

Titel: doctor rerum naturalium (Dr.rer. nat)

Thema: Role of Mitochondria in Ischemia / Reperfusion Mediated Brain Injury: Mechanisms and Pharmacological Interventions

Name: Syed Shaida Ahmad Andrabi

ZUSAMMENFASSUNG:

Eine fokale Ischämie des Zentralnervensystems wird durch die reduzierte Blutversorgung eines distinkten cerebralen Hirnareals verursacht. Das führt zu massiven Zellschädigungen innerhalb der ersten Stunden bis zu Wochen nach dem Insult. Der extensive Verlust von Neuronen und Gliazellen in einem von Ischämie betroffenen Areal ist das pathologische Hauptcharakteristikum eines Schlaganfalls und führt - je nach Ausmaß und Lokalisation - zu neurologischen Symptomen verschiedener Schweregrade bis hin zum Tode des Patienten. In der Ereigniskaskade der Pathogenese des Schlaganfalls spielt oxidativer und nitrosativer Stress eine wichtige Rolle, hervorgerufen durch die schädigenden Effekte von reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffspezies (ROS/RNS). Es ist bekannt, dass RNS/ROS einen direkt schädigenden Einfluß auf Mitochondrien ausüben und zu einer potentiell proapoptotischen Akkumulation von Ca^{2+} im Zytosol ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) führen können. Zu diesem proapoptotische Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_c$ trägt wahrscheinlich die Aktivierung der mitochondrialen *permeability transition pore* (mtPTP) bei, einem Megakanal, der sich durch die innere und äußere Membran der Mitochondrien spannt. Durch die mtPTP können auch proapoptotische Proteine, wie Cytochrom C (cyt c), *apoptosis inducing factor* (AIF), Smac/DiaBLO und Procaspasen, aus dem Intermembranraum in das Zytosol gelangen. Die Freisetzung von cyt c in das Zytosol initiiert die mitochondriale apoptotische Zelltodkaskade über eine Aktivierung von Caspase-3. Die Behandlung cerebraler Ischämie mit Substanzen, die entweder die mtPTP direkt inhibieren oder die den oxidativen/nitrosativen Stress reduzieren, erscheint von besonderem Interesse, weil von einer solchen pharmakologischen Intervention zur Reduzierung der durch Ischämie-verursachten Hirnschädigung eine entsprechende Wirksamkeit erwartet werden kann.

Die der Dissertation zugrunde liegenden Untersuchungen konzentrieren sich zunächst auf Melatonin. Melatonin ist ein Amin, das von Zellen des Pinealorgans synthetisiert und sezerniert wird. Es wird als Neuroprotektivum im Zusammenhang mit cerebraler Ischämie diskutiert, wobei die Wirkung hauptsächlich seinen antioxidativen Eigenschaften zugeschrieben wird. Hier wird erstmalig gezeigt, dass Melatonin die mtPTP direkt inhibieren kann. Übereinstimmend damit belegen die weiteren Ergebnisse, dass der NMDA-induzierte $[Ca^{2+}]_c$ -Anstieg in striatalen Maus-Neuronenkulturen durch Melatonin reduziert wird, ähnlich der Wirkung, die man bei Behandlung mit Cyclosporin A (CsA), einem Blocker der mtPTP, beobachtet. Wenn solche Neuronenkulturen einem Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD) ausgesetzt wurden, dann war Melatonin in der Lage, den durch OGD verursachten Verlust des mitochondrialen Membranpotentials zu verhindern. Um den direkten Effekt von Melatonin auf die mtPTP-Aktivität auf Einzelkanalebene zu ermitteln, wurde in elektrophysiologischen *patch-clamp* Studien die mtPTP-Aktivität an der inneren mitochondrialen Membran von Lebermitoplasten aufgezeichnet. Dabei zeigte sich, dass Melatonin dosisabhängig die mtPTP-Ströme mit einem IC_{50} von $0,8 \mu M$ inhibiert.

Auf der Basis dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass Melatonin als wirksamer mtPTP-Blocker die Freisetzung von cyt c aus Mitochondrien in das Zytosol, analog zu der des Ca^{2+} , verhindert. Für eine entsprechende Untersuchung am Ganztier benutzten wir das *middle cerebral artery occlusion (MCAO)*-Modell, bei dem in Ratten die *Arteria media cerebri* für zwei Stunden mit nachfolgender Reperfusion okkludiert wird. Melatonin (10 mg/kg , i. p.) oder die entsprechende Vehikel-Lösung wurden wiederholt appliziert: einmal nach der Okklusion und einmal zum Zeitpunkt der Reperfusion. Tatsächlich zeigte das Infarktareal in Hirnschnitten von Melatonin-behandelten Tieren eine stark verringerte cyt c-Immunoreaktivität im Zytosol, begleitet von einer reduzierten Aktivierung von Caspase 3 und apoptotischer DNA-Fragmentierung. Melatonin verringerte auch den Verlust von Neuronen und reduzierte das Infarktvolumen im Vergleich zu Vehikel-behandelten MCAO-Ratten ganz beträchtlich. Unsere Befunde implizieren, dass die direkte Inhibierung der mtPTP durch Melatonin essentiell zum antiapoptotischen Effekt dieser Substanz bei transientser Hirnischämie beiträgt.

Da oxidativer/nitrosativer Stress ein pathologischer Hauptfaktor in der apoptotischen Kaskade der cerebralen Ischämie ist, wurde weiteres natürlich vorkommendes Antioxidants, das Oxyresveratrol (OXY), untersucht in Bezug auf seinen potentiellen neuroprotektiven Effekt. Erneut kam dazu das MCAO-Modell transientser Hirnischämie zum Einsatz. OXY wurde wiederholt i. p. appliziert: einmal sofort nach Okklusion und einmal zum Zeitpunkt der

Reperfusion. 10 bzw. 20 mg/kg OXY reduzierten das Hirninfarktvolumen im Vergleich zu Vehikel-behandelten MCAO-Ratten um mehr als die Hälfte (um $54 \pm 4\%$ bzw. $63 \pm 5\%$). Auch die neurologischen Defizite, die anhand verschiedener Verhaltensparameter erfasst wurden, waren in OXY-behandelten MCAO-Ratten geringer ausgeprägt. Die histologische Analyse von Apoptose-Markern im ischämischen Hirnareal zeigte, dass OXY die cyt c-Freisetzung aus Mitochondrien und die nachfolgende Caspase-3-Aktivierung in MCAO-Ratten verringerte. Zudem reduzierte OXY die Anzahl der sich in Apoptose befindenden Zellen im ischämischen Hirnareal im Vergleich zu Vehikel-behandelten MCAO-Ratten, wie unter Verwendung von Antikörpern gegen apoptotische Einzelstrang-DNA nachgewiesen werden konnte. Diese Befunde belegen in dem von uns verwendeten *in-vivo*-Schlaganfall-Modell, dass OXY nach akuter Hirnischämie zur Verringerung der Schädigung des Hirngewebes führt.

Befunde, die in der Dissertation, wie auch in den daraus resultierenden Publikationen vorgestellt wurden, belegen, dass sowohl Melatonin als auch OXY, interessante Kandidaten für eine erfolgreiche Intervention in der Schlaganfall-Therapie sind.

SUMMARY AND CONCLUSION:

Focal brain ischemia caused by reduced supply of blood to cerebral tissue, results in cellular damage within the first few hours up to weeks after the insult. Extensive loss of neurons as well as glia in such ischemic brain areas is the characteristic pathological feature of cerebral infarcts causing mild to severe neurological symptoms that may even lead to the death of the subject. The cascade of events in the pathogenesis of stroke involves oxidative and nitrosative stress, i.e., the deleterious effects of reactive oxygen and nitrogen species (ROS / RNS).

It is known that RNS / ROS cause mitochondrial damage and lead to an accumulation of pro-apoptotic high cytosolic Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) in the cells. It is now realised that an activation of the mitochondrial permeability transition pore (mtPTP), a megachannel formed in the mitochondrial membranes contributes to such pro-apoptotic $[\text{Ca}^{2+}]_c$ rise. Also, the mtPTP opening leads to the release of pro-apoptotic proteins like cytochrome c (cyt c), apoptosis inducing factor (AIF), Smac / DiaBLO and procaspases from the mitochondrial intermembrane space into the cytoplasm. The release of cyt c into the cytosol initiates the cascade of mitochondrial apoptotic cell death by activating caspase-3.

Treatment with drugs that can either directly inhibit the mtPTP or can reduced the oxidative / nitrosative stress are therefore potential pharmacological interventions to reduce the ischemia-induced brain injury.

5.1 Melatonin, the secretory product of the pineal gland, is known to be neuroprotective in cerebral ischemia, which is so far mostly attributed to its antioxidant properties. Here we show that melatonin directly inhibits the mtPTP. Consistently, NMDA-induced $[\text{Ca}^{2+}]_c$ rises were diminished by melatonin in cultured mouse striatal neurons, similar to the pattern seen with cyclosporine A (CsA), an inhibitor of mtPTP. When the mouse striatal neurons were subjected to oxygen-glucose deprivation (OGD), melatonin strongly prevented the OGD-induced loss of mitochondrial membrane potential. To assess the direct effect of melatonin on the mtPTP activity at the single channel level, recordings from the inner mitochondrial membrane were obtained by a patch-clamp approach using rat liver mitoplasts. Melatonin strongly inhibited mtPTP currents in a dose-dependent manner with an IC_{50} of 0.8 μM . If melatonin is an inhibitor of the mtPTP, it should prevent mitochondrial cyt c release as seen in stroke models. Rats underwent middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 2 h followed by reperfusion. Melatonin (10 mg/kg intraperitoneal, i.p.) or vehicle was given at the time of

occlusion and at the time of reperfusion. Indeed, infarct area in the brain sections of melatonin-treated animals displayed a considerably decreased cyt c release along with less activation of caspase-3 and apoptotic DNA fragmentation. Melatonin treatment diminished the loss of neurons and decreased the infarct volume as compared to vehicle-treated MCAO rats. Our findings suggest that the direct inhibition of the mtPTP by melatonin may essentially contribute to its anti-apoptotic effects in transient brain ischemia.

5.2 Since oxidative / nitrosative stress is one of the major pathological factors in the cascade of cell death in cerebral ischemia, we investigated the neuroprotective effect of a naturally occurring antioxidant, oxyresveratrol (OXY) to reduce brain injury after cerebral stroke. We used the MCAO model of transient brain ischemia to induce a defined brain infarction. OXY was given twice i.p.: immediately after occlusion and at the time of reperfusion. OXY (10 or 20 mg / kg) significantly reduced the brain infarct volume by approximately $54 \pm 4 \%$ and $63 \pm 5 \%$, respectively, when compared to vehicle-treated MCAO rats. Also, the neurological deficits as assessed by different scoring methods reduced in OXY-treated MCAO rats. Histological analysis of apoptotic markers in the ischemic brain area revealed that OXY treatment diminished cyt c release from the mitochondria and decreased caspase-3 activation in MCAO rats. Also, staining for apoptotic DNA showed that the number of apoptotic nuclei in ischemic brain were reduced after OXY treatment as compared to the vehicle-treated MCAO rats. These findings demonstrate that OXY is neuroprotective in an *in-vivo* stroke model by limiting ischemia-induced brain injury.

Taken together, we show here for the first time that the endogenous pineal hormone melatonin is a blocker of the mtPTP. Our data indicate that this property of melatonin contributes to its neuroprotective effects both, *in-vitro* and *in-vivo*.

Furthermore, we established the naturally occurring hydroxystilbene, OXY as a potent neuroprotectant in a transient brain ischemia model, by demonstrating strongly reduced infarct volumes and neurological deficits upon its treatment after stroke insults.

Our data show that both melatonin and OXY are potential drugs for the development of pharmacological intervention in stroke therapy.