

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

DISSERTATION

**Pharmakologische Präkonditionierung:
Experimentelle Untersuchungen zur endogenen Toleranz gegen
Sauerstoff-Glukose-Entzug in einer neuronalen Zellkultur**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von
Alexandra Bergk
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. U. Dirnagl
2. Prof. Dr. med. U. Heinemann
3. Priv.-Doz. Dr. med. N. Plesnila

Datum der Promotion: 17.03.2006

Widmung

Meinen Eltern Marie-Therese Ursula und Hans-Joachim Bergk.

Abstrakt

Der Schlaganfall ist die dritthäufigste Todesursache und die häufigste Ursache einer dauerhaften Behinderung in der westlichen Welt mit einer daraus folgenden immensen sozioökonomischen Bedeutung. In einem *in vitro* Modell der zerebralen Ischämie, der durch einen kombinierten Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD) an einer neuronengereicherten primären Zellkultur aus Rattenneuronen simuliert wurde, konnte durch hypoxische Präkonditionierung oder Vorbehandlung mit 3-Nitropropionsäure, Eisenascorbat und sperminem NO-Komplex eine endogene Protektion der Neurone gegenüber einer potentiell letalen OGD erzeugt werden. Als Mechanismen dieser Toleranzinduktion konnten freie Radikale sowie mindestens ein weiterer davon unabhängiger Signaltransduktionsweg nachgewiesen werden.

Darüber hinaus konnte durch eine Zugabe von Flupirtin, einem Nichtopioid-Analgetikum für welches antioxidative Eigenschaften beschrieben wurden, während einer OGD deren letaler Effekt signifikant vermindert werden. Wurde Flupirtin zeitgleich mit einer hypoxischen Präkonditionierung appliziert, potenzierte sich deren Toleranzinduktion, ohne dass für Flupirtin allein ein solcher Effekt nachweisbar gewesen wäre.

Damit konnten einerseits die Mechanismen der endogenen Hypoxietoleranzentwicklung an Neuronen weiter analysiert werden und andererseits mit Flupirtin eine Substanz identifiziert werden, deren Potenz in der Behandlung akuter ischämischer Insulte vielversprechend ist und durch *in vivo* Experimente weiter untersucht werden sollte.

Schlagwörter:

Zellkultur, Hypoxietoleranz, Neuronen

Abstract

Ischemic stroke is the third leading cause of death in the western world leading to major postinfarct incapacibilities and cognitive deficits. To investigate the induction of endogenous neuronal tolerance against ischemic injury we used an *in vitro* model of combined oxygen-glucose-deprivation (OGD) in a primary cell culture of rat neurons. Tolerance against potentially lethal OGD could be induced either by short-term hypoxic preconditioning or chemically by 3-nitropropionic acid, ironascorbate and spermine NO complex. Reactive oxygen species and free radicals could be determined as mediator of tolerance induction and evidence of at least one additional signal transmission pathway was found.

Furthermore, addition of flupirtine, a nonopioid analgetic drug, during short-term hypoxic preconditioning lead to an increase in tolerance induction. Administered alone, flupirtine did not show any tolerance-inducing properties.

In this work we were able to prove and further analyze mechanisms of endogenous neuronal tolerance induction. In addition, with flupirtine a substance was identified which has potential impact on the treatment of acute ischemic stroke and is a promising agent for further investigation in *in vivo* experiments.

Keywords:

Cell culture, neurons, hypoxic tolerance

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Schlaganfall	1
1.2	Die Präkonditionierung	2
1.2.1	Entdeckung der Präkonditionierung am Myokard	2
1.2.2	Ischämische Präkonditionierung an neuronalen und nicht neuronalen Geweben	3
1.3	Pharmakologische Präkonditionierung	4
2	Herleitung einer Aufgabenstellung	6
2.1	Präkonditionierungsmodelle	6
2.2	Auswahl eines geeigneten Modells zur Untersuchung der zellulären Komponenten der Präkonditionierung	9
2.3	Kreuztoleranz	11
2.4	Auswahl chemischer Substanzen zur Präkonditionierung	12
2.4.1	Hemmer der Atmungskette	12
2.4.2	Redoxsystem mit Produktion von freien Hydroxylradikalen	12
2.4.3	NO-Donoren	13
2.4.4	Flupirtin	15
2.5	Auswahl der untersuchten Zeitfenster	16
2.6	Fragestellungen	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Materialien	18
3.2	Primäre neuronale Zellkulturen	20
3.3	Färbungen	21
3.4	Modell der Zellschädigung: Kombiniertes Sauerstoff- und Glukose- Entzug	24
3.5	Evaluierung der Zellschädigung	26
3.5.1	Laktatdehydrogenase	26
3.5.2	Evaluierung der mitochondrialen Funktion	27
3.5.3	Phasenkontrastmikroskopie	29
3.6	Applikation von Substanzen	29
3.6.1	Behandlung mit 3-Nitropropionsäure	30
3.6.2	Behandlung mit Eisen-Ascorbat	31
3.6.3	Behandlung mit sperminem NO-Komplex	32
3.6.4	Behandlung mit Flupirtin	33
3.6.5	Behandlung mit Dimethylthiourea	35
3.7	Messung der Lipidperoxidation	38
3.8	Statistische Auswertung	38
4	Ergebnisse	41
4.1	Charakterisierung der neuronal angereicherten Zellkultur	41
4.2	Charakterisierung des Schadens durch kombinierten Sauerstoff-Glukose-Entzug	42
4.3	Präkonditionierung durch 3-Nitropropionsäure	43
4.3.1	Basale Toxizität	43
4.3.2	Dosis- und Zeit- Wirkungs- Beziehung	44
4.3.3	Wirkungsblockierung	46

4.3.4	Lipidperoxidation	48
4.4	Präkonditionierung durch Eisen-Ascorbat	49
4.4.1	Basale Toxizität	49
4.4.2	Dosis- und Zeit- Wirkungs- Beziehung	50
4.4.3	Wirkungsblockierung	53
4.4.4	Lipidperoxidation	53
4.5	Präkonditionierung durch sperminen NO-Komplex	56
4.5.1	Basale Toxizität	56
4.5.2	Dosis- und Zeit- Wirkungs- Beziehung	57
4.5.3	Wirkungsblockierung	60
4.5.4	Lipidperoxidation	61
4.6	Präkonditionierung durch Flupirtin	62
4.6.1	Basale Toxizität	62
4.6.2	Dosis- und Zeit- Wirkungs- Beziehung	63
4.6.3	Wirkungsverstärkung	65
4.6.4	Lipidperoxidation	67
4.7	Additive Wirkung von Eisen-Ascorbat und sperminem NO-Komplex	68
4.7.1	Lipidperoxidation	69
5	Diskussion	70
6	Zusammenfassung	80
7	Literaturverzeichnis	82

Abkürzungsverzeichnis

3-NPA	3-Nitropropionsäure
ATP	Adenosintriphosphat
β -NADH	beta-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
BSL	Physiologische Salzlösung
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DIV	days in vitro, Zellkultivierungszeit
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTU	Dimethylthiourea
DNA	Desribonukleinsäure
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid (oxidierte Form)
GFAP	Glial fibrillary acid protein
HP	Hypoxische Präkonditionierung
IE	Internationale Einheiten
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
LDH	Laktatdehydrogenase
MDA	Malondialdehyd
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduzierte Form)
NBM	Neurobasales Medium
NGF	Nerve growth factor, neuronaler Wachstumsfaktor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NSE	Neuronenspezifische Enolase
OGD	oxygen-glucose-deprivation, Sauerstoff-Glukose-Entzug
PBS	phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPER/NO	spermine NO complex, sperminer NO-Komplex
TNF-alpha	Tumor-Nekrose-Faktor alpha