

Aus dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Fachbereich Pharmazie



Methoden zur Evaluation des neuronalen Zelltods in hippokampalen und kortikalen Primärkulturen der Ratte

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten

Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Anne Karayilan (geb. Bork)

aus Aachen

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
27.07.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Rothmund

Referent: Prof. Dr. Dr. Krieglstein

Korreferent: PD Dr. Höglinger

Für Annika

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Material und Methoden	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Tiere und Tierhaltung.....	15
2.1.2 Pharmaka	15
2.1.3 Materialien zur Beschichtung der KulturgefäÙe	15
2.1.4 Materialien für die Zellkultur.....	15
2.2 Methoden für embryonale (E18) kortikale Zellkulturen.....	16
2.2.1 PEI-Beschichtung	16
2.2.2 Präparationslösungen und Kulturmedien	17
2.2.3 Präparation embryonaler (E18) kortikaler und hippokampaler Neurone der Ratte	19
2.3 Methoden für postnatale hippokampale Kulturen.....	21
2.3.1 Poly-L-Lysin-Beschichtung	21
2.3.2 Präparationslösungen und Kulturmedien	22
2.3.3 Präparation postnataler hippokampaler Neurone der Ratte.....	23
2.4 Behandlung der Zellkulturen	24
2.4.1 Behandlungslösungen	24
2.4.2 Induktion des Zellschadens	25
2.5 Bestimmung der geschädigten Zellzahl	29
2.5.1 Färbung der Zellkulturen.....	29
2.5.2 Photometrische Messung	30
2.5.3 Auszählung der Kulturen.....	30
2.6 Statistik	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Vergleich unterschiedlicher Wellenlängen der photometrischen Messung zur Bestimmung der geschädigten Zellzahl	32
3.2 Vergleich von 8 und 13 Tage alten Zellkulturen.....	33
3.3 Vergleich von photometrischer Messung und Zählung der geschädigten Zellen.....	34
3.4 Untersuchungen an verschiedenen Schädigungsmodellen	35
3.4.1 Glutamatschädigung.....	36

3.4.2 Glukoseentzug und Staurosporinschädigung	36
3.4.3 Sauerstoff-Glukoseentzug	37
3.5 Effekte von Dizocilpin.....	38
3.5.1 Effekt von Dizocilpin nach Glutamatschädigung	38
3.5.2 Effekt von Dizocilpin nach NMDA-Schädigung	40
3.5.3 Effekt von Dizocilpin bei Sauerstoff-Glukose-Entzug	41
3.6 Effekt von Memantine	42
3.7 Effekt von Pifithrin	43
3.8 Kombination von Clenbuterol und Memantine	44
3.9 Vergleich von Pifithrin und Dizocilpin	45
4. Diskussion	46
4.1 Quantitative Methoden zur Bestimmung der Zellschädigung.....	46
4.2 Einfluss der Kultivierungszeit	47
4.3 Vergleich von Tiermodell und Zellkulturen.....	48
4.4 Schädigung durch Sauerstoff- und Glukoseentzug.....	49
4.5 Neuroprotektiva im Modell des Sauerstoff-Glukose-Entzugs.....	51
4.5.1 Clenbuterol und Memantine	51
4.5.2 Pifithrin und Dizocilpin (MK801).....	53
5. Zusammenfassung	57
Abstract	59
Abkürzungsverzeichnis	61
Literaturverzeichnis	63
Verzeichnis der akademischen Lehrer	69
Danksagung	71

1. Einleitung

Die Anzahl der Neuerkrankungen an ischämischen Schlaganfällen beträgt in Deutschland pro Jahr ungefähr 160 bis 240 auf 100 000 Einwohner. Die Mortalität liegt ein Jahr nach einem erlittenen Insult bei durchschnittlich 25 %. Der Krankenbestand zerebrovaskulärer Erkrankungen steigt im Moment aufgrund sinkender Mortalitätsraten und alternder Gesellschaft und liegt bei 700 bis 800 auf 100 000 Einwohner. Der Schlaganfall ist die häufigste Ursache für eine dauerhafte Behinderung. Folgeschäden eines Schlaganfalls beinhalteten sowohl primäre Schäden, wie Lähmungen, Sprachstörungen und kognitive Störungen, als auch sekundäre Folgeerscheinungen, wie Gelenkkontrakturen und Gliedmaßenfehlstellungen. In Anbetracht des hohen Pflegeaufwands, den die Erkrankung mit sich bringt, überrascht es nicht, dass Schlaganfallpatienten in westlichen Industrieländern die teuerste Krankheitsgruppe überhaupt bilden (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2005). In Industrieländern ist der Schlaganfall die dritthäufigste Todesursache und der Hauptgrund für langfristige Erwerbsunfähigkeit. Etwa eine Million erstmalige Schlaganfälle ereignen sich schätzungsweise jedes Jahr in der Europäischen Union. Die lebenslangen direkten Behandlungskosten (Kosten aus stationärer und ambulanter Behandlung, Rehabilitations- und Pflegekosten) betragen pro Schlaganfallpatient durchschnittlich circa 43.000 Euro (Kolominsky-Rabas et al., 2006). Bei diesen Daten sind indirekte Kosten, wie beispielsweise aus der Erkrankung resultierende Erwerbsunfähigkeit, nicht mit berücksichtigt. Landesweite Hochrechnungen für 2006 bis 2025 lassen direkte Kosten von 108,6 Milliarden Euro für die lebenslange Behandlung von Patienten mit einem Schlaganfall-Erstereignis erwarten. Dies unterstreicht die enorme medizinische und ökonomische Bedeutung des Schlaganfalls (Kolominsky-Rabas et al., 2006). Eine kausale Therapie nach Schädigung des Hirngewebes existiert nicht, so dass Präventivmassnahmen (Primär- und Sekundärprävention) zur Verhinderung von Schlaganfällen von großer Bedeutung sind. Zu den primären Präventivmassnahmen gehört die Behandlung von Risikofaktoren, wie Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, Vorhofflimmern, Adipositas und der Verzicht auf Nikotin und Alkohol. Die genannten Lebensgewohnheiten und Erkrankungen tragen zur Arteriosklerose bei, die die Hauptursache für ischämische Schlaganfälle dar-

stellt (Gass, 1997). Zur Sekundärprävention wird Acetylsalicylsäure verwendet. Handelt es sich um Patienten mit hohem Rezidiv-Schlaganfallrisiko ($\geq 4\%$ pro Jahr), wird seit 2007 zur Sekundärprävention die Kombination aus Acetylsalicylsäure und retardiertem Dipyridamol empfohlen. Besteht zusätzlich eine symptomatische periphere arterielle Verschlusskrankheit, wird zur Rezidivprophylaxe eine Clopidogrel-Monotherapie empfohlen (Diener et al., 2007). Es ist von großer Bedeutung die pathophysiologischen Mechanismen im Rahmen einer ischämischen Zellschädigung zu verstehen, da nur so neue, dringend benötigte therapeutische Ansätze entwickelt werden können.

Nach dem derzeitigen Erkenntnisstand handelt es sich bei der Ischämie um ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Schädigungskaskaden, wobei Glukose im Energiestoffwechsel des Gehirns eine außerordentlich wichtige Rolle spielt, da es den wichtigsten Energielieferanten darstellt. Fettsäuren können die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren und somit nicht zur Energiegewinnung genutzt werden. Aminosäuren spielen für die Energiegewinnung im Gehirn ebenfalls keine Rolle, da die Glukoneogenese, für die Aminosäuren als eine der Vorstufen dienen, im Gehirn nicht abläuft. Das Gehirn verfügt lediglich über einen äußerst geringen Glykogenvorrat, welches als Polysaccharid zur Kohlenhydratreserve dient. Eine Alternative zur aeroben Glykolyse ergibt sich unter länger andauerndem Hungern. In diesem Fall kann das Gehirn durch Oxidation Energie aus Ketonkörpern gewinnen, die in der Leber gebildet und in das Gehirn aufgenommen werden.

Der Stoffwechsel des Gehirns beruht fast ausschließlich auf aerober Glykolyse, an der die Mitochondrien beteiligt sind (Gass, 1997). Die aerobe Glykolyse dient der Gewinnung von ATP (Adenosintriphosphat), das die wichtigste Speicherform chemischer Energie ist. Der wichtigste Energie- und damit ATP-verbrauchende Prozess der Nervenzellen ist der aktive Transport von Natrium durch die Zellmembran. Natrium wird im Austausch gegen Kalium entgegen der jeweiligen Konzentrationsgradienten aus der Zelle heraus und Kalium in die Zelle hinein transportiert, um eine Aufrechterhaltung des Membranpotentials zu gewährleisten.

Astrozyten, die zu den Gliazellen gehören, und unter anderem eine strukturgebende Stützfunktion haben, nehmen im Energiestoffwechsel des Gehirns eine

zentrale Rolle ein. Durch den engen Kontakt zu intraparenchymalen Kapillaren nehmen sie Metabolite wie Glukose aus dem Blut auf und passen den Energiestoffwechsel der synaptischen Aktivität der Nervenzellen an. Die Neurone selbst hingegen treten mit den Kapillaren nicht in Kontakt (Magistretti und Pellerin, 1999).

Die durch eine Ischämie hervorgerufene Unterbrechung der Blutversorgung und der damit verbundene Sauerstoff- und Glukosemangel, führt dazu, dass die betroffenen Nervenzellen nicht mehr in der Lage sind, ihre Funktionen aufrecht zu erhalten.

Der Sauerstoff in der grauen Substanz ist bereits nach wenigen Sekunden verbraucht, freie Glukose findet sich nach drei bis vier Minuten nicht mehr. Bereits wenige Sekunden nach einer Ischämie sind Veränderungen im EEG zu beobachten (z.B. Amplitudenminderung, Frequenzverlangsamung und epilepsietypische Potentiale). Zunehmender struktureller und funktioneller Untergang von Nervengewebe führen zum Erliegen physiologischer Prozesse wie Reizweiterleitung und Stoffwechselfunktionen. Zu einem Untergang von Nervengewebe kommt es nach etwa vier bis fünf Minuten (Gass, 1997). Dies leitet neurodegenerative Prozesse ein, die zur Apoptose und Nekrose führen.

Die beiden Formen der Neurodegeneration bringen unterschiedliche morphologische Veränderungen mit sich. Zum einen können Zellschrumpfung, Kondensation des Chromatins, DNA-Fragmentierung, Vakuolenbildung im Zytoplasma und letztendlich die Auflösung des Kerns und der Zelle beobachtet werden. Diese Merkmale werden der Apoptose, dem als programmierten (aktiven) Zelltod bezeichneten Zelluntergang, zugeschrieben (Kerr et al, 1972). Die Apoptose wird als genetisch festgelegtes und Energie verbrauchendes Selbstmordprogramm der Zelle definiert, das in der Embryonalentwicklung immer nach dem gleichen Schema abläuft. Merkmale einer Entzündung (Leukozyteninfiltration, Ödem) finden sich nicht, da umliegende Zellen aufgrund der erhaltenen Plasmamembran, die trotz zerstörtem Zellinneren weiter bestehen bleibt, nicht in Mitleidenschaft gezogen werden. Apoptose kommt auch unter physiologischen Bedingungen vor und ist Grundlage für die ständige Umwandlung und Erneuerung von Gewebe.

Unter Nekrose versteht man den passiven Zelluntergang, der durch äußere Einflüsse ausgelöst wird. Der wesentliche Unterschied zur Apoptose besteht in der Zellschwellung und Zerstörung der Zelle mit Plasmamembran, was eine entzündliche Reaktion des umliegenden Gewebes verursacht und auch zur Zerstörung intakter Zellen führt. Man geht davon aus, dass es sich bei der Nekrose um einen energieunabhängigen Prozess handelt.

Ob eine Zelle apoptotisch oder nekrotisch stirbt, hängt von der Reizstärke, der Reizdauer und dem intrazellulären ATP-Gehalt ab. Eine milde Schädigung in Kombination mit hohem intrazellulärem ATP-Gehalt führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zum apoptotischen Untergang der betroffenen Zelle (Katchanov et al., 2001). Eine zu Beginn apoptotische Degeneration kann sekundär in eine Nekrose übergehen, wenn der ATP-Vorrat verbraucht ist. Portera-Cailliau beschreibt dieses Phänomen als das „Apoptose-Nekrose-Kontinuum“ (Portera-Cailliau et al., 1997).

Bei der fokalen Ischämie werden Infarktkern und umgebendes deutlich vermindert durchblutetes Gewebe, die so genannte Penumbra, unterschieden. Bezogen auf die fokale zerebrale Ischämie als auslösenden Faktor degenerativer Prozesse, ist die Nekrose ein Vorgang, der sich relativ kurzzeitig nach Schädigung im Infarktkern ereignet. Die geschädigten Zellen der Penumbra sterben später durch verzögerte Neurodegeneration ab. Tierexperimentell konnte nachgewiesen werden, dass Apoptose eine Ursache für diese verzögerte Degeneration ist (Plesnila et al., 2006, Fisher et al., 1996).

Apoptose und Nekrose sind sozusagen die Extrem-Varianten des Zelluntergangs und nur ein Teil der Zellen einer Kultur sterben auf diese Art. Fließende Übergänge und Mischformen sind durchaus möglich. Somit handelt es sich nicht um zwei verschiedene Formen des Zelluntergangs, sondern um zeitlich und örtlich versetzte Vorgänge während des Sterbeprozesses von Zellen, die in einer Nervenzellkultur durchaus nebeneinander vorkommen können (Kanduc et al., 2002).

Dieser Untergang von Neuronen ist initial gekennzeichnet durch ein rasches Absinken der zellulären ATP-Konzentration, da die Gewinnung über die aerobe Glykolyse durch den Mangel an Sauerstoff und Glukose zum Erliegen kommt (Schütz, 1988). Ersatzweise kann ATP kurzfristig über die anaerobe Glykolyse gebildet werden, dessen saures Endprodukt Laktat darstellt. Laktat kann zwar

zur Energiegewinnung wieder herangezogen werden, jedoch nur in Anwesenheit von Sauerstoff (Magistretti, Pellerin, 1999). Das anfallende Laktat führt allmählich zu einer Azidose des umliegenden Gewebes und bald darauf zur Ödembildung (Duverger und MacKenzie, 1988). Da der energieabhängige Transport der membranständigen Natrium-Kalium-Pumpen an ATP gekoppelt ist, kommt es durch fehlendes ATP zum Funktionsverlust der Ionen-Pumpen, die nun immer weniger in der Lage sind, Natrium entgegen dem Konzentrationsgradienten aus der Zelle heraus und Kalium hinein zu transportieren. Die Aufrechterhaltung des Membranpotentials ist somit nicht mehr gewährleistet und es kommt infolge dessen zu einem Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration, welche dann kurze heftige Entladungssalven (schnell aufeinander folgende Aktionspotentiale), gefolgt von anhaltender Depolarisation hervorruft. Die Depolarisation bewirkt eine pathologische Aktivierung (Öffnung) spannungsabhängiger Kalzium- und Natriumkanäle. Dies bewirkt eine Freisetzung der Aminosäure Glutamat (Gass, 1997).

Die Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat führt zur Öffnung glutamaterger Rezeptoren. Die Glutamatrezeptoren werden aufgrund der synthetischen Liganden, der nachfolgenden Signaltransduktions-Mechanismen und ihrer molekularen Homologie in verschiedene Untertypen eingeteilt. Die Einteilung nach Signaltransduktions-Mechanismen umfasst zwei große Gruppen: ionotrope (Ionenkanal bildende) und metabotrope (G-Protein gekoppelte) Glutamatrezeptoren. Ionotrope Rezeptoren sind Ionenkanäle und bewirken schnelle, im Millisekundenbereich liegende Änderungen des Membranpotentials der postsynaptischen Zelle.

Metabotrope Rezeptoren lösen in der postsynaptischen Zelle eine Signalkaskade aus. Es kommt zur langsamen und oft längerfristigen Änderung des Membranpotentials im hundertfachen Millisekunden- und Sekundenbereich. Dabei wird immer ein intrazellulärer Botenstoff (sekundärer Botenstoff, second messenger) gebildet. Glutamatrezeptoren sind in der Lage über negative Rückkopplung die exzitatorische Neurotransmission zu hemmen. Es sind insgesamt acht metabotrope Subtypen von Glutamatrezeptoren (mGluR 1-8) beschrieben. Es wurden noch keine klinisch relevanten Substanzen entwickelt, die auf der Ebene der metabotropen Rezeptoren wirken. Zu den ionotropen Glutamat-

Rezeptoren gehören der N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA), der α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA)- und der Kainat-Rezeptor. Die Namen wurden aufgrund der synthetischen Liganden vergeben, die eine Ionenkanalöffnung herbeiführen. Der Ionenkanal des NMDA-Rezeptors ist bei Öffnung für Natrium- und Kalziumionen durchlässig. Durch eine im Ionenkanal liegende Bindungsstelle für Magnesium ist er unter physiologischen Bedingungen blockiert. Diese Blockade ist spannungsabhängig und bei Depolarisation kommt es zum Verlust des Magnesiumblocks (Block, 2001).

Die Öffnung dieser Kanäle führt zur intrazellulären Kalziumakkumulation, was zum einen zu einer mitochondrialen Dysfunktion mit verminderter ATP Produktion führt und zum anderen eine Aktivierung von Proteasen, Endonucleasen und Lipasen bewirkt. Diese Enzyme verursachen eine strukturelle Schädigung der Neurone und ihrer DNA und erhöhen somit durch den Zelltod die extrazelluläre Kaliumkonzentration. Dies verstärkt zusätzlich die Freisetzung von Glutamat. Somit kommt es zu einem *circulus vitiosus*, der die Zellschädigung fortschreiten lässt. Außerdem vermittelt die Aktivierung glutamaterger Rezeptoren einen Natriumeinstrom in die Zellen, was einen Einstrom von Chlorid-Ionen und Wasser nach sich zieht und durch diese Flüssigkeitsverschiebung von extra- nach intrazellulär zu einem zytotoxischen Hirnödem führt. Dies trägt neben der Azidose zusätzlich zur Ausbildung des Hirnödems bei. Die erhöhte Kalziumionenkonzentration und die damit verbundene Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter führen zur Entstehung von freien Radikalen, was zu direkten Schäden an Lipiden, Proteinen, der DNA und Mitochondrien führt (Lo et al., 2003).

Die Überstimulation durch den Neurotransmitter Glutamat führt zu einer Kalziumüberladung der Neurone und spielt als neurotoxischer Mechanismus beim zerebralen Insult (Schlaganfall), bei Epilepsien und neurodegenerativen Erkrankungen eine bedeutende Rolle. Somit nimmt der NMDA-Rezeptor unter pathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle ein. Außerdem ist er an Lernvorgängen unter physiologischen Bedingungen beteiligt. Die Vielfalt der Bindungsstellen, über die seine Funktion beeinflusst werden kann, bieten therapeutische Ansatzpunkte. Außerdem exprimieren die meisten Neurone, die durch Glutamat

erregt werden, mehrere Glutamaterezeptortypen gleichzeitig, die dann in unterschiedlicher Dichte an den Synapsen vorhanden sind. Auf diese Weise kann die entsprechende Funktion in den verschiedenen Regionen des Gehirns moduliert werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass der Hippokampus die höchste Dichte an Glutamaterezeptoren (vor allem NMDA-Rezeptoren) besitzt, weshalb sich hippokampale Neuronenkulturen besonders gut zur Untersuchung der Veränderungen unter pathologischen Bedingungen eignen (Ikonovic et al., 1999). Der Hippokampus ist eine Region des Gehirns, der zum größten Teil im Schläfenlappen lokalisiert ist und einen Teil des so genannten limbischen Systems bildet. Ihm kommen somit zahlreiche Aufgaben für das Entstehen von Aggression, Affektverhalten, Bewusstsein und Motivation zu. Außerdem ist er an dem Prozess der Gedächtnisbildung beteiligt und trägt einen erheblichen Teil zur Merkfähigkeit bei. Er gehört zu den selektiv vulnerablen Gehirnregionen. Das bedeutet, dass er Zellen enthält, die besonders empfindlich auf Glukose- und Sauerstoffmangel reagieren (Gass,1997).

Die verschiedenen Pathomechanismen, die zur Neurodegeneration führen, bieten Angriffspunkte für eine pharmakologische Therapie des zerebralen Infarkts.

Therapieziel aller Sofortmaßnahmen ist es, wichtige Körperfunktionen, wie Herz-Kreislauf-, Atmung, Metabolismus und Flüssigkeitshaushalt zu stabilisieren. So umfasst die allgemeine Behandlung zunächst einmal die Kontrolle des Blutdrucks und zurückhaltende Behandlung einer etwaigen Hypertonie (Bluthochdruck), Aufrechterhaltung einer ausreichenden zerebralen Perfusion, ausreichende Sauerstoffzufuhr (ggf. künstliche Beatmung), Kontrolle des Blutzuckers und der Elektrolyte, Freihalten des venösen Abflusses (Jugularvenen) durch korrekte Kopflagerung, Entgegenwirken der Entwicklung eines Hirnödems (Osmotherapie), Einsatz von Barbituraten, Normothermie (Diringer et al., 2004) und die Vorbeugung einer Thrombose durch Heparinisierung und Stützstrümpfe. Die Therapie mit Aspirin (100-300 mg) wird in der Frühphase empfohlen, sofern keine Thrombolysetherapie geplant ist. Der zweite Schritt der Therapie dient der Verbesserung der Durchblutung und umfasst die intravenöse Thrombolyse, die in einem Zeitfenster von drei Stunden als gesichert angesehen wird. Es gibt Hinweise, dass eine Lysetherapie nach bis zu viereinhalb

Stunden nach Symptombeginn für ein bestimmtes Patientenkollektiv von Nutzen sein kann. Dies wird als individueller Heilversuch betrachtet und die Patientenauswahl nach MRT-Befund getroffen (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2005). Falls eine Emboliequelle wahrscheinlich ist, sollte eine Therapie mit Antikoagulanzen begonnen werden.

Diese Therapie-Maßnahmen sind hauptsächlich symptomatisch ausgerichtet. So kann durch Barbiturate eine Verringerung des Hirnstoffwechsels erreicht werden. Sie dienen zudem noch als Fänger für freie Radikale. Die früher propagierte Hyperventilation führt durch einen verminderten CO₂-Partialdruck zur unkontrollierten Vasokonstriktion und somit verminderten Hirnperfusion. Sie bietet sich zur Überbrückung einer Hirndruckkrise an, sollte jedoch nicht längerfristig zur Anwendung kommen (Muizelaar u. Marmarou, 1991). Es sollte von daher eine kapnometrisch kontrollierte Normoventilation angestrebt werden. Die moderate Hypothermie (32–33 °C) kann die Mortalität nach ausgedehnten Hemisphäreninfarkten reduzieren, ist aber spezialisierten Zentren vorbehalten (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2005).

Mögliche Ansatzpunkte in der pharmakologischen Therapie bieten Substanzen, wie NMDA-Rezeptor-Antagonisten oder Kalzium-Antagonisten, die auf der Ebene von exzitatorischen Rezeptoren wirken, deren Aktivierung als wesentlicher Auslöser der Schadenskaskade gelten. Auch die transkriptionellen postschämischen Veränderungen sind von Interesse, um neuroprotektiv wirksame oder Apoptose-induzierende Gene (wie Bax) zu finden, um Substanzen entwickeln zu können, die deren Expression erhöhen, beziehungsweise hemmen.

Folgende solcher neuroprotektiver Substanzen sind in dieser Arbeit verwendet worden:

Dizocilpin (MK801)

MK801 wirkt als nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist. Er besetzt den Ionenkanal des Rezeptors und verhindert so den Einstrom von Kalziumionen und damit die durch Glutamat induzierte exzitatorische Schädigung an Nervenzellen.

Clenbuterol

Clenbuterol ist ein β_2 -Sympathomimetikum und bewirkt eine vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren (Neurotrophine) wie NGF, bFGF und TGF- β_1 in gemischten hippokampalen Primärkulturen. Diese Expression kommt durch die Aktivierung von β_2 -Adrenorezeptoren zustande, die sich auf Neuronen und Astrozyten befinden. Eine Expression dieser Neurotrophine konnte zunächst in Astrozytenkulturen nachgewiesen werden. Da bekannt war, dass Neurone nur wenige β_2 -Adrenorezeptoren besitzen, erklärte man den starken Effekt durch die Interaktion mit den Astrozyten, die zu den Gliazellen gehören (Zhu und Kriegstein, 1999, Culmsee et al., 1999). Diese Neurotrophine wirken über zwei verschiedene membranständige Rezeptoren neuroprotektiv, den Trk-Tyrosinkinase-Rezeptor und den p75-Neurotrophinrezeptor, an die sie mit unterschiedlicher Affinität binden und fördern das Wachstum und die Differenzierung (durch Apoptose) von Nervenzellen (Kaplan und Miller, 2000, Casaccia-Bonnel et al., 1996).

Memantine

Memantine wirkt als nicht-kompetitiver Antagonist an NMDA-Rezeptoren und verhindert die Schädigung der Zellen durch den Neurotransmitter Glutamat, ähnlich wie MK801. Zusätzlich führt Memantine zu einer Induktion von BDNF-mRNA. BDNF gehört zur Familie der Neurotrophine. Unter Einfluss von Memantine kommt es vor allem im Kortex und einigen hippokampalen Anteilen zu einer vermehrten Expression von Neurotrophinen (Marvanová et al., 2001).

Pifithrin (PFT)

Pifithrin ist eine antiapoptotisch wirksame Substanz, die ihre Wirkung durch eine Hemmung der Transkriptionsaktivität des Tumorsuppressors p53 vermittelt. Dies geschieht dadurch, dass die Translokation in den Kern und damit die Bindung an die DNA verhindert wird (Schwarz, 2004). Das Protein P53 reguliert als Transkriptionsfaktor den Zellzyklus, besitzt Apoptose induzierende Eigenschaften und übernimmt somit beim apoptotischen Untergang ischämisch geschädigter Neurone eine wichtige Funktion (Culmsee et al., 2001). Die Aktivierung des Tumorsuppressors erfolgt nach DNA-Schädigung, oxidativem Stress und gestörter Kalziumhomöostase. Als Transkriptionsfaktor erhöht p53 die

Expression einer Reihe von Genen, die seiner Steuerung unterliegen, wie zum Beispiel p21, das den Zellzyklusarrest vermittelt, damit der entstandene Schaden nicht an andere Zellgenerationen weiter gegeben wird. Darauf könnte entweder die DNA-Reparatur oder das Einleiten der Apoptose folgen. Das geschieht über die Induktion proapoptotischer Proteine, wie beispielsweise Bax, das die Apoptose (p53 vermittelt) über die Schädigung von Mitochondrien initiiert (Marchenko et al., 2000). Zudem blockiert p53 andere Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NFκB, dem eine Schlüsselrolle bei neuroprotektiven Prozessen zukommt (Culmsee und Mattson, 2005).

Ein Schutz der Neurone durch eine neuroprotektive Therapie ist somit experimentell für einige Substanzen schon gezeigt worden. Dies konnte jedoch aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen, wie psychotischen Symptomen (Fisher und Schaebitz, 2000), teilweise klinisch noch nicht umgesetzt werden.

Ein weiteres Problem bei der Untersuchung möglicher neuroprotektiver Therapien liegt darin, dass Studienergebnisse aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Methoden nur eingeschränkt miteinander verglichen werden können. So werden verschiedene Untersuchungsmodelle, wie das Tiermodell, organotypische Gehirnschnitte und neuronale Zellkulturen für Studienzwecke herangezogen.

In einer Zellkultur ist der Zellverband und somit die Interaktion der Zellen untereinander aufgrund des Präparationsvorganges nicht mehr in seiner ursprünglichen Form vorhanden, während das in organotypischen Schnitten und im Tiermodell der Fall ist. Die Blut-Hirn-Schranke existiert in Zellkulturen nicht mehr. Jedoch bilden sich auch in der Neuronenkultur synaptische Kontakte zwischen den Zellen aus. Die Vernetzung der Zellen und im Blut enthaltene Faktoren könnten im Rahmen einer Perfusionsstörung, wie sie während einer Ischämie im lebenden Organismus auftritt, eine entscheidende Rolle spielen und den Grad der Nervenzellschädigung beeinflussen. Der direkte Vergleich dieser drei Modelle ist somit nur eingeschränkt möglich.

Ebenfalls stehen mehrere Formen der quantitativen Bestimmung der geschädigten Zellzahl zur Verfügung. Zunächst einmal sei hier die klassische Form der Zellauszählung unter dem Mikroskop nach der Farbausschlussmethode nach

Paul genannt. Weitere Möglichkeiten bieten der LDH- (Laktatdehydrogenase) Assay und die photometrische Bestimmung der geschädigten Zellzahl.

Die Schädigung einer Neuronenkultur lässt sich durch viele Substanzen (Stauroporin, Glutamat) und Veränderung der Umgebungsbedingungen (Sauerstoff-Glukose-Entzug) erreichen und ist auch in der Dauer der Einwirkzeit und der Konzentration der neuroprotektiven und neurotoxischen Substanzen variabel. Unterschiede bestehen auch im Alter der verwendeten Zellkulturen, beispielsweise hinsichtlich der Differenzierung der Nervenzellen und der Expression von NMDA-Rezeptoren. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine NMDA-Rezeptorblockade in den ersten vierzehn Tagen nach der Geburt eine massive apoptotische Neurodegeneration verursacht. Hervorgerufen wird diese durch das Ausbleiben der für Lernvorgänge so wichtigen Stimulation der NMDA-Rezeptoren (Haberny et al., 2002). Diese Ergebnisse weisen auf eine erhöhte Expression von NMDA-Rezeptoren in den ersten vierzehn Tagen nach der Geburt und somit eine größere Anfälligkeit für die Schädigung durch Glutamat hin.

Zellen, die während des Zellzyklus das Stadium der Mitose durchlaufen haben, gehen entweder in eine Ruhephase, die sogenannte G₀-Phase über, oder differenzieren sich zu reifen Zellen aus. Seit vier Tagen kultivierte embryonale kortikale Zellen, zeigten laut der Arbeit von Kruman bereits signifikant weniger Nervenzellen, die sich noch in der S-Phase (Synthesephase) befanden (Kruman, 2004). Nervenzellen des adulten Gehirns sind terminal postmitotisch ausdifferenziert, was eine dauerhafte Blockade des Zellzyklus bedeutet (Ross, 1996). Im Rahmen einer Ischämie kommt es durch oxidativen Stress und Bildung freier Radikale zu DNA-Strangbrüchen, was zu einer Zellzyklusaktivierung postmitotisch ausdifferenzierter Zellen führt. Diese Zellzyklusaktivierung könnte einen Versuch darstellen, den entstandenen Zellschaden zu beheben. Gelingt dies nicht, führt das zur Apoptose. Die Apoptose wird für die verzögerte Neurodegeneration verantwortlich gemacht (Katchanov et al., 2001). Dass die Zellzyklusaktivierung zur Regulierung und Kontrolle der Apoptose dient, konnte schon gezeigt werden. Ob davor die Möglichkeit besteht den entstandenen Zellschaden durch Reparaturmechanismen zu beheben, ist derzeit noch nicht geklärt (Kruman, 2004).

Fragestellungen

In der vorliegenden Arbeit war ein Schwerpunkt die Untersuchung und der Vergleich verschiedener Labormethoden zur Quantifizierung des neuronalen Zelltods. Anhand dieser Ergebnisse sollte die Vergleichbarkeit voneinander abweichender quantitativer Methoden untersucht und die Bewertung erleichtert werden. Von besonderem Interesse war die Vereinfachung der quantitativen Auswertung einer geschädigten Nervenzellkultur, da diese durch die bisherige Auszählung sehr zeitaufwendig ist. Dafür wurde die photometrische Bestimmung nach Trypanblaufärbung herangezogen. Die Absorptionswerte zweier verschiedener Wellenlängen (570 und 590 nm) der mit Trypanblau gefärbten Zellkulturen wurden miteinander verglichen. Weiterhin wurde untersucht, welche Auswirkung das Alter einer Zellkultur auf das Ergebnis einer schädigenden Behandlung der Zellen zeigte.

Ein weiterer Schwerpunkt war die Untersuchung von Schädigungsmodellen im Hinblick auf den erreichbaren Zellschaden und die neuroprotektive Wirkung einzelner Substanzen. Die neuroprotektive Wirkung von Pifithrin und Dizocilpin wurde sowohl unter den Bedingungen des Sauerstoff-Entzugs (OD), als auch des Sauerstoff-Glukose-Entzugs (OGD) beurteilt. Der neuroprotektive Effekt von Clenbuterol und Memantine wurde für die Einzelwirkstoffe und die Kombination beider Substanzen während eines Sauerstoff-Glukose-Entzugs untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere und Tierhaltung

Zur Präparation embryonaler kortikaler Kulturen wurden trächtige weibliche Sprague Dawley Ratten (Firma Charles River, Sulzfeld) verwendet. Die für die hippokampalen postnatalen Kulturen benötigten neugeborenen (P1-2) Fischer-344 Ratten stammten aus der institutseigenen Zucht. Die Tierhaltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 23 \pm 1 °C, relativer Luftfeuchte von 55 \pm 5%, zwölfstündigem Hell-Dunkel Rhythmus und freier Verfügung über Standardfutter (Altromin[®], Lage) und Trinkwasser.

2.1.2 Pharmaka

Clenbuterol	Arzneimittelwerk Dresden
Memantine	Merz, Darmstadt
MK 801 (Dizocilpin)	Sigma, Deisenhofen
N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)	Sigma, Deisenhofen
Pifithrin (PFT)	Tocris
Staurosporin (STS)	Sigma, Deisenhofen

2.1.3 Materialien zur Beschichtung der KulturgefäÙe

Borax (Natriumtetraborat)	Fluka Chemie AG, Buchs
Borsäure	Riedel-de Haën, Seelze
PEI	Sigma, Deisenhofen
Poly-L-Lysin-Hydrobromid	Sigma, Deisenhofen

2.1.4 Materialien für die Zellkultur

Albumin Bovine Fraction V (BSA)	Sigma, Deisenhofen
B27 supplement	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Formalinpuffer	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum	PAA, Marburg
Gentamicinsulfat	Sigma, Deisenhofen

Glukose	Sigma, Deisenhofen
HEPES	Sigma, Deisenhofen
KCl	Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄	Fluka Chemie AG, Buchs
L-Glutamine	Sigma, Deisenhofen
MEM (Modifiziertes Eagle Medium)	Invitrogen
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Fluka Chemie AG, Buchs
NaHCO ₃	Fluka Chemie AG, Buchs
Neurobasalmedium	Invitrogen
Papain	Sigma, Deisenhofen
Phenolrot	Sigma, Deisenhofen
Pyruvat	Sigma, Deisenhofen
SDS	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Amersham, Braunschweig
Trypsininhibitor	Sigma, Deisenhofen

2.2 Methoden für embryonale (E18) kortikale Zellkulturen

Die im Folgenden aufgeführten Techniken zum Anlegen und zur Kultivierung embryonaler kortikaler Zellkulturen wurden von Herrn Dr. Carsten Culmsee und Frau Sandra Engel durchgeführt.

2.2.1 PEI-Beschichtung

Durch die Beschichtung der Kulturgefäße wurde eine bessere Haftung der Zellen am Boden erzielt.

Rezeptur der Grundlösung

Boratpuffer

Borsäure 1,24 g

Borax 1,9 g

Aqua dest. ad 400 ml

Boratpuffer steril filtrieren und bei 4 °C lagern.

PEI-Beschichtungslösung

Zur Herstellung von PEI 5% wurde PEI (50%) 1:10 mit Wasser verdünnt und aliquotiert eingefroren (-20°C).

PEI 5 %	0,4 ml
Boratpuffer	400 ml

Beschichtung

Der Boden der Petrischalen (Fischer Scientific) wurde mit PEI-Beschichtungslösung über zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dreimal mit 1,5 bis 2 ml destilliertem Wasser (steril) gewaschen und die geöffneten Petrischalen wurden dreißig Minuten unter UV-Licht (Laminar Flow Werkbank) nochmals sterilisiert.

Es erfolgte die Zugabe von MEM+ und die Aufbewahrung im Brutschrank (5% CO₂, 37°C) über Nacht.

2.2.2 Präparationslösungen und Kulturmedien

MEM+

Fertigpackungen von Invitrogen plus:

HEPES	0,238 g
Glukose	10 g
NaHCO ₃	2,2 g
KCl	1,12 g
Pyruvat	0,12 g
L-Glutamine	0,176 g
Gentamicinsulfat	10 mg

pH 7,2

900 ml MEM+ und 100 ml FCS (Fötales Kälberserum), steril filtrieren.

HBSS 10x

KCL	4 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g

MgSO ₄ x7H ₂ O	80 g
Na ₂ HPO ₄	0,9 g
Glukose	10 g
Phenolrot	0,1 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

pH 7,2

Steril filtrieren und bei 4°C lagern.

HBSS 1x

H ₂ O	400 ml
HBSS 10x	50 ml
HEPES	1,2 g
Gentamicinsulfat	5 mg
Aqua dest.	ad 500 ml

pH 7,2

Steril filtrieren und bei 4°C maximal vier Wochen lagern. Vor Gebrauch wurden 2 ml B27 auf 100 ml HBSS hinzu gegeben.

Neurobasalmedium

Neurobasalmedium 1x	500 ml
HEPES	0,5725 g
B27 supplement	10 ml
L-Glutamine	0,088 g
Gentamicinsulfat	12,5 mg

Steril filtrieren und bei 4°C maximal vier Wochen lagern.

2.2.3 Präparation embryonaler (E18) kortikaler und hippokampaler Neurone der Ratte

Das Präparations-Besteck wurde für dreißig Minuten in Alkohol eingelegt. 10 mg Trypsin und 10 mg Trypsininhibitor wurden eingewogen und in je eine Petrischale gegeben. Mit UV-Licht wurden die Lösungen für zwanzig Minuten bestrahlt, ebenso die Petrischalen, die Stereolupe und das Präparationsbesteck. Neun Petrischalen wurden mit je 7 ml HBSS 1x gefüllt: drei Petrischalen zum Aufnehmen der Gehirne, drei zur Lagerung und drei zur Präparation der Kortexe. Die HBSS-befüllten Schalen wurden bis zu ihrer Verwendung in einer UV-sterilisierten Box im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Weibliche Ratten Sprague Dawley (Charles River, Sulzfeld) wurden zum Zeitpunkt des achtzehnten Gestationstages (E 18) mit Halothan tief narkotisiert. Die Tötung erfolgte durch Dekapitation. Die getöteten Ratten wurden mit Alkohol eingesprüht, nach kurzer Einwirkzeit wurde der Uterus mit den Embryonen entnommen und in die 90 mm Schalen gelegt. Die Embryonen wurden herausgenommen und ebenfalls durch Dekapitation getötet. Das Gehirn wurde sofort herauspräpariert und in das HBSS der Aufnahmeschalen überführt. Es wurden circa zehn Gehirne pro Schale überführt. Nach Entnahme aller Gehirne wurden diese nochmals in die Lagerungsschalen mit frischem HBSS überführt und bis zur Präparation der Hippokampus- und Kortexgewebe bei 4°C gelagert.

Die Präparation der Hippokampus- und Kortexgewebe wurde unter der Stereolupe vorgenommen und erfolgte einzeln in den vorbereiteten Präparationschälchen. Zunächst wurde die Dura abgelöst und der Hippokampus entfernt. Entweder wurde dann ein großes Stück Kortex (ohne striatale Anteile) entnommen und mit den folgenden Kortexgeweben in einem 15 ml Falcon-Röhrchen (gefüllt mit 12 ml HBSS) gesammelt oder das entnommene Hippokampusgewebe auf gleiche Weise überführt. Das zu Beginn abgewogene Trypsin wurde in 5 ml HBSS gelöst. Nach Präparation aller Hippocampi, bzw. Kortexe wurde das HBSS aus dem Falconröhrchen (Fisher Scientific, [15 ml], [50 ml]) entfernt und wiederum mit HBSS ad 5 ml aufgefüllt. Es wurde 5 ml Trypsinlösung zugegeben (Endkonzentration Trypsin: 1 mg/ml) und unter mehrfachem leichtem Umschwenken zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Trypsinlösung wurde vorsichtig abgenommen und verworfen und die Hippocampi, bzw. Korte-

xe einmal mit HBSS gewaschen. Dann wurden wieder 5 ml HBSS zugegeben und der in 5 ml HBSS gelöste Trypsininhibitor (Endkonzentration 1 mg/ml) zugegeben und unter Umschwenken zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Hippokampus-, bzw. Kortexstücke wurden zweimal mit HBSS gewaschen, dann wurden 4 bis 5 ml HBSS zugegeben. Anschließend wurden die Hippokampus-, bzw. Kortexgewebe mit einer 10 ml Glaspipette (MAGV, Rabenau-Londorf, Klasse B) mit enger Öffnung mit etwa fünfzehn, maximal fünfundzwanzig Hüben trituriert, bis eine einheitliche Zellsuspension entstanden war. Gewebestücke, die nach fünfzehn bis fünfundzwanzig Hüben nicht aufgelöst waren, wurden verworfen. Es wurde mit HBSS auf das Endvolumen aufgefüllt, das sich errechnete aus:

Für kortikale Zellkulturen: Endvolumen = Zahl der Gehirne/2,5 (ml)

Für hippokampale Zellkulturen: Endvolumen = Zahl der Gehirne/4 (ml)

Die Suspension wurde dann in ein 50ml Falconröhrchen überführt (ohne evtl. sedimentierte Gewebeteile), nochmals mit dem gleichen Volumenteil HBSS versetzt (entspricht einer 1:2 Verdünnung) und bei 200xg (=1000 Upm) für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit der entsprechenden Menge frischen HBSS vorsichtig in Suspension gebracht. Von einem Teil dieser Zellsuspension wurde eine weitere 1:2 Verdünnung mit MEM+ hergestellt (entspricht einer Endverdünnung von 1:4). Die jeweilige Teilung des Ansatzes richtete sich nach der Anzahl der 35 mm oder 60 mm Schalen, die beschichtet werden sollten. Die 1:4 Verdünnung wurde mit der Neubauer-Kammer ausgezählt. Es wurde die Zellzahl von zwei großen Quadraten (ein großes Quadrat = 16 kleine Quadrate) bestimmt. Das Volumen eines großen Quadrates betrug 1 mm^3 (entspricht $0,1 \mu\text{l}$). Aus den Zellzahlen beider Quadrate wurde der Mittelwert gebildet. Aus diesem Wert wurde auch der Mittelwert für die 1:2 Verdünnung berechnet (Mittelwert 1:4 Verdünnung $\times 2^2$).

Das Aussaatvolumen wurde wie folgt berechnet:

Aussaatdichte: 4×10^4 Zellen/cm²

Fläche 35er Petrischale: 9,6 cm²

Fläche 60er Petrischale: 28,3 cm²

35er Schalen: $4000 \text{: Mittelwert (1:4 Verdünnung)} \times 9,6 = \mu\text{l Zellsuspension}$

60er Schalen: 4000:Mittelwert (MW 1:4 Verdünnung x^2) x 28,3 = μ l Zellsuspension

Die Zellsuspension wurde in die vorbereiteten MEM-inkubierten Petrischalen verteilt. Dabei wurde die 1:2 Verdünnung in die 60er Schalen und die 1:4 Verdünnung in die 35er Schalen ausgesät.

Nach sechzehn Stunden wurden die beimpften Schalen einmal mit Neurobasal-Medium gewaschen und in Neurobasalmedium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Medienwechsel wurden nach fünf und gegebenenfalls zehn Tagen in Kultur durchgeführt. Die Schädigung der Neurone erfolgte ab dem achten Tag (Stau-sporinschädigung), bzw. ab dem zwölften bis vierzehnten Tag (Glutamat, Sauerstoff-Glukose-Entzug).

2.3 Methoden für postnatale hippokampale Kulturen

2.3.1 Poly-L-Lysin-Beschichtung

Pro 10 ml Boratpuffer wurde 1 mg Poly-L-Lysin hinzugegeben.

Boratpuffer

Borsäure (1,25%) und Borax (Natriumtetraborat 1,91%) wurde zu gleichen Teilen gemischt.

Beschichtung

Es erfolgte die sterile Filtration und das Abfüllen in die Kulturgefäße. Die mit Beschichtungslösung befüllten Kulturgefäße wurden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwölf bis vierundzwanzig Stunden wurden sie mit autoklaviertem Aqua bidest unter einem Laminar Flow gespült (Absaugen der Beschichtungslösung mit einer Pasteur-Pipette mit Absaugpumpe und Zugabe von Aqua bidest), was zwanzig Minuten später nochmals wiederholt wurde. Nach fünf bis dreißig Stunden weiterer Inkubation bei Raumtemperatur wurde nochmals mit Aqua bidest gespült, derselbe Vorgang weitere zwanzig Minuten später nochmals wiederholt und die Kulturgefäße mit Hilfe der Pasteur-Pipette trocken gesaugt. Erst kurz vor Präparation wurden die Kulturgefäße mit Neurobasalmedium befüllt und im Brutschrank bis zum Aussäen der Nervenzellen bei 37°C/5% CO₂ inkubiert.

Haltbarkeit: acht bis zehn Tage.

2.3.2 Präparationslösungen und Kulturmedien

Präparationslösungen:

Zur Präparation postnataler hippocampaler Neurone wurden folgende Lösungen benötigt:

1. Lösung

Neurobasalmedium	150 ml
BSA; Albumin Bovine Fraction V	30 mg

2. Lösung

Lösung	130 ml
Papain	30 mg

3. Lösung

BSA, Albumin Bovine Fraction	500 mg
Trypsin-Inhibitor, Type II-O Chicken egg white	500 mg
Neurobasalmedium	50 ml

Alles wurde steril filtriert und in sterile Zentrifugenröhrchen (Falcon) gefüllt.

Aufbewahrung der fertigen Lösungen:

Lösung 1	à 15 ml	4 °C
Lösung 2	à 3 ml	-20 °C
Lösung 3	à 5 ml	-20 °C

2.3.3 Präparation postnataler hippocampaler Neurone der Ratte

Pro Kulturschale wurden jeweils 2 ml Neurobasalmedium vorgelegt und diese dann bis zum Ende der Präparation in den Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gestellt. Das Präparationsbesteck wurde für mindestens zwanzig Minuten in 70%iges Ethanol eingelegt. Für die Kulturen wurden Fischer-344-Ratten (höchstens vierundzwanzig Stunden alt) mit Alkohol abgespritzt, dekapitiert und das Gehirn herauspräpariert. Die entnommenen Gehirne wurden kurzzeitig in Lösung 1 aufbewahrt. Der Hippokampus wurde vorsichtig herauspräpariert und in eine kleine Petrischale (gefüllt mit Lösung 1) überführt. Die Hippocampi wurden von Blut und Gewebe gereinigt. Mit einer Pasteurpipette wurden diese in Lösung 2 überführt. Während der zwanzig Minuten Inkubation bei 37°C in einem Wasserbad wurde die Hippocampi enthaltende Papain-Lösung immer wieder vorsichtig umgeschwenkt. Dann wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abgenommen, 1 bis 2 ml Neurobasalmedium auf das Pellet gegeben und achtmal, ohne Luftblasen zu erzeugen, mit einer verjüngten Pasteurpipette trituriert. Es wurde kurz gewartet, bis sich die Zellen, die noch nicht aus dem Zellverband gelöst waren, absetzen konnten und der Überstand mit den voneinander gelösten Zellen in Lösung 3 überführt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Dann wurde Lösung 3, die die voneinander gelösten Zellen enthielt, bei 1000 Upm für zehn Minuten zentrifugiert (Minifuge, Heraeus, Hanau). Der Überstand wurde abgenommen, verworfen und das Pellet in entsprechender Menge Neurobasalmedium aufgenommen (200 µl Zellsuspension/Schale; vier Hippocampi wurden auf fünf Schalen aufgeteilt). Es wurde nochmals vorsichtig trituriert, um eine Zellsuspension zu erhalten. 200 µl der Zellsuspension wurden mit einer Eppendorf-Pipette in jede Kulturschale pipettiert. Danach erfolgte die Kultivierung über dreizehn bis vierzehn Tage im Brutschrank (Cytoperm, Heraeus, Hanau oder Function Line, Typ BB 16, Heraeus, Hanau) bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luft und einer relativen Luftfeuchte von 90 bis 95%. Ebenfalls 200 µl der Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Hämazytometer gegeben und die Zelldichte ermittelt. Die Aussaatdichte betrug etwa 3×10^5 Zellen/35er Kulturschale. Alle drei bis vier Tage erfolgte ein Medienwechsel mit Neurobasalmedium. Die Schädigung der Neurone erfolgte dreizehn bis vierzehn Tage nach der Präparation.

2.4 Behandlung der Zellkulturen

2.4.1 Behandlungslösungen

Zur Behandlung der Zellkulturen wurden folgende Medien benötigt:

Locke's Medium (mit und ohne Glukose)

Für den Glukose- und den Sauerstoff-Glukose-Entzug wurde glukosefreies Locke's Medium hergestellt.

NaCl	4,495 g
HEPES	0,595 g
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0,169 g
KCl	0,208 g
NaHCO ₂	0,501 g
MgCl ₂ 6 H ₂ O	0,102 g
Phenolrot	5 mg
Gentamicin	0,5 ml
Mit Glukose	0,9 g
H ₂ O	ad 500 ml

pH 7,2

Sterile Filtration und Lagerung bei 4°C.

EBSS (mit und ohne Glukose)

Für den Glukose- und Sauerstoff-Glukose-Entzug wurde glukosefreies EBSS hergestellt.

NaCl	116,36 mM
CaCl ₂	1,8 mM
MgCl ₂	0,81 mM
KCl	5,36 mM
NaHCO ₃	26,19 mM
NaH ₂ PO ₄	1,01 mM
Dextrose / Glukose	5,5 mM

HEPES	300 mg/l
Phenolrot	10 mg/l

pH 7,0 bis 7,4

Sterile Filtration und Lagerung bei 4 °C.

2.4.2 Induktion des Zellschadens

Glutamatschädigung

Durch den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat wird im Nervengewebe vorwiegend eine nekrotische Zellschädigung verursacht. Die Glutamat-Lösungen wurden vor der Behandlung in der benötigten Menge frisch mit HBSS angesetzt und in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt.

Die embryonale hippokampale Kultur wurde in drei Gruppen unterteilt:

1. Kontrolle (HBSS)
2. Glutamat 1 mM (Behandlungsdauer 1 Stunde)
3. Glutamat 1 mM (Behandlungsdauer 24 Stunden)

Das in den Kulturgefäßen befindliche Neurobasalmedium wurde zunächst mit einer Pasteur-Pipette abgenommen und in 50 ml Falcon-Tubes gesammelt. Diese wurden für die Zeit der Behandlung bei 37 °C aufbewahrt.

Die verwendeten Behandlungslösungen wurden in die entsprechenden Petrischalen hinzu pipettiert. Für den Zeitraum der Behandlung wurde die Kultur im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Behandlung erfolgte in Gruppe 1 und 2 jeweils eine Stunde, in Gruppe 3 für vierundzwanzig Stunden. Die Wirkstofflösungen wurden nach Ablauf der Behandlungszeit mit einer Pumpe und Pasteurpipette abgesaugt, zweimal mit frischem Neurobasalmedium gewaschen und das in den Falcon-Röhrchen aufbewahrte Neurobasalmedium wieder hinzu pipettiert. Die Färbung erfolgte vierundzwanzig Stunden nach Beginn der Behandlung mit Trypanblau (s.u.).

Glutamatschädigung mit Schutz durch Dizocilpin (MK801)

Dizocilpin 10 mM Stocklösung (gelagert bei -20°C) wurde mit Neurobasalmedium zu einer 2 mM Lösung verdünnt. Von dieser 2 mM Lösung wurden 10 μl auf 2 ml Medium pro Schale pipettiert, so dass sich eine Endkonzentration von 10 μM ergab.

Die postnatale hippocampale Kultur wurde in fünf Gruppen unterteilt:

1. Kontrolle (Neurobasal)
2. Kontrolle (EBSS)
3. Kontrolle MK801 10 μM
4. Glutamat 500 μM
5. Glutamat/MK801 500 $\mu\text{M}/10 \mu\text{M}$

Zusätzlich wurde die Schädigungsrate unter Glutamat in 500 μM und 1 mM Konzentration untersucht.

Glukoseentzugsschädigung und Staurosporinschädigung

Durch den Entzug von Glukose kommt es zum Erliegen des Zellstoffwechsels und zur nekrotischen und apoptotischen Schädigung der Nervenzellen. Staurosporin (STS) wurde 1977 von Omura aus *Streptomyces staurosporus* isoliert (Omura et al., 1977). Es zeigt sowohl antihypertensive, als auch antifungale Eigenschaften über eine Hemmung verschiedener Proteinkinasen, wie cAMP- und GMP-abhängige Proteinkinasen und Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinasen. Das Molekül interagiert dabei mit der jeweiligen ATP-Bindungsstelle der Proteinkinasen, indem es die Bindung von ATP kompetitiv verhindert. Staurosporin induziert jedoch als Proteinkinaseinhibitor der Proteinkinase C auch eine apoptotische Schädigung von Nervenzellen. So wurde es aufgrund seiner toxischen Wirkung nie therapeutisch verwendet.

Die Locke's- und HBSS-Medien wurden vor Behandlungsbeginn in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt.

Die embryonale kortikale Kultur wurde in sechs Gruppen unterteilt:

1. Kontrolle ohne Medienwechsel (Neurobasal)
2. Kontrolle mit Medienwechsel (Neurobasal)
3. Neurobasal mit 200 nM STS
4. HBSS – (ohne B27)
5. Locke´s + (mit Glukose)
6. Locke´s – (ohne Glukose)

Das Neurobasalmedium, was sich in den Petrischalen befand, wurde mit Hilfe einer Pipette und Pumpe vorsichtig abgesaugt und zweimal mit der entsprechenden Lösung gewaschen (Locke´s+/-, HBSS). In der oben angegebenen Reihenfolge wurden die Medien hinzupipettiert und für zwanzig Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Medien abgesaugt und mit Trypanblau gefärbt.

Staurosporin (STS) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst (Stocklösung: 200 µM), aliquotiert und bei minus 20°C gelagert. Zur Behandlung der Neurone am achten bzw. dreizehnten Kulturtag wurden 1 µl STS-Stocklösung je ml Neurobasalmedium (37°C) verdünnt und dann mit dieser Lösung ein Medienwechsel durchgeführt.

Daraus ergab sich eine STS-Endkonzentration von 200 nM

Die Behandlung erfolgte nach dem oben genannten Schema für jeweils vierundzwanzig Stunden (Inkubation bei 37°C/5% CO₂).

Sauerstoff-Glukoseentzugsschädigung (OGD)

Durch den Sauerstoff-Glukose-Entzug konnte eine Ischämie in vitro simuliert werden. Es kommt hierbei, sowohl zur Nekrose als auch zur Apoptose der Nervenzellen. Entwickelt wurde dieses Modell Ende der Achtziger Jahre durch den Arbeitskreis um Choi (Goldberg und Choi, 1990) an neuronalen kortikalen Kulturen und wurde später auch an anderen Neuronenpopulationen angewendet (Bruer et al., 1997).

Die Begasung der Medien (Locke´s mit und ohne Glukose) mit CO₂ und N₂ im Verhältnis 1:20 erfolgte unter sterilen Bedingungen (Laminar Flow Werkbank) für mindestens fünfzehn Minuten (pH ↓ ~ 7,1 - 7,2). Eingeleitet wurde das Gas-

gemisch über einen Schlauch, der mit Hilfe einer Klemme an einer Teleskop-Stange befestigt wurde und an dessen Ende sich eine sterile Pasteur-Pipette befand, die direkt in das Medium eingetaucht wurde. Nach frühestens fünfzehn Minuten wurde die Begasung beendet, die Medien fest verschlossen und in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt. Unter einem Laminar Flow wurde mit der Behandlung der einzelnen Gruppen begonnen. Bereits behandelte Gruppen wurden in eine Kunststoff-Kammer gestellt, die seitlich Öffnungen besaß, die jeweils durch ein Ventil verschlossen werden konnten. Für die Zeit während der Behandlung weiterer Gruppen wurden bereits behandelte Gruppen unter oben genannten Bedingungen begast, indem das Gasgemisch bei geöffneten Ventilen durch die Kammer strömte. Waren alle Gruppen behandelt, so wurde das Gasgemisch noch kurzzeitig weiter in die Kammer eingeleitet und die Kammer mit Hilfe eines Textil-Klebebandes luftdicht abgedichtet. Dann wurden die seitlichen Ventile geschlossen. Die Kammer wurde in den Brutschrank (5% CO₂, 37°C) gestellt und zwei bzw. vier Stunden inkubiert.

Die Öffnung der Kammer und der Medienwechsel mit frischem Neurobasalmedium erfolgte nach zwei, bzw. vier Stunden. Es folgte die weitere Inkubation der Kultur (ohne Kammer) unter Brutschrank-Bedingungen (5% CO₂, 37°C) bis zur Färbung der Kultur.

Die Trypanblau-Färbung erfolgte vierundzwanzig Stunden nach Beginn der Behandlung (s.u.).

Materialien für Begasungsapparatur:

- Kohlendioxid und Stickstoffflasche
- Gummischlauch mit Kunststoff-Verbindungsstücken
- Halterung (Teleskop-Stange) und Klemmen zur Befestigung des Schlauches
- Pasteurpipetten (steril) zum Einleiten des Gasgemisches in die Medien
- Kunststoff-Kammer mit seitlichen Ventilen
- Textil-Klebeband

2.5 Bestimmung der geschädigten Zellzahl

2.5.1 Färbung der Zellkulturen

Die Anzahl der geschädigten Neurone wurde mit Hilfe der sogenannten Farbausschlussmethode (Paul, 1975) bestimmt. Verwendet wurde hierfür der Farbstoff Trypanblau. Dieser Methode liegt zugrunde, dass der hinzugegebene Farbstoff die gesunden Zellen mit intakter Zellmembran nicht durchdringen kann und diese somit nicht anfärbt. Sie erscheinen unter dem Mikroskop transparent. Nur Zellen, die geschädigt sind, nehmen den Farbstoff auf, dessen Anionen dann an Zellproteine binden und die Zellen als geschädigt kennzeichnen. Das bedeutet, dass nur abgestorbene (nekrotische) Zellen durch den Farbstoff angefärbt und somit unter dem Mikroskop erfasst werden können.

Trypanblau-Färbung

Trypanblau-Lösung

Trypanblau	400 mg
NaCl	810 mg
K ₂ HPO ₄	60 mg
H ₂ O ad 100 ml	

PBS-Lösung

KH ₂ PO ₄	1,06 mM
NaCl	154,0 mM
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	4,47 mM

Vierundzwanzig Stunden nach Beginn der Behandlung wurde die Kultur gefärbt. Die Trypanblau-Lösung wurde für kortikale Kulturen 1:8 (0,05%) mit Neurobasal verdünnt, für hippokampale Kulturen nicht verdünnt (0,4%) und im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Mit einer Pipette und Pumpe wurde das Neurobasalmedium jeweils von den Petrischalen abgesaugt und mit einer Einweg-Pipette die Färbelösung (für 96er Mikrotiter-Platten 200 µl/Well; für 24er Mikrotiter-Platten 1 ml/Well und für 35er Petrischalen ebenfalls 1 ml/Schale) zügig hinzugegeben. Darauf folgte eine Inkubationszeit von fünfzehn Minuten im Brutschrank bei 37°C/5% CO₂. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Kulturgefäße dreimal mit

Phosphate buffered saline (PBS) gewaschen und zur mikroskopischen Auszählung mit Formalinpuffer (4%) fixiert. Die Aufbewahrung erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C in einer luftundurchlässigen Box. Zur photometrischen Messung wurde die Kultur mit Natriumdodecyl-Sulfat (SDS, 1%) lysiert. Dafür wurde in jede 35er Schale 200 µl SDS-Lösung pipettiert und mit Hilfe eines kleinen Schabers die Zellen vom Boden der Petrischale gekratzt. Vor Überführung in Zentrifugen-Röhrchen wurde kurz mit einer Eppendorf-Pipette trituriert und dann die 200 µl komplett für jede Schale separat in jeweils ein Röhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden bei 13000 Upm für zehn Minuten zentrifugiert und für die Messung bei 570 nm 150 µl des Überstands in eine 96-well-Platte pipettiert. Für die photometrische Messung bei 590 nm wurde der SDS-lysierte Inhalt der einzelnen Petrischalen innerhalb einer Gruppe zusammenpipettiert, dann zentrifugiert (s.o), in spezielle Photometer-Glas-Küvetten gegeben und somit pro Gruppe nur ein Wert bestimmt.

2.5.2 Photometrische Messung

Ein Teil des mit SDS lysierten Inhalts der Kulturgefäße wurde unter Einhaltung der Reihenfolge der einzelnen Gruppen in ELISA-Platten pipettiert. Diese wurden dann in einem Photometer bei 570 nm Wellenlänge vermessen. Die Vermessung bei einer Wellenlänge von 590 nm erfolgte an einem Photometer, für die die Proben in eine spezielle Glasküvette überführt wurden. Das Absorptionsmaximum für Trypanblau liegt bei 580 nm. Angegeben wurde die Schädigung in Absorptionswerten (absolute Werte), bzw. prozentual bezogen auf den Wert der höchsten Schädigung (relative Werte).

2.5.3 Auszählung der Kulturen

Unter einem inversen Mikroskop (Diavert, Leitz, Wetzlar) erfolgte im Hellfeld mit 200-facher Vergrößerung unter zu Hilfenahme eines Zählquadrates die Auszählung, die pro 35er Schale eine Gesamtzahl von hundert bis hundertzwanzig Zellen umfasste. Angegeben wurde die Schädigung in Prozent trypanblau gefärbter Zellen in Relation zur Gesamtzahl der gezählten Neurone.

2.6 Statistik

Der statistische Vergleich der Mittelwerte erfolgte mittels ANOVA-Varianzanalyse und anschließendem Test auf Signifikanz nach Scheffé. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus n Versuchen angegeben.

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt dargestellt:

Signifikanzniveau (p)	Symbol
<0,05	*/#
<0,01	**/##
<0,001	***/###

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich unterschiedlicher Wellenlängen der photometrischen Messung zur Bestimmung der geschädigten Zellzahl

Mit dem Farbstoff Trypanblau gefärbte Kulturen wurden photometrisch vermessen. Es wurde untersucht, ob sich zwischen den Absorptionswerten des Farbstoffes Trypanblau bei unterschiedlichen Wellenlängen Differenzen ergeben. Jeweils ein 24er-Well der Kultur wurde bei 570 nm (Plattenphotometer) und 590 nm gemessen und die Ergebnisse miteinander verglichen. Zwischen den Absorptionswerten beider Messreihen wurde kein signifikanter Unterschied gefunden. In Abbildung 1(a) sind die Ergebnisse in absoluten Werten angegeben, in Abbildung 1(b) in Relation zum höchsten Mittelwert gesetzt, der mit 100% festgelegt wurde. Weitere Ergebnisauswertungen erfolgten dann mit Hilfe des Plattenphotometers bei 570 nm.

Abb. 1: Vergleich der Messergebnisse bei einer Wellenlänge von 570 nm und 590 nm.

Abb. 1(a)

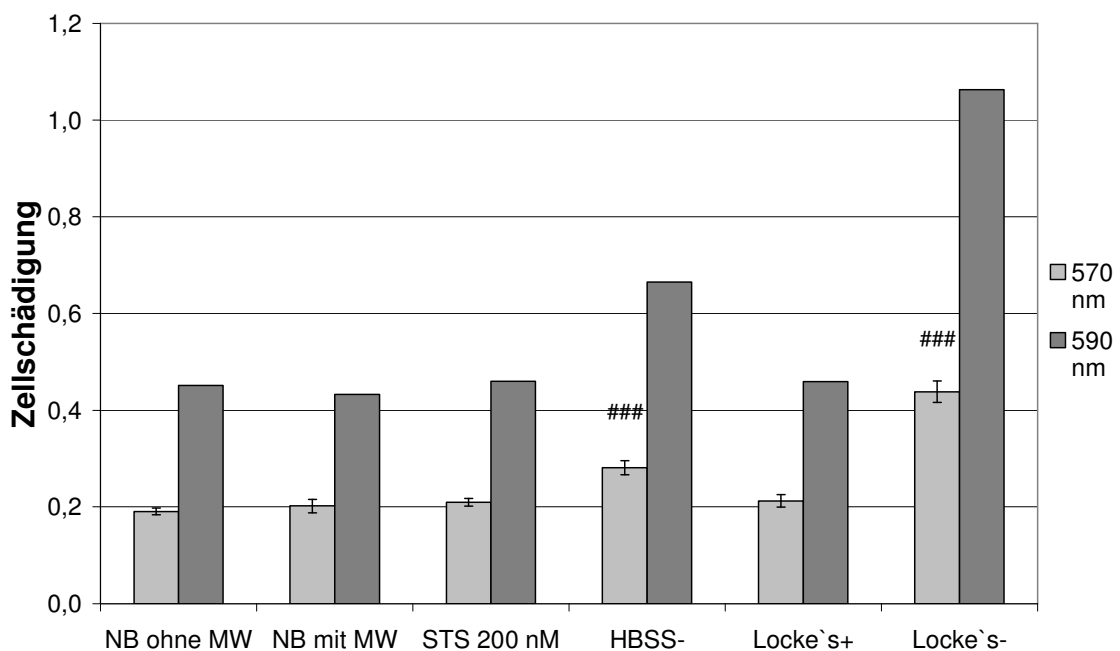


Abb. 1(b)

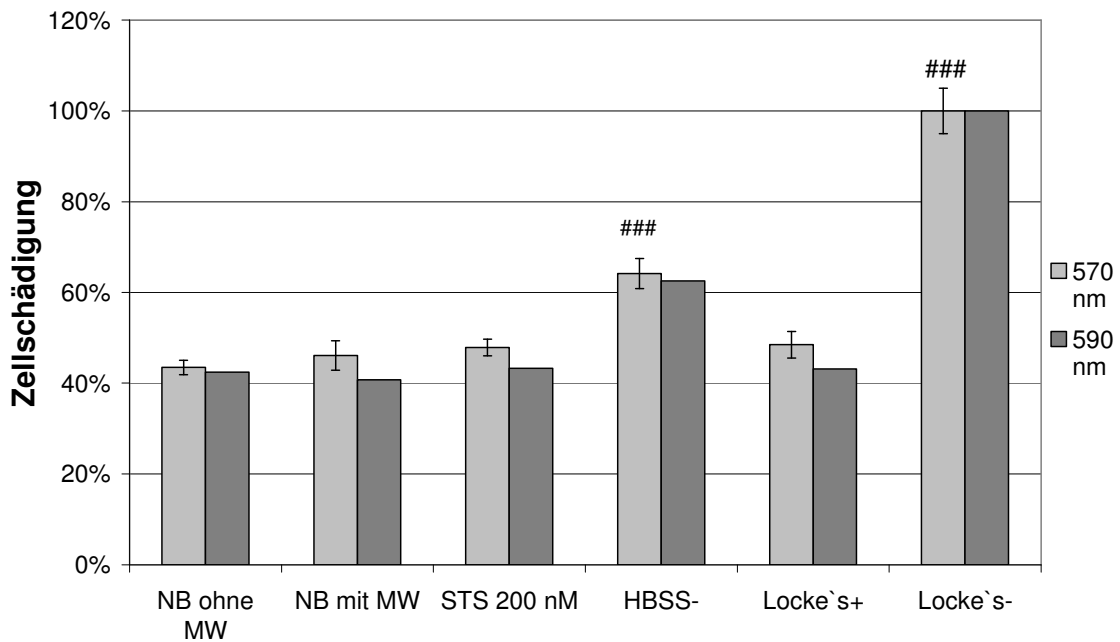


Abb. 1: Embryonale kortikale Kultur (CC 17/10), 24er-Well, 8 Tage in Kultur, Glukoseentzug und Staurosporinschädigung (200 nM, STS), Trypanblaufärbung. ### $p < 0,001$ im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Dargestellt sind bei 570 nm die Mittelwerte mit Standardabweichung aus $n=4$ /Gruppe, bei 590 nm sind Messwerte aus vereinigten Proben aus $n=4$ Versuchen dargestellt. Kontrollen enthielten Neurobasalmedium (NB). HBSS= Hank's balanced salt solution. Locke's +/- = Locke's-Medium mit bzw. ohne Glukose. **(a):** Die Angabe der Werte erfolgte in absoluten Zahlen. **(b):** Die Angabe der Werte erfolgte in Relation zum höchsten Mittelwert.

3.2 Vergleich von 8 und 13 Tage alten Zellkulturen

Es wurde eine Kultur nach der Präparation in zwei 24er Wells ausgesät und diese einmal nach acht und einmal nach dreizehn Tagen in identischer Weise durch Glukose- und Wachstumsfaktorentzug und Zugabe von Staurosporin über vierundzwanzig Stunden geschädigt (Abb. 2). Die Ergebnisse dieser Kulturen unterschiedlichen Alters wurden daraufhin miteinander verglichen. Es galt das für die Schädigungsmodelle geeigneteres Alter der Zellen festzulegen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kulturen. Lediglich die mit Locke's+ inkubierte Gruppe zeigte bei der älteren Kultur eine etwas höhere Schädigung. Beide Kulturen waren geeignet, um die Effekte der Behandlung deutlich zu zeigen. Der Glukoseentzug zeigte den deutlichsten Schaden.

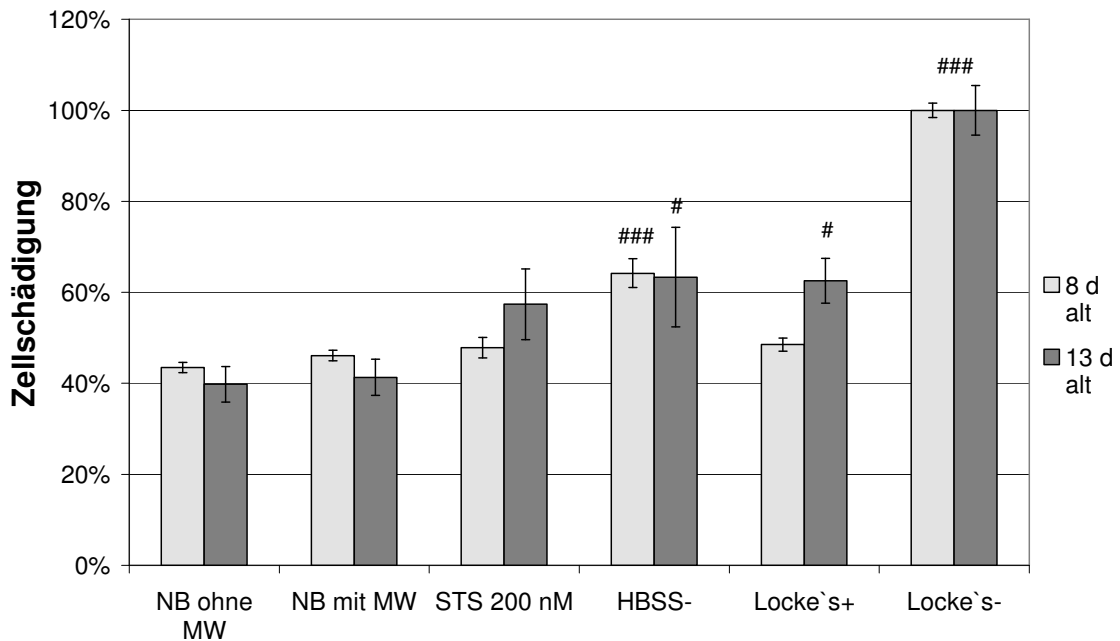


Abb. 2: Vergleich von 8 und 13 Tage alten Zellkulturen. Embryonale kortikale Kultur (CC 17/10), 24-er Well, **hellgrau 8 Tage in Kultur, dunkelgrau 13 Tage in Kultur**, Glukoseentzug, Trypanblau-Färbung, photometrische Messung bei 570 nm. ### $p < 0,001$ im Vergleich zu den Kontrollgruppen, # $p < 0,05$ im Vergleich zu den Kontrollgruppen, NB ohne/mit MW=Neurobasalmedium ohne/mit Medienwechsel, Locke's+/-=Locke's-Medium mit und ohne Glukose. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus $n=4$ /Gruppe.

3.3 Vergleich von photometrischer Messung und Zählung der geschädigten Zellen

Eine über vierundzwanzig Stunden durch Staurosporin (200 nM) und Glukoseentzug mit Wachstumsfaktorenentzug geschädigte Nervenzellkultur wurde zunächst unter dem Mikroskop ausgezählt und direkt im Anschluss mit SDS lysiert und photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen (Abb. 3). Bis auf die Kontrollgruppe mit Medienwechsel (MW) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Messmethoden. Die Standardabweichungen der Ergebnisse, die durch Auszählung ermittelt wurden, waren geringer als die, die durch photometrische Messung bestimmt wurden.

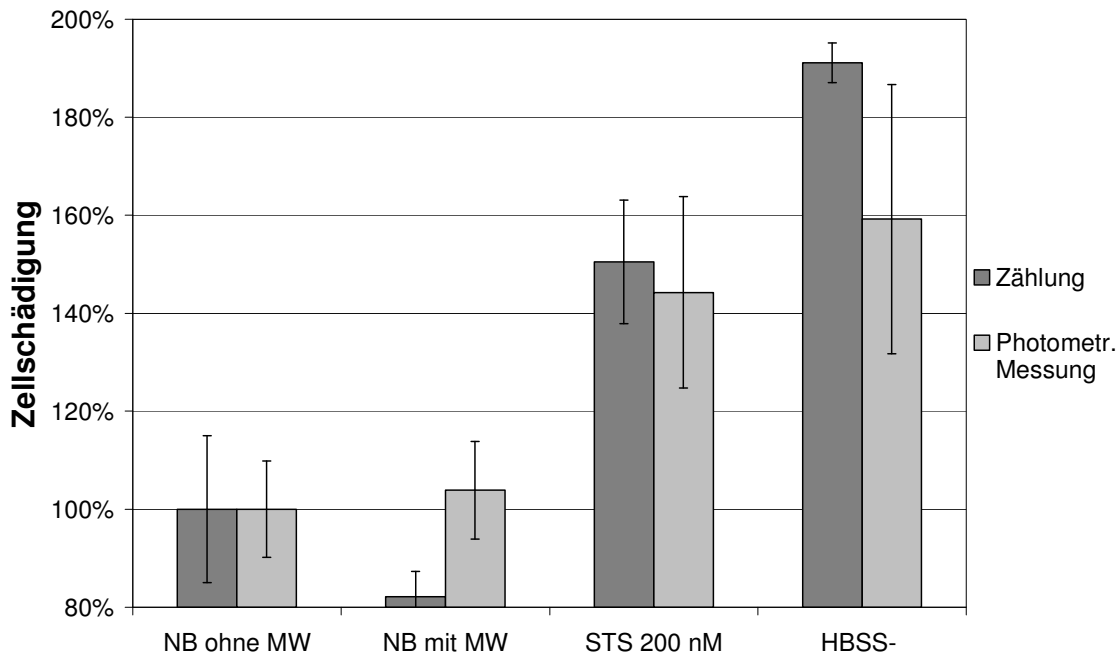


Abb. 3: Vergleich der photometrischen Messung gegen die Auszählung der geschädigten Zellzahl, Glukoseentzug und Staurosporinschädigung (STS). Embryonale kortikale Kultur (CC 17/10), 24-er Well, 13 d in Kultur, Trypanblau-Färbung, Photometrische Messung bei 570 nm, NB ohne/mit MW=Neurobasalmedium ohne/mit Medienwechsel, HBSS-=Hank's balanced salt solution ohne Glukose. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus n=4/Gruppe.

3.4 Untersuchungen an verschiedenen Schädigungsmodellen

Zur Untersuchung der Auswirkungen verschiedener schädlicher Einflüsse auf eine Neuronenzellpopulation wurden unterschiedliche Modelle herangezogen. Zunächst wurden Modelle ohne die Zugabe von neuroprotektiven Substanzen getestet, dann wurden die Modelle erweitert und durch die Zugabe neuroprotektiver Substanzen ergänzt.

Es sollte gezeigt werden, inwieweit unterschiedliche Substanzen die Anzahl geschädigter Zellen in verschiedenen Schädigungsmodellen senken können. Verwendet wurden der NMDA-Antagonist Dizocilpin (MK 801), das β_2 -Sympatomimetikum Clenbuterol, der nichtkompetitive NMDA-Antagonist Memantine und Pifithrin (PFT), ein p53-Antagonist. Memantine und Clenbuterol wurden einzeln und in Kombination untersucht.

3.4.1 Glutamatschädigung

Glutamat führt als exzitatorischer Neurotransmitter zu einer nekrotischen Schädigung der Neurone. Die Höhe der Schädigung war abhängig von der Dauer der Einwirkzeit des Glutamats auf die Zellkultur (eine Stunde und vierundzwanzig Stunden mit Glutamat 1 mM). Über einen Zeitraum von vierundzwanzig Stunden schädigte Glutamat (1 mM) die Kultur signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 4).

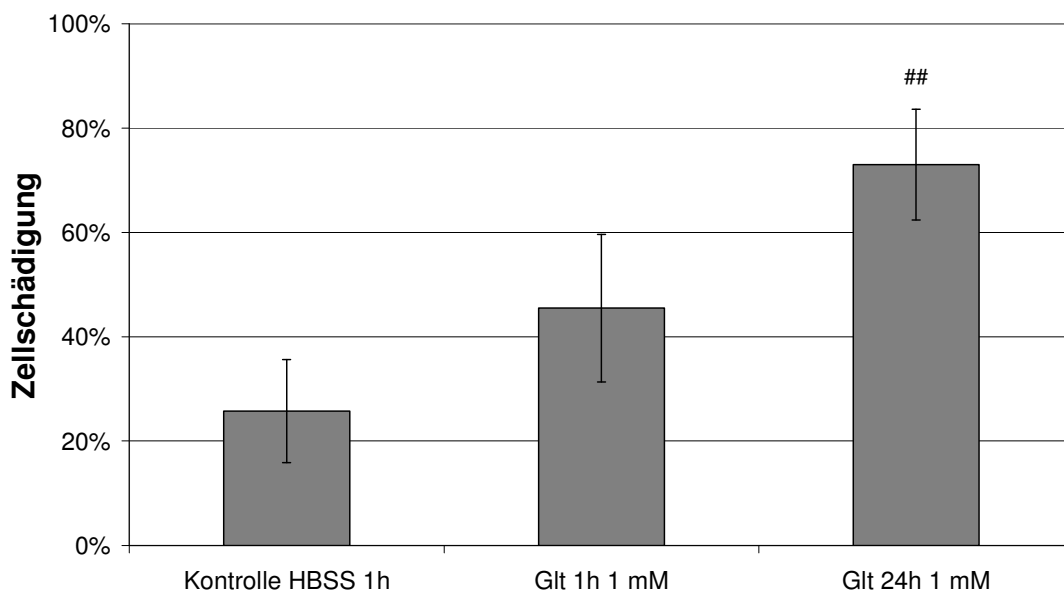


Abb. 4: Glutamatschädigung (Glt, 1 mM). Embryonale hippokampale Kultur (HC 24/10), 24-er Multiwell, 13 Tage in Kultur, Trypanblau-Färbung, Zählung. ^{##} $p < 0,01$ im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus $n=4$ /Gruppe.

3.4.2 Glukoseentzug und Staurosporinschädigung

Die Schädigung der Zellen durch Glukoseentzug und Staurosporin (STS) stellte den Vorläufer-Versuch zum Sauerstoff-Glukose-Entzug dar, der sowohl zum apoptotischen; als auch nekrotischen Untergang der Zellen führt. Staurosporin verursacht als Inhibitor der Proteinkinase C überwiegend eine apoptotische, Glukoseentzug eine nekrotische und apoptotische Zellschädigung. Die Inkubation mit den Behandlungslösungen erfolgte in jeder Gruppe über vierundzwanzig Stunden. Als Kontrollgruppen wurden zum einen Zellen verwendet, deren Neurobasalmedium zu Beginn der Behandlung noch einmal ausgetauscht wurde, zum anderen Zellen, deren Neurobasalmedium nicht erneuert wurde. Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen. Der alleinige Ent-

zug von Wachstumsfaktoren schädigte die Zellen signifikant im Vergleich zu den Kontrollen. Der Entzug von Wachstumsfaktoren und Glukose (Gruppe Locke's-) führte zu einer deutlich signifikanten Schädigung der Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Abb. 5).

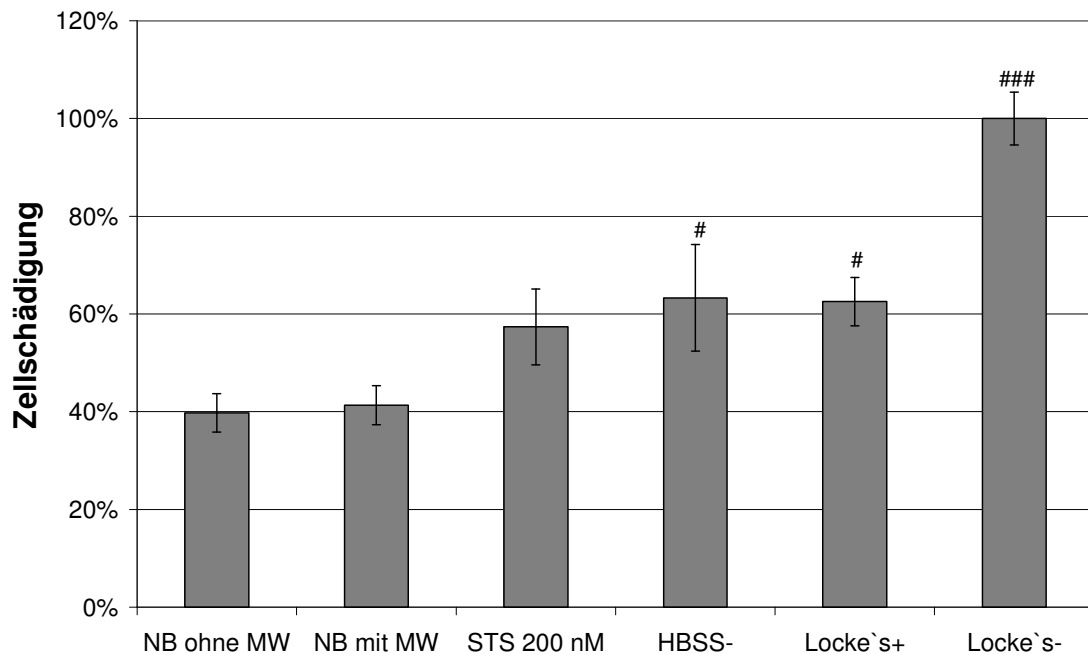


Abb. 5: Effekte von Glukoseentzug und Staurosporinschädigung (STS, 200 nM). Embryonale kortikale Kultur (CC 17/10), 24-er Multiwell, Glukoseentzug, Staurosporinschädigung, 13 Tage in Kultur, Trypanblau-Färbung, photometrische Messung bei 570 nm. **HBSS-** und **Locke's+**: Wachstumsfaktorentzug; **Locke's-**: Entzug von Wachstumsfaktoren und Glukose. ### $p < 0,001$ im Vergleich zu den Kontrollgruppen, # $p < 0,05$ im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus $n=4$ /Gruppe.

3.4.3 Sauerstoff-Glukoseentzug

Den Zellen wurde für zwei und vier Stunden Sauerstoff und Glukose entzogen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Zwei- und Vierstunden-Werten, die Tendenz der höheren Schädigung bei vier Stunden Inkubationszeit ist dennoch zu erkennen (Abb. 6). Die jeweiligen Kontrollen stellen die beiden Gruppen dar, denen für die entsprechende Zeit Sauerstoff zur Verfügung stand und die glukosehaltigen Locke's-Medium ausgesetzt waren.

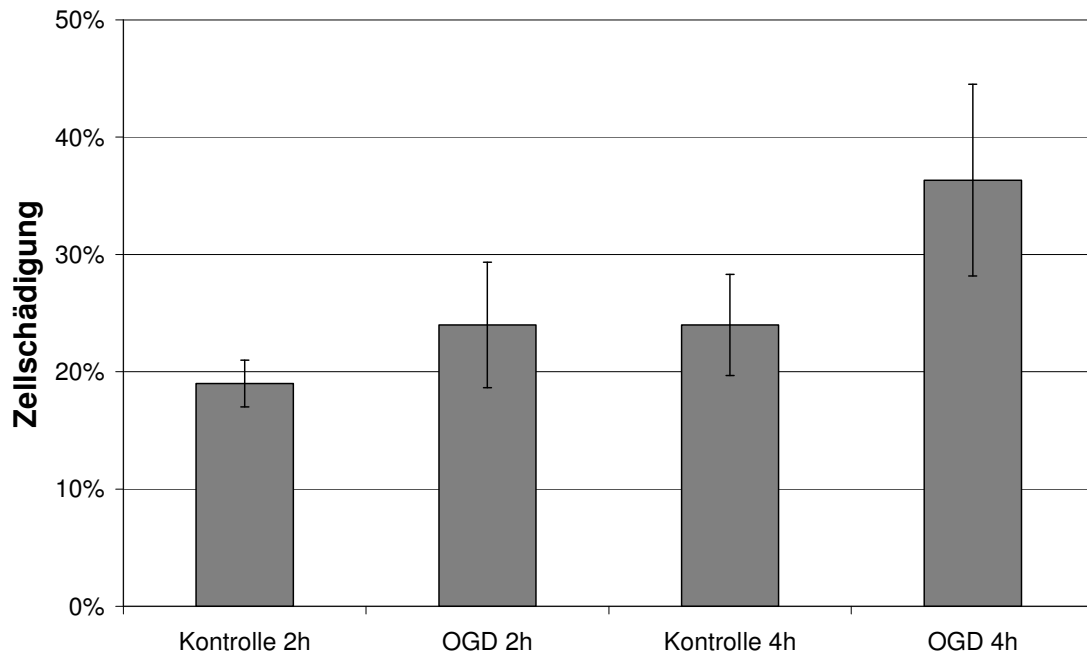


Abb. 6: Sauerstoff-Glukoseentzug (OGD). Embryonale hippokampale Kultur (HC 14/11), 35-er Schalen, 8 Tage in Kultur, Trypanblau-Färbung, Zählung. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus n=3/Gruppe.

3.5 Effekte von Dizocilpin

3.5.1 Effekt von Dizocilpin nach Glutamatschädigung

Der NMDA-Antagonist Dizocilpin (MK 801) wurde in einer Konzentration von 10 μM eine Stunde vor Behandlungsbeginn in die entsprechenden Kulturgefäße hinzupipettiert. Die Inkubation mit dem schädigenden Agens Glutamat erstreckte sich über den Zeitraum von einer Stunde. Es folgte eine Nachbehandlung mit MK 801 (10 μM) über vierundzwanzig Stunden bis zur Färbung der Kultur. Die Behandlung der Zellen mit Glutamat in einer Konzentration von 500 μM führte zu einer deutlich signifikanten Schädigung, die mit MK 801 auf das Schädigungsniveau der Kontrollgruppen gesenkt werden konnte (Abb.7). In einem weiteren Versuch wurde untersucht, inwiefern sich Unterschiede in Abhängigkeit der Konzentration von Glutamat ergeben. Eine Konzentration von 1 mM führte zu keiner höheren Schädigung der Zellen. Der protektive Effekt von MK 801 zeigte sich bei der Schädigung mit Glutamat sowohl in der niedrigen, als auch in der höheren Konzentration deutlich signifikant und senkte die Zellschädigung in beiden Konzentrationen gleichermaßen auf das Niveau der Kontrollgruppe (Abb. 8).

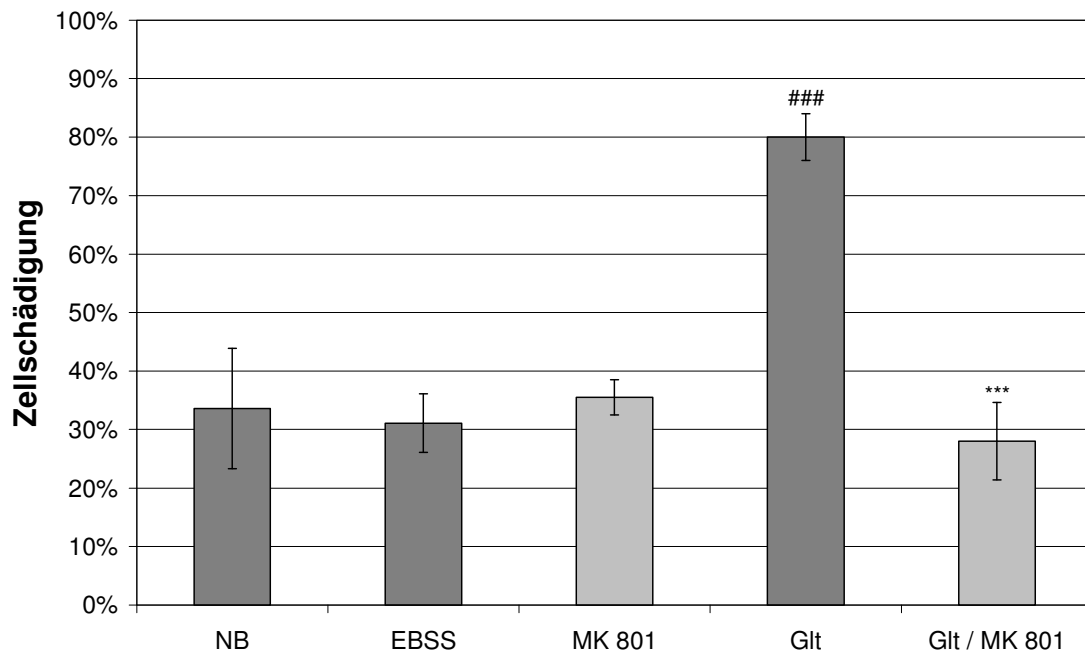


Abb. 7: Effekt von Dizocilpin (MK 801, 10 μM) nach Glutamatschädigung (Glt, 500 μM). Postnatale hippocampale Kultur, 14 Tage in Kultur, Trypanblaufärbung 24 Stunden nach Behandlung mit Glutamat, Zählung. ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur glutamatgeschädigten Kontrollgruppe. NB=Neurobasalmedium, EBSS=Earle's balanced salt solution. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus $n=4$ /Gruppe.

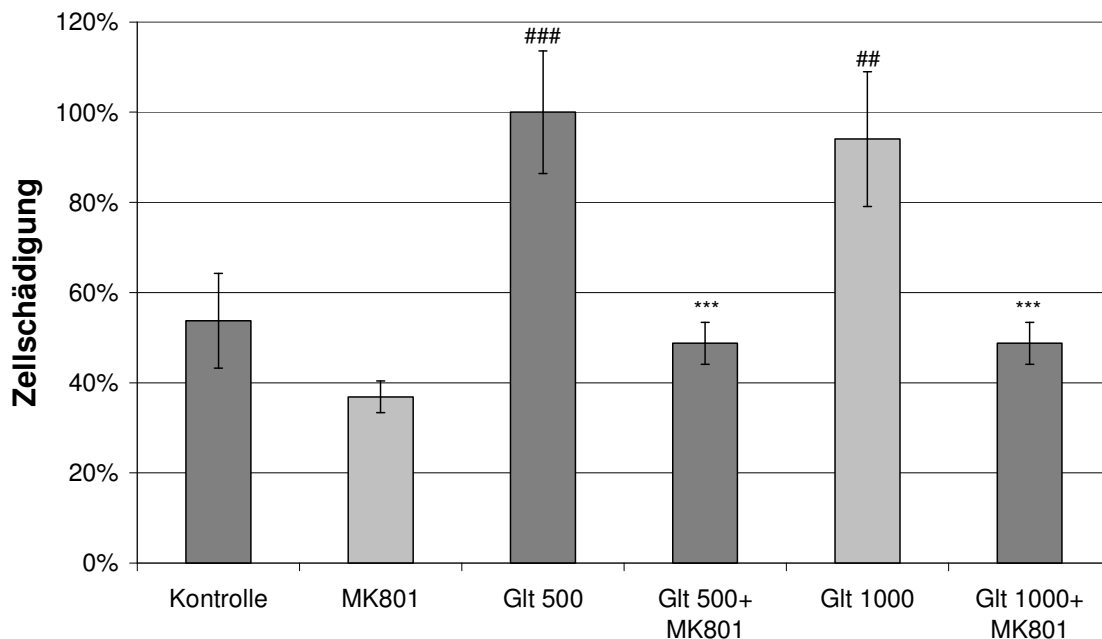


Abb. 8: Effekt von Dizocilpin (MK 801, 10 μM) nach Glutamatschädigung (Glt, 500 μM , 1000 μM). Embryonale kortikale Kultur, 14 Tage in Kultur, Trypanblaufärbung 24 Stunden nach Behandlung mit Glutamat, photometrische Messung bei 570 nm. ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe, ## $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Glutamatsgeschädigten Kontrollgruppe. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus $n=4$ /Gruppe.

3.5.2 Effekt von Dizocilpin nach NMDA-Schädigung

Der NMDA-Antagonist MK 801 wurde in einer Konzentration von 10 μM eine Stunde vor Behandlungsbeginn in die entsprechenden Kulturgefäße hinzupipetiert. NMDA wurde in drei unterschiedlichen Verdünnungen mit EBSS angesetzt und für den Zeitraum von einer Stunde den zu behandelnden Gruppen hinzugefügt. Die Kontrollgruppen enthielten Neurobasal, bzw. EBSS. Zum Ende der Behandlung wurde Neurobasalmedium hinzugegeben und die entsprechende Gruppe mit MK 801 (10 μM) über 24 Stunden bis zur Färbung der Kultur nachbehandelt. Es zeigte sich bei einer Konzentration von 100 μM NMDA die stärkste Schädigung der Zellen, während eine Konzentration von 300 μM zu einer geringeren Schädigung der Zellen führte. MK 801 hatte einen deutlichen neuroprotektiven Effekt und senkte die Schädigung nahezu auf das Niveau der Grundschädigung von Neurobasalmedium (100%, nicht dargestellt, Abb. 9).

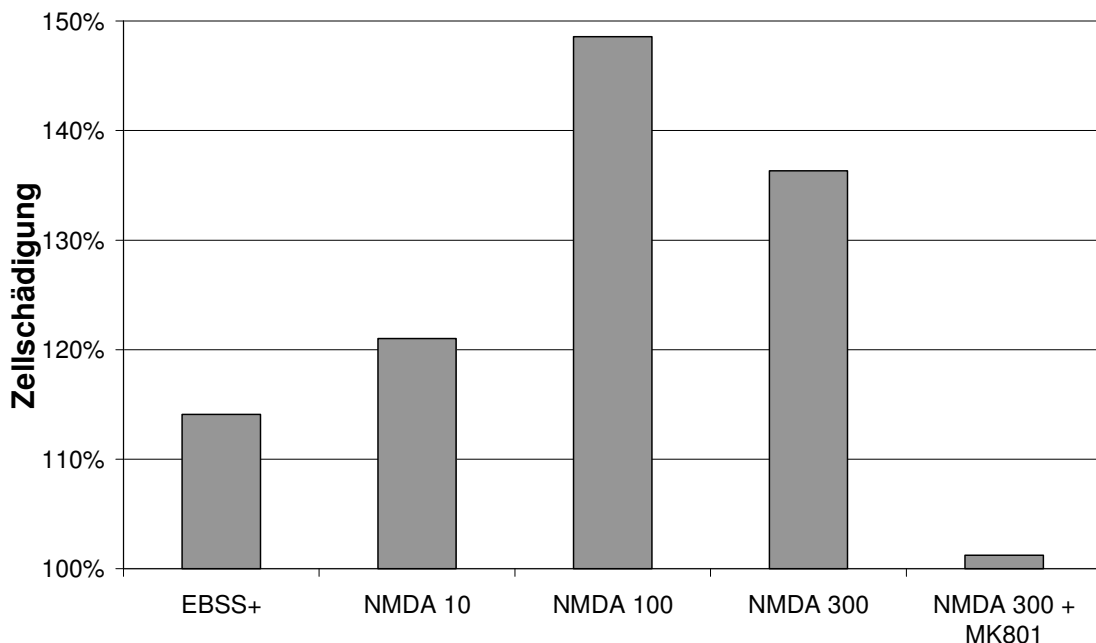


Abb. 9: Effekt von Dizocilpin (MK 801, 10 μM bis 300 μM) bei NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Schädigung. Embryonale hippocampale Kultur (HC 03/04), 35-er Schalen, 14 Tage in Kultur, Trypanblau-Färbung, photometrische Messung bei 570nm. Es sind Messwerte aus vereinigten Proben aus n=6 Versuchen dargestellt.

3.5.3 Effekt von Dizocilpin bei Sauerstoff-Glukose-Entzug

In die jeweiligen Kulturgefäße wurde eine Stunde vor Behandlungsbeginn der NMDA-Rezeptorantagonist MK 801 in einer Konzentration von 10 μM hinzu pipettiert und die Kultur im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe der neuroprotektiven Substanz in die mit Stickstoff und Kohlendioxid begasten und somit an Sauerstoff armen Medien, erfolgte vier Stunden die Inkubation im Brutschrank. Im Anschluss wurde der Kultur wieder Neurobasalmedium hinzugefügt und die Nachbehandlung mit MK 801 durchgeführt, welches bis zur Färbung in den Kulturgefäßen verblieb. Vierundzwanzig Stunden nach Behandlungsbeginn wurde die Kultur mit Trypanblau gefärbt (Abb.10). Der reine Glukoseentzug (EBSS-) schädigte die Kultur signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Behandlung mit dem NMDA-Rezeptorantagonisten MK 801 führte unter diesen Bedingungen dazu, dass die Anzahl der geschädigten Zellen auf Kontrollniveau gesenkt wurde. Die Kombination aus Sauerstoff- und Glukoseentzug führte erwartungsgemäß zu einer hohen Schädigung, die deutlich signifikant über der Schädigung der Kontrollgruppe lag. MK 801 konnte auch hier die Schädigungsrate auf Kontrollniveau senken. Die höchste Rate an geschädigten Neuronen wurde durch alleinigen Sauerstoffentzug erreicht.

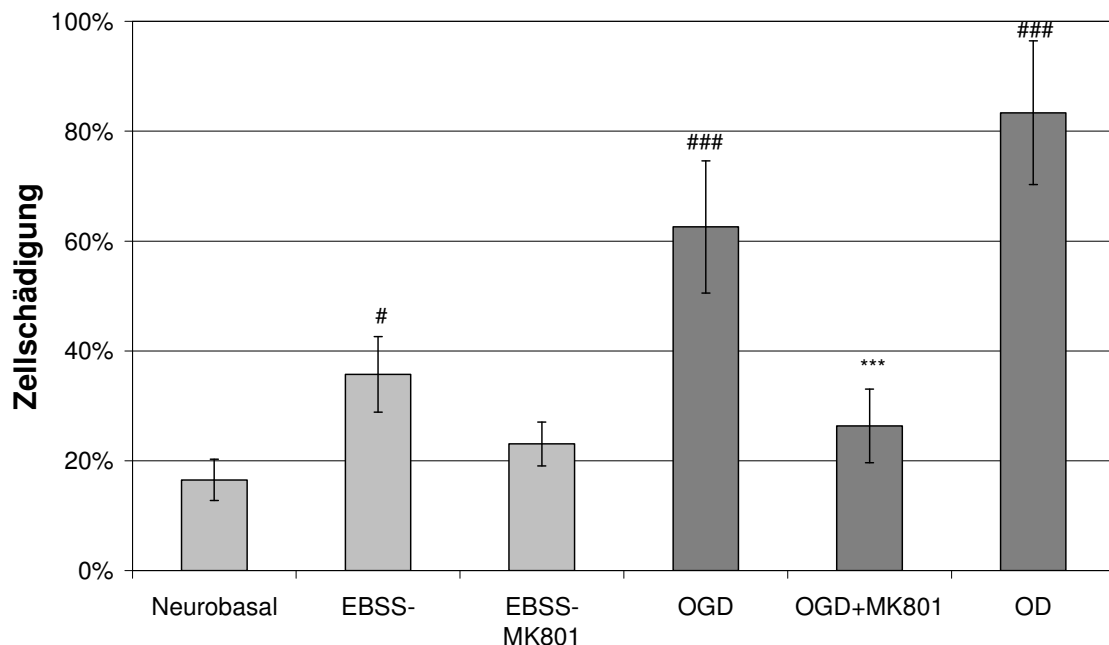


Abb. 10: Effekt von Dizocilpin (MK 801, 10 μM) bei Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD) (vier Stunden). Embryonale hippocampale Kultur, 14 Tage in Kultur, Trypanblaufärbung 24 Stunden nach Behandlung, Zählung. # $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe, ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur OGD-geschädigten Gruppe, OD=Sauerstoffentzug. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus $n=4$ /Gruppe.

3.6 Effekt von Memantine

Der NMDA-Antagonist Memantine wurde in vier unterschiedlichen Konzentrationen eine Stunde vor Behandlungsbeginn in die Kulturgefäße hinzupipettiert. Von vier Kontrollgruppen enthielten drei glukosehaltige Locke's-Lösung, zwei davon mit Memantine-Zusatz in unterschiedlichen Konzentrationen. Eine Kontrollgruppe enthielt Neurobasal-Medium. Die Inkubation der Kultur unter Entzug von Sauerstoff und Glukose erfolgte für zwei Stunden, danach wurde Neurobasal hinzu gegeben und zur Nachbehandlung die nötige Konzentration Memantine in die entsprechenden Kulturgefäße hinzugegeben. Vierundzwanzig Stunden nach Behandlungsbeginn wurde die Kultur mit Trypanblau gefärbt.

Die Konzentration von 1 nM Memantine führte im vorliegenden Sauerstoff-Glukose-Entzug zu keinerlei neuroprotektivem Effekt. Die höchste Konzentration Memantine von 1000 nM bewirkte eine nicht signifikante Verringerung des Anteils trypanblau gefärbter Zellen auf Grundschnädigungsniveau (Abb. 11).

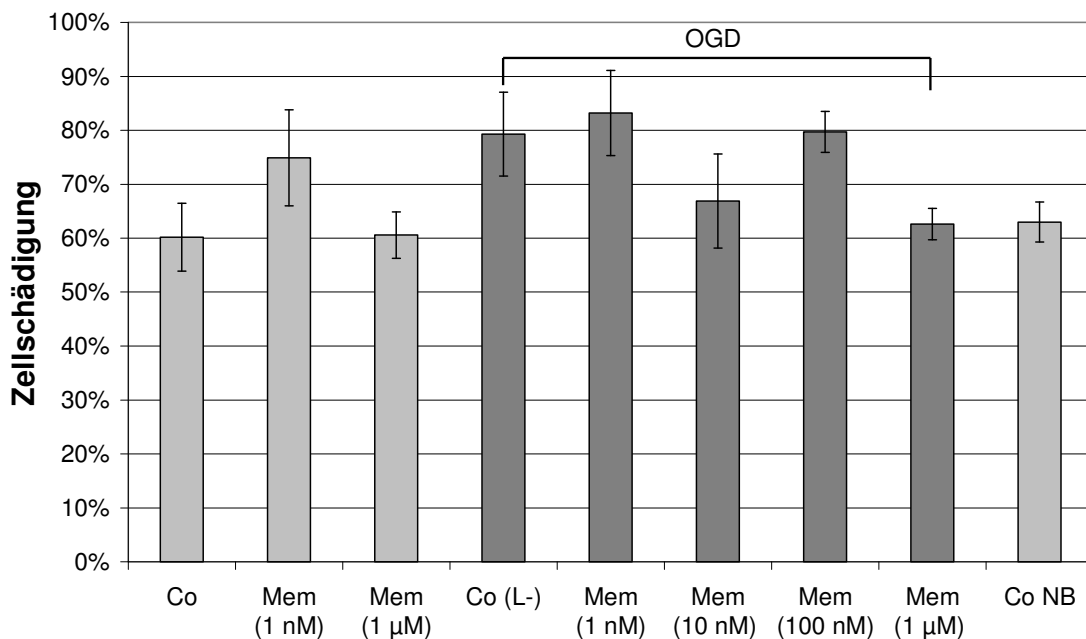


Abb. 11: Effekt von Memantine (Mem, 1 nM bis 1 µM) bei Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD). Embryonale hippokampale Kultur (HC 30/10), 35-er Schalen, 15 Tage in Kultur, Trypanblau-Färbung, Zählung. Co=Kontrolle mit Locke's+-Medium, Co NB=Kontrolle mit Neurobasalmedium, Co (L-)=Kontrolle Locke's-, Gruppen unter OGD-Bedingungen enthielten Locke's-Medium ohne Glukose (L-). Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus n=4/Gruppe.

3.7 Effekt von Pifithrin

Der Zellkultur wurde für zwei oder vier Stunden entweder nur Sauerstoff (OD) oder Sauerstoff und Glukose entzogen (OGD). Der isolierte Entzug von Sauerstoff für einen Zeitraum von zwei Stunden führte zu keiner signifikanten Schädigung gegenüber der Kontrolle. Pifithrin konnte in einer Konzentration von 100 nM weder die Schädigung in der Gruppe, die dem Sauerstoffmangel für zwei Stunden ausgesetzt war, noch die Schädigung der Gruppe, die für vier Stunden dem Sauerstoffmangel ausgesetzt war, reduzieren. Die Kombination aus Sauerstoff und Glukose-Entzug für zwei, als auch für vier Stunden führte zu einer deutlich signifikanten Schädigung gegenüber der Kontrolle. In diesen Gruppen reduzierte Pifithrin die Schädigungsrate signifikant. In der zwei Stunden bei Sauerstoff-Glukose-Entzug geschädigten Gruppe wurde durch Pifithrin eine deutlichere Senkung der Schädigungsrate als in der vier Stunden geschädigten Gruppe erreicht (Abb. 12).

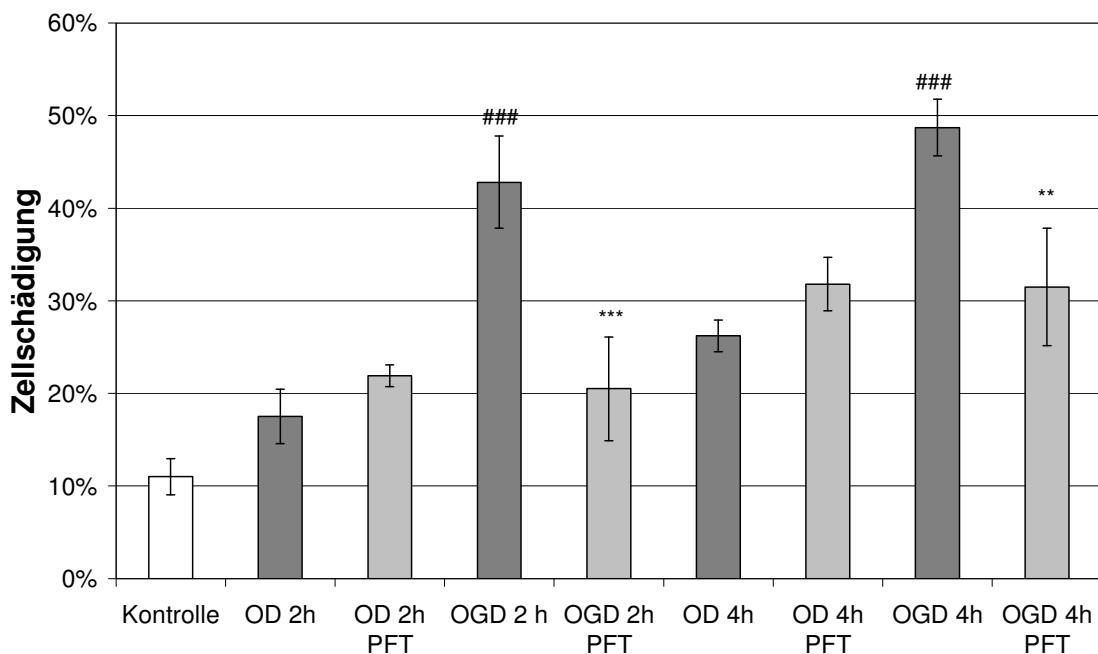


Abb. 12: Effekt von Pifithrin (PFT, 100 nM) bei Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD). Embryonale hippocampale Kultur, 2 h- und 4 h- Werte, Trypanblaufärbung, Zählung. ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zur OGD-geschädigten Gruppe, OD=Sauerstoffentzug, Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus $n=4$ /Gruppe.

3.8 Kombination von Clenbuterol und Memantine

Die Wirkstofflösungen des NMDA-Antagonisten Memantine und des β_2 -Sympatomimetikums Clenbuterol wurden fünf Stunden vor Behandlungsbeginn in einer Konzentration von jeweils 1 nM (Verdünnung in Neurobasal) in die Kulturgefäße hinzugegeben. Die entsprechenden Kulturgefäße (Abb. 13: Gruppen dunkelgrau) wurden für zwei Stunden dem Sauerstoff-Glukose-Entzug ausgesetzt. Die mit Sauerstoff-Glukose-Entzug behandelten Gruppen enthielten alle Locke's-Lösung ohne Glukose. Die vier Kontroll-Gruppen (Abb. 13: hellgraue Gruppen) enthielten alle glukosehaltige Locke's-Lösung und je nach Behandlungsgruppe die neuroprotektiven Substanzen entweder einzeln oder in Kombination. Nach zwei Stunden Behandlungszeit wurde wieder auf Neurobasalmedium gewechselt und die neuroprotektiv behandelten Gruppen mit den entsprechenden Lösungen bis zur Färbung nachbehandelt. Die Färbung mit Trypanblau erfolgte vierundzwanzig Stunden nach Beginn der Vorbehandlung. Clenbuterol und Memantine zeigten einzeln einen etwa vergleichbaren neuroprotektiven Effekt und konnten die Anzahl trypanblau gefärbter Zellen auf das Niveau der Kontrollgruppe senken. Deutlicher war das Ergebnis bei Kombination beider Substanzen. Hier zeigte sich ein additiver Effekt beider Substanzen. Die Anzahl geschädigter Zellen lag jedoch nicht signifikant unter der der Kontrollgruppe. Der additive Effekt beider Substanzen ist aber zu erkennen.

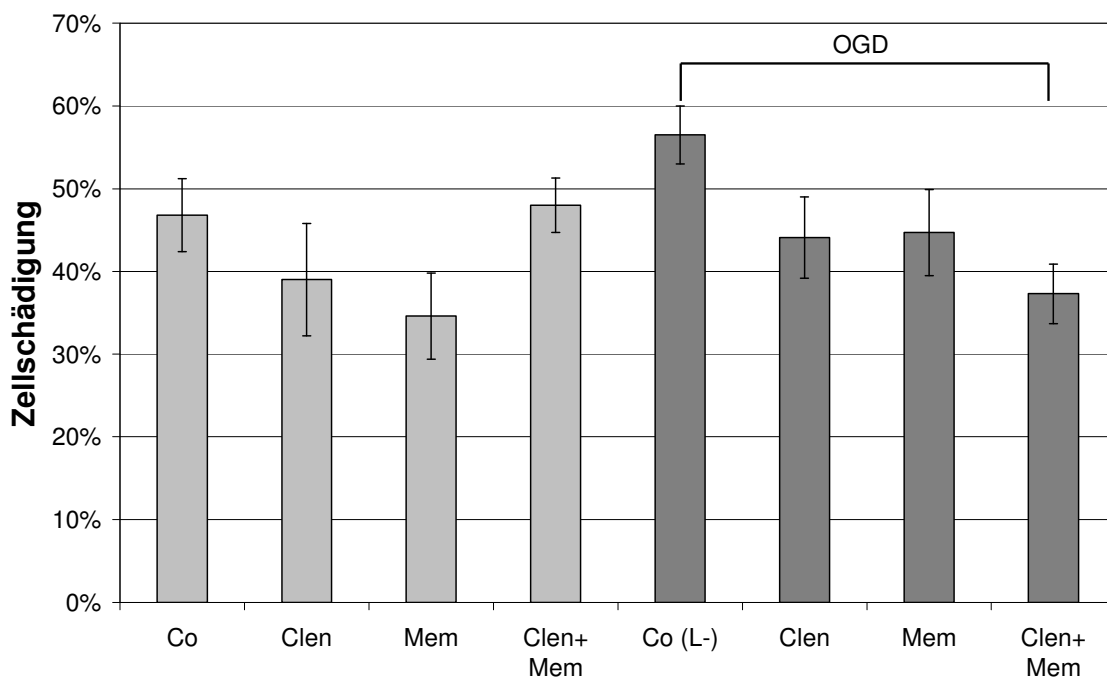


Abb. 13: Effekt von Memantine (Mem, 1 nM) und/ oder Clenbuterol (Clen, 1 nM) bei Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD). Embryonale hippocampale Kultur

(HC 28/08), 35-er Schalen, 15 Tage in Kultur, Trypanblaufärbung, Zählung. Co=Kontrolle mit Locke's+-Medium, Co NB=Kontrolle mit Neurobasalmedium, Co (L-)=Kontrolle Locke's ohne Glukose (OGD), Gruppen unter OGD-Bedingungen enthielten Locke's-Medium ohne Glukose (L-). Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus n=4/Gruppe.

3.9 Vergleich von Pifithrin und Dizocilpin

Der Kultur wurde für vier Stunden Sauerstoff und Glukose entzogen und der neuroprotektive Effekt von Pifithrin und Dizocilpin verglichen. Pifithrin wurde den Kulturgefäßen in einer Konzentration von 100 nM, Dizocilpin in einer Konzentration von 10 µM jeweils eine Stunde vor Behandlungsbeginn hinzugegeben. Pifithrin und Dizocilpin zeigten ohne Sauerstoff-Glukose-Entzug im Vergleich zu der Kontrollgruppe keinerlei neuroprotektiven Effekt. Der Sauerstoff-Glukose-Entzug führte zu einer deutlich signifikanten Schädigung der Zellen. Sowohl Pifithrin, als auch Dizocilpin führten zu einer Reduktion der geschädigten Zellzahl. Die deutlichere Senkung zeigte sich unter Dizocilpin. Der alleinige Entzug von Sauerstoff führte zu keinem hohen Zellschaden und die Schädigungsrate lag deutlich unter der des Sauerstoff-Glukose-Entzugs (Abb.14).

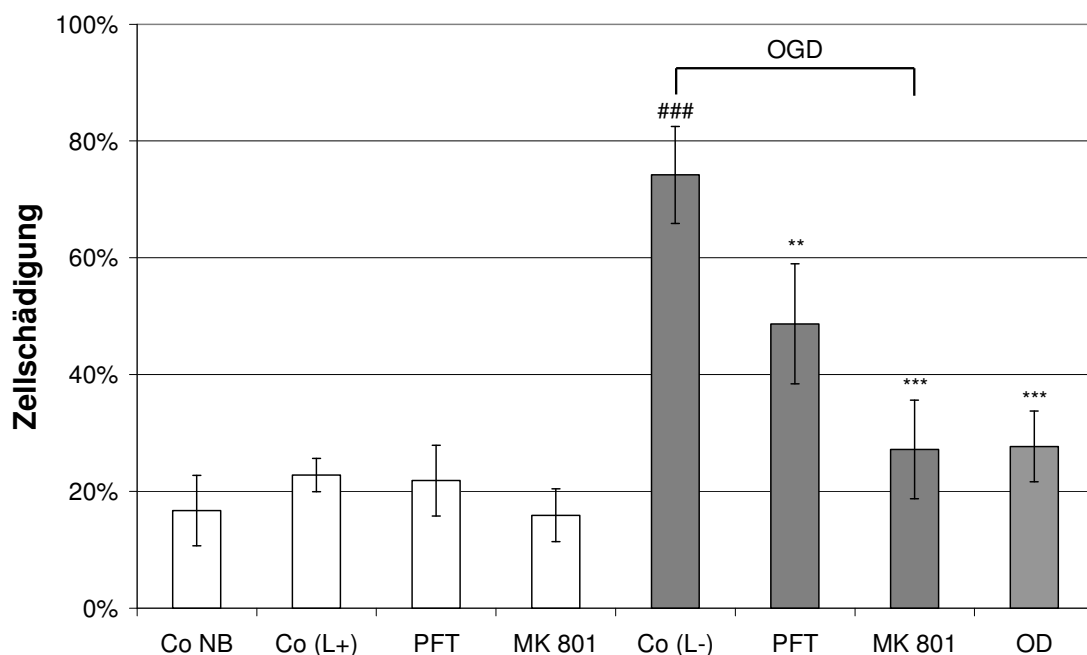


Abb. 14: Effekt von Pifithrin (PFT, 100 nM) und Dizocilpin (MK 801, 10 µM) bei Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD). Embryonale hippokampale Kultur, Trypanblaufärbung, Zählung. ###p<0,001 im Vergleich zur Kontrollgruppe, ***p<0,001, **p<0,01 im Vergleich zur OGD-geschädigten Gruppe. Co NB=Kontrolle Neurobasal, Co (L+)=Kontrolle Locke's mit Glukose, Co (L-)=Kontrolle Locke's ohne Glukose (OGD), Gruppen unter OGD-Bedingungen enthielten Locke's-Medium ohne Glukose (L-), OD=Sauerstoffentzug. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus n=5/Gruppe.

4. Diskussion

4.1 Quantitative Methoden zur Bestimmung der Zellschädigung

In der vorliegenden Arbeit wurde die photometrische Absorptionsmessung bei unterschiedlichen Wellenlängen von 570 und 590 nm zur quantitativen Bestimmung der geschädigten Zellen herangezogen. Das Absorptionsmaximum für Trypanblau liegt bei 580 nm. Beide Wellenlängen sind nach den erhobenen Messungen gleichermaßen geeignet, um die Kulturen quantitativ zu beurteilen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Absorptionswerten der Messungen bei 570 und 590 nm für Trypanblau gefärbte Zellen.

Die verwendete Farbausschlussmethode nach Paul (Paul, 1975) mit Trypanblau ist eine der bekanntesten Methoden, um Zellschädigungen quantitativ zu beurteilen. Mit der Farbausschlussmethode werden Zellen erfasst, die aufgrund ihrer defekten Membran den Farbstoff aufgenommen haben und somit terminal geschädigt sind. Wenn man den fließenden Übergang des Zellsterbens zu den morphologischen Veränderungen des endgültigen Zelltods betrachtet, wird deutlich, dass Grenzfälle vorkommen können, die die Ergebnisgenauigkeit beeinflussen können. Sicherlich verläuft diese Farbstoffaufnahme nicht nach dem „Alles-oder-nichts-Prinzip“ und lässt unterschiedliche Färbestufen zu. Unter dem Mikroskop sind solche Grenzfälle zwar einzeln beurteilbar, jedoch liegt es im subjektiven Ermessen des Untersuchers, wo die Grenze gezogen wird. Zudem ist diese Methode sehr zeitaufwendig, da eine Mindestanzahl an Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden muss. Aus diesem Grund wird eine entsprechend große Menge Zellen benötigt. Die Zellen müssen stets eine bestimmte Aussaatdichte besitzen. Wenn diese zu hoch sein sollte, ist eine Beurteilung unter dem Lichtmikroskop durch Überlagerungseffekte der Zellen schwierig oder gar nicht möglich.

Aufgrund dieser Problematik ist es sinnvoll, eine einfachere, effektivere und objektivere Methode zur quantitativen Beurteilung der geschädigten Zellen heranzuziehen. Uliasz und Hewitt verglichen den LDH-Assay mit der Absorption einer mit Trypanblau gefärbten Kultur, die bei einer Wellenlänge von 590 nm photometrisch vermessen wurde. Zwischen beiden Methoden ergaben sich keine signifikanten Unterschiede und die photometrische Messung stellte sich als schnelles und zuverlässiges Verfahren heraus (Uliasz und Hewitt, 2000).

Bei diesem Verfahren kann man davon ausgehen, dass der Grad der Färbung auch von teilweise angefärbten Zellen und somit objektiv bestimmt wird.

Die Messung lässt sich mit Hilfe eines Plattenphotometers sehr einfach und schnell durchführen und verlangt eine geringere Menge an Zellen, als zur Auszählung unter dem Lichtmikroskop nötig sind.

In dieser Arbeit wurden die Auszählung und die photometrische Messung direkt miteinander verglichen und die Ergebnisse korrelieren gut miteinander. Die Schädigungsraten unterschieden sich in der photometrischen Messung nicht signifikant voneinander, wenn kurz vor Behandlungsbeginn noch ein Medienwechsel durchgeführt worden war. Jedoch konnte in der Auszählung im Vergleich dieser beiden Gruppen ein Unterschied hinsichtlich einer Reduktion des Zellschadens bei vorher durchgeführtem Medienwechsel festgestellt werden. Zudem fiel auf, dass bei photometrischer Bestimmung die Streuung der Ergebnisse größer war. Bei der Auswertung mit Hilfe dieser zeitsparenden Methode ist demnach eine höhere Ungenauigkeit zu erwarten. Mögliche Störfaktoren bei photometrischer Bestimmung sind in der Art der nötigen Weiterverarbeitung der Zellen nach dem Färbevorgang zu suchen, die bei der Auszählung unter dem Lichtmikroskop entfällt. Die Zellen werden zunächst in SDS gelöst und mit einem Schaber von den Kulturplatten gekratzt. Zuletzt wird der gelöste Inhalt zur Vermessung im Plattenphotometer in eine Multiwellplatte überführt. Der Lösevorgang könnte unvollständig vonstatten gehen und zur Sedimentation von Zellbestandteilen führen, was den Absorptionsvorgang bei photometrischer Vermessung beeinflussen und zur breiteren Streuung der Werte führen könnte. Eine Vermessung bei einer anderen Wellenlänge, beispielsweise 630 nm könnte als Referenzwellenlänge sinnvoll sein, um eine unspezifische Absorption zu reduzieren (Uliasz und Hewitt, 2000).

4.2 Einfluss der Kultivierungszeit

Der exzitotoxische neuronale Zellschaden, wie er bei ischämischen Ereignissen innerhalb des zentralen Nervensystems zu beobachten ist, ist hauptsächlich auf eine exzessive Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, eines Glutamatrezeptorsubtyps, zurückzuführen (Choi, 1988). Der NMDA-Rezeptor ist ein ionotroper Glutamatrezeptor, der unter physiologischen Bedingungen bei Lernvorgängen eine Schlüsselrolle einnimmt. Es konnte gezeigt werden, dass während der postna-

talent Entwicklung das zentrale Nervensystem von zwischen sieben und vierzehn Tage alten Ratten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber schädigenden Einflüssen durch Veränderungen innerhalb des NMDA-Rezeptor-Systems aufweist. Es wurde festgestellt, dass dem eine erhöhte Expression von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten zugrunde liegt (Monyer et al., 1994). Bei älteren Zellkulturen scheint die verzögerte Neurodegeneration eine weitere Rolle zu spielen, da es hierbei zu einer Zellzyklusaktivierung von terminal postmitotisch ausdifferenzierten Zellen kommt und mit einer gewissen Latenzzeit zum Zelltod führt (Katchanov et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden sieben bis acht und dreizehn bis vierzehn Tage alte Zellkulturen untersucht, um zu prüfen, ob sich Unterschiede in der Empfindlichkeit bei einem Entzug von Glukose ergeben. Die Absorptionswerte der photometrischen Messung zeigen in beiden Gruppen ein ähnliches Schädigungsmuster und keine signifikanten Unterschiede. Der Zeitraum zwischen dem siebten und vierzehnten Tag nach Präparation der Zellen erscheint gleichermaßen geeignet um eine neuronale Kultur zu schädigen.

4.3 Vergleich von Tiermodell und Zellkulturen

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe verschiedener Schädigungsmodelle die Situation in vivo für den Untergang von Nervenzellen in vitro anhand embryonaler hippokampaler und kortikaler, als auch postnataler hippokampaler Kulturen simuliert. Voraussetzung hierfür ist, dass sich in vitro vergleichbare Bedingungen herstellen lassen. Bei der transienten Vorderhirnischämie zeigte sich der Hippokampus als empfindlichste Region des Gehirns. Innerhalb des Hippokampus existieren zusätzlich Areale, die sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Ischämie signifikant unterscheiden (Strasser et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass Glutamat als exzitotoxischer Neurotransmitter hauptverantwortlich für den neuronalen Zelltod nach einem Ischämieereignis in vivo ist (Abele et al., 1990, Rothman, 1984). In vitro konnte durch die gleichen Konzentrationen von Glutamat, wie sie in vivo ermittelt wurden, ebenfalls eine Schädigung von Neuronen hervorgerufen werden. Jedoch sind bei Zellkulturen Variablen, die im lebenden Organismus vorkommen und für die Ausbreitung des Gewebeschaadens eine entscheidende Rolle spielen, wie Temperatur des Hirngewebes und systemischer Blutdruck, nicht zu berücksichtigen. Außerdem können im Blut

enthaltene Faktoren das Ausmaß der Nervenzellschädigung nicht mit beeinflussen. Viel zu gering ist in vitro der Effekt der postischämischen Akkumulation endogen freigesetzter neurotoxischer Substanzen, der aufgrund der verhältnismäßig großen Menge des Kulturmediums verloren geht. Nachteil ist hierbei die nicht erhaltene Gewebearchitektur und somit die Zufallsverteilung verschiedener Zelltypen, was während der Vorgänge unter ischämischer Schädigung eine Rolle spielen könnte (Strasser et al., 1994). Die Neubildung synaptischer Kontakte in einer Zellkultur ergibt zudem eine veränderte neuronale Vernetzungsstruktur. Bei der ischämischen Schädigung von Nervenzellen in vivo wirken jedoch mehrere pathophysiologische Prozesse wie Exzitotoxizität, Peri-Infarkt-Depolarisation, Inflammation und Apoptose zusammen, bei denen auch der Zellverband eine Rolle spielt. Die Blutgefäße, neurovaskuläre Matrix und inflammatorische Zellen interagieren miteinander. Dies ist im Rahmen inflammatorischer Prozesse durch das Komplementsystem möglich, was über ein Kaskadensystem die Entzündungsantwort initiiert. Alle Zellen der neurovaskulären Matrix exprimieren Komponenten des Komplementsystems und treten so während der Entzündungsreaktion in Kontakt (Lo, 2003).

Hingegen besteht die Möglichkeit, dass im Tiermodell potentiell neuroprotektive Effekte von Pharmaka durch Nebeneffekte überlagert oder nicht erkannt werden, da die neuroprotektive Substanz beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann. Das komplexe System des Tiermodells ist anfällig für Störfaktoren und kann Probleme bei der Kontrolle der Temperatur und dem Blutdruck bereiten (Strasser et al., 1994). Ein weiterer Vorteil von Zellkulturen ist, dass sich der entstandene Zellschaden in Zellkulturen exakt und objektiv quantifizieren lässt. Diese Unterschiede sollten beim Vergleich von Ergebnissen, die in vivo und in vitro gewonnen wurden, mit in Betracht gezogen werden.

4.4 Schädigung durch Sauerstoff- und Glukoseentzug

Eine Perfusionsstörung, wie sie im Rahmen einer Ischämie in vivo auftritt, kann unter Kulturbedingungen nicht direkt vergleichbar nachgestellt werden. Man kann sich den Bedingungen einer Ischämie nur annähern und durch eine Glukose- und Sauerstoffreduktion eine ähnliche, aber auf die Bedingungen in vivo nicht unmittelbar übertragbare Schädigung hervorrufen. Durch die Kombination

aus Sauerstoff- und Glukoseentzug ist es *in vitro* möglich sich den ischämischen Bedingungen *in vivo* am stärksten anzunähern (Goldberg und Choi, 1990, 1993). Das Modell des Sauerstoff-Glukoseentzugs ist gut etabliert und zur Untersuchung des neuronalen Zelltods geeignet, da relativ zuverlässig konstante Bedingungen geschaffen und zellschädigende Effekte exakt quantifiziert werden können. Dieses Modell gibt somit wichtige Hinweise auf Prozesse, die sich unter ischämischen Bedingungen abspielen. In der vorliegenden Arbeit kam es unter Glukose- und Sauerstoffentzug der Kulturen abhängig von der Dauer der Einwirkung zum Zelluntergang. Unter Sauerstoffentzug kam es durch das Anfallen von Laktat erwartungsgemäß zu pH-Wert-Schwankungen in den sauren Bereich des Kulturmediums, was durch Zusatz eines Indikators zu erkennen war. Problematisch bei dieser Art der Behandlung war, dass für die Zeit, in der den Kulturgefäßen der Sauerstoff entzogen werden musste, die Möglichkeit der Inkubation im Brutschrank bei 37°C nicht gegeben war. Für die Dauer von etwa fünfzehn Minuten waren die Zellen der Gruppen, denen währenddessen Sauerstoff entzogen wurde, daher einer Hypothermie ausgesetzt. Eine Hypothermie wirkt sich neuroprotektiv auf eine Neuronenkultur aus (Bruno et al., 1994). In einer Studie wurden die Auswirkungen einer 20 Minuten andauernden Hypothermie (28,5 bis 31,5°C) sechs bis achtundvierzig Stunden vor der ischämischen Schädigung untersucht und eine Erhöhung der ischämischen Toleranz festgestellt (Nisho et al., 1999, 2000). Die Arbeitsgruppe Meloni setzte neuronale Kulturen für ein oder zwei Stunden einer Temperatur von 30°C aus, bevor die Kulturen vierundzwanzig Stunden später geschädigt wurden. Hier konnte keine neuroprotektive Wirkung beobachtet werden. Die Arbeitsgruppe um Meloni erklärte ihre abweichenden Ergebnisse aufgrund der Verwendung verschiedener Schädigungsmodelle und der unterschiedlichen Umgebungsbedingungen *in vivo* und *in vitro* im Vergleich zu anderen Studien (Meloni et al., 2002). *In vivo* konnte der neuroprotektive Effekt einer milden Hypothermie ebenfalls gezeigt werden. Die Arbeitsgruppe Hacke untersuchte die Veränderungen während milder Hypothermie auf den Sauerstoffmetabolismus und den zerebralen Blutfluss des Gehirns an einem Kollektiv von sechs Patienten, die eine Ischämie im Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media erlitten hatten. Bei fünf Patienten reduzierte sich der zerebrale Sauerstoffverbrauch deutlich (Keller et al., 2000). Die Mehrzahl der Autoren beobachteten einen neuroprotekt-

tiven Effekt durch Hypothermie (Lo, 2003). Daher könnte der Effekt der Zellschädigung durch die Behandlung aufgrund der protektiven Wirkung der Hypothermie überlagert werden. Ein Problem war in der vorliegenden Arbeit die teilweise hohe Grundschädigung und der unzureichende Zellschaden durch Sauerstoff-Glukose-Entzug. Die hohe Grundschädigung könnte durch unterschiedliche Präparationsbedingungen und Zellkulturen verursacht sein. Die Ursache für die teilweise nur mild ausgeprägte Schädigung könnte ein unzureichender Sauerstoffentzug oder auch ein neuroprotektiver Effekt durch eine Hypothermie sein. Sinnvoll wäre es beim Sauerstoff-Glukose-Entzug die Temperatur und den Sauerstoffgehalt in den Kulturgefäßen zu ermitteln, um die genannten Nebeneffekte auszuschließen.

4.5 Neuroprotektiva im Modell des Sauerstoff-Glukose-Entzugs

4.5.1 Clenbuterol und Memantine

In einer parallel zu dieser Arbeit laufenden Studie, konnte gezeigt werden, dass Clenbuterol als Einzelsubstanz in einer Konzentration von 1 bis 100 μM und fünf Stunden Vorbehandlung in einer mit Glutamat geschädigten Kultur signifikant neuroprotektiv wirksam ist. Bei der apoptotischen Schädigung durch Staurosporin zeigte Clenbuterol mit einer Vorbehandlungszeit von sechs Stunden und Konzentrationen von 1 und 10 μM signifikant neuroprotektive Effekte. Für Memantine als Einzelsubstanz ergaben sich in einer durch Glutamat geschädigten Zellkultur bei einer Vorbehandlungszeit von einer Stunde signifikant neuroprotektiv wirksame Konzentrationen zwischen 1 und 10 μM . Keine signifikante Reduktion des Zellschadens konnte hingegen bei einer durch Staurosporin geschädigten Zellkultur durch Memantine erzielt werden, wenn die Vorbehandlungszeit nur eine Stunde betrug. Bei einer Vorbehandlungszeit von fünf Stunden war Memantine in einer Konzentration von 10 μM auch gegenüber dem apoptotischen Zelltod neuroprotektiv wirksam (Kremers, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde der neuroprotektive Effekt von Memantine unter den Bedingungen des Sauerstoff-Glukose-Entzugs untersucht. Die Vorbehandlungszeit betrug eine Stunde. Hierbei konnte durch Memantine als Einzelsubstanz in einer Konzentration von 1 nM, 10 nM und 100 nM erwartungsgemäß keine signifikante Reduktion der Schädigungsrate und somit kein ausreichender Schutz für die Kultur erreicht werden. Eine Konzentration von 1000 nM Meman-

tine konnte die Schädigungsrate auf das Grundschädigungsniveau von Neurobasalmedium reduzieren. Das Grundschädigungsniveau lag jedoch relativ hoch, so dass der neuroprotektive Effekt nicht signifikant war. Eine Vorbehandlung von fünf Stunden könnte auch beim Modell des Sauerstoff-Glukose-Entzugs sinnvoll sein, um eine signifikante Reduktion des Zellschadens zu erzielen.

Durch die Kombination neuroprotektiver Substanzen kann zum einen eine Wirkungssteigerung und damit eine Dosisreduktion der Einzelsubstanzen, zum anderen eine Verbreiterung des therapeutischen Fensters erzielt werden. Mehrere parallel zu dieser Arbeit laufende Studien innerhalb des Arbeitskreises bestätigten einen additiven Effekt von Clenbuterol und Memantine in den Konzentrationen 1 nM und 10 nM sowohl im Tiermodell, als auch in der Zellkultur für die Schädigung mit Glutamat und Staurosporin (Culmsee et al., 2004). Clenbuterol zeigte sich in der fünfstündigen Vorbehandlung wirkungsvoll, was verständlich ist, wenn man bedenkt, dass der neuroprotektive Effekt durch die Induktion von Wachstumsfaktoren zu Stande kommt. Eine therapeutische Wirkung ist zu erwarten, wenn diese Induktion schon einige Stunden im Vorfeld des ischämischen Ereignisses geschieht. Die Kombinationstherapie führte dazu, dass das Zeitfenster auf fünf Stunden vor und zwei Stunden nach Ischämieereignis erweitert wurde. Die Konzentration von 1 nM Clenbuterol und Memantine erwies sich als ausreichend, um eine glutamatgeschädigte Zellkultur zu schützen. Der apoptotische Zellschaden, induziert durch Staurosporin, reduzierte sich signifikant bei einer Konzentration der beiden Substanzen von 10 nM. Somit zeigte sich auch eine antiapoptotische Wirkung der Kombination von Clenbuterol und Memantine. Culmsee et al. diskutierten, dass dieser Effekt durch die Blockade der glutamatbedingten nekrotischen Zellschädigung, somit Verzögerung pathologischer Prozesse und damit Erweiterung des Zeitfensters für die antiapoptotische Wirkung von Clenbuterol induzierten Wachstumsfaktoren (NGF, bFGF, TGF- β_1) zu Stande kommt. NGF, bFGF und TGF- β_1 wirken über zwei membranständige Rezeptoren, den hochaffinen TrkA-Tyrosinkinase-Rezeptor und den niedrigaffinen p75-Neurotrophinrezeptor. Es wurden bisher drei verschiedene Trk-Rezeptoren identifiziert: TrkA, TrkB und TrkC. Die Signalwirkung des p75-Neurotrophinrezeptors scheint in engem Zusammenhang mit dem Status der Trk-Rezeptor-Aktivierung zu stehen. So kann der Trk-Rezeptor Signalwege des p75-Neurotrophinrezeptors und umge-

kehrt beeinflussen. Jedoch konnte in einer Studie gezeigt werden, dass der TrkA-Rezeptor in hippocampalen Neuronen nicht exprimiert wird. Es wurde angenommen, dass p75-Neurotrophinrezeptoren auch von TrkA-Rezeptoren unabhängig funktionieren. Der neuroprotektive Effekt von NGF kann über den p75-Neurotrophinrezeptor durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermittelt werden (Zhu und Kriegstein, 1999). Außerdem wurde für Memantine eine Induktion von BDNF-mRNA beschrieben. BDNF bindet an den TrkB-Rezeptor und kann somit auch die p75-Signalwirkung mit beeinflussen. Diese erhöhte Expression des Neurotrophins BDNF könnte über die Wechselwirkung dieser Rezeptoren mit Clenbuterol induzierten Wachstumsfaktoren synergistisch zusammen wirken (Culmsee et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit zeigte der Sauerstoff-Glukose-Entzug unter schützender Wirkung von Memantine und Clenbuterol in einer Konzentration von 1 nM einen additiven protektiven Effekt für die Kombination beider Substanzen. Hier trat jedoch neben der relativ hohen Grundschädigung noch das Problem auf, dass der durch Sauerstoff-Glukose-Entzug erreichte Zellschaden relativ gering war, so dass der neuroprotektive Effekt von Memantine und Clenbuterol in der Kombination nicht signifikant war.

4.5.2 Pifithrin und Dizocilpin (MK801)

P53 nimmt in der neuronalen Apoptose eine führende Rolle oberhalb der mitochondrialen Schädigungsebene ein. Nach zerebraler Ischämie kommt es durch den oxidativen Stress, die mangelnde Energie und das Zusammenbrechen der Kalziumhomöostase zur Dysfunktion der Mitochondrien. Diese Dysfunktion wird als Schlüsselereignis betrachtet, das die Apoptose in Neuronen triggert. Ein wichtiger regulatorischer Schritt in diesem Prozess läuft an der Membran der Mitochondrien ab, an der Mitglieder der Bcl-2-Gen-Familie beteiligt sind, die sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirken. Die proapoptotisch wirksamen Proteine der Bcl-2-Gen-Familie (Bax, PUMA, Noxa) bewirken die Bildung von Poren in der Mitochondrienmembran, was die Dysfunktion verursacht. Aus der Zerstörung der Mitochondrienmembran resultiert die Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom c und AIF (Apoptose induzierender Faktor). P53 wird im ischämisch geschädigten Hirngewebe schnell hoch reguliert und wirkt über die Transkription von Bax, PUMA und Noxa Apoptose induzierend (Culm-

see und Krieglstein, 2007). Als Transkriptionsfaktor erhöht p53 die Expression von p21, das den Zellzyklusarrest vermittelt. Somit wird verhindert, dass der entstandene Schaden an andere Zellgenerationen weiter gegeben wird. Außerdem wurden weitere Angriffsziele, auf die p53 Einfluss nehmen könnte, gefunden. Im Zusammenhang mit p53 abhängigem apoptotischen Zellschaden konnte eine erhöhte Expression von Perp (p53 apoptosis effector related to PMP-22) nachgewiesen werden (Ihrie et al. 2003). Dieser Effektor agiert an der Plasmamembran und nicht an den Mitochondrien und könnte somit neue Wege der neuroprotektiven Therapie eröffnen (Ihrie et al., 2004). Zusätzlich könnte p53 den Zelltod über einen sogenannten Todesrezeptor (Fas), der sich an der Plasmamembran befindet, vermitteln. Auch eine durch p53 verursachte Hochregulation des Proteins APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1) könnte die Apoptose beeinflussen, da durch dieses Protein die Caspase abhängige Apoptose vermittelt wird. Studien an Zellkulturen konnten zeigen, dass eine enge Korrelation zwischen der Expression von p53 und einem exzitatorischen neuronalen Zelltod, wie er durch Glutamat ausgelöst wird, besteht (Culmsee und Mattson, 2005).

Pifithrin wirkt als Antagonist des Tumor-Suppressors p53 und ist dadurch antiapoptotisch wirksam. Im Tierversuch konnte seine Wirksamkeit sowohl für die fokale zerebrale Ischämie der Maus (Culmsee et al., 2001), als auch für die transiente globale Ischämie der Ratte (Schwarz, 2004) gezeigt werden.

Pifithrin zeigte sich in einer Konzentration von 100 nM und einer Stunde Vorbehandlungszeit wirksam im Sauerstoff-Glukose-Entzug und konnte die Schädigungsrate signifikant reduzieren. Im Vergleich mit Dizocilpin war die Wirksamkeit schwächer. Dizocilpin, das als nicht-kompetitiver Antagonist am NMDA-Rezeptor wirkt, verhindert den Einstrom von Kalziumionen in die Zellen. Es führte beim Sauerstoff-Glukose-Entzug in einer Konzentration von 10 µM und einer Vorbehandlungszeit von einer Stunde zu einer Senkung der Schädigungsrate, die nur leicht über der Grundschädigungsrate lag. Die Wirkungsweisen dieser neuroprotektiven Substanzen lassen vermuten, dass sich auch bei ihrer Kombination ein additiver neuroprotektiver Effekt zeigen könnte. Die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 erfolgt unter anderem durch eine gestörte Kalziumhomöostase (Culmsee und Mattson, 2005). Dizocilpin erreicht durch die NMDA-Rezeptorblockade einen verminderten Einstrom von Kalzium in die Zellen und

senkt somit die Aktivität von p53. Pifithrin hemmt zusätzlich die Aktivität des Tumorsuppressors p53, indem es die Translokation dieses Proteins in den Kern und damit die Bindung an die DNA verhindert.

Die Kombination einzelner Substanzen scheint viel versprechend zu sein. Es könnte dadurch die Zahl geschädigter Neurone weiter verringert und eine Erweiterung des Zeitfensters erzielt werden (Doyle et al., 2008). Aus dem additiven neuroprotektiven Effekt könnte eine Dosisreduktion der Einzelsubstanzen resultieren.

So könnte die Kombination von Dizocilpin und Pifithrin ebenfalls, wie Memantine und Clenbuterol einen additiven Effekt zeigen (Culmsee et al., 2004). Im Tierversuch konnte ein additiver Effekt von Metoprolol und Clenbuterol durch Blockade von β_1 - und Stimulation von β_2 -Rezeptoren erreicht werden, während Metoprolol als β_1 -Antagonist alleine keine neuroprotektive Wirkung hatte. Dieser Effekt kommt wahrscheinlich durch die Abschwächung unerwünschter systemischer Nebenwirkungen, wie Tachykardie und Hyperglykämie, die durch das β_2 -Mimetikum Clenbuterol hervorgerufen werden, zustande. Auch konnte in vitro gezeigt werden, dass die Aktivierung von Astrozyten als Hauptquelle der Neurotrophine nicht nur durch Stimulation von β_2 -Rezeptoren, sondern auch durch β_1 -Rezeptorstimulation (durch Dobutamin) erreicht wird. Für die alleinige neuroprotektive Anwendung in vivo sind aufgrund der systemischen Nebenwirkungen jedoch Grenzen gesetzt. Die Kombination von β_2 -Mimetika und β_1 -Antagonisten wiederum könnte, was unerwünschte systemische Nebenwirkungen der Einzelsubstanzen angeht, jedoch positive Effekte erzielen (Junker et al., 2002). Auch die Kombination einer thrombolytischen Therapie mit neuroprotektiven Substanzen scheint wirkungsvoller als die alleinige Thrombolyse zu sein. Eine klinische Studie beschreibt die sichere Behandlung mit tPA, dem Plasminogenaktivator zur Thrombolyse und der neuroprotektiven Substanz Clomethiazole (Lyden et al., 2001). Clomethiazole, dessen neuroprotektive Wirksamkeit in Modellen der fokalen und globalen Ischämie nachgewiesen werden konnte, wirkt als Agonist an GABA-Rezeptoren (Clarkson et al., 2005). In der Doppel-Blind-Studie zeigte sich, dass Clomethiazole in Kombination mit tPA das Outcome von Patienten mit Infarktsymptomen des vorderen Versorgungsgebietes (TACS) verbesserte (Lyden et al., 2001).

Nachdem lange Zeit die exzitatorische neuronale Schädigung, die Kalziumhomöostase und die Entstehung freier Radikale im Mittelpunkt des Interesses zur Therapie der zerebralen Ischämie standen, setzen neuere Untersuchungen bei vorhergehenden Ereignissen an und konzentrieren sich auf die mitochondriale Dysfunktion mit nachfolgender Erschöpfung der ATP-Vorräte und Zusammenbrechen der Kalziumhomöostase. Außerdem scheint die Beeinflussung Caspase abhängiger und unabhängiger Vermittlung des neuronalen Schadens nach mitochondrialer Schädigung weitere Möglichkeiten zu eröffnen. Caspasen sind Proteasen, die eine Schlüsselrolle während des apoptotischen Zellschadens einnehmen. Sie gehören zur Familie der Proteasen, die Zelltod verursachend wirken. Leider waren die bisher entwickelten Caspase-Inhibitoren nicht in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Ein Caspase unabhängiger Weg die neuronale Schädigung aufzuhalten, könnte beispielsweise die Verhinderung der Freisetzung des Apoptose induzierenden Faktors durch die Mitochondrien sein. Auch die neurovaskuläre Einheit ist von besonderem Interesse, denn im Rahmen einer ischämischen Schädigung spielen so genannte Matrix Metalloproteinasen (MMP) eine Rolle, die zu einem Zusammenbrechen der extrazellulären Matrix und nachfolgender Zerstörung der Mikrovaskularisation des geschädigten Hirngewebes führen. MMP's sind eine der Hauptursachen für die vaskuläre Dysfunktion und die hämorrhagische Umwandlung des Hirngewebes während einer thrombolytischen Therapie mit dem Plasminogenaktivator tPA. MMP-Inhibitoren könnten wirkungsvolle Neuroprotektiva zum Schutz der neurovaskulären Einheit darstellen, vor allem in Kombination mit Plasminogenaktivatoren, da eine häufige Nebenwirkung die Einblutung in das infarzierte Gewebe ist und einer Aktivierung von MMP's zugeschrieben wird. Momentan laufen für diese neuen Therapieoptionen vorklinische Studien (Culmsee, Krieglstein, 2005 u. 2006).

5. Zusammenfassung

Die große medizinische und ökonomische Bedeutung des Schlaganfalls hat in den vergangenen Jahren zu intensiver Forschung geführt. Die verzögerte Neurodegeneration, wie sie in der Penumbra abläuft, stellt einen viel versprechenden Ansatz zur neuroprotektiven Therapie dar. Hier laufen nach dem ischämischen Ereignis neurodegenerative Prozesse ab, auf die pharmakologisch Einfluss genommen werden kann und die zu einer Prognoseverbesserung dieses Krankheitsbildes führen können (Lo, 2003).

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Vergleichbarkeit von einander abweichender Labormethoden zur Bestimmung der Zellschädigung. Von besonderem Interesse war eine Vereinfachung der quantitativen Auswertung des Zelltods in neuronalen Zellkulturen anhand der photometrischen Messung. Ein weiterer Schwerpunkt war die Untersuchung der Zellschädigung und die Neuroprotektion unterschiedlicher Substanzen unter den Bedingungen des Sauerstoff-Glukose-Entzugs.

Eine mit dem Farbstoff Trypanblau gefärbte Nervenzellkultur wurde bei Wellenlängen von 570 und 590 nm photometrisch vermessen, was keinen signifikanten Unterschied ergab. Auch die Zellschädigung von acht und dreizehn Tage alten Zellkulturen zeigte vergleichbare Ergebnisse. Daraus lässt sich herleiten, dass Ergebnisse, die auf methodischen Unterschieden, wie das Alter der Kultur oder verschiedene Wellenlängenbereiche bei einer photometrischen Auswertung basieren, sehr gut vergleichbar sind. Beim Vergleich der photometrischen Messung mit der Auszählung einer Zellkultur zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Methoden. Jedoch war die Streuung der durch photometrische Messung ermittelten Ergebnisse deutlich größer als bei der Auszählung. Bei Methoden, die eine höhere Ungenauigkeit erwarten lassen, wie die photometrische Messung, sollte das bei der Planung der Versuche, zum Beispiel durch eine höhere Zahl der Einzelversuche, mit in Betracht gezogen werden. Hinsichtlich der Schädigung durch Glutamat war in der vorliegenden Arbeit weniger die Konzentration, als die Dauer der Einwirkung für das Ausmaß der Schädigung der Neurone ausschlaggebend. Dieser Faktor sollte beim Vergleich von Ergebnissen annähernd gleich sein. Die Substanz Dizocilpin führte bei Glutamatschädigung zu einer signifikanten Reduktion des Zellscha-

dens. Auch bei der Schädigung durch NMDA war die Substanz neuroprotektiv wirksam. Das zeigt, dass Dizocilpin im Rahmen einer exzitotoxischen Zellschädigung über die Blockade der NMDA-Rezeptoren signifikant neuroprotektiv wirksam ist.

Um die Wirksamkeit von neuroprotektiven Substanzen unter den Bedingungen einer ischämischen Zellschädigung in der Nervenzellkultur beurteilen zu können, wurde das Modell des Sauerstoff-Glukose-Entzugs näher untersucht. Neuroprotektive Substanzen, die sich im Tiermodell als wirksam erwiesen hatten (Culmsee et al., 2001, 2004), erreichten auch unter den Bedingungen des Sauerstoff-Glukose-Entzugs eine Reduktion des Zellschadens. So kam es unter dem Einfluss von Pifithrin unter diesen Bedingungen zu einer signifikanten Reduktion an geschädigten Zellen. Memantine und Clenbuterol zeigten in der vorliegenden Arbeit keinen stark schützenden Effekt. Zum einen könnte das durch die zu kurze Vorbehandlungszeit von nur einer Stunde, zum anderen durch die hohe Grundschädigung und die verhältnismäßig schwache Schädigung durch Sauerstoff-Glukose-Entzug bedingt sein. Als Ursache für den hohen Grundschaden kommen unterschiedliche Präparationsbedingungen und die Verwendung unterschiedlicher Zellkulturen in Frage. Die schwache Schädigung könnte durch eine Hypothermie der Zellkulturen während der langen Behandlung oder durch einen unzureichenden Sauerstoffentzug verursacht sein. Es handelt sich beim Sauerstoff-Glukose-Entzug um ein etabliertes Modell, das unter kontrollierten Bedingungen Aufschluss über die ischämische Zellschädigung geben kann. Es ist jedoch sinnvoll auf gleiche Präparationsbedingungen und Zellkulturen zu achten und die Temperatur und den Sauerstoffgehalt in den Kulturen unter den Bedingungen des Sauerstoff-Glukose-Entzugs zu ermitteln, um solche Nebeneffekte sicher auszuschließen.

Abstract

The important medical and economic interest of apoplectic stroke resulted in intensive research over the past years. The delayed neurodegeneration, which proceeds in the penumbra, is a promising approach for the neuroprotective therapy. After the ischemic occurrence neurodegenerative processes proceed in this place, which can be affected pharmacological and may result in an advancement of prognosis (Lo, 2003).

A focal point of this study was the investigation of comparability of aberrant laboratory techniques for the identification of the cell damage. A main interest was the simplification of the quantitative analysis of neuronal cell cultures with the photometric measurement. A further focal point was the investigation of the cell damage and the neuroprotective effect of diverse substances under the conditions of oxygen-glucose-deprivation.

A trypanblue stained neuronal cell culture was analysed photometric, which showed, that there was no significant difference between 570 and 590 nm. There was also no significant difference between the cell damage of eight and thirteen day old cell cultures. Thus it appears that results, which base upon methodical differences, like the age of the cell culture or different wavelengths of photometric analysis, are very well comparable. Also by comparing the photometric measurement and the enumeration of a cell culture there were no significant differences between the methods. However the scatter of the results, which were detected with the photometric measurement, was considerably greater than the scatter of the results of enumeration. If methods are used, which give rise to expectations for a higher impreciseness, like the photometric measurement, it should be considered in the design of an experiment, for instance by increasing the number of trials. Concerning the damage caused by glutamate in this study the concentration was less deciding for the cell damage than the duration of exposure. This criterion should be approximate the same, when considering results. The substance Dizocilpin resulted in significant reduction of the cell damage under glutamate exposure. Also under NMDA exposure the substance affected neuroprotective. That shows, that Dizocilpin acts significant neuroprotective caused by blockade of the NMDA-receptors in line with excitatory cell damage.

To appraise the efficacy of neuroprotective substances under ischemic conditions in cell culture, the model of oxygen-glucose-deprivation was more exactly analysed. Neuroprotective substances, which proved to be effective in the animal model (Culmsee et al., 2001, 2004), achieved also a reduction of the cell damage under the conditions of oxygen-glucose-deprivation. So in this study Pifithrin achieved a significant reduction of cell damage under these conditions. Memantine and Clenbuterol showed no intense protective effect in this study. On the one hand it could be caused by the short time of pre-treatment of only one hour, on the other hand it could be caused by the high basic-damage and the comparative low damage caused by oxygen-glucose-deprivation. The reason for the high basic-damage could be the different conditions of preparation and the usage of different cell cultures. The low damage could be caused by hypothermia of the cell cultures during the long period of treatment or by a deficient oxygen-deprivation. The model of oxygen-glucose-deprivation is an established model, which is able to give information about the ischemic cell damage under controlled conditions. However it is expedient to mind the same conditions of preparation and cell cultures and to detect the temperature and the oxygen content of the cultures under the conditions of oxygen-glucose-deprivation to eliminate such side effects.

Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptose induzierender Faktor
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
APAF-1	apoptotic protease activating factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-assoziertes X-Protein
Bcl-2	B-cell-lymphoma-2
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Albumin Bovine Fraction V
CC	kortikale Zellen
Clen	Clenbuterol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E (18)	18. Gestationstag
EBSS	Earle's balanced salt solution
EEG	Elektroenzephalogramm
FCS	Fötale Kälberserum
GABA	γ -Aminobutyrat
Glt	Glutamat
HBSS	Hank's balanced salt solution
HC	hippokampale Zellen
HEPES	Hydroxyethylpiperazine-ethanesulfonic acid
L-	Locke's-Medium ohne Glukose
L+	Locke's-Medium mit Glukose
LDH	Laktatdehydrogenase
Mem	Memantine
MEM	Modifiziertes Eagle Medium
MK801	Dizocilpin
MMP	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MW	Medienwechsel
NB	Neurobasalmedium

NGF	Nerve growth factor
NK κ B	Nuclear Faktor κ -B
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OD	Sauerstoff-Entzug
OGD	Sauerstoff-Glukose-Entzug
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphate buffered saline
PEI	Polyethylenimin
Perp	p53 apoptosis effector related to PMP-22
PFT	Pifithrin
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
SDS	Sodiumdodecyl-Sulfat
STS	Staurosporin
TACS	total anterior circulation syndrome
TGF- β 1	Transforming growth factor- β 1
Trk-R	Tyrosinkinaserzeptor
Upm	Umdrehungen pro Minute

Literaturverzeichnis

Abele A. E., Scholz K. P., Scholz W. K., Miller R. J., (1990). Excitotoxicity induced by enhanced excitatory neurotransmission in cultured hippocampal pyramidal neurons. *Neuron* 2: 413-419.

Block F., Kosinski C.M., Neurologische Klinik der RWTH Aachen, (2001). *Der Nervenarzt* 72: 393-405.

Bruer U., Weih M. K., Isaew N. K., Meisel A., Ruscher K., Bergk A., Trendelenburg G., Wiegand F., Victorov I. V., Dirnagl U., (1997). Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning, *FEBS Lett* 414: 117-121.

Bruno V. M., Goldberg M. P., Dugan L. L., Giffard R. G. and Choi D. W., (1994). Neuroprotective effect of hypothermia in cortical cultures exposed to oxygen-glucose deprivation or excitatory amino acids. *J. Neurochem.* 63: 1398–1406.

Casaccia-Bonnet P., Carter B., Dobrowsky R. T., Chao, M. V., (1996). Nerve growth factor mediated cell death of mature oligodendrocytes through the p75 neurotrophin receptor, *Nature* 383: 716-719.

Choi D. W., (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623-643.

Clarkson A. N., Liu H., Rahman R, Jackson D. M., Appleton I., Kerr D. S, (2005). Clomethiazole: mechanisms underlying lasting neuroprotection following hypoxia-ischemia, *The FASEB Journal* Vol. 19: 1036-1038.

Culmsee C and Krieglstein J, (2007). Ischaemic brain damage after stroke: new insights into efficient therapeutic strategies, *Embo reports* Vol 8, No.2: 129-133.

Culmsee C, Stumm R K, Schaefer MKH, Weihe E, Krieglstein J., (1999). Clenbuterol induces growth factor mRNA, activates astrocytes, and protects rat brain tissue against ischemic damage. *Eur J Pharmacol.* 379: 33-45.

Culmsee C., Junker V., Kremers W., Thal S., Plesnila N. and Krieglstein J., (2004). Combination Therapy in Ischemic Stroke: Synergistic Neuroprotective Effects of Memantine and Clenbuterol, *Stroke* 35: 1197-1202.

Culmsee C., Krieglstein J., (2005). Mechanisms of neuronal degeneration after ischemic stroke- Emerging targets for novel therapeutic strategies, *Drug Discovery Today* Vol. 2, No. 4: 463-470.

Culmsee C., Krieglstein J., (2006). Emerging pharmacotherapeutic strategies for the treatment of ischemic stroke, *Drug Discovery Today* Vol. 3, No. 4: 621-628.

Culmsee C., Mattson M. P., (2005). p53 in neuronal apoptosis, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331: 761–777.

Culmsee C., Zhu X., Yu Q., Chan S. L., Camandola S., Guo Z., Greig N., Mattson M. P., (2001). A synthetic inhibitor of p53 protects neurons in the brain against ischemic and excitotoxic injury, *J Neurochem.* 77: 220-228.

Diener H. C., Allenberg J.–R., Bode C., Busse O., Forsting M., Grau A. J., Hennerici M., Grond M., Haberl R. L., Hamann G. F., Ringelstein E. B., Ringleb P. A., (2007). Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie und der Deutschen Schlaganfallgesellschaft zur Primär- und Sekundärprävention des Schlaganfalls: Aktualisierung, *Akt. Neurol.* 34: 8-12.

Diringer M., Reaven N. L., Funk S. E., Uman G. C., (2004). Elevated body temperature independently contributes to increased length of stay in neurologic intensive care unit patients, *Crit. Care Med.* 32: 1489-1495.

Doyle K. P., Simon R. P., Stenzel-Poore M. P., (2008). Mechanisms of ischemic brain damage, *Neuropharmacology* 55: 310-318.

Duverger D., MacKenzie E. T., (1988). The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration, and age, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 8: 449-461.

Fisher M. and Garcia J. H., (1996). Evolving stroke and the ischemic penumbra, *Neurology* 47: 884–888.

Fisher M., Schaebitz W., (2000). An overview of acute stroke therapy: past, present and future, Arch. Intern. Med. 160: 3196-3206.

Gass P., (1997). Cerebrale Ischämie und Epilepsie. Klinische Neurobiologie (eds. Herdegen T, Bähr M, Tölle T) 189-220. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Goldberg M. P. and Choi D. W., (1990). Intracellular free calcium increases in cultured cortical neurons deprived of oxygen and glucose, Stroke 21: 11175-11177.

Goldberg M. P. and Choi D. W., (1993). Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury, J. Neuroscience 13: 3510-3524.

Haberny K. A., Paule M. G., Scallet A. C., Sistare F. D., Lester D. S., Hanig J. P. and Slikker W. Jr., (2002). Ontogeny of the N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor System and Susceptibility to Neurotoxicity, Toxicological Sciences 68: 9-17.

Ihrie R.A., Attardi L.D., (2004). Perp-etrating p53-dependent apoptosis, Cell Cycle 3: 267–269.

Ihrie R.A., Reczek E., Horner J.S., Khachatrian L., Sage J., Jacks T., Attardi L.D., (2003). Perp is a mediator of p53-dependent apoptosis in diverse cell types, Curr. Biol. 13: 1985–1990.

Ikonomovic M. D., Mizukami K., Warde D., Sheffield R., Hamilton R., Wenthold R. J., Armstrong D. M., (1999). Distribution of glutamate receptor subunit NMDAR₁ in the hippocampus of normal elderly and patients with Alzheimer's disease. Exp. Neurol. 160: 194-204.

Junker V., Becker A., Hühne R., Zembatov M., Ravati A., Culmsee C., Krieglstein J., (2002). Stimulation of β -adrenoceptors activates astrocytes and provides neuroprotection, European Journal of Pharmacology 446: 25-36.

Kanduc D., Mittelman A., Serpico R., Sinigaglia E., Sinha A. A., Natale C., Santacroce S., Di Corcia M. G., Lucchese A., Dini L., Pani P., Santacroce S., Simone S., Bucci R. and Farber E., (2002). Cell death: apoptosis versus necrosis (review). Int. J. Oncol. 21: 165–170.

Kaplan und Miller, (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system, *Curr. Opin. Neurobiol.* 10(3):381-91.

Katchanov J., Harms C., Gertz K., Hauck L., Waeber C., Hirt L., Priller J., von Harsdorf R., Brück W., Hörtnagl H., Dirnagl U., Bhide P. G., Endres M., (2001). Mild Cerebral Ischemia Induces Loss of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors and Activation of Cell Cycle Machinery before Delayed Neuronal Cell Death, *The Journal of Neuroscience* 21(14): 5045-5053.

Keller E., Steiner T., Fandino J., Schwab S., Hacke W., (2000). Changes in cerebral blood flow and oxygen metabolism during moderate hypothermia in patients with severe middle cerebral artery infarction, *Neurosurg Focus* Vol. 8 (5):Article 4: 1-4.

Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer* 26: 239-257.

Kolominsky-Rabas P. L., Heuschmann P. U., Marschall D., Emmert M., Baltzer N., Bnurs, Neundörfer B., Schöffski O., Krobot for the CompetenceNet Stroke, (2006). Lifetime Cost of Ischemic Stroke in Germany: Results and National Projections From a Population-Based Stroke Registry, *Stroke* 37(5): 1179-83.

Kremers, (2004). Neuroprotektion durch Nikotin, Clenbuterol, Memantin und Prolinreiches Peptid in einer Primärkultur von postnatalen Hippocampuszellen der Ratte.

Kruman I., (2004). Why does Neurons enter the Cell Cycle? *Landes Bioscience Cell Cycle* 3:6, 769-773.

Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie (2005), 3. überarbeitete Auflage, AWMF-Leitlinien-Register Nr. 030/046.

Lo E. H., Dalkara T. and Moskowitz M. A., (2003). Mechanisms, challenges and opportunities in stroke, *Nature Reviews Neuroscience* Vol. 4: 399-415.

Lyden, P., Jacoby M., Schim J., Albers G., Mazzeo P., Ashwood T., Nordlund A., Odergren T. and the CLASS IHT Investigators, (2001). The Clome-thiazole Acute Stroke Study in tissue-type plasminogen activator-treated stroke (CLASS-T): final results. *Neurology* 57: 1199-1205.

Magistretti P.J., Pellerin L., (1999). Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 354: 1155-1163.

Marchenko N. D., Zaika A., Moll U. M., (2000). Death signal-induced localization of p-53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling, *J. Biol. Chem.* 257: 16202-16212.

Marvanová M., Lakso M., Pirhonen J., Nawa H., Wong G., Castren E. (2001). The neuroprotective agent memantine induces brain-derived neurotrophic factor and trkB receptor expression in rat brain, *Mol. Cell. Neurosci.* 18: 247-258.

Meloni B. P, Majda B. T, Knuckey N. W, (2002). Evaluation of preconditioning treatments to protect near-pure cortical neuronal cultures from in vitro ischemia induced acute and delayed neuronal death. *Brain Res.* 928 (1-2):69-75.

Monyer H., Burnashev N., Laurie D. J., Sakmann B. and Seeburg P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors, *Neuron* 12: 529-540.

Muizelaar u. Marmarou (1991). Adverse effects of prolonged hyperventilation in patients with severe head injury: a randomized clinical trial, *J. Neurosurg.* 75(5): 731-9.

Nisho S., Chen Z.-F., Yunoki M., Toyoda T., Anzivino M. J., Lee K. S., (1999). Hypothermia-induced ischemic tolerance, *Ann. NY Acad. Sci.* 890: 26-41.

Nisho S., Yunoki M., Chen Z.-F., Anzivino M. J, Lee K.S., (2000). Ischemic tolerance in the rat neocortex following hypothermic preconditioning, *J. Neurosurg.* 93: 845-851.

Omura S., Iwai Y., Hirano A., Nakagawa A., Awaya J., Tsuchya H. (1977). A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization, *J. Antibiot.* 30: 275–282.

Paul J., (1975). *Cell and Tissue Culture*, 5th edition. Edinburgh-London-New York: Curchill Livingstone: 368.

Plesnila N., von Baumgarten L., Retiounskaia M., Engel D., Zimmermann R., Landshamer S., Culmsee C., (2006). Delayed neuronal death after brain trauma involves p53-dependent inhibition of NF- κ B transcriptional activity. *Journal of Neuroscience*: 1-43.

Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ, (1997). Excitotoxic neuronal death in the immature brain is apoptosis-necrosis morphological continuum. *J. Comp. Neurol.* 378: 70-87.

Ross M. E., (1996). Cell division and the nervous system: regulating the cycle from neural differentiation to death. *Trends Neurosci.* 19(2): 62-8.

Rothman S. M., (1984). Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J. Neurosci.* 4: 1884-1891.

Schütz H, (1988). Spontane intrazerebrale Hämatomme: Pathophysiologie, Klinik und Therapie, Springer Verlag, Berlin 150-156.

Schwarz, S. (2004). Die Rolle von p53 und der Proteinphosphatase 2C in der neuronalen Apoptose: 1-187.

Strasser u. Fischer, (1994). Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation, *J. of Neuroscience Methods* 57: 177-186.

Uliasz und Hewitt (2000). A microtiter trypan blue absorbance assay for the quantitative determination of excitotoxic neuronal injury in cell culture, *Journal of Neuroscience Methods* 100: 157-163.

Zhu und Krieglstein, (1999). β -Adrenoceptor agonist Clenbuterol causes NGF expression and neuroprotection, *CNS Drug Reviews* Vol.5, No.4: 347-364.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren an der Universität Marburg:

Prof. Arnold

Prof. Aumüller

Prof. Austermann

Prof. Back

Prof. Barth

Prof. Basler

Prof. Baum

Prof. Bertalanffy

Prof. Cetin

Prof. Czubayko

Prof. Daut

Prof. Eilers

Prof. Göke

Prof. Geus

Prof. Grzeschik

Prof. Griss

Prof. Gotzen

Prof. Gudermann

Prof. Happle

Prof. Hasillik

Prof. Hellinger

Prof. Hoffmann

Prof. Junclas

Prof. Kienapfel

Prof. Kern

Prof. Klenk

Prof. Klose

Prof. Koolman

Prof. Krieg

Prof. Kroh

Prof. Kroll
Prof. Lammel
Prof. Lang
Prof. Lange
Prof. Lill
Prof. Lohoff
Prof. Maisch
Prof. Moll
Prof. Moosdorf
Prof. Mutters
Prof. Müller
Prof. Neubauer
Prof. Oertel
Prof. Renz
Prof. Renschmidt
Prof. Rosenow
Prof. Rothmund
Prof. Schachtschabel
Prof. Schäfer
Prof. Schmidt
Prof. Seitz
Prof. Steiniger
Prof. Suske
Prof. Vogelmeier
Prof. Weihe
Prof. Werner
Prof. Wulf

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Professor Dr. Dr. Josef Krieglstein für die freundliche Überlassung des Themas, die große Unterstützung und Geduld ganz herzlich bedanken.

Auch Professor Dr. Carsten Culmsee danke ich sehr für die unermüdliche Unterstützung, das offene Ohr und die fachlichen Empfehlungen sowohl bei der Tätigkeit im Labor, als auch beim Verfassen dieser Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt auch meinem Kollegen Dr. Wolfram Kremers, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und der mir trotz seiner knapp bemessenen Zeit bei der Korrektur dieser Arbeit behilflich war.

Für die nette und verständnisvolle Unterstützung während der Präparation und Behandlung der Zellkulturen möchte ich mich bei Frau Sandra Engel, Frau Michaela Stumpf und Frau Elke Bauerbach ebenfalls ganz herzlich bedanken.

Allen Kollegen und Frau Emma Esser gilt mein Dank für die schöne und familiäre Atmosphäre am Institut.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich ganz besonders herzlich für die von klein auf liebevolle Unterstützung, Motivation und finanzielle Hilfe, die mir mein Studium und diese Dissertation überhaupt erst ermöglicht haben.

Meinen Geschwistern Jennifer und Benjamin und meinem Schwager Jochen danke ich für den ermutigenden Zuspruch und die Hilfe bei EDV-Problemen.

Meiner Tochter Annika danke ich dafür, dass sie mir die Kraft und die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit fertig zu stellen.

Nicht zuletzt danke ich meinem Mann Alex, dass er mit mir seit knapp zehn Jahren alle Höhen und Tiefen meistert, immer an mich glaubt und mich in jeder Lebenslage uneingeschränkt unterstützt.