zeitfenster. Es besteht darüberhinaus theoretisch aber die Möglichkeit, dass der optimale Effekt der frühen IT noch zu einem anderen Zeitpunkt zwischen Ende der BCCAO und einer Stunde liegt. So bilden unsere Untersuchungen z.B. nicht den Zeitpunkt von 15 Minuten und 45 Minuten zwischen BCCAO und MCAO ab, zu denen eine noch stärkere Reduktion des Infarktolumens eventuell hätte beobachtet werden können. Auch in der Literatur sind diese Zeitfenster der frühen IT bisher nicht untersucht worden, sodass zukünftige Studien dieser Frage nachgehen sollten.

Die leichte Neuroprotektion im Zweistundenzeitfenster zeigt mit ihrem Einsetzen erst nach Stunden schon Charakteristika der späten IT und könnte der Beginn eines zunehmenden neuroprotektiven Effektes sein, der in vergleichbaren Studien von Cho et al. auch nach vier Stunden beobachtet wurde und am deutlichsten 24-Stunden nach BCCAO zu erkennen ist.⁷² Zum Zweck des Tierschutzes, im Sinne einer möglichst reduzierten Anzahl von Tierversuchen, setzt sich die Sham-Gruppe (Abbildung 16, erste Box von links) aus Infarktolumina Sham-präkonditionierter Tiere aller Zeitfenstern zusammen. Die Ergebnisse der Sham-Tiere aus den unterschiedlichen Zeitfenstern waren konsistent und die abgebildete Sham-Gruppe somit repräsentativ.

4.3 De-novo Proteinbiosynthese bei früher und später IT

Studien zum zeitlichen Verlauf der *de-novo* Proteinsynthese zeigen, dass dieser Prozess mehrere Stunden benötigt, um neue Proteine, z.B. als Reaktion auf einen neuartigen Stimulus oder Situation, zu synthetisieren.⁹⁷

Es ist experimentell nachgewiesen, dass die frühe IT unabhängig von der *de-novo* Proteinsynthese sein muss, da das schnelle Eintreten des Effektes innerhalb von Minuten keine Zeit für die Neusynthese von Proteinen zulässt. Auch unsere Ergebnisse lassen

diese Schlussfolgerung zu, da wir im frühen Zeitfenster keinen Effekt der Anisomycin Applikation bei BCCAO präkonditionierten Tieren sehen, obwohl die gleiche Dosis der Applikation im späten Zeitfenster ischämische Toleranz verhinderte. Die Unabhängigkeit der frühen IT von der *de-novo* Proteinsynthese fanden auch Yunoki et al.⁹⁸, die mithilfe von Hypothermie frühe IT in Ratten induzierten und diese auch nach der Verabreichung von Anisomycin noch nachweisen konnten. Auch die Studie von Orio et al.⁷⁵ untersuchte das frühe Zeitfenster der IT und fand ebenfalls heraus, dass Anisomycin keinen Einfluss auf die frühe protektive Wirkung ihres präkonditionierenden Stimulus hatte. Obwohl diese Studien andere Stimuli zur Präkonditionierung benutzten, macht die Beobachtung, dass verschiedene Stimuli frühe IT verleihen können, es wahrscheinlich, dass ein gemeinsamer zugrunde liegender Mechanismus der frühen IT existiert. Die Unabhängigkeit von der Proteinsynthese stellt somit ebenfalls ein gemeinsames Merkmal dieses Mechanismus dar. Mit dem Nachweis der Unabhängigkeit von der *de-novo* Proteinsynthese gehen wir deshalb davon aus, dass es sich bei dem von uns gefundenen Effekt um frühe ischämische Toleranz handelt, und dass andere, schnellere Mechanismen zum Phänomen der frühen IT führen. Wie eingangs erwähnt, könnte es sich dabei um post-translationale Modifikationen, wie z.B. Ubiquitylierung und/oder Änderungen der Durchlässigkeit von mitochondrialer K_{ATP} -Ionenkanäle, handeln.²⁰

Bezüglich post-translationaler Modifikationen zeigen Studien von Meller et al., dass frühe IT zu einer schnellen und reversiblen Änderung der postsynaptischen Dichte durch dendritische Spineretraktion, vermittelt über das Ubiquitin-Proteasomen-System, führt.⁹⁹ Diese schnellen Veränderungen bedingen eine geringere Anfälligkeit der Zellen für NMDA-Rezeptor vermittelte Toxizität, wie sie durch zerebrale Ischämie entsteht, und könnten eine Erklärung der frühen IT darstellen.

Eine weitere mögliche Reaktionskaskade der frühen IT könnte über NO zur erhöhten Konzentrationen von cGMP und folglich zur Aktivierung der Proteinkinase C führen (siehe Abschnitt 4.4).⁷⁶ Studien von Costa und Garlid et al. an Kardiomyozyten zeigen, dass die Aktivierung der Proteinkinase C zur Öffnung mitochondrialer K_{ATP} -Kanäle führt, welche daraufhin eine erhöhte Konzentration an ROS bedingen (engl.: reactive oxygen species) und somit eine gesteigerte mitochondriale Permeabilität verhindert wird.¹⁰⁰ Die Inhibition führt damit zur Stabilisierung mitochondrialer Funktionen, einem grundlegenden Mechanismus, der das Überleben von Zellen begünstigt.¹⁰¹ Obwohl diese Ergebnisse in Studien von Kardiomyozyten erzielt wurden, existieren entsprechende Be-

obachtungen auch in Neuronen weshalb ein gleichgearteter Mechanismus angenommen werden kann.¹⁰²

Mehrere Studien bestätigen, dass im späten Zeitfenster der IT, 24 Stunden nach präkonditionierendem Stimulus eine funktionierende *de-novo* Proteinsynthese im Gegensatz zur frühen IT essentiell für die Mechanismen der späten IT ist.^{18,20,34} Dieses geht auch aus unseren Versuchen zum späten Zeitfenster hervor.

Hinsichtlich ihrer zugrunde liegenden Mechanismen konnten Studien zeigen, dass ischämische Präkonditionierung im späten Zeitfenster zu einer Hochregulation von Genen führt, die dann über die Neusynthese von Proteinen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit der Zelle bewirken.¹⁰³ Die Zellen werden so reprogrammiert, dass ihre Zellvorgänge denen beim Winterschlaf stark ähneln. Es wird daher angenommen, dass es sich bei diesen Prozessen um alte, evolutionär konservierte Eigenschaften von Zellen handelt, die in fast allen Zellen vermutet werden.⁴⁹ Die Fähigkeit, diese Programme zu „erwecken“ und so eine erhöhte Widerstandsfähigkeit zu schaffen, beansprucht Stunden bis Tage und ist somit die logische Erklärung für das späte Auftreten dieser Form von IT. Unsere Ergebnisse bestätigen diese Theorie der nötigen *de-novo* Proteinsynthese im späten Zeitfenster, da wir einen kompletten Verlust des präkonditionierenden Effekts durch die Hemmung dieser Synthese mit Anisomycin im späten Zeitfenster beobachteten. Unsere Ergebnisse stimmen damit mit Studien von Barone et al.¹⁰⁴ überein, die ebenfalls diese Proteinsyntheseabhängigkeit für die späte IT beweisen konnten. Es muss aber erwähnt werden, dass Barone et al. in ihren Studien nicht Anisomycin als Inhibitor der *de-novo* Proteinsynthese verwendeten, sondern den relativ toxischen Inhibitor Cycloheximid und deshalb eine direkte Vergleichbarkeit nicht unmittelbar gegeben ist. Darüberhinaus existieren Studien von Kato et al.¹⁰⁵, in denen wider der Erwartungen die Applikation von Anisomycin zu keiner Aufhebung der späten IT führte, obwohl mit der gleichen Applikation eine Syntheseinhibition von Proteinen gezeigt werden konnte. Die Autoren machen dafür Toleranz induzierende Eigenschaften von Anisomycin in Zellen außerhalb des ZNS verantwortlich, die eventuell veränderte metabolische Abläufe nach Applikation von Anisomycin bedingt haben könnten.

Generell entschlossen wir uns zur Verwendung von Anisomycin als Inhibitor der *de-novo* Proteinsynthese, da seine Eigenschaften durch Flodd et al. detailliert untersucht

und beschrieben sind.⁸⁶ Anisomycin stellt demnach einen relativ preiswerten, nur in hohen Dosen toxischen Inhibitor dar, der sich mit geringem Aufwand in Lösung bringen und somit gut dosieren und applizieren lässt. Wir verzichteten in unseren Experimenten auf das eigene Erstellen einer Dosis-Wirkungskurve, da diese hinreichend von Flood et al. für Gehirn und Leber gezeigt wurde. Die von uns verwendete Dosierung zeigte darüberhinaus auch in anderen Studien zur IT hinreichende Inhibition der *de-novo* Proteinsynthese und lag weit unter der von Flood et al. beschriebenen geringfügig toxischen Dosierung.^{38,98}

Ein weiterer zu diskutierender Punkt unserer Versuche zur Rolle der *de-novo* Proteinsynthese im frühen Zeitfenster ist, dass in dieser Fragestellung nur eine Reduktion des Infarkt Volumens auf ca. 60 mm³ im Mittel durch BCCAO erzielt werden konnte (vergleiche Abbildung 16A, Vehikel-BCCAO-Gruppe), während in Studien zur Zeitreihe (vergleiche Abbildung 15, Box 2 von links) eine Reduzierung auf 30 mm³ im Zeitfenster von 30 Minuten erreicht wurde. Eine mögliche Erklärung dieser Unterschiede ist die Verwendung der manuell gefertigten Monofilamente, die zu einer relativ großen Variabilität der Infarkt volumina führen kann sowie zu individuellen Unterschieden zwischen einzelnen Versuchstieren.

4.4 eNOS und nNOS bei früher IT

Da die Bedeutung der Rolle von Stickstoffmonoxid innerhalb fokaler zerebraler Ischämie und innerhalb der endogenen Schutzfunktionen des Gehirns seit Jahren kontrovers diskutiert wird, richteten wir in unseren nachfolgenden Studien zur Charakterisierung der von uns gefunden frühen IT den Fokus auf die endotheliale und neuronale NO-Synthase als Quellen dieses Moleküls. Wie einleitend erwähnt, zeigen frühere Studien von Gidday et al. eine mögliche Beteiligung der endothelialen NO-Synthase im Zusammenhang mit der späten IT und beschreiben eine neuroprotektive Wirkung derselben im späten Zeitfenster.⁵³ In dem von uns verwendeten Präkonditionierungsmodell mittels BCCAO und transients MCAO wurde dies bisher für frühe IT nicht gezeigt. Unsere Ergebnisse weisen nun darauf hin, dass auch im frühen Zeitfenster eine Etablierung von Neuroprotektion ohne eNOS nicht möglich ist. Somit unterstützen unsere Ergebnisse Erkenntnisse von Orío et al., die ebenfalls zeigen konnten, dass eNOS essentiell für die Generierung von NO und somit die frühe IT ist.⁷⁵ Darüberhinaus weisen auch weitere Studien von Atochin et al. auf diese Zusammenhänge hin, denn auch in ihrer Studie

konnten eNOS Knock-out Mäuse nicht von der ischämischen Präkonditionierung profitieren.⁷⁴ Obwohl wir in eNOS Knock-out Mäusen keine Messungen der absoluten zerebralen Durchblutung vornahmen, ist es unwahrscheinlich, dass der von uns gefundene Effekt auf Unterschiede der zerebralen Durchblutung zwischen Wildtyp und eNOS Knock-out Mäusen beruht, da Atochin et al. zeigen konnten, dass die zerebrale Durchblutung in den genetischen Variationen von eNOS und nNOS Knock-out Mäusen im Vergleich zum Wildtyp Mäusen gleich bleibt. Atochin et al. weisen aber darauf hin, dass mit letzter Sicherheit Unterschiede diesbezüglich nicht ausgeschlossen werden können, da die Messungen methodenbedingt nur in narkotisierten Tieren vorgenommen wurden und eventuelle Unterschiede an wachen Tieren verdecken.⁷⁴

Auch ist anzumerken, dass die Infarktgröße unserer Sham-präkonditionierten eNOS Knock-out Mäuse nicht größer als die der Sham-präkonditionierten Wildtyp Mäuse ist und damit nicht mit Beobachtungen von Huang et al. übereinstimmt, die dieses an ihren eNOS Knock-out Mäusen beobachteten.⁶⁵ Durch den Wegfall der neuroprotektiven eNOS in Knock-out Mäusen hätten auch wir in Sham-präkonditionierten Knock-out Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen ein vergrößertes Infarktvolumen messen müssen. Ein Grund für die Größenunterschiede zwischen den Ergebnissen von Huang et al. und den unseren könnte in den unterschiedlichen Verschlusszeiten der Arteria cerebri media liegen. Huang et al. benutzten ein MCAO-Modell mit permanenter Okklusion für 24 Stunden, während es sich bei unserem um ein transientes MCAO-Modell mit einer Verschlusszeit von lediglich 45 Minuten handelt, was folglich kleinere Infarkte zur Folge hat. Allerdings müsste das von uns verwendete MCAO-Modell zumindest zu gleich großen Infarktvolumina zwischen Sham-präkonditionierten Wildtyp und eNOS Knock-out Mäusen führen und nicht wie abgebildet zu kleineren Infarktvolumina der eNOS Knock-out Tiere, wie im Vergleich zwischen Abbildung 17 und Abbildung 15 ersichtlich. Letztendlich lässt sich über die genauen Gründe für die Unterschiede nur spekulieren, die neben der Verwendung handgefertigter Monofilamente auch weitere methodisch bedingte Ursachen haben können.

Weiterhin testeten wir nicht, ob eine pharmakologische Inhibition der eNOS zu gleichen Ergebnissen kommt wie wir sie bei unseren eNOS Knock-out Mäusen zeigen konnten. Die doppelte Testung eines gefunden Effekts in einem pharmakologischen Setting und einem Knock-out Modell wird generell empfohlen, da Knock-out Tiere zu keinem Zeit-

punkt ihrer Existenz über das ausgeschaltete Gen verfügen und sich so eventuelle kompensatorische Mechanismen entwickeln, die zu einem verfälschten Ergebnis führen könnten.¹⁰⁶ Auch die zitierten Studien von Atochin et al. und Orio et al. führten keine Versuche zur pharmakologischen Inhibition von eNOS im frühen Zeitfenster der IT durch, sodass weitere Arbeiten auf diesem Gebiet notwendig sind. Da jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt kein ausreichend spezifischer pharmakologischer eNOS-Inhibitor existiert, sind bis zur Verfügbarkeit eines solchen keine vergleichenden Studien zwischen eNOS Knock-out Mäusen und der pharmakologischen Inhibition von eNOS möglich.¹⁰⁷ Eine mögliche Lösung zur pharmakologischen Testung könnte in der Substitution von NO durch NO-Donatoren in eNOS defizienten Mäusen liegen, um so eine mögliche Restitution des neuroprotektiven Effekts zu zeigen.

Im Gegensatz dazu existiert mit 7-Nitroindazol ein relativ spezifischer pharmakologischer Inhibitor der nNOS, den wir in dem von uns etablierten Versuchsprotokoll an präkonditionierten und nicht präkonditionierten Wildtypmäusen untersuchten. Die Applikation von 7-NI führte zur völligen Aufhebung des frühen protektiven Effekts der BCCAO. Die Schlussfolgerung, die wir aus diesen Beobachtungen ziehen ist, dass neben der eNOS auch die nNOS wichtig für die Ausbildung eines Ischämie toleranten Phänotyps ist. Außer den schädigenden Eigenschaften die diese Synthase besitzt, indem sie zur überschießenden und somit toxischen Produktion von NO bei zerebraler Ischämie führt, existieren Eigenschaften der nNOS, die im Setting der ischämischen Präkonditionierung anscheinend sogar notwendig für die Ausbildung der frühen IT sind.

Damit widersprechen unsere Ergebnisse Beobachtungen, die der nNOS überwiegend toxische Effekte zuschreiben. Eine mögliche Erklärung dieser unterschiedlichen Ergebnisse scheint die Dauer der Ischämie und damit die Menge des durch nNOS ausgeschütteten NOs zu sein. Ganz nach dem wohlbekannten Ausspruch von Paracelsus: „Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift; allein die Dosis macht, daß ein Ding kein Gift sei.“¹⁰⁸ führt die Dauer der Ischämie im Rahmen einer Präkonditionierung zu geringen Dosen von NO und somit zur Neuroprotektion, während weitaus länger andauernde ischämische Zustände zu hohen Dosen an NO und folglich zur Schädigung des Gewebes führen.

Zu dem gleichen Schluss kommen auch die Studien von Atochin et al. und Orio et al., die zusätzlich zur pharmakologischen Inhibition auch bei nNOS Knock-out Mäusen kei-

ne frühe IT durch LPS oder ischämische Stimuli auslösen konnten.^{74,75} Diese zusätzliche Beobachtung konnten wir bisher nicht bestätigen, da uns zum Zeitpunkt der Versuche keine nNOS Knock-out Mäuse zur Verfügung standen. Einen präkonditionierenden Effekt der 7-NI Applikation konnten wir dagegen durch Kontrollversuche ausschließen, indem wir Wildtyptieren 7-NI injizierten und anschließend einer Sham-Präkonditionierung unterzogen. Infarkt volumina dieser Tiere nach 45 Minuten MCAO unterschieden sich nicht von Infarkt volumina der Tiere ohne 7-NI Injektion. Die von uns verwendete Dosis 7-NI zeigte bereits in Studien von Atochin et al., Orio et al. sowie Bush et al. suffiziente Wirkung und ist daher als ausreichend zur Inhibierung der nNOS anzusehen.^{74,75,87}

Es muss aber darauf hingewiesen werden, dass die Selektivität von 7-NI in Studien von Alderton et al. untersucht wurde und von den Autoren als nicht selektiv eingeschätzt wird.¹⁰⁹ Laut Alderton et al. besteht bei allen drei Isoformen eine ähnliche Affinität von 7-NI zur Hemmung. Es gilt aber zu beachten, dass die Untersuchungen *in-vitro* an humanen Proben vorgenommen wurden. Eine Übertragung auf die Selektivität von 7-NI in murinen *in-vivo* Studien ist somit nicht unmittelbar gegeben.

Hinsichtlich der von uns vermuteten Beteiligung von eNOS und nNOS bei der Vermittlung der frühen IT messen also zwei wichtige zitierte *in-vivo* Studien diesen Synthesen ebenfalls eine zentrale Bedeutung zu.^{74,75} Dabei unterstützen unsere mithilfe eines ischämischen Stimulus erhobenen Ergebnisse die Hypothese, dass eNOS und nNOS zusammen bei der Ausbildung des protektiven Effekts in der frühen IT wirken.⁷⁵ Die Relevanz dieser Synthesen bei früher IT im Gegensatz zur iNOS erklärt sich über die Eigenschaft der eNOS und nNOS, konstitutionell vorhanden zu sein und daher unmittelbar eine Rolle in der Vermittlung dieses Effekts spielen zu können.

Wie genau diese Mechanismen ablaufen und wie das Zusammenspiel von eNOS und nNOS dabei funktioniert, ist immer noch Gegenstand intensiver Forschung und Diskussion. Dabei könnte NO sowohl nötig sein, um ischämische Toleranz zu stimulieren, als auch im Sinne eines Transducers wirken, um vaskuläre und neuronale Protektion zu vermitteln.⁶⁰ Bisher ist bekannt, dass NO in mindestens zwei Signalwegen eine wichtige Rolle einnimmt, dem RAS (engl.: rat sarcoma)-Signalweg sowie dem PI3 (engl.: phosphate-inositol-3)/Akt-Signalweg.^{110,111} Da die korrekte Funktion des Gehirngewebes in hohem Maße von der ununterbrochenen Zufuhr von Sauerstoff und Glukose abhängig ist, führen schon kurze Unterbrechungen der Blutversorgung zu Energiemangel und zur

Depolarisation von Neuronen.⁵ Exzitatorische Aminosäuren wie Glutamat werden ausgeschüttet und aktivieren NMDA-Rezeptoren, die zu einem erhöhten Kalziumeinstrom in die Zelle führen. Diese erhöhten Kalziumspiegel aktivieren unter anderem die nNOS, welche daraufhin NO ausschüttet.⁶⁰ Studien von Lander et al. zeigen, dass NO das G-Protein RAS aktiviert, welches daraufhin an die RAF-Kinasen (engl.: rat fibrosarcoma) bindet und damit eine Kaskade von Phosphorylierungen unterschiedlicher weiterer Kinasen auslöst, welche über MEK (engl.: MAP or ERK-kinase) schließlich die ERK (engl.: extracellular signal regulated kinase) aktiviert.¹¹² Die ERK ist damit das Effektormolekül dieses Signalwegs und moduliert auf unterschiedlichsten Ebenen grundlegende Zellmechanismen, die zum Überleben der Zelle nötig sind.¹¹⁰ Die Aktivierung der RAS durch NO als Produkt der nNOS führt neben der Aktivierung des RAF-MEK-ERK Signalweges auch zum Einbau der PI3-Kinase in die Zellmembran, welche dadurch zur Bildung von Phosphoinositiden angeregt wird und somit zur Aktivierung der Akt führt.⁶⁰ Vor allem die Akt-1, die in Neuronen eine wichtige Position einnimmt, phosphoryliert eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, Zelltodproteinen und die eNOS, die damit aktiviert oder inaktiviert werden. Es wird angenommen, dass die eNOS somit ein Effektor dieser Signalkaskade ist und durch ihre Phosphorylierung Zellprozesse wie die Modulation von Caspasen, die Aktivierung des PKC-Signalweges, als auch eine veränderte Genexpression beeinflusst werden.⁶⁰

Wie unter 4.3 näher erläutert, könnte die Reaktionskaskade der frühen IT, angestoßen über eine kurze ischämische Episode als Stimulus, zur Aktivierung von nNOS und im weiteren Verlauf eNOS führen, wodurch über die erwähnten Signalwege (cGMP/Proteinkinasen) eine Aktivierung mitochondrialer K_{ATP} -Kanäle erfolgen könnte, welche zur Stabilisierung mitochondrialer Funktionen und somit zum besseren Überleben von Neuronen unter ischämischen Zuständen führt.^{76,102}

Trotz dieser Erkenntnisse bleibt das Wissen um die genaue Wirkungsweise der eNOS und nNOS - gerade im frühen Zeitfenster der IT - lückenhaft und weitere Arbeiten sind notwendig, um den exakten Ablauf der Mechanismen weiter aufzuschlüsseln. So stellt sich die Frage, wie Interaktionen zwischen nNOS und eNOS ablaufen können, obwohl die eNOS im Endothel und die nNOS in Neuronen, also an unterschiedlichen Orten, lokalisiert sind. Eine Erklärung könnte in der bekannten Eigenschaft von NO liegen, als leicht flüchtiges Gas über Zellgrenzen hinweg zu diffundieren und somit in nicht unmittelbar benachbarten Kompartimenten wirken zu können.

Unsere Studien weisen darauf hin, dass eine funktionierende Neuroprotektion *in-vivo* durch frühe ischämische Toleranz nur durch ein intaktes Zusammenspiel vaskulärer und neuronaler Faktoren möglich ist.

4.5 Limitationen der Studie

Obwohl die bisher zitierten Studien die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen, indem sie zu vergleichbaren Ergebnissen kommen, müssen wir im Folgenden auch auf mögliche Limitationen der Arbeit eingehen.

4.5.1 Zerebrale Durchblutung und Laser-Doppler-Messung

Zur Überprüfung einer effektiven Reduktion der zerebralen Durchblutung während der BCCAO sowie zur Sicherstellung einer guten Reperfusion während der nicht ischämischen Phasen dieses Verfahrens nutzten wir die Laser-Doppler-Messung. Die Ergebnisse zeigen, dass das Verfahren der BCCAO eine gute Steuerung der Durchblutung gewährleistet. Unsere Messungen stimmen mit Beobachtungen von Atochin et al.⁷⁴ überein, die ebenfalls eine schnelle Abnahme der relativen regionalen CBF (rCBF) nach Schluss der Arteria carotis communis messen konnten und ebenfalls eine gute Reperfusion nach erneuter Öffnung registrierten. Auch Studien von Cho et al. zeigen einen Abfall des rCBF auf unter 90% des Ausgangswertes durch BCCAO in C57Bl6 Mäusen innerhalb weniger Sekunden.¹¹³ Desweiteren konnten Cho et al. zeigen, dass eine Reduktion des rCBF unter 90% zur Etablierung von ischämischer Toleranz führt.⁷² Somit existieren verschiedene Studien, die zeigen, dass BCCAO in C57Bl6 Mäusen zu einer Reduktion des rCBF unter 90% führt und dass die Wiederholung von transienten BCCAO-Episoden IT verleiht.

Im Gegensatz zu Atochin et al., maßen wir keine zerebrale Durchblutung mit Hilfe der LDF bei den von uns verwendeten eNOS Knock-out Mäusen während BCCAO. Beobachtungen zeigen aber, dass der relative rCBF in eNOS Knock-out Mäusen sich nicht maßgeblich von dem in Wildtypmäusen unterscheidet. Es muss aber darauf hingewiesen werden, dass es sich bei der von uns gemessenen Durchblutung nur um relative Werte handelt. Unsere Messungen können also keine Aussage über die absoluten Verhältnisse machen. Die bereits vielfach zitierte Studie von Atochin et al. beweist aber, dass auch hier keine Unterschiede zwischen Wildtyp C57Bl/6 und eNOS *-/-* zu verzeichnen sind.

Ein weiterer Kritikpunkt der LDF-Methode ist, dass jeweils nur ein sehr selektives Areal hinsichtlich der zerebralen Durchblutung überwacht werden kann und deshalb keine Aussagen über die zerebrale Durchblutung in der Penumbra gemacht werden können. Zukünftige Studien sollten nicht nur die Hemisphäre der fokalen zerebralen Ischämie hinsichtlich des CBF messen, sondern auch den CBF der kontralateralen Hemisphäre, um eventuelle Unterschiede erkennen und bewerten zu können. Untersuchungen von Dirnagl et al.⁸⁰ weisen allerdings darauf hin, dass die LDF zwar keine verlässliche Aussage über die absoluten regionalen Durchblutungsverhältnisse geben kann, aber prozentuale Unterschiede in der LDF-Messung sehr gut mit prozentualen Unterschieden in der absoluten Messung korrelieren. Insgesamt erscheint also ein verfälschender Effekt durch unterschiedliche Reduktion der zerebralen Durchblutung oder Reperfusion während BCCAO zwischen einzelnen Tieren unwahrscheinlich. Das Verfahren der BCCAO ist daher geeignet, reproduzierbare und vergleichbare ischämische Präkonditionierungen durchzuführen. Es wäre aber für weitere Untersuchungen wünschenswert, andere Methoden der CBF Messung (z.B. Laser-Speckle-Imaging) zu verwenden oder mit den LDF-Messungen zu kombinieren, um mehrere Regionen des Gehirns hinsichtlich Veränderungen in der Durchblutung überwachen zu können.

4.5.2 MCAO-Modell und Mausstamm

Nicht nur die BCCAO und die Verwendung der LDF bedarf einer kritischen Betrachtung, sondern auch das von uns verwendete Schadensmodell der MCAO unterliegt maßgeblich der Erfahrung und Übung des Operateurs. Unsere Erfahrung zeigt dabei, dass eine kontinuierliche Durchführung der Experimente durch den selben Operateur anzustreben ist, um konsistente und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Dieses war bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten der Fall. Die Anwendung einer 45 minütigen MCAO führte in den unterschiedlichen Fragestellungen bei Sham-präkonditionierten Wildtypmäusen zu einem Schlaganfallvolumen von ca. 100 mm³ und zeigt somit eine gute Reproduzierbarkeit und Konsistenz. Lediglich bei der Fragestellung zur Rolle der eNOS (3.5) und nNOS (siehe 3.6) konnte bei Kontrolltieren nur ein kleineres Schlaganfallvolumen erzielt werden. Gründe für eine starke Varianz des Infarktolumens in dem von uns verwendeten intraluminalen MCAO-Fadenmodell können dabei sowohl in der Art der verwendeten Filamente als auch im verwendeten Mausstamm liegen. So ist für die erfolgreiche Induktion und gute Reproduktion eines ischämischen Schlaganfalls

entscheidend, dass z.B. Länge des Filaments, Dicke der Filamentspitze und Anatomie des Gefäßsystems des Versuchstieres bestmöglich aufeinander abgestimmt sind. Studien von Spratt et al. zum Vergleich von Silikon beschichteten Filamenten und Poly-L-Lysin-Filamenten, deren Spitze durch Erwärmung verdickt wurden, zeigen einen Vorteil der Silikon beschichteten Filamente hinsichtlich Konsistenz der Infarktgröße und verringerter Mortalität gegenüber den Poly-L-Lysin-Filamenten.¹¹⁴ Wir verwendeten in eigener Handarbeit hergestellte beschichtete Monofilamente mit einem Durchmesser von ca. 200 μm .¹¹⁵ Neben der gleichmäßigen und ausreichend langen Beschichtung des Filaments spielt auch die Länge des Filament eine Rolle bzw. der Abstand zur Carotisgabel, an dem das Filament in das Lumen des Gefäßsystem eingeführt und vorgeschoben wird.¹¹⁶ Optimale Filamentlängen für das MCAO-Modell der Maus werden von Liu et al. mit 9-11 mm angegeben.¹¹⁷ Wir verwendeten Filamente mit einer Länge von 13mm, da unsere Insertionsstelle proximal der Carotisbifurkation und nicht wie in der zitierten Literatur erwähnt, distal dieser lag. Zusammengenommen ist die passgenaue Auswahl der Filamente entscheidend, um einen signifikanten Blutfluss über die Arteria cerebri communicans anterior des Circulus willisi zur zu verschließenden Arteria cerebri media zu vermeiden und einheitliche Infarktgrößen erzeugen zu können.

Mit LDF Messungen des rCBF an einer repräsentativen Gruppe von Tieren konnten wir eine wirksame und ausreichende Reduktion durch die von uns verwendeten Monofilamente und MCAO-Technik belegen (vergleiche Abbildung 13).

Trotzdem birgt die eigene Herstellung der beschichteten Filamente selbst bei größter Sorgfalt immer das Risiko einer gewissen Schwankungsbreite hinsichtlich des Durchmessers der Filamentspitze und der Länge der Beschichtung. Daher stehen seit einiger Zeit kommerzielle standardisierte Monofilamente zur Verfügung, deren Einsatz in zukünftigen Studien bevorzugt werden sollte, um verfälschende Effekte durch unterschiedlich gearbeitete Filamente zu minimieren. Weiterhin muss bei der Analyse der Infarktgrößen und Varianz dieser die Auswahl des verwendeten Mausstammes mit beachtet werden. Studien von Kitagawa et al. zeigen an den Modellen der BCCAO und MCAO, dass die Erfolgsquote, eine zerebrale Ischämie zu verursachen und deren Größe maßgeblich von der Ausbildung der Arteria cerebri communicans posterior abhängt.¹¹⁸ In dem von uns verwendeten Tierstamm C57Bl6 ist die Arteria cerebri communicans posterior nur selten oder insuffizient ausgebildet, sodass das Einführen eines Filaments in den Circulus willisi auch zum Verschluss der Arteria cerebri posterior führt,

die aufgrund der fehlenden Arteria cerebri communicans posterior dann nicht mehr mit Blut versorgt wird.¹¹⁸ Es resultieren dadurch häufig große Infarkte bei Mäusen des Stamms C57Bl6. Dies konnten auch Beckmann et al. an einer *in-vivo* MRT-Studie zeigen, die ebenfalls die vaskuläre Anatomie von C57Bl6-, CBA-, CD1- und SV-129 Mäusen untersuchten.¹¹⁹

Diese Untersuchungen bestätigen, dass die größte Ausprägung der Arteria cerebri media und das von ihr versorgte Gebiet in C57Bl6 Mäusen zu verzeichnen ist. Die Studie zeigt aber auch, dass SV 129-Mäuse die geringsten Varianzen hinsichtlich der Anastomosen zwischen vorderem und hinterem Stromgebiet aufweisen. Entgegen der Auffassung von Yang et al. weisen also nicht C57Bl6 Mäuse die kleinste zerebrale Gefäßvarianz und damit möglichst kleine Varianzen in der Infarktgröße auf, sondern SV 129 Mäuse.¹²⁰ Wir verwendeten trotz dieser Erkenntnisse C57Bl6 Mäuse, da die von uns verwendeten eNOS Knock-out Tiere mit C57Bl6 Mäusen rückgekreuzt wurden und so eine bestmögliche Vergleichbarkeit gewährleistet wurde.

Aus den Studien zur richtigen Auswahl des Filaments sowie zu den Unterschieden zwischen den verschiedenen Mausstämmen wird aber ersichtlich, dass in der Beachtung dieser Schwierigkeiten ein wesentliches Potential zur Minimierung von Störfaktoren bei *in-vivo* Studien zur zerebralen Ischämie liegt. Es wird daher von vielen Autoren angemahnt, individuelle Unterschiede der Tiere in der Gefäßversorgung mithilfe von LDF-Messungen zu erfassen und diese Technik lückenlos bei jedem Tier einzusetzen.¹¹⁸ Wir überprüften den Erfolg unserer MCAO-Technik in einer Gruppe von C57Bl6-Tieren mithilfe der LDF und fanden in jedem der Tiere eine über 80%ige Reduktion der regionalen relativen Durchblutung nach Verschieben des Filaments vor den Abgang der Arteria cerebri media sowie eine prompte Reperfusion nach Entfernung des Filaments (vergleiche repräsentative Abbildung 13). Auch das Verfahren der BCCAO überwachten wir mit dieser Methode in einer Gruppe von Tieren (siehe Abbildung 12). Aus Gründen einer kürzeren Narkose entschieden wir uns aber gegen ein LDF-Monitoring jeder einzelnen BCCAO und MCAO, um Störfaktoren durch eine dadurch zwangsläufig verlängerte Narkosezeit zu minimieren. Unsere repräsentativen LDF-Messungen in den Gruppen zeigen darüberhinaus keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen, sodass von einer guten Reproduzierbarkeit der charakteristischen Durchblutungsreduktion durch BCCAO bzw. MCAO ausgegangen werden kann.

4.5.3 Hypothermie und Isoflurannarkose als potentielle Störfaktoren

Eine weitere zu beachtende Störgröße bei der Untersuchung von Ischämie und neuroprotektiven Effekten ist der Einfluss der Hypothermie während und nach Durchführung der Versuche. Schon 1990 konnten Pulsinelli et al. nachweisen, dass die neuroprotektive Wirkung des NMDA-Antagonisten MK801 nicht auf dessen Antagonismus an sich beruht, sondern auf der Tatsache, dass die Applikation von MK801 zu transienten komatösen Zuständen der Wüstenrennmäuse führte, die durch die mangelnde Bewegung hypotherm wurden und deshalb geringere neurologische Schäden aufwiesen als mit MK801 behandelte Tiere, die während des komatösen Zustandes auf normothermischem Niveau gehalten wurden.¹²¹ Studien von Nishio et al. und Yunoki et al. beweisen, dass kurze hypotherme Phasen von ca. 20-30 Minuten in der Lage sind, Ratten zu präkonditionieren und zu früher wie auch später ischämischer Toleranz führen.^{38,98} Auch Untersuchungen von Barber et al. an C57Bl6 Mäusen nach 45 Minuten bzw. 30 Minuten MCAO zeigen, dass der zerebrale ischämische Schaden kleiner ist, wenn die Mäuse nach der MCAO aufgrund ihrer temporären Bewegungseinschränkungen für eine gewisse Zeit hypotherm werden.¹²² Besondere Beachtung verdient dieses Erkenntnis vor dem Hintergrund, dass die Körpertemperatur der Maus in hohem Maße von ihrer körperlichen Aktivität abhängig ist und ihre Durchschnittstemperatur bis zu 4°C schwanken kann.

Zur Vermeidung eines verfälschenden neuroprotektiven Effekts durch Hypothermie induzierte ischämische Präkonditionierung während BCCAO und MCAO benutzten wir daher eine Wärmematte gekoppelt mit einer rektalen Temperatursonde und hielten so die Körpertemperatur während der Operationen zwischen 36,5 und 37,5 °C stabil, was der durchschnittlichen Körpertemperatur der Maus entspricht (siehe Abschnitt 2.1.1). Auch während der ersten Stunden nach MCAO und BCCAO wurden die Tiere während des Narkoseüberhangs bis zum Erlangen einer ausreichend guten Mobilität in einer auf 30°C vorgewärmten Aufwachbox überwacht. Obwohl wir postoperativ nicht die Körpertemperatur maßen und mit letzter Sicherheit eine kurzzeitige Hypothermie dadurch nicht ausschließen können, so zeigen doch Studien von Hoffmann-Goetz et al., dass die Körperkerntemperatur von sich frei bewegenden C57Bl6 Mäusen bei solchen Bedingungen bei 36°C liegt.¹²³ Trotz der Tatsache, dass unsere Tiere durch die Operation in ihrer Bewegung eingeschränkt waren, erscheint es deshalb unwahrscheinlich, dass

Hypothermie während der postoperativen Phase entstehen konnte, da die Tiere nie so stark eingeschränkt waren, dass sie bewegungslos in ihren Käfigen verharrten. Des Weiteren gilt es zu beachten, dass Hypothermieeffekte erst ab einer Körpertemperatur von 31-32°C wirksam werden und dann meist nur, wenn dieses Niveau über mehrere Stunden gehalten wird.³⁸ Da unsere Versuchstiere nach Umsetzen von der Aufwachbox in den Tierstallkäfig körperlich aktiv waren, treffen solche Annahmen auf unsere Versuchstiere höchstwahrscheinlich nicht zu.³⁸ Durch die Durchführung von Kontrollexperimenten innerhalb jeder Fragestellung können wir davon ausgehen, dass protektive Effekte durch Hypothermie daher keine Rolle bei den von uns durchgeführten Experimenten gespielt haben.

Weitere physiologische Parameter (pH, Pco₂, Po₂, mittlerer arterieller Blutdruck) aus Blutgasanalysen wurden in unseren Experimenten nicht gemessen und auf Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen evaluiert. Daten aus anderen MCAO-Studien machen es aber sehr wahrscheinlich, dass diese sich auch durch unsere Methode der Präkonditionierung und MCAO nicht verändert haben und deshalb nicht für Unterschiede zwischen Sham und präkonditionierten Tieren herangezogen werden können.^{65,124} Die Atemfrequenz der Versuchstiere wurde während der Operationen eng überwacht und als Monitoring zur Feststellung der Narkosetiefe herangezogen. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde bei Spontanatmung mit Atemfrequenzen von ca. 100/min erreicht.

Ein weiterer beachtenswerter Punkt ist die Verwendung des Inhalationsnarkotikums, Isofluran. Mehrere Studien zeigen, dass Isofluran neuroprotektive Wirkung besitzt.¹²⁵⁻¹²⁷ Xiong et al. konnten an Ratten zeigen, dass eine dosisabhängige Fähigkeit von Isofluran zur Präkonditionierung besteht, wenn es in Konzentrationen von 1,5-2,25% über fünf Tage jeweils eine Stunde täglich appliziert wird.¹²⁸ Auch in Mäusen, die drei Stunden mit 1%-Isofluran präkonditioniert wurden, konnten Kapinya et al.⁷¹ zeigen, dass dies zu schneller wie auch länger anhaltender ischämischer Toleranz führte und folglich zu kleineren Infarkten nach MCAO. Aufgrund der Vasoaktivität von Isofluran, welche in hohen Dosen zur Hypotonie führen kann, besteht die Möglichkeit, dass die Verwendung von Isofluran in Kombination mit einer respiratorischen Insuffizienz durch zu starke Sedierung zu einer globalen Hypoxie und damit zu einer relevanten Störgröße führt.¹²⁹ Es ist deshalb zu diskutieren, in wie weit Isofluran als Narkosegas eine relevan-

te Störgröße bei Untersuchungen zu präkonditionierenden Methoden wie z.B. BCCAO darstellt.

Die von uns verwendeten Methoden der BCCAO und MCAO machen eine kumulative Narkosegesamtzeit von max. 40 Minuten mit 1,5% Isofluran nötig, die in den meisten Versuchen an nur einem Tag verabreicht wurde. Bei den Versuchen der späten IT verteilte sich die Narkosegesamtzeit auf zwei Tage, mit dann jeweils ca. 20 Minuten Narkosezeit. Aufgrund dieser kurzen Narkosezeiten und der Tatsache, dass Kontrolltiere der gleichen Narkosezeiten ausgesetzt waren und keine Anzeichen der Neuroprotektion zeigten, halten wir es für weitestgehend ausgeschlossen, dass verfälschende Effekte durch Isoflurannarkose in Betracht gezogen werden können. Desweiteren vermieden wir eine respiratorische Insuffizienz und zu starke Sedierung durch Überdosierung von Isofluran durch enges Monitoring der Atemfrequenz (siehe oben).

Es ist aber festzuhalten, dass auch sehr kurze Phasen der Isofluranapplikation prinzipiell schon zerebrale ischämische Toleranz hervorrufen können. So konnten Blanck et al. an Hunden zeigen, dass schon 30 Minuten Isofluranverabreichung in einer Dosis von 1,5% zu signifikant weniger neurologischen Schäden führte, wenn die Hunde im Anschluss an diese Präkonditionierung einem achtminütigen Herzstillstand zugeführt wurden.¹³⁰ Es ist aufgrund der Unterschiede zwischen den Spezies und aufgrund des anderen Schadensmodells aber fraglich, ob diese Erkenntnisse auf unser experimentelles Setting übertragen werden können. Nach Vergleich verschiedener Narkoseprotokolle entschieden wir uns für die Verwendung eines Isofluran-Stickstoff-Sauerstoff-Narkosegasgemischs, da diese Art der Narkose nachweislich die geringste kardiodepressive Wirkung verursacht und auch alle anderen Körperfunktionen wie z.B. Temperaturhomöostase und Kortisolausschüttung, den physiologischen Parametern unter Bewusstsein am ehesten entsprechen und daher nur eine geringe Wahrscheinlichkeit für verfälschende Störfaktoren durch die Narkose besteht.¹³¹

4.5.4 Ausblick

Kritisch müssen unsere Ergebnisse allerdings auch vor dem Hintergrund einer mangelnden Verblindung betrachtet werden. Alle Maßnahmen der Präkonditionierung, Applikation von Medikamenten, Durchführung der MCAO, die Pflege der Tiere, sowie das Schneiden und Auswerten der entnommenen Gehirne erfolgten durch einen Untersucher und könnte daher potentiell zu einer Untersucher bedingten Verzerrung der Er-

gebnisse führen. Durch die durchgehende Nummerierung der Versuchstiere wurde versucht, innerhalb der einzelnen Fragestellungen eine bestmögliche Verblindung des eigentlichen Versuchsprotokolls zu erwirken, es handelte sich dabei aber sicher nicht um eine ausreichende Maßnahme, da teilweise allein durch die Beobachtung der Tiere zwischen präkonditionierten und nicht präkonditionierten unterschieden werden konnte. Die Zuordnung einer Infarktgröße zu einer Gruppe erfolgte erst am Ende der Auswertung, um eine möglichst große Objektivität zu gewährleisten.

Wir sind der Meinung, objektive, belastbare Ergebnisse erzielt zu haben, die schon vorhandene Studien komplementieren und bestätigen. Wir konnten erstmals zeigen, dass BCCAO ein adäquater Stimulus zur Etablierung früher IT durch eNOS und nNOS ist. Aus den in der Diskussion genannten Gründen können unsere Ergebnisse nicht auf Zufällen beruhen. Die Arbeit trägt dazu bei, wichtige Erkenntnisse zur frühen ischämischen Toleranz zu festigen, wirft aber auch Fragen auf, die in weiteren Studien untersucht werden sollten. So bedarf es weiterer Arbeiten, um die exakten, komplexen Mechanismen der frühen ischämischen Präkonditionierung zu entschlüsseln und eventuell für klinische Anwendungen nutzbar zu machen.

Dabei wollen wir in weiteren Versuchen zeigen, dass die Gabe von NO-Donatoren wie z.B. Spermin-NONOate den präkonditionierenden Effekt der BCCAO in eNOS und nNOS Knock-out Mäusen wiederherstellen kann und so einen weiteren Beweis dafür liefern, dass NO ein wichtiger Bestandteil der frühen IT ist. Außerdem ist die Verwendung von iNOS Knock-out Mäusen und die Verwendung des iNOS-Inhibitors Aminoguanidin geplant, um zu untersuchen, ob die iNOS eine Rolle in der frühen IT spielt.

Außerdem sollte in zukünftigen Studien untersucht werden, über welchen Zeitraum sich die Effekte der frühen IT nachweisen lassen, oder, wie von Kritikern oft angeführt, die Ausreifung des Infarkts nur verzögert wird. Auch die Auswirkungen der frühen IT auf ein potentiell geringeres funktionelles Defizit sollte dabei beleuchtet und über einen längeren Zeitraum untersucht werden.

Insgesamt wollen wir durch die bisherigen Ergebnisse und die Bearbeitung der zukünftigen Fragestellungen eine systematische Untersuchung der NO-Synthasen an einem einheitlichen Präkonditionierungs- und Schadensmodell liefern, um die Mechanismen der Wirkungsweise von NO im Rahmen der Neuroprotektion in Zukunft aufklären und potentielle neue Therapieansätze bei der Behandlung des Schlaganfalls liefern zu können.

5 Literaturverzeichnis

1. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, Carnethon MR, Dai S, de Simone G, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Greenlund KJ, Hailpern SM, Heit JA, Ho PM, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McDermott MM, Meigs JB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Rosamond WD, Sorlie PD, Stafford RS, Turan TN, Turner MB, Wong ND, Wylie-Rosett J. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123(4):e18–e209.
2. Di Carlo A. Human and economic burden of stroke. *Age Ageing*. 2009;38(1):4–5.
3. Grau AJ, Weimar C, Buggle F, Heinrich A, Goertler M, Neumaier S, Glahn J, Brandt T, Hacke W, Diener HC. Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke*. 2001;32(11):2559–2566.
4. Diener HC, Weimar C. *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Stuttgart: Thieme; 2012.
5. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 1999;22(9):391–397.
6. Broderick JP, Palesch YY, Demchuk AM, Yeatts SD, Khatri P, Hill MD, Jauch EC, Jovin TG, Yan B, Silver FL, von Kummer R, Molina CA, Demaerschalk BM, Budzik R, Clark WM, Zaidat OO, Malisch TW, Goyal M, Schonewille WJ, Mazighi M, Engelter ST, Anderson C, Spilker J, Carrozzella J, Ryckborst KJ, Janis LS, Martin RH, Foster LD, Tomsick TA, Interventional Management of Stroke (IMS) III Investigators. Endovascular therapy after intravenous t-PA versus t-PA alone for stroke. *N Engl J Med*. 2013;368(10):893–903.

7. Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, Brott TG, Toni D, Grotta JC, Albers GW, Kaste M, Marler JR, Hamilton SA, Tilley BC, Davis SM, Donnan GA, Hacke W, ECASS, ATLANTIS, NINDS and EPITHET rt-PA Study Group, Allen K, Mau J, Meier D, del Zoppo G, De Silva DA, Butcher KS, Parsons MW, Barber PA, Levi C, Bladin C, Byrnes G. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet*. 2010;375(9727):1695–1703.
8. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1317–1329.
9. Ringelstein EB, Nabavi DG. *Der ischämische Schlaganfall: eine praxisorientierte Darstellung von Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie*. W. Kohlhammer Verlag; 2007.
10. Boehringer Ingelheim. Fachinformationen zu Actilyse. 2011. Available at:
<http://www.fachinfo.de/viewFI?FINR=000011&RL=Actilyse%26reg%3B%2010%26nbsp%3Bmg/-20%26nbsp%3Bmg/-50%26nbsp%3Bmg%20Pulver%20und%20L%26ouml%3Bsungsmittel%20zur%20Herstellung%20einer%20Injektions-/Infusionsl%26ouml%3Bsung>.
11. European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee, ESO Writing Committee. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc Dis*. 2008;25(5):457–507.
12. Mishra NK, Lyden P, Grotta JC, Lees KR, VISTA Collaborators. Thrombolysis is associated with consistent functional improvement across baseline stroke severity: a comparison of outcomes in patients from the Virtual International Stroke Trials Archive (VISTA). *Stroke*. 2010;41(11):2612–2617.
13. García-Moncó JC, Pinedo A, Escalza I, Ferreira E, Foncea N, Gómez-Beldarrain M, Ruiz-Ojeda J, Mateo I, Mediavilla J, Basterretxea JM. Analysis of the reasons for exclusion from tPA therapy after early arrival in acute stroke patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2007;109(1):50–53.

14. Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the Enlimomab Acute Stroke Trial. *Neurology*. 2001;57(8):1428–1434.
15. Emsley HCA, Smith CJ, Georgiou RF, Vail A, Hopkins SJ, Rothwell NJ, Tyrrell PJ, Acute Stroke Investigators. A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2005;76(10):1366–1372.
16. Diener H-C, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Shuaib A, Ashwood T, Wasiewski W, Alderfer V, Hårdemark H-G, Rodichok L. NXY-059 for the treatment of acute stroke: pooled analysis of the SAINT I and II Trials. *Stroke*. 2008;39(6):1751–1758.
17. Kikuchi K, Tanchaen S, Takeshige N, Yoshitomi M, Morioka M, Murai Y, Tanaka E. The Efficacy of Edaravone (Radicut), a Free Radical Scavenger, for Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2013;14(7):13909–13930.
18. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci*. 2003;26(5):248–254.
19. Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:243–282.
doi:10.1146/annurev.physiol.61.1.243.
20. Gidday JM. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006;7(6):437–448.
21. Janoff A. Alterations In Lysosomes (Intracellular Enzymes) During Shock; Effects Of Preconditioning (Tolerance) And Protective Drugs. *Int Anesthesiol Clin*. 1964;2:251–269.
22. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124–1136.
23. Dahl Na, Balfour Wm. Prolonged Anoxic Survival Due To Anoxia Pre-Exposure: Brain Atp, Lactate, And Pyruvate. *Am J Physiol*. 1964;207:452–456.
24. Schurr A, Reid KH, Tseng MT, West C, Rigor BM. Adaptation of adult brain tissue to anoxia and hypoxia in vitro. *Brain Res*. 1986;374(2):244–248.

25. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K. "Ischemic tolerance" phenomenon found in the brain. *Brain Res.* 1990;528(1):21–24.
26. Kirino T, Tsujita Y, Tamura A. Induced Tolerance to Ischemia in Gerbil Hippocampal Neurons. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991;11(2):299–307.
27. Xu G-P, Dave KR, Vivero R, Schmidt-Kastner R, Sick TJ, Pérez-Pinzón MA. Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. *Brain Res.* 2002;952(2):153–158.
28. Bruer U, Weih MK, Isaev NK, Meisel A, Ruscher K, Bergk A, Trendelenburg G, Wiegand F, Victorov IV, Dirnagl U. Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. *FEBS Lett.* 1997;414(1):117–121.
29. Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V, Knab R, Fiebach JB, Schellinger PD, Kucinski T, Jungehülsing GJ, Brunecker P, Müller B, Banasik A, Amberger N, Wernecke KD, Siebler M, Röther J, Villringer A, Weih M. Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter magnetic resonance imaging study. *Stroke.* 2004;35(3):616–621.
30. Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J, Altieri M, van Melle G. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology.* 2000;54(11):2089–2094.
31. Zhao H, Ren C, Chen X, Shen J. From rapid to delayed and remote postconditioning: the evolving concept of ischemic postconditioning in brain ischemia. *Curr Drug Targets.* 2012;13(2):173–187.
32. Zhu Y, Zhang Y, Ojwang BA, Brantley MA Jr, Gidday JM. Long-term tolerance to retinal ischemia by repetitive hypoxic preconditioning: role of HIF-1 α and heme oxygenase-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(4):1735–1743. doi:10.1167/iovs.06-1037.
33. Pérez-Pinzón MA. Neuroprotective effects of ischemic preconditioning in brain mitochondria following cerebral ischemia. *J Bioenerg Biomembr.* 2004;36(4):323–327. doi:10.1023/B:JOB.0000041762.47544.ff.
34. Kirino T. Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22(11):1283–1296.

35. Narayanan SV, Dave KR, Perez-Pinzon MA. Ischemic preconditioning and clinical scenarios. *Curr Opin Neurol*. 2013;26(1):1–7.
36. Bhuiyan MIH, Kim YJ. Mechanisms and prospects of ischemic tolerance induced by cerebral preconditioning. *Int Neurorol J*. 2010;14(4):203–212.
37. Gidday JM, Fitzgibbons JC, Shah AR, Park TS. Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat. *Neurosci Lett*. 1994;168(1-2):221–224.
38. Nishio S, Chen ZF, Yunoki M, Toyoda T, Anzivino M, Lee KS. Hypothermia-induced ischemic tolerance. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;890:26–41.
39. Chopp M, Chen H, Ho KL, Dereski MO, Brown E, Hetzel FW, Welch KM. Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat. *Neurology*. 1989;39(10):1396–1398.
40. Lowenstein DH, Simon RP, Sharp FR. The pattern of 72-kDa heat shock protein-like immunoreactivity in the rat brain following flurothyl-induced status epilepticus. *Brain Res*. 1990;531(1-2):173–182.
41. Kawahara N, Ruetzler CA, Klatzo I. Protective effect of spreading depression against neuronal damage following cardiac arrest cerebral ischaemia. *Neurol Res*. 1995;17(1):9–16.
42. Takahata Y, Shimoji K. Brain injury improves survival of mice following brain ischemia. *Brain Res*. 1986;381(2):368–371.
43. Wiegand F, Liao W, Busch C, Castell S, Knapp F, Lindauer U, Megow D, Meisel A, Redetzky A, Ruscher K, Trendelenburg G, Victorov I, Riepe M, Diener HC, Dirnagl U. Respiratory chain inhibition induces tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19(11):1229–1237.
44. Ohtsuki T, Matsumoto M, Kuwabara K, Kitagawa K, Suzuki K, Taniguchi N, Kamada T. Influence of oxidative stress on induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *Brain Res*. 1992;599(2):246–252.

45. Tasaki K, Ruetzler CA, Ohtsuki T, Martin D, Nawashiro H, Hallenbeck JM. Lipopolysaccharide pre-treatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. *Brain Research*. 1997;748(1–2):267–270.
46. Koch S, Katsnelson M, Dong C, Perez-Pinzon M. Remote ischemic limb preconditioning after subarachnoid hemorrhage: a phase Ib study of safety and feasibility. *Stroke*. 2011;42(5):1387–1391.
47. Connolly M, Bilgin-Freiert A, Ellingson B, Dusick JR, Liebeskind D, Saver J, Gonzalez NR. Peripheral vascular disease as remote ischemic preconditioning, for acute stroke. *Clin Neurol Neurosurg*. 2013.
48. Dirnagl U, Becker K, Meisel A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol*. 2009;8(4):398–412.
49. Stenzel-Poore MP, Stevens SL, Xiong Z, Lessov NS, Harrington CA, Mori M, Meller R, Rosenzweig HL, Tobar E, Shaw TE, Chu X, Simon RP. Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states. *Lancet*. 2003;362(9389):1028–1037.
50. Marti HJH, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, Risau W. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *American Journal of Pathology*. 2000;156(3):965–976.
51. Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, Priller J, Dirnagl U, Meisel A. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: Evidence from an in vitro model. *Journal of Neuroscience*. 2002;22(23):10291–10301.
52. Grabb MC, Choi DW. Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: critical role for NMDA receptors. *J Neurosci*. 1999;19(5):1657–1662.
53. Gidday JM, Shah AR, Maceren RG, Wang Q, Pelligrino DA, Holtzman DM, Park TS. Nitric oxide mediates cerebral ischemic tolerance in a neonatal rat model of hypoxic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19(3):331–340.
54. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011;17(11):1391–1401.

55. Terpolilli NA, Moskowitz MA, Plesnila N. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(7):1332–1346.
56. Loscalzo J. The Identification of Nitric Oxide as Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Circulation Research.* 2013;113(2):100–103.
57. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(2):156–167.
58. Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(13):5159–5162.
59. Fleming I, Gray GA, Schott C, Stoclet J-C. Inducible but not constitutive production of nitric oxide by vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology.* 1991;200(2–3):375–376.
60. Huang PL. Nitric oxide and cerebral ischemic preconditioning. *Cell Calcium.* 2004;36(3-4):323–329.
61. Tanaka M, Yoshida S, Yano M, Hanaoka F. Roles of endogenous nitric oxide in cerebellar cortical development in slice cultures. *Neuroreport.* 1994;5(16):2049–2052.
62. Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, Chopp M. Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 1993;13(3):355–358.
63. Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science.* 1994;265(5180):1883–1885.
64. Iadecola C, Zhang F, Xu X. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol.* 1995;268(1 Pt 2):R286–292.
65. Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16(5):981–987.

66. Lin H-Y, Wu C-L, Huang C-C. The Akt-endothelial nitric oxide synthase pathway in lipopolysaccharide preconditioning-induced hypoxic-ischemic tolerance in the neonatal rat brain. *Stroke*. 2010;41(7):1543–1551.
67. Vellimana AK, Milner E, Azad TD, Harries MD, Zhou M-L, Gidday JM, Han BH, Zipfel GJ. Endothelial nitric oxide synthase mediates endogenous protection against subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. *Stroke*. 2011;42(3):776–782.
68. Hashiguchi A, Yano S, Morioka M, Hamada J, Ushio Y, Takeuchi Y, Fukunaga K. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase via phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004;24(3):271–279.
69. Puisieux F, Deplanque D, Pu Q, Souil E, Bastide M, Bordet R. Differential role of nitric oxide pathway and heat shock protein in preconditioning and lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *Eur J Pharmacol*. 2000;389(1):71–78.
70. Zhao P, Peng L, Li L, Xu X, Zuo Z. Isoflurane preconditioning improves long-term neurologic outcome after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Anesthesiology*. 2007;107(6):963–970.
71. Kapinya KJ, Prass K, Dirnagl U. Isoflurane induced prolonged protection against cerebral ischemia in mice: a redox sensitive mechanism? *Neuroreport*. 2002;13(11):1431–1435.
72. Cho S, Park E-M, Zhou P, Frys K, Ross ME, Iadecola C. Obligatory role of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25(4):493–501.
73. Kunz A, Park L, Abe T, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, Iadecola C. Neurovascular protection by ischemic tolerance: role of nitric oxide and reactive oxygen species. *J Neurosci*. 2007;27(27):7083–7093.
74. Atochin DN, Clark J, Demchenko IT, Moskowitz MA, Huang PL. Rapid cerebral ischemic preconditioning in mice deficient in endothelial and neuronal nitric oxide synthases. *Stroke*. 2003;34(5):1299–1303.
75. Orio M, Kunz A, Kawano T, Anrather J, Zhou P, Iadecola C. Lipopolysaccharide induces early tolerance to excitotoxicity via nitric oxide and cGMP. *Stroke*. 2007;38(10):2812–2817.

76. Iadecola C, Kahles T, Gallo EF, Anrather J. Neurovascular protection by ischaemic tolerance: role of nitric oxide. *J Physiol (Lond)*. 2011;589(Pt 17):4137–4145.
77. Dirnagl U, Group M of the M-S. Standard operating procedures (SOP) in experimental stroke research: SOP for middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Nature Precedings*. 2010.
78. 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.
79. Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V. Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *J Vis Exp*. 2011;(47).
80. Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, Pulsinelli W. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1989;9(5):589–596.
81. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. *Nosotchu*. 1986;8(1):1–8.
82. Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA. Reduced Brain Edema and Infarction Volume in Mice Lacking the Neuronal Isoform of Nitric Oxide Synthase After Transient MCA Occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16(4):605–611.
83. Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Waeber C, Zhang L, Gómez-Isla T, Hyman BT, Moskowitz MA. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998;18(3):238–247.
84. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992;119(3):493–501.
85. 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.
86. Flood JF, Rosenzweig MR, Bennett EL, Orme AE. The influence of duration of protein synthesis inhibition on memory. *Physiol Behav*. 1973;10(3):555–562.

87. Bush MA, Pollack GM. Pharmacokinetics and protein binding of the selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole. *Biopharm Drug Dispos.* 2000;21(6):221–228.
88. Kunz A, Iadecola C. Cerebral vascular dysregulation in the ischemic brain. *Handb Clin Neurol.* 2009;92:283–305.
89. Yoshida T, Limmroth V, Irikura K, Moskowitz MA. The NOS inhibitor, 7-nitroindazole, decreases focal infarct volume but not the response to topical acetylcholine in pial vessels. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;14(6):924–929.
90. Wu C, Zhan RZ, Qi S, Fujihara H, Taga K, Shimoji K. A forebrain ischemic preconditioning model established in C57Black/Crj6 mice. *J Neurosci Methods.* 2001;107(1-2):101–106.
91. Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem.* 1998;46(3):327–334.
92. Md HS. In situ end labeling and its applications to the study of endocrine disease: How can we study programmed cell death in surgical pathology materials? *Endocr Pathol.* 1995;6(2):87–89.
93. Watanabe M, Hitomi M, van der Wee K, Rothenberg F, Fisher SA, Zucker R, Svoboda KKH, Goldsmith EC, Heiskanen KM, Nieminen A-L. The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues, and organs. *Microsc Microanal.* 2002;8(5):375–391.
94. Qi S, Zhan R-Z, Wu C, Fujihara H, Yamakura T, Baba H, Taga K, Shimoji K. Sublethal cerebral ischemia inhibits caspase-3 activation induced by subsequent prolonged ischemia in the C57Black/Crj6 strain mouse. *Neuroscience Letters.* 2001;315(3):133–136.
95. Pérez-Pinzón MA, Xu GP, Dietrich WD, Rosenthal M, Sick TJ. Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17(2):175–182.
96. Stagliano NE, Pérez-Pinzón MA, Moskowitz MA, Huang PL. Focal ischemic preconditioning induces rapid tolerance to middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19(7):757–761.

97. Monopoli MP, Raghnaill MN, Loscher JS, O'Sullivan NC, Pangalos MN, Ring RH, von Schack D, Dunn MJ, Regan CM, Pennington S, Murphy KJ. Temporal proteomic profile of memory consolidation in the rat hippocampal dentate gyrus. *Proteomics*. 2011;11(21):4189–4201.
98. Yunoki M, Nishio S, Ukita N, Anzivino MJ, Lee KS. Hypothermic preconditioning induces rapid tolerance to focal ischemic injury in the rat. *Exp Neurol*. 2003;181(2):291–300.
99. Meller R, Thompson SJ, Lusardi TA, Ordonez AN, Ashley MD, Jessick V, Wang W, Torrey DJ, Henshall DC, Gafken PR, Saugstad JA, Xiong Z-G, Simon RP. Ubiquitin proteasome-mediated synaptic reorganization: a novel mechanism underlying rapid ischemic tolerance. *J Neurosci*. 2008;28(1):50–59.
100. Costa ADT, Garlid KD. Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(2):H874–882.
101. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*. 1999;341 (Pt 2):233–249.
102. Liu D, Lu C, Wan R, Auyeung WW, Mattson MP. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22(4):431–443.
103. Bernaudin M, Tang Y, Reilly M, Petit E, Sharp FR. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance. *J Biol Chem*. 2002;277(42):39728–39738.
104. Barone FC, White RF, Spera PA, Ellison J, Currie RW, Wang X, Feuerstein GZ. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke*. 1998;29(9):1937–1950; discussion 1950–1951.
105. Kato H, Liu Y, Araki T, Kogure K. MK-801, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus. *Neurosci Lett*. 1992;139(1):118–121.
106. Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke*. 1997;28(6):1283–1288.

107. Oliveira BL, Moreira IS, Fernandes PA, Ramos MJ, Santos I, Correia JDG. Insights into the structural determinants for selective inhibition of nitric oxide synthase isoforms. *J Mol Model*. 2013;19(4):1537–1551.
108. Zeno. Volltext Philosophie: Theophrast Paracelsus: Werke. Bd. 2, Darmstadt 1965, S. 508-513.: Die dritte ... Available at: <http://www.zeno.org/Philosophie/M/Paracelsus/Septem+Defensiones/Die+dritte+Defension+wegen+des+Schreibens+der+neuen+Rezepte>. Accessed December 2, 2013.
109. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001;357(Pt 3):593–615.
110. Gonzalez-Zulueta M, Feldman AB, Klesse LJ, Kalb RG, Dillman JF, Parada LF, Dawson TM, Dawson VL. Requirement for nitric oxide activation of p21(ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(1):436–441.
111. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol*. 2001;11(3):297–305.
112. Lander HM, Ogiste JS, Pearce SF, Levi R, Novogrodsky A. Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J Biol Chem*. 1995;270(13):7017–7020.
113. Cho K-O, Kim S-K, Cho Y-J, Sung K-W, Kim SY. Regional differences in the neuroprotective effect of minocycline in a mouse model of global forebrain ischemia. *Life Sciences*. 2007;80(22):2030–2035.
114. Spratt NJ, Fernandez J, Chen M, Rewell S, Cox S, van Raay L, Hoggan L, Howells DW. Modification of the method of thread manufacture improves stroke induction rate and reduces mortality after thread-occlusion of the middle cerebral artery in young or aged rats. *J Neurosci Methods*. 2006;155(2):285–290.
115. Speetzen LJ, Endres M, Kunz A. Bilateral common carotid artery occlusion as an adequate preconditioning stimulus to induce early ischemic tolerance to focal cerebral ischemia. *J Vis Exp*. 2013;(75).
116. Zarow GJ, Karibe H, States BA, Graham SH, Weinstein PR. Endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in rats: effect of suture insertion distance on cerebral blood flow, infarct distribution and infarct volume. *Neurol Res*. 1997;19(4):409–416.

117. Liu S, Zhen G, Meloni BP, Campbell K, Winn Hr. Rodent Stroke Model Guidelines For Preclinical Stroke Trials (1st Edition). *J Exp Stroke Transl Med*. 2009;2(2):2–27.
118. Kitagawa K, Matsumoto M, Yang G, Mabuchi T, Yagita Y, Hori M, Yanagihara T. Cerebral ischemia after bilateral carotid artery occlusion and intraluminal suture occlusion in mice: evaluation of the patency of the posterior communicating artery. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998;18(5):570–579.
119. Beckmann N. High resolution magnetic resonance angiography non-invasively reveals mouse strain differences in the cerebrovascular anatomy in vivo. *Magn Reson Med*. 2000;44(2):252–258.
120. Yang G, Kitagawa K, Matsushita K, Mabuchi T, Yagita Y, Yanagihara T, Matsumoto M. C57BL/6 strain is most susceptible to cerebral ischemia following bilateral common carotid occlusion among seven mouse strains: selective neuronal death in the murine transient fore-brain ischemia. *Brain Res*. 1997;752(1-2):209–218.
121. Buchan A, Pulsinelli WA. Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J Neurosci*. 1990;10(1):311–316.
122. Barber PA, Hoyte L, Colbourne F, Buchan AM. Temperature-regulated model of focal ischemia in the mouse: a study with histopathological and behavioral outcomes. *Stroke*. 2004;35(7):1720–1725.
123. Hoffman-Goetz L, Keir R. Body temperature responses of aged mice to ambient temperature and humidity stress. *J Gerontol*. 1984;39(5):547–551.
124. Belayev L, Busto R, Zhao W, Fernandez G, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation. *Brain Res*. 1999;833(2):181–190.
125. Baughman VL, Hoffman WE, Miletich DJ, Albrecht RF, Thomas C. Neurologic outcome in rats following incomplete cerebral ischemia during halothane, isoflurane, or N2O. *Anesthesiology*. 1988;69(2):192–198.

126. Kawaguchi M, Kimbro JR, Drummond JC, Cole DJ, Kelly PJ, Patel PM. Isoflurane delays but does not prevent cerebral infarction in rats subjected to focal ischemia. *Anesthesiology*. 2000;92(5):1335–1342.
127. Miura Y, Grocott HP, Bart RD, Pearlstein RD, Dexter F, Warner DS. Differential effects of anesthetic agents on outcome from near-complete but not incomplete global ischemia in the rat. *Anesthesiology*. 1998;89(2):391–400.
128. Xiong L, Zheng Y, Wu M, Hou L, Zhu Z, Zhang X, Lu Z. Preconditioning with isoflurane produces dose-dependent neuroprotection via activation of adenosine triphosphate-regulated potassium channels after focal cerebral ischemia in rats. *Anesth Analg*. 2003;96(1):233–237, table of contents.
129. Zuurbier CJ, Emons VM, Ince C. Hemodynamics of anesthetized ventilated mouse models: aspects of anesthetics, fluid support, and strain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282(6):H2099–2105.
130. Blanck TJ, Haile M, Xu F, Zhang J, Heerdt P, Veselis RA, Beckman J, Kang R, Adamo A, Hemmings H. Isoflurane pretreatment ameliorates postischemic neurologic dysfunction and preserves hippocampal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in a canine cardiac arrest model. *Anesthesiology*. 2000;93(5):1285–1293.
131. Constantinides C, Mean R, Janssen BJ. Effects of isoflurane anesthesia on the cardiovascular function of the C57BL/6 mouse. *ILAR J*. 2011;52:e21–31.

6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1 Einfluss der Pathomechanismen nach einem ischämischen Schlaganfall in Abhängigkeit von der Zeit, nach Verschluss des versorgenden Gefäßes
- Abb. 2 Trigger, Sensoren, Transducer und Effektoren von schneller und verzögerter ischämischer Toleranz
- Abb. 3 Tierexperimenteller Arbeitsplatz
- Abb. 4 Narkoseeinleitung der Versuchstiere
- Abb. 5 Fiberoptische Sonde und Adapter
- Abb. 6 Position der fiberoptischen Sonde in Bezug zum Bregma
- Abb. 7 Dreidimensionale Darstellung der BCCAO
- Abb. 8 Dreidimensionale Darstellung der MCAO
- Abb. 9 Nach Hämatoxylin-Protokoll gefärbter Gehirnschnitt
- Abb. 10 Berechnung der ödemkorrigierten Infarktareale
- Abb. 11 Zeitliche Abfolge der experimentellen Teilschritte als Paradigma der durchgeführten Versuche
- Abb. 12 Verlauf des CBF während des BCCAO-Protokolls
- Abb. 13 Beispielhafter Verlauf des CBF während einer MCAO
- Abb. 14 Zerebrale TUNEL-Färbungen 20-fach vergrößert
- Abb. 15 Zeitprofil mit unterschiedlichen Abständen zwischen BCCAO und MCAO
- Abb. 16 Hemmung der *de-novo* Proteinsynthese bei früher & später IT durch Anisomycin
- Abb. 17 Untersuchungen zu eNOS Knock-out Tieren bei früher IT
- Abb. 18 Applikation des nNOS-Inhibitors 7-Nitroindazol im Zeitfenster der frühen IT
- Tab. 1 Auflistung wichtiger *in-vivo* Studien zur Beteiligung der verschiedenen NO-Synthasen bei früher und später ischämischer Toleranz
- Tab. 2 Auflistung der verwendeten chirurgischen Instrumente

7 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
Akt/AKT 1	V-akt Maus Thymoma virales Onkogen homolog 1
ANOVA	analysis of variance
Aqua dest.	Aqua destillata
BCCAO	bilateral common carotid artery occlusion
CBF	cerebral blood flow
CREB	cAMP response element binding protein
DAPI	Diamidinphenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
engl.	englisch
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
EPO	Erythropoetin
et al.	et alii
FEM	Forschungseinrichtung Experimentelle Medizin
HIF	hypoxia inducible factor
i.v.	intravenös
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IT	ischämische Toleranz/ischemic tolerance
JOVE	Journal for visualized experiments
LDF	laser doppler flowmetry
LPS	lipopolysaccharid
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCAO	middle cerebral artery occlusion
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NFKB	nuclear factor kappa of activated B-cells
NHSS	National Institute of Health Stroke Scales
NMDA	N-methyl-D-aspartat
nNOS	neuronal nitric oxide synthase

NO	Stickstoffmonoxid
PARP	poly ADP ribose Polymerase
pAVK	periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphate bufferd saline
PC	preconditioning
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Protein Kinase C
rCBF	regional cerebral blood flow
rhIL-1ra	recombinant human interleukin receptor antagonist
RIPC	remote ischemic preconditioning
ROS	reactive oxygen species
rtPA	reactive tissue plasminogen activator
SD	standard deviation
SOP	standard operating procedures
TdT	terminal desoxynucleotidyl transferase
TIA	transient ischemic attack
TUNEL	TdT mediated dUTP nick end labeling
VEGF	vascular endothelial growth factor

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lukas Julius Speetzen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: “Die Rolle von Stickstoffmonoxid in der frühen Phase der zerebralen ischämischen Toleranz“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Herr Lukas Julius Speetzen hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Speetzen, L. J., Endres, M., Kunz, A. Bilateral Common Carotid Artery Occlusion as an Adequate Preconditioning Stimulus to Induce Early Ischemic Tolerance to Focal Cerebral Ischemia. J. Vis. Exp. (75), e4387, doi:10.3791/4387 (2013).

Herr Speetzen hat als Erstautor maßgeblich die Arbeiten zum publizierten Thema vorangetrieben sowie die Publikationsschrift erstellt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

1. Speetzen, L. J., Endres, M., Kunz, A. Bilateral Common Carotid Artery Occlusion as an Adequate Preconditioning Stimulus to Induce Early Ischemic Tolerance to Focal Cerebral Ischemia. J. Vis. Exp. (75), e4387, doi:10.3791/4387 (2013).

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Matthias Endres für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Promotion in der Experimentellen Neurologie der Charité.

Mein weiterer ausdrücklichen Dank gilt meinem Betreuer Dr. Alexander Kunz, der mich über den gesamten Zeitraum der Arbeit, von den ersten Schritten im Labor bis zur Vollendung dieser Arbeit, stets unterstützt hat und mir bei allen Fragen mit Rat und Tat sowie konstruktiven und bereichernden Gespräche zur Seite stand. Ebenso möchte ich Petra Loge für ihre stets aufmunternde Art und ihre versierte Hilfe bei allen experimentellen Schwierigkeiten danken.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meiner Freundin Veronika Höring, durch deren Unterstützung, Verständnis und Geduld diese Arbeit überhaupt erst entstehen konnte.

Anhang

Anhang 1:

Allgemeine Anleitung für alle am Versuch beteiligten Personen (Mitarbeiter, Pflegepersonal, Tierschutzbeauftragte) zur klinischen Untersuchung im Tierversuch:

<p><u>Überwachungshäufigkeit (klinische Visite):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - in den ersten drei Tagen nach MCAO: 2xtgl. - ab Tag 4 nach MCAO: 1xtgl. <p>Besondere <u>Pflegemaßnahmen</u> im Rahmen der klinischen Visite:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Futter direkt in den Käfig geben - Wasserflasche mit "langem Aufsatz" verwenden - auf Vorhandensein der Käfiganreicherung achten 	
<p><u>Anweisungen:</u></p>	
A	<p>Bei nur einem Symptom der Kategorie A: das Tier täglich (ggf. auch mehrmals tgl.) beobachten. Spätestens bei Kombination von zwei oder mehr Symptomen der Kategorie A muss das Tier dem Tierarzt oder dem Projektleiter vorgestellt werden.</p>
B	<p>Bei einem Symptom der Kategorie B: das Tier muss dem Tierarzt vorgestellt werden. Der Projektleiter muss informiert werden. Bei Kombination eines B mit Torkeln, Schmerz, Blässe oder Blut ist das Tier unverzüglich schmerzlos zu töten! (siehe C)</p>
C	<p>Unverzüglich schmerzlos töten!</p>

Achten Sie auf folgende SYMPTOME und handeln Sie nach den ANWEISUNGEN:	
SYMPTOME	ANWEISUNGEN
1. Beim täglichen Blick in den Käfig	
Tier isoliert sich	A
struppiges Fell, ungepflegtes Fell, Augenränder, Piloerektion	A
aufgetriebener Leib	A
geringfügig verstärkte Atmung	A
Urin u./o. Kot abweichend in Menge, Farbe und Konsistenz (einzeln oder kombiniert)	A
anhaltende Obstipation	A
Schmerz (Gesichtsausdruck, Haltung gekrümmt oder Leib aufgezogen)	B
ingesunkene, trübe Augen	B
Blässe (Augen, Ohren, Haut)	B
Blut an Körperöffnungen, blutiger Kot	B
deutlich verstärkte Atmung / Keuchen	B
Durchfall, wenn schwächend oder andauernd	B
kurzzeitige Krampfanfälle, Torkeln, vorübergehende Apathie	B
dunkle Verfärbung des Unterbauchs bzw. der Hodensäcke	C
Rektumprolaps	C
2. Beim Umsetzen	
Verletzungen, Hautveränderungen	A
Fehlstellung der Zähne	A
Tier vermeidet Bewegungen	A
Teilnahmslosigkeit	A
Ruhelosigkeit	A
Stelzgang	A
Postoperative Wundheilungsstörungen	B

lokale Infektion(en)	B
Abszess(e)	B
Bauch hart oder gespannt	B
Hautfalten bleiben stehen, Dehydratation	B
Odembildung	B
Automutilation (z.B. Annagen von Zehen)	B
Lautäußerungen beim Ergreifen	B
Zähneknirschen	B
ulzerierende Tumore	C
Moribund	C
3. Beim Wiegen	
ungewöhnliche Zunahme	B
10 % Gewichtsdefizit verglichen mit gesunden Tieren des gleichen Stamms und Alters.	B
20 % Gewichtsdefizit verglichen mit gesunden Tieren des gleichen Stamms und Alters.	C