

1 Einleitung

Diese Arbeit befasst sich mit der Untersuchung endogener Toleranzmechanismen neuronaler Zellen der Ratte gegen einen kombinierten Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD) als Zellkultur-Modell der zerebralen Ischämie. Ziel der hier dargestellten Experimente war es zu zeigen, dass neuronale Zellen *per se* in der Lage sind, eine Toleranz gegen potentiell letale Stimuli zu entwickeln. Darauf aufbauend sollte untersucht werden, inwiefern eine solche Toleranzinduktion auch pharmakologisch durch die Applikation unterschiedlich wirkender Substanzen provoziert werden kann, die somit eventuell eine potentielle Behandlungsmöglichkeit für zerebral ischämie-gefährdete Personen darstellen. Durch die unterschiedlichen Ansatzpunkte der Pharmaka sollen Rückschlüsse auf die der Präkonditionierung zu Grunde liegenden Mechanismen ermöglicht werden.

1.1 Der Schlaganfall

Der Schlaganfall ist eine der häufigsten Erkrankungen der westlichen Welt, der zu starken Behinderungen, kognitiven Funktionseinschränkungen und häufig auch zum Tode führt [1,2]. In der deutschen Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes nimmt er hinter anderen Herz-Kreislaufkrankungen und Krebserkrankungen, zusammen mit anderen akuten zerebrovaskulären Ereignissen, mit 11,4% den dritten Platz ein [3]. Die häufigsten Ursachen eines Schlaganfalls sind fokale zerebrale Ischämien (etwa 80%), gefolgt von intrazerebralen oder subarachnoidalen Blutungen [2].

Als Ursache dauerhafter Behinderungen steht der Schlaganfall aufgrund einer Morbiditätsrate von 80-90% sogar an erster Stelle, wodurch seine hohe sozioökonomische Bedeutung unterstrichen wird. Mit einer Inzidenz von 4/100000 in der jüngsten Altersgruppe (25-34 Jahre) und von 2117/100000 in der Altersgruppe der über 84-Jährigen muss man in Deutschland insgesamt mit etwa 150.000 Neuerkrankungen an Schlaganfällen pro Jahr rechnen [4,5,6]. Dadurch entstehen für die Gesellschaft enorme Kosten, die beispielsweise für Nordamerika auf durchschnittlich \$103576 / Schlaganfall geschätzt wurden [7].

Ein Schlaganfall tritt in der Regel bei Patienten mit einem oder mehreren vaskulären Risikofaktoren auf, von denen die wichtigsten die arterielle Hypertonie,

Herzerkrankungen, Vorhofflimmern, Diabetes mellitus, Karotisstenosen, Nikotinabusus und Hyperlipidämie sind [8]. Durch entsprechende präventive Maßnahmen beobachtete man in den letzten 50 Jahren bereits eine deutliche Abnahme der Inzidenz von Schlaganfällen in den industrialisierten Ländern, wobei in einer Metaanalyse die besondere Bedeutung der Senkung erhöhter Blutdruckwerte herausgestellt werden konnte: schon eine geringe Senkung des arteriellen Druckes um durchschnittlich 5-6 mmHg bewirkte eine deutliche Reduktion der Inzidenz von Schlaganfällen um 35-42% [9].

Neben der Behandlung oder der Vermeidung von vaskulären Risikofaktoren stellt die Idee einer pharmakologischen Vorbehandlung = Präkonditionierung schlaganfallgefährdeter Patienten zur Erzielung einer gesteigerten neuroneneigenen Toleranz gegen eine eventuell auftretende zerebrale Ischämie einen vielversprechenden Forschungsansatz dar.

1.2 Die Präkonditionierung

1.2.1 Entdeckung der Präkonditionierung am Myokard

Der erste systematische Nachweis einer erfolgreichen ischämischen Präkonditionierung stammt aus der experimentellen Kardiologie und erfolgte 1986 durch Reimer und Murry. Zunächst wurde an Hundeherzen gezeigt, dass vier jeweils 10 Minuten dauernde ischämische Episoden, entgegen den Erwartungen, zu keinem Myokardschaden führten, da sie keinen kumulativen ATP-Abfall verursachten, wohingegen 40 Minuten ununterbrochener Ischämie eine massive Myokardnekrose auslösten [10]. Dieselbe Arbeitsgruppe führte daraufhin die erste kontrollierte Präkonditionierung *in vivo* durch: vor einer 40-minütigen Myokardischämie wurden vier 5-minütige ischämische Intervalle durch Verschluss der Koronararterien erzeugt. Die resultierende Myokardnekrose war dabei um 75% gegenüber der unvorbehandelten Kontrollgruppe reduziert [11]. Dies wird seither als „ischämische Präkonditionierung“ oder „Hypoxietoleranz“ bezeichnet [10, 11, 12].

Am *menschlichen* Herzen wurde dieses Phänomen erstmals 1993 beobachtet [13] und 1996 in einer klinischen Studie bestätigt: bei Patienten, die vor einer aortokoronaren Bypass-Operation ischämisch präkonditioniert wurden, zeigte sich ein geringerer Troponinanstieg als ohne vorangehende Ischämie [14]. Im gleichen Patientengut konnte ebenso eine Verbesserung funktioneller Parameter (EKG-

Veränderungen, Ventrikel-Motilität und Laktat-Produktion) nachgewiesen werden, was als Hinweis auf einen verringerten myokardialen Zellschaden nach Präkonditionierung gewertet wird [15, 16]. In diesen klinisch-interventionellen Untersuchungen konzentrierte man sich naturgemäß auf ein kurzes Intervall zwischen Präkonditionierung und Intervention. Retrospektive Studien wiesen nach, dass auch Patienten, die bereits längere Zeit vor einem Myokardinfarkt eine Angina pectoris-Symptomatik als Zeichen einer rezidivierenden mildereren Myokardischämie erfuhren, eine günstige klinische Prognose bezüglich Mortalität und Herzinsuffizienz haben [17, 18, 19].

1.2.2 Ischämische Präkonditionierung an neuronalen und anderen nicht-neuronalen Geweben

Bereits 1964 wurden erste Hinweise darauf veröffentlicht, dass als mögliche Folge von Anpassungsvorgängen eine biologisch relevante Anoxie-Toleranz am Hirn existiert, die zunächst jedoch nur wenig Beachtung fanden [23].

Seit der vielbeachteten Untersuchungen am Myokard wurde eine solche Präkonditionierung an unterschiedlichsten Geweben, wie Lunge [21], Leber [22, 23], Darm [24], Niere [25] und Skelettmuskel [26] und an unterschiedlichen Spezies, wie Ratten [27], mongolischen Wüstenspringmäusen (Gerbils) [28], Mäusen [29], Kaninchen [30], Schweinen [31] und auch an humanen Herzmuskelzellen [13] nachgewiesen. 1990, vier Jahre nach den Experimenten am Myokard, gelang in einem Tiermodell erstmals der Nachweis einer Präkonditionierung an neuronalen Geweben: Kitagawa et al. zeigten in einem *in vivo* Modell der globalen Ischämie an Wüstenspringmäusen, dass der neuronale Schaden in der hippocampalen CA1-Region bei einem schweren ischämischen Insult durch eine vorausgehende subletale transiente globale Ischämie um bis zu 90% reduziert werden konnte [28]. Dazu wurden ein bzw. zwei Tage vor der „letalen“ fünfminütigen Ischämie beide Karotiden ein- oder mehrmals für 2 Minuten durch Aneurysma-Clips okkludiert. Die größte Protektion wurde durch eine Präkonditionierung mit zweimaligem Karotidenverschluss zwei *und* einen Tag vor der fünfminütigen Ischämie erreicht, wobei ein fast kompletter Schutz (90%) der CA1-Neuronen gelang.

Nachfolgend gelang in verschiedenen Tiermodellen *in vivo* sowohl bei fokalen als auch globalen Ischämien und Hypoxien der Nachweis einer ischämischen

Präkonditionierung [28, 32, 33, 34, 35]. Der protektive Effekt beschränkte sich dabei nicht nur auf eine verbesserte quantitative Überlebensrate von Hirnzellen, sondern zeigte sich auch funktionell an elektrophysiologischen Parametern [36] oder an funktionellen Paresegraden [37].

Messungen des zerebralen Blutflusses zeigten, dass eine solche Toleranzentwicklung nicht durch eine Verbesserung der regionalen Gewebedurchblutung während oder nach der präkonditionierenden Ischämie erklärt werden kann [12, 37, 38]. Folglich ist die durch Präkonditionierung erzielte Toleranz ein Schutzmechanismus der Neuronen auf zellulärer Ebene. So konnte nachfolgend auch *ex vivo* an akuten Hirn-Schnitten [39] gezeigt werden, dass die evozierte elektrische Aktivität von hippokampalen Hirn-Schnitten während einer Anoxie durch eine vorangehende kurze fünfminütige anoxische Periode erhalten werden kann, wohingegen an unvorbehandelten Hirn-Schnitten während einer Anoxie keine Aktivitätsspiques abgeleitet werden können.

Entscheidende Hinweise zur klinischen Bedeutung der Präkonditionierung am menschlichen Gehirn fanden sich erstmals in retrospektiven Fall-Kontroll-Studien [40]. Hier konnte gezeigt werden, dass Patienten, die vor einem schweren ischämischen Insult bereits transiente ischämische Attacken (TIAs) erlitten hatten, die der selben Lokalisation zuzuordnen waren, zu milder ausgeprägten Schlaganfällen neigten, ein besseres funktionelles Endresultat und ein höheres Maß an Selbständigkeit erreichten. Diese Ergebnisse wurden kurze Zeit später an einem größeren Patientenkollektiv bestätigt [41]. Korrelierend hierzu konnte kürzlich mittels funktionellen Magnetresonanz-Untersuchungen dargestellt werden, dass trotz ähnlichem Perfusionsdefizit, welches ähnliche Lokalisationen und Schweregrade der Gefäßverschlüsse impliziert, bei Patienten mit vorangegangener ipsilateraler TIA die in diffusionsgewichteten T2-Aufnahmen nachweisbare initiale Läsion kleiner und das letztlich entstehende Infarktvolume vermindert ist [42].

Um die Präkonditionierung auf zellulärer Ebene studieren zu können, wurden neuronale Zellkulturmodelle der Ischämie mit OGD entwickelt und charakterisiert. Sowohl in einem *in vitro* Modell unserer Arbeitsgruppe an Rattenneuronen [43] als auch an einem Modell mit Mäuseneuronen [44] gelang die Erzeugung einer Hypoxietoleranz durch eine subletale OGD über 30 bzw. 5 Minuten. Unsere Arbeitsgruppe konnte hierbei an einer primären Neuronenkultur erstmals eine

hypoxische Präkonditionierung nachweisen und näher charakterisieren [43]. Dieses Modell stellte die Grundlage für unsere weiteren Experimente dar.

1.3 Pharmakologische Präkonditionierung

Die ischämische oder hypoxische Präkonditionierung kann durch Pharmaka, die ein Energiedefizit des Hirngewebes hervorrufen, imitiert werden. Zunächst konnte an hippokampalen Hirn-Schnitten gezeigt werden, dass durch *in vivo*-Vorbehandlung mit 3-Nitropropionsäure (3-NPA), einem irreversiblen Blocker des Komplexes II der Atmungskette, die CA1-Neuronen eine nachfolgende Hypoxie besser tolerierten [45]. Dieser Effekt wurde „chemische“ oder „pharmakologische“ Präkonditionierung genannt. Eine Ischämietoleranz konnte *in vivo* beispielsweise erzeugt werden durch 3-NPA [45, 46, 47, 48], Diazoxid [49], Hypothermie [50], Lipopolysaccharide [51], Cycloheximid [52, 53], KCl [38, 54, 55, 56], Desferrioxamin [57] und Inhibitoren der Superoxid-Dismutase [58] und *in vitro* durch Ouabain [43].