

# **Einfluß von transitorisch-ischämischen Attacken auf darauffolgende ischämische Hirninfarkte**

## **Experimentelle und klinische Untersuchungen zur Hypoxietoleranz**

### **HABILITATIONSSCHRIFT**

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach  
Neurologie



vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
von

Herrn Dr. med. Markus Karl Weih

geboren am 24.11.1965 in Nürnberg

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

eingereicht: 12/2000

Gutachter: 1.....

2. ....

## **Abstrakt**

Ischämietoleranz bezeichnet das Phänomen, dass ein kurzer ischämischer, metabolischer oder physikalischer Stimulus das Gehirn paradoxerweise "resistent" macht gegenüber einer darauffolgenden, längerdauernden Ischämie.

In einer retrospektiven Studie versuchten wir die Hypothese zu untermauern, dass transiente ischämische Attacken (als kurzdauernde ischämische Stimuli) vor einem Infarkt (prodromale TIAs) protektiv sind gegen eine nachfolgende zerebrale Ischämie. Es zeigte sich dabei, dass Patienten mit prodromalen TIAs ein geringeres Defizit und einen günstigeren Verlauf zeigten und im CT seltener Infarktfrühzeichen hatten. Somit könnten transiente ischämische Attacken, vor einem Schlaganfall, analog zu der Situation am Herzen und wie in zahlreichen in vivo Modellen gezeigt, ein klinisches Korrelat zur hypoxischen Präkonditionierung darstellen.

Im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass sich hypoxische Präkonditionierung in vitro in neuronalen Kulturen modellieren läßt. Eine kurzzeitige Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) 1-3 Tage vor einer längeren OGD führt zu einem signifikanten Schutz von Neuronen, bis zu 90%. Hypoxietoleranz kann auch durch andere metabolische Stimuli, wie Inhibition von Atmungskettenenzymen durch 3-NPA im gleichen Zeitrahmen simuliert werden.

Eine genaue Kenntnis der endogenen Neuroprotektion durch Ischämietoleranz könnte in Zukunft helfen, den Schaden durch ischämische Infarkte und ischämische Enzephalopathien zu minimieren.

Schlagwörter: Schlaganfall, transitorisch ischämische Attacken, Präkonditionierung, Neuroprotektion.

## **Abstract**

Ischemic tolerance is a phenomenon where a brief episode of ischemia renders the brain paradoxically resistant against a subsequent, longerlasting ischemic event.

In a retrospective study we tested the hypothesis that transient ischemic attacks (as brief ischemic stimuli) before cerebral ischemia (prodromal TIA's) may have a protective effect. Here we show that patients with prodromal TIA's have less severe neurologic impairment, a better clinical course and have less early infarct signs.

Therefore we suggest that TIA's, before stroke could represent a clinical correlate to hypoxic preconditioning, as shown in the heart.

Experimentally we were able to model hypoxic preconditioning in vitro using neuronal cultures. Brief oxygen-glucose deprivation (OGD) 1-3 days before longer lasting OGD protects neurons, up to 90%. Hypoxic tolerance was also simulated by metabolic stimuli like inhibition of the respiratory chain by 3-NPA.

Increasing knowledge of this endogenous neuroprotection by ischemic tolerance might help to minimize neuronal damage following ischemic strokes and hypoxic encephalopathy.

**Key words:** ischemic stroke, transient ischemic attack, preconditioning, neuroprotection.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>2 Literaturübersicht</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Hypoxietoleranz am Herzen</b>	<b>12</b>
2.1.1 Experimentelle Studien	14
2.1.2 Klinische Studien	15
<b>2.2 Hypoxietoleranz am Gehirn</b>	<b>16</b>
2.2.1 Mechanismen	18
2.2.2 Hypoxietoleranz am Gehirn: transiente ischämische Attacken als Modell ?	35
<b>3 Methoden und Grundlagen</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Zellkultur</b>	<b>38</b>
3.1.1 Medien und Lösungen	38
3.1.2 Präparation von kortikalen Neuronen	39
<b>3.2 Sauerstoff-Glucosedeprievation (OGD) und 3-NPA-Inkubation</b>	<b>41</b>
3.2.1 Medien und Lösungen	41
3.2.2 Schädensevaluation	43
<b>3.3 Schlaganfalldatenbank</b>	<b>45</b>
<b>3.4 Diagnoseevaluation TIA</b>	<b>45</b>
<b>3.5 Klinische Endpunkte</b>	<b>46</b>
<b>3.6 CT / MRT: Frühzeichen und Infarktgrösse</b>	<b>46</b>
<b>3.7 Statistik</b>	<b>47</b>
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Hypoxische Präkonditionierung</b>	<b>49</b>
<b>4.2 Pharmakologische Präkonditionierung</b>	<b>52</b>
<b>4.3 Fall-Kontrollstudie mit klinischen Endpunkten</b>	<b>55</b>
<b>4.4 Fall-Kontrollstudie mit neuroradiologischen Endpunkten</b>	<b>65</b>
<b>5 Zusammenfassung und Diskussion</b>	<b>73</b>
<b>5.1 Hypoxische Präkonditionierung</b>	<b>73</b>
<b>5.2 Pharmakologische Präkonditionierung</b>	<b>75</b>
<b>5.3 Studie mit klinischen Endpunkten</b>	<b>78</b>

5.4 Studie mit neuroradiologischen Endpunkten	83
5.5 Ausblick	88
<b>6 Anhang</b>	<b>92</b>
6.1 Abkürzungen	92
6.2 Danksagung	93
6.3 Lebenslauf	94
6.4 Erklärung	96
6.5 Fragebögen, Scores, und Definitionen	99
6.6 Schema und ein Beispiel für Infarktfrühzeichen	107
6.7 Tabellen, Abbildungsverzeichnis und Index	108
6.8 Literaturverzeichnis	112

*A faltering and inarticulation of the voice, drowsiness, forgetfulness, a slight delirium, a dimness of sight, or objects appearing double, a numbness gradually propagated to the head, weakness, a distortion of the mouth, a palpitation, a disposition of faint, some or most of these have preceded a palsy for a few minutes or for some hours or even a few days.*

**William Heberden, 1802**

*Our remedies oft in ourselves do lie. Which we ascribe to heaven: the fated sky gives us free scope, only doth backward pull. Our slow designs when we ourselves are dull.*

William Shakespeare, All's Well That Ends Well

## **1 Einleitung**

Schlaganfälle sind in den meisten industrialisierten Ländern, nach anderen Herz-Kreislaufkrankungen und Krebserkrankungen die dritthäufigste Todesursache mit einer Mortalitätsrate von 10-20%. Als Ursache dauerhafter Behinderung stehen sie, aufgrund einer Morbiditätsrate von 80-90%, sogar an erster Stelle. Schlaganfälle beinhalten unterschiedlichste Entitäten, wobei der ischämische Hirninfarkt mit ca. 80%, gefolgt von primären intrazerebralen Blutungen, die häufigste Untergruppe darstellt. Innerhalb der ischämischen Schlaganfälle können weiter epidemiologisch grob 4 grosse Untergruppen unterteilt werden: Makroangiopathien; Mikroangiopathien; Kardioembolien und gemischte/seltene/ungeklärte Ursachen. Pathophysiologisch können, in Anlehnung an die Virchowsche Trias 3 Hauptmechanismen unterschieden

werden: lokale, autochtone Thrombosen; Thromboembolien und hämodynamische Infarkte.

Das menschliche Gehirn ist, ähnlich wie bei den meisten Säugetieren, ausserordentlich Hypoxie- und Ischämieempfindlich. Obwohl das Gehirn nur 2-5% des Körpergewichtes hat, verbraucht es ca. 15% des Herzminutenvolumens (ca. 50 ml/100g/min) und 20% des Sauerstoffes. Der zerebrale Blutfluss (CBF) ist in der grauen Substanz etwa 4-5 -fach höher als in der weissen Substanz. Der Energieverbrauch des Gehirns kann durch den Glucose- ( $CMR_{Gluc}$ ; cerebral metabolic rate) oder Sauerstoffverbrauch ( $CMR_{O_2}$ ) berechnet werden. Die  $CMR_{O_2}$  kann durch den Blutfluss und den arteriovenösen Sauerstoffunterschied berechnet werden und beträgt ca. 3 bis 3.8 ml  $O_2$ /100g/min, die  $CMR_{Gluc}$  beträgt etwa 70  $\mu$ mol/100g/min. Der respiratorische Quotient des Gehirnes (Sauerstoffverbrauch/ $CO_2$ -Entstehung) ist nahezu 1, was anzeigt, dass der Sauerstoff dabei fast ausschließlich für die Oxidation von ca. 60-70 mg Glucose pro Minute verbraucht wird, was etwa 25 Watt entspricht. Die durchschnittliche ATP-Synthese des Gehirnes beträgt etwa 2.5 mmol/100g/min unter der Annahme dass 1 mol Glucose 36 mol ATP ergibt.

Der normale cerebrale Blutfluss beträgt etwa 20-60 ml/100g/min und wird, unabhängig vom arteriellen Mitteldruck, durch die zerebrale Autoregulation konstant gehalten; sinkt der CBF unter 15 ml/100g/min ab, kommt es zunächst zu einer funktionellen Störung, dauert diese Ischämie länger an oder sinkt der CBF weiter, ca. auf Werte unter 8-10 ml/100g/min (oder ca. 30 mmHg oder 20% des Normalwertes) ab <sup>1,2</sup>, kommt es rasch zur Nekrose, oder, als prinzipiell anderer Form des Zellunterganges, zum programmierten Zelltod oder Apoptose. Bioenergetisch gesehen kommt es in diesem Bereich zur raschen Hydrolyse von ATP und Phosphokreatin. Zwischen dem, bei der fokalen Ischämie dem Gefässverschluss unmittelbar nachgeschaltetem Gewebe oder Kern (core) des Infarktes, und dem normal durchblutetem Gehirn befindet sich die Penumbra (Halbschatten). Die Penumbra ist eine Zone, in der der Blutfluss nur moderat herabgesetzt ist, so dass zwar die oxidative Phosphorylierung gestört ist und die Proteinsynthese gehemmt ist, es jedoch, zu Beginn, noch zu keiner strukturellen Störung kommt. Der

Zelltod selbst stellt das Ende einer neurotoxischen, zum Teil selbstverstärkenden multidimensionalen Kaskade dar, an deren Anfang der rasche ATP-Verbrauch am Beginn einer Ischämie steht. Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Differenzierung Hypoxie vs. Ischämie. Hypoxie alleine führt wesentlich langsamer zum ATP Abfall und Zelltod als Ischämie. Im Gehirn sind, wie in anderen Organen auch, zahlreiche Stoffwechselwege ATP-abhängig (siehe Tabelle 2). Unterschieden werden muss hierbei zwischen Aktivierungsmetabolismus und residualem Strukturmetabolismus, wenn die synaptische Aktivität erloschen ist.

Bereits wenige Minuten einer Hypoxie oder Ischämie führen zu klinischen Ausfallssymptomen (Lähmungszeit) und das Intervall, innerhalb dessen eine komplette Restitution möglich ist, bzw. nach der es zu irreversiblen Schäden kommt (Wiederbelebungszeit) ist kurz und die Erholungszeit (Zeit, die für eine völlige Erholung benötigt wird) ist lange. Einige geschätzte gewebespezifische Hypoxiezeiten sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1 **Hypoxiezeiten verschiedener Gewebe**

	Lähmungszeit	Wiederbelebungszeit	Erholungszeit
Gehirn	4-12 s	8-10 min.	1-24 h
Muskulatur	20 min.	2 h	?
Niere/Leber	20 min.	3-4 h	24-72 h
Herz	3-4 min.	30-60 min.	24-48 h

Zunächst kommt es im Gehirn zu einer selektiv neuronalen Nekrose, später werden auch nicht neuronale Zellen wie Astrozyten oder Endothelzellen geschädigt; Unterschieden wird zwischen globaler und fokaler Ischämie; während die globale Ischämie am ehesten einem Herz-Kreislaufstillstand entspricht, betrifft eine fokale Ischämie nicht das gesamte Gehirn, sondern nur das einem Gefäß nachgeschaltete Parenchym.

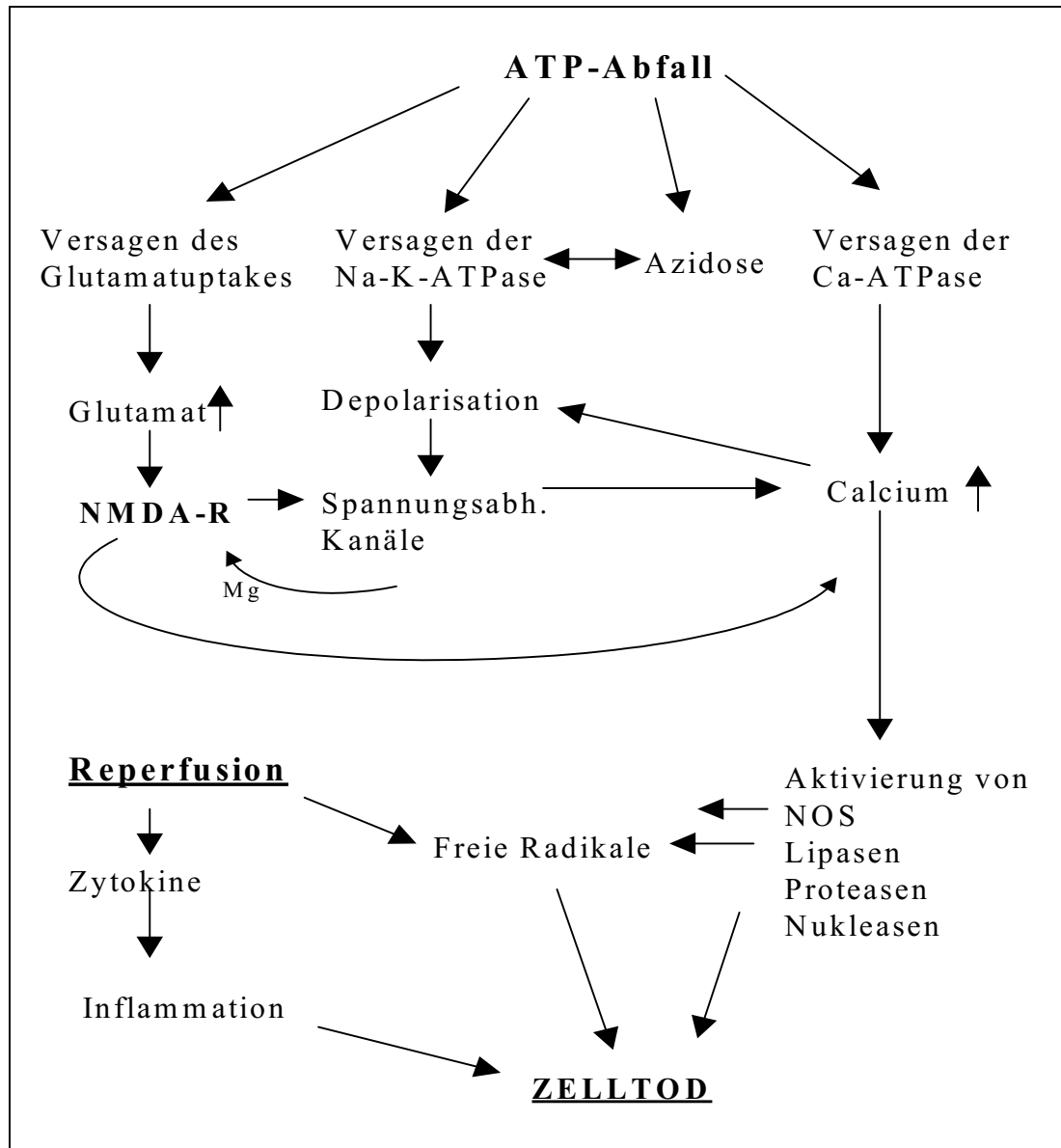
**Tabelle 2 ATP-abhängige Stoffwechselwege (mod. nach Hochachka und Welsh <sup>3,4</sup>)**

	geschätzter ATP-Verbrauch in $\mu\text{mol/g/h}$
Na-K-ATPase; Ca-ATPase	19 (ca. 50%) <sup>5</sup>
Biosynthese Proteine (Import und Faltung) Lipide Kohlenstoffe Nukleinsäuren	5 (-50)
Synaptische Übertragung Vesikelexozytose Neurotransmittersynthese/-aufnahme axonaler Transport	?
Metabolismus Proteinabbau (V.a. 26S-Proteasom) DNA-Reparatur und PARP Hitzeschockproteine	11
Phosphorylierung/Signaltransduktion	?
Harnstoffsynthese	2
Gluconeogenese	11

Tabelle 2: Die differentielle Rolle der einzelnen Parameter ist in Neuronen im einzelnen nicht untersucht worden. Die angegebenen Werte stellen Schätzungen aus unterschiedlichen Modellen dar. In der Proteinsynthese werden pro Aminosäurerest ein ATP und 2 GTP Moleküle verbraucht. im Proteinkatabolismus werden zur Ubiquitinylierung pro Protein 2 Moleküle ATP verbraucht. PARP: Poly(ADP-Ribose) Polymerase.

Dauert die Ischämie zu lange, schreitet der Zelltod fort, auch wenn es zu einer Reperfusion kommt. Der entscheidende Faktor ist hierbei die Zeit, was durch die beeindruckende Zeitabhängigkeit der Effektivität der Thrombolyse beim Herzinfarkt und Schlaganfall unterstrichen wird. In Abbildung 1 ist die neurotoxische Kaskade bei der Ischämie nochmals dargestellt.

Abbildung 1 Neurotoxische Kaskade beim ischämischen Hirnschaden

(mod. nach de Keyser) <sup>6</sup>

Durch die Ischämie kommt es im Gehirn, im Ermangelung von glykolytischen Reserven, zu einem Verbrauch von ATP innerhalb weniger Minuten. Da zahlreiche Ionenpumpen ATP-abhängig arbeiten, kommt es daraufhin zu einer fehlenden Repolarisation der Neuronen und Anstieg von Kalium; Calcium und Glutamat im Extrazellulärraum. Diese Depolarisation und fehlender Glutamatuptake stimuliert einerseits spannungsabhängige Ionenkanäle und depolarisiert die Zellen weiter. Depolarisation entfernt den  $Mg^{2+}$ -Block an NMDA-Rezeptoren und aktiviert diese dadurch. Das erhöhte intrazelluläre Calcium aktiviert mehrere Stoffwechselwege, die letztendlich zu einer Erhöhung von neurotoxischen freien Radikalen und Aktivierung von Nukleasen, Lipasen und Proteasen führt. Kommt es zu Reperfusion, wird dieser „Burst“ von freien Radikalen noch verstärkt und das Gewebe wird zusätzlich von einer inflammatorischen Reaktion (v.a. Leukozyten-Endothelinteraktion in der Mikrozirkulation) geschädigt.

## 2 Literaturübersicht

Hypoxietoleranz, am Gehirn als Modell erst seit einigen Jahren etabliert, ist ein Phänomen, welches derzeit intensiv Gegenstand in der Hypoxieforschung ist. Beginnend von rein phänomenologischer Beschreibung, haben sich die Inhalte in den letzten Jahren zunehmend auf die Beschreibung der zugrundeliegenden Mechanismen, vor allem auf genetischer und molekularer Ebene verschoben. Im folgenden soll subjektiv versucht werden, den derzeitigen Wissensstand zu beschreiben im Kontext der darauffolgenden Ergebnisse.

### 2.1 Hypoxietoleranz am Herzen

Ein herausragendes Merkmal von Zellen, Organen und Organismen ist die Fähigkeit, das interne zelluläre Milieu an chemische und physikalische Veränderungen der Umwelt anzupassen oder zu adaptieren. Mit dieser Strategie sind Zellen in der Lage, Stressoren zu überleben, die ansonsten letale Schäden verursachen würden. Dieser Gedanke wurde erstmals 1943 formuliert<sup>7</sup>. Sauerstoff, als Elektronengeber der oxidativen Phosphorylierung, der wesentlichen zellulären Energiequelle, spielt hierbei eine besondere Rolle. Zellen können, abhängig vom umgebenden Sauerstoffpartialdruck, eine Vielzahl von Reaktionen zeigen, von Stoffwechsel- bis hin zu Strukturveränderungen. Während phylogenetisch ältere Organismen, wie Schildkröten oder bestimmte Fische konstitutionell eine hohe Resistenz gegenüber Hypoxie besitzen, kommt es bei den meisten Säugetieren, abhängig von Alter und Temperatur, nach einer Anoxiezeit von 5-30 Minuten in den meisten Organen, vor allem aber im Gehirn, Leber und Herz zu irreversiblen Schäden.

Bei einer Hypoxie oder Ischämie, besitzt der Organismus mindestens 5 physiologische Adaptationsmechanismen, um das Verhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Verbrauch zu regulieren:

1. Sauerstoffsensible Neuronen im Glomus der Karotisbifurkation sind die dopaminergen Afferenzen des IX. und X. Hirnnerven und vermitteln einen

Abfall des arteriellen  $pO_2$  über den Nucleus tractus solitarius an zentrale sympathische Kerne im Hirnstamm. Über den Tractus bulbospinalis in der intermediolateralen Säule führen Efferenzen präganglionärer sympathischer Neurone zu den sympathischen Ganglien, wo sie auf postganglionäre sympathische Nerven umgeschaltet werden, die zur Aktivierung der Motoneurone des kardiovaskulären und pulmonalen Systems führt, was sich klinisch in erhöhter Herz- und Atemfrequenz zeigt (hypoxic ventilatory response).

2. Sauerstoffsensoren in den Pulmonararterien und -arteriolen führen zu einer Vasokonstriktion und passen somit die Ventilation der Perfusion an (hypoxic pulmonary vasoconstrictor response)

3. VEGF (vascular endothelial growth factor) wird in vielen Gefäßen und Geweben nach einer Hypoxie exprimiert und führt zu einer Angiogenese (vor allem im Herz und im Skelettmuskel).

4. In der Nierenarterie führt ein Absinken des  $pO_2$  über die Freisetzung von Erythropoetin innerhalb von wenigen Stunden bis Tagen zum Ausschwemmen von Erythrozyten aus dem Knochenmark, um die Anzahl der Sauerstoffträger im Blut zu erhöhen.

5. Ein Absinken des  $PO_2$  führt ebenso innerhalb von Sekunden bis Minuten zu einer Dilatation von arteriolären Widerstandsgefäßen. An dieser hypoxischen Vasodilation sind vermutlich ATP-abhängige  $K^+$ -Kanäle ( $K_{ATP}$ ) an glatten Muskelzellen der Gefäße, Stickstoffmonoxyd (NO) und möglicherweise Adenosin beteiligt<sup>8</sup>.

Diese 5 physiologischen Mechanismen sind seit vielen Jahren, v.a. in der physiologischen und Sportmedizin gut bekannt. Wenn jedoch der Abfall des  $pO_2$  im arteriellen Blut zu rasch oder zu stark ist oder es zu einer globalen Ischämie kommt, werden diese Systeme den akuten Sauerstoffmangel nicht ausreichend kompensieren können. In den letzten 10 Jahren wurde deutlich, daß unter diesen Umständen quasi als 6. Mechanismus einzelne, ansonsten extrem hypoxieempfindliche Organe Hypoxietoleranz entwickeln können. Wird ein Gewebe hierbei einer kurzzeitigen Hypoxie ausgesetzt, welche noch zu keinem morphologischen Schaden führt, scheinen sich die Zellen bei erneuter Hypoxie an diesen Stimulus „erinnern“ zu können und sind in der

Lage, über bislang nicht genauer geklärte Mechanismen eine längerdauernde Hypoxie mit einem wesentlich geringerem oder keinem Schaden zu überleben. Erste systematische Arbeiten hierzu stammen aus der experimentellen Kardiologie.

### 2.1.1 Experimentelle Studien

Reimer konnte 1986 zeigen, daß vier, je 10 Minuten dauernde Episoden myokardialer Ischämie bei Hunden zu keinem kumulativem ATP-Abfall und zu keinem Myokardschaden führten, wogegen 40 Minuten Ischämie einen massiven Zelluntergang nach sich zogen<sup>9</sup>. In einer daran anschließenden Arbeit, die als Beginn der Hypoxietoleranzforschung bezeichnet werden kann, konnte gezeigt werden, daß paradoxerweise eine Konditionierung mit 4, je 5 Minuten dauernden Myokardischämien (durch Verschuß der Koronararterien) vor einer 40 minütigen Myokardischämie nur 25 % des Zellschadens ohne Vorbehandlung zeigten<sup>10</sup>. Dieses Phänomen wurde fortan „ischämische Präkonditionierung“ oder „Hypoxietoleranz“ genannt und konnte auch in verschiedenen anderen Geweben, wie Leber<sup>11,12</sup>, Lunge<sup>13</sup> Darm<sup>14</sup>, Skelettmuskel<sup>15,16</sup>, Niere<sup>17</sup> sowie verschiedenen Spezies, wie Schweinen, Kaninchen, Ratten und isolierten humanen Kardiomyozyten gezeigt werden<sup>18-20</sup>. Der protektive Effekt konnte dabei durch histologische, funktionelle und biochemische Parameter nachgewiesen werden.

Hypoxietoleranz am Herzen entwickelt sich in mindestens zwei verschiedenen „Fenstern“, welche sich durch den zeitlichen Ablauf und mögliche zugrundeliegenden Mechanismen unterscheiden lassen.

Ein erstes Zeitfenster zeigt sich klassischerweise in einem Intervall nach einigen Minuten zwischen „präkonditionierender“ und längerdauernder Ischämie und hält für weitere 60-120 Minuten. Hierbei wurde v.a. die Rolle von Adenosin-Rezeptoren, ATP-abhängigen Kaliumkanälen<sup>20-22</sup> und Hitze-Schock-Proteinen<sup>23</sup> untersucht. Ein zweites, verzögertes Zeitfenster besteht (abhängig vom Modell) nach etwa 24 Stunden und bietet für ca. 1-2 weitere Tage einen verzögerten Schutz. Diese Phase der Hypoxietoleranz scheint, wie die klassischen Streßreaktionen transskriptionell reguliert, von *de novo* Proteinsynthese abhängig zu sein<sup>24-26</sup>.

Hypoxietoleranz ist nicht nur durch Hypoxie selbst, sondern auch durch andere kardiale Stressoren, wie Volumen- oder Katecholamininfusion<sup>27,28</sup>, Acetylcholin<sup>29</sup>, inflammatorische Stimuli wie Zytokine durch Endotoxine oder Hyperthermie/Hypothermie<sup>25,30-32</sup> induzierbar.

### 2.1.2 Klinische Studien

Ausgehend von den experimentellen Daten, dauerte es (sicher auch aufgrund ethischer Überlegungen) jedoch bis 1993, bis erste klinische Hinweise über Ischämietoleranz des menschlichen Herzens gezeigt werden konnten. Yellon et al.<sup>33</sup> führte zwei kurze, je drei Minuten dauernde Myokardischämien vor einer längerdauernden Abklemmung der Koronararterien bei Bypassoperationen durch. Trotz einem rapidem ATP-Abfall (in der Myokardbiopsie) in der präkonditionierten Gruppe, war nach einer 10 minütigen, zweiten Ischämie der ATP Gehalt höher als in der nicht präkonditionierten Gruppe.

Bei Patienten, die im Rahmen eines aorto-koronaren Bypasses ischämisch präkonditioniert wurden, konnte in einer randomisierten Studie ein geringerer Troponinanstieg (als Hinweis für Myokardzellschaden) gezeigt werden<sup>34</sup>. In der Arbeit von Musumeci<sup>35</sup> wurden transkranielle Doppleruntersuchungen und eine neuropsychologische Testbatterie einbezogen. Obwohl bei intermittierendem coronaren clamping die Ischämiezeiten länger waren, kam es nicht zu mehr neurologischen Komplikationen. Andere Arbeiten, die ebenfalls Patienten während Bypass-Operationen untersuchten, konnten auch die Verbesserung weiterer funktioneller Parameter, wie Thoraxschmerzen, ischämische EKG-Veränderungen, Ventrikelmotilität (Echokardiographie) und Laktatproduktion als Hinweis auf einen geringeren Myokardzellschaden nach Präkonditionierung nachweisen<sup>36,37</sup>.

Während diese klinisch-interventionellen Arbeiten methodenbedingt vor allem das kurze Zeitfenster untersuchten, konnte in einer retrospektiven Analyse der Daten einer großen Thrombolyse-Studie 1995 erstmals gezeigt werden, daß auch Patienten mit einer prodromalen reversiblen Myokardischämie (Angina pectoris) vor einem Myokardinfarkt einen günstigeren klinischen Verlauf, kleinere Infarkte (CK-Anstieg; EKG-Veränderungen), eine geringere

Mortalitätsrate hatten sowie seltener eine manifeste Herzinsuffizienz oder Schock erlitten<sup>38</sup>. Diese Ergebnisse konnten darauffolgend in 2 weiteren ähnlichen Studien bestätigt werden<sup>39,40</sup>. Auch in einem weiteren humanen Organ zeigten sich nun Hinweise für Hypoxietoleranz: ein Herzkreislaufstillstand des Organspenders vor Lebertransplantation beeinflusst die Leberfunktion nach Transplantation nicht ungünstig. Es sind sogar signifikant geringere Leberwerte, als Parameter für einen hypoxischen Leberschaden in diesen Organen nachweisbar, ein Befund der mit hypoxischer Präkonditionierung der menschlichen Leber vereinbar ist<sup>41</sup>.

## 2.2 Hypoxietoleranz am Gehirn

Entscheidende Parameter in jedem Hypoxietoleranzmodell sind die Anzahl, Dauer und Art des „präkonditionierenden“ Stimulus, die Dauer der „letalen“ oder „Testischämie“, das zeitliche Intervall zwischen den beiden Ischämien sowie das verwendete Hypoxiemodell (globale vs. fokale Ischämie; brain slice, Zellkultur). Weitgehend unbeachtet wurde bereits 1964 in einem globalen Hypoxiemodell Hypoxietoleranz am Gehirn beobachtet<sup>42</sup>. 1986 wurden von Schurr elektrophysiologische Hinweise Hypoxietoleranz im akuten Hirnschnitt beobachtet<sup>43</sup>. Auch diese Arbeit fand wenig Beachtung.

### Globale Ischämie - CA1-Protektion

Bis heute die globale Hypoxie das Modell, an dem die meisten Untersuchungen zur Hypoxietoleranz erfolgten. Die ersten systematischen *in vivo* Untersuchungen erschienen 1990, 4 Jahre nach den ersten Untersuchungen am Herzen. In einem gut etablierten Tiermodell der globalen Ischämie konnten Kitagawa et al. an Gerbils (mongolische Wüstenspringmäuse) zeigen, dass 2, jeweils 2 Minuten dauernde Kompressionen der Arteria carotis communis (CCAO) einen Schutz von mehr als 90 % gegen eine 5 Minuten dauernde Ischämie 48 Stunden später erbrachten. Der Schaden wurde hier 7 Tage später anhand der Zelldichte in der CA1-Region des Hippocampus beurteilt. Der Schutz war in geringerer Ausprägung auch durch eine einzige Ischämie 24 oder 48 Stunden zuvor

induzierbar, nicht jedoch, wenn die Ischämie nur eine Minute dauerte<sup>44</sup>. In einer darauffolgenden Arbeit derselben Arbeitsgruppe, und in zahlreichen weiteren Publikationen konnte Hypoxietoleranz im gleichen Modell bestätigt werden und auch in anderen Hirnregionen, wie im Cortex und in den Basalganglien nachgewiesen werden<sup>45</sup>. Das Ausmaß des Schutzes durch einen endogenen Mechanismus wie Hypoxietoleranz war beeindruckend und übersteigt die meisten bekannten pharmakologischen neuroprotektiven Ansätze. Außer im histologischen Bild war in anderen Untersuchungen der protektive Effekt auch durch eine Verbesserung von elektrophysiologischen Parametern<sup>46,47</sup>, durch on-line Videomikroskopie mit spannungsabhängigen Farbstoffen in brain slices (Taga; Shimoji; persönliche Mitteilung) oder semiquantitativ in Paresegraden<sup>48</sup> nachweisbar. Hypoxietoleranz zeigte sich zudem, altersunabhängig, auch in älteren Versuchstieren<sup>49</sup>. Unklar bleibt bei den globalen Ischämie-Modellen bislang jedoch, ob der histologische Schutz auch zu einer funktionellen Besserung von hippocampalen Funktionen, z.B. in Lern und Gedächtnistests führt<sup>50</sup> (s.a. Tabelle 4).

#### Fokale Ischämie - Infarkt volumenreduktion

Auch bei fokaler Ischämie, die sich methodisch, klinisch und histologisch von der globalen Ischämie unterscheidet<sup>51</sup>, konnte Hypoxietoleranz gezeigt werden, hier allerdings vorwiegend im Cortex und zu einem geringeren Ausmaß<sup>48,52-54</sup> (ca. 20 - 60% Schadensreduktion; s.a. Tabelle 5). Auch im akuten Hirnschnittmodell sowie in neuronalen Zellkulturen konnte bei hypoxischer<sup>55-58</sup> und pharmakologischer Präkonditionierung<sup>59-61</sup> Hypoxietoleranz gezeigt werden. In Tabelle 6 sind hierzu einige Arbeiten zusammengestellt.

Der Frage warum Neuroprotektion durch Hypoxietoleranz nach globaler Ischämie deutlicher ist als bei fokaler Ischämie, kann derzeit nicht beantwortet werden. Eine Erklärungsmöglichkeit könnte sein, dass Hypoxietoleranz ein vorwiegend neuronales Phänomen ist. Somit würde sich die Protektion deutlicher in Paradigmen zeigen, die einen vorwiegend neuronalen Schaden induzieren; Auch bei fokaler Ischämie zeigte sich, dass der Schutz im Cortex grösser war als im Marklager<sup>62</sup>.

### 2.2.1 Mechanismen

Die Entwicklung von Hypoxietoleranz kann grob in drei Phasen eingeteilt werden<sup>63</sup>: Im ersten Schritt kommt es zur Detektion des Sauerstoffmangels bzw. der Ischämie (Signalinduktion). In einem zweiten Schritt muß die Zelle das hypoxische Signal erkennen und umsetzen (Signaltransduktion) um in einem dritten Schritt Toleranz entwickeln zu können (Protektion). Bislang nicht eindeutig geklärt ist hierbei, wie Neuronen Hypoxie detektieren.

#### Mechanismen in der Induktionsphase

Während der Präkonditionierung scheint die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zwingend erforderlich zu sein, da durch Gabe von NMDA-Antagonisten die Entwicklung der Hypoxietoleranz *in vivo*, in brainslices und in gemischten glialen-neuronalen Kulturen geblockt werden kann<sup>64-66</sup>, was jedoch nicht in allen Modellen bestätigt werden konnte<sup>67</sup>. NMDA-Rezeptoraktivierung führt zu Calciumeinstrom und Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen neuronalen NO-Synthase. Somit kommen  $Ca^{2+}$  und NO als "second-messenger" in der Induktionsphase in Betracht<sup>68,69</sup>. Neuere Untersuchungen zeigen, dass sich der NMDA-Rezeptor über Proteine wie dem PSD-95 oder SAP-90 mit Proteinkinasen assoziieren kann<sup>70</sup>, was die Hypothese eröffnet, dass die Induktions- und Transduktionsphase innerhalb eines einzigen grossen Multiproteinkomplexes ablaufen kann.

Eine bislang wenig beachtete Hypothese ist, dass möglicherweise auch andere Ionenkanäle, die sozusagen die „Schnittstelle“ zwischen extra- und intrazellulärem Milieu darstellen, eine wichtige Rolle spielen können. Die Leitfähigkeit von Natrium- und Kaliumkanälen kann sich abhängig vom Sauerstoffpartialdruck verändern, daß es bei Hypoxie zu einem reduzierten Ausstrom von Natrium und Einstrom von Kalium kommt und somit der konsekutive Energieverbrauch durch die Na-K-ATPase reduziert werden kann<sup>71</sup>. Unklar bleibt hierbei, ob diese Veränderungen durch  $O_2$  selbst oder

durch andere, sekundäre Vorgänge, wie ATP-Abfall, Anstieg von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  oder pH-Veränderungen ausgelöst werden.

### Mechanismen in der Transduktionsphase

Drei Molekülklassen sind in der Phase der intrazellulären Signaltransduktion auf molekularer und genetischer Ebene von besonderem Interesse:

1. Kinasen sind Proteine, welche durch Phosphorylierung die Aktivität anderer Proteine in der Ischämietoleranz beeinflussen können<sup>72,73</sup>. Sie sind damit ideal zur intrazellulären Signaltransduktion auf molekularer und genetischer Ebene geeignet, da sie sowohl die Aktivität von Ionenkanälen als auch, über Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression steuern können. Hypoxie-abhängige Kinasen oder Stimulation der Proteinkinase C nach Aktivierung von Adenosinrezeptoren<sup>74</sup> könnten somit die Signale sowohl für die frühe als auch die späte Hypoxietoleranz weiterleiten.

Einer Hypothese von Shamloo und Wieloch zufolge kommt es zu einer gestörten posthypoxischen Signaltransduktion beispielsweise durch persistierende Phosphorylierung von Ionenkanälen oder Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Möglicherweise normalisiert sich das Phosphorylierungsmuster in präkonditionierten Hirnarealen nach Hypoxie rascher wieder und trägt somit zu einer rascheren Normalisierung der second-messenger Systeme bei. Eine persistierende Phosphorylierung von Tyrosinresten an NR2-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors nach Hypoxie ist nach einer vorangegangenen Hypoxie nicht vorhanden<sup>72</sup>. Eine veränderte Phosphorylierung der Calcium/Calmodulin protein kinase II<sup>75</sup>, Aktivierung von MAP-Kinasen<sup>73</sup> oder AP-1<sup>76</sup> nach Präkonditionierung konnte auch nachgewiesen werden.

ERK-Proteine gehören, wie auch p38 zu der Familie der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) welche in komplexen Kaskaden Transkriptionsfaktoren oder Elemente der Proteinsyntheseapparates (wie den Initiationsfaktor eIF-4E) phosphorylieren können. ERK-Kinasen und ERK-Kinasen-Kinasen, aber nicht c-jun N-terminale Proteinkinasen (JNKs) werden nach einer kurzen Ischämie aktiviert, normalisieren sich nach einer längerdauernden Ischämie jedoch rascher wieder<sup>73,77</sup>. Die Aktivierung der

ERK während Präkonditionierung ist vermutlich auch NMDA und möglicherweise NO-abhängig während die Phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K)<sup>69</sup> nicht zu beteiligt sein scheint.

Eine persistierende Aktivierung eines anderen Vertreters der MAP-Kinasen, der c-JUN N-terminalen Proteinkinase (JNKs) konnte jedoch nach Präkonditionierung nicht nachgewiesen werden was möglicherweise auf eine protektive Rolle der ERKs und eine schädliche Aktivierung der JNKs hinweisen könnte<sup>77</sup>.

2. Transkriptionsfaktoren wandern nach Aktivierung in den Nukleus ein, binden an eine DNA-Konsensussequenz und aktivieren die Transkription<sup>78</sup>. Eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion und möglicherweise auch als Effektormechanismen kommt Transkriptionsfaktoren zu, die in Folge von Hypoxie oder Reoxygenation aktiviert werden können. Sind diese Transkriptionsfaktoren konstitutiv exprimiert, können sie das Hypoxiesignal in eine genomische Antwort umsetzen. Werden daraufhin Gene exprimiert, die wiederum als Transkriptionsfaktoren agieren, wie dies für *immediate early* Gene wie *fos* und *jun* der Fall ist, können sie mittels ihrer Genprodukte (c-FOS, FOS-B bzw. c-JUN, JUN-B oder JUN-D) kaskadenförmig eine gezielten zelltypabhängige Genexpression vermitteln. Astrogläre Zellen und auch Neuronen exprimieren hypoxie-sensible Proteine, wie den Transkriptionsfaktor HIF-1 (hypoxia-inducible-factor-1), der nach Aktivierung im Zytosol in den Zellkern transmigriert, um dort die Transkription von verschiedenen hypoxie-responsiblen Genen, z.B. der Glycolyse; Glucose-Transportern oder Wachstumsfaktoren wie VEGF oder FGF zu initiieren<sup>79,80</sup>. HIF-1 wird nach hypoxischer Präkonditionierung aktiviert<sup>79</sup> und pharmakologische Induktion von HIF-1 mit Kobaltchlorid oder Desferrioxamine ist neuroprotektiv<sup>81</sup>. c-FOS, c-JUN sowie NF-κB sind weitere Beispiele von Transkriptionsfaktoren, die mit Hypoxietoleranz in Verbindung gebracht wurden<sup>78,82</sup>.

3. Immediate early genes (wie der *fos/jun*-Komplex) werden nach verschiedensten Stimuli rasch und transient exprimiert und können selbst

wieder als Transkriptionsfaktoren protektive Gene aktivieren<sup>83</sup>. Beispielsweise bilden 2 JUN-Moleküle einen protektiven AP-1-Komplex und als Heterodimer mit c-FOS einen destruktiven AP-1-Komplex. Dass die Aktivierung von AP-1, z.B. durch Präkonditionierung protektiv sein kann, wurde kürzlich nachgewiesen<sup>76</sup>.

Die Rolle von freien Radikalen, wie NO (nitric oxide; Stickstoffmonoxyd) als „second-messenger“ der Hypoxietoleranz ist widersprüchlich bzw. es ist unklar in welchen Schritten der Hypoxietoleranz NO eingreift: In einem Modell mit neonatalen Ratten hatte Blockade der neuronalen NO keinen Einfluss auf hypoxische Präkonditionierung, jedoch Blockade der endothelialen NO mit L-Nitroarginine (L-NA)<sup>67</sup>, möglicherweise auch bei der Präkonditionierung mit LPS<sup>84</sup>. NO könnte auch als Effektor wirken, Hinweise für eine verminderte NO-Produktion im präkonditionierten Gehirn wurden diskutiert<sup>85</sup>. Hypoxische Präkonditionierung in brain slices konnte durch NO-Donoren simuliert werden und durch NO-Inhibitoren geblockt werden<sup>86</sup>. Auch im Skelettmuskel wurde eine NO-abhängige Präkonditionierung gezeigt<sup>16</sup>.

### Biochemisch-energetische Hypothese

*In vivo* Modelle zeigten, daß es in präkonditionierten Hirnarealen zu einem langsameren intrazellulärem Sauerstoffabfall und es damit zu einer verzögerten ATP-Depletion kommt<sup>42,87</sup>, allerdings scheint die anoxische Depolarisation<sup>88</sup>, als Marker für den neuronalen Energiestatus nach Präkonditionierung nicht verzögert zu sein, zumindest in akuten Hirnschnitten<sup>47</sup>. Posthypoxische NADH-Anstiege zeigen eine Störung der oxidativen Phosphorylierung (Komplex I) an und sind nach Präkonditionierung reduziert<sup>89,90</sup>. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind unklar. Möglicherweise kommt es in präkonditionierten Hirnarealen zu einer verminderten Inanspruchnahme von endergonischen Prozessen (pilot-light Hypothese<sup>3</sup>).

### Mechanismen in der Effektorphase

Im präkonditionierten Gehirn kommt es zu einer verminderten posthypoxischen Freisetzung von freien Radikalen als möglichen Schadensmediatoren, was vereinbar ist mit einer Induktion von antioxidativen Systemen<sup>53,90</sup>. Nach Präkonditionierung konnten bei Gerbils im globalen Hypoxiemodell reduzierte Marker für oxidativen DNA und Proteinschaden beobachtet werden<sup>91</sup>. Keinen Einfluss auf die Entwicklung der Hypoxietoleranz haben systemphysiologische Parameter wie Temperatur oder Veränderungen im zerebralen Blutfluss<sup>50,72,92-94</sup>.

Am Herzen wurde diskutiert, ob Hypoxietoleranz auch durch Rekrutierung von Kollateralkreisläufen alleine erklärt werden kann. Am Gehirn sind hierzu bislang keine Untersuchungen bekannt.

Neuere Ergebnisse weisen auf eine grosse Bedeutung der Mikrozirkulation in der Ischämietoleranz hin. Die Mikrozirkulation ist in hypoxie-"toleranten" Ratten erhalten, möglicherweise durch anti-inflammatorische oder antioxidative Einflüsse auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion<sup>95</sup> und auch eine Rolle der endothelialen Isoform der NO-Synthase konnte gezeigt werden<sup>68</sup>.

Die molekularen Mechanismen der Induktions- und Transduktionsphase bei Hypoxietoleranz sind bislang erst ansatzweise verstanden. Der zeitliche Verlauf hingegen bis zur Effektorphase, also der eigentlichen Entwicklung von Hypoxietoleranz, ist hingegen in zahlreichen Untersuchungen gezeigt worden, wobei sich ein gemeinsames Muster erkennen lässt analog zu der Situation am Herzen, lassen sich auch am Gehirn 2 zeitlich und molekular unterschiedliche Intervalle oder Zeitfenster abgrenzen:

#### „Frühes“ Zeitfenster

In einer frühen Abwehrphase (ca. 5 – 30 Minuten) versuchen Zellen möglicherweise durch Reduktion von energieintensiven Stoffwechselvorgängen und Verwendung von alternativen Energiequellen wie der Glycolyse das Verhältnis zwischen Energieverbrauch und Angebot

wiederanzupassen<sup>3,42</sup>. Diese Phase wurde als „klassische Präkonditionierung“ bezeichnet und zeigt sich auch *in vivo* und *in vitro* am Gehirn.

Die Mechanismen der klassischen Präkonditionierung wurden vorwiegend von Pérez-Pinzón an brain-slices untersucht. Calciumeinstrom ist in der Induktionsphase erforderlich<sup>96</sup>. Die hypoxische Präkonditionierung kann durch NO-Donoren simuliert werden und durch NO-Inhibitoren geblockt werden<sup>86</sup>.

Eine maximale Protektion zeigte sich im Hirnschnitt (*in vitro-in vitro*-Modell) und in der Kultur bei einem Intervall von 1-2 Stunden<sup>43</sup>.

Bis vor kurzem war nicht klar ob das kurze Zeitfenster auch bei fokal-fokaler Präkonditionierung existiert<sup>97</sup>. Pérez-Pinzón zeigte jedoch, dass eine 2 Minuten dauernde Okklusion der Arteria carotis communis (CCAO), nur 30 Minuten vor 10-minütiger CCAO bei Ratten *in vitro* eine Schadensreduktion in der CA1-Region von 70-90% nach 3-7 Tagen (*in vivo-in vitro*-Modell)<sup>98</sup>, die Mechanismen dieses Schutzes sind jedoch unklar. In einer wegweisenden Arbeit von Stagliano et al. konnte Hypoxietoleranz auch im kurzen ("klassischem") Zeitfenster auch *in vivo* bei Mäusen<sup>94</sup> in neuronalen Kulturen<sup>61</sup> und auch *in vitro* an hypoxischen Hirnschnitten beobachtet werden.

Adenosin und die Aktivierung von Adenosinrezeptoren spielen, wie am Herzen, auch bei der Hypoxietoleranz im Gehirn eine wichtige Rolle. Adenosin-Antagonisten schwächen den Effekt einer hypoxischen Präkonditionierung ab, Agonisten oder Hemmer der Adenosinwiederaufnahme hingegen verstärken sie. Der Adenosinmechanismus konnte *in vivo*<sup>99,100</sup>, in brain slices<sup>101</sup> und in neuronalen Kulturen<sup>61</sup> gezeigt werden. Adenosin selbst zeigt neuroprotektive Eigenschaften *in vivo*<sup>102</sup> und in neuronalen Kulturen<sup>103,104</sup>.

ATP-abhängige Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ ) öffnen sich bei ATP-Abfall und führen so zu einer Hyperpolarisation. Dies könnte eine einfache Erklärung für Protektion im frühen Zeitfenster bieten: solange ATP noch erniedrigt ist, tritt durch die Hyperpolarisation ein „spike arrest“ durch Hemmung der spannungsabhängigen Ionenkanäle ein. Die Zelle depolarisiert, und verbraucht keine Energie, um über die Na-K-ATPase das Ruhepotenzial

wiederherzustellen. Im akuten Hirnschnittmodell der "klassischen Präkonditionierung" kann Toleranz durch Agonisten von  $K_{ATP}$  simuliert werden und hypoxische Präkonditionierung durch Antagonisten (i.d.R. Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid oder Tolbutamid, welche mit Membranproteinen interagieren und die  $K_{ATP}$  hemmen) geblockt werden<sup>105</sup>. Möglich ist auch eine Aktivierung über eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase C, obwohl einige Autoren hierfür keine Hinweise fanden<sup>105,106</sup>. Die Abhängigkeit der Hypoxietoleranz von diesem Mechanismus konnte auch in neuronalen Kulturen gezeigt werden.

#### „Spätes“ Zeitfenster und genomische Mechanismen

Eine zweite Phase, oder verzögerte Hypoxietoleranz, kann allgemein als Rettungsphase (salvage) der Zelle bezeichnet werden. Diese Phase entsteht nach 12-24 Stunden, hat ihr Maximum vermutlich am 2.-4. Tag und nimmt ab dem 5. Tag wieder ab<sup>3,53,107-109</sup>.

Auch die verminderte Freisetzung von Glutamat, Änderungen des RNA-editings<sup>110,111</sup> des NMDA Rezeptors nach Präkonditionierung erscheinen denkbar. Diese Mechanismen könnten eine postischämische Überaktivierung von NMDA-Rezeptoren verhindern<sup>47</sup>. In unreifen neuronalen Kulturen kommt es nach Hypoxie zur Freisetzung von bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) als möglichen Mediator der Hypoxietoleranz<sup>55</sup>, in Gehirnen von adulten Tieren gibt es jedoch derzeit keine bzw. negative Hinweise für die Rolle von Wachstumsfaktoren als Effektoren von Hypoxietoleranz<sup>112</sup>.

Zahlreiche Hinweise deuten vielmehr darauf hin, daß es im späten Fenster der Hypoxietoleranz, transskriptionell reguliert, zur genomisch gesteuerten Veränderung des Expressionsmusters ganzer Proteingruppen kommt. Unklar ist bislang, ob dabei neurotrophe oder neuroprotektive Proteine vermehrt, oder potentiell schädliche Proteine vermindert exprimiert oder aktiv degradiert werden.

### Hitzeschockproteine

Mehrere Kandidaten kommen in der genomischen Phase der Hypoxietoleranz in Frage. Möglich erscheint die Expression von Hitzeschock-Proteinen (HSP's). Diese Proteinfamilie zeigt neuroprotektive Eigenschaften, vermutlich durch Elimination von während oder nach Ischämie denaturierten Proteinen. HSP's werden in einem Zeitrahmen exprimiert, in dem auch Hypoxietoleranz beobachtet werden kann. Hinweise gibt es für <sup>84,91,108,113</sup> und HSP-27 <sup>54</sup>, jedoch vorwiegend in Gliazellen <sup>114</sup>.

Ubiquitin, ein niedermolekulares HSP, konnte in der CA1-Region im 72 Stunden Intervall nach hypoxischer Präkonditionierung, 48 Stunden nach Testischämie wieder vermehrt nachgewiesen werden <sup>115</sup>. Insgesamt gibt es jedoch für die Rolle der HSP's, mit wenigen Ausnahmen <sup>116</sup> nur indirekte Hinweise. Zudem tritt Hypoxietoleranz auch unabhängig von der Expression von HSP's auf <sup>117,117-119</sup>.

Möglich erscheint auch eine Beteiligung des Proto-Onkogenes c-JUN <sup>83,120</sup>, des anti-apoptotischen Proteines BCL-2 <sup>121</sup> oder einer vermehrten Expression von antioxidativen Proteinen, wie der Superoxiddismutase (SOD) <sup>122</sup>. Transgene Mäuse, welche die Cu/Zn-SOD vermindert exprimieren, zeigen verminderte Toleranz gegenüber repetitiver Hypoxie <sup>123</sup>. P53 ist ein Tumor-Suppressor, der vermutlich als Transkriptionsfaktor wiederum die Expression einer Reihe von anderen Genen reguliert. P53 mRNA und Protein wird nach einer präkonditionierenden Ischämie in der CA1-Region herunter reguliert <sup>124</sup>. Vorwiegend in Gliazellen kommt es nach Hypoxie zur Expression der Protein-disulfide isomerase (PDI), welche über unbekannte Mechanismen Apoptose in Hippocampus CA1-Neuronen hemmt <sup>125</sup>.

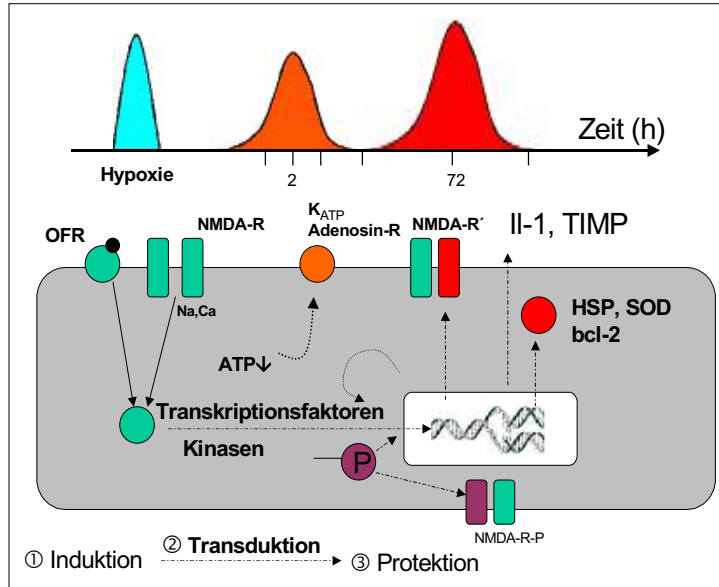
Nach einer Ischämie werden zahlreiche Proteasen aktiviert, die an der funktionellen Inaktivierung von Membranrezeptoren und intrazellulären Proteinen und Organellen beteiligt sind. Ob ein verändertes Expressionsmuster von Proteasen oder deren Inhibitoren bei Hypoxietoleranz beteiligt ist, ist bislang im Detail unklar, aber plausibel. Der Gewebsinhibitor der Matrixmetalloproteinase-1 (TIMP-1) wird nach

Hypoxietoleranz vermehrt exprimiert<sup>126</sup> und auch eine differentielle Rolle der Protease Thrombin in niedrigen Konzentration wird diskutiert<sup>127,128</sup>.

Neuerdings wurde versucht, mittels subtraktiver Verfahren oder serieller Analyse der Genexpression (SAGE) die komplexe genetische Antwort nach Präkonditionierung zu erfassen<sup>129</sup>. Bislang konnten durch diese Verfahren weitere Kandidatengene, wie der Gewebsinhibitor der Matrixmetalloproteinase-1 (TIMP-1) erfasst werden<sup>126</sup>.

Abbildung 2 stellt die derzeit vermuteten Mechanismen der Hypoxietoleranz dar. Eine Literaturübersicht zu den verschiedenen Modellen der Hypoxietoleranz geben die Tabellen 4-6.

**Abbildung 2 Mechanismen der Ischämietoleranz**



Legende: Ein kurzer präkonditionierender ischämischer Stimulus führt zu einer Aktivierung des NMDA-Rezeptors. Der ATP-Abfall aktiviert innerhalb des kurzen Zeitfensters ATP-abhängige Kaliumkanäle und Adenosinrezeptoren und führt zu einer Hyperpolarisation und Neuroprotektion während einer darauffolgenden Ischämie. Gleichzeitig werden Kinasen und Transkriptionsfaktoren aktiviert, die die Genexpression hypoxieabhängiger Gene beeinflussen oder die Phosphorylierung von Proteinen verändern. Während einer zweiten, längerdauernden Ischämie führt eine veränderte Zusammensetzung von Membranrezeptoren oder ein erhöhter Spiegel von Antioxidantien zu einem reduzierten Schaden nach Ischämie. NMDA : N-methyl-D-aspartat: exzitatorischer Neurotransmitter; AMPA: alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionat; K(ATP) : ATP-abhängige Kaliumkanäle; HSP : Hitzeschockproteine; SOD: Superoxiddismutase; TIMP-1: tissue inhibitor of metalloproteinase; IL-1: Interleukin 1; PDI: protein disulfide isomerase; OFR: oxygen free radicals; NMDA-R' und NMDA-R-P: Veränderung von Untereinheiten oder Phosphorylierung des NMDA-Rezeptors.

Tabelle 3 Mechanismen der Ischämietoleranz

1. Induktion	2. Transduktion	3. Protektion (und Funktion)
NMDA-R. <sup>64,66</sup> Ca <sup>2+</sup> ; NO <sup>68,69</sup> Adenosin; K <sub>ATP</sub> <sup>99</sup>	Proteinkinasen: erk <sup>69</sup>  Transkriptionsfaktoren: JUN <sup>83,120</sup> NF-κB <sup>82</sup> HIF-1 <sup>79,81</sup> AP-1 <sup>78</sup> , zif-268 <sup>48,76</sup>  Immediate early genes: <i>c-fos</i> <sup>48</sup>  Zytokine: IL-1 <sup>48</sup> TNF/Ceramid <sup>130</sup>	Hitzeschockproteine: HSP70 <sup>116</sup> Ubiquitin <sup>115</sup> (Disulfide Isomerase <sup>125</sup> )  Antioxidantien: SOD <sup>122,131</sup> Metallothionein II <sup>129</sup>  Neuroprotektion: TIMP-1 <sup>126</sup>  Anti-apoptotisch: bcl-2 <sup>121</sup>

Legende: s.a. Abkürzungsverzeichnis; NMDA-R: NMDA-Rezeptor;

### Parakrine Hypothese

Wie kann nun eine mehrere Tage dauernde Neuroprotektion durch Genexpression erklärt werden? Die Transkription und Translation alleine dauert unter physiologischen Bedingungen nur einige Stunden. Wahrscheinlich sind in der Effektorphase kaskadenartig mehrere Zyklen hintereinandergeschaltet, beispielsweise durch die Expression von IEGs, die selbst als Transkriptionsfaktoren sekundäre Kandidatengene aktivieren können. Ebenfalls möglich erscheinen "parakrine" Effekte zwischen Astrozyten und Neuronen: In Gliazellen kommt es nach Hypoxie zur Expression von "Stressproteinen" wie der Protein-disulfide isomerase (PDI), welche auf CA1-Neuronen anti-apoptotisch wirkt <sup>125</sup>. Erythropoetin kann

nach Hypoxie, HIF-abhängig, in Astrozyten exprimiert werden und ist neuroprotektiv<sup>132,132</sup>.

### Alternative Stimuli und chemisch-pharmakologische Präkonditionierung

Da es durch kurzzeitige zerebrale Hypoxie zu einer Vielzahl von sekundären Veränderungen wie Periinfarktdepolarisationen, Anstieg von freien Radikalen, Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen wie TNF-alpha oder Il-1 oder reversibler Proteinsynthesehemmung kommt, wurde untersucht, ob diese Stimuli im Sinne eines Mediators alleine Hypoxietoleranz auslösen können<sup>133-136</sup> oder im Umkehrschluß durch Inhibition dieser putativen Mediatoren die hypoxische Präkonditionierung wieder aufgehoben werden kann<sup>67</sup>. In primär neuronalen Kulturen der Ratte konnte eine hypoxische Präkonditionierung durch Sauerstoffdeprivation auch durch TNF-alpha erreicht werden, bzw. durch TNF-alpha Antikörper geblockt werden. Als "second messenger" konnte in diesem Modell das Shingolipid Ceramid identifiziert werden<sup>130</sup>. Toleranz gegen fokale Ischämie kann auch durch pro-inflammatorische Stimuli wie LPS (Lipopolysaccharide) oder LPS-Derivate induziert werden, möglicherweise NO (nitric oxide) vermittelt<sup>84,137,138</sup>. Auch durch elektrische Stimulation des Nucleus fastigii des Kleinhirnes<sup>139-141</sup>, durch pharmakogen ausgelöste epileptische Anfälle in jungen Ratten<sup>142</sup> oder durch Hibernation<sup>143</sup> kann Hypoxietoleranz ausgelöst werden kann. Möglicherweise wird die endogene Hypoxietoleranz durch weitere Faktoren, wie den Östrogen/Gestagenzyklus moduliert<sup>144</sup>.

Von Riepe et al. stammt die Hypothese, dass Hypoxietoleranz auch durch zugelassene Medikamente wie Acetylsalicylsäure oder Haloperidol<sup>145</sup> ausgelöst werden kann, welche somit möglicherweise bereits neuroprotektiv sein könnte. Auch Glykoside wie Quabain<sup>56</sup> oder durch physikalische Stimuli wie Hyperthermie<sup>118,146</sup> oder hyperbare Oxygenation<sup>147,148</sup> kann Hypoxietoleranz ausgelöst werden, was in Zukunft einen interessanten klinischen Therapieansatz bieten. Der Mechanismus bei Hyperthermie scheint dabei unabhängig von Adenosinrezeptoraktivierung zu sein<sup>74</sup>.

Die Hypothese, dass Hypoxietoleranz kann auch chemisch-pharmakologisch, z.B. durch Hemmstoffe der oxidativen Phosphorylierung, wie 3-NPA induziert

werden kann, wurde von Riepe et al. <sup>145</sup> entwickelt und konnte zwischenzeitlich in verschiedensten Hypoxiemodellen bestätigt werden: bei globaler Hypoxie in Gerbils <sup>149</sup> und Ratten <sup>150</sup>, bei fokaler Ischämie in Ratten <sup>62</sup>; in akuten Hirnschnitten <sup>59</sup> und in der Zellkultur <sup>151</sup>. 3-NPA führt zu einer raschen Induktion von Adenosin-Rezeptoren (v.a. A3 mRNA) <sup>152</sup>.

Kortikale Depolarisationswellen "Spreading Depressions; SDs" führen zu minutenlangen Verschiebungen des Extrazellulärpotenzials und stellen einen starken metabolischen Stress ohne gleichzeitige Ischämie dar. SDs ähneln in vielerlei Hinsicht Migräneauraen und können experimentell Hypoxietoleranz induzieren <sup>134</sup>. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass es nach einer SD zu einer veränderten Genexpression von putativ neuroprotektiven Proteinen wie BDNF sowie zu einer verminderten Expression von Glutamattransportern kommt <sup>153,154</sup>. Umgekehrt kann auch durch hypoxische Präkonditionierung Toleranz gegen andere Stressoren wie mechanisch-traumatische Hirnschädigung induziert werden <sup>155</sup>.

Tabelle 4 Hypoxietoleranz bei globaler Ischämie

Autor	Spezies	Präkonditionierung	Intervall	Ischämie	Outcome	Methode	Protektion
Corbett 1997 <sup>50</sup>	Gerbil	2x1.5 min. CCAO	72 h	5 min. CCAO	10, 30 d	CA1	53-81 %
Perez-Pinzon 1997 <sup>156</sup>	Ratte	2 min. CCAO +hypotension	0.5 h	10 min. CCAO	3, 7 d	CA1	70-91%
Kitagawa 1990 <sup>44</sup>	Gerbil	2x2 min. CCAO	24 h	5 min. CCAO	7 d	CA1	53-98 %
Kato 1992 <sup>65</sup>	Gerbil	2 min. CCAO	72 h	3 min.	7 d	CA1	94 %
Chopp 1989 <sup>146</sup>	Ratte	15 min. 41.5°C	24 h	7.5 min. CCAO	7 d	CA1	ca. 4%
Kobayashi 1995 <sup>157</sup>	Ratte	2 h 2M KCl	24 h	6 min.	6 d	Nekrose	56 %
Towfighi 1999 <sup>142</sup>	Ratte	KA; fluorothyl s.c.	6, 24 h	60-90 min. CCAO	24-48 h	Hippo- campus- Schaden	18-30 %
Heurteaux 1995 <sup>99</sup>	Rat	3 min. CCAO	72 h	6 min. CCAO	1-7 d	CA1	90 %
Dowden 1999 <sup>158</sup>	Alte Gerbils	2 x 1.5 min. CCAO	72 h	5 min. CCAO	10,30, 60 d	CA1 EPSP	20-89 %

CA1: Messung der Neuronendichte im CA1-Sektor des Hippocampus; CCAO: beidseitiger Verschluss der A.carotis communis; EPSP : exzitatorische postsynaptische Potentiale.

**Tabelle 5** Hypoxietoleranz bei fokaler Ischämie

Autor	Präkonditionierung	Intervall	Ischämie	Outcome	Protektion
Toyoda 1997 <sup>122</sup>	20 min. CCAO + MCAO	24 h	60 min.	48 h	41 - 46 %
Matsushima 1995 <sup>92</sup>	„global“ oder MCAO	96 h	MCAO	96 h	0 - 66 %
Yanamoto 1998 <sup>159</sup>	48 h 4M KCl	1,2,6,9, <u>12,15,21</u> d	2 h BCAO + MCAO	48 h	51 %
Wiegand 1999 <sup>62</sup>	3-NPA i.p.	12h, <u>1,2, 3,7</u> d	p MCAO 90 min.	72 h	35 - 70 %
Reis 1998 <sup>141</sup>	1h FN Stimulation	1h,3h, <u>1d, 3d, 7d</u>	p MCAO	24 h	10 – 50 %
Chen 1996 <sup>93</sup>	3x10 min MCAO	<u>1,2,3,5,7</u> d	100 min. MCAO	24 – 72 h	33 – 45 %
Chimon 1998 <sup>160</sup>	3 x 3 min MCAO	1, 2, 3, <u>4, 5</u> d	p MCAO	48 h	20 %
Stagliano 1999 <sup>94</sup>	Maus: 1-3x 3 min. MCAO	30 min.	1 h 24 h	24 h	39 % (p) 33 % (t)

Spezies: Ratte wenn nicht anders angegeben; MCAO: Verschluss der A. cerebri media; FN: Nucleus fastigii; p= permanent; t: transient; Die Protektion wurde in allen Veröffentlichungen mittels der Reduktion des histologischen Infarktolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen. Das Intervall mit der maximalen Protektion ist unterstrichen.

**Tabelle 6 Hypoxietoleranz: *In vitro* Modelle**

Autor	Spezies Methode	Präkonditionierung in min.	Intervall	Ischämie in min.	Outcome	Methode	Protektion
Schurr 1986 <sup>43</sup>	(R)Hippocampus Slice	5 OD	30 min.	20	während OD	CA1 PS	Ca. 50 %
Bruer 1997 <sup>56</sup>	(R) kortikale Neuronen	90 OGD	24, <u>48</u> , 72 h	180 OGD	4, 24, 48 h	LDH	6 – 72 %
Riepe 1997 <sup>161</sup>	(R)Hippocampus Slice	3-NPA;ASS; Haloperidol	1 h; 24 h	15 OD	≤ 45 min.	CA1 ePS	90%
Khaspekov 1998 <sup>57</sup>	(R)Hippocampuskultur	60 OGD	24 h	90 min. OGD	24 h	LDH	40 – 60 %
Grabb 1999 <sup>66</sup>	(M) gemischte Kulturen	5 – 30 OGD; K+; NMDA	7, <u>24</u> , 72 h	45– 55 OGD	24 h	LDH	30 – 50 %
Weih 1999 <sup>151</sup>	(R) kortikale Neuronen	120 3-NPA	24, 48 h	120-150 OGD	24 h	LDH	30 – 70 %
Reshef 1996 <sup>61</sup>	(R) Neuronen	5 iod.; Adenosin	10 min.; 72 h	150 iod.	60	LDH	40 – 60 %
Sakaki 1995 <sup>55</sup>	(R) kortikale Neuronen	4 h OD	72 h	24 h OD	24 – 48 h	LDH	90 %
Kasischke 1999 <sup>144</sup>	(M)Hippocampus slices	1 h 3-NPA	1 h	15 OD	45	ePS	Ca. 50 %
P.-Pinzon 1996 <sup>101</sup>	(M)Hippocampus slices	10 OD	30 min.	10 min.	30 min.	ePS	141 %
Liu 2000 <sup>130</sup>	(R) kortikale Neuronen	20 OD; TNF- $\alpha$	24 h	2.5 h OGD	24 h	Ethidium-fl.	50 %

R: Ratte; M: Maus; OGD: Oxygen-Glucose-Deprivation; OD: Oxygen-Deprivation;

iod: iodoacetate.

### Hypoxietoleranz am Gehirn: „remote“ Preconditioning

"Remote preconditioning" bedeutet, dass die Präkonditionierung in einem anderen Gewebe als die Testhypoxie induziert wird. In der Ratte konnte beobachtet werden, dass fokale Hypoxie einer Hemisphäre Toleranz erzeugt gegen eine globale Hypoxie 3 Tage später<sup>162</sup>. Durch eine Nierenischämie<sup>163</sup> oder Verschluss der Mesenterialarterie<sup>164</sup> kann Toleranz gegen eine darauffolgende Myokardischämie induziert werden. Hypoxietoleranz am Herz kann auch in Myokard beobachtet werden, das zuvor nicht präkonditioniert wurde<sup>165</sup>. Eine kurze Myokardischämie, kann auch die Thrombosierung einer geschädigten und stenosierten A. carotis verhindern<sup>166</sup>. Als Mechanismen des „remote preconditioning“ sind entweder zirkulierende Mediatoren wie Adenosin (Aktivierung von Adenosinrezeptoren auf Thrombozyten)<sup>166</sup> oder neurogene Mechanismen, möglicherweise durch Bradykinin aktiviert<sup>167</sup>.

### **2.2.2 Hypoxietoleranz am Gehirn: transiente ischämische Attacken als Modell ?**

Der Nachweis einer neuroprotektiven Wirkung eines Medikamentes oder einer Behandlung im Tiermodell bedeutet nicht, daß dieselben Mechanismen auf das menschliche Gehirn übertragen werden können. Weniger jedoch unterschiedliche biologische Prinzipien als Speziesdifferenzen, Alter, Risikofaktoren (Definitionen im Anhang), Medikamentendosis und Zeitpunkt der Behandlung, sowie Art und Zeitpunkt der Evaluation des Schadens sind vermutlich für diese Diskrepanz zwischen experimentellem Ansatz und den bislang fast durchgängig enttäuschend verlaufenen klinischen Studien zur Neuroprotektion beim ischämischen Hirninfarkt verantwortlich zu machen.

Bevor jedoch die Hypothesen zur Hypoxietoleranz am menschlichen Gehirn aufgestellt werden, sollten einige Vorüberlegungen angestellt werden:

Ein idealer präkonditionierender ischämischer Stimulus sollte in einem definierten vaskulärem Territorium, für eine definierte Zeit eine komplette Okklusion des Gefäßes bewirken und keine morphologischen Schäden hinterlassen. Im Gegensatz zum Tiermodell, bei dem eine transiente fokale oder globale Ischämie an einem narkotisierten, kardiovaskulär gesundem und in der Regel jungem Tier ausgelöst wird, sind TIA's nicht vorhersagbar und können oftmals, aufgrund der kurzen Dauer nur retrospektiv beurteilt werden. Die vaskuläre Grunderkrankung, z.B. eine Karotisstenose auf der Grundlage einer Arteriosklerose, besteht zudem beim Menschen auch nach einer TIA fort.

In der Kardiologie wird die Frage, ob Präkonditionierung überhaupt auch im poststenotischen Parenchym möglich ist, vermehrt diskutiert<sup>168,169</sup>. Die klinische Lokalisation einer TIA kann, vor allem bei hemisphäriellen TIA's in der Regel eindeutig erfolgen. Bei untypischen TIA's im vertebro-basilärem Stromgebiet oder bei einer Amaurosis fugax (retinale TIA) bleibt sie jedoch manchmal problematisch. Die Mehrzahl der Patienten haben 1-2 klinische TIA's<sup>170</sup>, es muß jedoch angenommen werden, daß zahlreiche TIA's auch nachts oder in nicht eloquenten Arealen auftreten und somit klinisch asymptomatisch bleiben und die Anzahl sowie die Intervalle der

möglicherweise präkonditionierenden Ischämien nicht beurteilt werden kann. Die durchschnittliche Dauer einer TIA wurde mit 14 Minuten für hemisphärielle und 8 Minuten für vertebro-basiläre TIA's angegeben<sup>171</sup>. Wenn eine TIA mehr als eine Stunde dauert, sinkt die Chance für den Patienten, nach 24 Stunden symptomfrei zu werden, deutlich ab<sup>172</sup>. Die Dauer einer TIA lässt keine Rückschlüsse zu für eine embolische oder thrombotische Genese<sup>173-175</sup>.

Der Zeitraum zwischen Beginn der vaskulärer Occlusion und dem Beginn von klinischen Symptomen ist zudem beim Menschen nicht genau bekannt. Nach einer Ballonkatheter-Testokklusion der A. carotis interna kam es nur bei 11% der Patienten nach 2-7 Minuten zu klinischen Symptomen<sup>176</sup>. Ob zwischen der Dauer einer TIA und einem bildgebend nachweisbarem Infarkt ein zeitlicher Zusammenhang, besteht, ist unklar<sup>177</sup>. TIA Patienten zeigen im CT in ca. 11 - 47 % Ischämiezeichen<sup>178-180</sup>, im MRT in 46 % der Fälle<sup>181</sup>, wobei unklar bleibt, wie viele Läsionen in kausalem Zusammenhang mit der TIA bzw. ihrer Dauer stehen.

Die Frage ob eine TIA ein adäquater Stimulus sein könnte, um eine Hypoxietoleranz am menschlichen Gehirn auszulösen, kann somit derzeit nicht eindeutig beantwortet werden. Auf der Basis der experimentellen Modelle zur Hypoxietoleranz, sowie den epidemiologischen Daten zu TIA's, ist anzunehmen, daß klinisch sicher lokalisierbare TIA's von wenigen Minuten Dauer, in einem Zeitraum von Stunden bis zu etwa 7 Tagen vor einem Schlaganfall, ohne relevante Makroangiopathie am ehesten geeignet sein könnten, Ischämietoleranz zu induzieren.

### Epidemiologie von transienten ischämische Attacken

Zur Planung einer klinischen Studie sollte anhand der epidemiologischen Daten zu TIA's der erforderliche Stichprobenumfang abgeschätzt werden. Die Inzidenz von TIA's beträgt, in verschiedenen Populationen, ca. 0.4/1000/Jahr<sup>170</sup>. Die Dauer beträgt in den meisten Fällen, wie oben berichtet, weniger als eine Stunde<sup>171,172,182</sup> und definitionsgemäß maximal 24 Stunden. Schätzungsweise 43% bzw. 36% der TIA's treten im linken bzw. rechten Karotisstromgebiet auf, ca. 15% sind im vertebro-basilären Stromgebiet, die übrigen Attacken können klinisch nicht eindeutig zugeordnet werden<sup>183</sup>. Eine TIA muß als Warnsymptom einer zugrundeliegenden kardiovaskulären Erkrankung gewertet werden.

Zwischen Patienten mit einer TIA und Schlaganfallpatienten gibt es keine wesentlichen Unterschiede in Hinblick auf kardiovaskuläre Risikofaktoren, so daß angenommen werden kann, daß beide Syndrome einen gemeinsamen pathophysiologischen Ursprung haben und sich nur im Zeitverlauf unterscheiden<sup>184</sup>. Ein Patient nach einer TIA hat ein 4-8%iges Risiko für einen Schlaganfall im ersten Monat<sup>185</sup>, ein 4-12%iges Schlaganfallrisiko im ersten Jahr, ein lebenslang fünffach erhöhtes Risiko für Schlaganfall<sup>186,187</sup> sowie ein erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt<sup>188</sup>. Bei einer retinalen TIA ist das Schlaganfallrisiko geringer<sup>177</sup>. Schätzungsweise 7 - 40% aller Schlaganfallpatienten haben vor dem Hirninfarkt eine TIA erlitten<sup>177,189</sup>, wobei Patienten mit Makroangiopathien häufiger TIA's zu haben scheinen als Patienten mit einer kardialen Emboliequelle oder Mikroangiopathien<sup>189,190</sup>. Überdurchschnittlich häufig (ca. 55%) tritt ein Hirninfarkt im Territorium einer vorangegangenen TIA auf<sup>183</sup>. Dennoch gibt es, trotz zahlreicher Studien keine zuverlässigen Kriterien dafür, welcher Patient nach einer TIA ein erhöhtes Risiko für einen schweren Schlaganfall hat<sup>170,191</sup>. Insgesamt ist somit bei 5-20% aller Schlaganfallpatienten mit einer prodromalen TIA zu rechnen.

## **3 Methoden und Grundlagen**

### 3.1 Zellkultur

#### **3.1.1 Medien und Lösungen**

Neuronenkulturmedium NeuroBasalMedium (NBM) mit 2% B27-Supplement und folgenden Zusätzen:

100 µg/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin

0.25% L-Glutamin 2mM

0.1% 25 mM Glutamat (als "Startermedium")

Alternativ wurde N-Med verwendet:

MEM (Earle) (mit 2,2g Bicarbonat und 1g Glucose) mit 10% fetalem Kälberserum (FKS)

100 µg/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin

L-Glutamin 2mM

0.25% Insulin 100 I.E./l

1% Hepes Buffer 1M

8g/l Glucose

Poly-L-Lysin (PLL)-Beschichtung von Zellkulturwells

PBS ohne Calcium und Magnesium mit 5% PLL.

Trypsin

PBS ohne Calcium und Magnesium mit folgendem Zusatz

10% Trypsin / Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Die vom Hersteller gelieferte 10-fach konzentrierte Stammlösung wurde aliquotiert zu je 5 ml und bei -20°C gelagert. Um die gebrauchsfertige Lösung mit einer Konzentration von 0,05/0,02% zu erhalten, wurden diese mit 45 ml PBS ohne Calcium und Magnesium verdünnt, und bei +4°C aufbewahrt.

Kollagen-Beschichtung der Zellkulturplatten

MEM (Earle) (mit 2,2g Bicarbonat und 1g Glucose) mit folgenden Zusätzen

10% Fetales Kälberserum (FKS)

1% Pen/Strep

1% L-Glutamin 2 mM

0.25% Insulin

1% Hepes Buffer 1M

8g/l Glucose

1% Kollagen G

#### Lösung zur Zellzählung

PBS ohne Calcium und Magnesium mit:

10% Trypanblau

10% Zellsuspension

#### Beschichtung der Kulturgefäße

Zum Beschichten der Kulturgefäße kam poly-L-Lysin (MG>300.000 kDa; 0.1 mg/ml) in einer Verdünnung von 1:20 in PBS ohne Calcium und Magnesium zur Anwendung. Am Tag der Präparation wurden die Kulturgefäße mit dieser Lösung überschichtet 20-30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und dann zweimal mit PBS ohne Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> gewaschen. Anschließend wurde die Kollagen Lösung (s. Lösungsprotokoll Nr. 3) auf die Kulturgefäße aufgetragen. Im Inkubator verblieben die Platten dann für eine Stunde und wurden dann erneut mit PBS ohne Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> zweimal gewaschen.

#### SDH-Messung<sup>a</sup>

In den 3-NPA Experimenten wurde untersucht, ob es zu einer Minderung des Aktivität des Komplexes II der Atmungskette kommt. Dazu wurden die Zellen 2 h nach 3-NPA Gabe in Ultraschall homogenisiert. Eine kinetische photometrische SDH-Messung wurde in 50 mM Tris/HCl (pH=7.4) mit 25 mM Sucrose, 50 µM 2,6-dichloroindophenol und 10 mM Succinat bei 604 nm durchgeführt und auf den Proteingehalt (nach Lowry) bezogen.

### **3.1.2 Präparation von kortikalen Neuronen**

Präparation von kortikalen neuronalen Kulturen wurde, wie zuvor bereits berichtet<sup>56,192,193</sup> durchgeführt, im Einzelnen wie folgt: Zwischen dem E16-18 (16.-18. Gestationstag) trächtige weibliche Wistarratten wurden mit Äther narkotisiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet.

Nach möglichst keimarmem Herauspräparieren des Uterus und seiner Lagerung auf Eis, erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen:

---

<sup>a</sup> in Zusammenarbeit mit Dr.rer.nat. Dirk Megow.

- Embryonen aus dem Uterus herauspräparieren in einer Petrischale mit kaltem PBS ohne  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  lagern,
- Gehirne herauspräparieren und in kaltem PBS ohne  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  lagern,
- unter mikroskopischer Kontrolle die Kortizes präparieren und die Meningen sorgfältig entfernen,
- Kortizes zweimal in PBS ohne  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  waschen,
- Gewebe mit dem Skalpell mechanisch zerkleinern und anschließend in kleine Zentrifugenröhrchen überführen,
- ca. 5 ml der gebrauchsfertigen Trypsin / EDTA Lösung zugeben und 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubieren,
- 2-3 mal in PBS ohne  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  waschen und in ca. 5-10 ml N-Med (Medium 3) aufnehmen,
- weitere mechanische Dissoziation des Gewebes mit verengten Pasteur Pipetten,
- über ca. 2-3 Minuten das Absetzen der größeren Gewebepartikel abwarten, anschließend Überstand entfernen,
- Zentrifugation der Zellsuspension bei 1000 Umin / 2 min/ RT, um Zellbruchstücke und Erythrozyten zu entfernen,
- den Überstand verwerfen, das bodenständige Pellet in Startermedium (Medium2) aufnehmen und erneut mit der Pipette die Neuronen vorsichtig vereinzeln.

Nach dem Auszählen der Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, wurde die Zellsuspension in die beschichteten Kulturplatten in einer Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät.

Die Kulturen wurden bei 5% CO<sub>2</sub>/ 95% Luft, 95% Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 36°C gehalten.

Zweimal pro Woche wurden 50% des Mediums gewechselt, wobei die Neuronen dann das normale Nährmedium (Medium 3) erhielten. Jedes well einer 24-well-Platte erhielt 400µL Medium, einer 6-well-Platte 2 ml.

Zwischen dem 8. und 14. Tag *in vitro* erfolgten die Experimente. 80-90% der präparierten Zellen waren immunhistochemisch positiv für Neuronen-

spezifische Enolase, weitere 15% für GFAP (Astrozytenmarker) und weniger als 5% auf OX 42 (Mikroglia marker).<sup>b</sup>

## 3.2 Sauerstoff-Glucosedepriuation (OGD) und 3-NPA-Inkubation

### **3.2.1 Medien und Lösungen**

#### BSSO; Hypoxielösung

Deoxygenierte, mit 5% CO<sub>2</sub> und 95% N<sub>2</sub> begaste Lösung, bestehend aus:

- 1160 mM NaCl
- 8 mM MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O
- 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O
- 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>
- 26,2 mM NaHCO<sub>3</sub>
- 10 µM Glycin
- 100 mg/l Phenolrot

#### BSS20; Kontrollösung

Normal oxygenierte Lösung, bestehend aus:

- 1160 mM NaCl
- 8 mM MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O
- 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O
- 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>
- 26,2 mM NaHCO<sub>3</sub>
- 10 µM Glycin
- 100 mg/l Phenolrot
- 20 mM D-Glucose

#### OGD

Für die Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) wurden die Nervenzellen in eine befeuchtete, Temperatur-kontrollierte (36±0.5 °C) Hypoxiekammer (s. Abbildung 3) umgesetzt, deren Sauerstoffpartialdruck bei 2-4 mmHg (5% CO<sub>2</sub>/95% N<sub>2</sub>) lag. Gemessen und kontrolliert wurde dieser Druck mit einer polarographischen Elektrode (Licox pO<sub>2</sub>, GMS, Kiel, Germany ).

---

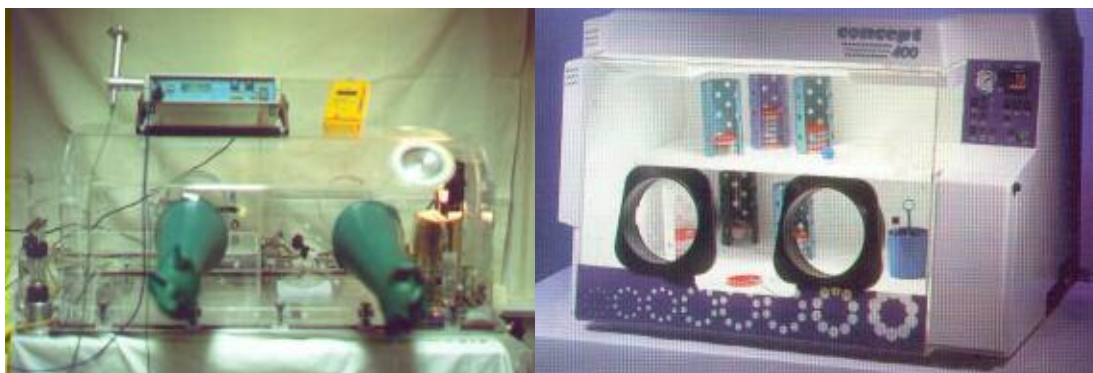
<sup>b</sup> in Zusammenarbeit mit Dr.Dorette Freyer und Dr.Marion Lautenschlager.

Vor dem Umsetzen der Zellen in die Kammer, wurde das Neuronenkulturmedium zweimal mit Magnesium- und Ca-freiem PBS heruntergespült. Die Versuchsneuronen erhielten stattdessen eine deoxygenierte, d.h. zuvor unter polarographischer Kontrolle mit 5% CO<sub>2</sub> und 95% N<sub>2</sub> Gas bebubbelte „Hypoxielösung“ (-BSS<sub>0</sub>-) wobei der pH bei 7.4 konstant gehalten wurde. Der Kontrollgruppe wurde im Standardinkubator normoxische BSS<sub>20</sub> verabreicht, welche eine normale Glucosekonzentration (20mM D-Glucose) enthielt. Somit waren die Kontrollzellen im Vergleich mit OGD-Bedingungen normalen Zucker- und Sauerstoffverhältnissen ausgesetzt. Die hypoxische Präkonditionierung bzw. die OGD begannen jeweils mit dem Wechsel vom ursprünglichen Nährmedium zu den Versuchslösungen: BSS<sub>0</sub> und BSS<sub>20</sub>, bzw. mit dem Umsetzen der Testgruppe in die Hypoxiekammer und endete mit der Versorgung der Neuronen mit normoxischem, asserviertem Neuronenkulturmedium. Zeitlich entsprach die hypoxische Präkonditionierung einer Verweildauer der Neuronen von etwa 90 Minuten in der Kammer, während die OGD zeitlich auf 120-150 Minuten festgelegt war, eine Zeitdauer, nach der ein Zellschaden nachweisbar war. Die hypoxische Präkonditionierung fand jeweils am Tag 8-10 *in vitro*, die OGD i.d.R. 24-72 h später, also am Tag ca. 9-13 *in vitro* statt.

### 3-NPA-Inkubation

Analog zur OGD wurden die Neuronen am Tag 8-10 *in vitro* zweimal mit Magnesium- und Ca-freiem PBS gespült. Die Versuchsneuronen erhielten in den angegebenen Konzentrationen 3-NPA, gelöst in BSS<sub>0</sub>. Der pH-Wert war bei 7.4. Die Kontrollgruppe erhielt BSS<sub>20</sub>. Beide Gruppen wurden 2h im Standardinkubator (mit Sauerstoff) inkubiert. Anschliessend erhielten die Zellen wieder asserviertes Neuronenkulturmedium. Die OGD fand nach einem Intervall von 24-72 h statt.

### Abbildung 3 Hypoxiekammern



**Links:** Selbstgebaute Hypoxiekammer (umgebauter Babyinkubator); die Manipulation ist durch gasdichte Gummihandschuhe möglich, die Kammer kann, unter laufendem Betrieb, durch eine gasdichte Vorkammer (atrium), die getrennt begast werden kann, bedient werden; im Inneren sorgt eine 60W Glühbirne und eine Heizplatte, gekoppelt an einen Wärmefühler für konstante Temperaturen, Konvektion wird durch ein Gebläse erreicht; der Druck in der Kammer bleibt durch ein Siphonsystem, durch das überschüssiges Gas entweichen kann, konstant. Die Luftfeuchte, Temperatur und Sauerstoffgehalt werden permanent gemessen und protokolliert.

**Rechts:** kommerzielle Hypoxiekammer, ursprünglich zur Kultur von anaeroben Bakterien. Diese Kammer war ab 2000 im Einsatz und zeichnet sich dadurch aus, dass sie sich im permanenten Betrieb befindet. Eindringender Sauerstoff wird durch einen Katalysator entfernt.

#### 3.2.2 Schadensevaluation

Das Ausmaß der Neuronenschädigung durch Hypoxie wurde sowohl durch Phasenkontrastmikroskopie bei 100-facher bzw. 400-facher Vergrößerung abgeschätzt, als auch durch Messungen der Laktatdehydrogenase (LDH)-Konzentrationen im Neuronenmedium beurteilt.

##### LDH-Messung

Geschädigte Neuronen geben, vermutlich sowohl im Rahmen eines nekrotischen, als auch apoptotischen Zelltodes Lactatdehydrogenase (LDH) passiv in den Überstand ab. Abgegebenes LDH repräsentiert für Neuronen eine quantitative Meßmethode von Verletzung, Schädigung und Zelltod<sup>194</sup>. Aufgrund ihrer Einfachheit, physikalischen und biologischen Stabilität und wegen der guten Korrelation der LDH-Meßwerte zu den Ergebnissen von Zellzählungen ist die Laktatdehydrogenase ausgewählt worden.

LDH wandelt in Gegenwart von NADH Pyruvat zu Lactat um. Um die Enzymkonzentration im Neuronenmedium zu bestimmen, wird die Absorptionsänderung bei Pyruvatüberschuss bei 340 nm gemessen; diese Absorptionsänderung spiegelt den NADH Verbrauch wieder und damit die Aktivität des zellulären Enzyms im Kulturmedium.

#### Lösungen

- 0,1 M LDH Puffer, bestehend aus
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , im Verhältnis 2:1
- 22,7 mM Pyruvatlösung
- $\beta$ -NADH Lösung (0,3mg/ml)

#### Messung

Die LDH Aktivität wurde mit spektrophotometrisch gemessen. Die Messung erfolgte an einem plate reader der für 96 well Platten ausgelegt ist. Jedes well erhielt 25 $\mu$ L Probe, bzw. 25 $\mu$ L Standard, 100 $\mu$ L NADH Lösung in LDH Puffer (Zimmertemperatur, 3mg/10ml) und 125 $\mu$ L LDH Puffer. Unmittelbar vor Beginn der LDH Messung durch den Reader erhielt jedes well 25 $\mu$ L Pyruvatlösung. Meßprinzip ist, daß Licht jedes der 96 wells in vertikaler Richtung passiert. Der Reader mißt die Absorption bei 340 nm im Lichtweg, die der NADH Menge in der Testlösung entspricht. In Intervallen von je 30 Sekunden wurden anhand des linearen Absorptionsabfalles die Aktivität der Lactatdehydrogenase bestimmt.

#### Mikroskopie

Während die LDH Freisetzung, den neuronalen Zellschaden in seiner Quantität detektiert, kann mit der Mikroskopie auch qualitativ differenziert werden; beispielsweise zwischen zellulärer Apoptose und Nekrose. Die neuronale Morphologie steht hier im Vordergrund. Der Differenzierungsgrad der Neuronen, aber auch der Verzweigungsgrad und Zustand der Dendriten kann grob aufgrund der Menge und Dichte der Dendriten und der Menge des Zelldetritus beurteilt werden. Gleiches gilt für den Zeitverlauf des Schadens.

### 3.3 Schlaganfalldatenbank

Erfasst wurden alle in der Charité aufgenommenen Schlaganfallpatienten. Patienten mit primären Hirnblutungen, Subarachnoidalblutungen, Sinusvenenthrombosen oder Patienten, die nur eine TIA erlitten hatten, wurden separat erfasst und die Daten nicht weiter ausgewertet. Die Daten wurden in eine eigens dafür programmierte Datenbankanwendung (MS Access; Version 6.0) eingegeben. Folgende Daten wurden den Akten entnommen: Personalien, Behandlungsjahr, Behandlungsdauer, Station, Zeitpunkt, Lokalisation und Anzahl von TIA's, vorangegangene Hirninfarkte, Zeitdauer bis zur Durchführung der Computertomographie des Kopfes und bis zum Beginn der Behandlung, Duplexsono- und Echokardiographieergebnisse, Risikofaktorenprofil (Hypertonus, Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörung, Herzerkrankung, Nikotinabusus, periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK; s.a. Anhang), Blutdruck bei Aufnahme, Medikamente bei Aufnahme und Entlassung, klinischer Verlauf, Komplikationen, Wiederaufnahme, Hausarztadresse.

Darüber hinaus wurde der Infarkt nach TOAST-Kriterien klassifiziert<sup>195</sup> (s.Anhang) sowie ein Zahlenwert nach der Canadian Neurological Scale (CNS; s. Anhang)<sup>196-198</sup> erhoben und dokumentiert.

### 3.4 Diagnoseevaluation TIA

Der validierte TIA-Fragebogen wurde freundlicherweise von Prof. Koudstaal (Universität Rotterdam) zur Verfügung gestellt und übersetzt (siehe Anhang). Per Post wurde jedem Patienten ein Fragebogen zugesandt. Diese Fragen wurden zur Sicherung der Diagnose einer TIA eingesetzt und weisen eine hohe Übereinstimmung bei verschiedenen Untersuchern auf<sup>199</sup>. In leicht verständlichen Worten (Laiensprache) wurde dabei im Multiple Choice Verfahren nach der Form des Auftretens von Symptomen gefragt, ebenso nach Beginn, Verlauf, Ende, Dauer, Anzahl der Attacken und zeitlichem Zusammenhang mit dem nachfolgenden Schlaganfall. Eine Attacke, die mit halbseitigen motorischen oder sensiblen Symptomen oder Aphasie einherging wurden als hemisphärielle und transiente monokuläre Visusverluste als retinale TIA gewertet. Schwindelanfälle, Doppelbilder,

Hemianopsie oder bilaterale motorische oder sensible Symptome (mehr als 1 Symptom waren erforderlich) sind *per definitionem*<sup>200</sup> als TIAs im vertebro-basilären Stromgebiet beurteilt worden.

### 3.5 Klinische Endpunkte

Jeder Infarkt wurde nach TOAST-Kriterien klassifiziert<sup>195</sup> (s. Anhang). Zur Dokumentation des fokalen neurologischen Defizites wurde, wie oben erwähnt, die validierte Canadian Neurological Scale (CNS; s. Anhang) erhoben und dokumentiert. Diese Skala ist zur retrospektiven Einschätzung neurologischer Defizite, vor allem motorischer Defizite, geeignet.

### 3.6 CT / MRT: Frühzeichen und Infarktgrösse

Als Infarktfrühzeichen wurden gewertet: frühe, zur klinischen Ausfallsymptomatik passende territoriale Hypodensität im Aufnahme-CT oder Hypodensität des Linsenkernes; Verlust der Inselrinden-Zeichnung oder Verlust des Kortexbandes.

Infarktfrühzeichen und CT/MRT Befunde zur Beurteilung des finalen Infarktvolumens wurden in Zusammenarbeit und mit Hilfe von Prof. Lehmann; Neuroradiologie der Charité, geblindet durchgeführt. Alle verfügbaren Aufnahme-CTs wurden unter Kenntnis des klinischen Befundes auf das Vorhandensein von Frühzeichen überprüft. Anschliessend wurden, wenn vorhanden, CTs oder MRTs, welche im Verlauf, üblicherweise nach 2-28 Tagen angefertigt wurden, ausgewählt um das finale Infarktvolumen zu bestimmen. Diese Bilder wurden in einem SHARP DIN A3 Durchlichtscanner eingescannt und das Infarktareal visuell umfahren und die Fläche planimetrisch berechnet (Sigma Scan). Dies wurde für jede Schicht mit sichtbarem Infarkt wiederholt um schliesslich anhand der Schichtdicke und Addition der einzelnen Infarktvolumina das finale Infarktvolumen zu bestimmen.

### 3.7 Statistik

Für alle Zielgrößen wurden die Befunde zunächst exploratorisch untersucht und deskriptiv ausgewertet. Um zu prüfen, ob die Daten normalverteilt waren, wurde ein Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Als konfirmatorische Auswertungsmethoden kamen bei diskontinuierlichen Daten und Daten, die nicht normalverteilt waren, nicht-parametrische Testverfahren zur Anwendung (U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney), nur im Fall metrisch skalierter Daten kamen auch parametrische Tests (t-Test, Varianzanalyse, Kolmogorov-Smirnov-Test) zum Einsatz. Der auf dem sogenannten Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben basierende Rangtest von Mann und Whitney ist das verteilungsunabhängige Gegenstück zum parametrischen t-Test für den Vergleich zweier Mittelwerte stetiger Verteilungen. Bei dichotomen oder qualitativen Daten wurden der Chi-Quadrat-Test oder der exakte Test von Fisher angewendet. Zur Feststellung möglicher, dem beobachteten Effekt zugrundeliegender Effekte wurde eine multivariate Analyse eingesetzt.

In der retrospektiven Studie mit klinischen Endpunkten kam, da der CNS (s.a. Anhang) eine diskontinuierliche Skala ist, eine schrittweise lineare Regression zur Anwendung. Als Störgrößen wurden in der Studie mit klinischen Endpunkten eingegeben: kardiovaskuläre Risikofaktoren (s.Anhang) Zeit zwischen Symptombeginn und CNS (s.a. Anhang) und TIA (Ja/Nein). In der klinischen Studie mit neuroradiologischen Endpunkten wurde eine logistische Regression mit geschätzten odds-ratios und korrespondierenden 95% Konfidenzintervallen errechnet<sup>201</sup>. Als dichotome Endpunkte (abhängige Variable) wurden Infarktfrühzeichen oder ein grosser Infarkt (> 1/3 der Territoriums der A. cerebri media) angesetzt um den Einfluss von Störgrößen (confounding factors oder covariates) einzurechnen. Als Störgrößen wurden in der Studie mit radiologischen Endpunkten eingegeben: kardiovaskuläre Risikofaktoren (Diabetes, Hypertonus, koronare Herzerkrankung, periphere arterielle Verschlusskrankung, Nikotinabusus; s.a. Anhang), Zeit zwischen Symptombeginn und CT, CNS (s.a. Anhang) und TIA (Ja/Nein). Alle Statistiken wurden mit SPSS 7.5 berechnet.

In den Zellkulturexperimenten wurde üblicherweise der Unterschied zwischen den Gruppen mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Korrektur verwendet. Wenn nicht anders erwähnt sind folgende P-Werte angegeben: \*\*\*,\*\* und \* für  $p \leq 0.001$ ;  $p \leq 0.01$  und  $p \leq 0.05$ . Professor Dr. Wernecke, Leiter der medizinischen Biometrie der Charité betreute in statistischen Fragen alle Phasen der klinischen Studien, wie Planung des Stichprobenumfangs, Design der Fall-Kontroll Studien und kritische Anwendung der statistischen Methoden.

## 4 Ergebnisse

Vorbemerkung:

Wichtige Parameter jedes Hypoxietoleranz-Experimentes sind Art und Dauer des präkonditionierenden Stimulus (A), Dauer des Intervalles (B), Dauer der "Testhypoxie" (C) und die Art und der Zeitpunkt, nachdem der Schaden beurteilt wurde (D, Abbildung 4). Zur Veranschaulichung des Designs wird dieses Schema in jedem folgenden Experiment angegeben.

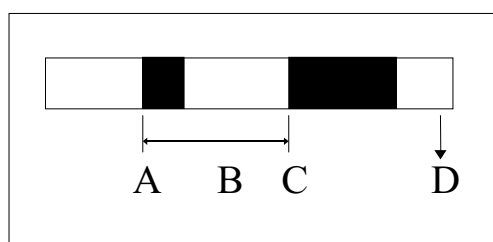


Abbildung 4  
Schema Hypoxietoleranz

### 4.1 Hypoxische Präkonditionierung<sup>c</sup>

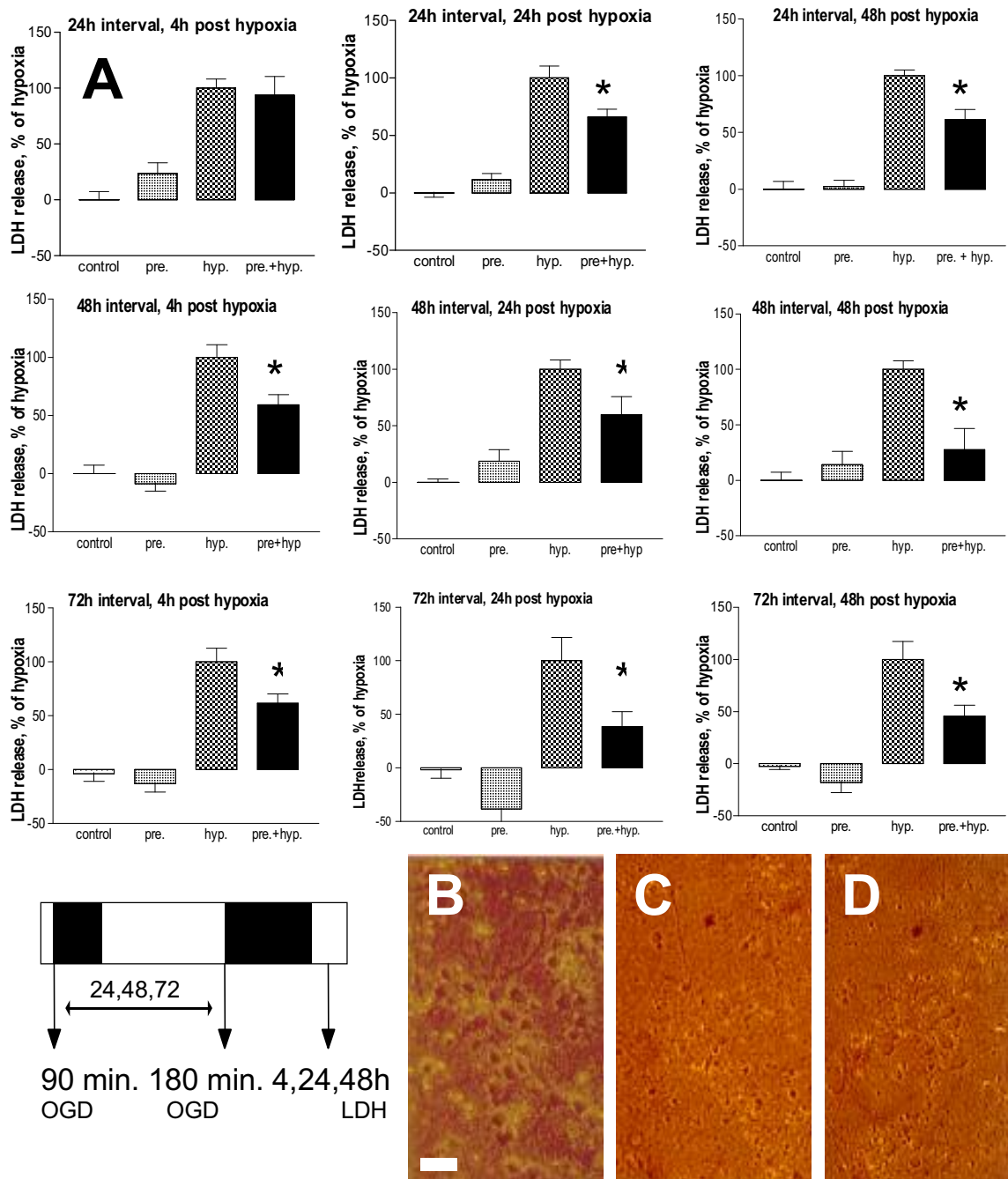
Zuerst, zur Etablierung eines stabilen Modelles zur OGD untersuchten wir den Schwellenwert, oberhalb dessen 24-72h später ein morphologischer Schaden und ein LDH-Anstieg als Indikator neuronalen Schaden nachweisbar war. Dabei zeigte sich, dass durch Hypoxiezeiten zwischen 60 und 90 Minuten kein nachweisbarer Schaden entstand. Abhängig vom Alter der Zellkultur, der Zelldichte und dem PO<sub>2</sub>-Spiegel zeigte sich eine Zellschwellung etwa ab 120-150 Minuten.

Als Nächstes wurde untersucht, ob durch kurze OGD-Phasen Hypoxietoleranz gegen eine längerdauernde Hypoxie induziert werden kann. Abbildung 5 zeigt den Versuchsaufbau und die Ergebnisse für das 24, 48 und 72 h Intervall. Dabei zeigt sich, dass bereits im 24 h Intervall, und, mehr noch bei 48 h und 72 h Präkonditionierung durch OGD erzielt werden kann. Der Schaden war dabei 24 h nach der zweiten Hypoxie eindeutig

<sup>c</sup> Diese Versuche wurden mit Dr. Andreas Meisel; cand.med. Ulrike Bruer (Zellkultur) und Nikolaj Isaev (OGD) durchgeführt.

nachweisbar; 4 h nach Hypoxie war im 24 h Intervall noch kein Schaden nachweisbar. Die Protektion war im 72 h Intervall maximal. Diese Experimente dienten dazu, ein stabiles Modell der hypoxischen Präkonditionierung zu etablieren, als Ausgangspunkt zur Charakterisierung genetischer Modelle.

Abbildung 5 Hypoxische Präkonditionierung, LDH-Werte und Zytologie



**Legende:** **A** contr.: Zellen wurden mit BSS20 gespült; pre.: 90 min. nur präkonditionierende OGD; hyp.: 3 h OGD; pre.+ hyp. 1.5 h OGD-Präkonditionierung und 3 h OGD 24 h (1. Reihe); 48 h (2.Reihe) und 72 h (3.Reihe) später; die LDH-Werte variierten zwischen 100 und 270 U/ml und wurden normalisiert; die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SE aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die LDH-Werte wurden 4h (1.Spalte); 24h (2.Spalte) oder 48h (3.Spalte) nach Ende der OGD gemessen.

**B,C,D** Phasenkontrastmikroskopie neuronaler Zellkulturen: Hypoxische Präkonditionierung. **B** : neuronale Zellen (DIV 10; (control) , **C** : 24 h nach 1.5h OGD; **C** : 24 h nach 3h OGD **D**: 1.5h OGD 72 h vor 3h OGD; jedes Bild 24 h nach OGD.

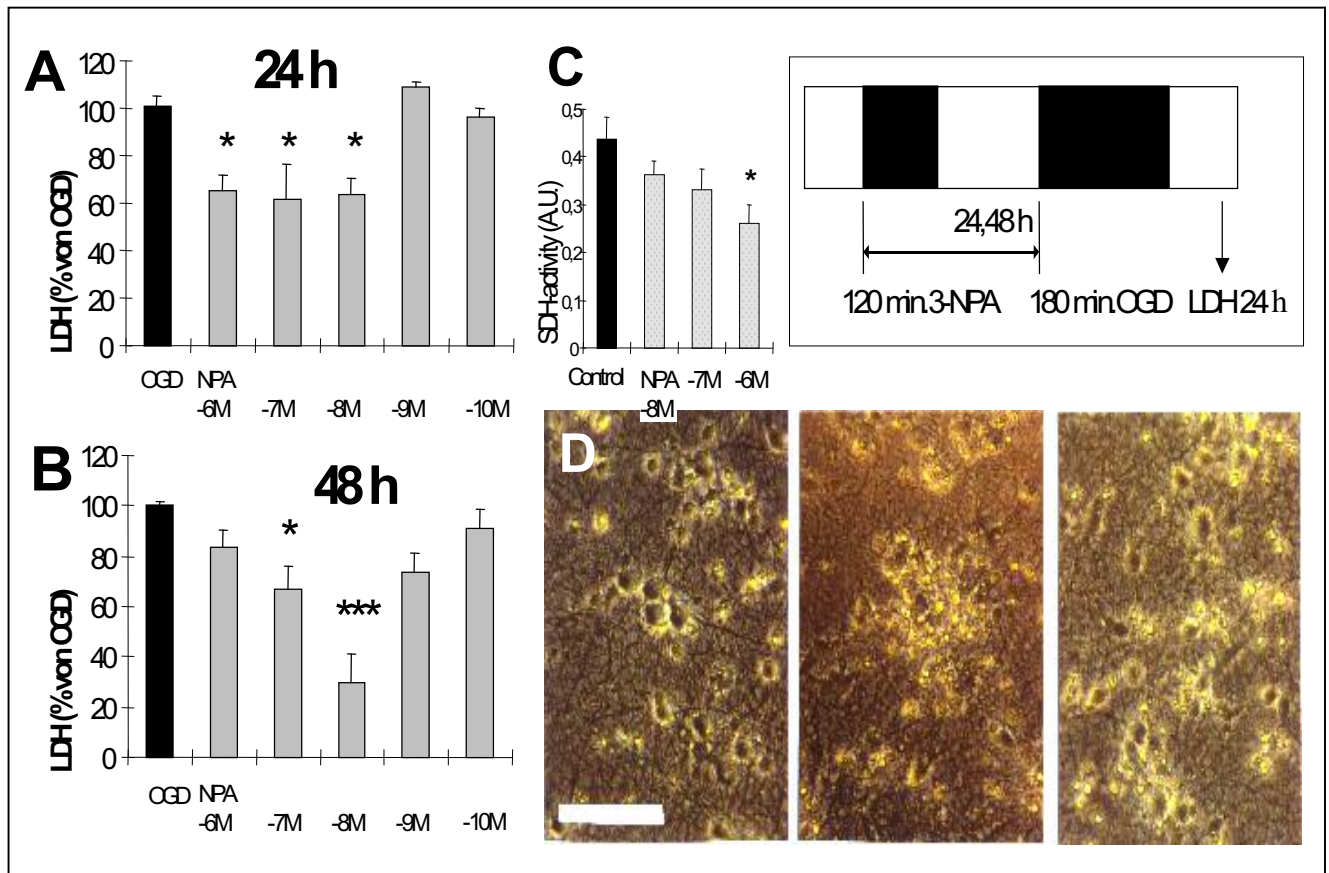
#### 4.2 Pharmakologische Präkonditionierung d

3-NPA ist ein Inhibitor des Komplexes II (Succinatdehydrogenase) der Atmungskette. 3-NPA zeigte in Hirnschnitten Protektion<sup>112</sup>. Dabei blieb unklar, ob der Effekt direkt neuronale Zellen betrifft, oder durch Interaktion mit Endothel, Gefäßen und Astrozyten im intakten Organ entsteht. Wir untersuchten, ob durch direkte Applikation von 3-NPA auf Neuronen ebenfalls Toleranz gegen eine darauffolgende OGD induziert werden kann. Dabei zeigt sich, dass in einer U-förmigen Kurve, ab einer Dosis von  $10^{-6}$  M im 24 h Intervall signifikant eine Protektion erzielt werden kann. Eine maximale Protektion wurde, im 24 h und 48 h Intervall wurde durch  $10^{-8}$  M induziert (s. Abbildung 6). Kleinere Dosen, wie  $10^{-9}$  und  $10^{-10}$  M waren nicht mehr protektiv.

---

<sup>d</sup> Diese Experimente wurden zusammen mit Nikolaj Isaev (OGD); Christoph Harms (LDH), Alexandra Bergk (Zellkultur) und Mathias Riepe (3-NPA-Protokolle) durchgeführt.

Abbildung 6 Pharmakologische Präkonditionierung



Pharmakologische Präkonditionierung mit 3-NPA, LDH-Werte und Zytologie; 3-NPA wurde in Konzentrationen von 10<sup>-6</sup> bis 10<sup>-10</sup> M für 2 h eingesetzt.

**A:** 24 h Intervall;

**B:** 48 h Intervall zwischen 3-NPA und OGD. Die LDH-Werte waren zwischen 150-300 U/ml; die Daten sind Mittelwerte ± S.E.; n= 8-24 von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

\*\* : p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 (Student t-test). 3-NPA zeigte eine dosisabhängige Induktion von Hypoxietoleranz mit einer maximalen Protektion von 72 % bei 10<sup>-8</sup> M bei einem Intervall von 48 h.

**C:** SDH: Succinat-dehydrogenase-Aktivität; A.U. Arbiträre Einheiten (-mabs/μg Protein; Mittelwerte ± S.E.; n= 4-7 von mindestens 3 unabhängigen Experimenten; Kontrolle: "sham wash" mit BSS 20; NPA -6M; -7M; -8M: 3-Nitropropionat 10<sup>-6</sup> M; 10<sup>-7</sup> M; 10<sup>-8</sup> M; 2 h.

\* : p < 0.05 (Student t-test).

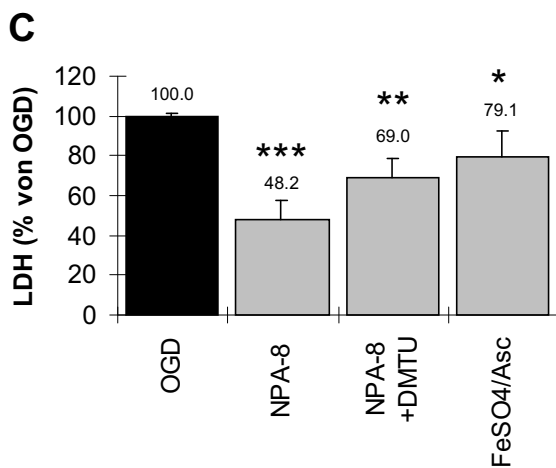
**D:** Photomikrographien 24 h nach OGD.

**Links:** Kontrolle: "sham wash" mit BSS20.

**Mitte:** OGD 3 h, die Zellen zeigen deutliche degenerative Veränderungen (Schrumpfung des Zytoplasmas, Dendritenverlust und letztendlich Desintegration).

**Rechts:** 3-NPA (10<sup>-6</sup> M; 2 h) 48 h vor OGD reduzierte die durch OGD verursachten Veränderungen signifikant; Balken: 50 μm.

Abbildung 7: Pharmakologische Präkonditionierung/Antioxidantien.



FeSO<sub>4</sub>/Asc: Eisensulfat/Ascorbat ist ein Redoxsystem, welches freie Radikale generiert; DMTU: Di-methyl-thio-urea: Radikalfänger 10<sup>-4</sup> M. Das Intervall war 48 Stunden. LDH wurde 24 h nach OGD gemessen.

### 4.3 Fall-Kontrollstudie mit klinischen Endpunkten<sup>e</sup>

Die Ergebnisse oben zeigen, dass es möglich ist, Hypoxietoleranz *in vitro* zu modellieren und zu simulieren. Ob diese Ergebnisse jedoch auf das adulte Gehirn oder die klinische Situation übertragbar sind, ist unklar. Auch gibt die Literatur nur schwache und indirekte Indizien für Hypoxietoleranz am menschlichen Gehirn. Als ersten Ansatz zur Klärung dieser Frage möchten wir folgende Arbeitshypothese formulieren: TIAs sind kurzzeitige Ischämien, welche in der Regel kein strukturelles Defizit hinterlassen. Sollte eine TIA, sozusagen als klinisches Korrelat eines präkonditionierenden Stimulus, in der Lage sein Hypoxietoleranz zu induzieren, so sollten Ausmass und Schwere der neurologischen Ausfälle bei einem darauffolgenden Hirninfarkt geringer sein. Um dies zu untersuchen, erhoben wir, wie oben erwähnt eine Schlaganfalldatenbank, in der Patienten mit prodromalen TIAs mit Patienten ohne TIA retrospektiv verglichen wurden.

Abbildung 8 zeigt schematisch das Studiendesign.

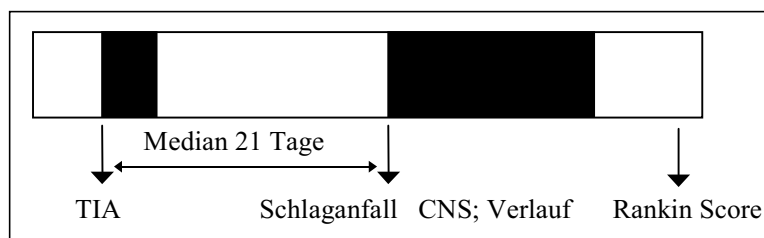


Abbildung 8  
Studiendesign

#### **Einschlusskriterien**

Eingeschlossen wurden: alle Patienten der Neurologischen Klinik der Charité, die zwischen Januar 1994 und August 1998 mit der Verdachtsdiagnose eines ischämischen Hirninfarktes aufgenommen wurden.

#### **Ausschlusskriterien**

<sup>e</sup> Die Schlaganfalldatenbank wurde zusammen mit Kai Kallenberg (Archivarbeiten) und Prof. Wernecke (Studiendesign) erstellt.

Patienten bei denen eine vorbestehende Demenz bekannt war, die nach dem Schlaganfall eine persistierende Bewusstseinsstörung, eine schwere Sprachstörung (v.a. globale Aphasie), eine vorbestehende ausgeprägte Demenz oder Gedächtnisstörung hatten und Patienten, bei denen auch die Angehörigen keine Angaben über die Vorgeschichte machen konnten, wurden aus der Studie ausgeschlossen, da in diesen Fällen über eine (oder keine) vorangegangene TIA nicht entschieden werden konnte. Eine Ausnahme stellten Patienten dar, bei denen in der Vorgeschichte bereits klinisch eindeutig eine TIA diagnostiziert wurde oder eine TIA fremdanamnestisch gesichert werden konnte. Solche Patienten wurden in die TIA-Gruppe aufgenommen.

Ebenso wurden Patienten mit minimalen, nur sensiblen und rasch rückläufigen Ausfällen ausgeschlossen, da die Diagnose einer zerebralen Ischämie in diesen Fällen oft schwierig bzw. die Abgrenzung gegen TIAs, Migräne- oder epileptische Anfälle bzw. postiktale Defizite manchmal schwer zu treffen ist.

Patienten mit einer Subarachnoidal- oder primären intrazerebralen Blutung, Sinusvenenthrombose und vorangegangenem demarkierten ipsilateralen ischämischen Hirninfarkten im CT wurden ausgeschlossen, genauso wie Patienten mit einer TIA ohne darauffolgenden Infarkt. Trat eine TIA in einem anderen vaskulärem Territorium als der nachfolgende Infarkt auf, wurde die betreffende Person in die Gruppe „nur“ Schlaganfall aufgenommen. Dies gilt auch für retinale TIAs.

### **Studiendesign und Hypothesen**

Die Studie wurde retrospektiv durchgeführt. Alle Krankenakten wurden zunächst mittels des Entlassungsbriefes vorselektiert. Alle Briefe mit der Diagnose Hirninfarkt; Mediainfarkt; Hirnstamminfarkt, Schlaganfall; cerebrale Ischämie; ischämischer Infarkt, arterielle Thrombose wurden auf das Vorliegen der Ein- und Ausschlusskriterien überprüft. Ausser den persönlichen Daten wurden Behandlungsjahr, Behandlungsdauer, Station, Zeitpunkt, Lokalisation und Anzahl von TIAs, vorangegangene Hirninfarkte, bekannte Zeitdauer bis zur ersten klinischen Untersuchung und bis zur

Durchführung der Computertomographie des Kopfes und bis zum Beginn der Behandlung, Duplexsono- und Echokardiographieergebnisse, Risikofaktorenprofil, Blutdruck bei Aufnahme, Medikamente bei Aufnahme und Entlassung, klinischer Verlauf, Komplikationen, Wiederaufnahme, Hausarztadresse den Akten entnommen. Bei Patienten, bei denen der Infarktbeginn nicht bekannt war, wurde der Zeitpunkt, wann der Patient zuletzt gesund gesehen wurde registriert. Bei Patienten, bei denen der Zeitpunkt des CTs nicht vermerkt war, wurde aufgrund eigener Erfahrungen ein Zeitraum von 1 Stunde nach Aufnahme angenommen.

Die primäre Hypothese lautete, daß Patienten mit einer vorausgegangenen TIA im gleichen vaskulären Versorgungsgebiet im Vergleich zu Patienten mit Infarkt ohne vorangegangene TIA ein geringeres neurologisches Defizit bei Aufnahme aufweisen (primärer Endpunkt). Aufgrund eines kleineren Schlaganfalles sollte es auch zu einem kürzeren und unkomplizierteren Krankenhausaufenthalt kommen (sekundäre Endpunkte). Je einem Patienten mit einer prodromalen TIA vor dem Schlaganfall wurden drei Patienten gleichen Geschlechts und Alters ( $\pm 5$  Jahre) gegenübergestellt, die einen unangekündigten Hirninfarkt erlitten haben.

### **Datenschutz, Dokumentation, Diagnostik und Therapie**

Die Teilnahme an der vorliegenden Studie war freiwillig. Allen Patienten wurde bei Aufnahme in die Klinik eine schriftliche Einverständniserklärung/Datenschutzerklärung vorgelegt, die entweder vom Patienten persönlich bei Aufnahme oder, wenn der individuelle Zustand dies nicht zuließ, von einem Angehörigen vorläufig unterschrieben wird. Die Daten sind nach der Erhebung anonymisiert worden und werden ausschließlich anonym veröffentlicht. Die Dokumentation erfolgte auf standardisierten Formularen vor Eingabe in die Datenbank.

Von allen Patienten wurde sofort nach der Aufnahme eine Computertomographie angefertigt. Davon wurden diejenigen ausgenommen, die in die Charité verlegt wurden und bereits eine aktuelle CT-Aufnahme mitbrachten. Alle Patienten wurden nach einem lokalen Klinikprotokoll mit fraktioniertem oder unfraktioniertem Heparin therapiert (unter PTT-Kontrolle).

Bei 14 Patienten wurde eine systemische oder lokale Thrombolyse mit rt-PA oder alternativ mit Urokinase durchgeführt.

Von jedem Patienten wurde innerhalb der ersten 12 Stunden ein EKG angefertigt, ebenso eine Duplex-Sonographie innerhalb von 48 Stunden. Bei 26 Patienten wurde transthorakal, bei 111 transösophageal eine Echokardiographie durchgeführt. Nach einer initialen Phasen wurden die Patienten entweder für eine Carotis-Endarterektomie vorgesehen, erhielten 300 mg Acetylsalicylsäure (oder andere Thrombozytenaggregationshemmer) oder eine INR-kontrollierte orale Antikoagulation, üblicherweise mit Phenprocoumon (Marcumar® oder Falithrom®).

### **Biometrie<sup>f</sup>**

Die Daten wurden in die oben erwähnte Schlaganfalldatenbank eingegeben. Anschließend wurden die Daten anhand des Parameters: vorangegangene TIA *JA* oder *NEIN* in 2 Gruppen eingeteilt. Jedem Patienten aus der TIA-Gruppe wurden, in Alter und Geschlecht übereinstimmend, 3 Patienten aus der anderen Gruppe gegenübergestellt.

### **Primäre Endpunkte**

Als primäre Endpunkte wurde der klinisch neurologische Status bei Aufnahme und der dokumentierte weitere klinische Verlauf innerhalb der ersten Tage nach Aufnahme gewählt. Zur Skalierung wurde hierzu der etablierte und validierte Canadian Neurological Score (CNS) verwandt (siehe Anhang), dessen Schwerpunkt auf motorischen Defiziten liegt, der klinische Verlauf wurde unterteilt in: Verschlechterung, Verbesserung oder Unverändert. In den Fällen, in denen der Verlauf nicht dokumentiert war, wurde angenommen, dass der klinische Verlauf unverändert geblieben war.

---

<sup>f</sup> In Zusammenarbeit mit Prof. Wernecke; Institut für Biometrie und Statistik.

### **Sekundäre Endpunkte**

- 1) Intensivpflicht
- 2) Dauer des stationären Aufenthalts
- 3) Komplikationen, wie Reinfarkt, intracerebrale Blutung unter Antikoagulation, tiefe Beinvenenthrombose, Pneumonie, Harnwegsinfektionen, Myokardinfarkt, gastrointestinale Blutungen.

### **Ergebnisse**

Es wurden insgesamt 450 Krankenakten ausgewertet, davon wurden 270 ausgeschlossen: 31 aufgrund eines primär hämorrhagischen Infarkts oder einer Subarachnoidalblutung; bei 29 lag eine Sinusvenenthrombose vor; 32 hatten einen initialen CNS-Score (s.Anhang) von weniger als 4 Punkten, eine globale Aphasie oder eine vorbestehende Demenz; 130 hatten nur ein geringes oder ein schnell abnehmendes Defizit bei Aufnahme; ein vorausgegangener Schlaganfall oder TIA mit Infarzierung im CT im selben vaskulären Versorgungsgebiet war bei 16 Patienten der Fall; 32 Patienten hatten nur eine TIA ohne nachfolgenden Schlaganfall.

Letztlich umfaßt die Analyse 152 Schlaganfallpatienten (im Alter von 18 bis 92 Jahren, bei einem Durchschnittsalter von  $61.2 \pm 15.2$  Jahren, 76 Frauen und 76 Männer). 38 hatten eine vorangegangene TIA, denen 114 (=38x3) ohne TIA mit Alters- und Geschlechtsübereinstimmung gegenübergestellt wurden. 4 Patienten mit TIA und Schlaganfall und 24 „nur“-Schlaganfall-Patienten fanden kein Korrelat aus der anderen Gruppe und wurden ebenfalls ausgeschlossen.

Bei 23 Patienten (15 %) konnte im Nachbeobachtungszeitraum kein Kontakt mehr hergestellt werden. Für diese Patienten konnte kein Rankin Score oder Glasgow Score erhoben werden.

In Tabelle 7 sind die Basisdaten der Patienten mit und ohne TIA-Anamnese verglichen: Es gab keine signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf das Alter und kardiovaskuläre Risikofaktoren (Anhang). Ebenso konnten keine Unterschiede bei der Einnahme von Medikamenten wie Acetylsalicylsäure oder Phenprocoumon und der Zeit

zwischen Auftreten der Symptome (falls bekannt) und Ankunft im Krankenhaus gefunden werden (Zeit bis Behandlung).

**Tabelle 7: Basisdaten**<sup>9</sup>

	TIA		P
	ja ( n = 38 )	nein ( n = 114 )	
Alter, Durchschnitt $\pm$ S.D.	59.7 $\pm$ 13.5	60.4 $\pm$ 13.1	> 0.05*
weiblich,n (%)	19 (50)	57 (50)	> 0.05
männlich,n (%)	19 (50)	57 (50)	> 0.05
Hypertonus,n (%)	24 (63)	67 (59)	> 0.05
Diabetes,n (%)	9 (24)	29 (25)	> 0.05
VHF,n (%)	6 (16)	22 (19)	> 0.05
KHK,n (%)	6 (16)	22 (19)	> 0.05
pAVK,n (%)	5 (13)	10 (9)	> 0.05
Fettstoffwechselstörung,n (%)	13 (34)	38 (33)	> 0.05
Rauchen,n (%)	13 (34)	38 (33)	> 0.05
Acetylsalicylsäure,n (%)	6 (16)	15 (13)	> 0.05
Phenprocoumon,n (%)	0 (0)	5 (4)	> 0.05
Zeit bis Behandlung (h); $\pm$ S.D.	16.0 $\pm$ 19.6	16.9 $\pm$ 27.4	> 0.05*

**Legende:** KHK= koronare Herzkrankheit; VHF=Vorhofflimmern; pAVK= periphere arterielle Verschlusskrankheit; \*= Mann-Whitney-Test; Acetylsalicylsäure,n (%);Phenprocoumon,n (%): Medikamente bei Aufnahme.

In Tabelle 8 werden die Gruppen in Bezug auf Infarktätologie und Lokalisation verglichen. Die beiden Gruppen weisen weder signifikante Abweichungen in der Häufigkeit von kardioembolischen Infarkten, Makro- oder Mikroangiopathie noch in der Infarktlokalisierung auf.

**Tabelle 8 Infarktätiologie und –lokalisierung**

	TIA		P
	ja	nein	
Makroangiopathie, n (%)	15 (39)	29 (25)	> 0.05
Mikroangiopathie, n (%)	6 (16)	20 (18)	> 0.05
Kardioembolischer Infarkt, n (%)	4 (11)	24 (21)	> 0.05
andere/ unbestimmbare Ursache, n (%)	13 (34)	41 (36)	> 0.05
linke Karotis, n (%)	16 (42)	44 (39)	> 0.05
rechte Karotis, n (%)	15 (39)	46 (40)	> 0.05
v.-b.-Versorgungsgebiet, n (%)	5 (13)	21 (18)	> 0.05

**Legende:** v.-b.: vertebro-basilär; andere/unbestimmbare Ursache: Patienten bei denen keine einzelne Schlaganfallätiologie mit höherer Wahrscheinlichkeit oder mehrere mögliche Ursachen (wie Carotisstenose und Vorhofflimmern oder Mikroangiopathie und Makroangiopathie bestanden oder seltenere Schlaganfallätiologien wie fibromuskuläre Dysplasien, Dissekte; paradoxe Embolien; migränöse Hirninfarkte; n. TOAST-Kriterien, s. Anhang.

Die primären und sekundären Endpunkte sind in Tabelle 9 aufgeführt. Patienten mit TIA vor einem ischämischen Hirninfarkt hatten einen signifikant besseren CNS-Score (s.a. Anlage) bei Aufnahme sowie einen signifikant besseren Rankin Score und Glasgow Outcome Score. Die Verteilung der CNS-Werte ist in Abbildung 9 dargestellt. Die Werte in der TIA-Gruppe bzw. nicht-TIA Gruppe waren normalverteilt ( $p=0.25$ ; bzw.  $0.007$ ).

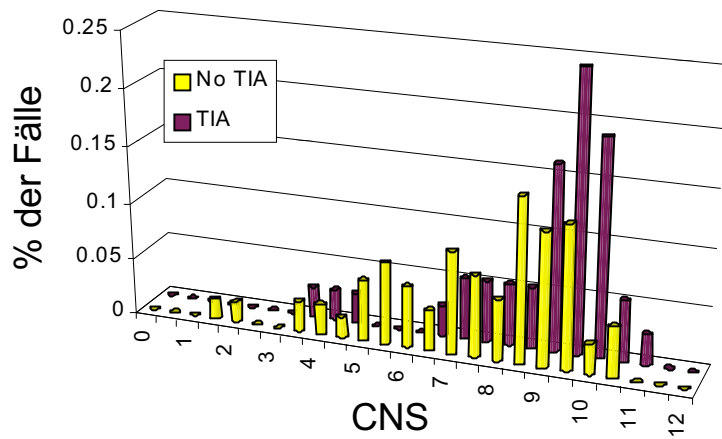
Nach einem durchschnittlichen Beobachtungszeitraum von  $17 \pm 12.4$  Monaten nach dem Infarkt waren insgesamt 22 Patienten verstorben. Die differentielle Analyse der einzelnen Scores zeigt, dass der höhere mittlere CNS-Wert in der TIA-Gruppe großteils auf die geringere Anzahl schwerer Defizite bei Aufnahme zurückzuführen ist (CNS-Wert 4 oder geringer: 29 % gegenüber 8%;  $p < 0.05$ ). 20 Patienten hatten ihre letzte TIA weniger als 72 h vor dem Infarkt ereignis. Diese Untergruppe wies keine Unterschiede im CNS-Wert bei Aufnahme auf und auch nur einen leicht besseren Rankin Score (1.8 gegenüber 1.1) verglichen mit der gesamten TIA-Gruppe.

**Tabelle 9 CNS-Wert und Endpunkt von Patienten mit und ohne TIA.**

	TIA		P
	ja	nein	
<b>CNS-Wert bei Aufnahme <math>\pm</math> S.D.</b>	<b>8.7 <math>\pm</math> 1.8 median 9.5</b>	<b>7.3 <math>\pm</math> 2.1 median 7.5</b>	<b>&lt;0.01</b>
Rankin Score $\pm$ S.D.	1.4 $\pm$ 1.2 median 1	2.7 $\pm$ 1.6 median 3	<b>&lt;0.01</b>
Glasgow Score $\pm$ S.D.	4.3 $\pm$ 1.3 median 5	3.6 $\pm$ 1.6 median 4	<b>&lt;0.05</b>
Tod, n (%)	4 (11)	13 (11)	>0.05
Behandlungszeit (Tage $\pm$ S.D.)	17.8 $\pm$ 9.5	23.0 $\pm$ 16.1	>0.05
Intensivpflicht, n (%)	3 (8)	35 (31)	<b>&lt;0.05</b>
Komplikationen, n (%)	7 (18)	26 (23)	>0.05
Verschlechterung, n (%)	3 (8)	13 (11)	>0.05
Keine Veränderung, n (%)	11 (29)	43 (38)	>0.05
Verbesserung, n (%)	47 (63)	61 (54)	>0.05

**Legende:** S.D.: Standardabweichung; CNS: siehe Anhang; Komplikationen: Reinfarkt; Beinvenenthrombose; Pneumonie, Harnwegsinfekt, Myokardinfarkt; Gastrointestinale Blutung.

Abbildung 9 Verteilung der CNS-Werte



**Tabelle 10: Univariate Analyse**

	<b>CNS ≤ 7</b> <b>(n=40)</b>	<b>CNS ≥ 7</b> <b>(n=108)</b>	<b>OR ±95 % CI)</b>
TIA nein (n = 111)	36	75	
TIA ja (n = 37)	4	33	<b>3.96 (1.38-11.38)</b>

	<b>Rankin 0-1</b> <b>(n=52)</b>	<b>Rankin 2-5</b> <b>(n=56)</b>	<b>OR ± 95 % CI</b>
TIA nein (n = 81)	45	36	
TIA ja (n = 27)	7	20	<b>3.57 (1.39-9.14)</b>

	<b>Glasgow 1-4</b> <b>(n=73)</b>	<b>Glasgow 5</b> <b>(n=54)</b>	<b>OR ± 95 % CI</b>
TIA nein (n = 93)	59	34	
TIA ja (n = 34)	14	20	<b>2.48 (1.12-5.49)</b>

**Legende:** OR: Odds Ratio; CI: Konfidenzintervall; Rankin 0-1: und Glasgow 1-4 bedeuten einen günstigeren Outcome.

In der multivariaten Analyse (lineare Regression) waren nur eine Fettstoffwechselstörung und eine TIA ein unabhängiger Faktor für einen schlechten bzw. guten CNS Score.

In der Analyse des Rankin Scores und des Glasgow outcome Scores waren TIAs keine unabhängigen Prädiktoren.

#### 4.4 Fall-Kontrollstudie mit neuroradiologischen Endpunkten<sup>g</sup>

In den experimentellen Modellen zur Hypoxietoleranz bei fokaler Ischämie zeigte sich eine Reduktion des Infarkt volumens um etwa 20-60 %. In der klinischen Situation ist das Infarktvolumen durch das Ausmass der Läsion in bildgebenden Verfahren abschätzbar. Daher möchten wir für die folgende Studie folgende Hypothese formulieren: Wenn vorangehende, prodromale TIAs zur Hypoxietoleranz führen, sollte, neben verbesserten klinischen Parametern wie Paresegraden auch das geschätzte Infarktvolumen geringer sein oder, grosse Infarkte seltener auftreten. Die vorangegangene Studie erfasste heterogene Infarkte mit Ischämien im Carotisstromgebiet als auch vertebro-basiläre Ischämien. Da für letztere die Darstellung des Infarktes im CT schwierig ist und auch eine komplizierte Korrelation zwischen Infarktlokalisierung, Klinik und Bildgebung besteht, wurden in die folgende Studie nur Patienten mit Ischämien im Stromgebiet der Arteria cerebri media aufgenommen. Abbildung 9 zeigt das Design der Studie.

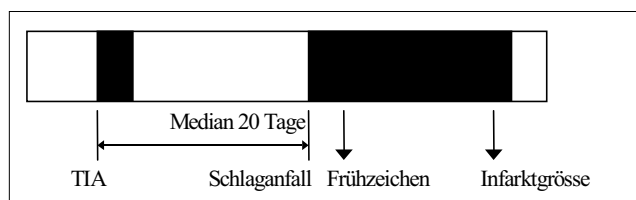


Abbildung 10 Studiendesign

Ein weiterer Unterschied zur vorherigen Studie besteht im matching: In der vorangegangenen Studie wurde nur nach Alter; Geschlecht und Infarktlokalisierung gematcht. Dies birgt die Gefahr, dass Schlaganfälle unterschiedlicher Ätiologien miteinander verglichen wurden: Beispielsweise unterscheidet sich die Pathophysiologie und oftmals auch die Infarktgrösse bei Patienten mit Kardioembolien mit Infarkten, z.B. bei Carotisstenosen.

<sup>g</sup> Diese Daten wurden zusammen mit Prof. Lehmann (Neuroradiologie) und Nicola Amberger (Datenerfassung und Archivarbeiten) erhoben.

Daher wurde in der folgenden Studie auch nach TOAST-Kriterien gematcht (s.Anhang).

### **Studiendesign und Hypothesen:**

Die Studie ist, wie zuvor als retrospektive Fall-Kontrollstudie angelegt und beruht im wesentlichen auf dem gleichen Datensatz - der Population der Schlaganfallpatienten, die zwischen Januar 1994 und August 1998 in der Charité Campus Mitte unter der Verdachtsdiagnose eines ischämischen Schlaganfalles aufgenommen wurden. Ausgangspunkt ist wiederum die oben erwähnte Schlaganfalldatenbank. Die Diagnose einer TIA wurde wie oben, mittels eines validierten Fragebogens (s. Anhang) festgelegt. Die primäre Hypothese lautete, dass Patienten mit einer prodromalen TIA seltener und weniger Ischämie-assoziierte Veränderungen im initialen CT und in der zerebralen Bildgebung im Verlauf haben. In Anlehnung an experimentelle Modelle sollten Patienten mit prodromalen TIAs ein geringeres Infarktvolumen haben. Da das Infarktvolumen oftmals schwer zu bestimmen ist, und, wie im Verlauf der Studie deutlich wurde, bei günstigen Verläufen oftmals kein Kontroll-CT angefertigt wurde, wurden folgende zusätzliche Surrogatparameter als Endpunkte bestimmt.

### **Primärer Endpunkt:**

- Infarktfrühzeichen (Hypodensität; Verlust des Inselrindenbandes; Verlust der Basalganglienzeichnung oder des Kortex-Marklagerkontrastes).

### **Sekundäre Endpunkte: h**

- Grösse des Infarktes (grösser/kleiner als 1/3 des anzunehmenden oberflächlichen und tiefen Territoriums der A. cerebri media).
- Infarktlokalisierung (kortikal/subkortikal).
- Raumfordernde Wirkung des Infarktes.
- Infarktvolumen.

---

<sup>h</sup> die Archivarbeiten und Bestimmung der Infarktvolumina wurden von cand. med. Nicola Amberger durchgeführt.

Beide Endpunkte wurden dichotomisiert ausgewertet.

**Einschlusskriterien:**

- (1) akute neurologische ischämische Defizite im Carotisstromgebiet.
- (2) Aufnahme und ggf. Verlaufs CT in ausreichender technischer Qualität.

**Ausschlusskriterien:**

- (1) Primäre intrazerebrale Blutung
- (2) Sinusvenenthrombose
- (3) vorangegangene TIA mit demarkiertem Infarkt
- (4) TIA in einem anderen Territorium als der darauffolgende Infarkt oder nicht-klassifizierbare TIAs.

Die folgende Tabelle zeigt die klinischen epidemiologischen Daten der Patienten:

Tabelle 11 Klinische Daten

Klinische Daten von Patienten mit einer oder mehreren TIAs vor einem hemisphäriellem Schlaganfall, verglichen mit Patienten ohne TIA vor Schlaganfall<sup>i</sup>.

TIA vor Schlaganfall	Ja	Nein	P
	( n = 36 )	( n = 36 )	
Mittlere Zeit bis CT; $\pm$ S.D.	11.2 $\pm$ 11.1	14.5 $\pm$ 16.2	0.36 (*)
Minimum; Maximum (in Stunden)	1.5 – 48	1.5 – 72	
Median	6	6	
A. carotis links, n	22 (61 %)	18 (50 %)	0.34
Hypertonus, n	25 (69 %)	22 (61 %)	0.46
Diabetes, n	10 (28 %)	13 (36 %)	0.45
koronare Herzerkrankung, n	7 (19 %)	7 (19 %)	1
periphere AVK, n	2 (6 %)	3 (8 %)	0.64
Lipidstoffwechselstörung, n	13 (36 %)	12 (33 %)	0.80
Nikotinabusus, n	11 (31 %)	11 (31 %)	1
Aspirin, n	6 (17 %)	5 (14 %)	0.74
Phenprocoumon, n	1 (3 %)	0 (0 %)	0.31
Medikamente gegen Blutdruck, n	9 (25 %)	8 (22 %)	0.78
Medikamente gegen Diabetes, n	4 (11 %)	4 (11 %)	1
Intensivstation erforderlich, n	4 (11 %)	6 (17 %)	0.50
Komplikationen, n	5 (14 %)	7 (19 %)	0.53
Tod, n	3 (8 %)	2 (6 %)	0.64
Rankin Skala, median $\pm$ S.D.	1.8 $\pm$ 1.5	2.4 $\pm$ 1.4	<0.70 (*)
Median	1	2.5	

<sup>i</sup> In Zusammenarbeit mit Prof. Lehmann und Nicola Amberger.

Mittlerer CNS, MW $\pm$ S.D.	8.9 $\pm$ 1.8	7.1 $\pm$ 2.0	<0.01 (*)
Makroangiopathie (31%)	8.5 $\pm$ 2.4	6.6 $\pm$ 2.3	
Mikroangiopathie (19%)	9.4 $\pm$ 1.4	7.6 $\pm$ 1.6	
Kardioembolie (14%)	9.0 $\pm$ 1.4	6.8 $\pm$ 1.3	
Andere/Unbekannt (36%)	8.9 $\pm$ 1.6	7.5 $\pm$ 2.2	
Rankin Skala, MW $\pm$ S.D.	1.8 $\pm$ 1.5	2.4 $\pm$ 1.4	<0.70 (*)
Median	1	2.5	
Hämorrhagischer Infarkt, n	7 (19 %)	4 (11 %)	0.33
Infarktvolumen in cm <sup>3</sup> , MW $\pm$ S.D.	41.8 $\pm$ 91.9	50.6 $\pm$ 74.1	0.44 (*)
Median in cm <sup>3</sup>	6.0	16.2	
Raumfordernder Infarkt, n	3 (8 %)	4 (11 %)	0.45
Subkortikaler Infarkt <15mm, n	12 (33 %)	6 (17 %)	0.10
Subkortikaler Infarkt >15mm, n	8 (22 %)	8 (22 %)	1
Subkortikaler Infarkt total, n	20 (56 %)	14 (39 %)	0.16

**Legende:** p Wert : Pearson Chi-Square (\*): Wilcoxon U-Test; MW: Mittelwert; S.D: Standardabweichung; CNS: canadian neurological scale; Komplikationen: Reinfarkt; Beinvenenthrombose; Pneumonie, Harnwegsinfekt, Myokardinfarkt; Gastrointestinale Blutung.

Es zeigt sich dabei, dass bzgl. der kardiovaskulären Risikofaktoren keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe mit oder ohne TIAs bestand. Wie bereits in der ersten Population, war auch hier das neurologische Defizit (ausgedrückt durch den CNS-Score) in der Gruppe mit prodromalen TIAs signifikant geringer. Dieser Effekt zeigte sich in allen 4 Schlaganfallkategorien (nach TOAST-Kriterien). Der Rankin-Score, als Mass der bleibenden Behinderung war in der Gruppe mit prodromalen TIAs geringer, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Patienten mit TIAs hatten auch häufiger subkortikale oder eingeblutete Infarkte sowie ein etwas kleineres Infarktvolumen, jedoch waren auch diese Unterschiede nicht signifikant.

Die Patienten mit prodromalen TIAs waren im Durchschnitt etwa 3 Stunden früher im ersten CT untersucht worden. Die Komplikations- und Todesrate war nicht signifikant unterschiedlich, ebenso wie die Anzahl der Patienten die auf einer Intensivstation behandelt werden mussten.

Tabelle 12 Univariate und multivariate Korrelation neuroradiologischer Befunde

	Frühz. Ja (n=43)	Frühz. Nein (n=29)	OR (95% CI) P	Grosser Infarkt (n=21)	Kleiner Infarkt (n=47)	OR (95% CI) P	Volumen >50 mm <sup>3</sup> (n=12)	Volumen <50 mm <sup>3</sup> (n=46)	OR (95% CI) P
CNS>7 (n=48)	25	23	2.8 (0.9-8.1) p=0.06 (u)	7	37	6.9 (2.3-20.7) p=0.001(u)	2	36	18 (1.4-75) p=0.001 (u)
CNS≤7 (n=24)	18	6	3.8 (1.1-13.2) p=0.004 (m)	13	10	8.8 (2.4-32.4) p=0.001 (m)	10	10	8.8 (2.4-32.4) P=0.001 (m)
Rankin 0-1 (n=29)	15	14	2.3 (0.8-6.6) p=0.13 (u)	3	24	10.9 (2.9-40.9) p=0.001 (u)	1	24	12 (1.9-76.8) p=0.01 (u)
Rankin 2-5 (n=31)	22	9	4.2 (1.2-14.6) p=0.03 (m)	15	11	2.8 (0.8-9.9) p=0.35 (m)	8	16	2.2 (0.4-13.5) p= 0.37 (m)
Glasgow 5 (n=28)	14	14	2.6 (0.9-7.4) p=0.08 (u)	3	23	5.5 (1.5-20.9) p=0.01 (u)	1	23	10.8 (1.7-70.6) p=0.01 (u)
Glasgow 1-4 (n=32)	23	9	3.9 (1.1-13.6) p=0.03 (m)	13	18	3.8 (0.8-18.6) p=0.1 (m)	8	17	6.0 (0.5-66.2) p= 0.10 (m)

**Legende:** Frühz.: Infarktfrühzeichen; CNS: Canadian neurological Scale; Grosser Infarkt: mehr als 1/3 des Territorium der A. cerebri media; Infarktfrühzeichen: Frühe Hypodensität im Aufnahme-CT oder Verschattung des Linsenkernes; Verlust der Inselrinden-Zeichnung; Verlust des Kortexbandes; u: univariate Analyse; m: multivariate Analyse (Lineare Regression).

Tabelle 13 Einfluss vorangegangener TIAs auf Infarktgrösse

	<b>Frühzeichen ja (n=43)</b>	<b>Frühzeichen nein (n=29)</b>	<b>OR (95% CI)</b>
TIA nein (n =36)	28	8	4.9 (1.8-13.4) p=0.002 (u)
TIA ja (n = 36)	15	21	7.9 (2.6-23.9) p=0.001 (m)

	<b>Grosser Infarkt (n=21)</b>	<b>Kleiner Infarkt (n=47)</b>	<b>OR (95% CI)</b>
TIA nein (n =36)	15	19	3.8 (1.3-11.3) p=0.02 (u)
TIA ja (n =36)	6	28	3.0 (0.9-9.9) p=0.06 (m)

	<b>Volumen &gt;50 cm<sup>3</sup> (n=12)</b>	<b>Volumen &lt;50 cm<sup>3</sup> (n=46)</b>	<b>OR (95% CI)</b>
TIA nein (n =36)	9	23	3.0 (0.7-12.2) p=0.12 (u)
TIA ja (n =36)	3	23	4.9 (0.8-30.9) p=0.09 (m)

**Legende:** Grosser Infarkt: fokale Hypodensität in mehr als 1/3 des Versorgungsgebietes der A. cerebri media; kleiner Infarkt: fokale Hypodensität in weniger als 1/3 des Versorgungsgebietes der A. cerebri media; u:univariate Analyse; m:multivariate Analyse.

## 5 Zusammenfassung und Diskussion

Zusammengefasst zeigen die oben erwähnten Ergebnisse, dass es Hinweise für hypoxische Präkonditionierung am menschlichen Gehirn geben könnte und dass hypoxische Präkonditionierung *in vitro* stabil modelliert werden kann.

In einer retrospektiven Studie versuchten wir die Hypothese zu untermauern, dass transiente ischämische Attacken (als kurzdauernde ischämische Stimuli) vor einem Infarkt (prodromale TIAs) protektiv sind gegen eine nachfolgende zerebrale Ischämie. Es zeigte sich dabei, dass Patienten mit prodromalen TIAs ein geringeres Defizit und einen günstigeren Verlauf zeigten und im CT seltener Infarktfrühzeichen hatten. Somit könnten transiente ischämische Attacken, vor einem Schlaganfall, analog zu der Situation am Herzen und wie in zahlreichen *in vivo* Modellen gezeigt, ein klinisches Korrelat zur hypoxischen Präkonditionierung darstellen.

Im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass sich hypoxische Präkonditionierung *in vitro* in neuronalen Kulturen modellieren lässt. Eine kurzzeitige Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) 1-3 Tage vor einer längeren OGD führt zu einem signifikanten Schutz von Neuronen, bis zu 90%. Hypoxietoleranz konnte auch durch andere metabolische Stimuli, wie Inhibition von Atmungskettenenzymen durch 3-NPA im gleichen Zeitrahmen simuliert werden.

Da die in dieser Arbeit verwendeten Methoden von unterschiedlichen Modellen ausgehen, soll im folgenden die Diskussion der experimentellen und klinischen Untersuchungen getrennt erfolgen.

### **Diskussion der experimentellen Ergebnisse:**

#### 5.1 Hypoxische Präkonditionierung

In den experimentellen Untersuchungen wird als "Schlaganfallmodell" Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) in primär neuronalen Kulturen verwendet. Diese OGD ist als Zellkulturmodell für globale oder fokale Ischämie anerkannt, in vielen Laboren etabliert und gut reproduzierbar<sup>133</sup>.

Neuronen zeigen in diesem Modell vorwiegend einen nekrotischen Zelltod, der überwiegend von NMDA-Rezeptoren vermittelt wird (Exzitotoxizität)<sup>66</sup>. Der Nachteil dieses Modelles ist im wesentlichen die methodische Reduktion des Zellkulturansatzes: Es werden Neuronen perinataler Tiere in geringer Dichte, auf künstlichen Nährböden in einem vereinfachten Nährmedium gehalten. Diese Situation kann nicht ohne weiteres auf das adulte Gehirn von Versuchstieren oder gar den Menschen übertragen werden. Dennoch differenzieren diese Zellen *in vitro* weiter zu Neuronen, bilden Dendriten, NMDA-Rezeptoren und Synapsen aus, sind elektrisch aktiv und sind, im Vergleich zu Astrozyten oder Endothelzellen, relativ hypoxiesensibel<sup>66</sup>.

OGD (Sauerstoff-Glucose-Deprivation) ist ein oft verwandtes und etabliertes Modell zur Simulation von Hypoxie und Ischämie. Diese beiden, prinzipiell unterschiedlichen Stimuli und auch unterschiedlichen klinischen Bilder können in diesem Modell nicht getrennt simuliert werden. Grob vereinfacht kann jedoch angenommen werden, dass eine OGD einer Ischämie noch am ehesten entspricht, während durch eine GD eine Hypoglycämie und OD eine Hypoxie simuliert werden kann. Der Vorteil dieses Modelles ist, dass der Sauerstoffpartialdruck gut kontrolliert werden kann, dass es reproduzierbare Ergebnisse liefert und dass, durch ein definiertes extrazelluläres Milieu multiple Parameter kontrolliert werden können und, nicht zuletzt eine grosse Menge von Schwesterkulturen gleichzeitig untersucht werden kann. Der prinzipielle Nachteil besteht darin, dass der Sauerstoff (in der Atmosphäre und im Überstand gelöst) entfernt werden muss, was einen Zeitfaktor darstellt und, durch Zellspülungen einen mechanischen Stimulus *per se* darstellt. Ein weiterer Nachteil ist, dass in unterschiedlichen Laboren unterschiedliche Zellkammern und Protokolle verwendet werden, was die Vergleichbarkeit erschwert. In den Experimenten zur hypoxischen Präkonditionierung zeigte sich, dass durch ein Intervall von 1-3 Tagen Toleranz gegenüber einer zweiten Hypoxie induziert wird. Dieser Effekt war robust und reproduzierbar. Unterhalb von 24 h war keine Hypoxietoleranz nachweisbar. Die vorliegenden Ergebnisse stellten das erste stabile Zellkulturmodell der Hypoxietoleranz in differenzierten neuronalen Kulturen dar. Sakaki et al.<sup>55</sup> berichteten über Hypoxietoleranz in undifferenzierten

gemischten neuronalen Zellen durch eine 4-stündige Hypoxie. Khaspekov et al.<sup>57</sup> konnten zwischenzeitlich in hippocampalen Kulturen ebenfalls Hypoxietoleranz durch hypoxische Präkonditionierung induzieren, mit einem ähnlichen zeitlichem Verlauf wie wir zuvor zeigen konnten. Unsere Ergebnisse fügen sich somit ein in die wachsende Anzahl von *in vivo* Arbeiten, die in verschiedenen Spezies und verschiedenen Hypoxiemodellen Hypoxietoleranz zeigen konnten. Die zugrundeliegenden Mechanismen bleiben jedoch in unserem Modell offen. Das Zeitfenster, in dem wir Hypoxietoleranz beobachteten (24-72 h), legt nahe, dass genomische Mechanismen oder *de novo* Proteinsynthese beteiligt sind, ohne dass wir derzeit Kandidatengene identifizieren oder nachweisen konnten. Zukünftig soll jedoch, auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse, die genomische Antwort nach hypoxischer Präkonditionierung untersucht werden. Angesichts der Komplexität der zu erwartenden adaptiven Veränderungen, ist geplant, dabei Methoden zu verwenden, die eine parallele Analyse einer grossen Menge von Genen oder Proteinen erlauben, wie SAGE, DNA-Chips oder 2-dimensionale Gelelektrophorese (2D-GE).

### 5.2 Pharmakologische Präkonditionierung

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Hypoxietoleranz nicht nur durch Hypoxie als präkonditionierenden Stimulus, sondern auch durch metabolische Stimuli, wie sie eine Blockade der Atmungskette darstellt, induziert werden kann. 3-NPA inhibierte dosisabhängig die Succinatdehydrogenase (SDH) von lysierten Zellen. Ähnliche Dosen induzierten 24 bis 48 h später Hypoxietoleranz gegen eine OGD, welche ansonsten einen deutlichen neuronalen Schaden hervorrief. Dieser Effekt von 3-NPA konnte durch Antioxidantien teilweise aufgehoben werden, so dass möglicherweise freie Radikale als Induktoren der Hypoxietoleranz eine Rolle spielen. Ebenso wie in der hypoxischen Präkonditionierung war ein Zeitfenster von 24 bis 48 Stunden erforderlich, was die Beteiligung eines genetischen Programmes suggeriert. Im Gegensatz zu den akuten Hirnschnitten, in denen auch eine 3-NPA Gabe *in vivo* nur wenige Stunden zuvor noch Hypoxietoleranz induzierte<sup>112</sup>, war dies

in den Zellkulturen nicht möglich. Der Grund dafür ist unklar. Möglich erscheinen systemische Effekte von 3-NPA, z.B. auf Leuko- oder Erythrozyten oder Gefässwände.

Ein protektiver Effekt von 3-NPA konnte auch in anderen Schlaganfallmodellen bestätigt werden: *In vivo* konnte Hypoxietoleranz durch 3-NPA gezeigt werden sowohl bei fokaler<sup>202</sup> als auch bei globaler Hypoxie<sup>203</sup>. Mit der Ausnahme des kurzen Zeitfensters, sind die Ergebnisse vergleichbar: in den akuten Hirnschnitten als auch *in vivo* war der Effekt nach 48-72 h maximal, also in einem ähnlichen Muster wie in den Zellkulturexperimenten. *In vivo* konnte der 3-NPA Effekt durch NMDA-Antagonisten, Antioxidantien oder durch Proteinsynthesehemmer inhibiert werden<sup>202</sup>. Wir konnten diese Ergebnisse nicht reproduzieren, da die erwähnten Substanzen *per se* einen grossen Einfluss auf den hypoxischen Zellschaden hatten, der eine Unterscheidung zum präkonditionierenden Effekt erschwerte, ein Problem, welches auch andere Untersucher beobachten konnten<sup>66</sup>. Unsere Experimente legen jedoch eine Beteiligung von freien Radikalen nahe, da Radikalfänger, vor einer OGD gegeben, den präkonditionierenden Effekt von 3-NPA teils aufheben konnten.

3-NPA führt zu einem Anstieg von freien Radikalen<sup>204</sup>. Andererseits scheint 3-NPA-Präkonditionierung den posthypoxischen Anstieg von Radikalen zu reduzieren<sup>90</sup>, so dass die Zusammenhänge zwischen 3-NPA, Radikalen und Hypoxie weiterer Klärung bedürfen. Möglich erscheint folgendes Szenario: 3-NPA führt zu einem Anstieg von freien Radikalen, welche wiederum Antioxidantien induzieren. Diese Antioxidantien führen dann andererseits zu einer verminderten Radikalproduktion in einer zweiten Hypoxie. Da in den *in vivo* Experimenten systemische Effekte von 3-NPA nicht ausgeschlossen werden können, bieten Zellkulturen hier einen grossen Vorteil. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass 3-NPA direkt an den Neuronen wirken könnte, zumindest in den von uns untersuchten Zeitfenstern von 24-48 Stunden. In wie weit in den Kulturen verbliebene nicht-neuronale Zellen an der Präkonditionierung beteiligt sind, kann derzeit nicht beurteilt werden.

Ein weiterer diskussionswürdiger Punkt ist, dass die Dosen, in denen in unseren Versuchen Hypoxietoleranz induziert wurde, sehr niedrig waren. Die effektivste protektive Dosis ( $10^8$  M) führte unerwarteterweise nicht zu einem signifikanten SDH-Abfall. Methodische Probleme, insbesondere eine mangelnde Sensitivität der SDH-Messung, können hier jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die von uns verwendeten Dosen waren auch im Vergleich zu anderen Modellen niedrig. Eine Erklärung könnte sein dass die neuronal-angereicherten Zellen besonders empfindlich auf Inhibitoren der Atmungskette sind, da die physiologische "Pufferung" mit Astrozyten nur eingeschränkt möglich ist<sup>205</sup>. Zudem wurde 3-NPA stets in zuckerfreien Lösungen appliziert, was zu einer höheren Toxizität führt<sup>206</sup>. Die genetischen Programme oder Veränderungen, die eine 3-NPA Gabe induziert, sind nicht bekannt. Um die initialen Schritte der Signalkaskade zu verfolgen, untersuchten wir an anderer Stelle eine Aktivierung von NF $\kappa$ B und HIF<sup>151</sup>. Keiner dieser beiden Transkriptionsfaktoren wurde jedoch durch 3-NPA aktiviert, was jedoch die Beteiligung anderer Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder CREB nicht ausschliesst.

### 5.3 Studie mit klinischen Endpunkten

Hypoxietoleranz, wurde als erstes am Myokard von Murry et al.<sup>10</sup> beschrieben und hat als wichtiger endogener adaptiver Mechanismus gegen Hypoxie beträchtliche Beachtung gefunden.

Obwohl Studien am Herzen gezeigt haben, daß Angina pectoris vor einem Myokardinfarkt ein klinisches Korrelat für hypoxische Präkonditionierung darstellen könnten<sup>39,40</sup>, ist trotz einer steigenden Anzahl von experimentellen Studien *in vivo* und *in vitro* über die Situation im menschlichen Gehirn nur wenig bekannt<sup>45,145</sup>.

TIAs sind, ähnlich wie eine Angina pectoris am Herzen klinisch als ein zeitlich begrenzter fokaler Funktionsverlust aufgrund einer Ischämie definiert, der üblicherweise kein strukturelles Defizit hinterläßt. Darüber hinaus sind TIAs wichtige Warnsignale einer kardiovaskulären Erkrankung und gehen häufig einem Schlaganfall mit bleibenden Defiziten voraus. Nach einer TIA liegt das Schlaganfallrisiko im ersten Monat bei 4-8%<sup>185</sup>, bei 4-12 % im ersten Jahr und bleibt lebenslang fünffach erhöht<sup>186,187</sup>. Abhängig von der Infarktätiologie, haben etwa 7-40 % der Schlaganfallpatienten eine vorausgegangene oder prodromale TIA<sup>177,207</sup>.

Die Hypothese war nun, daß wenn - in Analogie zu der Situation am Herzen - eine TIA das klinische Korrelat von ischämischer Toleranz<sup>208</sup> ist, ein nachfolgender Schlaganfall ein geringeres Defizit und einen unkomplizierteren Verlauf zeigen sollte.

Als primärer Endpunkt wurde der dokumentierte standardisierte klinisch-neurologische Status bei Aufnahme gewählt, welche unter Zuhilfenahme der etablierten und validierten Canadian Neurological Scale (CNS; s. Anhang)<sup>196</sup> quantifiziert wurde. Bei der Auswahl dieser Skala spielten Praktikabilität und Reproduzierbarkeit die größte Rolle. Der CNS legt seinen Schwerpunkt auf motorische Funktionen, und kann, vor allem, auf der Grundlage der körperlichen Untersuchung, auch retrospektiv einfach erhoben werden. Unsere Erfahrungen zeigten, dass die Variabilität zwischen unterschiedlichen Untersuchern und zu verschiedenen Zeitpunkten gering war und die Erhebung leicht erlernt werden konnte. Anschließend wurden, zur Vergleichbarkeit der Daten in einem Fall-Kontroll-Design, jedem Patienten

der TIA-Gruppe drei Patienten der anderen Gruppe (ohne TIA) gegenübergestellt, die in den Parametern Alter und Geschlecht übereinstimmten.

Jeder Patient bekam den oben bereits genannten validierten Fragebogen (s. Anhang), zugesandt, was zur Sicherung der TIA-Diagnose diente. Im Falle von Diskrepanzen zwischen der Patientenakte und dem Fragebogen wurde mit den Patienten zusätzlich telefonisch Kontakt aufgenommen, ebenso in Fällen, in denen Fragebögen nicht zurückgesandt wurden. Die Antworten wurden von zwei verschiedenen Personen unabhängig von einander ausgewertet. Diese verglichen hinterher ihre Ergebnisse. Bei unterschiedlichen Auffassungen fand eine Diskussion statt, an deren Ende immer ein Konsens gefunden werden konnte. Somit war die größte mögliche Sicherheit bei der TIA-Diagnose gegeben, was die Basis für eine Einteilung der Patienten in die beiden Beobachtungsgruppen darstellte. Damit ist ein hohes Maß an Objektivität erreicht.

Die oben bereits angeführten Ergebnisse zeigten, daß die Patienten mit einer TIA vor ihrem Schlaganfall ein signifikant geringeres neurologisches Defizit (mit einem signifikant höherem CNS) zum Zeitpunkt der Aufnahme hatten als jene Patienten ohne prodromale TIA.

Darüber hinaus konnte bei der ersten Gruppe ein besserer stationärer Outcome (sowohl weniger Intensivfälle als auch kürzere Liegezeiten) und im Nachbeobachtungszeitraum eine geringere Behinderung (Rankin und Glasgow Scales) festgestellt werden. Die genaue Ursache für diesen "protektiven" Effekt ist unbekannt, allerdings legen die beschränkten Daten dieser Studie nahe, daß eine TIA einen gewissen Schutz vor einem nachfolgenden ischämischen Hirninfarkt bietet. Trotz allem soll nicht vergessen werden, dass eine TIA ein wichtiges Warnsignal für eine vorliegende schwere zerebro- oder kardiovaskuläre Erkrankung ist.

TIA sind *per se* gewichtige Risikofaktoren für einen Schlaganfall<sup>188</sup>, und beinhalten auch eine höhere Mortalität für einen Herztod<sup>209</sup>.

Eine mögliche Erklärung könnte sein dass, während ein unangekündigter ischämischer Hirninfarkt plötzlich und häufig durch irreversible Gefäßastverschlüsse zustande kommt, könnte eine TIA - sofern sie nicht

selbst strukturelle Schäden hinterlässt - dem Gehirn ermöglichen endogene protektive Mechanismen gegen einen nachfolgenden, ansonsten schwereren Insult zu bilden.

Wie oben erwähnt, war der primäre Endpunkt dieser Studie die Canadian Neurological Scale (CNS), welche in erster Linie die motorische Funktion betrachtet. Der Unterschied zwischen den beiden Beobachtungsgruppen betrug ungefähr 1 Punkt, was etwa dem klinisch relevantem Unterschied zwischen einer leichten und einer schweren Parese in einer Extremität entspricht. Es ist als unwahrscheinlich anzusehen, daß diese Differenz rein zufällig zustande kommt, da der Unterschied von 1 Punkt in der CNS eine hohe Sensitivität, eine gute Spezifität und ebenso einen hohen negativen Vorhersagewert beinhaltet<sup>197</sup>.

Die vorliegende Studie, muss jedoch, in der vorliegenden Form, mit Vorsicht betrachtet werden. Erstens ist es fraglich, ob eine TIA, aufgrund ihrer Heterogenität überhaupt einen adäquaten Stimulus darstellt, um eine Ischämietoleranz zu induzieren. Der Grad der Hypoperfusion bei einer TIA, deren Dauer und Lokalisation im untersuchten Patientengut ist nicht bekannt. In früheren Studien konnte eine persistierende Hypo<sup>210</sup> aber auch Hyperperfusion<sup>211</sup> nach einer TIA gemessen werden. Darüber hinaus ist es bei TIAs - aufgrund des vorübergehenden Charakters - oft schwer, eine präzise klinische Quantifizierung und eine genaue Diagnose zu erreichen. In der ersten Studie wurden vorwiegend, in der zweiten Studie ausschliesslich Patienten mit hemisphärieller TIA eingeschlossen, was die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Lokalisation erhöht<sup>212</sup>. Patienten, bei denen eine adäquate TIA-Diagnose nicht möglich war, wurden ausgeschlossen. Da es jedoch in einer retrospektiven Diagnosestellung keine objektiven Kriterien gibt, gründete die TIA-Diagnose auf der Fähigkeit der Patienten, sich an eine TIA zu erinnern und diese auch als eine solche wahrzunehmen, was besonders bei älteren Menschen problematisch sein kann. Verschiedene Studien zeigten bereits, daß TIAs häufig von Patienten nicht als solche wahr genommen werden oder schnell vergessen werden<sup>213</sup>. Aus diesem Grund wurde speziell diesem Punkt, wie oben bereits ausgeführt, besonders viel Aufmerksamkeit gewidmet: Die Patienten wurden

erstens von verschiedenen Personen zu einem solchen Ereignis befragt und zweitens fanden unterschiedliche Verfahren Anwendung. Somit fußt die Diagnose insgesamt auf der Anamnese durch den aufnehmenden Arzt in der Rettungsstelle, der Nachanamnese und Diagnose des stationär behandelnden Arztes, der Überprüfung dieser Ergebnisse durch den Fragebogen (Anhang) und gegebenenfalls ein Telefonat, wobei in einigen Fällen zusätzlich eine Fremdanamnese erhoben wurde, wodurch eine möglichst genaue und engmaschige Erhebung und Übereinstimmung ermöglicht werden sollte. Trotzdem bleibt die Möglichkeit bestehen, daß einige Patienten, die eine solche ischämische Attacke erlitten haben, falsch eingruppiert wurden.

Ein weiterer Nachteil unseres retrospektiven Studiendesigns ist ein möglicher Datenverlust durch unvollständige Angaben des Patienten oder des aufnehmenden Arztes, so daß eine Aussage über den Schlaganfall oder die TIA bezüglich der Ätiologie, Schwere und Verlauf nur begrenzt möglich ist (selection bias). Während des Nachbeobachtungszeitraumes können Patienten aus unbekanntem Grund verstorben sein, was dazu führen kann, daß die Anzahl von weiteren Hirn- oder Myokardinfarkten mit letalem Ausgang, vor allem in der TIA-Gruppe unterschätzt wird.

Eine weitere Beobachtung und möglicherweise auch Nachteil in unserer Studie war, dass das Intervall zwischen TIA und Infarkt erheblich variierte; manchmal ging die TIA dem nachfolgenden Infarkt direkt voraus, teilweise lagen aber auch Jahre dazwischen. Deshalb sollten auch andere Faktoren in Betracht gezogen werden, wie eine verbesserte Kollateralversorgung oder eine frühere Reperfusion (wie sie am Herz beobachtet wurde).

Unsere Studie war, wie erwähnt, in einem retrospektivem Design angelegt. Aufgrund von Migration und Patientenselektion, auch durch Aufnahme in eine Universitätsklinik, sowie durch die Tatsache, daß an der Erhebung des initialen neurologischen Befundes trotz weitestmöglicher Standardisierung der Untersuchung verschiedene Ärzte beteiligt waren, können beträchtliche Messfehler entstehen (measurement bias). Da die Daten dieser Studie monozentrisch von einer Institution stammen, die u.a. Patienten aus anderen Krankenhäusern übernimmt, könnte die Auswahl der Schlaganfallpatienten

nicht repräsentativ für eine größere Schlaganfallpopulation sein. Überraschenderweise waren kardiovaskuläre Risikofaktoren, die Infarktlokalisierung und -ätiologie in beiden Gruppen (mit und ohne TIA) ungefähr gleich verteilt. Lediglich Makroangiopathien (s.a. TOAST-Kriterien im Anhang) waren in der TIA-Gruppe überrepräsentiert, jedoch nicht statistisch signifikant. In anderen Studien konnte beobachtet werden, daß eine TIA-Schlaganfall-Episode häufiger bei arteriosklerotischen Veränderungen auftreten, als bei kardioembolischen oder lakunären Infarkten. Daher kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß der beobachtete Unterschied aufgrund verschiedener Prognosen von Makroangiopathien verglichen mit anderen Schlaganfallätiologien, z.B. kardialen Embolien zustande kommt.

Eine andere Erklärung für die beobachteten Ergebnisse könnte sein, daß Patienten nach einer TIA-Episode etwas häufiger mit Acetylsalicylsäure (neuroprotektive Wirkung) behandelt wurden als Patienten aus der anderen Gruppe. Es konnte allerdings kein signifikanter Unterschied bezüglich der Einnahme von ASS in den beiden Gruppen festgestellt werden. Auch in der Behandlung von Risikofaktoren (v.a. Antihypertensiva) zeigten sich keine Unterschiede, die ein besseres Outcome erklären könnten.

Trotz der oben angeführten Unsicherheitsfaktoren muß in Erwägung gezogen werden, daß die protektive Funktion einer TIA durch den pathophysiologischen Mechanismus der Hypoxietoleranz (ischemic preconditioning) zustande kommt. Obwohl dieser Mechanismus 1986 am Herz<sup>10</sup> und 1991 am Gehirn<sup>45</sup> entdeckt wurde, hat man diesem Phänomen bisher in der klinischen Schlaganfallforschung wenig Aufmerksamkeit gewidmet.

Interessanterweise berichteten Yamamoto et al.<sup>214</sup> bei einer Gruppe von Patienten mit einer TIA vor dem Schlaganfall geringere neurologische Folgen und einen verbesserten Outcome.

Ein Vergleich unserer Studie mit der Literatur ist schwer möglich, da die vorliegende Fragestellung bislang nur in einer, ebenfalls retrospektiven Studie bearbeitet wurde: Moncayo et al. konnten kürzlich zeigen, daß Patienten mit einer TIA vor einem Schlaganfall, seltener einen kompletten

Mediainfarkt, häufiger eine komplette Rückbildung der Lähmung sowie ein geringeres neurologisches Defizit (incl. Bewußtseinsstörung) und seltener dauerhaft Behinderungen aufwiesen, insbesondere wenn eine TIA 10 bis 20 Minuten dauerte. Der Effekt war am grössten, wenn die Patienten zwischen einer und drei TIAs hatten, der Infarkt kortikal war und wenn die TIA innerhalb von einer Woche vor dem Schlaganfall aufgetreten war<sup>215,216</sup>. Diese retrospektive Arbeit basierte auf einer großen und gut etablierten Schlaganfalldatenbank und hat den Vorteil, dass ausser einer weitaus grösseren Stichprobe, Lokalisation; Anzahl und Dauer der TIAs festgehalten worden war. Die Diagnose einer TIA selbst wurde jedoch nicht stringent überprüft.

Zusammenfassend soll nicht behauptet werden, daß eine TIA einem Schlaganfall vorbeugt, aber falls ein Infarkt im selben vaskulären Versorgungsgebiet innerhalb eines bestimmten Zeitfensters nach der TIA auftritt, kann der Schlaganfall und die persistierende Behinderung geringer ausgeprägt sein.

#### 5.4 Studie mit neuroradiologischen Endpunkten

Zusammengefasst stellte sich in dieser Studie dar, dass Patienten mit einer prodromalen TIA vor einem hemisphäriellem ischämischen Hirninfarkt seltener Infarktfrühzeichen zeigten. Diese Patienten entwickelten im Verlauf auch seltener einen Mediaterritorialinfarkt und hatten ein geringeres Infarktvolumen, jedoch war der Unterschied nur schwach signifikant und stellte sich in der multivariaten Analyse nicht als unabhängiger Faktor dar. Andere mögliche Störfaktoren, wie Alter, Geschlecht oder die Zeit zwischen Beginn der klinischen Symptome und CT unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. Obwohl das Auftreten von frühen Infarktzeichen im CT (wie Verlust des Kortex-Marklagerkontrastes oder Hypodensität) sicher eine Funktion der Zeit und des betroffenen Hirnareals sind<sup>217</sup>, können, wie unsere Daten zeigen, durchaus auch andere Faktoren, wie eine vorangegangene TIA, möglicherweise das zeitliche und räumliche Muster der

Infarktdemarkation beeinflussen. In der vorangegangenen Studie zeigte sich, dass eine vorangegangene TIA das motorische Defizit beeinflusste. In der zweiten Studie, welche nur hemisphärielle Infarkte untersuchte und die auch die Infarktätiologie (nach TOAST-Kriterien) berücksichtigte, bestätigten sich diese Daten. Hypoxietoleranz könnte einer Erklärung für die beobachteten Daten sein.

Parallel zu klinischen Parametern wurden in der zweiten Studie auch unterschiedliche Zeitfenster untersucht: das CT unmittelbar nach Aufnahme/Beginn der klinischen Symptomatik und die CT/MRT Bildgebung nach einigen Tagen. Hierbei wurde versucht, das initiale neurologische Defizit mit der initialen Bildgebung und den outcome mit der Verlaufsbildgebung zu vergleichen. Hierbei stellten sich folgende Probleme: In der initialen Bildgebung, üblicherweise zum Ausschluss einer primären intrazerebralen Blutung, wurde in den meisten Fällen ein CT durchgeführt, welches jedoch beim ischämischen Schlaganfall in den ersten Stunden noch keine Infarktdemarkierung zeigt. Es gibt jedoch einige, gut validierte und zuverlässige "frühe" Infarktzeichen, die auf die Perfusionsstörung und das anzunehmende Infarktareal hindeuten und die sensitive Marker eines sich entwickelnden Infarktes darstellen<sup>218,219</sup>: Kontrastverlust zwischen Mark-Rinde; Verlust der Inselrindenzzeichnung und Verlust der hyperdensen Basalgangliendemarkierung; v.a. gegenüber der Capsula interna. Da keine systematische Bildgebung im Verlauf erfolgt war, entschlossen wir uns, die Schwere und Ausmass des sich entwickelnden Infarktes anhand der Infarktfrühzeichen, als Surrogatparameter abzuschätzen.

Diese Infarktzeichen, die im wesentlichen an Grenzen zwischen grauer und weisser Substanz zu beobachten sind, kommen zustande, da die Netto-Wasseraufnahme von ischämischem Hirngewebe die Abschwächung des Röntgenstrahles beeinflusst. 2-3 HU's (Hounsfield units) entsprechen dabei etwa einem 1%igem Anstieg des Wassergehaltes; Experimentell konnte gezeigt werden, dass der durch das zunehmende Ödem nach Ischämie verursachte Wasseranstieg etwa 1.5 HU's / h beträgt<sup>220</sup>. Im CT kann eine Läsion etwa ab einem Kontrast von 5 HU unterschieden werden, so dass theoretisch sich eine ischämische Läsion im CT etwa nach 3-4 Stunden

abgrenzt. Dies kann jedoch durch einen lokalen Anstieg im CBF (z.B. bei einer posthypoxischen Hyperperfusion) verschleiert werden. Klinische Erfahrungen zeigen, dass eine Hypodensität sich in den meisten Fällen im CT sich erst etwa nach 6 Stunden sicher beurteilbar abgrenzt. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass eine vorangegangene TIA, über unklare Mechanismen, möglicherweise das Zeitfenster, in dem Frühzeichen auftauchen, verzögern kann. Der Zeitpunkt, wann das CT durchgeführt wurde, war hierbei in den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich und kann somit keine Erklärung für die beobachteten Unterschiede bieten.

In beiden Studien fiel auf, dass die Unterschied zwischen den Gruppen mit und ohne prodromale TIA am grössten waren, umso kürzer der Infarkt zurücklag. Ein Grund dafür könnte sein, dass Hypoxietoleranz vorwiegend in der Frühphase nach dem Infarkt eine Rolle spielt, bzw. dass im weiteren Verlauf eher andere Faktoren wie Rekanalisation, Kollateralversorgung oder Alter und kardiovaskuläre Komorbidität stärker ins Gewicht fallen.

Es erscheint auch möglich, dass Hypoxietoleranz den finalen Schaden lediglich prolongiert und nicht verhindert, wie dies bereits am Herzen vermutet wurde<sup>221</sup>.

TIAs bleiben desto trotz ernstzunehmende Warnsymptome einer kardiovaskulären Erkrankung und gehen oftmals Schlaganfällen oder Herzinfarkten voraus<sup>188</sup>. Obwohl wir in unseren Studien versuchten das experimentelle Design nachzubilden, bleibt die grundsätzliche Frage einer Übertragbarkeit bestehen. Darüber hinaus beinhaltet, wie bereits oben erwähnt, unser retrospektives Studiendesign mehrere Nachteile. In den neuroradiologischen Endpunkten sollten jedoch noch weitere methodische Probleme erwähnt werden:

1. In dieser Studie wurden nur hemisphärielle Infarkte eingeschlossen und, im Gegensatz zur ersten Studie, auch nach TOAST-Kriterien gematcht. Dieses Design und die relative Seltenheit (ca. 7-20%) für eine TIA in der gleichen Hemisphäre führte dazu, dass eine grosse Anzahl von Patienten mit hemisphäriellen Infarkten ohne vorangegangene TIA ausgeschlossen wurden, was einen relativen Datenverlust um den Preis einer Annäherung zwischen Fällen und Kontrollen bedeutet.

2. Infarktfrühzeichen im CT sind vermutlich ein sensitiver Indikator für eine Perfusionsstörung. Diese Infarktzeichen sind jedoch oftmals subtil, von der Qualität des CTs stark abhängig und erfordern Erfahrung. Ob Infarktzeichen auch ein geeigneter Surrogatparameter für die anzunehmende finale Infarktgrösse sind, ist unklar. Vermutlich stellt das funktionelle MRT mit Diffusions-, Perfusions- und T2-Wichtung einen genaueren Parameter zur Abschätzung des finalen Infarktvolumens dar. Das Infarktvolumen im CT korreliert nicht sonderlich gut mit dem klinischen Outcome<sup>222</sup>. Eine prospektive Studie mit zu ähnlichen Zeiten durchgeführten MRT ist gegenwärtig in Arbeit.

Unsere beiden, obengenannten Studien und eine kürzlich veröffentlichte Studie<sup>215</sup> sind derzeit die einzigen Untersuchungen, die sich den Phänomen Hypoxietoleranz von klinischer Seite genähert haben, mit positivem Ergebnis. Darüber hinaus gibt es jedoch anekdotisch weitere Hinweise für Hypoxietoleranz im menschlichen Gehirn:

Etwa 7-40 % aller Schlaganfälle geht eine TIA voraus<sup>177,207</sup> und 2/3 dieser Schlaganfälle sind nur sogenannte „minor strokes“ also Hirninfarkte ohne bleibendes relevantes Defizit<sup>188</sup>, Hinweise für Hypoxietoleranz lassen sich daraus jedoch nicht ableiten.

Schwache Hinweise für Hypoxietoleranz gibt es aus Untersuchungen, die sich mit Erkrankungen befassen, die unvermeidlich mit relativen zerebralen Ischämien vergesellschaftet sind. Gross et al.<sup>223</sup> konnten zeigen, daß Volumenexpansion mit Hydroxyäthylstärke vor einer Karotisendarterektomie bei Carotisstenosen die Ischämie-„Toleranz“ gegenüber intraoperativer Abklemmung der A. carotis interna erhöht, vermuten ursächlich aber eher Veränderungen des zerebralen Blutflusses. In einer kleinen, retrospektiven Studie bei Aneurysmaoperationen wurde interessanterweise festgestellt, dass Patienten mit multiplen Aneurysmen, bei denen mehrere kurze Okklusionen meist der A. cerebri media durchgeführt wurden, ein geringeres Risiko für einen perioperativen Hirninfarkt hatten<sup>224</sup>. Hentschel et al.<sup>225</sup> konnten in einer prospektiven MRT-Arbeit zeigen, daß Patienten mit obstruktiver Schlafapnoe, welche repetitive Phasen von globaler Hypoxie

erleiden, im Gegensatz dazu keine vaskulären Läsionen im MRT haben und diskutieren die Entwicklung einer Hypoxietoleranz.

In der Arbeit von Musumeci<sup>35</sup> wurden nach intermittierendem clamping während eines aorto-coronaren Bypass im Vergleich zu einer einzigen, längeren Ischämiezeit nicht häufiger neurologische oder neuropsychologische Defizite beobachtet, obwohl in der präkonditionierten Gruppe die gesamte Hypoxiezeit länger war.

## 5.5 Ausblick

### **1. Parallelen zu LTP (Langzeitpotenzierung) und Plastizität**

Hypoxietoleranz ist eine Form von Adaptation, die es Zellen ermöglicht, einen ansonsten letalen oder zumindest stark schädigenden Stimulus zu überstehen. LTP bzw. LTD bezeichnet eine Erhöhung bzw. Erniedrigung der ePSPs bei Erhöhung bzw. Erniedrigung der präsynaptischen Stimulationsfrequenz. LTP bzw. LTD (long-term Depression) ist auch als Adaptation aufzufassen und gilt als experimentelles Modell für Lernen, Gedächtnis und neuronale Plastizität. LTP wird in 3 Phasen eingeteilt, welche in vielen Schritten der Hypoxietoleranz ähneln: eine Glutamat (NMDA, AMPA und mGlut-Rezeptor) abhängige Induktionsphase; eine NO und kinase-abhängige Transduktionsphase und eine von *de-novo* Proteinsynthese abhängige Erhaltungsphase. Die Ähnlichkeit der initialen Phasen mit ischämischen oder exzitotoxischen Stimuli wurde als das "Plastizitäts-Pathologie Kontinuum" bezeichnet<sup>226</sup>. LTP kann auch durch Hypoxie induziert werden und wird dann als anoxische LTP bezeichnet<sup>227</sup>. Möglicherweise stellen sowohl Hypoxietoleranz als auch LTP verschiedene Formen neuronaler Modifikation oder Plastizität auf pathologische oder physiologische Stimuli dar, für welche die Zelle initial ähnliche Mechanismen in der Signaltransduktion einsetzt.

### **2. Parallelen zur ontogenetischen Entwicklung**

Die zellulären und molekularen Veränderungen nach Ischämie ähneln in mancher Weise auch der ontogenetischen Entwicklung des Gehirnes. Beispielsweise werden in der Entwicklung und auch nach einer Hypoxie Differenzierungsfaktoren; Wachstumsfaktoren; Zellzyklusproteine oder Strukturproteine exprimiert. Die klinische Regeneration nach einem Schlaganfall mit einer Erholung der Grobmotorik gefolgt von der Feinmotorik ähnelt der motorischen Entwicklung („Recovery recapitulates ontogeny“<sup>228</sup>). Apoptose tritt nach Ischämie auf und spielt auch in der Entwicklung eine

wichtige Rolle. Da in der Entwicklung bis in die postnatale Phase hinein auch konstitutionell eine hohe Hypoxietoleranz beobachtet werden kann, ist es denkbar, dass nach einer kurzdauernden Hypoxie die keinen Schaden verursacht, aber zu Hypoxietoleranz führt, wie nach einer längerdauernden Ischämie, das Gehirn auf genetische Programme zurückgreift, welche auch in der Embryonalentwicklung, Differenzierung, Proliferation und Apoptose steuern.

### 3. Neues Konzept der Neurotoxizität/Neuroprotektion.

Die Mechanismen, die nach einem Stresstimulus auf Neuronen einwirken und einerseits z.B. Toleranz, andererseits Zelltod induzieren können, unterscheiden sich in Ihren initialen Schritten nicht wesentlich: Aktivierung von NMDA-Rezeptoren; Calciumeinstrom und Aktivierung von freien Radikalen wie NO oder Superoxydradikalen. Ähnliche Stimuli können, unter verschiedenen Umständen unterschiedliche Reaktionen der Zelle hervorrufen: Wachstumsfaktoren fördern normalerweise Neuroprotektion, können aber unter manchen Umständen auch paradoxerweise den Schaden vergrößern<sup>229,230</sup>. Azidose; V.a. in Form von Lactatazidose, gilt üblicherweise als Folge einer Hypoxie, die den Schaden vergrößert<sup>231</sup>, kann jedoch, vermutlich über eine Modifikation des NMDA Rezeptors auch den Schaden reduzieren<sup>232-234</sup>. 3-NPA ist ein irreversibler Inhibitor der Succinatdehydrogenase (Komplex II der Atmungskette) und erzeugt bei Tieren und Menschen einen striatalen Zelltod und dient als Modell für die Chorea Huntington. In niedrigen Dosen gegeben, zeigt 3-NPA paradoxerweise einen protektiven Effekt sowohl in Zellkulturen<sup>151</sup>; im Hirnschnitt<sup>90</sup> als auch *in vivo*<sup>62</sup>. Als Reaktion auf physiologische und auch pathophysiologische Stressoren aktivieren Neuronen innerhalb von Minuten immediate early genes (IEGs) die auf Neuronen sowohl protektive als auch apoptose-fördernde Effekte haben (Review in Akins<sup>235</sup>).

Im Kontext zur Hypoxietoleranz erscheint dabei folgendes Szenario möglich: Eine letale Noxe, definiert entweder über ihre biochemischen Eigenschaften,

Dosis oder Dauer, führt zu einer Nekrose, unabhängig davon, ob potentiell protektive Strategien noch initialisiert werden. Eine subletale Noxe induziert einen Zellschaden, der weniger nekrotisch sein wird (z.B. DNA, Protein- und Lipidschaden) und eine Reaktion der Zelle, i.d. Regel Aktivierung von IEGs, Transkriptionsfaktoren und Proteinkinasen. Die Zelle, nicht letal geschädigt, analysiert den Schaden und die zur Reparatur zur Verfügung stehenden Mechanismen: v.a. de-novo Proteinexpression, Antioxidantien; Proteasomaktivität; ATP-Verfügbarkeit. Ist eine "Reparatur" nicht möglich, wird der "Checkpoint" zur Apoptose, dem programmierten Zelltod freigegeben oder überschritten. Hierbei benötigt die Zelle ein breites spezifisches Repertoire, spezifische Proteasen, v.a. Caspasen und Nukleasen. Ist eine Reparatur möglich oder der Apoptose-"Checkpoint" nicht erreicht, wird für einen bestimmten Zeitraum der programmierte Zellschutz aktiviert. Sollte in dem Zeitraum, im dem das nun aktivierte genetische Programm aktiv ist, erneut ein schädigender Stimulus auftreten, so imponiert aufgrund der aktivierten Reparaturmechanismen eine Resistenz der Zelle, z.B. Hypoxietoleranz zu diesem Zeitpunkt.

#### 4. Klinischer Ausblick

Unsere klinischen Studien stellen einen ersten Ansatz zur Untersuchung der Hypoxietoleranz am menschlichen Gehirn dar und konnten mittlerweile in unabhängigen Untersuchungen bestätigt werden. Ischämietoleranz ist eine mögliche Erklärung für die klinische Beobachtung, dass ein Infarkt, dem eine TIA vorausging, zu einem geringeren Defizit führt. Eine Bestätigung dieser Daten durch prospektive Studien steht jedoch aus. Eine praktische Anwendung, auf der Basis des gegenwärtigen Kenntnisstandes ist derzeit jedoch weder in der Kardiologie noch in der Akutbehandlung des ischämischen Schlaganfalles realisierbar. Bei genauerer Kenntnis der zeitlichen und räumlichen Ausdehnung der Toleranz-„Fenster“ wäre jedoch zukünftig eine gezielte, möglicherweise pharmakologisch-chemische Toleranzinduktion vor Eingriffen mit hohem Hypoxie- oder Ischämierisiko, wie vor Herz- und Aortenoperationen oder Karotisendarterektomien bei Hochrisikopatienten eine mögliche Anwendung. Charakterisierung der

molekularen Mechanismen und Identifikation „protektiver“ und „destruktiver“ Gene könnte zudem auch pharmakologisch sinnvolle Ansätze zur prophylaktischen und Akut-Therapie der zerebralen Ischämie eröffnen.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungen

•		SDH	Succinatdehydrogenase
<b>A.</b>	<b>Arteria (lat. Arterie)</b>	SOD	Superoxiddismutase
Aa.	Arteriae (lat. Arterien)	TIA	transitorische ischämische Attacke
ACA	anterior cerebral artery	TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
AMPA	amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazolepropionat	TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
AP-1	Aktivatorprotein 1	TOAST	trial of Org 10172 in acute stroke
ASS	Acetylsalicylsäure	t-PA	tissue plasminogen activator
ATP	Adenosintriphosphat	zif/268	Zinc finger 268 Transcription factor
3-NPA	3-Nitropropionat		
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor		
BSS	balanced salt solution		
CA1	Hippocampusformation1		
CBF	cerebral blood flow (cerebraler Blutfluß)		
cDNA	copy DNA		
<i>c-fos</i>	cellular Finkel-Osteogenic sarcoma onkogen		
CNS	Canadian Neurological Scale		
CMR	cerebral metabolic rate		
CPP	cerebral perfusion pressure		
CREB	Transkriptionsfaktor		
CT	Computertomographie		
EEG	Elektroencephalogramm		
EPSP	exzitatorische postsynaptische Potenziale		
erk	Extracellular signal-regulated protein kinase		
GDNF	glia derived neurotrophic factor		
gluc	Glukose		
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1		
hsc73	heat-shock cognate 73		
HSP	Heat Shock Protein		
IL-1	Interleukin-1		
K <sub>A</sub> TP	ATP-abhängige Kaliumkanäle		
LTP	long-term Potentiation		
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B		
MCA	middle cerebral artery		
MRT	Magnetresonanztomographie		
NMDA	N-methyl-d-aspartat		
PBS	phosphate buffered saline		
SAGE	serial analysis of gene expression		
SAPAP	SAP90/PSD-95-associated protein		
SD	spreading depression		

## 6.2 Danksagung

Es ist nicht möglich, allen Leuten zu danken, die an der Erstellung dieser Arbeit direkt oder indirekt mitbeteiligt waren und ohne deren Hilfe die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonderer Dank gilt jedoch

- meiner Frau Angelika, für die Unterstützung
- meinen Kindern: Janek, Clara Fee und Tim Valentin
- meinen Eltern Karl und Sophie Weih und meinem Bruder Alex
- Prof. Dirnagl (Leiter der experimentellen Neurologie)
- Prof. Einhäupl (Kliniksdirektor)
- Prof. Villringer (leitender Oberarzt der klinischen Forschergruppe)
- Prof. Harms (Oberarzt; Studiendesign)
- Prof. Lehmann (Chefarzt Neuroradiologie)
- Prof. Choi (St.Louis, USA; Zellkultur ; 3-NPA)
- Prof. Wernecke (Studiendesign; Statistik)
- PD Dr. Valdueza (Bildgebung)
- PD Dr. Riepe (Neurologie Ulm; Präkonditionierung)
- PD Dr. Behse (Unterstützung; Geduld)
- Dr. Andreas Meisel; Dr.Tilman Grune; Dr. Jan Junge-Hülsing, Dr. Konstantin Prass; Dr. George Trendelenburg; Dr. Dorette Freyer; Dr. Dirk Megow; Dr. Nicolaj Isaev; Dr. Frank Wiegand; Dr. Margaret Grabb; Dr. Doug Lobner; Dr. Christian Sheline; Dr. Marion Lautenschlager.
- allen Doktoranden, insbesondere Nicola Amberger; Christoph Harms; Alexandra Bergk; Kai Kallenberg; Mathias Hofmeyer; Marion Schmitt; Ulrike Bruer; Anna Banasik.
- allen MTAs, insbesondere Renate Gusinda; Viola Kirfe; Renate Lebeck; Claudia Muselmann.

## 6.3 Lebenslauf

**24.11.1965 geboren in Nürnberg, verheiratet, 3 Kinder**

Ehefrau: Angelika Stürzl; geb.: 24.2.61; Erzieherin

Janek Stürzl \*30.12.89; Clara Stürzl \*15.11.94; Tim Stürzl \*22.12.98

Eltern :Sophie Weih, geborene Zistler; Verkäuferin;Karl Weih; Beamter

Bruder: Alexander, geboren 1970; Betriebswirt

1972 -1976

Grundschule in Nürnberg

1976 - 1985

Peter-Vischer-Gymnasium, Nürnberg

1985

*Abitur*

5/1985 - 2/1987

*Zivildienst bei der Johanniter-Unfall-Hilfe,Nürnberg*

5/1987 - 3/1989

Studium der Medizin an der F.-A.-Universität, Erlangen

4/1989 - 9/1989

Studium an der State University New York

10/1989 - 10/1992

Studium der Medizin an der R.-K.- Universität Heidelberg

4/1990

*1. Staatsexamen*

8/1992

Praktisches Jahr in Schwäbisch Hall

11/1993

*3. Staatsexamen*

11/1993

Dissertation: „Beeinflussung des Wachstums einer proximal-tubulären Nierenzelllinie (OK) durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ “ (magna cum laude)

1/1994 - 6/1995

Arzt im Praktikum an der Neurologischen Klinik der Charité

7/1995

*Approbation*

seit 7/1995

Assistenzarzt an der Neurologischen Klinik der Charité

**Weiterbildungen:** 1997 Ultraschall unter PD Dr. Valdueza

1998 Stroke Unit unter Prof. Harms

1999 Psychiatrie

2000 Elektrophysiologie unter PD Dr. Behse

**Forschungsaufenthalte:**

1998 Washington-University St.Louis, USA; Prof.Choi;

Pharmakologische Präkonditionierung

**Drittmittelförderung bzw: Kooperation mit drittmittelgeförderten Projekten:**

- **DFG 1562:** Induzierte Ischämietoleranz im ZNS: in-vitro Modellierung und molekulare Mechanismen

- universitäre Forschungsförderung der Humboldt-Universität

- Hermann und Lilly Schilling Stiftung.

- **SFB 507:** Die Bedeutung nicht-neuronaler Zellen bei neurologischen Erkrankungen

- klinische Forschergruppe: Nichtinvasive Methoden zur Untersuchung von zerebralem Blutfluss und Metabolismus.

- **MedNet** Schlaganfall.

**Tätigkeit als Reviewer** für Cerebrovascular Diseases, Neuroreport; European Students Conference.

**Mitglied** der Society for Neuroscience (SFN), Deutsche Gesellschaft für Neurogenetik, Deutsche Gesellschaft für klinische Neurophysiologie (DGKN).

#### 6.4 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst habe. Die beschriebenen Ergebnisse sind von mir selbst gewonnen worden. In Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern oder Mitarbeitern erhobene Ergebnisse und Teilergebnisse wurden in Zusammenhang mit den einzelnen Experimenten gekennzeichnet. Insbesondere waren an der Erstellung der Versuche durch Hilfe und Mitarbeit Doktoranden der Medizin beteiligt. Die Namen von beteiligten Mitarbeitern und Ihr jeweiliger Anteil an den Experimenten wurden angegeben. Die verwendete Literatur und die verwendeten Hilfsmittel wurden vollständig angeführt.

Berlin, den 4. November 2001

Dr. med. Markus Karl Weih

Teile der hier berichteten Ergebnisse sind Bestandteil von mehreren veröffentlichten Arbeiten (ISI-Impactfaktoren in [Klammern]).

### Originalarbeiten:

Attenuated stroke severity after prodromal TIA: A role for ischemic tolerance in the brain M. Weih; K. Kallenberg; A. Bergk; K.D. Wernecke; U. Dirnagl; L. Harms and K.M. Einhäupl STROKE (1999); 30; 1851-54 [4.9]

Induction of ischemic tolerance in rat cortical neurons by 3-Nitropropionic acid: chemical preconditioning M.Weih; A. Bergk; K. Ruscher; D.Megow; N.K. Isaev; M. Riepe; A.Meisel; I.V. Victorov; U.Dirnagl Neurosci Lett (1999) 272; 207-210 [1.9]

Ischemic Preconditioning and Tolerance in Human brain; M.Weih; U.Dirnagl (STROKE 2000 Sept 31(9) 2272-73 [4.9]

Induction of Tolerance in Rat Cortical Neurons: Hypoxic Preconditioning U.Brüer; N. K.Isaev; M.Weih; K.Ruscher; A.Bergk; G.Trendelenburg; A.Meisel; F.Wiegand; I.V.Victorov; U. Dirnagl FEBS Letters (1997) ;414 ;117-121 [3.6]

Induction of hypoxia inducible factor-1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons K.Ruscher; N.Isaev; M.Weih; L. Iurato; G.Trendelenburg; A.Meisel; U.Dirnagl Neurosci-Lett (1998); 254: 1-4 [1.9]

Ischämietoleranz:Modell für die Forschung, Hoffnung für die Klinik ? Markus Weih; Konstantin Prass; Karsten Ruscher, George Trendelenburg; Ulrich Dirnagl; Mathias W. Riepe; Andreas Meisel Nervenarzt 2000 (in press) [0.7]

### Abstracts/Poster

Tolerance to hypoxia/hypoglycemia induced by hypoxia or pharmacologically in cultured neurons U.Brüer; N.Isaev; M.Weih; F.Wiegand; R.Manz; A.Meisel; U.Dirnagl BRAIN '97 : International Symposium on Cerebral Blood Flow and Metabolism; Baltimore; USA

Induction of HIF-1 in an *in vitro* model of cerebral ischemia K.Ruscher; M.Weih; U.Brüer; U.Lindauer; U.Dirnagl; A.Meisel Congress of Molecular Medicine May 1997; Berlin

Induction of tolerance against oxygen-glucose deprivation by 3-nitropropionic acid in cortical neurons M.Weih; M.Grabb; N.Isaev; A.Meisel; U.Dirnagl;D.W. Soc-Neurosci-Abs 1997 pp 2182

Effect of Hypoxia and aglycemia on hypoxia inducible factor in an *in vitro* model of cerebral ischemia K.Ruscher;N.Isaev ;G.Trendelenburg ; A.Bergk;U.Brüer;M.Weih;A.Meisel; U.Dirnagl Soc-Neurosci-Abs 1997 pp 2181

Flupirtine reduces cell death induced by oxygen-glucose-deprivation (OGD) in primary neuronal cultures A. Bergk; M. Lautenschlager; M.Weih; C.Harms; F.Wiegand; G. Pergande; U.Dirnagl Society for Neuroscience Annual Meeting 1998 Los Angeles; Abstracts

Attenuated stroke severity after prodromal TIA: Is it ischemic tolerance ? M. Weih; K. Kallenberg; A. Bergk; U. Dirnagl; L. Harms M and K.M. Einhäupl MD 8<sup>th</sup> European Stroke Conference; Venice April 7-10; 1999

Induzierte Ischämietoleranz–Modell der Forschung; Hoffnung für die Klinik K.Prass; A. Meisel;A.Bergk;M.Weih;K.Ruscher;G.Trendelenburg;F.Wiegand;U.Dirnagl DGN; 72.Kongress mit Fortbildungsakademie; Magdeburg 30.9.-3.10.99

Dirnagl U.; Weih M.; Prass K.; Ruscher K.; Schumann P.; Isaev N.; Bruer U.; Bergk A.; Meisel A.; Harms C.; Megow D.; Wiegand F.; Trendelenburg G. Ischemic tolerance of the brain. Rest Neurol Neurosci 16 (2000) p23

Prior transient ischemic attacks and subsequent hemispheric stroke M. Weih MD, N. Amberger, K. Kallenberg, U. Dirnagl, A. Villringer, L. Harms, R. Lehmann and K.M. Einhäupl; FENS 2000 Brighton; 24.-28.6.2000

## 6.5 Fragebögen, Scores, und Definitionen

### **TIA-Fragebogen** modifiziert nach Koudstaal<sup>199</sup>

1. Wie würden sie ihren allgemeinen Gesundheitszustand VOR dem Schlaganfall beschreiben:

- |                          |  |                       |
|--------------------------|--|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> | „Völlig beschwerdefrei und selbstständig“  | R 0, G 5 <sup>j</sup> |
| <input type="checkbox"/> | „Ich hatte zwar geringe Beschwerden, war aber völlig selbstständig“                | R 1, G 5              |
| <input type="checkbox"/> | „Ich war manchmal auf fremde Hilfe angewiesen, konnte mich aber selbst versorgen“. | R 2, G 4              |
| <input type="checkbox"/> | „Ich war häufig auf fremde Hilfe angewiesen, konnte aber selbst laufen“.           | R 3, G 4              |
| <input type="checkbox"/> | „Ich konnte nicht selbst laufen oder war permanent auf fremde Hilfe angewiesen“.   | R 4, G 3              |

2. Hatten sie vor 1997 schon einmal einen Schlaganfall ?

- nein
- wenn ja, wann und in welchem Krankenhaus wurden sie behandelt ?

3. Haben sie vor dem Schlaganfall blutverdünnende Mittel eingenommen ?

- nein
- ja, und zwar.....

4. Haben sie vor dem Schlaganfall eines der folgenden Mittel eingenommen:  
Marcumar; Falithrom, Aspirin, ASS, HerzASS, Acesal, Miniasal, Acetylsalicylsäure.

- nein
- ja, und zwar: .....

Die folgenden Fragen beziehen sich auf die „Warnsymptome“ oder einen „kleinen Schlaganfall“:

5. Hatten sie vor dem Schlaganfall Sehstörungen?

- nein
- wenn ja, welcher Art:
  - verschleiert, neblig
  - blind, grau oder schwarz
  - verzerrt oder flimmernd
  - doppelt
  - auf einem Auge
  - auf beiden Augen
  - in der linken oder
  - rechten Gesichtshälfte
  - im oberen oder
  - unteren Gesichtsfeld
  - in der Mitte
  - am Rand
  - anders (bitte beschreiben)

6. Hatten sie vor dem Schlaganfall eine vorübergehende Lähmung am Arm oder Bein?

- nein
- wenn ja, welcher Art:
  - schlaff, konnte überhaupt nicht bewegt werden
  - ungeschickte Hand oder Bein hinterhergezogen
  - leichte Schwäche oder Gegenstände fallen gelassen
  - Schwere oder Müdigkeitsgefühl

---

<sup>j</sup> R: Rankin Score; G: Glasgow outcome score

kein Gefühl für Bewegung

7. Haben sie (oder eine andere Person) vor dem Schlaganfall einmal einen herabhängenden Mundwinkel oder ein „schiefes Gesicht bemerkt“ ?  nein  ja.

8. Hatten sie vor dem Schlaganfall einmal Taubheitsgefühle oder Sensibilitätsstörungen an Armen, Beinen oder im Gesicht ?

nein

wenn ja, wie:  taubes Gefühl

„wie Nadelstiche“

„als würde der Arm / das Bein / das Gesicht nicht zu mir gehören“

„Gefühl als wäre der Arm / das Bein / das Gesicht wie steif“

9. Haben sich die Lähmung, die Taubheitsgefühle oder Sensibilitätsstörungen vom Arm zum Bein (oder umgekehrt) ausgebreitet ?  nein  ja.

10. Hatten Sie vor dem Schlaganfall einmal Sprachstörungen ?

nein

wenn ja, wie:  „ich habe nicht die richtigen Worte gefunden“.

„ich habe nichts mehr verstanden“.

„ich habe die Worte gewußt, konnte mich aber nicht verständlich machen“.

„ich habe geredet wie ein Betrunkener“.

„keiner hat verstanden, was ich sagen wollte“.

*anders (bitte beschreiben)*

11. Hatten Sie vor dem Schlaganfall einmal Probleme beim Lesen ?

nein

wenn ja, wie:  „ich konnte lesen, habe aber nichts verstanden“

„ich konnte überhaupt nicht mehr lesen“.

„ich konnte einen Teil des Textes nicht lesen“.

„ich konnte die nächste Zeile nicht finden“.

*anders (bitte beschreiben):*

12. Hatten Sie vor dem Schlaganfall einmal Probleme beim Schreiben ?

nein

wenn ja, wie:  „meine Handschrift war plötzlich unleserlich“.

„ich habe die falschen Wörter aufgeschrieben oder Wörter verwechselt“.

*anders (bitte beschreiben):*

13. Hatten Sie vor dem Schlaganfall öfter Schwindel ?

nein

wenn ja, wie:  „wie wirr im Kopf“.

„Schweregefühl im Kopf“.

„es zog mich immer auf eine Seite“.

„wie im Karussell oder als ob der Raum sich dreht“.

*anders (bitte beschreiben):*

14. Hatten Sie vor dem Schlaganfall einmal Schluckprobleme ?

nein

wenn ja, wie:  „konnte Speisen oder Getränke nicht schlucken“.

„ich hatte dauernd einen Kloß im Hals“.

*anders (bitte beschreiben):*

15. Waren Sie vor dem Schlaganfall einmal verwirrt ?

- nein
- wenn ja, wie:
  - „ich habe meine Umgebung nicht erkannt“.
  - „ich konnte mich plötzlich nicht mehr ankleiden“.
  - „ich habe mich plötzlich an kurz zurückliegende Ereignisse überhaupt nicht mehr erinnern können“.
- anders (bitte beschreiben:

16. Hatten Sie vor dem Schlaganfall einmal :

- |  | nein                     | ja, wo, wann und wie lange:    |
|--|--------------------------|--------------------------------|
| Kopfschmerzen oder Schmerzen im Auge ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> ..... |
| Übelkeit oder Erbrechen ?              | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> ..... |
| eine Bewußtlosigkeit oder Ohnmacht ?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> ..... |
| ein Zucken der Armen und Beine ?       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> ..... |
| Kribbeln beider Hände und des Mundes ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> ..... |

17. Haben Sie Migräne, Diabetes, Epilepsie oder andere Herz-Kreislaufkrankungen ?

- nein
- wenn ja, welche:

18. In welchem Zeitraum haben sich die obengenannten Beschwerden (aus Fragen 5-15) entwickelt ?

- innerhalb einer Sekunde
- innerhalb mehrerer Sekunden
- innerhalb von Minuten
- innerhalb von Stunden
- innerhalb von Tagen
- innerhalb einer Sekunde

19. Wenn sie mehrere Beschwerden oder Symptome hatten:

- Wie oft hatten sie diese Beschwerden  nur einmal  
 mehr als einmal ( Anzahl .....

- Haben sich die Beschwerden  alle gleichzeitig entwickelt  
 oder nacheinander entwickelt ?  
 Reihenfolge:

20. Was haben sie unmittelbar vor Beginn der Symptome gemacht ?

21. In welchem Zeitraum haben sich die obengenannten Beschwerden (aus Fragen 5-15) zurückgebildet ?

- innerhalb einer Sekunde
- innerhalb mehrerer Sekunden
- innerhalb von Minuten
- innerhalb von Stunden
- innerhalb eines Tages (max. 24 h).
- länger als ein Tag oder nicht mehr zurückgebildet  
(Bitte diese Symptome beschreiben)

die folgenden Fragen beziehen sich nun auf die Zeit nach dem Schlaganfall

22. Wie würden sie ihren allgemeinen Gesundheitszustand nach dem Schlaganfall beschreiben:

- „Ich bin völlig beschwerdefrei und selbstständig“ R 0, G 5
- „Ich habe zwar geringe Beschwerden, bin aber sonst völlig selbstständig“ R 1 G 5
- „Ich bin manchmal auf fremde Hilfe angewiesen, kann mich aber selbst versorgen.“ R 2 G 4
- „Ich bin jetzt häufig auf fremde Hilfe angewiesen, kann aber selbst laufen.“ R 3 G 4

- „Ich kann nicht mehr selbst laufen oder bin permanent auf fremde Hilfe angewiesen.“ R4 G 3
- (dauernd bettlägerig, im Koma oder keine Kontaktaufnahme, keine Reaktion R5 G 2
- ( verstorben ) G1

23 Sind Sie nach dem Schlaganfall noch einmal ins Krankenhaus eingeliefert worden ?

nein

wenn ja, wann, warum:

erneuter Schlaganfall

Herzinfarkt

.....

### **TOAST-Kriterien (mit leichten Modifikationen) <sup>195</sup>**

1. Makroangiopathie: ipsilaterale Karotisstenose > 50 % oder ein Verschuß aufgrund von Arteriosklerose (Duplex, konventionelle oder MR-Angiographie) ohne Hinweise auf einen kardioembolischen Infarkt.
2. Mikroangiopathie: Zeichen einer lakunären Läsion in der CT-Aufnahme oder ein klassisches lakunäres Syndrom bei Ausschluß einer Makroangiopathie und einer kardialen Emboliequelle.
3. Kardioembolischer Infarkt: Vorhofflimmern, Vorhoffthrombus, vorausgegangener Myokardinfarkt, dilatative Kardiomyopathie, künstliche Herzklappen, persistierendes Foramen ovale, Vorhofseptumaneurysma.
4. Andere oder konkurrierende Ursachen: fibromuskuläre Dysplasie, Dissekat, migränöse Hirninfarkte, ungeklärte oder verschiedene Ursachen.

## Definitionen kardiovaskulärer Risikofaktoren

### -Hypertonus:

Blutdruckwerte bei Aufnahme oder während des Aufenthaltes höher als 170 systolisch / 85 diastolisch mm Hg oder ein vorbestehender behandelter Bluthochdruck.

### - periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK):

Claudicatio intermittens, ischämischer Ruheschmerz, relevante Stenose bei Angiographie oder vorausgegangene Bypass-Operation.

### - Diabetes mellitus (DM):

Blutzuckerwerte im Nüchternzustand über 140 mg/dl (8 mmol/l), zufällige Blutglucosewerte über 200 mg/dl (11 mmol/l) oder ein behandelter Diabetes mellitus.

### - Koronare Herzkrankheit (KHK):

Angina pectoris, vorhergegangener Myokardinfarkt, relevante Stenose bei Koronarangiographie, zurückliegender PTCA oder Bypass-Operation.

### -Cholesterinerhöhung (Chol):

Nüchternwerte über 220mg/dl, Triglyceriderhöhung oder Einnahme von lipidsenkenden Medikamenten.

### -Vorhofflimmern (VHF):

keine p-Welle im EKG bei Aufnahme, intermittierendes Vorhofflimmern im Langzeit-EKG oder bereits diagnostiziertes Vorhofflimmern.

## Canadian Neurological Scale (CNS)<sup>197</sup>

1) Bewußtseinsgrad:  
wach: 3.0 Punkte  
schläfrig/somnolent: 1.5 Punkte

2) Orientierung:  
orientiert: 1 Punkt  
desorientiert / nicht erhebbar: 0 Punkte

3) Sprache:  
normal: 1 Punkt  
expressives Defizit: 0.5 Punkte  
rezeptives Defizit: 0 Punkte

### II. Motorische Funktion: Schwäche (ohne Verständnisprobleme)

4) Gesicht  
ohne motorische Ausfälle: 0.5 Punkte  
Schwäche: 0 Punkte

5) Arm, proximal  
volle Kraft: 1.5 Punkte  
leichte Schwäche: 1 Punkt  
deutliche Kraftminderung: 0.5 Punkte  
Plegie: 0 Punkte

6) Arm, distal  
volle Kraft: 1.5 Punkte  
leichte Schwäche: 1 Punkt  
deutliche Kraftminderung: 0.5 Punkte  
Plegie: 0 Punkte

7) Bein, proximal  
volle Kraft: 1.5 Punkte  
leichte Schwäche: 1 Punkt  
deutliche Kraftminderung: 0.5 Punkte  
Plegie: 0 Punkte

8) Bein, distal  
volle Kraft: 1.5 Punkte  
leichte Schwäche: 1 Punkt  
deutliche Kraftminderung: 0.5 Punkte  
Plegie: 0 Punkte

### III. Sensibilität (bei Verständigungsproblem zu prüfen)

9) Gesicht  
symmetrisch 0.5 Punkte  
asymmetrisch 0 Punkte

10) Arm  
symmetrisch 0.5 Punkte  
asymmetrisch 0 Punkte

11) Bein  
symmetrisch 0.5 Punkte  
asymmetrisch 0 Punkte

Bei der CNS können maximal 11.5 Punkte erreicht werden, je niedriger die Punktzahl ausfällt desto schwerer ist der Grad der Behinderung.

## **Rankin Scale** <sup>236</sup>

- 0 Punkte keinerlei Symptome
- 1 Punkt geringe Beschwerden, aber völlig selbständig
- 2 Punkte ab und zu auf fremde Hilfe angewiesen, aber in der Lage, sich allein zu versorgen
- 3 Punkte zwar häufig auf fremde Hilfe angewiesen, aber in der Lage alleine zu laufen
- 4 Punkte nicht in der Lage zu laufen und permanent auf fremde Hilfe angewiesen
- 5 Punkte bettlägerig, nicht kontaktfähig

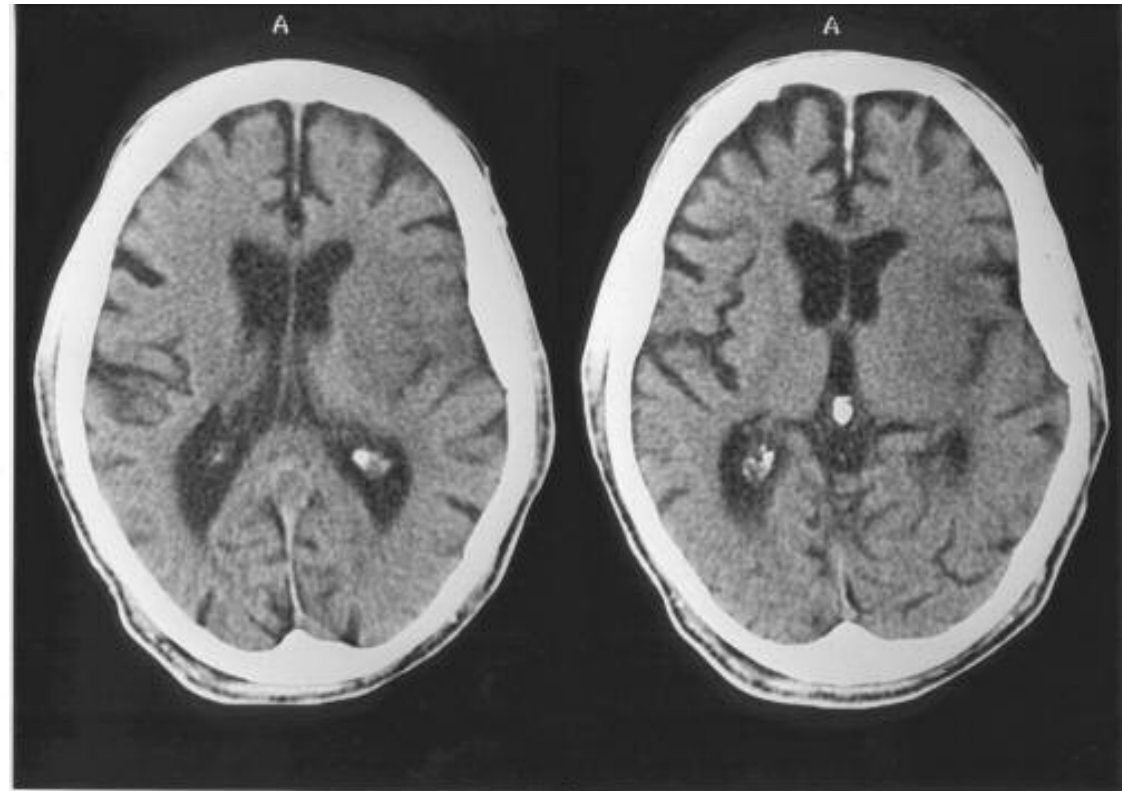
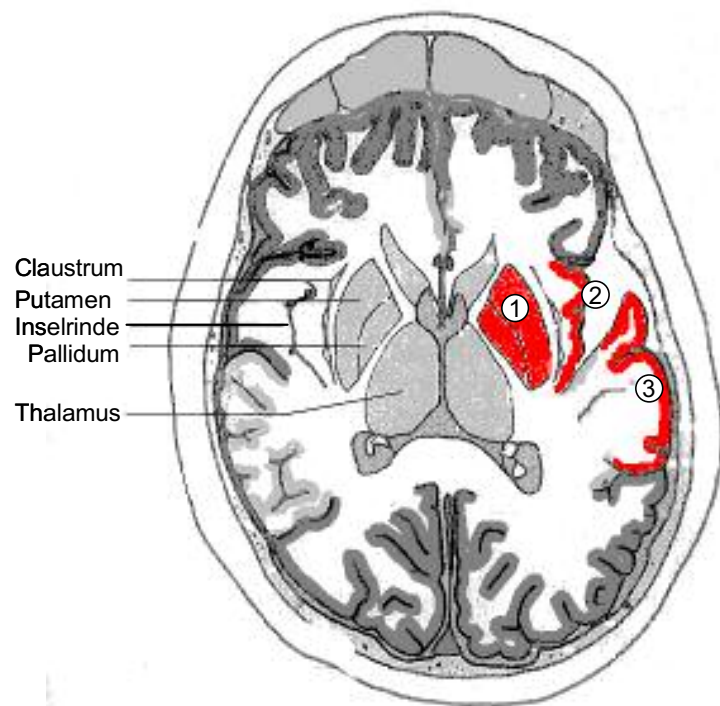
In diesem Fall sind 0-5 Punkte möglich, umso niedriger die Punktzahl, desto geringer sind die Beschwerden.

## **Glasgow Outcome Scale** <sup>237</sup>

- 1 Punkt Patient verstorben
- 2 Punkte persistierender vegetativer Status (kein Befolgen von Kommandos, kein verbaler Kontakt möglich, keine adäquaten Reaktionen, eventuell Schlaf-Wach-Rhythmus, spontanes Augenöffnen und in der Lage sein, sich bewegenden Objekten zu folgen, kann Essen schlucken).
- 3 Punkte schwer behindert (zur Bewältigung des täglichen Lebens auf ständige Hilfe angewiesen)
- 4 Punkte mäßig behindert
- 5 Punkte keine/minimale Behinderung

1 bis 5 Punkte sind zu erreichen, je höher die Punktzahl, desto besser der Zustand.

### 6.6 Schema und ein Beispiel für Infarktfrühzeichen



1: Verlust der relativen Hyperdensität im Putamen; 2: Verlust des „Inselrindenbandes“; 3: Verlust der relativen Hyperdensität des Cortex vs. Marklager. Auf der folgenden Seite sind die CT-Bilder nochmals vergrößert abgebildet.

6.7 Tabellen, Abbildungsverzeichnis und Index

<b>Tabelle 1 Hypoxiezeiten verschiedener Gewebe</b>	<b>9</b>
<b>Tabelle 2 ATP-abhängige Stoffwechselwege (mod. nach Hochachka und Welsh<sup>3,4</sup>)</b>	<b>10</b>
Tabelle 3 Mechanismen der Ischämietoleranz	28
Tabelle 4 Hypoxietoleranz bei globaler Ischämie	31
<b>Tabelle 5 Hypoxietoleranz bei fokaler Ischämie</b>	<b>32</b>
<b>Tabelle 6 Hypoxietoleranz: In vitro Modelle</b>	<b>33</b>
<b>Tabelle 7: Basisdaten<sup>8</sup></b>	<b>60</b>
<b>Tabelle 8 Infarktätiologie und –lokalisierung</b>	<b>61</b>
<b>Tabelle 9 CNS-Wert und Endpunkt von Patienten mit und ohne TIA.</b>	<b>62</b>
<b>Tabelle 10: Univariate Analyse</b>	<b>64</b>
Tabelle 11 Klinische Daten	68
Tabelle 12 Univariate und multivariate Korrelation neuroradiologischer Befunde	71
Tabelle 13 Einfluss vorangegangener TIAs auf Infarktgröße	72
Abbildung 1 Neurotoxische Kaskade beim ischämischen Hirnschaden	11
<b>Abbildung 2 Mechanismen der Ischämietoleranz</b>	<b>27</b>
<b>Abbildung 3 Hypoxiekammern</b>	<b>43</b>
Abbildung 4 Schema Hypoxietoleranz	49
Abbildung 5 Hypoxische Präkonditionierung, LDH-Werte und Zytologie	51
<b>Abbildung 6 Pharmakologische Präkonditionierung</b>	<b>53</b>
<b>Abbildung 7: Pharmakologische Präkonditionierung/Antioxidantien.</b>	<b>54</b>
Abbildung 8 Studiendesign	55
<b>Abbildung 9 Verteilung der CNS-Werte</b>	<b>63</b>
Abbildung 10 Studiendesign	65

## Index

---

*A*

Acetylsalicylsäure.....	28, 59
Adenosin .....	11, 22
Altersabhängigkeit.....	15
Amaurosis fugax.....	34
anoxische Depolarisation .....	20
antioxidative Systemen .....	21
AP-1.....	20
Apoptose .....	6, 24, 89, 90
Arteria carotis communis.....	14
Astrozyten.....	7, 28, 52
ATP .....	6, 8, 9, 13, 22, 26

---

*B*

bcl-2 .....	24, 27
BDNF .....	29
bFGF .....	23
Bradykinin.....	33
Brainslices.....	17
BSS.....	40
Bypass-Operationen.....	13

---

*C*

CA1.....	24
Calcium.....	9
calcium/calmodulin protein kinase II .....	18
Canadian Neurological Scale.....	44
CBF .....	6
CCAO.....	14
Ceramid .....	28
c-FOS .....	19
Chopp.....	30
c-JUN .....	19
clamping.....	13
CMR.....	6
Cortex.....	16

CT.....	35
---------	----

---

*D*

Datenschutz .....	57
Diabetes.....	68
DMTU .....	54
DNA.....	19
Duplex-Sonographie.....	58

---

*E*

Embolie .....	35
Endpunkte .....	58, 66
EPSP.....	30
ERK.....	18
Erythropoetin .....	11, 27

---

*F*

Fall-Kontrollstudie.....	55
Fokale Ischämie.....	15
freie Radikale .....	20

---

*G*

Genexpression .....	25
Gliazellen .....	27
Glibenclamid .....	23
globale Hypoxie .....	21
Globale Ischämie.....	14
Glutamat .....	9
Glutamatttransporter.....	29
Glycolyse.....	19, 21

---

*H*

Herz.....	10
Heurteaux .....	30
HIF .....	28

HIF-1.....	19
Hitzeschockproteine.....	24
HSP.....	24, 26
HSP70.....	27
hyperbare Oxygenation.....	28
hyperbarer Sauerstoff.....	28
Hypoxiekammern.....	42
hypoxische Vasodilation.....	11

---

*I*

Il-1.....	28
<i>immediate early genes</i> .....	19
Induktionsphase.....	17
Infarktfrühzeichen.....	45, 66
Infarkt volumen.....	45

---

*J*

JNK.....	19
----------	----

---

*K*

Kalium.....	9
Karotisstenose.....	34
Kinasen.....	18
Kitagawa.....	14
klassische Präkonditionierung.....	22
Kollateralkreisläufe.....	21
Komplikationen.....	59
Koudstaal.....	44

---

*L*

LDH.....	43
Leber.....	12
Leukozyten.....	9, 21
Leukozyten-Endothel-Interaktion.....	21
LPS.....	28

---

*M*

Metalloproteinasen.....	24
Migräne.....	29
Mikrozirkulation.....	21
Mortalitätsrate.....	5
MRT.....	35
Musumeci.....	13

---

*N*

NADH.....	20
Natrium.....	17
Nekrose.....	6
Neuroprotektion.....	15, 22
NF-κB.....	19
N-Methyl-D-Aspartat.....	17, 18, 23, 26
NO.....	11
NPA.....	28, 74
Nucleus fastigii.....	28

---

*O*

oxidative Phosphorylierung.....	20
---------------------------------	----

---

*P*

P53.....	24
Pérez-Pinzón.....	22
Periinfarktdepolarisation.....	28
Phasenkontrastmikroskopie.....	51
Phosphorylierung.....	18
pilot light-Hypothese.....	20
Proteasen.....	24
Protein-disulfide isomerase.....	24
Proteinkinase C.....	18, 23
Proteinkinasen.....	17
Proteinsynthese.....	12, 18, 28

---

*Q*

Quabain.....	28
--------------	----

---

*R*

Rankin Score .....	59
remote Preconditioning .....	33
Riepe.....	29, 32

---

*S*

SAGE .....	25, 76
Sauerstoff.....	10
Sauerstoffdeprivation .....	28
Schlaganfalldatenbank .....	44, 55, 58, 66, 84
SDH .....	76
second messenger .....	28
selection bias .....	82
Signalinduktion .....	17
Signaltransduktion.....	17
<b>Spreading Depression</b> .....	29
Stagliano .....	22, 31
Statistik .....	46
Studiendesign.....	56
Succinatdehydrogenase.....	52
Sulfonylharnstoffe.....	23

---

*T*

Thrombin.....	25
Thrombolyse.....	57

TIA .....	34, 35, 36
TNF .....	27
TNF-alpha.....	28
TOAST.....	44, 45, 66, 85, 86, 93, 104
Transkriptionsfaktoren .....	18, 19, 27, 78, 91
Troponinanstieg .....	13

---

*V*

VEGF .....	11
verzögerte Hypoxietoleranz.....	23

---

*W*

Wachstumsfaktoren .....	19, 23
Wieloch .....	18

---

*Y*

Yellon .....	13
--------------	----

---

*Z*

Zellkultur .....	75
zerebraler Blutfluss.....	21
Zytokine .....	13

6.8 Literaturverzeichnis

1. Siesjö BK. Historical overview. Calcium, ischemia, and death of brain cells. *Ann NY Acad Sci.* 1988;522:638-661.
2. Siesjö BK, Kristina T, Katsura K. Overview of bioenergetic failure and metabolic cascades in brain ischemia, in *Cerebrovascular disease: pathophysiology, diagnosis and treatment.* Malden, Blackwell Science, 1998, pp 3-13.
3. Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, Land SC. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:9493-9498.
4. Welsh FA. Ischemic energy failure, in *Cerebrovascular disease: pathophysiology, diagnosis and treatment.* Malden, Blackwell Science, 1998, pp 217-226.
5. Astrup J. Energy-requiring cell functions in the ischemic brain. *J Neurosurg.* 1982;56:482-497.
6. De KJ, Sulter G, Luiten PG. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? *Trends Neurosci.* 1999;22:535-540.
7. Noble R. The development of resistance by rats and guinea pigs to amount of trauma usually fatal. *Am J Physiol.* 1943;138:346-356.
8. Golanov EV, Reiss H-D. Oxygen and cerebral blood flow, in *Primer on cerebrovascular disease.* San Diego, Academic Press, 1997, pp 58-60.
9. Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML, Jennings RB. Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol.* 1986;251:H1306-H1315
10. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74:1124-1136.
11. Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpi E, Prats N, Rosello-Catafau J. Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;229:264-270.
12. Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S, Shimabukuro T, Yagi T, Nakagami M, Takada Y, Morimoto T, Yamaoka Y. Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med.* 1996;128:251-258.
13. Du ZY, Hicks M, Winlaw D, Spratt P, Macdonald P. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant.* 1996;15:1258-1267.
14. Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;222:27-32.
15. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation.* 1997;96:1641-1646.
16. Pudupakkam S, Harris KA, Jamieson WG, DeRose G, Scott JA, Carson MW, Schlag MG, Kvietys PR, Potter RF. Ischemic tolerance in skeletal muscle: role of nitric oxide. *Am J Physiol.* 1998;275:H94-H99
17. Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, Peters AM, Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. *Br J Urol.* 1997;79:842-847.
18. Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size

- in swine myocardium. *Circ Res.* 1990;66:1133-1142.
19. Cohen MV, Liu GS, Downey JM. Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits. *Circulation.* 1991;84:341-349.
  20. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation.* 1991;81:350-356.
  21. Lawson CS, Coltart DJ, Hearse DJ. "Dose"-dependency and temporal characteristics of protection by ischaemic preconditioning against ischaemia-induced arrhythmias in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1993;25:1391-1402.
  22. Li YW, Whittaker P, Kloner RA. The transient nature of the effect of ischemic preconditioning on myocardial infarct size and ventricular arrhythmia. *Am Heart J.* 1992;123:346-353.
  23. Yellon DM, Baxter GF. A "second window of protection" or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:1023-1034.
  24. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, Kamada T, Tada M. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res.* 1993;72:1293-1299.
  25. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation.* 1993;88:1264-1272.
  26. Nishio S, Chen ZF, Yunoki M, Toyoda T, Anzivino M, Lee KS. Hypothermia-induced ischemic tolerance. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;890:26-41:26-41.
  27. Bankwala Z, Hale SL, Kloner RA. Alpha-adrenoceptor stimulation with exogenous norepinephrine or release of endogenous catecholamines mimics ischemic preconditioning. *Circulation.* 1994;90:1023-1028.
  28. Ovize M, Kloner RA, Przyklenk K. Stretch preconditions canine myocardium. *Am J Physiol.* 1994;266:H137-H146
  29. Yao Z, Gross GJ. Acetylcholine mimics ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in dogs. *Am J Physiol.* 1993;264:H2221-H2225
  30. Nishio S, Chen ZF, Yunoki M, Toyoda T, Anzivino M, Lee KS. Hypothermia-induced ischemic tolerance. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;890:26-41:26-41.
  31. Brown JM, White CW, Terada LS, Grosso MA, Shanley PF, Mulvin DW, Banerjee A, Whitman GJ, Harken AH, Repine JE. Interleukin 1 pretreatment decreases ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:5026-5030.
  32. Brown JM, Grosso MA, Terada LS, Whitman GJ, Banerjee A, White CW, Harken AH, Repine JE. Endotoxin pretreatment increases endogenous myocardial catalase activity and decreases ischemia-reperfusion injury of isolated rat hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:2516-2520.
  33. Yellon DM, Alkhalafi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet.* 1993;342:276-277.
  34. Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhalafi AM, Kemp M, Hooper J, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart.* 1997;77:314-318.
  35. Musumeci F, Feccia M, MacCarthy PA, Ellis GR, Mammanna L, Brinn F, Penny WJ. Prospective randomized trial of single clamp technique versus intermittent ischaemic arrest: myocardial and neurological outcome.

- Eur J Cardiothorac Surg.* 1998;13:702-709.
36. Airaksinen KE, Huikuri HV. Antiarrhythmic effect of repeated coronary occlusion during balloon angioplasty. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29:1035-1038.
37. Eltchaninoff H, Cribier A, Tron C, Derumeaux G, Koning R, Hecksweiler B, Letac B. Adaptation to myocardial ischemia during coronary angioplasty demonstrated by clinical, electrocardiographic, echocardiographic, and metabolic parameters. *Am Heart J.* 1997;133:490-496.
38. Kloner RA, Shook T, Przyklenk K, Davis VG, Junio L, Matthews RV, Burstein S, Gibson M, Poole WK, Cannon CP. Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning? *Circulation.* 1995;91:37-45.
39. Ottani F, Galvani M, Ferrini D, Sorbello F, Limonetti P, Pantoli D, Rusticali F. Prodromal angina limits infarct size. A role for ischemic preconditioning. *Circulation.* 1995;91:291-297.
40. Andreotti F, Pasceri V, Hackett DR, Davies GJ, Haider AW, Maseri A. Preinfarction angina as a predictor of more rapid coronary thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1996;334:7-12.
41. Totsuka E, Fung JJ, Urakami A, Moras N, Ishii T, Takahashi K, Narumi S, Hakamada K, Sasaki M. Influence of donor cardiopulmonary arrest in human liver transplantation: possible role of ischemic preconditioning. *Hepatology.* 2000;31:577-580.
42. Dahl NA, Balfour WM. Prolonged anoxic survival due to anoxia pre-exposure: brain ATP, lactate and pyruvate. *Am J Physiol.* 1964;207:452-456.
43. Schurr A, Reid KH, Tseng MT, West C, Rigor BM. Adaptation of adult brain tissue to anoxia and hypoxia in vitro. *Brain Res.* 1986;374:244-248.
44. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res.* 1990;528:21-24.
45. Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, Tagaya M, Ohtsuki T, Hata R, Ueda H, Handa N, Kimura K, Kamada T. 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res.* 1991;561:203-211.
46. Tokunaga H, Hiramatsu K, Sakaki T. Effect of preceding in vivo sublethal ischemia on the evoked potentials during secondary in vitro hypoxia evaluated with gerbil hippocampal slices. *Brain Res.* 1998;784:316-320.
47. Kawai K, Nakagomi T, Kirino T, Tamura A, Kawai N. Preconditioning in vivo ischemia inhibits anoxic long-term potentiation and functionally protects CA1 neurons in the gerbil. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:288-296.
48. Barone FC, White RF, Spera PA, Ellison J, Currie RW, Wang X, Feuerstein GZ. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke.* 1998;29:1937-1950.
49. Brott T, Marler JR, Olinger CP, Adams HPJ, Tomsick T, Barsan WG, Biller J, Eberle R, Hertzberg V, Walker M. Measurements of acute cerebral infarction: lesion size by computed tomography. *Stroke.* 1989;20:871-875.
50. Corbett D, Crooks P. Ischemic preconditioning: a long term survival study using behavioural and histological endpoints. *Brain Res.* 1997;760:129-136.
51. Hakim A. Ischemic penumbra: The therapeutic window. *Neurology.* 1998;51 (Suppl 3):S44-S46

52. Simon RP, Niiro M, Gwinn R. Prior ischemic stress protects against experimental stroke. *Neurosci Lett.* 1993;163:135-137.
53. Chimon GN, Wong PT. Ischemic tolerance and lipid peroxidation in the brain. *Neuroreport.* 1998;9:2269-2272.
54. Currie RW, Ellison JA, White RF, Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. Benign focal ischemic preconditioning induces neuronal hsp70 and prolonged astrogliosis with expression of hsp27. *Brain Res.* 2000;863:169-181.
55. Sakaki T, Yamada K, Otsuki H, Yuguchi T, Kohmura E, Hayakawa T. Brief exposure to hypoxia induces bFGF mRNA and protein and protects rat cortical neurons from prolonged hypoxic stress. *Neurosci Res.* 1995;23:289-296.
56. Bruer U, Weih M, Isaev N, Meisel A, Ruscher K, Bergk A, Trendelenburg G, Wiegand F, Victorov I, Dirnagl U. Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. *FEBS Lett.* 1997;414:117-121.
57. Khaspekov L, Shamloo M, Victorov I, Wieloch T. Sublethal in vitro glucose-oxygen deprivation protects cultured hippocampal neurons against a subsequent severe insult. *Neuroreport.* 1998;9:1273-1276.
58. Bossenmeyer-Pourié, Daval JL. Prevention from hypoxia-induced apoptosis by preconditioning: a mechanistic approach in cultured neurons from rat-forebrain. *Mol Brain Res.* 1998;58:237-239.
59. Riepe MW, Niemi WN, Megow D, Ludolph AC, Carpenter DO. Mitochondrial oxidation in rat hippocampus can be preconditioned by selective chemical inhibition of succinic dehydrogenase. *Exp Neurol.* 1996;138:15-21.
60. Weih M, Grabb MC, Isaev N, Meisel A, Dirnagl U, Choi DW. Induction of tolerance against oxygen-glucose deprivation by 3-nitropropionic acid in cortical neurons. *Soc Neur Abstr.* 1997;23:2182-2182.
61. Reshef A, Sperling O, Zoref-Shani E. Preconditioning of primary rat neuronal cultures against ischemic injury: characterization of the 'time window of protection'. *Brain Res.* 1996;741:252-257.
62. Wiegand F, Liao W, Busch C, Castell S, Knapp F, Lindauer U, Megow D, Meisel A, Redetzky A, Ruscher K, Trendelenburg G, Victorov I, Riepe M, Diener HC, Dirnagl U. Respiratory chain inhibition induces tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:1229-1237.
63. Sumeray MS, Yellon DM. Myocardial preconditioning. What have we learned? *Eur Heart J.* 1997;18 Suppl A:A8-14:A8-14.
64. Kasischke K, Ludolph AC, Riepe MW. NMDA-antagonists reverse increased hypoxic tolerance by preceding chemical hypoxia. *Neurosci Lett.* 1996;214:175-178.
65. Kato H, Liu Y, Araki T, Kogure K. MK-801, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus. *Neurosci Lett.* 1992;139:118-121.
66. Grabb MC, Choi DW. Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: Critical role for NMDA Receptors. *J Neurosci.* 1999;19:1657-1662.
67. Gidday JM, Shah AR, Maceren RG, Wang Q, Pelligrino DA, Holtzman D, Park TS. Nitric oxide mediates cerebral ischemic tolerance in a neonatal rat model of hypoxic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metabol.* 1999;19:331-340.
68. Gidday JM, Shah AR, Maceren RG, Wang Q, Pelligrino DA, Holtzman DM, Park TS. Nitric oxide mediates cerebral ischemic tolerance in a neonatal rat model of hypoxic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:331-340.
69. Gonzalez-Zulueta M, Feldman AB, Klesse LJ,

- Kalb RG, Dillman JF, Parada LF, Dawson TM, Dawson VL. Requirement for nitric oxide activation of p21(ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:436-441.
70. Hirao K, Hata Y, Yao I, Deguchi M, Kawabe H, Mizoguchi A, Takai Y. Three isoforms of synaptic scaffolding molecule and their characterization. Multimerization between the isoforms and their interaction with N-methyl-D-aspartate receptors and SAP90/PSD-95-associated protein. *J Biol Chem*. 2000;275:2966-2972.
71. Haddad GG, Jiang C. O<sub>2</sub>-sensing mechanisms in excitable cells: Role of plasma membrane K<sup>+</sup> channels. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:23-43.
72. Shamloo M, Wieloch T. Changes in protein tyrosine phosphorylation in the rat brain after cerebral ischemia in a model of ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metabol*. 1999;19:173-183.
73. Shamloo M, Rytter A, Wieloch T. Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in the hippocampal CA1 region in a rat model of global cerebral ischemic preconditioning. *Neurosci*. 1999;93:81-88.
74. Reshef A, Sperling O, Zoref-Shani E. Opening of K(ATP) channels is mandatory for acquisition of ischemic tolerance by adenosine. *NeuroReport*. 2000;11:463-465.
75. Shamloo M, Kamme F, Wieloch T. Subcellular distribution and autophosphorylation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II- $\alpha$  in rat hippocampus in a model of ischemic tolerance. *Neuroscience*. 2000;96:665-674.
76. Kapinya C, Penzel R, Sommer C, Kiessling M. Temporary changes of the AP-1 transcription factor binding activity in the gerbil hippocampus after transient global ischemia, and ischemic tolerance induction. *Brain Res*. 2000;872:282-293.
77. Gu Z, Jiang Q, Zhang G, Cui Z, Zhu Z. Diphosphorylation of extracellular signal-regulated kinases and c-Jun N-terminal protein kinases in brain ischemic tolerance in rat. *Brain Res*. 2000;860:157-160.
78. Yoneda Y, Kuramoto N, Azuma Y, Ogita K, Mitani A, Zhang L, Yanase H, Masuda S, Kataoka K. Possible involvement of activator protein-1 DNA binding in mechanisms underlying ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. *Neuroscience*. 1998;86:79-97.
79. Ruscher K, Isaev N, Trendelenburg G, Weih M, Iurato L, Meisel A, Dirnagl U. Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett*. 1998;254:117-120.
80. Guillemin K, Krasnow MA. The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell*. 1997;89:9-12.
81. Bergeron M, Gidday JM, Yu AY, Semenza GL, Ferriero DM, Sharp FR. Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann Neurol*. 2000;48:285-296.
82. Clemens JA, Stephenson DT, Dixon EP, Smalstig EB, Mincy RE, Rash KS, Little SP. Global cerebral ischemia activates nuclear factor-kB prior to evidence of DNA fragmentation. *Mol Brain Res*. 1997;48:187-196.
83. Sommer C, Gass P, Kiessling M. Selective c-JUN expression in CA1 neurons of the gerbil hippocampus during and after acquisition of an ischemia-tolerant state. *Brain Pathol*. 1995;5:135-144.
84. Puisieux F, Deplanque D, Pu Q, Souil E, Bastide M, Bordet R. Differential role of nitric oxide pathway and heat shock protein in preconditioning and lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *Eur J*

- Pharmacol.* 2000;389:71-78.
85. Xiao F, Fratkin JD, Rhodes PG, Cai Z. Reduced nitric oxide is involved in prenatal ischemia-induced tolerance to neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Neurosci Lett* 2000; 285 (1 ):5 -8. 2000;285:5-8.
  86. Centeno JM, Orti M, Salom JB, Sick TJ, Perez-Pinzon MA. Nitric oxide is involved in anoxic preconditioning neuroprotection in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 1999;836:62-69.
  87. Li JY, Ueda H, Seiyama A, Nakano M, Matsumoto M, Yanagihara T. A near-infrared spectroscopic study of cerebral ischemia and ischemic tolerance in gerbils. *Stroke.* 1997;28:1451-1456.
  88. Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci.* 1994;17:251-257.
  89. Huber R, Buchner M, Li H, Schlieter M, Speerfeld AD, Riepe MW. Protein binding of NADH on chemical preconditioning. *J Neurochem.* 2000;75:329-335.
  90. Riepe MW, Esclaire F, Kasischke K, Schreiber S, Nakase H, Kempinski O, Ludolph AC, Dirnagl U, Hugon J. Increased hypoxic tolerance by chemical inhibition of oxidative phosphorylation- chemical preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17:257-264.
  91. Baek SH, Kim JY, Choi JH, Park EM, Han MY, Kim CH, Ahn YS, Park YM. Reduced glutathione oxidation ratio and 8 ohdG accumulation by mild ischemic pretreatment. *Brain Res.* 2000;856:28-36.
  92. Matsushima K, Hale SL. Transient forebrain ischemia protects against subsequent focal cerebral ischemia without changing cerebral perfusion. *Stroke.* 1995;26:1052
  93. Chen J, Graham SH, Zhu RL, Simon RP. Stress proteins and tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16:566-577.
  94. Stagliano NE, Perez-Pinzon MA, Moskowitz MA, Huang PL. Focal ischemic preconditioning induces rapid tolerance to middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:757-761.
  95. Dawson DA, Furuya K, Gotoh J, Nakao Y, Hallenbeck JM. Cerebrovascular hemodynamics and ischemic tolerance: lipopolysaccharide- induced resistance to focal cerebral ischemia is not due to changes in severity of the initial ischemic insult, but is associated with preservation of microvascular perfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:616-623.
  96. Perez-Pinzon MA, Born JG, Centeno JM. Calcium and increase excitability promote tolerance against anoxia in hippocampal slices. *Brain Res.* 1999;833:20-26.
  97. Kato H, Liu Y, Araki T, Kogure K. Temporal profile of the effects of pretreatment with brief cerebral ischemia on the neuronal damage following secondary ischemic insult in the gerbil: cumulative damage and protective effects. *Brain Res.* 1991;553:238-242.
  98. Perez-Pinzon MA, Xu GP, Dietrich WD, Rosenthal M, Sick TJ. Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17:175-182.
  99. Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP- sensitive K<sup>+</sup> channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:4666-4670.
  100. Kawahara N, Ide T, Saito S, Kawai K, Kirino T. Propentofylline potentiates induced ischemic tolerance in gerbil hippocampal neurons via adenosine receptor. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:472-475.

101. Perez-Pinzon MA, Mumford PL, Rosenthal M, Sick TJ. Anoxic preconditioning in hippocampal slices: role of adenosine. *Neurosci.* 1996;75:687-694.
102. DeLeo J, Schubert P, Kreutzberg GW. Protection against ischemic brain damage using propentofylline in gerbils. *Stroke.* 1988;19:1535-1539.
103. Goldberg MP, Monyer H, Weiss JH, Choi DW. Adenosine reduces cortical neuronal injury induced by oxygen or glucose deprivation in vitro. *Neurosci Lett.* 1988;89:323-327.
104. Daval JL, Nicolas F. Opposite effects of cyclohexyladenosine and theophylline on hypoxic damage in cultured neurons. *Neurosci Lett.* 1994;175:114-116.
105. Perez-Pinzon MA, Born JG. Rapid preconditioning neuroprotection following anoxia in hippocampal slices: role of the K<sup>+</sup> ATP channel and protein kinase C. *Neuroscience.* 1999;89:453-459.
106. Reshef A, Sperling O, Zoref-Shani E. Opening of K(ATP) channels is mandatory for acquisition of ischemic tolerance by adenosine. *NeuroReport.* 2000;11:463-465.
107. Chen JC, Simon R. Ischemic tolerance in the brain. *Neurology.* 1997;48:306-311.
108. Liu Y, Kato H, Nakata N, Kogure K. Temporal profile of heat shock protein 70 synthesis in ischemic tolerance induced by preconditioning ischemia in rat hippocampus. *Neuroscience.* 1993;56:921-927.
109. Kirino T, Nakagomi T, Kanemitsu H, Tamura A. Ischemic tolerance. *Adv Neurol.* 1996;71:505-11:505-511.
110. Yamaguchi K, Yamaguchi F, Miyamoto O, Hatase O, Tokuda M. The reversible change of GluR2 RNA editing in gerbil hippocampus in course of ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:370-375.
111. Nakata N, Kato H, Liu Y, Kogure K. Effects of pretreatment with sublethal ischemia on the extracellular glutamate concentrations during secondary ischemia in the gerbil hippocampus evaluated with intracerebral microdialysis. *Neurosci Lett.* 1992;138:86-88.
112. Riepe MW, Kasischke K, Gericke CA, Lowe A, Hellweg R. Increase of hypoxic tolerance in rat hippocampal slices following 3-nitropropionic acid is not mediated by endogenous nerve growth factor. *Neurosci Lett.* 1996;211:9-12.
113. Kirino T, Tsujita Y, Tamura A. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991;11:299-307.
114. Kato H, Liu Y, Kogure K, Kato K. Induction of 27-kDa heat shock protein following cerebral ischemia in a rat model of ischemic tolerance. *Brain Res.* 1994;634:235-244.
115. Kato H, Chen T, Liu XH, Nakata N, Kogure K. Immunohistochemical localization of ubiquitin in gerbil hippocampus with induced tolerance to ischemia. *Brain Res.* 1993;619:339-343.
116. Nakata N, Kato H, Kogure K. Inhibition of ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus by quercetin and anti-heat shock protein-70 antibody. *Neuroreport.* 1993;4:695-698.
117. Abe H, Nowak TSJ. Gene expression and induced ischemic tolerance following brief insults. *Acta Neurobiol Exp (Warsz).* 1996;56:3-8.
118. Wada T, Kondoh T, Tamaki N. Ischemic "cross" tolerance in hypoxic ischemia of immature rat brain. *Brain Res.* 1999;847:299-307.
119. Pringle AK, Thomas SJ, Signorelli F, Iannotti F. Ischaemic pre-conditioning in organotypic hippocampal slice cultures is inversely correlated to the induction of the 72 kDa heat shock protein (HSP72). *Brain Res.* 1999;845:152-164.

120. Kato H, Kogure K, Araki T, Itoyama Y. Induction of Jun-like immunoreactivity in astrocytes in gerbil hippocampus with ischemic tolerance. *Neurosci Lett.* 1995;189:13-16.
121. Shimazaki K, Ishida A, Kawai N. Increase in bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus. *Neurosci Res.* 1994;20:95-99.
122. Toyoda T, Kassell NF, Lee KS. Induction of ischemic tolerance and antioxidant activity by brief focal ischemia. *NeuroReport.* 1997;8:847-851.
123. Buchner M, Li H, Huber R, Timmler M, Sehram I, Kasischke K, Volkel H, Ludolph AC, Riepe MW. Impaired tolerance to repetitive hypoxia in hippocampal slices of Cu,Zn superoxide dismutase transgenic mice. *Neurosci Lett.* 1999;276:131-134.
124. Tomasevic G, Shamloo M, Israeli D, Wieloch T. Activation of p53 and its target genes p21(WAF1/Cip1) and PAG608/Wig-1 in ischemic preconditioning. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999;70:304-313.
125. Tanaka S, Uehara T, Nomura Y. Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to Hypoxia/Brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. *J Biol Chem.* 2000;275:10388-10393.
126. Wang X, Yaish-Ohad S, Li X, Barone FC, Feuerstein GZ. Use of suppression subtractive hybridization strategy for discovery of increased tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 gene expression in brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:1173-1177.
127. Striggow F, Riek M, Breder J, Henrich-Noack P, Reymann KG, Reiser G. The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:2264-2269.
128. Masada T, Xi G, Hua Y, Keep RF. The effects of thrombin preconditioning on focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2000;867:173-179.
129. Trendelenburg G, Muselmann C, Wiegand F, Ruscher K, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. SAGE-Analyse differentieller Genexpression nach experimenteller Ischämie. 1999; Deutsche Gesellschaft für Neurologie:
130. Liu J, Ginis I, Spatz M, Hallenbeck JM. Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against hypoxic stress via TNF-alpha and ceramide. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278:C144-C153
131. Kato H, Kogure K, Araki T, Liu XH, Kato K, Itoyama Y. Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the hippocampus following ischemia in a gerbil model of ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15:60-70.
132. Ruscher K, Iurato L, Busch C, Trendelenburg G, Priller J, Bergk A, Lautenschlager M, Meisel A, Dirnagl U. Erythropoetin protects neurons from oxygen/glucose deprivation induced cell death. *Soc Neurosci Abs.* 1998;24:298-298.
133. Lobner D, Choi DW. Preincubation with protein synthesis inhibitors protects cortical neurons against oxygen-glucose deprivation-induced death. *Neuroscience.* 1996;72:335-341.
134. Matsushima K, Hogan MJ, Hakim AM. Cortical spreading depression protects against subsequent focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16:221-226.
135. Nawashiro H, Tasaki K, Ruetzler CA, Hallenbeck JM. TNF-alpha pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17:483-490.
136. Ohtsuki T, Ruetzler CA, Tasaki K, Hallenbeck JM. Interleukin-1 mediates induction of

- tolerance to global ischemia in gerbil hippocampal CA1 neurons. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16:1137-1142.
137. Toyoda T, Kassell NF, Lee KS. Induction of tolerance against ischemia/reperfusion injury in the rat brain by preconditioning with the endotoxin analog diphosphoryl lipid A. *J Neurosurg.* 2000;92:435-441.
138. Tasaki K, Ruetzler CA, Ohtsuki T, Martin D, Nawashiro H, Hallenbeck JM. Lipopolysaccharide pre-treatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.* 1997;748:267-270.
139. Golanov EV, Liu F, Reis DJ. Stimulation of cerebellum protects hippocampal neurons from global ischemia. *Neuroreport.* 1998;9:819-824.
140. Galea E, Golanov EV, Feinstein DL, Kobylarz KA, Glickstein SB, Reis DJ. Cerebellar stimulation reduces inducible nitric oxide synthase expression and protects brain from ischemia. *Am J Physiol.* 1998;274:H2035-H2045
141. Reis DJ, Kobylarz K, Yamamoto S, Golanov EV. Brief electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus conditions long-lasting salvage from focal cerebral ischemia: conditioned central neurogenic neuroprotection. *Brain Res.* 1998;780:159-163.
142. Towfighi J, Housman C, Mauger D, Vannucci RC. Effect of seizures on cerebral hypoxic-ischemic lesions in immature rats. *Dev Brain Res.* 1999;113:83-95.
143. Frerichs KU, Hallenbeck JM. Hibernation in ground squirrels induces state and species-specific tolerance to hypoxia and aglycemia: an in vitro study in hippocampal slices. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:168-175.
144. Kasischke K, Huber R, Hongge L, Timmler M, Riepe MW. Primary hypoxic tolerance and chemical preconditioning during estrus cycle in mice. *Stroke.* 1999; 30(6): 1256-62.
145. Riepe MW. Inhibition des Energiestoffwechsels - ein pathophysiologischer Mechanismus mit neuroprotektivem Potential durch chemische Präkonditionierung. Habilitationsschrift 1997;
146. Chopp M, Chen H, Ho KL, Dereski MO, Brown E, Hetzel FW, Welch KM. Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat. *Neurology.* 1989;39:1396-1398.
147. Wada K, Ito M, Miyazawa T, Katoh H, Nawashiro H, Shima K, Chigasaki H. Repeated hyperbaric oxygen induces ischemic tolerance in gerbil hippocampus. *Brain Res.* 1996;740:15-20.
148. Prass, Wiegand, Schumann P, Ahrens M, Kapinya K, Harms C, Liao W, Trendelenburg G, Gertz K, Moskowitz MA, Knapp F, Victorov IV, Megow D, Dirnagl U. Hyperbaric oxygenation induced tolerance against focal cerebral ischemia in mice is strain dependent. *Brain Res.* 2000;871:146-150.
149. Sugino T, Nozeki K, Takagi Y, Hashimoto N. 3-Nitropropionic acid induces ischemic tolerance in gerbil hippocampus in vivo. *Neurosci Lett.* 1999;259:9-12.
150. Nakase H, Heimann A, Uranishi R, Riepe MW, Kempfski O. Early-onset tolerance in rat global cerebral ischemia induced by a mitochondrial inhibitor. *Neurosci Lett.* 2000;290:105-108.
151. Weih M, Bergk A, Isaev N, Ruscher K, Megow D, Riepe MW, Meisel A, Victorov I, Dirnagl U. Induction of ischemic tolerance in rat cortical neurons by 3-Nitropropionic acid: chemical preconditioning. 1999;
152. von AC, Timmler M, Ludolph AC, Riepe MW. Adenosine receptor up-regulation: initiated upon preconditioning but not upheld. *NeuroReport.* 2000;11:1223-1226.
153. Douen AG, Akiyama K, Hogan MJ, Wang F,

- Dong L, Chow AK, Hakim A. Preconditioning with cortical spreading depression decreases intraschemic cerebral glutamate levels and down-regulates excitatory amino acid transporters EAAT1 and EAAT2 from rat cerebral cortex plasma membranes. *J Neurochem*;75 (2):812-8. 75:812-818.
154. Kariko K, Harris VA, Rangel Y, Duvall ME, Welsh FA. Effect of cortical spreading depression on the levels of mRNA coding for putative neuroprotective proteins in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998;18:1308-1315.
155. Perez-Pinzon MA, Alonso O, Kraydieh S, Dietrich WD. Induction of tolerance against traumatic brain injury by ischemic preconditioning. *Neuroreport*. 1999;10:2951-2954.
156. Perez-Pinzon MA, Xu GP, Dietrich WD, Rosenthal M, Sick TJ. Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:175-182.
157. Kobayashi S, Harris VA, Welsh FA. Spreading depression induces tolerance of cortical neurons to ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995;15:721-727.
158. Dowden J, Corbett D. Ischemic preconditioning in 18- to 20-month-old gerbils: long-term survival with functional outcome measures. *Stroke*. 1999;30:1240-1246.
159. Yanamoto H, Hashimoto N, Nagata I, Kikuchi H. Infarct tolerance against temporary focal ischemia following spreading depression in rat brain. *Brain Res*. 1998;784:239-249.
160. Chimon GN, Wong PT. Ischemic tolerance and lipid peroxidation in the brain. *Neuroreport*. 1998;9:2269-2272.
161. Riepe MW, Kasischke K, Raupach A. Acetylsalicylic acid increases tolerance against hypoxic and chemical hypoxia. *Stroke*. 1997;28:2006-2011.
162. Belayev L, Ginsberg MD, Alonso OF, Singer JT, Zhao W, Busto R. Bilateral ischemic tolerance of rat hippocampus induced by prior unilateral transient focal ischemia: relationship to c-fos mRNA expression. *Neuroreport*. 1996;8:55-59.
163. Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T, Morikawa S, Inubushi T, Kinoshita M. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of "remote preconditioning". *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:556-564.
164. Schoemaker RG, vanHeijngen CL. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000 May ;278 (5):H1571-H1576.
165. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993;87:893-899.
166. Hata K, Whittaker P, Kloner RA, Przyklenk K. Brief myocardial ischemia attenuates platelet thrombosis in remote, damaged, and stenotic carotid arteries. *Circulation*. 1999;100:843-848.
167. vanHeijngen CL, Schoemaker RG, van HC. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am J Physiol*. 2000;278:H1571-H1576
168. Duncker DJ, Verdouw PD. Effects of ischemic preconditioning. *Circulation*. 1998;97:1211-1212.
169. Kapadia SJ, Terlato JS, Most AS. Presence of a critical coronary artery stenosis does not abolish the protective effect of ischemic preconditioning. *Circulation*. 1997;95:1286-1292.
170. Hankey GJ, Warlow CP. Prognosis, Prognostic factors and prediction models of outcome, in

- Transient ischemic attacks of the brain and eye.* New York, WB Saunders Co Ltd., 1994, pp 251-300.
171. Dyken ML, Conneally M, Haerer AF, Gotshall RA, Calanchini PR, Poskanzer DC, Price TR, Swanson PD. Cooperative study of hospital frequency and character of transient ischemic attacks. I. Background, organization, and clinical survey. *JAMA.* 1977;237:882-886.
172. Levy DE. How transient are transient ischemic attacks? *Neurology.* 1988;38:674-677.
173. Pessin MS, Duncan GW, Mohr JP, Poskanzer DC. Clinical and angiographic features of carotid transient ischemic attacks. *N Engl J Med.* 1977;296:358-362.
174. Harrison MJ, Marshall J, Thomas DJ. Relevance of duration of transient ischaemic attacks in carotid territory. *Br Med J.* 1978;1:1578-1579.
175. Bogousslavsky J, Hachinski VC, Boughner DR, Fox AJ, Vinuela F, Barnett HJ. Clinical predictors of cardiac and arterial lesions in carotid transient ischemic attacks. *Arch Neurol.* 1986;43:229-233.
176. Schneeweis S, Urbach H, Solymosi L, Ries F. Preoperative risk assessment for carotid occlusion by transcranial Doppler ultrasound. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997;62:485-489.
177. Dennis M, Bamford J, Sandercock P, Warlow C. Prognosis of transient ischemic attacks in the Oxfordshire Community Stroke Project. *Stroke.* 1990;21:848-853.
178. Bogousslavsky J, Regli F. Cerebral infarct in apparent transient ischemic attack. *Neurology.* 1985;35:1501-1503.
179. Evans GW, Howard G, Murros KE, Rose LA, Toole JF. Cerebral infarction verified by cranial computed tomography and prognosis for survival following transient ischemic attack. *Stroke.* 1991;22:431-436.
180. Anonymous. Predictors of major vascular events in patients with a transient ischemic attack or nondisabling stroke. The Dutch TIA Trial Study Group. *Stroke.* 1993;24:527-531.
181. Bhadelia RA, Anderson M, Polak JF, Manolio TA, Beauchamp N, Knepper L, O'Leary DH. Prevalence and associations of MRI-demonstrated brain infarcts in elderly subjects with a history of transient ischemic attack : the cardiovascular health study. *Stroke.* 1999;30:383-388.
182. Werdelin L, Juhler M. The course of transient ischemic attacks. *Neurology.* 1988;38:677-680.
183. Cillessen JP, Kappelle LJ, van SJ, Algra A, van GJ. Does cerebral infarction after a previous warning occur in the same vascular territory? *Stroke.* 1993;24:351-354.
184. Dennis MS, Bamford JM, Sandercock P, Warlow CP. A comparison of risk factors and prognosis for transient ischemic attacks and minor ischemic strokes. The Oxfordshire community stroke project. *Stroke.* 1989;20:1494-1499.
185. Heyman A, Wilkinson WE, Hurwitz BJ, Haynes CS, Utley CM, Rosati RA, Burch JG, Gore TB. Risk of ischemic heart disease in patients with TIA. *Neurology.* 1984;34:626-630.
186. Wilterdink JL, Easton JD. Vascular event rates in patients with atherosclerotic cerebrovascular disease. *Arch Neurol.* 1998;49:857-863.
187. Whisnant JP. Modeling of risk factors for ischemic stroke; The Willis lecture. *Stroke.* 1997;28:1839-1843.
188. Hankey GJ, Slattery JM, Warlow CP. The prognosis of hospital-referred transient ischaemic attacks. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1991;54:793-802.
189. Bogousslavsky J, Van MG, Regli F. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000

- consecutive patients with first stroke. *Stroke*. 1988;19:1083-1092.
190. Timsit SG, Sacco RL, Mohr JP, Foulkes MA, Tatemichi TK, Wolf PA, Price TR, Hier DB. Brain infarction severity differs according to cardiac or arterial embolic source. *Neurology*. 1993;43:728-733.
191. Dippel DW, Koudstaal PJ. We need stronger predictors of major vascular events in patients with a recent transient ischemic attack or nondisabling stroke. *Stroke*. 1997;28:774-776.
192. Weih M, Bergk A, Isaev NK, Ruscher K, Megow D, Riepe M, Meisel A, Victorov IV, Dirnagl U. Induction of ischemic tolerance in rat cortical neurons by 3- nitropropionic acid: chemical preconditioning. *Neurosci Lett*. 1999;272:207-210.
193. Banker G, Goslin K. *Culturing nerve cells*, Cambridge, MIT Press, 1998,
194. Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods*. 1987;20:83-90.
195. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24:35-41.
196. Cote R, Hachinski VC, Shurvell BL, Norris JW, Wolfson C. The Canadian Neurological Scale: a preliminary study in acute stroke. *Stroke*. 1986;17:731-737.
197. Cote R, Battista RN, Wolfson C, Boucher J, Adam J, Hachinski V. The Canadian Neurological Scale: validation and reliability assessment. *Neurology*. 1989;39:638-643.
198. Dolhaberriague L, Litvan I, Mitsias P, Mansbach HH. A reappraisal of reliability and validity studies in Stroke. *Stroke*. 1998;27:2331-2336.
199. Koudstaal PJ, van Gijn J, Staal A, Duivenvoorden HJ, Gerritsma JG, Kraaijeveld CL. Diagnosis of transient ischemic attacks: improvement of interobserver agreement by a check-list in ordinary language. *Stroke*. 1986;17:723-728.
200. Special report from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Classification of cerebrovascular diseases III. *Stroke*. 1990;21:637-676.
201. Sachs L. *Angewandte Statistik*, Springer Verlag Heidelberg, 1997,
202. Wiegand F, Liao W, Busch C, Castell S, Knapp F, Lindauer U, Megow D, Meisel A, Redetzky A, Ruscher K, Trendelenburg G, Victorov I, Riepe MW, Diener HC, Dirnagl U. Respiratory chain inhibition induces tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999; 11: 1229-37.
203. Sugino T, Nozaki K, Takagi Y, Hashimoto N. 3-Nitropropionic acid induces ischemic tolerance in gerbil hippocampus in vivo. *Neurosci Lett*. 1999;259:9-12.
204. Wiegand F, Lindauer U, Busch C, Liao W, Megow D, Dirnagl U. Tolerance to focal ischemia induced by 3-NPA is mediated by formation of reactive oxygen species. *Soc Neur Abstr*. 1998;23:2183-2183.(abstract)
205. Pang Z, Geddes JW. Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J Neurosci*. 1997;17:3064-3073.
206. Fink SL, Ho DY, Sapolsky RM. Energy and glutamate dependency of 3-Nitropropionic acid neurotoxicity in culture. *Exp Neurol*. 1996;138:298-304.
207. Bogousslavsky J, van Melle G, Regli F. The Lausanne stroke registry: Analysis of 1000

- consecutive patients with first stroke. *Stroke*. 1988;19:1083-1092.
208. Hakim AM. Could Transient Ischemic Attacks have a Cerebroprotective Role ? *Stroke*. 1994;25:715-716.
209. Davalos A, Cendra E, Teruel J, Martinez M, Genis D. Deteriorating ischemic stroke: risk factors and prognosis. *Neurology*. 1990;40:1865-1869.
210. Bogousslavsky J, Delaloye-Bischof A, Regli F, Delaloye B. Prolonged hypoperfusion and early stroke after transient ischemic attack. *Stroke*. 1990;21:40-46.
211. Feldmann M, Voth E, Dressler D, Henze T, Felgenhauer K. 99mTc-hexamethylpropylene amine oxime SPECT and X-ray CT in acute cerebral ischaemia. *J Neurol*. 1990;237:475-479.
212. Ferro JM, Falcao I, Rodrigues G, Canhao P, Melo TP, Oliveira V, Pinto AN, Crespo M, Salgado AV. Diagnosis of transient ischemic attack by the nonneurologist. A validation study. *Stroke*. 1996;27:2225-2229.
213. Kraaijeveld CL, van Gijn J, Schouten HJ, Staal A. Interobserver agreement for the diagnosis of transient ischemic attacks. *Stroke*. 1984;15:723-725.
214. Yamamoto H, Bogousslavsky J, van Melle G. Different predictors of neurological worsening in different causes of stroke. *Arch Neurol*. 1998;55:481-486.
215. Moncayo J, de FG, Bogousslavsky J, Altieri M, Van MG. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology*. 2000;54:2089-2094.
216. Altieri M, van Melle G, Bogousslavsky J. Do transient ischemic attack protect from severe subsequent stroke ? (Abstract). *Stroke*. 1998;29:320-320.
217. von Kummer R, Haemodilution bei zerebraler Ischaemie: Therapieversuch ohne gesichertes pathophysiologisches Konzept. *Nervenarzt*. 1989;1989:523-527.
218. Marks MP, Holmgren EB, Fox AJ, Patel S, von KR, Froehlich J. Evaluation of early computed tomographic findings in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1999;30:389-392.
219. Grond M, von KR, Sobesky J, Schmulling S, Rudolf J, Terstegge K, Heiss W. Early x-ray hypoattenuation of brain parenchyma indicates extended critical hypoperfusion in acute stroke. *Stroke*. 2000;31:133-139.
220. delZoppo GJ, vonKummer R, Hamann GF. Ischaemic damage of brain microvessels: inherent risks for thrombolytic treatment in stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998;65:1-9.
221. Kloner RA, Shook T, Przyklenk K, Davis VG, Junio L, Matthews RV, Burstein S, Gibson M, Poole WK, Cannon CP. Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning? *Circulation*. 1995;91:37-45.
222. Saver JL, Johnston KC, Homer D, Wityk R, Koroshetz W, Truskowski LL, Haley EC. Infarct volume as a surrogate or auxiliary outcome measure in ischemic stroke clinical trials. The RANTTAS Investigators. *Stroke*. 1999;30:293-298.
223. Gross CE, Bednar MM, Lew SM, Florman JE, Kohut JJ. Preoperative volume expansion improves tolerance to carotid artery cross-clamping during endarterectomy. *Neurosurgery*. 1998;43:222-226.
224. Lavine SD, Masri LS, Levy ML, Gianotta SL. Temporary occlusion of the middle cerebral artery in intracranial aneurysm surgery: time limitation and advantage of brain protection. *J Neurosurg*. 1997;87:817-824.
225. Hentschel F, Schredl M, Dressing H. Schlaf-Apnoe-Syndrom und zerebrale Läsionen - eine prospektive MRT-Studie. *Fortschr Neurol Psychiatr*. 1997;65:421-424.

226. McEachern JC, Shaw CA. The plasticity-pathology continuum: defining a role for the LTP phenomenon. *J Neurosci Res.* 1999;58:42-61.
227. Hammond C, Crepel V, Gozlan H, Ben-Ari Y. Anoxic LTP sheds light on the multiple facets of NMDA receptors. *Trends Neurosci.* 1994;17:497-503.
228. Cramer SC, Chopp M. Recovery recapitulates ontogeny. *Trends Neurosci.* 2000;23:265-271.
229. Fernandez MT, Novelli A. Basic fibroblast growth factor protects cerebellar neurons in primary culture from NMDA and non-NMDA receptor mediated neurotoxicity. *FEBS Lett.* 1993;335:124-131.
230. Koh JY, Gwag BJ, Lobner D, Choi DW. Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science.* 1995;268:573-575.
231. Lundgren J, Zhang H, Agardh CD, Smith ML, Evans PJ, Halliwell B, Siesjö BK. Acidosis-induced ischemic brain damage: are free radicals involved? *J Cereb Blood Flow and Metab.* 1991;11:587-596.
232. Sapolsky RM, Trafton J, Tombaugh GC. Excitotoxic neuron death, acidotic endangerment, and the paradox of acidotic protection. *Adv Neurol.* 1996;71:237-44; discussion 244-5:237-244.
233. Traynelis SF, Cull-Candy SG. Pharmacological properties and H<sup>+</sup> sensitivity of excitatory amino acid receptor channels in rat cerebellar granule neurones. *J Physiol (Lond).* 1991;433:727-63:727-763.
234. Giffard RG, Monyer H, Christine CW, Choi DW. Acidosis reduces NMDA receptor activation, glutamate neurotoxicity, and oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures. *Brain Res.* 1990;506:339-342.
235. Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia. Friend or foe? *Stroke.* 1996;27:1682-1687.
236. van Swieten JC, Koudstaal PJ, Visser MC, Schouten HJ, van Gijn J. Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke.* 1988;19:604-607.
237. Maas AI, Braakman R, Schouten HJ, Minderhoud JM, van Zomeren AH. Agreement between physicians on assessment of outcome following severe head injury. *J Neurosurg.* 1983;58:321-325.