

Aus dem
Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger

Angefertigt an der
Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München
(apl. Prof. Dr. med. M. Blobner)

**Zum Einfluss von 17 β -Östradiol und Progesteron auf die
neurologische Funktion und die Gehirnmorphologie sowie auf
molekulare Aspekte der zerebralen Inflammation und
Exzitotoxizität vier Tage nach herzchirurgisch typischer
extrakorporaler Zirkulation mit 45-minütigem tief hypothermem
Kreislaufstillstand im Rattenmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Franziska Anna Hötzing
aus
Deggendorf

München, 2014

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Manfred Stangassinger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

Meinen Eltern und Großeltern

“...mind you, that you have a sound scientific theory to correlate your observations at the bedside. Mere experience by itself is nothing. If I take my dog to the bedside with me, he sees what I see. But he learns nothing from it. Why? Because he's not a scientific dog.”

(“The doctor's dilemma” von Bernard Shaw, 1. Akt)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Das Gehirn	3
2.1.1	Anatomie und Ontogenese	4
2.1.2	Zerebrale Geschlechtsdimorphismen	5
2.1.3	Zerebrale Ischämie	10
2.1.3.1	Fokale Ischämie.....	12
2.1.3.2	Globale Ischämie	12
2.1.3.2.1	Azidose	13
2.1.3.2.2	Glutamat, Exzitotoxizität und die Rolle des Kalziums	14
2.1.3.2.3	Oxidativer Stress und freie Radikale	15
2.1.3.3	Zerebrale Ischämie und Geschlecht	16
2.2	Weibliche Geschlechtshormone	17
2.2.1	Östrogen	17
2.2.1.1	Östrogenrezeptoren	20
2.2.1.2	Neuroprotektion durch Östrogen	23
2.2.2	Progesteron	28
2.2.2.1	Progesteronrezeptoren	30
2.2.2.2	Neuroprotektion durch Progesteron	32
2.3	Extrakorporale Zirkulation (EKZ) mit tief hypothermem Kreislaufstillstand (DHCA).....	35
2.3.1	Funktionsweise und klinische Anwendung der EKZ	35
2.3.2	Konzept der Hypothermie und der tief hypotherme Kreislaufstillstand	36
2.3.3	Zerebrale Pathophysiologie und neurologische Komplikationen nach EKZ	37
2.3.3.1	Zerebrale Hypoperfusion.....	37
2.3.3.2	Embolien	38
2.3.3.3	Inflammation	38
2.3.3.4	Intra- und postoperative zerebrale Hyperthermie.....	39
2.3.3.5	Neurologische Komplikation und neurokognitive Dysfunktion in der Klinik.....	40
2.3.4	EKZ bei Frauen und Männern – eine Differenzierung.....	40

2.3.4.1	Herzchirurgische Eingriffe mit EKZ – schlechtere Ergebnisse bei Frauen?.....	41
2.3.4.2	Geschlechtsspezifische Pathophysiologie bei der EKZ	43
2.3.5	Geschlecht, Geschlechtshormonstatus und neurokognitive Dysfunktion nach EKZ	45
2.4	Inflammation	46
2.4.1	Akute systemische Inflammation	46
2.4.2	Zerebrale Inflammation	50
2.4.2.1	Ablauf und zelluläre Vermittlung der Entzündungsantwort im Gehirn	51
2.4.2.1.1	Die Blut-Hirn-Schranke	51
2.4.2.1.2	Mikroglia	51
2.4.2.1.3	Astroglia	54
2.4.2.1.4	Neuronale Beteiligung an der Entzündungsantwort.....	56
3	Eigene Untersuchungen.....	58
3.1	Zielsetzung	58
3.2	Material und Methoden	60
3.2.1	Versuchsvorbereitung.....	60
3.2.2	Versuchsaufbau	61
3.2.2.1	Zeitlicher Ablauf	61
3.2.2.2	Aufteilung der Versuchsgruppen.....	62
3.2.3	Versuchsdurchführung	62
3.2.3.1	Herstellung der Hormonimplantate	62
3.2.3.1.1	17 β -Östradiol-Implantat	63
3.2.3.1.2	Progesteron-Implantat	63
3.2.3.1.3	Plazebo-Implantat.....	63
3.2.3.2	Kastration/Scheinkastration.....	64
3.2.3.3	Einsetzen der Hormonimplantate	66
3.2.3.4	Vorbereitung und Durchführung der EKZ mit DHCA	67
3.2.3.4.1	Allgemeine und spezielle Vorbereitung der EKZ	67
3.2.3.4.2	Technischer Aufbau und Durchführung der EKZ.....	69
3.2.3.4.3	Abkühlungsphase	71
3.2.3.4.4	DHCA.....	71
3.2.3.4.5	Phase der Wiedererwärmung.....	72
3.2.3.4.6	Ende der EKZ und Einbringen der Telemetrie-Sonde	73

3.2.3.4.7	Postoperative Überwachung.....	75
3.2.3.4.8	Bestimmung der Geschlechtshormonkonzentration.....	75
3.2.3.5	Telemetrie.....	76
3.2.3.5.1	Systemaufbau und Aufzeichnung.....	76
3.2.3.5.2	Alarmsystem.....	78
3.2.3.6	Untersuchung der neurologischen Funktion.....	80
3.2.3.6.1	Allgemeinbefinden	81
3.2.3.6.1.1	Bewusstsein	81
3.2.3.6.1.2	Pflegeverhalten	82
3.2.3.6.1.3	Gewichtskontrolle	82
3.2.3.6.2	Motorik.....	82
3.2.3.6.2.1	Gitter-Dreh-Test („Rotating-Grid“)	82
3.2.3.6.2.2	Balken-Gleichgewichts-Test („Beam-Balance“)	82
3.2.3.6.2.3	Balken-Lauf-Test („ Beam-Walking“).....	83
3.2.3.6.2.4	Greif-Zug-Test („Prehensile-Traction“).....	83
3.2.3.6.3	Sensorik	83
3.2.3.6.3.1	Propriozeption	83
3.2.3.6.3.2	Sehfähigkeit.....	84
3.2.3.6.3.3	Hörvermögen.....	84
3.2.3.6.3.4	Vibrissen-Sensibilität	84
3.2.3.7	Euthanasie, Probenentnahme und Blutanalyse.....	85
3.2.4	Tierauswahl zum Einschluss in die Studie und weiterführende Untersuchungen.....	87
3.2.4.1	Gezielte Tierauswahl durch Ausschlusskriterien	87
3.2.4.2	TNF α -Konzentrationsbestimmung im Serum mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	88
3.2.4.3	Histologische Untersuchungen	90
3.2.4.4	Nachweis von Rezeptor-, Transporter- und Entzündungsproteinen im Gehirngewebe mittels Western-Blot-Verfahren.....	93
3.2.4.4.1	Probenaufbereitung mit Proteinextraktion	93
3.2.4.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	94
3.2.4.4.3	Gelelektrophoretische Proteinauftrennung.....	94
3.2.4.4.4	Proteintransfer mittels „Blotting“ und Proteindetektion mittels Chemilumineszenz-Reaktion.....	95
3.2.5	Statistische Grundlagen der Auswertung	98

4	Ergebnisse	99
4.1	Physiologische Befunde vor, während und nach EKZ und DHCA	99
4.1.1	Parametrische physiologische Befunde während der OP-Phase	99
4.1.2	Geschlechtshormonspiegel am OP-Tag	102
4.1.3	Körpergewichtsentwicklung im Versuchsverlauf	104
4.1.4	Verlauf der Körpertemperatur bei den 5 Versuchsgruppen in der postoperativen Phase	106
4.2	Befunde bei der Untersuchung der neurologischen Funktion	109
4.2.1	Sensorik	109
4.2.2	Gitter-Dreh-Test („Rotating-Grid“)	110
4.2.3	Balken-Gleichgewichts-Test („Beam-Balance“)	112
4.2.4	Balken-Lauf-Test („Beam-Walking“)	113
4.2.5	Greif-Zug-Test („Prehensile Traction“)	114
4.3	Befunde beim Blutbild	116
4.4	Befunde zur Serumkonzentration von TNFα	117
4.5	Histologische Befunde	118
4.6	Befunde zum Nachweis von Rezeptor-, Transporter- und Entzündungsproteinen im Gehirngewebe	122
4.6.1	ER α -Expression	123
4.6.2	ER β -Expression	124
4.6.3	EAAT1-Expression	126
4.6.4	GLT-1b-Expression	127
4.6.5	CXCR2-Expression	128
4.6.6	IL-8-Expression	130
4.6.7	iNOS-Expression	131
5	Diskussion	133
5.1	Diskussion der Methoden	133
5.1.1	Zur Eignung der Hormonsubstitution	133
5.1.2	Zur Eignung des Versuchsmodells der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) mit tief hypothermem Kreislaufstillstand (DHCA) bei der Ratte	135
5.1.3	Zur Eignung der telemetrischen Überwachung der Körpertemperatur	136

5.1.4	Zur Eignung der neurologischen Untersuchung.....	137
5.1.5	Zur histologischen Darstellung neuronaler Schäden.....	140
5.1.6	Zur Eignung der Western-Blot-Analyse.....	140
5.2	Diskussion der Ergebnisse	141
5.2.1	Physiologische Befunde	141
5.2.1.1	Endokrine physiologische Befunde.....	142
5.2.1.2	Parametrische physiologische Befunde während der OP-Phase	145
5.2.1.3	Befunde bei der Körpertemperatur.....	147
5.2.2	Sensomotorische neurologische Befunde.....	148
5.2.3	Befunde beim Blutbild	150
5.2.4	Befunde zur Serumkonzentration von TNF α	152
5.2.5	Histologische Befunde	153
5.2.6	Befunde zum Nachweis von Rezeptor-, Transporter- und Entzündungsproteinen im Gehirngewebe	154
5.2.6.1	Expression von ER α und ER β	154
5.2.6.2	Zur Exzitotoxizität: Expression von EAAT1 und GLT-1b.....	156
5.2.6.3	Zur zerebralen Inflammation: Expression von CXCR2, IL-8 und iNOS.....	158
5.3	Abschließende Betrachtung und Ausblick	160
6	Zusammenfassung.....	162
7	Summary	164
8	Literaturverzeichnis.....	166
9	Tabellenverzeichnis.....	188
10	Abbildungsverzeichnis.....	190
11	Abkürzungsverzeichnis	195
12	Danksagung	200

1 Einleitung

Es existieren beim Menschen deutliche Geschlechtsunterschiede bezüglich des Outcomes nach herzchirurgischen Eingriffen, die unter extrakorporaler Zirkulation (EKZ) durchgeführt werden. Frauen schneiden dabei wesentlich schlechter ab als Männer (O'CONNOR et al., 1993; KOCH et al., 2004). Lange führte man dieses schlechtere Ergebnis bei Frauen auf folgende Risikofaktoren zurück: Frauen sind in der Regel bei der Durchführung dieser Eingriffe älter, bringen dadurch mehr Komorbiditäten mit und weisen meist eine kleinere Körperoberfläche sowie einen niedrigeren präoperativen Hämatokrit auf (ALDEA et al., 1999). Diese Risikofaktoren alleine sind aber inzwischen nachgewiesenermaßen nicht die Ursache für die höhere Morbidität, darunter neurologische Ausfälle, und die höhere Mortalität von Frauen während und nach EKZ (HOGUE et al., 2001a; BLANKSTEIN et al., 2005; HEDBERG et al., 2011). Dass die Geschlechtshormone eine Rolle bei den Unterschieden zwischen Frauen und Männern im Outcome nach EKZ spielen, ist inzwischen anerkannt. Welche Rolle dabei gerade den weiblichen Geschlechtshormonen zuzuordnen ist bleibt unklar, wird aber nach wie vor intensiv diskutiert. Die Mehrheit der Frauen, die herzchirurgisch versorgt werden müssen, befindet sich zum Zeitpunkt der EKZ bereits in der Menopause oder in der postmenopausalen Phase. Entsprechend niedrig sind die Serumspiegel weiblicher Geschlechtshormone bei diesen Patientinnen. Zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Studien bescheinigen insbesondere dem 17 β -Östradiol, aber auch dem Progesteron u. a. anti-inflammatorisches und neuroprotektives Potential (LIU et al., 2010; STRAUB, 2007; TAIT et al., 2008). Es war naheliegend, das menopausal bedingte Fehlen dieser Hormone als ursächlich für das höhere Risiko der Frauen im Rahmen von Herzchirurgie mit EKZ einzuschätzen. Jedoch erbrachte eine Substitution mit 17 β -Östradiol bei postmenopausalen EKZ-Patientinnen keine Verbesserung z. B. des postoperativen neurokognitiven Outcomes (HOGUE et al., 2007). Aktuell wird sogar von einer postmenopausalen Hormonersatztherapie bei Eingriffen mit EKZ abgeraten (HILLIS et al., 2011). Und gerade vergleichsweise junge Frauen (50 Jahre und jünger) zeigten in einer klinischen Studie die höchste Mortalität und die meisten neurologischen Komplikationen verglichen mit gleichaltrigen männlichen Patienten (VACCARINO et al., 2002). Offensichtlich sind die Informationen über die Rolle der weiblichen Geschlechtshormone in diesem Zusammenhang noch unzureichend. So wäre z. B. noch zu prüfen, inwiefern 17 β -Östradiol und Progesteron in Kombination oder einzeln das postoperative Outcome nach EKZ beeinflussen, welche Rolle dabei dem Zeitpunkt des

Beginns einer Hormonersatztherapie beizumessen ist und inwiefern sich ein physiologischer Geschlechtshormonstatus von dem durch Hormonsubstitution erreichten Status in den oben genannten Auswirkungen unterscheidet. Für einen Vergleich von prä- und postmenopausalen Herzchirurgie-Patientinnen im Rahmen einer prospektiven klinischen Studie unter Einbindung des jeweiligen Hormonstatus gibt es insgesamt zu wenige prämenopausale Herzchirurgie-Patientinnen. Die meisten der existierenden klinischen Studien zu diesem Thema bedienen sich retrospektiver Analysen von vorhandenen Daten, die jedoch den Hormonstatus der Patientinnen zum Zeitpunkt der herzchirurgischen Versorgung häufig nicht beinhalten. So ist aus humanklinischer Sicht immer noch wenig bekannt über die Wirkung von weiblichen Geschlechtshormonen z. B. auf das postoperative neurologische Outcome und/oder auf die zerebrale Inflammation und die Exzitotoxizität nach EKZ. In einer vorausgegangenen Doktorarbeit (FRIEDRICH, 2013) wurden unter Verwendung eines etablierten – auch in vorliegender Arbeit eingesetzten – Versuchsmodells mittels männlicher und weiblicher Ratten (kastriert und intakt) postoperative neurologische und neurokognitive Funktionen sowie die Gehirnmorphologie untersucht. Dabei zeigten die weiblichen Tiere eine bessere postoperative motorische Funktion und ihre Gehirne histomorphologisch weniger Schäden als die der männlichen Tiere. Es wurde aber auch eine auffällig hohe Ausfallrate bei den weiblich intakten Tieren im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen beobachtet (FRIEDRICH, 2013; KELLERMANN et al., 2013). In der Diskussion der Vorgängerstudie wurden einige Gesichtspunkte als besonders relevant für einen Fortschritt im Verständnis der Hintergründe der höheren Morbidität und höheren Mortalität bei Frauen während und nach EKZ erachtet: Eine differenzierte Darstellung der Wirkung von 17 β -Östradiol und von Progesteron bei den weiblichen Tieren; eine postoperative Überwachung und Erfassung der Vitalwerte sowie eine rechtzeitige Entnahme der Gehirne von Tieren, bei denen eine Euthanasie aufgrund sehr schlechten Allgemeinbefindens unvermeidbar ist; die Untersuchung weiterer Aspekte der zerebralen Pathophysiologie bei den Versuchstieren nach EKZ mit 45 min DHCA.

Die vorliegende Studie hat es sich deshalb zum Ziel gesetzt, in einem etablierten und bewährten Rattenmodell den Einfluss von 17 β -Östradiol und/oder Progesteron auf das neurologische Outcome *in vivo*, auf die Gehirnmorphologie post mortem sowie auf die zerebrale Inflammation und Exzitotoxizität *in vitro* nach herzchirurgisch typischer extrakorporaler Zirkulation mit 45 min tief hypothermem Kreislaufstillstand zu untersuchen.

2 Schrifttum

2.1 Das Gehirn

Das Gehirn, neben dem Rückenmark Bestandteil des Zentralnervensystems (ZNS), stellt das komplexeste und vielschichtigste Organ der Säugetiere und damit auch des Menschen dar. Aufgebaut aus bis zu einer Billion Nervenzellen ist es Voraussetzung für Bewusstsein, kognitive Fähigkeiten, Spezies-typisches Verhalten, Emotionen, Fortpflanzung, zielgerichtete Bewegung und Koordination des Körpers sowie lebenserhaltende Körperfunktionen (THOMPSON, 2001).

Die primäre evolutionäre Entwicklung des Gehirns lässt sich heute unter Betrachtung unterschiedlicher primitiver Tierstämme nachvollziehen: von Tieren wie beispielsweise Schwämmen, die überhaupt kein Nervensystem besitzen, über Seeanemonen und Quallen mit Nervensystemen in Form einfacher Nervennetze, bis hin zum Regenwurm. Dieser besitzt bereits Nervenzellansammlungen in Form von Ganglien mit afferenten sensorischen und efferenten motorischen Neuronen sowie ein vergrößertes und übergeordnetes Kopf- oder Oberschlundganglion, den Beginn eines Gehirns (THOMPSON, 2001). Man spricht in Bezug auf die Phylogenese dann von der sog. „Zephalisation“, das heißt ein großer Teil des zentralen Nervensystems wird im Kopfbereich zusammengefasst (STOFFEL, 2011).

Im weiteren evolutionären Verlauf ist mit der Ausbildung leistungsfähiger Kopfsinnesorgane (Riech-, Seh-, Gleichgewichts- und Hörorgane) in der Wirbeltierreihe die Voraussetzung für eine Weiterentwicklung der Gehirnanlage, ihren zunehmenden Ausbau sowie eine Vervollkommnung des Gehirnes geschaffen. Schon bei den Rundmäulern (Zyklostomen) sind der grundsätzliche Bauplan des Wirbeltiergehirns und seine lineare Gliederung in Nachhirn, Hinterhirn, Mittelhirn, Zwischenhirn und Endhirn (auch Großhirn) festgelegt. Lediglich die Ausprägungen einzelner Gehirnabschnitte erfahren in aufsteigender evolutionärer Reihe einige Veränderungen: Während bei den Fischen noch das primäre Hinterhirn und das Mittelhirn gegenüber den beiden Vorderhirnabschnitten dominieren, ist bei den Reptilien erstmals das Endhirn besonders ausgeprägt (NICKEL et al., 2004).

Bei den Säugetieren ist der neu ausgebildete und sehr große Neokortex des Großhirns die vorherrschende Struktur des Gehirns und somit das Kennzeichen dieser Klasse (HILDEBRAND und GOSLOW, 2004). Vor allem die Großhirnrinde mit dem anteiligen

Neokortex ist für Bewusstsein, Sensorik, Motorik, Kognition und Sprache des Menschen bedeutsam. Sie stellt damit eine grundlegende anatomische Struktur für die genannten menschlichen Leistungen dar (THOMPSON, 2001).

Funktionell agiert das Gehirn in Verbindung mit dem Rückenmark als übergeordnetes Zentrum. Es erhält die Informationen, die von Rezeptoren in der Peripherie erfasst werden, über afferente Bahnen. Nach Verarbeitung dieser Informationen steuern die efferenten Leitungsbahnen ausgehend von Gehirn und Rückenmark die Effektoren in den zu versorgenden Gebieten. Die Afferenz und Efferenz von Information zum ZNS geschieht durch periphere Nerven, Nervengeflechte (Plexus) und Ganglien, welche als peripheres Nervensystem (PNS) zusammengefasst werden. Die Reizbeantwortung, die grundlegende Aufgabe des Nervensystems, ist nur durch die Erregbarkeit von Rezeptoren und Nervenzellen sowie die elektrische Leitfähigkeit der Nervenzellfortsätze (Axone) möglich (STOFFEL, 2011).

2.1.1 Anatomie und Ontogenese

Bei den Haussäugetieren und beim Menschen liegt das Gehirn in der knöchernen Schädelhöhle. Es wird von den drei Hirnhäuten Pia mater, Arachnoidea und Dura mater umhüllt und ist von Zerebrospinalflüssigkeit (Liquor cerebrospinalis) umgeben. Oberflächlich betrachtet lässt sich das Gehirn grob in drei Abschnitte einteilen: Großhirn (Cerebrum), Kleinhirn (Cerebellum) und Hirnstamm (Truncus encephali). Der innere Aufbau wird bei einem Schnitt durch die Sagittalebene deutlich: Groß- und Kleinhirn haben jeweils eine äußere graue Rindenschicht und einen inneren weißen Markkörper (NICKEL et al., 2004).

Die Embryonalentwicklung des Zentralnervensystems beginnt mit Induktion des Ektoderms, welches nachfolgend die Neuralplatte und schließlich das Neuralrohr ausbildet. Aus dem vorderen Abschnitt des Neuralrohres entwickelt sich nach Wachstums- und Differenzierungsvorgängen das sogenannte „Dreibläschenstadium“ des embryonalen Gehirns. Ab diesem Zeitpunkt lässt sich die Gehirnanlage in Vorderhirn (Prosencephalon), Mittelhirn (Mesencephalon) und Rautenhirn (Rhombencephalon) einteilen. Aus dem Vorderhirn wachsen die paarigen Endhirnbläschen aus, welche die Anlagen des Endhirns (Telencephalon) und damit der adulten Großhirnhemisphären darstellen. Aus dem verbleibenden Teil des Vorderhirns entsteht das Zwischenhirn (Diencephalon). Das Mittelhirn bleibt zunächst ohne große Veränderungen. Aus dem Rautenhirn bilden sich im weiteren Verlauf der Entwicklung das Hinterhirn (Metencephalon) mit der Anlage des Kleinhirns und

der Brücke (Pons) sowie das Nachhirn (Myelencephalon) mit der Anlage des verlängerten Marks (Medulla oblongata) (RÜSSE und SINOWATZ, 2008).

Auch anatomisch lässt sich das adulte Gehirn in die fünf Hauptabschnitte Nachhirn (Myelencephalon), Hinterhirn (Metencephalon), Mittelhirn (Mesencephalon), Zwischenhirn (Diencephalon) und Endhirn (Telencephalon) einteilen (KÖNIG et al., 2005).

Aus dem zentralen Hohlraum der Gehirnanlage, dem Neurozoel, entstehen untergliederte Hohlräume: die Ventrikel. Hierbei können jeweils ein Ventrikel in den beiden Hemisphären des Endhirns (I. und II. Ventrikel), ein Ventrikel im Zwischenhirn (III. Ventrikel) und ein Ventrikel in Nach – und Hinterhirn (IV. Ventrikel) unterschieden werden. Der röhrenförmige Hohlraum innerhalb des Mesencephalons wird als Zentralkanal (Aquaeductus cerebri) bezeichnet (HILDEBRAND und GOSLOW, 2004).

Während im Rückenmark die Nervenzellkörper in der grauen Substanz als durchgehende dorsale oder ventrale Säulen organisiert sind, bilden sie im Gehirn zum einen die Rindenschichten (Cortices) von Groß- und Kleinhirn und zum anderen funktionell und räumlich getrennte Kerngebiete, auch Nuklei genannt. Diese Nuklei sind Zentren der Koordination und Assoziation. Sie können eingehende Impulse sofort verarbeiten oder verändern und an weitere Kerne oder höhere Zentren wie zum Beispiel den zerebralen Kortex weiterleiten, je nach Komplexität der Antwortstruktur. Für die Verarbeitung jeglicher Information, die Kommunikation zwischen verschiedenen Anteilen des Gehirns und zwischen Gehirn und Rückenmark ist eine enorme Anzahl an Nervenfaserbündeln notwendig, die je nach anatomischer Ausprägung als Trakte, Faszikuli oder Pedunkel bezeichnet werden. Querverbindungen von Nervenfasern, die Gehirnareale der einen Seite mit entsprechenden Gebieten der anderen Seite des Gehirns verbinden, werden Kommissuren genannt und sind für die Integration der Informationsverarbeitung aus beiden Körperhälften zuständig (HILDEBRAND und GOSLOW, 2004).

2.1.2 Zerebrale Geschlechtsdimorphismen

In Forschungsgebieten wie der Neuroanatomie, Neurophysiologie oder der Verhaltenskunde wird das Gehirn von Mensch und Tier auch in der heutigen Zeit noch sehr oft als ein Organ ohne „geschlechtliche Identität“ dargestellt. Tatsächlich gibt es aber bei weiblichem und männlichem Gehirn durchaus Unterschiede in Entwicklung, Aufbau, Form und Funktion (CAHILL, 2006).

Bereits 1966 erschien in der Zeitschrift „Scientific American“ ein Artikel des amerikanischen Wissenschaftlers Seymour Levine, in dem er sowohl die Ergebnisse von Forscherkollegen zusammenfasste als auch seine eigenen Erkenntnisse zur geschlechtlichen Differenzierung des Gehirns der Ratte in einer frühen Entwicklungsphase nach der Geburt veröffentlichte (LEVINE, 1966). LEVINE's Hauptaugenmerk richtete sich dabei auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. Mithilfe einer einmaligen Injektion von Testosteron-Propionat bei neugeborenen Rattenweibchen und einer Kastration bei neugeborenen Rattenmännchen konnte er zeigen, dass Testosteron in der frühen postnatalen Entwicklung des Gehirns einen entscheidenden und prägenden Effekt aufweist. Die einmalig mit Testosteron behandelten Weibchen zeigten im weiteren Verlauf ihrer Entwicklung ein männliches Fortpflanzungsverhalten, ihre Ovarien waren verkümmert und es war kein Ovulationszyklus festzustellen. Selbst mit einer Substitution von Östrogen und Progesteron ließ sich bei diesen Weibchen kein weiblicher Sexualzyklus mehr induzieren. Die früh kastrierten Männchen zeigten nach Verabreichung kleiner Dosen Östrogen und Progesteron weibliches Sexualverhalten und entwickelten nach Implantation weiblicher Ovarien sogar einen physiologischen weiblichen Ovarialzyklus. Mit seiner Arbeit zeigte Levine also schon vor fast einem halben Jahrhundert, dass das Geschlecht und die damit verbundenen Geschlechtshormone ganz eindeutig einen dauerhaften Einfluss auf Strukturen im Gehirn, in diesem Fall den Hypothalamus, haben.

Auch neuere Studien bestätigen LEVINE's (1966) Ergebnisse bezüglich der prägenden Eigenschaften von Geschlechtshormonen bei der Gehirnentwicklung. Hier spricht man dann vom „organisatorischen Effekt“ der gonadalen Steroidhormone zum Beispiel im sog. „Nucleus suprachiasmaticus“ des Hypothalamus, der die zirkadiane Rhythmik von Körpertemperatur, Aktivität und Hormonsekretion steuert. Dieser „Nucleus suprachiasmaticus“ erhält – ebenfalls durch postnatale Einwirkung von Testosteron bei der Ratte – eine nicht aufzuhebende typisch männliche Prägung der zirkadianen Körpertemperaturschwankungen (ZULOAGA et al., 2009). Auch in Studien zu räumlichem Denken und Lernen (WILLIAMS et al., 1990) und zur Expression von Vasopressin-Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) im Bettnukleus der Stria terminalis (HAN und DE VRIES, 2003) konnten dauerhafte modulierende Einwirkungen von Geschlechtshormonen im Gehirn festgestellt werden.

Neben diesen organisatorischen und prägenden Einflüssen der Geschlechtshormone auf die Gehirnentwicklung und -funktion, die schon sehr früh prä- oder postnatal initiiert werden,

wurden lange Zeit auch sogenannte „aktivierende Effekte“ propagiert. Diese Effekte sollen auch im adulten Individuum, aber nur kurzfristig und reversibel in Abhängigkeit des Hormonspiegels, Auswirkungen auf zerebrale Strukturen haben, zum Beispiel im Rahmen des Sexualverhaltens (DAVIDSON, 1966; POWERS, 1972; FEDER, 1984). Mittlerweile ist allerdings bekannt, dass diese Einteilung zu sehr vereinfacht und somit weitgehend überholt ist, da Geschlechtshormone auch noch im adulten Gehirn deutlich nachweisbare morphologische Veränderungen bewirken können (GÜNTÜRKÜN und HAUSMANN, 2007). So sind z. B. beim Menschen regionale Volumenunterschiede der grauen Substanz im adulten Kortex von zirkulierenden Sexualhormonen nachmessbar beeinflusst (WITTE et al., 2010). Bei der adulten Ratte ist das Volumen der posteros dorsalen medialen Amygdala erheblich von zirkulierenden Androgenen abhängig und der Geschlechtsunterschied im Volumen dieser Struktur kann durch Kastration erwachsener Tiere ausgeglichen werden (COOKE et al., 1999).

Unterschiede in Gehirngröße und -gewicht, sowohl interindividuell als auch geschlechtsvergleichend, sind für die Wissenschaft schon seit Mitte des 19. Jahrhunderts von Bedeutung. So machte der französische Neurologe Paul Broca bereits 1861 anhand volumetrischer Messungen die Beobachtung, dass das männliche Gehirn größer und schwerer ist als das weibliche Gehirn (GÜNTÜRKÜN und HAUSMANN, 2007). MRT-Untersuchungen konnten diese Beobachtung von Broca bestätigen (COSGROVE et al., 2007). Weiterhin wurde bei diesen Untersuchungen festgestellt, dass Männer einen höheren Prozentsatz an weißer und Frauen einen höheren Anteil an grauer Substanz im Gehirn aufweisen (SCHLAEPFER et al., 1995; GUR et al., 1999; COSGROVE et al., 2007; LEONARD et al., 2008).

Durch den Vergleich von der Größe nach aufeinander abgestimmten Männer- und Frauengehirnen (d. h. vergleichsweise große Frauengehirne und eher kleine Männergehirne) mithilfe einer „Brain Mapping“-Datenbank konnten LUDERS et al. (2009) nachweisen, dass der höhere Anteil an grauer Substanz in Frauengehirnen keine Eigenart kleiner Gehirne generell, sondern ein tatsächlicher geschlechtsspezifischer Unterschied ist (LUDERS et al., 2009).

Zahlreiche weitere Sexualdimorphismen im Gehirn sind mittlerweile bekannt, werden aber kontrovers diskutiert und in vielen Studien weiter hinterfragt. Im Mittelpunkt der Kritik steht oft die Frage nach bestimmten Korrelationen, zum Beispiel zwischen Gehirnvolumen und Körpergröße oder zwischen der Größe von Einzelstrukturen und den Gesamtausmaßen des

Gehirns. Da Männer z. B. etwa 10 % mehr Gehirnvolumen als Frauen aufweisen, sind ohne statistische Anpassung fast alle Strukturen in Männergehirnen größer (GIEDD et al., 2012). Als Fehlannahme inzwischen widerlegt ist ein Zusammenhang zwischen Körpergröße und der Größe des Gehirns (RAZ et al., 2004). Abhängigkeiten zwischen Variablen wie Gesamtausmaß des Gehirns und Größe der Einzelstrukturen können mittlerweile durch statistische Methoden (O'BRIEN et al., 2006) oder durch eine in Volumen und Größe vergleichbare Auswahl in Datenbanken (LUDERS et al., 2009) weitgehend ausgeschlossen werden.

Dagegen wird immer noch diskutiert, ob der Hirnbalken (Corpus callosum) geschlechtsdifferenziert strukturiert ist. Der Hirnbalken stellt die größte Ansammlung von Kommissuralfasern im Gehirn dar und verbindet damit Rindenbezirke der linken und rechten Großhirnhälfte (KÖNIG et al., 2005). Bereits 1982 stellten DELACOSTE-UTAMSING und HOLLOWAY (1982) an aus Leichen entnommenen Gehirnen eine relativ größere (d. h. relativ zur Gesamtgröße des Gehirns) mittlere sagittale Schnittfläche des Hirnbalkens bei Frauen fest. Vor allem der posteriore Anteil des Hirnbalkens, das sog. „Splenum“, schien hierbei in weiblichen Gehirnen größer und rundlicher zu sein (DELACOSTE-UTAMSING und HOLLOWAY, 1982). Aufgrund des insgesamt größeren Gehirns bei Männern ist entsprechend auch der Hirnbalken bei Männern absolut größer (BISHOP und WAHLSTEN, 1997). In einer Metaanalyse von 49 Studien stellten BISHOP und WAHLSTEN (1997) jedoch keinen signifikanten relativen Größenunterschied bei den Hirnbalken von Frauen und Männern fest. Allerdings führt SMITH (2005) die Ergebnisse von BISHOP und WAHLSTEN (1997) auf eine Fehlinterpretation statistischer Verhältniszahlen zurück. Er kommt in seiner eigenen Metaanalyse von 21 Studien vor dem Jahr 2003 zu dem Ergebnis, dass die mittlere sagittale Schnittfläche des Hirnbalkens der Frau tatsächlich größer ist als die des Mannes (SMITH, 2005). In einer 2012 veröffentlichten Studie wurde mithilfe von MRT-Bildern die sagittale Schnittfläche des Hirnbalkens vermessen. Dabei zeigte sich ebenfalls eine signifikant größere Fläche bei Frauen (ARDEKANI et al., 2012).

Es ist unstrittig, dass sich – egal ob Mensch oder Tier – männliche und weibliche Individuen in ihrem Verhalten unterscheiden. Für die Prägung des Verhaltens spielt der organisierende Einfluss der Geschlechtshormone vor und um den Zeitpunkt der Geburt eine wichtige Rolle. So lässt sich mit einer Frühkastration bei männlichen Nagern das männliche Sexualverhalten später im Leben reduzieren und in ein eher weibliches Verhalten abwandeln (KIMURA, 1992).

Aber nicht nur das Sexualverhalten, sondern auch kognitive Fähigkeiten unterscheiden sich zwischen den Geschlechtern. Bei der Lösung von bestimmten Problemen unter Laborbedingungen schneiden Männer grundsätzlich bei räumlicher Orientierung, mathematisch logischem Denken, dem Folgen einer zuvor gelernten Route und den zielgerichteten motorischen Fähigkeiten besser ab als Frauen. Frauen dominieren dagegen bei sprachlichen Tests, beim Erinnern von Worten und bei feinmotorischen Aufgaben. Weiterhin schneiden Frauen beim Erlernen einer Route zwar insgesamt schlechter ab, jedoch merken sie sich mehr Orientierungspunkte – wie zum Beispiel Gebäude – als Männer (KIMURA, 1992). Auch Schwankungen im Sexualhormonspiegel können kognitive Leistungen beeinträchtigen. So schnitten Frauen bei Tests zur Raumkognition während der Menstruation besser ab als in der mittlutealen Phase mit hohen Progesteron- und Östradiolspiegeln (HAMPSON und KIMURA, 1988). Vergleichsweise hohe Testosteronspiegel hatten bei Probandinnen deutlich positive, hohe Östradiolspiegel negative Auswirkungen auf die Leistungen beim sog. „Mentalen Rotationstest“, ebenfalls ein Testverfahren zur räumlichen Kognition (HAUSMANN et al., 2000).

Immer mehr rücken nun auch die funktionellen Aspekte der anatomischen Unterschiede zwischen weiblichem und männlichem Gehirn in den Fokus der Neurowissenschaften. Es ist mittlerweile bekannt, dass Gehirnvolumen und allgemeine kognitive Leistungsfähigkeit positiv korrelieren (ANDREASEN et al., 1993; LYNN, 1994; RUSHTON und ANKNEY, 1996). Da Männer ein größeres Gehirn und auch eine höhere neuronale Dichte und Neuronenzahl im Kortex besitzen (RABINOWICZ et al., 1999), wird Männern in verschiedenen Untersuchungen eine höhere Intelligenz unterstellt. Verschiedene Verfahren und Tests zur Bestimmung des Intelligenzquotienten bei Probandengruppen untermauern diese These (LYNN, 1994; JACKSON und RUSHTON, 2006; NYBORG, 2005). Andere Studien hingegen können mit ähnlichen IQ-Tests keinen Hinweis für Unterschiede in der allgemeinen Intelligenz von Frauen und Männern zeigen (COLOM et al., 2000; HALPERN und LAMAY, 2000; VAN DER SLUIS et al., 2006).

Die Informationsverarbeitung in Gehirnen von Frauen und Männern unterscheidet sich. So ist das männliche Gehirn stärker lateralisiert als das weibliche: Räumliche und verbale kognitive Fähigkeiten sind bei ihnen relativ strikt auf die beiden Hemisphären verteilt, während Frauen diese Spezialisierung weniger aufweisen (MCGLONE, 1980; SHAYWITZ et al., 1995). Ein Einfluss der unterschiedlichen Morphologie des Hirnbalkens bei Frauen und Männern auf diese Lateralisation wäre denkbar. So könnte z. B. ein größerer Hirnbalken bei der Frau eine

bessere Verknüpfung der beiden Gehirnhälften bedeuten. Dieser Zusammenhang ist allerdings noch nicht vollständig geklärt (HINES et al., 1992). Der höhere relative Anteil grauer Substanz im weiblichen Gehirn könnte wiederum einen Ausgleich für das absolut kleinere Gehirn der Frau darstellen. Ein Überwiegen der Informationsverarbeitung gegenüber der Informationsweiterleitung im weiblichen Gehirn ist vorstellbar (GUR et al., 1999). Die unterschiedliche räumliche Verteilung und das unterschiedliche Volumen der grauen Substanz im Gehirn im Geschlechtervergleich als Erklärung für bestimmte männliche und weibliche kognitive Fähigkeiten muss aber noch weiter erforscht werden (LUDERS et al., 2009).

2.1.3 Zerebrale Ischämie

Das Gehirn ist ein Organ mit außerordentlicher Leistungsfähigkeit, entsprechend angepasst ist sein Energiebedarf.

Obwohl das Gehirn nur etwa 1–2 % des gesamten Körpergewichts ausmacht, beansprucht es durch seinen intensiven Stoffwechsel ca. 15 % des gesamten Herzzeitvolumens und damit im Vergleich zu anderen Organen einen sehr großen Anteil an Nähr- und Sauerstoff (HERMANN, 2010).

Die Blutversorgung des Gehirns wird von insgesamt vier Arterien gewährleistet, der paarigen inneren Halsschlagader (A. carotis interna) sowie den beiden Vertebralarterien (Aa. vertebrales). Diese vier Hauptarterien bilden an der Schädelbasis miteinander verbunden einen Arterienring (Circulus arteriosus Willisii), wobei die Vertebralarterien sich im anterioren Bereich des verlängerten Marks zur Hirnbasisschlagader (A. basilaris) vereinigen (siehe Abb. 01) (HACKE, 2010).

2.1.3.1 Fokale Ischämie

Bei der fokalen Ischämie, auch als Schlaganfall, Hirninfarkt oder Apoplexie bezeichnet, wird die Durchblutung eines begrenzten Hirnareals entweder durch den plötzlichen Verschluss einer zuleitenden Arterie oder durch eine Hirnblutung gestört. Mehrheitlich (zu 80 %) kommen ischämische Schlaganfälle vor, die aufgrund von Thrombenbildung oder kardialen Embolien in zerebralen Arterien entstehen (THEWS et al., 2007).

Bei hämorrhagischen Schlaganfällen, die hauptsächlich durch eine Blutung aus atherosklerotisch veränderten Arterien entstehen (THEWS et al., 2007) ereignet sich die ischämische Schädigung des Gehirngewebes erst sekundär aufgrund des mit dem zusätzlichen Volumen ansteigenden intrakraniellen Druckes (REITMEIR und HERMANN, 2010).

Das ischämische Gebiet lässt sich einteilen in einen zentralen Bereich, den sog. „Infarktkern“, in dem die Durchblutung weitgehend unterbrochen ist, und einen Randbereich, in dem noch eine Restdurchblutung vorhanden ist. Bei diesem ringförmigen Randbereich um das Zentrum der neuronalen Schädigung spricht man von der sog. „Penumbra“, auch „ischämischer Halbschatten“ genannt (ASTRUP et al., 1981). Während im Gehirn unter physiologischen Bedingungen ein Blutfluss von etwa 50 ml/100 g/min herrscht, liegt er im Infarktkern bei weniger als 10 ml/100 g/min und in der Penumbra zwischen 10 und 20 ml/100 g/min (REITMEIR und HERMANN, 2010). Die Art des neuronalen Untergangs unterscheidet sich zwischen Infarktzentrum und dem Randbereich. Im energetisch stark unterversorgten Infarktkern herrscht die ischämische Nekrose als passive, nicht energieabhängige und frühe Form des Zelltodes vor. In der noch etwas durchbluteten Penumbra hingegen, ist zeitabhängig die Apoptose, also der programmierte Zelltod, Ursache für das Neuronensterben (PADOSCH et al., 2001). Die Intensität und Dauer der Durchblutungsstörung sind ausschlaggebend für die Entwicklung des zerebralen Gewebeschadens. So führt auch eine vorerst reversible Einschränkung der neuronalen Funktion durch einen noch akzeptablen Blutfluss über einen längeren Zeitraum letztlich doch zum Untergang der Penumbra (HACKE, 2010). Eine kürzere ischämische Episode kann über einen längeren postischämischen Zeitraum in einer ähnlichen Infarktbildung resultieren wie eine längere zerebrale Ischämie nach kurzer Zeit (DU et al., 1996).

2.1.3.2 Globale Ischämie

Die globale zerebrale Ischämie betrifft im Gegensatz zum ischämischen Schlaganfall das gesamte Gehirn und entsteht durch einen signifikanten Abfall oder eine gänzliche

Unterbrechung der Hirndurchblutung z. B. im Rahmen eines Herzstillstandes, bei Kammerflimmern, im Schock oder bei schwierigen herzchirurgischen Eingriffen, unter anderem auch im Zusammenhang mit der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) (HARUKUNI und BHARDWAJ, 2006).

Im Vergleich zur fokalen zerebralen Ischämie gibt es bei dieser generalisierten Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen keinen singulären bzw. abgrenzbaren zerebralen Schaden, sondern ein absehbares Schädigungsmuster in Abhängigkeit von der Dauer der Ischämie (BHARDWAJ et al., 2003). Dem zu Grunde liegen Studien, die im Tierversuch an der Ratte zu unterschiedlichen Zeiten einer globalen zerebralen Ischämie die Schädigung unterschiedlicher Neuronenpopulationen untersucht haben (PULSINELLI et al., 1982; PETITO und PULSINELLI, 1984). Als am empfindlichsten stellten sich bei PULSINELLI et al. (1982) nach 10-minütiger globaler Ischämie die Ammonshorn-Region 1 (Cornu-ammonis-Region 1, CA1) des Hippokampus und der paramediane Hippokampus dar. In der Gesamtauswertung (10-, 20-, und 30-minütige globale Ischämie) folgten mit abnehmender Empfindlichkeit die Hippokampusregionen CA3-5, die neokortikalen Schichten 3, 5 und 6 und die kleinen bis mittelgroßen Neurone des Striatums. In diesem Zusammenhang etablierte sich der Begriff der „selektiven Vulnerabilität“ gewisser neuronaler Populationen mit regional unterschiedlichen Schädigungsbildern im Gehirn (SCHOLZ, 1963).

Unabhängig von der individuellen Empfindlichkeit einzelner Neuronengruppen gibt es allerdings pathophysiologische Mechanismen, die in diesem Fall auf alle Nervenzellen des Gehirns zutreffen:

2.1.3.2.1 Azidose

Zur Deckung des Energiebedarfs verbraucht das Gehirn etwa 20 % der im Körper verfügbaren Glukose. Durch aerobe Glykolyse und anschließenden Zitratzyklus entsteht im zerebralen Energiestoffwechsel Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) (REITMEIR und HERMANN, 2010). Bei einem Sauerstoffmangel infolge einer nicht ausreichenden Durchblutung kommt es durch ein Umschalten von aerober Energiegewinnung auf die anaerobe Glykolyse zu einem Abfall des ATP-Spiegels und zu einem Anstieg von Laktat im Gehirn (THEWS et al., 2007). Der intrazelluläre pH-Wert kann bei vollständiger Ischämie auf 6,5 bis 6,2, bei einer vorher bestehenden Hyperglykämie sogar auf Werte unter 6,0 absinken (KEMPSKI, 2000). Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass höhere Ausgangswerte im Blutglukosespiegel vor einem ischämischen Ereignis mit einer vermehrten Laktatbildung

im Gehirn und damit auch mit einer ausgeprägten Azidose einhergehen. Dadurch wurde ein Zusammenhang zwischen zerebraler Azidose, einer weniger guten Erholung sowie vermehrten neurologischen Ausfällen nach einer ischämischen Schädigung vermutet (WELSH et al., 1980; REHNCRONA et al., 1981; CHOPP et al., 1987). Als Grund für einen verstärkten ischämischen Zellschaden im Rahmen einer Gewebsazidose wird dabei eine begünstigte Bildung von freien Radikalen und Entzündungsmediatoren im sauren Milieu diskutiert (KATSURA, 1997). Auch eine azidotische Schädigung von Membranproteinen und Enzymen mit nachfolgenden ödematösen Veränderungen an allen zerebralen zellulären Strukturen ist möglich (WERNER, 2000).

2.1.3.2.2 Glutamat, Exzitotoxizität und die Rolle des Kalziums

Glutamat spielt als exzitatorischer Neurotransmitter eine wichtige Rolle bei der synaptischen Übertragung im zentralen Nervensystem von Mensch und Tier. Über ionotrope und metabotrope Rezeptoren hat es in über 50 % der Synapsen des Gehirns Anteil an der Signalübertragung. Zu den im Rahmen der zerebralen Ischämie bedeutsamen ionotropen Rezeptoren für Glutamat zählen die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA-), α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat (AMPA-) und Kainatrezeptoren. Die AMPA- und Kainatrezeptoren sind bei der Bindung von Glutamat durch eine schnelle erregende Wirkung auf die postsynaptische Membran über den Einstrom von Natrium- und Kaliumionen charakterisiert. NMDA-Rezeptoren sind bei einem Ruhemembranpotential von Magnesiumionen blockiert und werden erst verzögert durch die Aktivität an anderen Synapsen und eine nachfolgende Depolarisation der Zellmembran funktionsfähig. Dann sind sie im Besonderen auch für Kalziumionen durchlässig, wodurch ihnen bei der Exzitotoxizität eine besondere Rolle zukommt (MÜLLER und KAUPP, 2009).

Der Begriff der „Exzitotoxizität“ wurde 1969 von OLNEY geprägt (OLNEY, 1969) und definiert die neuronale Schädigung durch sog. „exzitatorische Aminosäuren“, zu denen auch das Glutamat zählt. In der Anfangsphase einer zerebralen Ischämie kommt es mit zunehmendem Abfall von ATP zu einem Energiemangel und damit auch zu einem Ausfall der für die neuronale Funktion essentiellen energieabhängigen Ionenpumpen. Das Versagen dieser Ionenpumpen führt zu einem Einstrom von Natrium und Chlorid in die Nervenzelle, während Kalium vorwiegend ausströmt. Die dadurch ausgelöste Depolarisation der Zellmembran führt zur Aktivierung von spannungsabhängigen Ionenkanälen, wie z. B. Kalziumkanälen und zu einer Freisetzung von Glutamat aus präsynaptischen Endigungen (WERNER, 2000). Während unter physiologischen Bedingungen Glutamat aus dem

synaptischen Spalt durch Glia- und Nervenzellen energieabhängig mithilfe von Glutamattransportern entfernt wird, wird dies bei zunehmendem Energiemangel weitgehend unmöglich. Das im extrazellulären Raum akkumulierende Glutamat kann an AMPA- und Kainatrezeptoren binden, was wiederum zu Depolarisationen der Zellmembranen führt. An depolarisierten Membranen werden dann auch die NMDA-Rezeptoren durch Glutamat aktiviert, was zu einem Einstrom von Kalzium- (Ca^{2+} -)Ionen in die Nervenzelle führt (KEMPSKI, 2000). In Kombination mit der Aktivierung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle kommt es insgesamt zu einem erheblichen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle. Ca^{2+} -Ionen erfüllen physiologischerweise als sog. „Second Messenger“ wichtige Funktionen in der Zelle. So sind dann bei einem Überangebot an Ca^{2+} -Ionen auch beispielsweise Genexpression, Proteinsynthese, mitochondrialer Stoffwechsel und die Funktion zahlreicher Enzyme gestört (KEMPSKI, 2000).

2.1.3.2.3 Oxidativer Stress und freie Radikale

Freie Radikale sind Moleküle mit einem oder mehreren ungepaarten Valenzelektronen, die – extrem reaktionsfreudig – andere Moleküle wie z. B. Desoxyribonukleinsäure („Deoxyribonucleic acid“, DNA) oder Lipide oxidieren und damit schädigen. Bei der zerebralen Ischämie sind vor allem reaktive Sauerstoffspezies („Reactive oxygen species“, ROS) wie das Superoxid-Anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), das Hydroxyl-Radikal ($\text{HO}\cdot$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) von pathophysiologischer Bedeutung (CHEN et al., 2011).

Am isolierten Gehirn konnte gezeigt werden, dass diese ROS auch unter physiologischen Bedingungen von ca. 2–5 % der transportierten Elektronen in Mitochondrien produziert werden (BOVERIS und CHANCE, 1973). Diese ständig erzeugten Sauerstoffradikale werden allerdings unter physiologischen Bedingungen wirkungsvoll von antioxidativen Enzymen (z. B. Superoxid-Dismutase [SOD], Glutathion-Peroxidase [GSH-Px] und Katalase) und Antioxidantien (z. B. Glutathion, Ascorbinsäure, Vitamin E) neutralisiert (CHAN, 1996). Während der Reperfusion eines ischämischen Bereiches im Gehirn sind diese Schutzmechanismen jedoch durch eine vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen und den Verbrauch antioxidativer Verbindungen gestört (CHEN et al., 2011). Mithilfe von Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass schon während der Phase der Ischämie durch eine Hemmung der Zellatmung in den Mitochondrien vermehrt ROS gebildet werden (ABRAMOV et al., 2007). Diese ROS können durch direkte Schädigung von zellulären Makromolekülen, aber auch über indirekte Signalübermittlung zum neuronalen Zelltod führen (CHAN, 2001). So kann z. B. der Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor Kappa B (NF- κ B),

der eine zentral wichtige Rolle im Inflammationsgeschehen spielt, von Sauerstoffradikalen aktiviert werden (SCHRECK et al., 1991).

2.1.3.3 Zerebrale Ischämie und Geschlecht

Mit zunehmenden Erkenntnissen über die Ursachen und pathophysiologischen Hintergründe der zerebralen Ischämie steigt auch das Interesse der Wissenschaft an der Bedeutung des chromosomalen Geschlechts bei diesen Erkrankungen. Besonders im Rahmen der Schlaganfallforschung werden derzeit neue Möglichkeiten für ein geschlechterspezifisches Verständnis von Durchblutungsstörungen des Gehirns untersucht (BUSHNELL et al., 2006).

In Deutschland sind ca. 200.000–250.000 Menschen jährlich von einem Schlaganfall betroffen, wobei die Mortalität in den ersten vier Wochen etwa 10–15 % beträgt. Weltweit steht der Schlaganfall auf Platz 2 der Todesursachenstatistik (WHO, 2013) und ist daneben als häufigste Ursache für Arbeitsunfähigkeit auch von enormer wirtschaftlicher Bedeutung (HACKE, 2010). Die Epidemiologie des Schlaganfalls unterscheidet sich ganz erheblich zwischen den Geschlechtern. Grundsätzlich haben Frauen eine – altersangepasst – geringere Schlaganfallinzidenz als Männer und weisen hierbei auch eine geringere Mortalität auf (CARANDANG et al., 2006; REEVES et al., 2008). Das Risiko, einen ischämischen Schlaganfall zu erleiden, ist dabei wohl nicht ausschließlich von Geschlechtshormonen abhängig. So korreliert auch bei Kindern vor der Pubertät weibliches Geschlecht mit einer verminderten Inzidenz des Schlaganfalls (GOLOMB et al., 2009). Inwiefern und ob die weiblichen Sexualhormone eine Rolle bei der Neuroprotektion spielen, wird in Abschnitt 2.2.1.2 näher erläutert. Es gibt allerdings Hinweise, dass es bei männlichem und weiblichem Geschlecht besonders auf neuronaler Ebene unterschiedliche zelluläre Überlebensmechanismen gibt, die unabhängig von geschlechtshormonellen Einflüssen sind. So konnte in Zellkulturen von männlichen und weiblichen kortikalen Neuronen der Ratte ein vermehrtes Überleben von weiblichen Neuronen festgestellt werden, was auf eine erhöhte Expression der Überlebens-Signalmoleküle „extrazelluläre-signalregulierte-Kinase-1 und -2“ (ERK1 und ERK2) und eine dadurch verminderte Apoptose bei den weiblichen Neuronen zurückgeführt wurde (ZHANG et al., 2003). Auch bei der Apoptose selbst finden sich geschlechtsdifferenzierte Mechanismen: Während der programmierte Zelltod bei weiblichem Geschlecht vorwiegend durch sog. „Cysteinyl-Aspartat-spezifische Proteasen“ (Caspasen) vermittelt wird, ist im männlichen Organismus eher eine Vermittlung der Apoptose durch die Poly-Adenosinbiphosphat-Ribose-Polymerase (PARP) und den Apoptose-induzierenden Faktor (AIF) festzustellen (DU et al., 2004; HAGBERG et al., 2004). Die Erkenntnisse über

geschlechtsspezifische pathophysiologische Abläufe im Gehirn nach zerebraler Ischämie könnten demnach wegweisend für eine dem Geschlecht angepasste pharmakologische Behandlung nach Schlaganfall und weiteren zerebralen ischämischen Ereignissen sein. Die Anwendung von PARP- (DU et al., 2004) und Caspase-Inhibitoren (RENOLLEAU et al., 2007) in Zellkultur und nachfolgend in Tierversuchen ist ein erster Schritt in Richtung einer geschlechtsspezifischen Pharmakotherapie.

2.2 Weibliche Geschlechtshormone

Die weiblichen endogenen Geschlechtshormone Östrogen und Progesteron sind für zahlreiche physiologische Vorgänge im Körper von Bedeutung. Das medizinische Verständnis um die hormonelle Kontrolle des Ovarialzyklus im weiblichen Organismus begann Anfang des 20. Jahrhunderts. Zahlreiche Mediziner und Wissenschaftler in Europa und in den USA forschten an Isolierung, Charakterisierung und Nachweis dieser Hormone und entschlüsselten Mechanismen ihrer Wirkung im Rahmen der Reproduktion. Heute sind viele weitere Funktionen von Östrogen und Progesteron bekannt, die unabhängig von der Reproduktion von Bedeutung sind und nicht nur im weiblichen Organismus eine große Rolle spielen (LOOSE und STANCEL, 2005).

2.2.1 Östrogen

Östrogene sind Steroidhormone mit 18 Kohlenstoffatomen (C_{18}), die sich vom Cholesterol ableiten. Die drei wichtigen natürlichen bzw. endogenen Vertreter der Östrogene sind Östron, Östradiol und Östriol, wobei dem 17β -Östradiol im menschlichen Körper die größte Bedeutung zukommt. Bei der Östrogenbiosynthese ist Androstendion das direkte Vorläufermolekül von Östron; Östradiol geht hingegen aus dem Testosteron hervor. Unerlässlich ist hierbei der sog. Zytochrom-P450-Monooxygenase-Enzymkomplex (auch Aromatase), durch den die Aromatisierung des A-Ringes dieser Steroidhormone katalysiert wird. Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) und molekularer Sauerstoff (O_2) sind bei dieser Hydroxylierungsreaktion essentielle Kosubstrate. Östriol kann aus 16α -Hydroxyandrostendion, Östron oder Östradiol mithilfe weiterer Enzyme direkt gebildet werden (siehe Abb. 02) (LOOSE und STANCEL, 2005).

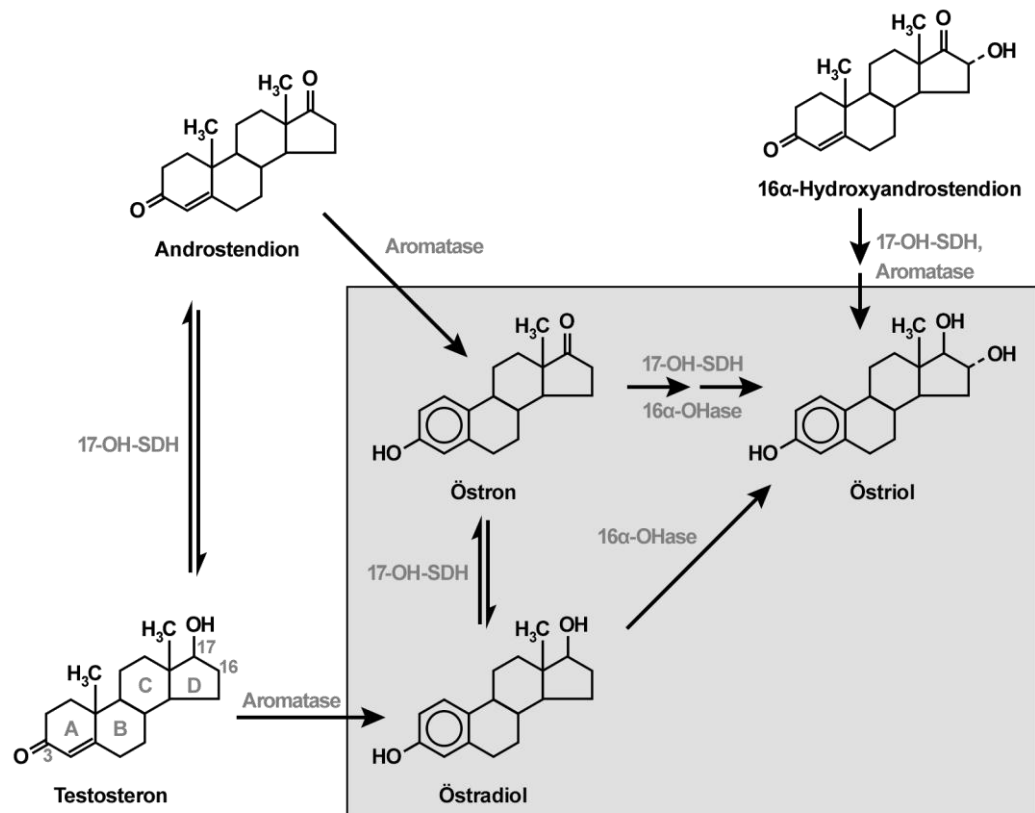


Abb. 02: Biochemische Synthese von Östron, Östradiol und Östriol. *17-OH-SDH* = *17-Hydroxysteroid-Dehydrogenase*; *16α-OHase* = *16α-Hydroxylase* (modifiziert und vereinfacht nach LOOSE und STANCEL, 2005).

Östradiol wird bei der prämenopausalen Frau hauptsächlich in den Theka- und Granulosazellen des ovariellen Follikels und nachfolgend auch in den Theka- und Granulosaluteinzellen des Gelbkörpers gebildet. Östron und Östriol entstehen dagegen in erster Linie in der Leber (GRUBER et al., 2002). Bei postmenopausalen Frauen werden Östrogene in Form von Östron vor allem im Fettgewebsstroma erzeugt. Die Vorläufermoleküle in Form von Dehydroepiandrosteron entstammen dabei der Nebenniere. Während einer Schwangerschaft werden große Mengen an plazentärem Östron und Östriol aus fetalem Dehydroepiandrosteron und seiner 16α-Hydroxyl-Variante umgewandelt (LOOSE und STANCEL, 2005).

Das wissenschaftliche Verständnis um die Bedeutung der Östrogene für die Fortpflanzung begann Ende des 19. bzw. Anfang des 20. Jahrhunderts. Der österreichische Gynäkologe Josef Halban postulierte um das Jahr 1900 erstmals die endokrinen Eigenschaften von Ovarien und Plazenta und die Bedeutung der Ovarfunktion bei der Menstruation von Primaten. Im Jahr 1929 konnte eine Forschergruppe um Edgar Allen (USA) erstmals Östron

aus der follikulären Flüssigkeit von Schweinen, aus humaner Plazenta und dem Urin von schwangeren Frauen isolieren (LAURITZEN, 1999).

Die physiologischen Funktionen der Östrogene sind vielfältig und bei weitem nicht nur auf den Reproduktionstrakt beschränkt. Östrogene sind in hohem Maße für die Ausprägungen der sekundären Geschlechtsmerkmale bei Mädchen in der Pubertät verantwortlich. Auch Wachstum und Entwicklung von Vagina, Uterus und Eierstöcken werden während dieser Entwicklungsphase von Östrogenen gesteuert. Weiterhin tragen sie zur Gestaltung der Körperkonturen, zur Ausformung des Skeletts und zum Wachstumsschub der langen Röhrenknochen und zum Epiphysenschluss in der Pubertät bei. Aber auch in der männlichen Pubertät und Entwicklung scheinen Östrogene, besonders in Bezug auf das skelettale Wachstum, eine wichtige Rolle zu spielen. Ein Östrogenmangel bei Jungen vermindert den pubertären Wachstumsschub und verzögert den Epiphysenschluss sowie die volle Ausreifung des Knochenapparates (LOOSE und STANCEL, 2005).

Im Rahmen des Sexualzyklus der Frau mediiieren Östrogene insbesondere proliferative und differenzierende Prozesse im Endometrium des Uterus und im Eileiter. Sie erhöhen weiterhin die muskuläre Kontraktilität in Eileiter und uterinem Myometrium und steigern die Menge an zervikalem Schleim, um die Spermienpenetration der Zervix zu erleichtern. Eine wichtige Reaktion auf den Einfluss von Östrogenen im Endometrium und weiteren Geweben ist die Induktion des Progesteron-Rezeptors (PR), was das Wirken dieses Gestagens in der zweiten Zyklushälfte erst ermöglicht (LOOSE und STANCEL, 2005).

Auch im Stoffwechsel von Säugetieren spielen Östrogene eine wichtige Rolle. Viele Gewebe und Organsysteme außerhalb des Reproduktionstrakts, wie z. B. Knochengewebe, Gefäßendothel, Leber, ZNS, Immunsystem und Gastrointestinaltrakt, exprimieren niedrige Mengen an Östrogenrezeptoren. Die Effekte der Östrogene auf Mineral-, Lipid-, Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsel werden teilweise direkt über diese organständigen Rezeptoren vermittelt. Im Knochen z. B. regulieren Östrogene direkt Osteoblasten und erhöhen die Produktion von Osteoblasten-Marker-Proteinen wie z. B. Kollagen Typ I und Osteokalzin. Weiterhin steigern Östrogene hier die Überlebenszeit von Osteozyten und erniedrigen die Anzahl und Aktivität von Osteoklasten. Dies hat insgesamt positive Auswirkungen auf die Knochendichte. Im Fettstoffwechsel erhöhen Östrogene leicht die Serum-Triglyzeride. Das totale Serum-Cholesteroll wird hingegen leicht erniedrigt, wobei Östrogen das vorteilhafte Verhältnis von Lipoprotein hoher Dichte zu Lipoprotein niedriger Dichte fördert. Im Kohlenhydratstoffwechsel können Östrogene Nüchternglukose- und

Insulinwerte leicht erniedrigen. Generell ist ihr Einfluss auf diesen Teil des Stoffwechsels allerdings gering. Östrogene modulieren zudem viele Serumproteine, besonders diejenigen, die für Hormonbindung und Blutgerinnung verantwortlich sind. Grundsätzlich erhöhen sie hier die Plasmakonzentration von Kortisol-bindendem Globulin, Thyroxin-bindendem Globulin und Sexualhormon-bindendem Globulin. Bei der Gerinnung werden sowohl Koagulation als auch Fibrinolyse durch die Wirkung von Östrogenen gefördert. Es können erhöhte Werte bestimmter Gerinnungsfaktoren und fibrinolytischer Faktoren durch Östrogeneinfluss festgestellt werden, wodurch ohne störende Einflüsse insgesamt ein Ausgleich zwischen Gerinnung und Gerinnungshemmung entsteht (LOOSE und STANCEL, 2005).

Die Serumkonzentrationen von Östradiol schwanken bei der Frau zyklusabhängig. Die höchsten Werte können präovulatorisch (250–500 pg/ml) gemessen werden. Die niedrigsten Konzentrationen im Serum findet man vor der Menstruation (40–50 pg/ml) und nach der Menopause (< 20 pg/ml) (GRUBER et al., 2002).

2.2.1.1 Östrogenrezeptoren

Die Östrogenrezeptoren („estrogen receptors“, ER) gehören zur Familie der Kernrezeptoren oder auch nukleären Rezeptoren (NR). Für die beiden bekannten Typen von Östrogenrezeptoren, ER α und ER β , kodieren zwei Gene auf unterschiedlichen Chromosomen: Das Östrogenrezeptor-1-Gen („estrogen receptor 1 gene“, ESR1) für ER α und das Östrogenrezeptor-2-Gen („estrogen receptor 2 gene“, ESR2) für ER β . Sowohl ER α als auch ER β sind Östrogen-abhängige, ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, die in unterschiedlicher Verteilung in Geweben vorliegen und die Transkription vieler unterschiedlicher Zielgene regulieren. Die beiden Östrogenrezeptortypen stimmen beim Menschen zu 44 % in ihrer Aminosäuresequenz überein. Wie alle Rezeptoren aus der Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren – dazu gehören z. B. auch Rezeptoren für Glukokortikoide oder Vitamin D – besitzen die ER drei Hauptdomänen: Eine variable N-terminale Domäne, eine hoch konservierte DNA-bindende Domäne (DBD) und eine weniger stark konservierte Liganden-bindende Domäne (LBD) (RIBEIRO et al., 1995). Die DBDs von ER α und ER β weisen in ihrer Struktur große Gemeinsamkeiten auf, was auf viele gemeinsame Zielgene schließen lässt. ER α wurde als erster Östrogenrezeptor entdeckt und wird in hohem Maße im weiblichen Reproduktionstrakt exprimiert, z. B. in Uterus, Vagina und Ovarien. Aber auch in der Milchdrüse, im Hypothalamus, in Endothelzellen und in der glatten Gefäßmuskulatur findet man beispielsweise ER α . Eine hohe ER β -Expression existiert

in der Prostata und in den Ovarien, eine weniger hohe in Lunge, Gehirn, Knochengewebe und in Gefäßen (LOOSE und STANCEL, 2005). Bei der Maus konnte die unterschiedliche Verteilung und von ER α - und ER β -mRNA in einigen Geweben ermittelt werden. Bei weiblichen und männlichen Wildtypmäusen war das Verhältnis von ER α - zu ER β -mRNA im Hypothalamus etwa 2:1. In der Lunge überwog die Expression von ER β im Vergleich zu der von ER α mit etwa dreifachen Werten von ER β -mRNA (COUSE et al., 1997).

Seit einiger Zeit befasst sich die Erforschung der Östrogenrezeptoren auch mit nicht-nukleären Formen dieser Rezeptoren, den sog. „Membran-Östrogenrezeptoren“. Östrogenrezeptoren wurden auch in der Plasmamembran von Zellen nachgewiesen. Ebenso konnten nicht-genomische Effekte von Östrogen, vermittelt durch diese Rezeptoren mithilfe von sog. „Second-Messenger-Systemen“, aufgezeigt werden (ZHU und SMART, 2003). So wurde z. B. eine Aktivierung der Adenylatzyklase über diese Membranrezeptoren nachgewiesen, mit nachfolgender Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), einem typischen sog. „Second-Messenger“ (ARONICA et al., 1994). Die Existenz von Membran-Östrogenrezeptoren ist mittlerweile in Forschungskreisen akzeptiert. Etwa 5–10 % der Östrogenrezeptoren einer Zelle befinden sich in deren Plasmamembran. Dabei wird unterschieden zwischen klassischen Östrogenrezeptoren, die aus dem Zellkern zur Plasmamembran transportiert werden, und neuen, oft noch relativ unbekannten Formen von Östrogenrezeptoren. Einer dieser „jungen“ Membran-Östrogenrezeptoren ist z. B. der G-Protein-gekoppelte-Rezeptor 30 (GPR30), dessen genaue Rolle und Wirkungsweise aber noch weiter erforscht werden müssen (LEVIN, 2009). Erste Untersuchungen zeigen, dass GPR30 eine Rolle bei der Regulation des Zellwachstums, inklusive Proliferation und Apoptose, spielen könnte. Die Wirkungen dieses Rezeptors werden dabei über unterschiedliche Signaltransduktionswege vermittelt, z. B. mit der Aktivierung der Adenylatzyklase oder der Phosphoinositid-3-Kinase (IP3K) (PROSSNITZ et al., 2007).

Das Verständnis von Östrogenen und ihrer Wirkung im Körper hat sich im letzten Jahrzehnt deutlich gewandelt. War das Östrogen vor etwa 60 Jahren noch ein reines „Frauenhormon“, lediglich bedeutsam im Rahmen der weiblichen Reproduktion und der postmenopausalen Beschwerden, so ist es heute bekannt für sein Wirken in zahlreichen Geweben bei Mann und Frau. Ein Wirkort von Östrogenen – das Gehirn – ist in den letzten Jahren in den Fokus gerückt. Zahlreiche Untersuchungen kommen zu dem Ergebnis, dass Östrogene neben ihrem Einfluss auf das Fortpflanzungsverhalten auch für Gedächtnisbildung, Stimmungslage, psychische Befindlichkeit, Neuronenentwicklung und -degeneration von großer Bedeutung

sind (GILLIES und MCARTHUR, 2010). Vor einigen Jahren beschränkte sich die Erforschung der Östrogenwirkungen im Gehirn noch zum allergrößten Teil auf den Hypothalamus und das Hypothalamus-Hypophysen-System. Mithilfe von Östradiolimplantaten in unterschiedlichen Bereichen des Hypothalamus bei weiblichen Goldhamstern konnte die Bedeutung der Östrogene für das weibliche Sexualverhalten differenziert werden. Besonders der ventromediale Hypothalamus schien hierbei eine wichtige Rolle zu spielen (TAKAHASHI und LISK, 1985). Im Rahmen des Sexualzyklus wurde die Wichtigkeit des Östrogens bei den Rückkopplungsmechanismen der Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse erkannt. Der Einfluss von 17β -Östradiol auf die Ausschüttung von sog. „Releasing-Hormonen“ des Hypothalamus und von Gonadotropinen und Prolaktin durch die Hypophyse im Rahmen des Zyklus konnte aufgedeckt werden. Die genauen Hintergründe der Östrogenwirkung auf neuronale Strukturen blieben aber noch weitgehend unbekannt (FINK, 1988).

Mit dem Wissen um die Existenz und Wirkungsweise der beiden unterschiedlichen Östrogenrezeptoren sowie validen Nachweisverfahren in vitro und in situ ist die Forschung mittlerweile bei zerebralen Östrogenwirkungen weit jenseits des Hypothalamus angekommen. Mithilfe der in-situ-Hybridisierung konnten SHUGHRUE et al. (1997) bei der Ratte die Verteilung von $ER\alpha$ - und $ER\beta$ -mRNA in Gelfrierschnitten des Gehirns abbilden. Dabei wurde festgestellt, dass $ER\beta$ -mRNA enthaltende Neurone grundsätzlich über eine größere Fläche im Gehirn verbreitet sind als $ER\alpha$ -mRNA enthaltende Neurone. Ein fast ausschließliches Vorkommen von $ER\beta$ -mRNA findet sich im zerebralen Kortex, während eine beinahe alleinige Expression von $ER\alpha$ -mRNA im ventralen Hypothalamus der Fall ist (SHUGHRUE et al., 1997). Bei $ER\alpha$ -Knockout-Mäusen ($ER\alpha^-$) konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass $ER\alpha$ besonders im Rahmen der neuroendokrinen Vorgänge in der Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse und beim Sexualverhalten eine enorm wichtige, wenn nicht sogar exklusive Rolle spielt (RISSMAN et al., 1997). Die mRNA von beiden Östrogenrezeptoren findet sich z. B. im Hippokampus, wo aber die Expression von $ER\beta$ -mRNA deutlich überwiegt (SHUGHRUE et al., 1997). Eine ähnliche Verteilung der Östrogenrezeptoren findet sich auch im menschlichen Gehirn, mit $ER\beta$ -mRNA-Expression ebenfalls in hohem Maße in zerebralem Kortex und Hippokampus. Eine Rolle von $ER\beta$ bei Gedächtnisbildung und Kognition wird daher diskutiert (ÖSTERLUND et al., 2000). Bekannt ist mittlerweile, dass $ER\beta$ z. B. bei der synaptischen Plastizität in der Amygdala und bei Angstreaktionen im Verhaltenstest von Bedeutung ist (KREZEL et al., 2001). Die großflächige Verteilung von Östrogenrezeptoren im Gehirn und erste Erkenntnisse über ihre

Funktion zeigen, dass der Einfluss der Östrogene sehr wahrscheinlich weit über die Steuerung neuroendokriner Vorgänge und des Sexualverhaltens hinausgeht.

2.2.1.2 Neuroprotektion durch Östrogen

Die Untersuchung der potentiell neuroprotektiven Eigenschaften von Östrogen hat sich zu einem zentralen Thema in weiten Teilen der medizinischen Forschung entwickelt (GARCIA-SEGURA et al., 2001; NORBURY et al., 2003; BRANN et al., 2007). Dieses Forschungsinteresse basiert auf klinischen Studien und epidemiologischen Betrachtungen, die sich alle mit dem Zusammenhang von Geschlecht und des Geschlechtshormonstatus bei bedeutsamen kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen beschäftigen. Der Schlaganfall ist eine dieser Erkrankungen. Allerdings ist nicht nur das Geschlecht, sondern auch der Hormonstatus eine wichtige Variable bei diesen Betrachtungen. Mit der Hormonersatztherapie („hormone replacement therapy“, HRT) und der Östrogensersatztherapie („estrogen replacement therapy“, ERT) während und nach der Menopause der Frau wurden neue Ansatzpunkte für die Überprüfung vorteilhafter oder auch negativer Wirkungen des Östrogens geschaffen. Die Zahl der ärztlich verschriebenen oralen menopausalen Hormonpräparate (Östrogene und Östrogen-Progestin-Präparate) stieg in den USA von 1992 bis zum Jahr 2000 um das 2,5-fache auf insgesamt 87,3 Millionen (WYSOWSKI und GOVERNALE, 2005). Ältere Studien weisen auf eine positive Auswirkung der ERT im Zusammenhang mit Schlaganfall-Risiko und -Mortalität hin (PAGANINI-HILL et al., 1988; FALKEBORN et al., 1993; PAGANINI-HILL, 1995). Bei einer Analyse großer aktueller klinischer Studien konnte diese positive Wirkung nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, es konnte sogar ein negativer Effekt der ERT mit erhöhter Inzidenz von Schlaganfällen und dem Auftreten schwererer Schlaganfälle beobachtet werden (BRASS, 2004). Auch wenn Frauen grundsätzlich eine geringere Inzidenz und eine geringere Mortalität im Vergleich zu Männern beim Schlaganfall aufweisen, zieht sich dieser Vorteil nicht durch alle Lebensabschnitte. So steigt ab einem Alter von 85 Jahren die Inzidenz des Schlaganfalls bei Frauen im Vergleich zu den Männern (PETREA et al., 2009). Weiterhin zeigte die sog. „Framingham-Heart-Study“, dass das Schlaganfallrisiko sich bei Frauen mit frühzeitiger Menopause (< 42 Jahre) nahezu verdoppelt (LISABETH et al., 2009). Die Menopause mit einem signifikanten Absinken des endogenen Östrogenspiegels ist ein wichtiger Faktor bei der Entstehung und dem weiteren Verlauf dieser zerebralen Ischämie. Zugrundeliegende pathophysiologische Mechanismen der neuroprotektiven Wirkungen des Östrogens wurden in zahlreichen Studien *in vivo* und *in vitro* untersucht.

Es existieren unterschiedliche Modelle, um fokale und globale zerebrale Ischämien im Tierexperiment abbilden zu können. Die fokale Ischämie wird tierexperimentell durch einen Verschluss der mittleren Zerebralarterie („middle cerebral artery occlusion“, MCAO) mit unterschiedlichen Verschlussmethoden erreicht. Verbreitete Methoden zur Durchführung einer globalen zerebralen Ischämie sind der Verschluss der beiden Karotiden (Aa. carotides communes) und der beiden Vertebralarterien (Aa. vertebrales) bei der Ratte („four-vessel-occlusion“, 4-VO) und die Okklusion der beiden Karotiden (Aa. carotides communes) beim Gerbil („two-vessel-occlusion“, 2-VO) (TRAYSTMAN, 2003).

Tierexperimentelle Studien konnten bei Modellen der fokalen Ischämie einen reduzierenden Effekt von Östradiol auf die Infarktgröße feststellen, und zwar sowohl bei intakten Weibchen mit körpereigenem Östrogen (ALKAYED et al., 1998) als auch bei 17 β -Östradiol-Substitution nach Ovariectomie (RUSA et al., 1999; DUBAL und WISE, 2001). Dabei wirkten sich insbesondere Östradiol-Serumspiegel in einem eher niedrigen physiologischen Bereich über einen längeren Zeitraum im Sinne einer Reduktion der ischämischen Schädigung im Gehirn aus. Sehr hohe, aber immer noch physiologische Spiegel von Östradiol zeigten hingegen einen eher einen Infarkt-fördernden Effekt (RUSA et al., 1999). Auch in Tierversuchsmodellen der globalen zerebralen Ischämie konnte durch 17 β -Östradiol-Behandlung z. B. ein verbessertes zerebrales histologisches Outcome beim männlichen Gerbil (CHEN et al., 1998) und ein verbessertes histologisches und funktionelles neurologisches Outcome bei weiblichen Ratten (WANG et al., 1999) erreicht werden. Die Ergebnisse dieser *in vivo*-Studien stützen also diejenigen Beobachtungen aus der Klinik, die prämenopausale Östradiolwerte bzw. die ERT nach der Menopause mit einer Schutzfunktion gegenüber Schlaganfall und zerebraler Ischämie assoziieren. Sowohl im Tierexperiment als auch in der Klinik (s. o.) gibt es allerdings Hinweise, dass die Substitution von Östradiol auch nachteilige Effekte im Zusammenhang mit zerebraler Ischämie mit sich bringen könnte. Harukuni et al. fanden in einem Modell der globalen Ischämie bei der weiblichen Ratte einen Zusammenhang zwischen vermehrtem Zelluntergang im Hippokampus und erhöhtem Plasma-Östradiolspiegel nach 5-minütiger Ischämiedauer (HARUKUNI et al., 2001). Die überwiegende Mehrzahl der experimentellen Studien zeigt allerdings eine neuroprotektive Wirkung des Östrogens (BRANN et al., 2007). Untermuert wird dies von zahlreichen *in vivo*- und *in vitro*-Studien, die sich mit den Mechanismen der Östrogenwirkung auf Apoptose, oxidativen Stress, Exzitotoxizität und Inflammation im Rahmen zerebraler Schädigung und Ischämie beschäftigt haben.

17 β -Östradiol „moduliert“ die nach einer Ischämie ablaufenden apoptotischen Signalkaskaden. Es kann z. B. das Herunterregulieren des anti-apoptotischen B-Zell-Lymphoma-2-Gens (BCL-2) in einem ischämisch geschädigten Bereich des Gehirns bei der Ratte verhindern (DUBAL et al., 1999). Weiterhin wird durch den Einfluss von 17 β -Östradiol die Expression des Überlebensfaktors Survivin in der CA1-Region des Hippokampus nach globaler Ischämie bei der Ratte gefördert (ZHANG et al., 2008). Jover et al. konnten an Östradiol-substituierten männlichen Gerbils zeigen, dass 17 β -Östradiol bei einer globalen Ischämie die Expression der Caspase-3 in der CA1-Region des Hippokampus reduziert (JOVER et al., 2002).

Östrogene spielen ebenfalls eine Rolle bei der Reaktion auf oxidativen Stress und reaktive Sauerstoffspezies. Besonders die phagozytische NADPH-Oxidase-2 (NOX2) spielt eine große Rolle bei der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies – insbesondere auch dem Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$) – im Rahmen der zerebralen Ischämie (BRANN et al., 2012). Durch Substitution von 17 β -Östradiol bei ovariectomierten Ratten und nachfolgender globaler Ischämie konnte gezeigt werden, dass Östradiol die Bildung des NOX2-NADPH-Oxidase-Komplexes und damit auch die Bildung von $O_2^{\cdot-}$ in der hippocampalen CA1-Region signifikant reduziert. Dies führte auch zu einem deutlich verminderten oxidativen Schaden in diesem Bereich bei der Östradiol-Gruppe im Vergleich zur ovariectomierten Placebo-Gruppe (ZHANG et al., 2009). Für eine Zusammenfassung der anti-apoptotischen und anti-oxidativen Wirkungen von 17 β -Östradiol vermittelt durch nukleäre und nicht-nukleäre ER siehe Abbildung 03.

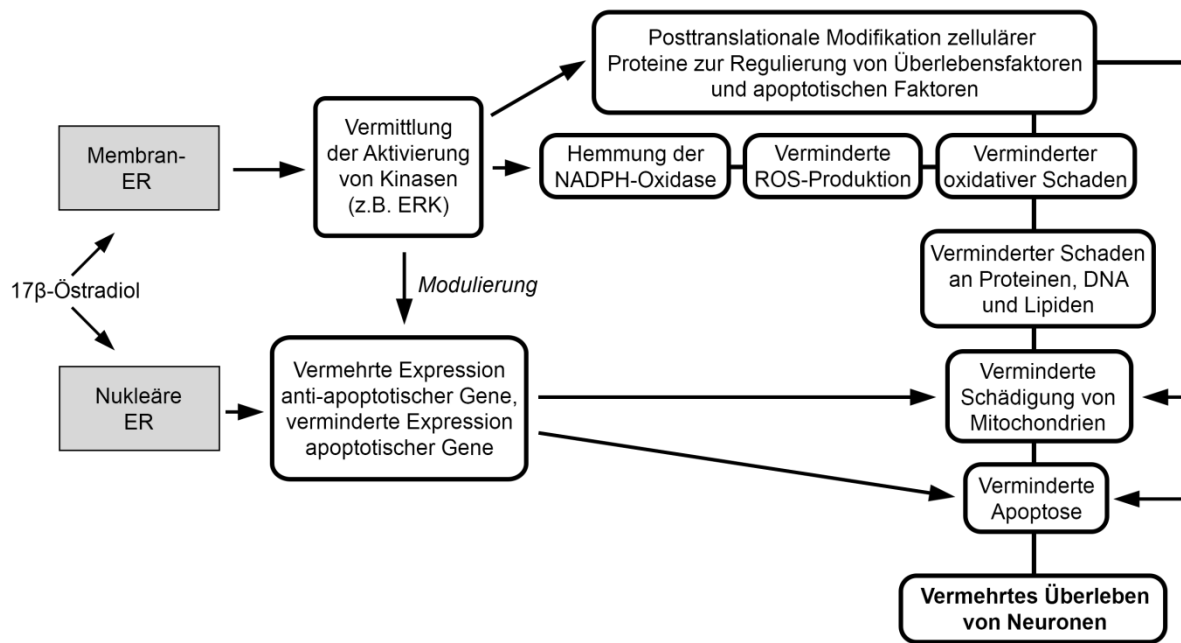


Abb. 03: Vermittlung der Neuroprotektion durch 17β-Östradiol über nukleäre und extranukleäre Östrogenrezeptoren („estrogen receptors“, ER). ERK = „Extracellular-signal Regulated Kinase“, extrazelluläre signalregulierte Kinase; NADPH-Oxidase = Nikotinamid-Adenin-Phosphatdinukleotid-Oxidase; ROS = „reactive oxygen species“, reaktive Sauerstoffspezies; DNA = Desoxyribonukleinsäure (modifiziert nach BRANN et al., 2007).

Auch im Zusammenhang mit Exzitotoxizität, die bei zerebraler Ischämie durch einen Glutamat-Überschuss im Gehirn entsteht, können Östrogene neuroprotektiv wirken. *In vitro* konnte eine 17β-Östradiol-Vorbehandlung einer Primärkultur kortikaler Neurone der Ratte den Zelltod durch Glutamateinfluss reduzieren (SINGER et al., 1996). Die Entfernung von Glutamat aus dem Extrazellulärraum ist ein entscheidender Faktor, um exzitotoxische Schädigungen im Gehirn bei einer Ischämie zu verhindern. Diese Aufgabe wird hauptsächlich von zwei Glutamattransportern in der Zellmembran von Astrozyten ausgeführt: Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST, oder auch „Excitatory amino acid transporter 1“, EAAT1) und Glutamat-Transporter-1 (GLT-1, oder auch EAAT2) (GEGELASHVILI und SCHOUSBOE, 1997). In Astrozytenkulturen der Maus konnten PAWLAK et al. (2005) zeigen, dass 17β-Östradiol eine vermehrte Expression von GLAST und GLT-1 anregt und als Folge davon eine vermehrte Glutamat-Aufnahme von Astrozyten erreicht wird (PAWLAK et al., 2005).

Inflammatorische Mechanismen spielen eine wichtige Rolle bei zerebraler Schädigung im Rahmen von ischämischen Ereignissen (siehe Abschnitt 2.4.2). Auch die Einwanderung von Leukozyten, Monozyten und Makrophagen in neuronales Gewebe sowie inflammatorische Signalwege unter der Beteiligung von Zytokinen wie z. B. Tumornekrosefaktor α (TNFα) und Interleukin-1 (IL-1) sind dabei von Bedeutung (HUANG et al., 2006). Als neuroprotektive

Eigenschaften des Östrogens sind auch anti-inflammatorische Effekte beschrieben. Eine zentrale Rolle nimmt dabei der Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor kappa B (NF- κ B) ein. NF- κ B kann durch zahlreiche Stimuli induziert werden und regelt infolge die Transkription von inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Immunorezeptoren und Zell-Adhäsions-Molekülen (PAHL, 1999). In Zellkulturen von zerebralen Endothelzellen der Ratte konnte z. B. nachgewiesen werden, dass eine Vorbehandlung mit 17 β -Östradiol eine dosisabhängige Reduzierung der NF- κ B-Aktivierung bewirkt. Gleiches gilt für das Interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 („Intercellular adhesion molecule 1“, ICAM-1). ICAM-1 ist für die Adhäsion von Leukozyten an Gefäßwände und ihre nachfolgende Abwanderung in das Gewebe von Bedeutung (GALEA et al., 2002). Auch *in vivo* konnte eine verminderte Aktivierung von NF- κ B nach fokaler Ischämie bei der Ratte durch 17 β -Östradiol-Substitution gezeigt werden (WEN et al., 2004). Im Rahmen der zerebralen Inflammation ist auch die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) bedeutsam, wobei iNOS bei entzündlichen Vorgängen in vielen Zellen, darunter insbesondere in Makrophagen, exprimiert wird. Das produzierte Stickstoffmonoxid wirkt in hohen Dosen zytotoxisch (IADECOLA et al., 1995). PARK et al. (2006) konnten zeigen, dass Östradiol die Expression von iNOS vermindert (PARK et al., 2006).

Bei vielen bisher beschriebenen neuroprotektiven Eigenschaften des Östrogens spielt die Vermittlung über ER α im Gehirn vermutlich eine große Rolle. Bei ER α -Knockout-Mäusen (ER α ⁻) war in einem Modell der fokalen Ischämie die neuroprotektive Wirkung von 17 β -Östradiol aufgehoben (DUBAL et al., 2001). Auch die anti-oxidative Wirkung des 17 β -Östradiols im Zusammenhang mit der NOX2 ist nachweislich durch ER α mediiert (ZHANG et al., 2009). Welche Rolle ER β bei der Vermittlung der Neuroprotektion des Östrogens genau spielt, bedarf ebenfalls noch weiterer Untersuchungen. Der ER β -selektive Agonist WAY 200070-3 konnte Neuroprotektion in der CA1-Region des Hippokampus der Ratte nach globaler Ischämie bewirken (MILLER et al., 2005). Eine neuere Studie mit Östrogen-substituierten ovariectomierten Ratten zeigte eine deutliche Verschlechterung des ischämischen Schadens im Hippokampus nach globaler Ischämie durch eine Blockierung von ER β (RAVAL et al., 2013). Auch ER β scheint also einen nicht unerheblichen Anteil an der von 17 β -Östradiol ausgeübten Neuroprotektion zu haben.

In vitro- und *in vivo*-Studien zeigen also durchaus viele positive Effekte und Wirkmechanismen von Östradiol bei zerebraler Ischämie. Dennoch sollten Vermutungen über eine generell neuroprotektive Wirkung des Östrogens bei ischämischen zerebralen

Schädigungen kritisch betrachtet werden. Im tierexperimentellen Bereich konnte mittlerweile gezeigt werden, dass die Methode der Östrogensubstitution (STROM et al., 2010), der Zeitpunkt der Hormonsubstitution in Bezug auf die Ovariectomie (SUZUKI et al., 2007) sowie die Östradiol-Dosis, die betroffene Gehirnregion und die Ischämiedauer (HARUKUNI et al., 2001) entscheidende Faktoren für das neuroprotektive Potential des Östrogens sind. Negative Auswirkungen einer Östrogensubstitution – klinisch und experimentell (s. o.) – bei zerebralen Ischämien sollten auf diese Faktoren überprüft und weiterhin ernstgenommen werden.

2.2.2 Progesteron

Als Steroidhormon mit 21 Kohlenstoffatomen (C_{21}) stammt Progesteron wie auch die Östrogene vom Cholesterol ab. Die Synthese des Progesterons findet allerdings noch eine Stufe vor der Synthese der Androgene statt. Dabei ist Pregnenolon, das wiederum über eine Zwischenstufe aus Cholesterol gebildet wird, das Vorläufermolekül von Progesteron. Durch eine Oxidierung der 3-Hydroxylgruppe des Pregnenolons zur 3-Ketogruppe sowie durch eine Isomerisierung seiner Δ^5 -Doppelbindung zu einer Δ^4 -Doppelbindung entsteht Progesteron (siehe Abb. 04) (BERG et al., 2011).

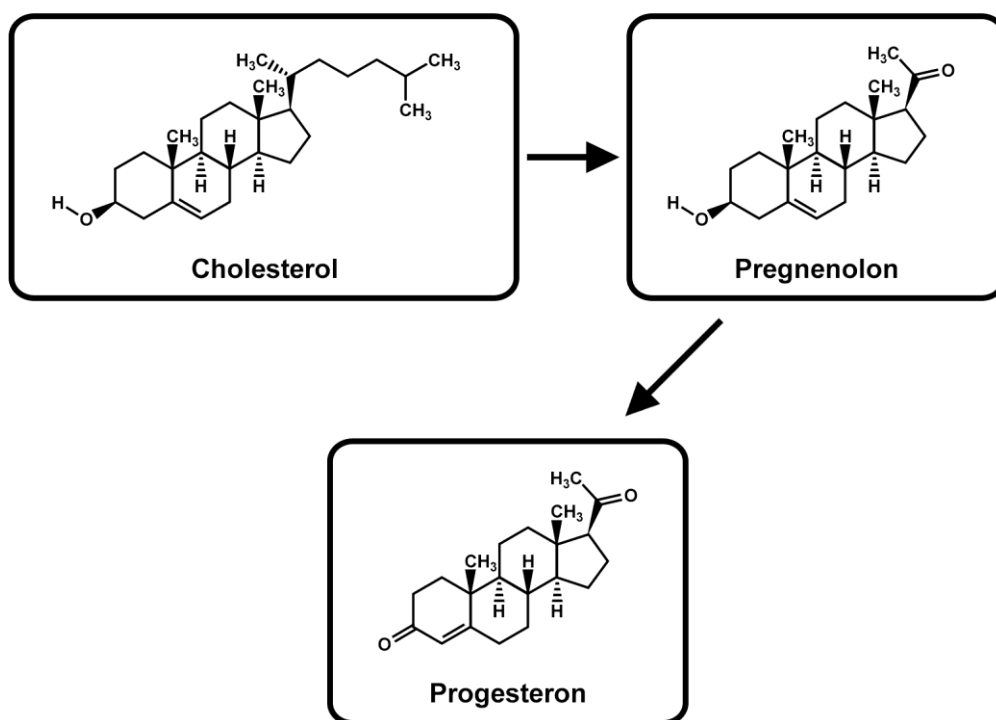


Abb. 04: Vorstufen der Progesteron-Synthese. Dargestellt ist das biochemische Ausgangsmolekül Cholesterol, das direkte Vorläufermolekül Pregnenolon und das Endprodukt Progesteron. Zwischenstufen bei der Synthese und beteiligte Enzyme sind nicht dargestellt. (vereinfacht und modifiziert nach DEWICK, 2001).

Die Geschichte der Erforschung des Progesterons geht auf den Anfang des 20. Jahrhunderts zurück. Zwischen 1900 und 1910 konnte der Breslauer Gynäkologe Ludwig Fraenkel (1870-1951) nachweisen, dass eine Entfernung des Ovars bzw. des Gelbkörpers beim Kaninchen die Einnistung der befruchteten Eizelle verhindert. George Corner und Willard Allen von der Medical School der Rochester Universität konnten 1933 erstmals erfolgreich Progesteron isolieren. Auch europäischen Forschergruppen gelang die Isolierung von Progesteron. Sie nannten ihr Isolat „Luteosteron“, während Corner und Allen den Namen „Progestin“ vorzogen. Auf einer Konferenz der Weltgesundheitsorganisation („World Health Organization“, WHO) 1935 in London einigte man sich auf Corners Vorschlag schließlich auf den auch heute gebräuchlichen Namen „Progesteron“ (GERABEK et al., 2005).

Bei synthetischen Verbindungen mit ähnlichen biologischen Wirkungen wie Progesteron spricht man überbegrifflich auch z. B. von Gestagenen, Progestagenen oder Progestinen. Die Hauptquelle für endogenes Progesteron im weiblichen Körper ist der Gelbkörper (Corpus luteum) des Ovars in der zweiten Zyklushälfte. Unter dem Einfluss von luteinisierendem Hormon (LH) aus der Hirnanhangdrüse produziert der nach dem Eisprung entstehende Gelbkörper große Mengen Progesteron und kleinere Mengen Östrogen. Nach einer Befruchtung der Eizelle sezerniert der Trophoblast humanes Choriongonadotropin (hCG) in den maternalen Blutkreislauf, um den Gelbkörper und damit die Schwangerschaft zu erhalten. Während des zweiten oder dritten Schwangerschaftsmonats übernimmt bei der Frau die Plazenta unter Mitwirkung der fetalen Nebennieren die Produktion von Progesteron und Östrogen und der Gelbkörper wird für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft nicht länger benötigt (LOOSE und STANCEL, 2005). Neben Gelbkörper und Plazenta ist auch die Nebenniere eine Quelle für Progesteron, was an ovariectomierten Ratten gezeigt werden konnte (RESKO, 1969). Progesteron ist das einzige Progestagen und generell das einzige Hormon, das beim Menschen eine Schwangerschaft aufrechterhalten kann. Während der Lutealphase können bei der Frau Serumkonzentrationen von 25 ng/ml erreicht werden und im Verlauf einer Schwangerschaft können sie bis auf 200 ng/ml ansteigen (KUHL, 2011).

Im Reproduktionstrakt der Frau und bei weiblichen Säugetieren reduziert Progesteron in der Lutealphase die proliferative Wirkung des Östrogens auf das uterine Endometrium und leitet die Sekretionsphase des Endometriums ein. Durch Förderung der epithelialen Sekretion und der Blutgefäßbildung wird das Endometrium auf die Implantation der Blastozyste vorbereitet. Auf Eileiter, Myometrium und Zervix weist Progesteron gegensätzliche Effekte zu den Östrogenen auf. Es vermindert Kontraktilität von Eileiter und Myometrium und sorgt für

geringeren und zäheren Zervikalschleim, um die Spermienpenetration zu erschweren. Progesteron ist zudem bedeutsam für proliferative Vorgänge in der Milchdrüse. Sowohl während einer Schwangerschaft als auch in der lutealen Phase des Zyklus sorgt es zusammen mit Östrogen für mitotische Vorgänge im Brustdrüsenepithel. Auch ZNS-Effekte von Progesteron sind bekannt. So ist der Temperaturanstieg um den Zeitpunkt der Ovulation um ca. 0,6 °C auf Progesteron zurückzuführen, wobei die genauen Mechanismen unbekannt sind. Weiterhin führt Progesteron im Atemzentrum des Gehirns zu einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber Kohlendioxid (CO₂) und damit zu einem verminderten alveolären und arteriellen Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂). Auch sedierende und hypnotische Wirkungen im ZNS durch Progesteron werden diskutiert (LOOSE und STANCEL, 2005).

2.2.2.1 Progesteronrezeptoren

Es existieren zwei Isoformen des Progesteronrezeptors (PR): Progesteronrezeptor A (PR-A) und Progesteronrezeptor B (PR-B). Die beiden Progesteronrezeptortypen werden von demselben Gen kodiert und unterscheiden sich lediglich in einer N-terminalen Sequenz von 165 Aminosäuren, die PR-A nicht besitzt (LOOSE und STANCEL, 2005).

Die Progesteronrezeptoren gehören, wie auch die Östrogenrezeptoren, zu den nukleären Hormonrezeptoren und stellen ebenso ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren dar. PR-A und PR-B besitzen die Transaktivierungsdomänen Aktivierungsfunktion 1 (AF1) und Aktivierungsfunktion 2 (AF2). PR-B besitzt als längeres Molekül noch die zusätzliche Transaktivierungsdomäne AF3 (siehe Abb. 05), wodurch ihm eine besondere Zell- und Promotoren-spezifische Aktivität zukommt (LOOSE und STANCEL, 2005). Ohne einen aktivierenden Liganden sind die Progesteronrezeptoren im Zellkern als inaktive Monomere an Hitzeschockproteine (HSP-90, HSP-70 und p59) gebunden. Durch die Bindung von Progesteron dissoziieren die Hitzeschockproteine ab, die Rezeptoren werden phosphoryliert und formen daraufhin Dimere (Homo- und Heterodimere). Diese Dimere können mit hoher Selektivität an sog. „Progesteron-responsive-Elemente“ (PREs) von Zielgenen binden (GIANGRANDE und MCDONNELL, 1999). Die vermittelten Wirkungen von PR-A und PR-B in Zielgeweben sind unterschiedlich. Während PR-B eher stimulatorische Effekte von Progesteron mediert, fungiert PR-A als eine Art negativer Modulator und unterdrückt die Wirkung von PR-B. Da PR-A und PR-B durch dasselbe Gen kodiert werden, scheint die Genexpression und damit in den Anteilen unterschiedliche Expression von PR-A und PR-B eine wichtige Rolle für die endgültige Wirkung von Progesteron in unterschiedlichen Geweben zu spielen (VEGETO et al., 1993).

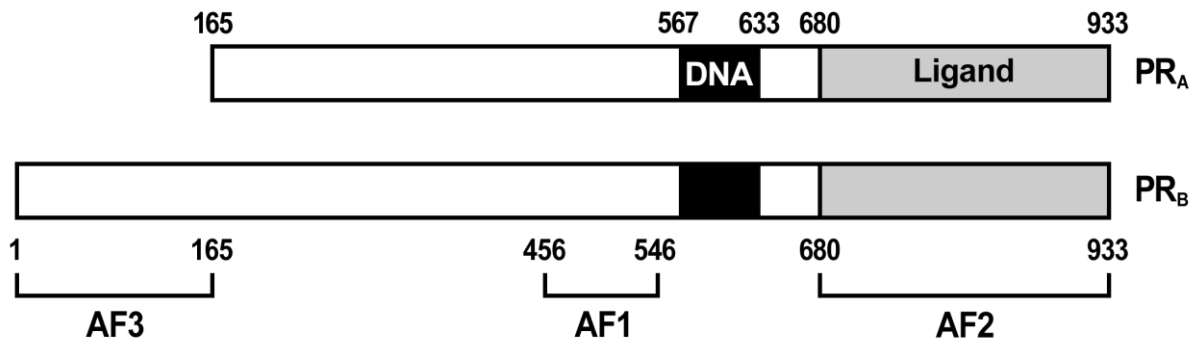


Abb. 05: Schematische Darstellung der beiden Isoformen des Progesteronrezeptors. Transaktivierungsdomänen Aktivierungsfunktion 1, 2 und 3 (=AF1, AF2 und AF3), Liganden-bindende Domäne (grau), DNA-bindende Domäne (schwarz), die Aminosäuresequenzen von PR-A und PR-B sind identisch bis auf die N-terminale Sequenz von PR-B (=AF3) (modifiziert nach GRAHAM et al.; 1995).

Progesteronrezeptoren werden in vielen unterschiedlichen Geweben von Säugetieren exprimiert. Sowohl in den weiblichen Fortpflanzungsorganen, Vagina, Uterus und Ovarien, als auch in den männlichen Testes konnten Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden. Weiterhin finden sie sich auch z. B. in der Milchdrüse, in Lunge und Pankreas, in Knochengewebe sowie im Gehirn (PRESS und GREENE, 1988; GRAHAM und CLARKE, 1997; BLAND, 2000). Bei weiblichen Mäusen konnten PR immunhistochemisch in vielen weiteren Geweben, wie z. B. Duodenum, Jejunum und Harnblase nachgewiesen werden. Ebenso wurden hier Östrogen-induzierte Progesteronrezeptoren in Uterus, Vagina und Urethra, aber auch in der Haut und in der glatten Muskulatur einiger Blutgefäße gezeigt (UOTINEN et al., 1999).

Bis Mitte der 1970er Jahre war es die weit verbreitete Meinung bei Wissenschaftlern, dass die Effekte des Progesterons im Gehirn – anders als bei Östrogen – nicht von Kernrezeptoren vermittelt werden. Erst Ende der 1970er bzw. Anfang der 1980er Jahre wurde gezeigt, dass sehr wohl nukleäre Progesteronrezeptoren im Gehirn existieren und diese essentiell für die Wirkungen des Progesterons auf das Sexualverhalten sind (BLAUSTEIN, 2008).

Für die Wirkung von Progesteron im Gehirn bedeutsam ist die Tatsache, dass Progesteron auch als Neurosteroid aktiv ist und daher vor Ort im Nervensystem aus Cholesterol oder anderen steroidalen Vorläufermolekülen synthetisiert wird (MELLON und DESCHEPPER, 1993; BAULIEU et al., 2001). Die Expression von Progesteronrezeptoren findet in weiten Teilen des Gehirns statt und beschränkt sich nicht auf einen bestimmten Zelltyp. Dennoch gibt es natürlich Variationen der Expression der PR in Bezug auf Gehirnregion, Zelltyp oder Hormonstatus (BRINTON et al., 2008). Mithilfe der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion („Reverse transcription polymerase chain reaction“, RT-PCR) und

Immunhistochemie konnten bei der Ratte beide Isoformen des Progesteronrezeptors z. B. in Hippokampus, frontalem Kortex, Hypothalamus und im präoptischen Areal des Hypothalamus nachgewiesen werden (GUERRA-ARAIZA et al., 2002; GUERRA-ARAIZA et al., 2003). Auch in Thalamus und Amygdala konnten PR mithilfe von in-situ-Hybridisierung dargestellt werden (KATO et al., 1994). GUERRA-ARAIZA et al. (2003) bestimmten auch die Expression der PR in Abhängigkeit vom Zyklusstand bei der weiblichen Ratte. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Östradiol die PR-Expression im Hypothalamus steigert. Progesteron hingegen hatte einen hemmenden Einfluss auf diesen Anstieg. Im frontalen Kortex wiederum konnte keinerlei Beeinflussung der PR-Expression durch Östradiol oder Progesteron nachgewiesen werden (GUERRA-ARAIZA et al., 2003). Die weite Verbreitung der Progesteronrezeptoren im Gehirn lässt auch für das Progesteron Wirkungsmöglichkeiten im ZNS vermuten, die weit über das Reproduktionsverhalten hinausgehen. Detaillierte Mechanismen bzw. konkrete Wirkungsweisen von Progesteron im Gehirn sind allerdings vielfach noch nicht erforscht.

2.2.2.2 Neuroprotektion durch Progesteron

Progesteron ist hinsichtlich möglicher neuroprotektiver Eigenschaften noch wenig charakterisiert. Im Tierexperiment, insbesondere bei Nagetieren, dient fast immer die Ovariectomie als eine Art „Negativkontrolle“ für eine mögliche neuroprotektive Wirkung des Östrogens. Vielfach wird hierbei aber vergessen, dass durch die Entfernung der Ovarien nicht nur im Blutkreislauf zirkulierendes Östrogen, sondern auch Progesteron deutlich reduziert wird. Mit einem schlechteren histologischen und funktionellen Outcome bei ovariectomierten Tieren ist deshalb grundsätzlich auch fehlendes Progesteron als Ursache in Betracht zu ziehen (SINGH et al., 2008)

Schon 1987 stellten ATTELLA et al. fest, dass scheinschwangere weibliche Ratten nach einer kortikalen Läsion ein besseres histologisches und funktionelles Outcome als normalzyklische Weibchen aufwiesen. Bei den scheinschwangeren Weibchen zeigte sich insbesondere auch eine verminderte zerebrale Ödematisierung (ATTELLA et al., 1987). Insbesondere die anti-ödematöse Wirkung des Progesterons spielt hierbei eine Rolle. Tierexperimentelle Untersuchungen bei Ratten konnten zeigen, dass eine tägliche Behandlung mit Progesteron nach einer traumatischen Schädigung des Gehirns das Ausmaß der Ödematisierung um bis zu 50 % verringern kann. Sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Ratten konnte nach der Hirnkompression verabreichtes Progesteron das Ausmaß des Hirnödems einschränken. Dabei war auch eine Erstbehandlung mit Progesteron erst 24 h

nach dem Insult mit täglicher Fortführung effektiv (ROOF et al., 1996). Progesteron wurde mittlerweile zur Behandlung traumatischer Hirnschäden in einer Phase-II-Studie am Patienten getestet. Durch eine intravenöse Progesteron-Behandlung über drei post- traumatische Tage konnte eine deutlich verminderte Mortalität und ein verbessertes funktionelles Outcome im Vergleich zu einer Placebo-Gruppe bei den Patienten verzeichnet werden (WRIGHT et al., 2007). Hintergrund für die anti-ödematöse Wirkung des Progesterons könnte möglicherweise das Progesteron-bindende Membranprotein 25-Dx sein. Eine hohe Expression von 25-Dx findet sich in Bereichen des Hypothalamus, die für die Osmoregulation zuständig sind. Auch in Gehirnbereichen, die die Produktion der Zerebrospinalflüssigkeit (ZSF) steuern, findet sich vermehrt 25-Dx. Nach einer traumatischen Schädigung des Gehirns im Tierexperiment zeigte sich in diesen Bereichen eine zusätzlich gesteigerte Expression dieses Membranproteins. Außerdem wird 25-Dx in manchen Teilen des Gehirns mit Vasopressin ko-exprimiert, welches das intrazelluläre Volumen im Gehirn reguliert. Die Rolle von 25-Dx bei der Osmoregulation und der Produktion von ZSF in Zusammenhang mit der Bindung von Progesteron ist ein Erklärungsansatz für die anti-ödematöse Wirkung des Progesterons im Gehirn (MEFFRE et al., 2005).

Aber nicht nur anti-ödematöse Wirkungen des Progesterons sind für sein neuroprotektives Potential verantwortlich. Ähnlich dem 17β -Östradiol zeigt auch Progesteron anti-apoptotische Effekte. Nach einer traumatischen Schädigung des Gehirns bei männlichen Ratten konnte durch Progesteron-Behandlung eine verminderte Expression der pro-apoptotischen Proteine „BCL-2-assoziiertes X-Protein“ (BAX) und „BCL-2-Antagonist of Cell Death“ (BAD) sowie eine vermehrte Expression der anti-apoptotischen Proteine BCL-2 und BCL-x_L im geschädigten Kortex nachgewiesen werden (YAO et al., 2005).

Auch inflammatorische Prozesse im Gehirn können durch Progesteron beeinflusst werden. Eine Kontusion des Gehirns im Bereich des präfrontalen Kortex bei männlichen Ratten wurde mit einer intraperitonealen Progesteron-Gabe nach einer und sechs Stunden über sechs Tage kombiniert. Die Progesteron-Behandlung reduzierte die Expression der inflammatorischen Zytokine Interleukin 1 β (IL-1 β) und TNF α im präfrontalen Kortex drei Stunden nach der Schädigung signifikant (HE et al., 2004).

Die neuroprotektiven Wirkungen des Progesterons beschränken sich aber nicht nur auf Schädel-Hirn-Traumata. Auch bei zerebralen Ischämien konnten im experimentellen Bereich positive Effekte von Progesteron festgestellt werden. Sowohl in Tierversuchsmodellen zu fokaler (CHEN et al., 1999) als auch zu globaler (MORALI et al., 2005) zerebraler Ischämie

konnte durch eine post-ischämische Behandlung mit Progesteron ein verminderter neuronaler Schaden erreicht werden. Die akute neuroprotektive Wirkung des Progesterons im Zusammenhang mit zerebraler Ischämie ist möglicherweise auf eine Verringerung der Exzitotoxizität zurückzuführen. Progesteron ist ein negativer Modulator des Sigma-1-Rezeptors (σ_1R), welcher wiederum die Aktivität des Glutamat-aktivierten NMDA-Rezeptors verstärkt. Durch diesen Regulationsmechanismus kann Progesteron den intrazellulären Kalziumanstieg während eines ischämischen Ereignisses im Gehirn reduzieren (CAI et al., 2008).

Da in vielen neueren epidemiologischen Studien keine Schutzwirkung der HRT oder der ERT in der Menopause z. B. beim Schlaganfall festgestellt werden konnte (siehe oben), stellt sich zumindest bei der HRT auch die Frage nach dem verwendeten Progestin. Ein vielfach in Kombination mit Östrogenen bei der HRT eingesetztes Progestin ist das synthetische Medroxyprogesteronazetat (MPA). Das natürliche Progesteron und das synthetische MPA weisen allerdings deutliche Unterschiede in ihrer neurobiologischen Wirkung auf. In unterschiedlichen Studien hatte MPA im Vergleich zu Progesteron keinerlei neuroprotektive und neurotrophe Wirkung (SINGH und SU, 2013). Im tierexperimentellen Schlaganfall-Modell bei der Ratte verminderte MPA sogar die neuroprotektive Wirkung des Östrogens. Im Striatum zeigte sich durch eine vorherige Behandlung der Tiere mit MPA und konjugierten equinen Östrogenen („conjugated equine estrogens“, CEE) ein höheres Infarktvolume als durch die Behandlung mit CEE alleine (die verwendeten Hormone und Dosierungen entsprachen einem gängigen Präparat zur HRT) (LITTLETON-KEARNEY et al., 2005). MPA könnte also ein Ansatzpunkt zur Erklärung der eher schlechten klinischen Erfahrungen mit der HRT in der Menopause in Bezug auf den Schlaganfall sein.

Progesteron wirkt also, wie auch Östrogen, durchaus neuroprotektiv. Allerdings liegt der Forschungsschwerpunkt im Fall des Progesterons auf dem Schädel-Hirn-Trauma. Im Gegensatz zu den Östrogenen im Bereich der zerebralen Ischämie erfährt Progesteron hier aber bereits eine therapeutische Anwendung im Rahmen klinischer Studien. Darüber hinaus scheint Progesteron bei ischämischen Hirnschäden durchaus ein neuroprotektives Potential zu besitzen.

2.3 Extrakorporale Zirkulation (EKZ) mit tief hypothermem Kreislaufstillstand (DHCA)

Die extrakorporale Zirkulation (EKZ) bietet im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe die Möglichkeit, den Körper des Patienten auch bei Stillstand des Herzens adäquat mit Blut und Sauerstoff zu versorgen. Mithilfe der Herz-Lungen-Maschine (HLM) wird das Blut aus dem rechten Herzen in ein Reservoir geleitet, gelangt dann über ein Schlauchsystem außerhalb des Körpers in einen Oxygenator, wird dort ausreichend mit Sauerstoff versorgt und wird dann wieder in der arteriellen Kreislauf des Patienten zurückgepumpt (LARSEN, 2012). Bei umfangreichen und komplexen Eingriffen, wie sie z. B. in der Aorten Chirurgie vorkommen, kommt zusätzlich zur EKZ noch der tief hypotherme Kreislaufstillstand („deep hypothermic circulatory arrest“, DHCA) zum Einsatz (VON SEGESSER, 2010).

2.3.1 Funktionsweise und klinische Anwendung der EKZ

Mithilfe der HLM können in der modernen Herzchirurgie Eingriffe am nicht-schlagenden Herzen mit einer weitgehenden Aufrechterhaltung der Körperperfusion durchgeführt werden. Auch Operationen am schlagenden Herzen oder an herznahen Strukturen, die die Hämodynamik negativ beeinflussen oder starke Blutungen provozieren könnten, sind mithilfe der HLM möglich. Die grundsätzliche Funktionsweise einer HLM ist dabei folgende: Über venöse Kanülen erfolgt eine Drainage des Blutes aus dem rechten Vorhof oder den Hohlvenen des Herzens in ein venöses Reservoir unterhalb des Herzniveaus. Von dort gelangt es mithilfe einer Pumpe in den Oxygenator, wo der Gasaustausch stattfindet. Das mit Sauerstoff angereicherte Blut passiert daraufhin einen arteriellen Filter, der Mikropartikel herausfiltert und somit das Risiko systemischer Embolien minimiert. Das Blut wird dann über eine Kanüle zurück in den arteriellen Kreislauf gepumpt. Die HLM besteht also aus einem Schlauchsystem mit zwischengeschalteten funktionellen Einheiten. Der Anschluss eines Wärmetauschers, der das im Oxygenator befindliche Blut durch einen Wasserkreislauf kühlt bzw. erwärmt, ist ebenfalls möglich. Als Pumpen werden auch heute noch häufig sog. „Rollerpumpen“ eingesetzt. Hier wird das Blut im komprimierbaren Plastikschauch mithilfe rotierender Rollen und Rollerbügel abschnittsweise vorwärts gedrückt. Weniger zelltraumatisch sind sog. „Zentrifugalpumpen“, bei denen das Blut zentral in ein rundes Gehäuse aufgenommen und durch einen rotierenden Pumpenkopf am hinteren Ende ausgestoßen wird. Vor Beginn einer EKZ am Patienten muss das gesamte System der HLM mit Vollelektrolytlösung (VEL) aufgefüllt und entlüftet werden. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als „Priming“. Auch ein Auffüllen mit kolloidalen Lösungen wie z. B.

Hydroxyethylstärke (HAES) oder Dextran ist möglich, um den osmotischen Druck im Gefäßsystem des Patienten aufrechtzuerhalten. Der Hämatokrit des Patienten wird nach Anschluss an die HLM durch diese Priming-Lösungen auf etwa zwei Drittel des physiologischen Normalwertes abgesenkt. Um einer unkontrollierten Gerinnung des Blutes im System der HLM entgegenzuwirken, erhält der Patient 300–400 I.E. Heparin pro kg Körpergewicht (sog. „Vollheparinisierung“). Auch der Priming-Lösung wird entsprechend Heparin zugesetzt. Während der EKZ werden EKG, Blutgase, Blutdruck, Gerinnung, Säure-Basen-Haushalt, Körpertemperatur und Urinproduktion des Patienten ständig überwacht. Nach Beendigung des eigentlichen herzchirurgischen Eingriffs und bei ausreichender Herzfunktion kann der Patient langsam von der EKZ entwöhnt werden. Der Fluss der HLM wird dann nach und nach reduziert und die Maschine letztlich vollständig ausgeschaltet. Die Heparinwirkung wird durch die Gabe von Protamin antagonisiert. Noch in der HLM vorhandenes Restblut kann dann über die arterielle Kanüle retransfundiert werden (SCHMID und PHILIPP, 2011).

2.3.2 Konzept der Hypothermie und der tief hypotherme Kreislaufstillstand

Der hypotherme Kreislaufstillstand war schon vor der ersten erfolgreichen Anwendung der HLM im Bereich der Herzchirurgie bedeutsam. Relativ einfach zu behebende Herzfehler, wie z. B. Vorhofseptumdefekte, konnten unter Hypothermie korrigiert werden. Der Patient wurde hierzu nach der Einleitung der Anästhesie mithilfe von Kühldecken oder Kühljacken abgekühlt und nach dem Eintritt des Kreislaufstillstandes am offenen Herzen operiert. Bei einer Körpertemperatur von 30 °C durfte der eigentliche Eingriff allerdings nicht länger als 5–7 min dauern, da ansonsten eine schwerwiegende ischämische Schädigung des Gehirns drohte (STONEY, 2009). Der amerikanische Arzt John Lewis führte auf diese Weise 1952 erfolgreich die erste Operation am offenen Herzen in der Geschichte durch (LEWIS und TAUFIC, 1953). Diese Methode wurde allerdings nach 1956 durch die in der Zwischenzeit gelungene Etablierung der HLM wieder aufgegeben (STONEY, 2009). Die Erkenntnisse zur Bedeutung der Hypothermie in der Herzchirurgie gehen auf Wilfred Bigelow zurück. Er beschäftigte sich Ende der 1940er Jahre intensiv mit den Nutzungsmöglichkeiten der Hypothermie bei herzchirurgischen Eingriffen (BIGELOW et al., 1950). Die zentrale Erkenntnis seiner – überwiegend an Hunden durchgeführten – Forschung war dabei, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen der Körpertemperatur und dem Sauerstoffverbrauch der Gewebe gibt. Je tiefer also die Oberflächen-induzierte Hypothermie war, desto länger konnte der betroffene Organismus einen Kreislaufstillstand ohne Gewebeschädigungen

tolerieren (SEALY, 1989). Mit der Etablierung der EKZ und der dadurch geschaffenen Möglichkeit einer kontrollierten Abkühlung des Patienten über die HLM erfuhr der hypotherme Kreislaufstillstand eine neue Bedeutung. In der heutigen Zeit kann der Großteil der herzchirurgischen Eingriffe mithilfe der HLM unter Beibehaltung der Körperperfusion durchgeführt werden. Es gibt allerdings Eingriffe, z. B. in der Aortenchirurgie, die aufgrund ihrer Komplexität und Blutungsgefahr mithilfe eines kompletten Kreislaufstillstandes durchgeführt werden müssen. Hier kommt der DHCA mit einer angestrebten Körpertemperatur von 18–20 °C zum Tragen. Eine Abkühlung der Körpertemperatur (37 °C) um jeweils 1 °C vermindert den zerebralen Stoffwechsel um 6–7 %. Als sicher wird eine Zeitspanne von 30 min DHCA betrachtet. Mit zunehmender Dauer des Kreislaufstillstandes steigt die Gefahr zerebraler ischämischer Schäden. Mehr als 60 min DHCA führen bei einem Großteil der Patienten zu nachhaltigen zerebralen Schädigungen (CONOLLY et al., 2010).

2.3.3 Zerebrale Pathophysiologie und neurologische Komplikationen nach EKZ

Trotz des enormen Fortschritts, den die Entwicklung der HLM für die Herzchirurgie mit sich gebracht hat, dürfen die pathophysiologischen Aspekte der EKZ für den Patienten nicht außer Acht gelassen werden. Im Rahmen dieser Arbeit soll vorwiegend auf die zerebralen Schädigungsmechanismen eingegangen werden, wobei durchaus Parallelen zu anderen Organsystemen existieren.

2.3.3.1 Zerebrale Hypoperfusion

Im Rahmen der EKZ wird die Blutflussrate im externen Kreislauf und damit auch im Patienten künstlich herabgesetzt, um eine mechanische Schädigung der Blutzellen zu vermeiden. Autoregulationsmechanismen des Körpers in Bezug auf den systemischen Blutdruck entfallen dabei größtenteils. Zwar wird der zerebrale Blutfluss weitgehend unabhängig und in engen Bereichen reguliert und vermag auch unterschiedliche arterielle Perfusionsdrücke innerhalb weiter Grenzen auszugleichen. Bestimmten Patientengruppen droht dennoch eine Minderperfusion des Gehirns. Menschen mit chronischem Bluthochdruck benötigen z. B. höhere systemische Perfusionsdrücke während der EKZ, um einen ausreichenden zerebralen Blutfluss aufrechterhalten zu können. Eine globale Hypoperfusion des Gehirns mit nachfolgender ischämischer Schädigung durch EKZ ist also möglich, kann aber durch ein aufmerksames Blutdruck-Regime in vielen Fällen verhindert werden (TAYLOR, 1998).

2.3.3.2 Embolien

Embolien stellen grundsätzlich ein Problem bei Eingriffen mit der HLM dar. Durch die OP-Wunde und durch den Kontakt des Blutes mit den inneren Oberflächen der HLM werden inflammatorische Prozesse und die Gerinnungskaskade im Körper aktiviert. Sowohl gasförmige als auch feste Emboli können entstehen. Die festen Emboli bestehen dabei z. B. aus Fibrin, Fett, Blutplättchen, Plättchen-Leukozytenaggregaten, Gewebepartikeln aus dem OP- Bereich oder abgeriebenen Teilchen aus der HLM. Emboli mit einem Durchmesser von mehr als 40 µm werden zwar durch den arteriellen Filter entfernt, kleinere Emboli können allerdings zurück in den Blutkreislauf des Patienten gelangen und die kleineren Kapillaren mit nur 8-10 µm Durchmesser verschließen (MURPHY und ANGELINI, 2004). Entsprechend können im Gehirn Schädigungen durch Makro- oder Mikroembolien entstehen. Makroembolien generieren sich dabei häufig aus dem Operationsgebiet selbst, durch das Ablösen eines intrakardialen oder intravaskulären Thrombus oder atheromatöser Plaques aus der aufsteigenden Aorta. Auch können kleinere und größere Menge Luft, aufgenommen in den arteriellen Kreislauf, zu Embolisierungen führen. Der Verschluss kleinerer und großer Gefäße durch Makro- und Mikroemboli kann im Gehirn zu weitreichenden ischämischen Schädigungen führen (TAYLOR, 1998).

2.3.3.3 Inflammation

Viele Faktoren tragen zu inflammatorischen Prozessen während und nach Eingriffen mit der HLM bei. Der Kontakt des Blutes mit den Oberflächen der HLM, Techniken zur Herbeiführung der Kardioplegie, allogene Bluttransfusionen und das Operationstrauma selbst führen zu einer systemischen entzündlichen Reaktion, die auch als systemisches inflammatorisches Response-Syndrom („systemic inflammatory response syndrome“, SIRS) bezeichnet wird (siehe auch Abschnitt 2.4.1). Im Zusammenhang mit dem Auftreten von Embolien kann SIRS im Rahmen der EKZ zu einem multiplen Organversagen führen, insbesondere von Herz, Lunge und Nieren. Sowohl zelluläre als auch humorale Bestandteile des Immunsystems spielen bei SIRS eine Rolle, z. B. Leukozyten oder das Komplementsystem. Von den Entzündungsmediatoren kommt besonders TNFα bei den Gewebeschädigungen nach EKZ eine Schlüsselrolle zu, aber auch weitere pro-inflammatorische Zytokine, wie z. B. Interleukin 8 (IL-8) und in eingeschränktem Maße auch Interleukin 6 (IL-6), spielen hierbei eine Rolle (MURPHY und ANGELINI, 2004). Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen systemischer und zerebraler Inflammation. Im peripheren Blutkreislauf zirkulierende inflammatorische Zytokine können z. B. unter

Umgehung der Blut-Hirn-Schranke („blood-brain barrier“, BBB) über die zirkumventrikulären Organe in das Gehirn gelangen. Ebenso gibt es Hinweise darauf, dass Zytokine aktiv von Endothelzellen durch die BBB transportiert werden (PERRY, 2004). Weiterhin kann die Permeabilität der BBB durch den Einsatz der EKZ erhöht sein (OKAMURA et al., 2010). Zusätzlich ist eine verstärkte pro-inflammatorische Genexpression im Gehirn bei systemischen inflammatorischen Zuständen möglich. Eine im Tierexperiment durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) ausgelöste systemische Inflammation bei der Ratte bewirkte die vermehrte Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α in zerebralem Kortex, Hippokampus und Kleinhirn (TURRIN et al., 2001). HINDMAN et al. (2001) konnten in einem EKZ-Modell an der Ratte zeigen, dass die Expression des inflammatorischen Enzyms Cyclooxygenase-2 (COX-2) im Gehirn nach EKZ im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant erhöht war (HINDMAN et al., 2001). Auf weitere Aspekte der zerebralen Inflammation, insbesondere auch im Hinblick auf zerebrale Ischämien, soll im Abschnitt 2.4.2 dieser Arbeit weiter eingegangen werden.

2.3.3.4 Intra- und postoperative zerebrale Hyperthermie

In gleichem Maße wie sich die Hypothermie im Rahmen der Herzchirurgie zum Herabsetzen des zerebralen Stoffwechsels und somit zur Neuroprotektion bewährt hat (s. o.), kann eine zerebrale Hyperthermie hier zu einer Verschlechterung des zerebralen Outcomes führen (GROCOTT et al., 2005). Die Wiedererwärmungsphase nach hypothermer EKZ stellt hierbei eine besonders kritische Phase dar. Hier ist in der Klinik ein sehr schneller zerebraler Temperaturanstieg bis hin zur Hyperthermie und ein damit verbundener Abfall der venösen zerebralen Sauerstoffsättigung keine Seltenheit (COOK et al., 1996). In Tierversuchsmodellen zur fokalen und zur globalen Ischämie konnte eine Verschlechterung des histologischen neuronalen Schadens durch den Einfluss der Hyperthermie nachgewiesen werden (CHEN et al., 1991; BAENA et al., 1997). Klinische Studien konnten ein verbessertes neurokognitives Outcome der Patienten durch eine langsamere (GRIGORE et al., 2002) bzw. weniger starke Wiedererwärmung (NATHAN et al., 2007) nach hypothermer EKZ zeigen. Hyperthermie fördert im Falle einer zerebralen Ischämie mehrere pathophysiologische Prozesse im Gehirn: Die Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter wie z. B. Glutamat, die Produktion von Sauerstoffradikalen, eine vermehrte Durchlässigkeit der BBB, ischämische Depolarisationen, intrazelluläre Azidose sowie die Destabilisierung des neuronalen Zytoskeletts (GINSBERG und BUSTO, 1998). Auch der postoperative Verlauf der Körpertemperatur und in diesem Zeitraum auftretende Hyperthermien können einen Einfluss auf das Auftreten neurokognitiver

Probleme bei Patienten nach Eingriffen mit EKZ haben. GROCOTT et al. (2002) fanden in einer klinischen Studie einen signifikanten Zusammenhang zwischen der maximalen Körpertemperatur innerhalb von 24 h nach konventioneller Koronararterien-Bypass-OP („coronary artery bypass graft“, CABG) und neurokognitiver Dysfunktion sechs Wochen nach dem Eingriff (GROCOTT et al., 2002). In Bezug auf die Ätiologie der Hyperthermie nach zerebraler Ischämie und operativen Eingriffen mit EKZ werden unterschiedliche Ursachen diskutiert. Im Falle der EKZ sind inflammatorische Prozesse und Fieber im Zusammenhang SIRS die wahrscheinlichste Ursache für eine Hyperthermie (SESSLER, 2005). So konnten CLARK et al. (2005) in einer retrospektiven Studie mit Patienten nach CABG einen Unterschied zwischen Eingriffen mit und ohne EKZ in Bezug auf die postoperative Hyperthermie feststellen. Diese trat nach Eingriffen ohne EKZ signifikant seltener bei den Patienten auf (CLARK et al., 2005). Bei zerebraler Ischämie mit sehr ausgeprägtem ischämischem Schaden bzw. einer Beteiligung des Hypothalamus ist auch eine Hyperthermie durch Beeinträchtigung der zentralen Thermoregulation möglich (GERRIETS et al., 2003).

2.3.3.5 Neurologische Komplikation und neurokognitive Dysfunktion in der Klinik

Postoperative neurologische und/oder neurokognitive Defizite sind nach herzchirurgischen Eingriffen unter Einsatz der HLM nicht zu unterschätzende Komplikationen. Auch wenn die Inzidenz für Schlaganfälle bei solchen Eingriffen in unterschiedlichen Studien nur mit 1,5 bis etwa 3 % angegeben wird, liegt die Inzidenz für neurokognitiven Defizite mit bis zu 60 % bedeutend höher (TAYLOR, 1998). In einer Metaanalyse verglichen VAN DIJK et al. (2000) die Ergebnisse von insgesamt 23 Studien, die sich mit dem neurokognitiven Outcome von Patienten nach CABG unter Einsatz der HLM beschäftigen. Die gepoolte Analyse von sechs vergleichbaren Studien ergab dabei einen Anteil von 22,5 % von Patienten mit kognitiven Defiziten zwei Monate nach CABG. Die kognitiven Leistungen der Patienten wurden dabei weitgehend mit standardisierten neuropsychologischen Testverfahren untersucht. Diesen Untersuchungen zufolge ist die neurokognitive Dysfunktion eine relativ häufige und daher ernstzunehmende Komplikation nach Eingriffen mit EKZ (VAN DIJK et al., 2000).

2.3.4 EKZ bei Frauen und Männern – eine Differenzierung

In den USA leiden geschätzt 83,6 Millionen Erwachsene, also in etwa jeder Dritte, an einer oder mehreren Formen kardiovaskulärer Erkrankungen („cardiovascular diseases“, CVD). Im Jahr 2009 waren diese Erkrankungen in den USA für 32,3 % aller Todesfälle verantwortlich,

wobei die koronare Herzkrankheit (KHK) dabei die größte Rolle spielte (49 % aller durch CVD hervorgerufenen Todesfälle). Dabei starben in den USA in diesem Zeitraum mehr Frauen als Männer an CVD (401.495 zu 386.436 Todesfälle) (GO et al., 2013). Auch in Deutschland belegen die kardiovaskulären Erkrankungen die vordersten Plätze der Todesursachenstatistik: Im Jahr 2012 waren die meisten Todesfälle durch die chronisch ischämische Herzkrankheit zu verzeichnen (STATISTISCHES_BUNDESAMT, 2013b), wobei auch hier mehr Frauen als Männer durch CVD verstarben (199.068 zu 150.149 Todesfälle) (STATISTISCHES_BUNDESAMT, 2013a). Diese Zahlen vermitteln einen Eindruck, welche Bedeutung kardiovaskuläre Erkrankungen für die westliche Welt insgesamt und insbesondere für die Frauen haben. Die Behandlung von CVD erfolgt dabei nicht selten auf herzchirurgischem Weg. In Deutschland wurden 2011 laut der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG) rund 100.000 Herzoperationen durchgeführt, darunter etwa 55.000 Koronararterien-Bypass-Operationen zur Behandlung der koronaren bzw. ischämischen Herzkrankheit. Dabei wurden 85 % der CABG mithilfe der Herz-Lungen-Maschine (HLM) ausgeführt (DGTHG, 2013). Der CABG ist demnach eine der häufigsten mithilfe der HLM ausgeführten Operationen und spielt auch bei der geschlechtervergleichenden Betrachtung der EKZ in der Literatur die größte Rolle. Welche geschlechtsspezifischen Besonderheiten gibt es im postoperativen Ergebnis von herzchirurgischen Eingriffen mit HLM? Welche physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen, die durch das Geschlecht beeinflusst sind, spielen hierbei eine Rolle? Und inwiefern beeinflussen Geschlecht und das Geschlechtshormon Östrogen die neurokognitive Funktion nach EKZ?

2.3.4.1 Herzchirurgische Eingriffe mit EKZ – schlechtere Ergebnisse bei Frauen?

Geschlechtsunterschiede bei den Ergebnissen herzchirurgischer Eingriffe werden kontrovers diskutiert. Es existieren zahlreiche Studien, die sich mit unterschiedlicher Mortalität, Morbidität und weiteren Gesichtspunkten dieser Eingriffe bei Frauen und Männern beschäftigen. Im Falle des CABG zeigt die überwiegende Mehrheit der Studien für Frauen eine höhere Mortalität nach solchen Eingriffen (O'CONNOR et al., 1993; KOCH et al., 1996; WOODS et al., 2003). In einigen Studien konnte das weibliche Geschlecht sogar als unabhängiger Risikofaktor für eine erhöhte perioperative Mortalität bei CABG ermittelt werden (BRANDRUP-WOGENSEN et al., 1996; EDWARDS et al., 1998; BLANKSTEIN et al., 2005). Weitere Differenzierungen sind bei diesen Ergebnissen aber notwendig. So ist in Hochrisikogruppen (EDWARDS et al., 1998) und bei den Langzeit-Ergebnissen (ab 1 Jahr

nach dem Eingriff) (BRANDRUP-WOGENSEN et al., 1996; GURU et al., 2004) beispielsweise die Mortalität von Frauen und Männern nach CABG in etwa gleich hoch.

Das präoperative Risikoprofil von weiblichen und männlichen CABG-Patienten unterscheidet sich erheblich. Frauen sind in der Regel älter und weisen höhere Inzidenzen von z. B. Diabetes mellitus, Übergewicht, Bluthochdruck und kongestivem Herzversagen auf als Männer. Weiterhin haben Frauen im Vergleich zu Männern eine kleinere Körperoberfläche (in Korrelation auch kleinere Koronararterien) und einen niedrigeren präoperativen Hämatokrit (ALDEA et al., 1999). Nicht-elektive CABG und Notfall-Eingriffe sind bei Frauen häufiger als bei Männern notwendig, was eine adäquate OP-Vorbereitung und Behandlung erschwert (EDWARDS et al., 1998; ALDEA et al., 1999). KOCH et al. (2003) kommen daher in ihrer prospektiven Beobachtungsstudie mit 2.048 CABG-Patienten zu dem Ergebnis, dass lediglich das besondere Risikoprofil und vermehrte Komorbiditäten bei Frauen zu einer vermehrten Mortalität führen und nicht das Geschlecht an sich. In einem multivariaten Modell fand hierbei eine Anpassung der Kovariaten für beide Geschlechter statt. Nach dieser Anpassung konnten keine rein geschlechtsbezogenen Unterschiede im Überleben nach CABG festgestellt werden (KOCH et al., 2003). BLANKSTEIN et al. (2005) kommen allerdings bei einer retrospektiven Studie mit 15.440 CABG-Patienten zu einem gegenteiligen Ergebnis. Nach der statistischen Anpassung aller Risikofaktoren blieb hier das weibliche Geschlecht als unabhängiger Risikofaktor für vermehrte Mortalität bestehen (BLANKSTEIN et al., 2005). Ebenfalls bemerkenswert ist, dass besonders jüngere Frauen (< 50 Jahre) verglichen mit Männern der gleichen Altersstufe eine deutlich höhere Frühmortalität nach CABG aufweisen. VACCARINO et al. (2002) zeigten in einer retrospektiven Studie, dass Frauen in der Gruppe der unter 50-Jährigen mehr als doppelt so häufig wie Männer der gleichen Altersgruppe verstarben, trotz einer statistischen Anpassung der auftretenden Risikofaktoren. Mit zunehmendem Alter sank die Risiko-angepasste Mortalität bei den Frauen im Vergleich zu den Männern, mit nur noch geringfügig höheren Werten bei den über 80-Jährigen (VACCARINO et al., 2002).

Über die Bedeutung der Vor- und/oder Begleiterkrankungen besteht im Zusammenhang mit der höheren Morbidität und Mortalität weiblicher Patienten demnach noch keine abschließende Erkenntnis. Dafür mehren sich die Hinweise, dass der Einsatz der HLM eine Rolle bei den schlechteren Ergebnissen von Frauen im Rahmen des CABG spielen könnte. Grund zu der Annahme geben klinische Studien, die einen Vergleich zwischen dem konventionellen CABG mit HLM und dem sog. „Off-pump coronary artery bypass“

(OPCAB) anstellen. Beim OPCAB wird die Bypass-OP am schlagenden Herzen und ohne HLM durchgeführt. Bei Frauen zeigte sich der OPCAB im Vergleich mit konventionellem CABG als vorteilhafter, mit geringerer Mortalität und Morbidität nach dem Eingriff (BROWN et al., 2002; MACK et al., 2004). ATHANASIOU et al. (2003) konnten in einer Studie mit männlichen und weiblichen Patienten keinen Zusammenhang zwischen weiblichem Geschlecht und vermehrter Mortalität nach OPCAB feststellen. Das Geschlecht spielte also in dieser Studie, im Gegensatz zu vielen Studien mit herkömmlichem CABG unter HLM-Einsatz, keine Rolle bei der Mortalität (ATHANASIOU et al., 2003). In einer weiteren klinischen Studie verglichen EIFERT et al. (2010) die Mortalität nach 30 Tagen und nach einem Jahr bei 3.441 Patienten (weiblich und männlich), die sich z.T. dem konventionellen CABG und z.T. dem OPCAB unterzogen. Hier zeigte sich bei den Eingriffen mit HLM eine etwa doppelt so hohe Mortalität bei den Frauen nach 30 Tagen und nach einem Jahr im Vergleich zu den Männern. Dagegen profitierten die Frauen in der OPCAB-Gruppe erheblich von dem Eingriff ohne HLM und zeigten keine signifikanten Unterschiede bei den Mortalitäten im Vergleich zu den Männern. Generell profitierten in dieser Studie lediglich die Frauen von dem Einsatz des OPCAB (EIFERT et al., 2010).

Die Ergebnisse von herzchirurgischen Eingriffen mit HLM unterscheiden sich also ganz eindeutig zwischen den beiden Geschlechtern. Auch wenn die genauen Ursachen dieses Unterschiedes noch nicht geklärt sind, scheint die Verwendung der HLM einen großen Einfluss auf das Outcome von Frauen nach CABG zu haben. Der Einsatz der HLM kann allerdings nicht bei allen Eingriffen am Herzen vermieden werden, z. B. in der Aorten Chirurgie mit zusätzlichem DHCA. Des Weiteren ist der OPCAB technisch aufwendig (CHASSOT et al., 2004) und schlechtere chirurgische Ergebnisse z. B. bei der Revaskularisation im Vergleich zum konventionellen CABG werden diskutiert (LIM et al., 2006). Deshalb sind weiterführende klinische und experimentelle Studien notwendig, um pathophysiologische Aspekte des weiblichen Geschlechts in Verbindung mit der EKZ aufzudecken und die Ergebnisse von Frauen bei herzchirurgischen Maßnahmen mit HLM zu verbessern.

2.3.4.2 Geschlechtsspezifische Pathophysiologie bei der EKZ

Über die geschlechtsspezifische Pathophysiologie nach EKZ ist bisher insgesamt wenig bekannt. Immer wieder werden Körpergröße, Körperoberfläche, Gewicht und Hämatokrit als mögliche Faktoren für ein schlechteres Ergebnis von Frauen bei Eingriffen mit HLM diskutiert. Die Hämodilution, entstehend durch das Priming mit kristalloiden Lösungen vor

Beginn der EKZ, hat grundsätzlich eine positive Wirkung bei Eingriffen mit EKZ. Durch eine Reduktion der Blut-Viskosität kann der Blutfluss leichter aufrechterhalten werden. Frauen zeigen in der Regel schon präoperativ niedrigere Hämatokritwerte, wodurch bei ihnen die Hämodilution und durch das Priming besonders ausgeprägt sein kann. Eine kleinere Körperoberfläche ist sowohl bei Männern als auch bei Frauen häufig mit niedrigeren Hämatokritwerten assoziiert (DEFOE et al., 2001). Sehr niedrige Hämatokritwerte während der EKZ sind mit höherer postoperativer Mortalität und Morbidität verbunden (DEFOE et al., 2001; HABIB et al., 2003). Da diese Problematik aber auch bei Männern mit geringerer Körperoberfläche beobachtet werden konnte, ist ein geschlechtsspezifischer pathophysiologischer Mechanismus unwahrscheinlich. CHRISTAKIS et al. (1995) konnten auch nach statistischer Anpassung für die Faktoren Körpergröße, Körperoberfläche, Gewicht und Body-Mass-Index (BMI) das weibliche Geschlecht als unabhängigen Risikofaktor für postoperative Mortalität nach CABG ausmachen (CHRISTAKIS et al., 1995).

Einige Erkenntnisse zu tatsächlich geschlechtsspezifischen Mechanismen gibt es mittlerweile bezüglich der Inflammation während EKZ. Bei herzchirurgischen Eingriffen an pädiatrischen Patienten mit HLM konnte gezeigt werden, dass die EKZ Einfluss auf die Plasmaspiegel von Östradiol und Progesteron nimmt: Der Östradiol-Spiegel fällt ab, während der Progesteronspiegel nach EKZ im Plasma der Patienten ansteigt (TROTTER et al., 1997). In einer weiteren Studie, ebenfalls mit pädiatrischen Patienten, konnte auch ein Anstieg von Progesteron im Plasma beider Geschlechter nach CABG mit EKZ nachgewiesen werden. Weiterhin wiesen die Mädchen in der Studie nach dem Eingriff signifikant höhere Plasmaspiegel des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin-10 (IL-10) im Vergleich zu den Jungen auf. Die Morbidität in Bezug auf das multiple Organversagen war bei den Mädchen ebenfalls signifikant geringer. Da die Gonaden bei diesen präpubertären Patienten als Ursprungsort für die Geschlechtshormone weitgehend ausscheiden, werden andere Mechanismen diskutiert, die zu der Erhöhung der Geschlechtshormonspiegel nach EKZ führen könnten (TROTTER et al., 2001). Eine Stimulation der Nebenniere, wie sie auch für das Mineralokortikoid Aldosteron beobachtet wurde (BURCH et al., 1992; BARTA et al., 1980), wäre denkbar. Da gonadale Steroidhormone wie Östrogen und Progesteron durchaus auch anti-inflammatorisches Potential besitzen (s. o.), ergeben sich durch die Ergebnisse von TROTTER et al. (2001) Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen, besonders auch an adulten EKZ-Patienten. Die Tatsache, dass trotz erhöhter Progesteronspiegel bei beiden Geschlechtern lediglich die Mädchen erhöhte IL-10-Spiegel aufwiesen, könnte auch auf

weitere, hormonunabhängige, geschlechtsspezifische Mechanismen hinweisen (SEGHAYE et al., 2001).

Die Bedeutung des Komplementsystems für inflammatorische Vorgänge nach EKZ scheint ebenfalls geschlechtsspezifisch unterschiedlich zu sein. Der lösliche humane Komplement-Rezeptor Typ 1 (TP10) ist ein starker Inhibitor der Komplementaktivierung. Die intravenöse Verabreichung von TP10 bei männlichen Hochrisikopatienten vor EKZ führte zu einer deutlich verminderten Mortalität und Morbidität (LAZAR et al., 2004). Bei weiblichen Hochrisikopatienten bewirkte die Verabreichung von TP10 vor EKZ zwar ebenfalls eine effektive Verminderung der Komplement-Aktivierung, hatte aber keinerlei Effekt auf das klinische Outcome oder die Mortalität (LAZAR et al., 2007).

Die vorliegenden Studien geben erste Hinweise auf physiologische und pathophysiologische Vorgänge während und nach EKZ, die vom Geschlecht bzw. von Geschlechtshormonen beeinflusst werden können.

2.3.5 Geschlecht, Geschlechtshormonstatus und neurokognitive Dysfunktion nach EKZ

Viele klinische Studien, die Geschlechtsunterschiede bei herzchirurgischen Eingriffen mit EKZ untersuchen, beschäftigen sich lediglich mit der Mortalität (s. o.). VACCARINO et al. (2003) stellten aber in einer prospektiven observatorischen Studie mit insgesamt 1.113 Patienten fest, dass Frauen nach CABG auch eine schlechtere Rekonvaleszenz mit vermehrten Komplikationen, vermindertem Erfolg des operativen Eingriffs und häufigeren Depressionen aufweisen. Auch nach einer statistischen Anpassung der soziodemographischen Unterschiede und der medizinischen Risikofaktoren für beide Geschlechter blieben die Unterschiede signifikant. So mussten z. B. die Frauen in dem beobachteten Zeitraum (6–8 Wochen nach CABG) fast doppelt so häufig in ein Krankenhaus zurücküberwiesen werden als die Männer (VACCARINO et al., 2003). Auch ein Jahr nach CABG waren Frauen in einer Studie von PHILLIPS BUTE et al. (2003) im Vergleich zu Männern stärker eingeschränkt in ihrem Alltagsleben, zeigten vermehrt kognitive Probleme, womit auch eine verminderte Lebensqualität assoziiert war (PHILLIPS BUTE et al., 2003). Und auch weitere Untersuchungen zeigen: Frauen sind nach Herzchirurgie mit EKZ gefährdeter für neurologische Komplikationen, wie z. B. Schlaganfall (HOGUE et al., 1999; HEDBERG et al., 2011) und neurologische Defizite (HOGUE et al., 2001a; HOGUE et al., 2001b). Eine Studie über das neurokognitive Outcome postmenopausaler Frauen nach CABG bzw. CABG

mit Herzklappen-OP zeigte, dass hier unter anderem höheres Lebensalter, Atherosklerose der aufsteigenden Aorta und eine längere EKZ-Dauer Risikofaktoren für die Entwicklung einer postoperativen neurokognitiven Dysfunktion sind (HOGUE et al., 2008). Östrogen-Substitution zeigt positive Effekte bei globaler und fokaler zerebraler Ischämie im Tierexperiment (s. o.). Dennoch konnte in einer prospektiven, randomisierten und doppelblinden klinischen Studie mit postmenopausalen Herzchirurgie-Patientinnen keine positive Wirkung einer Östrogen-Substitution auf das postoperative neurokognitive Outcome festgestellt werden. Die Patientinnen erhielten hierbei vom ersten präoperativen bis zum fünften postoperativen Tag entweder 17 β -Östradiol oder ein Placebo (HOGUE et al., 2007). In einer aktuellen CABG-Richtlinie aus den USA wird eine postmenopausale HRT bei CABG aufgrund des derzeitigen Kenntnisstandes nicht empfohlen. Es wird sogar zu einem Absetzen der HRT vor elektivem CABG bei Frauen nach der Menopause geraten (HILLIS et al., 2011).

2.4 Inflammation

Die Inflammation stellt einen komplexen und essentiellen Schutzmechanismus des Körpers gegenüber schädigenden Einflüssen von innen und außen dar. Die Vermittlung der Entzündungsantwort geschieht dabei, ausgehend von den Blutgefäßen und der Mikrozirkulation, insbesondere durch Leukozyten in Blut und Gewebe, Plasmaproteine und unterschiedliche Entzündungsmediatoren in Form von Peptiden und Proteinen. Entzündlichen Reaktionen kommt im Rahmen der Pathologie eine wichtige Bedeutung zu, da sie sowohl bei einer akuten Schädigung des Organismus als auch bei vielen chronischen Erkrankungen eine Rolle spielen. Die ersten vier Kardinalsymptome der Entzündung – *rubor* (Rötung), *tumor* (Schwellung), *calor* (vermehrte Wärme) und *dolor* (Schmerz) – wurden schon seit dem 1. Jhd. vor Christus durch den römischen Medizinschriftsteller Celsus bekannt. Das fünfte Kardinalsymptom – *functio laesa* (Funktionsverlust) – wurde im 19. Jhd. vom deutschen Arzt Rudolf Virchow hinzugefügt (KUMAR et al., 2009).

2.4.1 Akute systemische Inflammation

Akute Entzündungsreaktionen im Körper werden durch verschiedene Stimuli ausgelöst: Infektionen mit Mikroorganismen oder Parasiten, Gewebnekrosen durch unterschiedliche Traumata wie z. B. Ischämien, das Eindringen von Fremdkörpern bzw. das Einbringen von Fremdmaterialien in den Organismus sowie überschießende Immunreaktionen im Rahmen von z. B. Allergien oder Autoimmunerkrankungen. Infolge solcher Stimuli kommt es zu

Veränderungen in der Mikrozirkulation. Eine Vasodilatation, ausgelöst u. a. durch Histamin und NO, führt zu einer vermehrten kapillaren Durchblutung und zu einem verstärkten Blutfluss. Eine erhöhte Gefäßpermeabilität ermöglicht das vermehrte Austreten von Flüssigkeit, zirkulierenden Leukozyten und Plasmaproteinen in interstitielles Gewebe und Körperhöhlen. Die zunehmende Viskosität des Blutes, auch Blut-Stase genannt, führt zu einem langsameren Blutfluss und ermöglicht den Leukozyten eine Akkumulation entlang des Gefäßendothels. Von Entzündungszellen produzierte Zytokine aktivieren darüber hinaus endotheliale Zellen zu einer vermehrten Produktion von Adhäsionsmolekülen. Die Leukozyten, vorwiegend neutrophile Granulozyten (NG), können dadurch effektiv an der Gefäßwand anhaften und noch zahlreicher durch die Gefäßwände in das Interstitium austreten, wobei man auch von der sog. „Leukozytenmigration“ spricht. Die Auswanderung der Leukozyten in das Gewebe wird durch die sog. „Chemotaxis“ gesteuert. Hierbei wandern die Abwehrzellen entlang eines chemischen Gradienten, der unter anderem von unterschiedlichen chemischen Mediatoren gebildet wird. Zu diesen Mediatoren zählen: Zytokine – insbesondere aus der Familie der Chemokine (z. B. IL-8) –, Bestandteile des Komplementsystems (v. a. Komplementfaktor C5a) und Arachidonsäure-Metaboliten (v. a. Leukotrien-B4 [LTB₄]). Die Leukozyten-Art variiert je nach Auslöser der Entzündung und im Zeitverlauf. Bei den meisten Formen von akuter Entzündung dominieren NG das Geschehen und werden nach einer gewissen Zeit (24–48 h) von Monozyten ersetzt (KUMAR et al., 2009).

Monozyten sind die im Blut zirkulierenden Vorläuferzellen der Gewebsmakrophagen. Monozyten können, wie NG, den Blutkreislauf im Rahmen entzündlicher Reaktionen verlassen und differenzieren sich dann im Gewebe zu Makrophagen aus, mit der Fähigkeit der sog. „Phagozytose“, d. h. der Aufnahme kleiner, belebter und unbelebter Partikel. Neben der Phagozytose haben Makrophagen aber noch viele weitere Funktionen im Rahmen der Entzündung. Sie können z. B. durch die Produktion von pro-apoptotischen Zytokinen (z. B. TNF α) und von Sauerstoffradikalen bei anderen Entzündungszellen und auch bei Parenchym- und Stromazellen im Gewebe den programmierten Zelltod auslösen. Frisch differenzierte sog. „naive Makrophagen“ lassen sich im Rahmen der Inflammation klassisch oder alternativ aktivieren. Die klassische Aktivierung erfolgt z. B. durch Interferon-Gamma (IFN- γ) und weitere pro-inflammatorische Zytokine und führt zu einer gesteigerten Effizienz der Makrophagen mit vermehrter Apoptose und Gewebeschädigung. Die alternative Aktivierung z. B. durch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 generiert Makrophagen, die vermehrt

anti-inflammatorische Zytokine produzieren, Antigene präsentieren und die Bildung von Gewebematrix und damit die Heilung fördern (DUFFIELD, 2003).

Zytokine sind Entzündungsmediatoren und werden als Proteine von aktivierten Lymphozyten, Makrophagen aber auch weiteren Zellen, wie z. B. Endothelzellen synthetisiert. Die bedeutsamsten Zytokine im Rahmen der akuten Inflammation sind Interleukin-1 (IL-1) und $\text{TNF}\alpha$. Sie werden insbesondere von aktivierten Makrophagen produziert. IL-1 und $\text{TNF}\alpha$ üben ihre Wirkung durch Effekte auf Gefäßendothel, Leukozyten und Fibroblasten aus und können sog. „Akute-Phase-Reaktionen“ (APR) des Körpers einleiten (siehe Abb. 06) (KUMAR et al., 2009). Bei der APR wird eine Ereigniskette in Gang gesetzt, die zur Produktion von weiteren Zytokinen und inflammatorischen Mediatoren führt. Diese gelangen über den Extrazellularraum in den Blutkreislauf und beeinflussen auch den Hypothalamus und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse. Neben unterschiedlichen klinischen Reaktionen, wie z. B. Fieber und Anorexie, folgt auch eine Veränderung des Leberstoffwechsels mit einer vermehrten Produktion der sog. „Akute-Phase-Proteine“ (APP). Weiterhin werden z. B. Komplement- und Gerinnungssystem aktiviert. Zu den auslösenden Zytokinen zählt bei der APR neben IL-1 und $\text{TNF}\alpha$ auch Interleukin-6 (IL-6) (GRUYS et al., 2005).

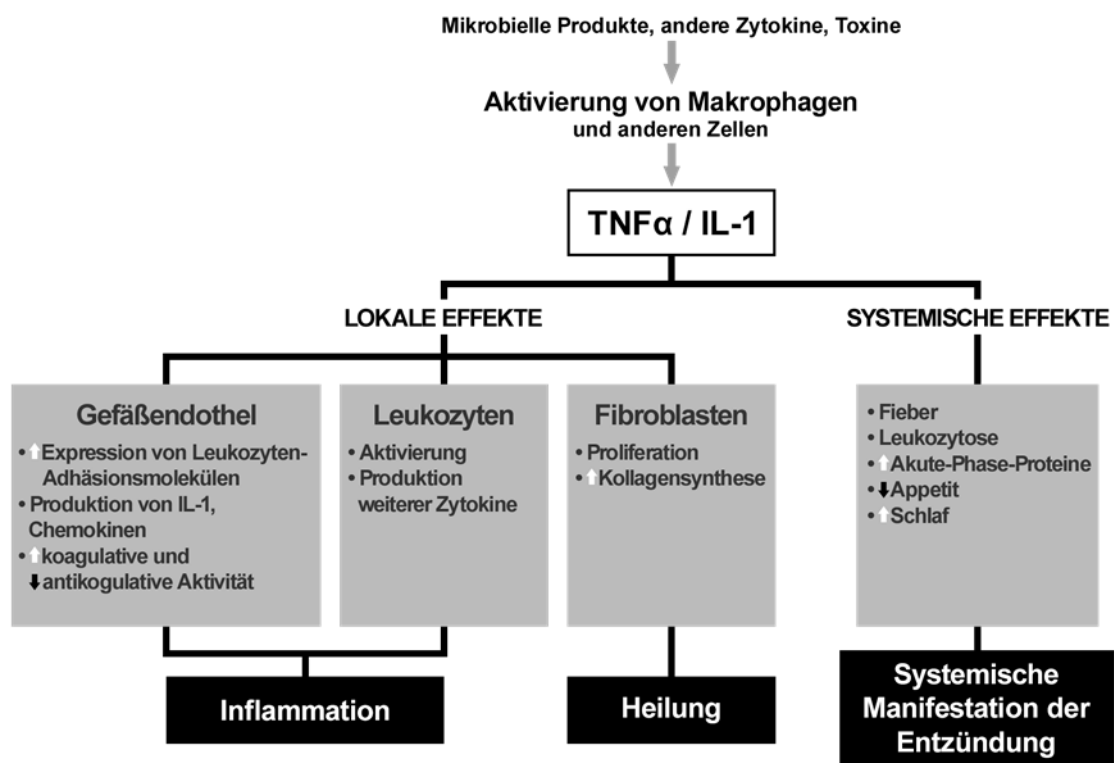


Abb. 06: Durch die Zytokine Tumornekrosefaktor α ($\text{TNF}\alpha$) und Interleukin-1 (IL-1) vermittelte lokale und systemische Effekte im Rahmen der Entzündungsantwort (modifiziert nach KUMAR et al., 2009)

Eine Schlüsselrolle bei der Regulation inflammatorischer Vorgänge nimmt der Transkriptionsfaktor NF- κ B ein (zu NF- κ B und Östrogen siehe auch Abschnitt 2.2.1.2). NF- κ B kann durch über 150 verschiedene Stimuli, darunter verschiedene Bakterien, Toxine, Viren, Zytokine sowie APP induziert werden und reguliert die Expression von ebenso vielen Zielgenen, die u. a. für Zytokine, Immunrezeptoren, APP und Wachstumsfaktoren kodieren. Aber nicht nur Mikroorganismen oder Entzündungsmediatoren, sondern auch unspezifische Schädigungsmechanismen, wie z. B. Ischämie/Reperfusion oder oxidativer Stress können NF- κ B aktivieren (PAHL, 1999). TNF α wird durch Induktion von NF- κ B vermehrt exprimiert und führt seinerseits durch Rezeptorwirkungen zu einer vermehrten NF- κ B-Aktion. Dies ist ein Beispiel für Vervielfältigung und Weiterverbreitung der Zytokin-Antwort durch NF- κ B (HAYDEN et al., 2006).

In der Klinik gibt es per definitionem verschiedene Formen von akuten systemischen Entzündungen, die sich z.T. in ihrer Ätiologie und z.T. in ihrem Schweregrad unterscheiden. Generell spricht man bei generalisierten inflammatorischen Vorgängen nach unterschiedlichen Insulten (z. B. chirurgische Eingriffe, Traumata oder Ischämie) vom sog. „SIRS“ (siehe auch Abschnitt 2.3.3.3). Kriterien zur Diagnose von SIRS sind (1) Fieber oder Hypothermie ($> 38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36^{\circ}\text{C}$ Körpertemperatur), (2) eine Herzfrequenz über 90 Schläge/min, (3) Tachypnoe (> 20 Atemzüge/min), (4) Leukozytose oder Leukopenie, wobei mindestens zwei der Kriterien zutreffen müssen. Ist SIRS das Ergebnis einer Infektion (z. B. bakteriell, viral) spricht man von der sog. „Sepsis“. Die Sepsis kann sich zu einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock ausweiten, wobei zunehmend Hypoperfusion, Hypotension und Organdysfunktionen als Komplikationen auftreten. Sowohl SIRS als auch Sepsis können als schwere Komplikation das sog. „Multiorgandysfunktions-Syndrom“ (MODS) beinhalten. MODS äußert sich in einem klinisch schwer kranken Patienten, der nur durch technische Unterstützung und intensive medizinische Betreuung am Leben erhalten werden kann (BONE et al., 1992). Für auslösende Faktoren und Regulationsmechanismen bei SIRS und MODS siehe Abb. 07.

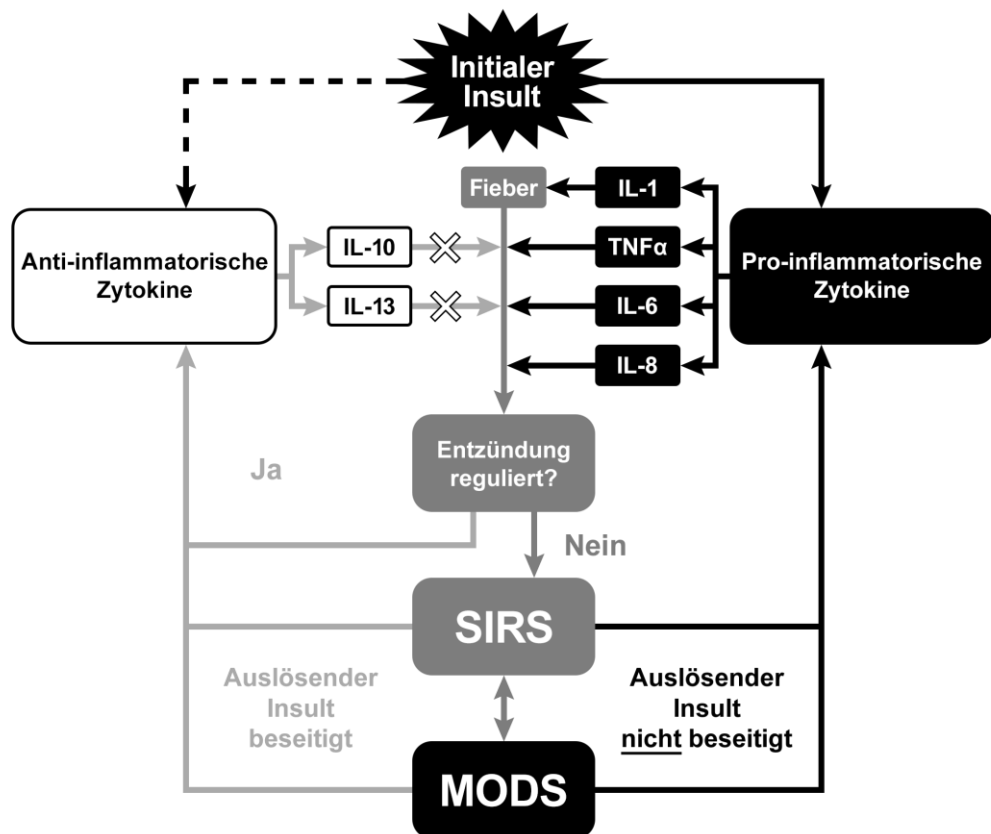


Abb. 07: Entstehung und Regulation des „Systemischen inflammatorischen Response-Syndroms“ (SIRS) und des „Multiorgandysfunktions-Syndroms“ (MODS); beteiligt sind pro- und anti-inflammatorischen Zytokine, darunter Interleukine (IL) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) (modifiziert nach JAFFER et al., 2010).

2.4.2 Zerebrale Inflammation

Das Gehirn kann zu einem großen Teil als ein „immunprivilegiertes“ Organ angesehen werden, in welchem die lokale Immunantwort zum Schutz seiner empfindlichen Strukturen durch unterschiedliche Mechanismen eingeschränkt wird. Und dennoch gibt es sehr wohl eine Immunantwort und folglich auch eine Entzündungsantwort im Gehirn, die sich in besonderer Weise von den strukturellen Gegebenheiten anderer Organsysteme unterscheidet. Auch im ZNS gibt es verschiedene Stimuli von Entzündungsreaktionen. Von Bedeutung sind insbesondere bakterielle oder virale Infektionen mit nachfolgender Meningitis oder Meningoenzephalitis, chronische Autoimmunreaktionen wie z. B. bei Multipler Sklerose (MS) und neuronale Schädigungen durch neurodegenerative Erkrankungen (z. B. Alzheimer-Krankheit), Trauma oder ischämische Ereignisse (z. B. Schlaganfall) (AKTAS et al., 2007). Entzündliche Reaktionen spielen bei zerebralen Ischämien wie dem Schlaganfall eine nicht zu unterschätzende Rolle. Sie können auch noch Tage nach dem auslösenden Insult im Gehirn

fortschreiten und somit für das endgültige Ausmaß der Hirnschädigung und das neurologische Outcome des Patienten bedeutsam sein (IADECOLA und ALEXANDER, 2001).

2.4.2.1 Ablauf und zelluläre Vermittlung der Entzündungsantwort im Gehirn

Das Gehirn weist viele immunologische Besonderheiten auf. Auch wenn hier grundsätzliche Mechanismen der Immunantwort wie in anderen Geweben des Körpers ablaufen, unterstreichen insbesondere die BBB und das einzigartige Zellspektrum die Sonderstellung des Gehirns im Organismus (FABRY et al., 1994).

2.4.2.1.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Die BBB ist eine morphologische und funktionelle Barriere, die das Gehirn vor körperfremden aber auch vor körpereigenen schädlichen Einflüssen aus dem Blutkreislauf schützen soll. Sie besteht aus spezifischen Endothelzellen, einer Basalmembran sowie umgebenden Astrozyten und Perizyten. Sehr enge Verbindungen zwischen den Endothelzellen, die sog. „Tight Junctions“ weisen einen hohen elektrischen Widerstand auf und verhindern so weitgehend die parazelluläre Diffusion. Die Endothelzellen der zerebralen Mikrogefäße sind beinahe vollständig von Ausläufern der Astrozyten, sog. „Endfüßchen“, umgeben. Die Perizyten mit einer hohen Phagozytose-Aktivität bilden eine weitere Schutzlinie. Die BBB ist somit relativ undurchdringlich für Proteine, Ionen, viele kleine Peptide und Aminosäuren. Es existiert allerdings eine sog. „selektive Permeabilität“, die den Transport von z. B. Nährstoffen ermöglicht. Auch für Zellen des hämatopoetischen Systems wie z. B. Leukozyten ist die BBB des gesunden Gehirns nicht überwindbar (FABRY et al., 1994). Physiologischerweise ist das Gehirn mit intakter BBB also weitgehend vom peripheren Immunsystem abgeschirmt. Es besitzt deshalb ein eigenes immunologisches Netzwerk, in dem v. a. die Gliazellen – insbesondere die Mikroglia und Astrozyten – eine entscheidende Rolle spielen (TIAN et al., 2012).

2.4.2.1.2 Mikroglia

Mikroglia – kleine Gliazellen im ZNS – sind anders als die klassische Neuroglia (u. a. Astrozyten, Ependymzellen und Oligodendrozyten) mesodermalen Ursprungs. Sie stellen die Gewebemakrophagen des ZNS dar und sind somit entscheidende Bestandteile der angeborenen Immunität im Gehirn. Es können drei Hauptphänotypen von Mikrogliazellen unterschieden werden: Embryonale Mikroglia besitzen den sog. „amöboiden Phänotyp“ und stellen phagozytierende und immunkompetente Zellen dar; mit zunehmender Entwicklung des

Gehirns transformieren die amöboiden Mikroglia in den sog. „ruhenden bzw. ramifizierten Phänotyp“ ohne Phagozytose und immunologische Effektivität; kommt es zu Schädigungen im ZNS, erfolgt die Umwandlung in die sog. „aktivierte Mikroglia“, die im Extremfall auch wieder in der amöboiden Form in Erscheinung tritt (siehe Abb. 08). Der Begriff „ruhende Mikroglia“ ist aber durchaus missverständlich, da diese Zellen in keinem Fall inaktiv sind. Vielmehr stellen auch diese Mikrogliazellen extrem aktive Zellen dar, die mit ihren zahlreichen Fortsätzen stets ihre Umgebung „überwachen“ und auf Unversehrtheit überprüfen. Man spricht deshalb auch von der Mikroglia als „Alarmsystem des ZNS“ (VERKHRATSKY und BUTT, 2013).



Abb. 08: Schematische Darstellung der drei Hauptphänotypen von Mikrogliazellen (modifiziert nach VERKHRATSKY und BUTT, 2013)

Viele Moleküle – darunter Peptide, Lipoproteine, Glykolipide und Nukleotide – und pathophysiologische Zustände (z. B. O₂-Mangel, Glukosemangel) können im Gehirn eine Aktivierung der Mikroglia hervorrufen. Ist die strukturelle und funktionelle Integrität des ZNS bedroht, können Fremdfaktoren (z. B. mikrobielle Strukturen, Serum-Komponenten) oder Faktoren in einer ungewöhnlich hohen Konzentration (z. B. intrazelluläre Bestandteile) von Mikrogliazellen erfasst werden. Dafür besitzen sie unterschiedliche Rezeptoren, z. B. aus der Familie der sog. „Mustererkennungsrezeptoren“ („Pattern recognition receptors“, PRR). Zu den PRR gehören auch die sog. „Toll-like-Rezeptoren“ (TLR), die mikrobielle Strukturen detektieren können. Darüber hinaus gibt es aber auch konstitutive Signale neuronaler Integrität, die durch spezifische Ligand-Rezeptor-Komplexe eine „Ruhigstellung“ der Mikroglia bewirken (s. u.). Bei einer Unterbrechung dieser „Ruhesignale“ durch z. B. neuronale Schädigung erfolgt ebenfalls eine Aktivierung der Mikroglia (HANISCH und KETTENMANN, 2007). Wie die Makrophagen in der Peripherie des Körpers haben auch die Mikrogliazellen ein breites funktionelles Spektrum. Dazu gehören Phagozytose,

Antigenpräsentation, die Produktion von Radikalen (z. B. NO, s. u.) und die Produktion immunregulatorischer Moleküle (z. B. Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren).

Die Phagozytose-Aktivität der Mikroglia ist insbesondere auch im Rahmen der neuronalen Apoptose bedeutsam, sowohl während der embryonalen Gehirnentwicklung als auch bei pathologischen Prozessen im ZNS. Diese „Reinigungsfunktion“ der Mikroglia wird von verschiedenen Zytokinen (z. B. TNF α und Interleukin-4) und auch exogenen Stimuli (z. B. LPS) beeinflusst und moduliert. Im Gegensatz zu typischen antigenpräsentierenden Zellen im ZNS, wie z. B. den dendritischen Zellen, ist die Expression der Klasse-II-Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes („Major histocompatibility complex“, MHC) bei der Mikroglia weitgehend unterdrückt. Bei neurologischen Schädigungen im Rahmen von z. B. Infektionen, Autoimmunerkrankungen oder Ischämien findet allerdings eine vermehrte Expression der MHC-Klasse-II-Moleküle bei Mikrogliazellen statt, wodurch ihnen ein wichtiges antigenpräsentierendes Potential zukommt (TAMBUYZER et al., 2009).

Die Produktion von Zytokinen und Chemokinen durch Mikroglia spielt insbesondere auch bei zerebraler Inflammation im Rahmen ischämischer Ereignisse eine wichtige Rolle. Werden Mikrogliazellen durch die Signale ischämisch geschädigter Neurone aktiviert, beginnen sie sehr schnell mit der Transkription und Synthese zahlreicher Effektormoleküle, darunter auch pro-inflammatorische Zytokine. Diese pro-inflammatorischen Zytokine, insbesondere TNF α und IL-1 β , werden mittlerweile als Hauptfaktoren für den sekundären neuronalen Zelltod nach zerebraler Ischämie diskutiert. Chemokine stellen die wichtigste Gruppe interzellulärer Botenstoffe in der frühen Phase zerebraler Ischämien dar. Im Gehirn werden sie von Neuronen und benachbarten Gliazellen produziert und in Extrazellulärraum und Zerebrospinalflüssigkeit abgegeben, um Mikroglia aus entfernten Bereichen des Gehirns und Makrophagen aus der Peripherie zu rekrutieren (LAI und TODD, 2006). Das Chemokin IL-8 und sein zugehöriger Rezeptor CXC-Motiv-Chemokinrezeptor-2 (auch CXCR2) sind für ihre Wirkung bei der sog. „Chemotaxis“ und der „Leukozytenmigration“ nach zerebraler Ischämie und nachfolgender Reperfusion bekannt. Insbesondere die Infiltration mit NG spielt bei IL-8 eine Rolle (GARAU et al., 2006). Im Tierexperiment mit globaler Ischämie und anschließender Reperfusion bei Affen konnte gezeigt werden, dass IL-8 und CXCR2 auch bei der Aktivierung und Akkumulation von Mikroglia im Hippokampus nach Ischämie/Reperfusion bedeutsam sind. Bei den Tieren mit Ischämie/Reperfusion (nicht bei den Kontrolltieren) konnte ab 30 min nach dem Start der Reperfusion eine vermehrte Anzahl

von Mikrogliazellen sowie eine vermehrte Expression von CXCR2 und IL-8 in der CA1-Region des Hippokampus festgestellt werden (POPIVANOVA et al., 2003).

Mithilfe von zwei Enzymen, der sog. „Phagozytischen NADPH-Oxidase“ (PHOX) und der iNOS sind Mikrogliazellen im Rahmen der zerebralen Inflammation in der Lage, z. B. mikrobielle Pathogene zu zerstören. Durch die gleichen Mechanismen kann es aber auch zur Neurodegeneration und zur neuronalen Apoptose u. a. bei der zerebralen Ischämie kommen. PHOX wird auch im gesunden Gehirn in einem hohen Maße in der Mikroglia exprimiert, aber erst durch z. B. $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , Chemokine, ATP oder phagozytische Aktivität aktiviert. Nach der Aktivierung produziert PHOX eine große Menge an extrazellulären Hyperoxiden, welche den ROS zugerechnet werden. Diese Hyperoxide können durch die extrazelluläre SOD zu H_2O_2 umgewandelt werden oder zusammen mit NO Peroxynitrit, eine reaktive Stickstoffspezies, bilden. Mithilfe von H_2O_2 und Peroxynitrit können Mikrogliazellen z. B. Bakterien im Rahmen einer bakteriellen Meningoenzephalitis zerstören. Die Aktivität von PHOX alleine trägt zwar nicht zum neuronalen Zelltod bei, sie stimuliert aber die Proliferation der Mikroglia, die Produktion von $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 β sowie die Expression von iNOS. Die Expression von iNOS erfolgt im Gegensatz zu PHOX nicht im gesunden Gehirn, sondern wird durch inflammatorische Mediatoren wie Zytokine oder LPS stimuliert. Die in der Mikroglia und Astroglia exprimierte iNOS produziert große Mengen an NO. NO kann den neuronalen Zelltod durch die kompetitive Hemmung der Cytochrom-c-Oxidase (COX) in Mitochondrien induzieren. Die Hemmung der neuronalen Atmungskette führt zur neuronalen Depolarisation und daraufhin zu Glutamat-Ausstrom und folglich Exzitotoxizität. Dies erfordert allerdings einen extrem hohen Spiegel an NO. Aber auch weniger hohe NO-Spiegel können in Kombination mit weiteren Faktoren zur neuronalen Apoptose führen: Im Zusammenhang mit zerebraler Ischämie auftretende Hypoxie fördert z. B. die Hemmung der COX über eine vermehrte Verdrängung von O_2 durch NO. Die gleichzeitige Aktivität von PHOX und iNOS führt – mediiert durch Peroxynitrit – zu einer manifesten Apoptose eines Großteils der Neurone in geschädigten Gehirnarealen (BROWN und NEHER, 2010).

2.4.2.1.3 Astroglia

Astrozyten sind die am weitesten verbreiteten Gliazellen im ZNS und tragen beim Säugetiergehirn in etwa zur Hälfte des Gesamtvolumens bei. Ihr Name, aus dem Lateinischen für „Sternzelle“ abgeleitet, bezieht sich auf die zahlreichen strahlenförmig angeordneten zytoplasmatischen Fortsätze dieser Zellen. Durch diese Fortsätze stehen sie mit allen wichtigen morphologischen und funktionellen Einheiten der Neurone in Verbindung (z. B.

Zellkörper, Axone, Dendriten und Synapsen). Grundsätzlich können die Astrozyten in den sog. „protoplasmatischen Typ“ (auch protoplasmatische Glia) und in den sog. „fibrösen Typ“ (auch Faserglia) eingeteilt werden, wobei sich die protoplasmatische Glia mit kürzeren Fortsätzen eher in der grauen Substanz und die Faserglia mit längeren Fortsätzen eher in der weißen Substanz befindet. Die Astroglia erfüllt zahlreiche wichtige Aufgaben im ZNS, darunter den Erhalt der Integrität der BBB, die Aufnahme von Glutamat und Gamma-Aminobuttersäure (GABA) aus dem Extrazellulärraum, die Aufrechterhaltung des extrazellulären Ionen-Milieus und die Unterstützung des neuronalen Stoffwechsels. Astrozyten nehmen aber auch an der Verarbeitung von Informationsprozessen im Gehirn teil und besitzen, wie Neurone, eine Vielzahl von Neurotransmitter-Rezeptoren in ihrer Zellmembran. Bei pathologischen Zuständen mit neuronaler Schädigung im Gehirn kommt es zu einer Aktivierung und Proliferation von Astrozyten; man spricht dann in diesem Bereich von einer sog. „Astrogliose“ oder auch „Astrozytose“ (GARMAN, 2011). In Extremfällen kann die Astrogliose zur Ausbildung einer sog. „Glianarbe“ führen, die eine Regeneration neuronaler Axone verhindert. Grundsätzlich gibt es unterschiedliche Schweregrade der Astrogliose, abhängig von Art und Schwere des ZNS-Insults. Sie stellt aber in jedem Fall ein fein abgestimmtes Aufeinanderfolgen von progressiven Veränderungen in Genexpression und Zellantwort dar und kann sowohl schädliche als auch nützliche Auswirkungen auf betroffene Neurone und umgebende Zellen haben (SOFRONIEW, 2009). Im Rahmen der zerebralen Ischämie sind nicht nur Neurone, sondern auch die Astrozyten von der Reduktion des Blutflusses im Gehirn betroffen. Durch den auftretenden Energieverlust kommt es in der Folge zu Zellschwellungen, einer Erhöhung des intrazerebralen Drucks und damit einer weiteren Reduktion der Gehirnperfusion. Protektive Eigenschaften der Astrozyten wie z. B. die Aufnahme von Glutamat werden unter diesen Bedingungen zunehmend negativ beeinflusst, mit zunehmender Astrozytenschwellung kann es sogar zu einer Abgabe von Glutamat in den Extrazellulärraum und damit einer verstärkten Exzitotoxizität im ischämischen Bereich kommen. Durch den ischämischen Insult wird eine reaktive Zellantwort in den Astrozyten ausgelöst, die u. a. zur Produktion und Abgabe von zahlreichen Zytokinen führen kann. Astrozyten können ähnlich wie die Mikroglia als immunkompetente Zellen während pathologischer Zustände fungieren und sind z. B. eine Hauptquelle für $\text{TNF}\alpha$ bei zerebraler Inflammation. Aber auch die pro-inflammatorischen Zytokine $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta 1$ („Transforming growth factor- $\beta 1$, $\text{TGF-}\beta 1$) können von Astrozyten exprimiert werden (MARKIEWICZ und LUKOMSKA, 2006). $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und $\text{IL-1}\beta$ spielen eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung der Entzündungsantwort im Gehirn,

sie vermitteln die Entstehung von Fieber, die Aktivierung der Immunantwort und die Abgabe weiterer Zytokine. Weiterhin können $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und IL-1 β die Permeabilität der BBB erhöhen, was *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden konnte (VRIES et al., 1997). Dies trägt auch zu einer vermehrten Migration von Leukozyten und weiteren Blutzellen (z. B. Thrombozyten) in zerebrales Parenchym bei Ischämien bei. Schon wenige Minuten nach einem ischämischen Insult beginnt die Rekrutierung von Leukozyten in den geschädigten Bereichen des Gehirns, vermittelt über Adhäsionsmoleküle und ausgelöst durch Zytokine (u. a. $\text{TNF}\alpha$) und weitere Mediatoren. Die Leukozyten-Rekrutierung kann Tage bis Wochen nach dem ursprünglichen Insult fortauern, wobei zu Beginn hauptsächlich polymorphkernige Granulozyten (vermehrt NG) und im weiteren Verlauf zunehmend Monozyten und Lymphozyten auftreten. Durch die Aktivität dieser peripheren Entzündungszellen im Gehirn können Ausmaß und Schwere eines ischämischen Insults verschlimmert werden (YILMAZ und GRANGER, 2010). Astrozyten spielen, neben ihrem aktiven Wirken im Entzündungsgeschehen (z. B. bei der Produktion von Zytokinen), auch eine wichtige Rolle bei der übergeordneten Regulation der Neuroinflammation. Einen großen Anteil an dieser Regulation hat der inflammatorische Transkriptionsfaktor NF- κ B, der im Gehirn und insbesondere auch in Astrozyten eine zentrale Stellung im Entzündungsgeschehen einnimmt. Neben bekannten Aktivatoren und Zielgenen von NF- κ B, wie sie auch bei der systemischen Inflammation vorkommen (s. o.), existieren im Gehirn auch ganz spezifische Aktivatoren dieses bedeutenden Transkriptionsfaktors, z. B. Glutamat oder Neurotrophine (O'NEILL und KALTSCHMIDT, 1997). Die wichtige Bedeutung des astrozytären NF- κ B konnte mithilfe transgener Mäuse gezeigt werden. Durch gezielte genetische Inaktivierung von NF- κ B in Astrozyten konnte sowohl im Tierversuchsmodell zum Spinaltrauma (BRAMBILLA et al., 2005) als auch zur experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (BRAMBILLA et al., 2009) ein verbessertes funktionelles Outcome und eine verminderte Entzündungsantwort im ZNS festgestellt werden.

2.4.2.1.4 Neuronale Beteiligung an der Entzündungsantwort

Während die immunologische Aktivität der Mikroglia und Astroglia im Gehirn allgemein anerkannt ist, geht man bei Neuronen in diesem Zusammenhang von einer weitgehend passiven Rolle aus. Neurone können aber auch aktiv Einfluss auf immunregulatorische Vorgänge im Rahmen pathologischer Ereignisse nehmen. Ebenso wie Gliazellen reagieren Neurone sehr empfindlich auf auch nur leichte Veränderungen des umgebenden Milieus und besitzen ebenso Mechanismen zur Einflussnahme (TIAN et al., 2009). Während

Mikrogliazellen stets die neuronale Integrität „überwachen“, haben Neurone im Gegenzug ebenfalls die Möglichkeit, auf die Mikroglia einzuwirken. Dies geschieht mithilfe von sog. „Off- und On-Signalen“, die sich aus spezifischen Signalmolekülen und ihren korrespondierenden Rezeptoren generieren. „Off“-Signale werden im gesunden Gehirn und von intakten Neuronen ständig übermittelt und allein ein Fehlen dieser Signale kann zu einer Aktivierung der Mikroglia führen. Signalmoleküle zur Übermittlung von „Off“-Signalen sind z. B. TGF- β , Moleküle mit der Unterscheidungsgruppe 22 („Cluster of differentiation 22“, CD 22) und der Nervenwachstumsfaktor („Nerve growth factor“, NGF). „On“-Signale können z. B. durch ATP, Glutamat oder das Chemokin CXC-Motiv-Chemokin-10 (CXCL10) an die Mikroglia übermittelt werden. Sie bewirken eine Aktivierung der Mikroglia, die bei einer Überaktivierung allerdings eine überschießende Immunreaktion und damit einen verstärkten Neuronenschaden bewirken kann. Es gibt Hinweise, dass die unzulängliche neuronale Kontrolle der Mikroglia mit einem Ausbleiben bzw. einem verminderten Auftreten von „Off“-Signalen bei vielen ZNS-Pathologien eine entscheidende Rolle spielen könnte (BIBER et al., 2007). Ein weiterer Anhaltspunkt für die immunologische Relevanz von Neuronen ist die Expression sehr spezifischer Moleküle auf ihrer Zelloberfläche. Es konnte mittlerweile gezeigt werden, dass intakte Neurone im ZNS *in vivo* MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren. Dies wurde aufgrund des sog. „Immunprivilegs“ im Gehirn (s. o.) lange Zeit ausgeschlossen. Mithilfe der MHC-I-Proteinkomplexe auf der Zelloberfläche können zytotoxische T-Zellen entartete oder infizierte Zellen erkennen und eine Apoptose herbeiführen. Noch ist unklar, ob die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle bei Neuronen eine neuroprotektive Funktion hat, indem z. B. Regenerationsprozesse nach neuronaler Schädigung erleichtert und sog. „sekundäre Degenerationen“ angrenzender gesunder Neurone verhindert werden. Negative Auswirkungen, z. B. durch einen vermehrten apoptotischen Untergang von Neuronen bei unterschiedlichen ZNS-Pathologien, sind ebenfalls möglich (BOULANGER und SHATZ, 2004).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von 17 β -Östradiol und/oder von Progesteron auf die neurologische Funktion *in vivo*, sowie auf die Gehirnmorphologie und molekulare Aspekte der zerebralen Inflammation und Exzitotoxizität *in vitro* vier Tage nach herzchirurgisch typischer extrakorporaler Zirkulation (EKZ) mit 45 min tief hypothermem Kreislaufstillstand („deep hypothermic circulatory arrest“, DHCA) im Rattenmodell. Herausgearbeitet werden soll der spezifische Einfluss von 17 β -Östradiol und/oder von Progesteron durch Substitution dieser beiden Geschlechtshormone – einzeln und in Kombination – in physiologischen Dosen bei kastrierten Rattenweibchen. Geschlechtlich intakte sowie kastrierte nicht-substituierte weibliche Tiere sollen als Kontrolltiere dienen.

Das hier verwendete, bereits etablierte Versuchsmodell der EKZ mit DHCA an Ratten (JUNGWIRTH et al., 2006) hat in diversen Studien gezeigt, dass es nach 45 min DHCA eine verstärkte zerebrale Inflammation mit neurologischen und neurokognitiven Defiziten bei den Versuchstieren verursacht (JUNGWIRTH et al., 2009; KELLERMANN et al., 2009). Eine kürzlich erfolgte geschlechterorientierte Promotionsstudie (FRIEDRICH, 2013) zeigte unter Anwendung des gleichen Versuchsmodells bei 14-tägiger Beobachtung bei weiblichen Ratten eine bessere postoperative motorische Funktion und weniger morphologische neuronale Schäden als bei männlichen Tieren, gleichzeitig war aber auch eine hohe Ausfallrate bei den weiblich intakten Ratten im Vergleich zu männlich intakten und kastrierten sowie zu den weiblich kastrierten Ratten gegeben (FRIEDRICH, 2013; KELLERMANN et al., 2013). Ob die weiblichen Geschlechtshormone 17 β -Östradiol und Progesteron einzeln oder beide zusammen einerseits beim besseren postoperativen Ergebnis der weiblichen Tiere und andererseits bei den vermehrten postoperativen Ausfällen der weiblich intakten Tiere eine entscheidende Rolle gespielt haben soll u. a. im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit weiter aufgeklärt werden.

Hauptzielgrößen der vorliegenden Arbeit sind die intra- und postoperativen physiologischen Parameter der Versuchstiere sowie deren postoperative neurologische Funktion über 4 Tage nach EKZ mit 45 min DHCA. Nebenzielgrößen sind hirnmorphologische Befunde und Aspekte der zerebralen Inflammation und Exzitotoxizität *in vitro*. Zusätzlich soll beleuchtet werden, ob sich bei den Nebenzielgrößen innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen unterschiedliche Befunde ergeben, wenn die Tiere danach gruppiert werden, ob sie den

gesamten Versuchszeitraum überlebt haben oder ob sie vorzeitig euthanasiert werden mussten.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes (Tierschutzgesetz in der Fassung vom 18. Mai 2006, BGBl I S. 1206, 1313, zuletzt geändert am 4. Juli 2013, BGBl I S. 2182) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: 55.2.1.54-2531-20-10).

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Versuchsvorbereitung

Alle im Folgenden beschriebenen Eingriffe und Untersuchungen werden an 100 weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) durchgeführt. Nach Ablauf des Versuchs werden nach vorher festgelegten Ausschlusskriterien 50 Tiere für die Auswertung der Daten ausgewählt (siehe Abschnitt 3.2.4.1). Die Datenauswertung dieser 50 Tiere soll in die hier vorliegende Studie eingehen. Die Tiere werden mit einem Alter von 12 Wochen in den vorhandenen Tierstall eingesetzt. Das Gewicht der Tiere variiert zu diesem Zeitpunkt zwischen 226 und 250 g (Angabe nach Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, USA).

Vor Versuchsbeginn sollen sich die Ratten an ihre neue Umgebung gewöhnen. Dazu werden sie in Gruppen von maximal 4 Tieren in Makrolon-Käfige Typ IV (55 x 35 x 20 cm) eingesetzt. Als Einstreumaterial dient entstaubtes und entkeimtes Weichholzgranulat (Lignocel, J. Rettenmaier und Söhne, Rosenberg). Um ihre Haltungsumwelt anzureichern, erhält jede Tiergruppe zusätzlich eine Hand voll autoklaviertes Heu und 2 Lagen Zellstoff als Nestbau- und Beschäftigungsmaterial. Futter (Altromin 1324, spezialbehandelte Haltungsdiät für Ratten/Mäuse, Altromin GmbH, Lage) und Wasser stehen den Tieren über Futterraufen und Nippeltränken ad libitum zur Verfügung. An 2 festgelegten Tagen in der Woche findet ein Käfigwechsel statt. Die Trinkflaschen werden einmal wöchentlich gewechselt.

Die Ratten sind in einem fensterlosen, klimatisierten Tierstall mit einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 ± 15 % untergebracht. Es besteht ein Hell/Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden (h) (Hellphase von 02:00 bis 14:00 Uhr, Dunkelphase von 14:00 bis 02:00 Uhr), der mittels einer Zeitschaltuhr gesteuert wird. Die Lichtintensität beträgt dabei maximal 60 Lux im Käfig, gemäß den Vorschriften für Albinotiere (GV-SOLAS, 1988). Damit entspricht die gesamte Versuchstierhaltung den Anforderungen der EU- Richtlinie 2010/63, Anhang III, Teil A. Die Hellphase ist mit leiser Radiomusik gekoppelt, um die Ratten an eine menschliche Geräuschkulisse zu gewöhnen. Weiterhin werden die Versuchstiere wöchentlich einzeln gewogen, um die optimale körperliche Entwicklung zu kontrollieren und eine Gewöhnung an die Handhabung durch den Menschen zu erreichen.

3.2.2 Versuchsaufbau

3.2.2.1 Zeitlicher Ablauf

Der Versuch unterliegt einem genauen Zeitschema (siehe Abb. 09). Nach dem Einsetzen in die Käfige verbringen die Versuchstiere 3 Wochen im Tierstall, wobei sie, mit Ausnahme des regelmäßigen Wiegens und Umsetzens, keinen weiteren Manipulationen durch den Menschen ausgesetzt sind. Danach werden die Ratten – je nach Gruppenzugehörigkeit randomisiert – kastriert bzw. scheinkastriert. Bei den zu kastrierenden Tieren ist dieser Eingriff mit dem Einsetzen der Hormon- bzw. Plazebo-Implantate verbunden, ebenfalls randomisiert entsprechend der Gruppenzugehörigkeit.

Es folgt ein Zeitintervall von 4 Wochen, das der Rekonvaleszenz und dem Aufbau eines stabilen Hormonstatus bei den Tieren mit Hormonimplantaten dient. Im Anschluss daran durchlaufen die Ratten die OP-Phase mit extrakorporaler Zirkulation (EKZ) und tiefhypothermem Kreislaufstillstand („deep hypothermic circulatory arrest“, DHCA). Am Tag vor der EKZ mit DHCA sowie an den 4 postoperativen Tagen werden die Tiere neurologisch untersucht. In der postoperativen Phase findet außerdem eine telemetrische Überwachung der Vitalfunktionen (Temperatur, Herzfrequenz, körperliche Aktivität) und des Elektrokardiogramms (EKG) der Versuchstiere statt. Bei einem starken Absinken der Vitalwerte im Zusammenhang mit sehr schlechtem Allgemeinbefinden findet bei betreffenden Tieren eine vorzeitige Euthanasie mit Organentnahme statt. Am 4. postoperativen Tag folgt die reguläre Tötung der Versuchstiere mit Blut- und Organentnahme.

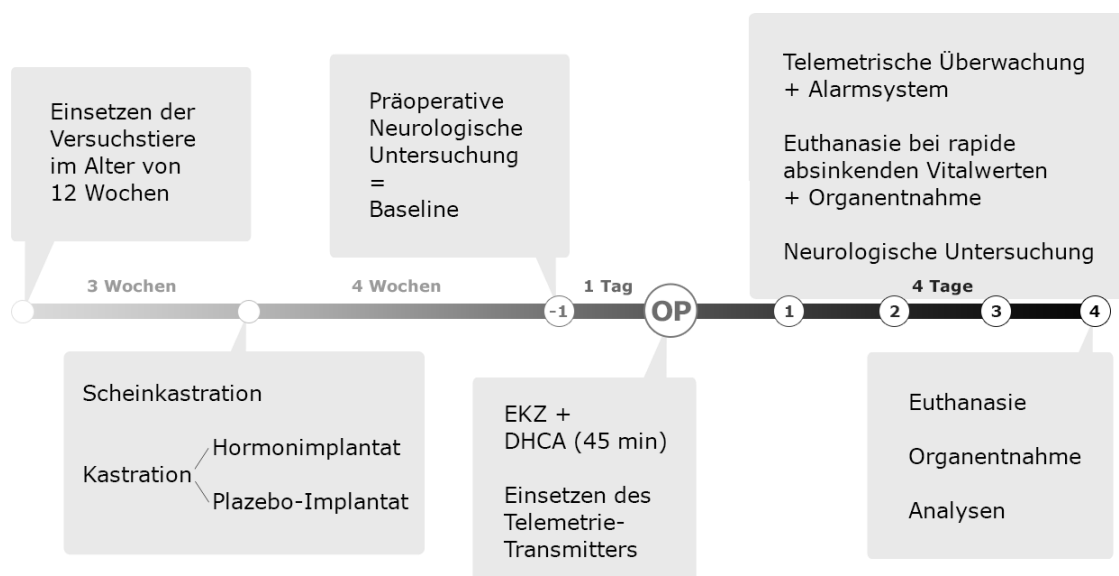


Abb. 09: Zeitplan des Versuchsablaufs

3.2.2.2 Aufteilung der Versuchsgruppen

Vor der Kastration/Scheinkastration werden die Versuchstiere randomisiert in 5 Gruppen aufgeteilt: scheinkastriert (= Gruppe „Intakt“), kastriert mit Plazebo-Implantat (= Gruppe „Plazebo“), kastriert mit 17β -Östradiol-Implantat (= Gruppe „Östrogen“), kastriert mit Progesteron-Implantat (= Gruppe „Progesteron“) und kastriert mit Progesteron- und 17β -Östradiol-Implantat (= Gruppe „Progesteron + Östrogen“ bzw. „P+Ö“) (siehe Abb. 10).

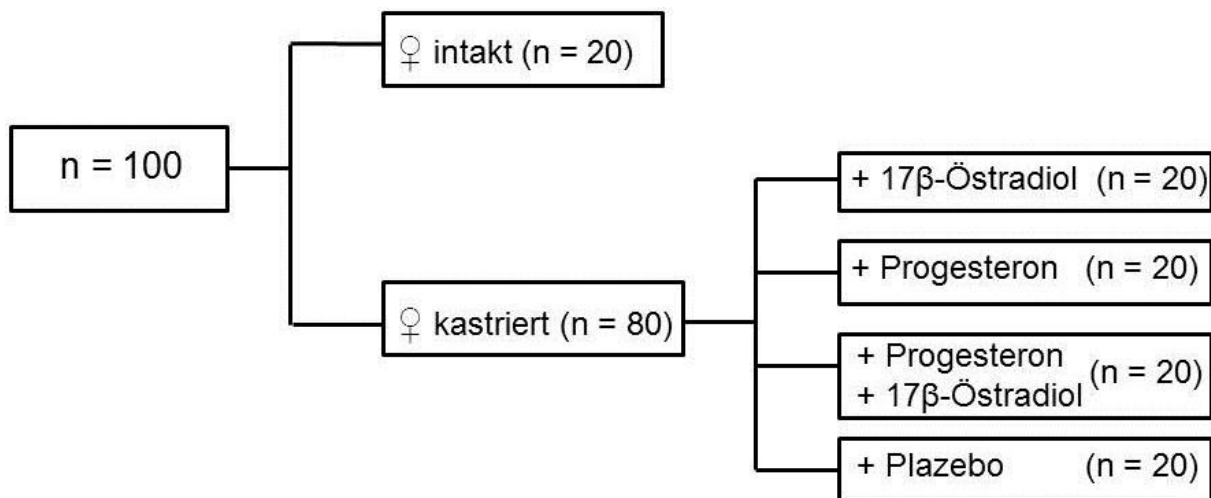


Abb. 10: Schema der Versuchsgruppeneinteilung nach zu erfolgender Behandlung

Die Gruppe der scheinkastrierten bzw. intakten Tiere dient als Kontrollgruppe mit physiologischen Sexualhormonwerten.

Der operative Teil mit EKZ und DHCA wird bei allen Versuchstieren unabhängig der 5 Versuchsgruppen durchgeführt.

3.2.3 Versuchsdurchführung

3.2.3.1 Herstellung der Hormonimplantate

Um bei einem Teil der kastrierten Versuchstiere stabile 17β -Östradiol- und/oder Progesteron-Serumspiegel zu erreichen, werden Depotpräparate mit 17β -Östradiol und Depotpräparate mit Progesteron hergestellt. Diese werden – einzeln oder in Kombination – im Anschluss an die Kastration bei den dafür vorgesehenen Tieren subkutan im Nackenbereich implantiert. Ebenso wird mit den Plazebo-Implantaten verfahren, die keinerlei Hormonzusatz enthalten.

3.2.3.1.1 17 β -Östradiol-Implantat

Das Depotpräparat mit Östrogen besteht aus einem 30 mm langen Silastic[®]-Schlauch (Katalognummer 508-008, Dow Corning, Wiesbaden) mit einem Außendurchmesser von 3,175 mm und einem Innendurchmesser von 1,57 mm (siehe Abb. 11). Die Wandstärke beträgt 0,8 mm. 24 h vor der Herstellung der Implantate wird eine Hormon-Öl-Lösung (180 μ g/ml 17 β -Östradiol in Sesamöl) angesetzt, damit sich das Östradiol (β -Estradiol, E8875, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, 89555 Steinheim) im Sesamöl (Sesame Oil, S3547, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, 89555 Steinheim) ausreichend lösen kann. Der Silastic[®]-Schlauch wird an einem Ende mit einem 5 mm langen Holzstäbchen verschlossen und mit der Hormon-Öl-Lösung über das offene Ende befüllt, bis eine Flüssigkeitssäule von 20 mm erreicht ist. Die noch vorhandene Öffnung wird mit einem zweiten Holzstäbchen gleicher Länge verschlossen. Die so angefertigten Depotpräparate müssen für mindestens 12 h eingelegt in einer Östradiol-Öl-Lösung gleicher Konzentration (180 μ g/ml) dunkel und bei Zimmertemperatur lagern, bevor sie bei den Versuchstieren eingesetzt werden können (STROM et al., 2010).

3.2.3.1.2 Progesteron-Implantat

Das Depotpräparat mit Progesteron besteht aus einem 30 mm langen Silastic[®]-Schlauch (Katalognummer 515-012, Dow Corning, Wiesbaden) mit einem Außendurchmesser von 6,35 mm und einem Innendurchmesser von 3,18 mm (siehe Abb. 11). Die Wandstärke beträgt 1,59 mm. Das Schlauchstück wird mit 80 mg kristallinem Progesteron (P0130, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, 89555 Steinheim) gefüllt und an beiden Enden mit Silikonkleber verschlossen. Die fertiggestellten Implantate müssen mindestens 12 h in Phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS), dunkel und bei Zimmertemperatur gelagert werden, bevor sie implantiert werden können.

3.2.3.1.3 Plazebo-Implantat

Material, Größe und Herstellungsweise der Plazebo-Implantate entsprechen den Östradiol-Depotpräparaten (siehe Abb. 11). Statt mit Hormon-Öl-Lösung sind diese aber mit reinem Sesamöl gefüllt und werden 12 h vor dem chirurgischen Einbringen in reinem Sesamöl bei Dunkelheit und Zimmertemperatur gelagert.

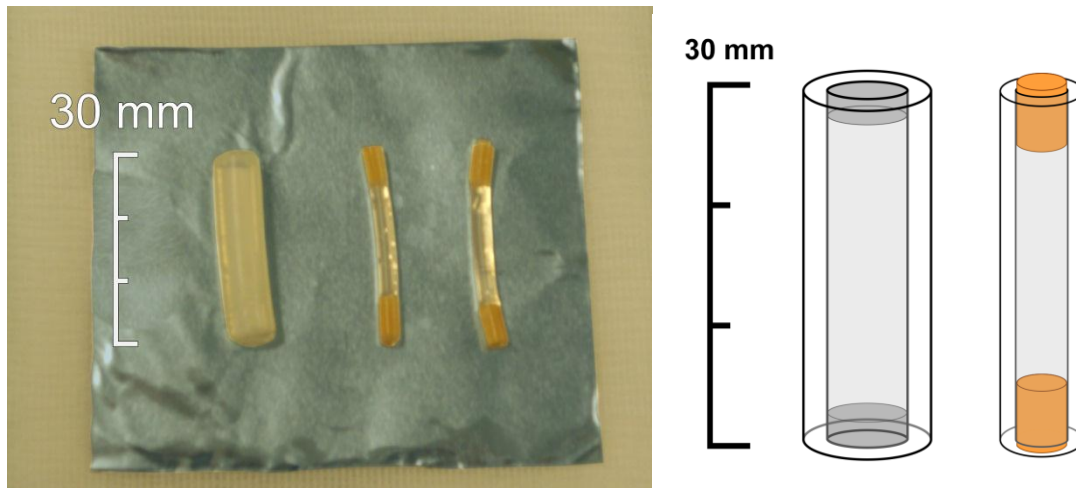


Abb. 11: Fotografische und schematische Wiedergabe der Hormonimplantate nach Herstellung.
*Links: Foto der fertiggestellten Implantate (links: Progesteron-Implantat; Mitte und rechts: 17 β -Östradiol und Plazebo-Implantat).
 Rechts: Schema der Hormonimplantate (links: Progesteron-Implantat; rechts: 17 β -Östradiol-/Plazebo-Implantat). 17 β -Östradiol- und Plazebo-Implantat sind optisch identisch.*

3.2.3.2 Kastration/Scheinkastration

Um bei einem Teil der Versuchstiere die eigene Produktion von Geschlechtshormonen weitgehend auszuschalten, wird bei diesen Tieren eine Kastration durchgeführt. Zyklus-unabhängige Geschlechtshormonspiegel werden je nach Gruppenzugehörigkeit durch das Einsetzen von 17 β -Östradiol-, Progesteron- bzw. 17 β -Östradiol- und Progesteron- Depotpräparaten erreicht. Es ist an dieser Stelle darauf hinzuweisen, dass es sich nach strenger medizinischer Definition bei dem vorgenommenen Eingriff um eine Ovariectomie handelt, da die Uterushörner hier nicht vollständig entfernt werden. Aus Gründen der Vereinfachung und da die Uterushörner doch zu einem gewissen Anteil mitentfernt werden, wird allerdings von einer „Kastration“ gesprochen.

Bis kurz vor dem Eingriff befinden sich die Tiere in ihrer gewohnten Haltungsumgebung und haben freien Zugang zu Wasser und Futter. Das Allgemeinbefinden aller Versuchstiere wird noch einmal überprüft, bevor sie in Gruppen von jeweils 2 Tieren in den Operationsraum gelangen. Dort werden die Ratten einzeln in eine durchsichtige, mit Sauerstoff (6 l/min) durchflutete Narkosebox gesetzt. Zur Einleitung der Anästhesie werden dem Sauerstoff 5,0 Vol % Isofluran (Forene[®], Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) zugeführt. Ist eine ausreichende Tiefe der Anästhesie mit Bewusstseinsverlust und Verlust der Stellreflexe erreicht, folgt die endotracheale Intubation mit einem modifizierten 14-G-Venenkatheter (Vasofix[®] Safety, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) und anschließend die Ventilation mit einem Kleintierbeatmungsgerät (Small Animal Ventilator KTR-4, Hugo Sachs Elektronik,

March) im halboffenen System ohne Rückatmung mit konstanter Frischgaszufuhr von 0,8 l/min, vorgeschaltetem Präzisionsverdampfer (Abott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) und Gasabsaugung. Die Atemluft in der Beatmung setzt sich dabei aus 2– 2,5 Vol% Isofluran in 40 % Sauerstoff und 55 % Druckluft zusammen. Die Atemfrequenz variiert zwischen 45 und 60 Atemzüge pro Minute, der Beatmungsdruck liegt bei 11–15 mmHg. Durch Anpassung von Atemfrequenz und Beatmungsdruck wird ein Kohlenstoffdioxid-Partialdruck (PaCO_2) von 30 mmHg angestrebt und aufrechterhalten. Die Ratten werden mit dem Abdomen nach oben auf einer mit einem Wasserbad verbundenen Wärmematte (Polystat Control cc2, Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg) mit einer Temperatur von 38,5 °C gelagert.

Die Kornea wird mit einer Salbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen) vor Austrocknung geschützt. Das Abdomen wird großzügig vom Schambeinrand bis zum Rippenbogen rasiert und das Operationsgebiet gründlich mit Cutasept® F (Fa. Bode, Hamburg) desinfiziert.

Die optimale Zugangsstelle liegt ca. 1 cm kranial des vorderen Schambeinrandes und wird vor der Inzision mit dem Lokalanästhetikum Lidokainhydrochlorid (Xylokain 2 %, Astra Zeneca, Großbritannien) infiltriert. Nach 2-minütiger Wartezeit werden Haut und Unterhaut mithilfe einer feinen Schere und einer Pinzette inzidiert und der Schnitt wird bis zu einer Länge von 1,5 cm erweitert. Nun wird die Bauchdecke an der Linea alba mithilfe einer Pinzette angehoben und die Tiere erhalten 0,005 ml einer Fentanyl-Injektionslösung (Fentanyl® Janssen 0,1mg/2ml, JANSSEN-CILAG GmbH, Neuss) intraperitoneal zur intraoperativen Analgesie. Danach wird die Bauchhöhle mit einem Schnitt durch Linea alba und Peritoneum entsprechend der Länge des Hautschnittes eröffnet.

Die Ovarien werden nacheinander kaudal der Nieren aufgesucht und zuerst auf der rechten Seite eine Klemme kranial des Ovars angebracht. Daraufhin wird mit resorbierbarem Nahtmaterial (Safil® 3-0, B. Braun AESCULAP, AESCULAP AG, Tuttlingen) eine Ligatur möglichst weit distal am zugehörigen Uterushorn angelegt und das Uterushorn kranial der Ligaturstelle abgesetzt. Nun wird eine Massenligatur kranial der Klemme am Ovar angelegt und das gefäßführende Bandgewebe zwischen Klemme und Ligatur durchtrennt. Der abgesetzte Teil des Gebärmutterhorns kann dann mitsamt Ovidukt und Ovar aus der Bauchhöhle entfernt werden. Ebenso wird mit Ovar und Uterushorn der linken Seite verfahren. Abschließend werden alle Ligaturstellen auf eventuelle Nachblutungen kontrolliert. Bauchmuskulatur und Peritoneum werden mit einem resorbierbaren Nahtmaterial (Vicryl 3-0, Ethicon®, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) in Einzelheften vernäht.

Unterhaut und Haut werden mit einem nicht-resorbierbaren Nahtmaterial (Prolene 4-0, Ethicon®) ebenfalls mit Einzelheften verschlossen.

Bei der Scheinkastration sind Narkoseregime, Analgesie und OP-Vorbereitung identisch mit dem Vorgehen bei der Kastration. Nach Eröffnung der Bauchhöhle werden die Ovarien jedoch lediglich mit einer Klemme hervorgezogen und dann in situ belassen. Der Wundverschluss erfolgt wie bei der Kastration.

3.2.3.3 Einsetzen der Hormonimplantate

Bei den kastrierten Tieren erfolgt direkt im Anschluss an die Kastration das Einsetzen der Hormon-Depotpräparate bzw. Plazebo-Implantate.

Dafür werden die Tiere in Bauchlage gebracht, ein ca. 1 x 1 cm großer Bereich im Schulter-/ Nackenbereich rasiert und mit Cutasept® F desinfiziert. Die gewählte Schnittstelle wird mit 2%igem Lidokainhydrochlorid infiltriert. Nach 2-minütiger Wartezeit werden Haut und Unterhaut mit einem Scherenschlag eröffnet und der Schnitt wird auf eine Länge von ca. 0,5 cm, parallel zur Wirbelsäule verlaufend, erweitert. Mithilfe einer kleinen Präparierschere wird nun stumpf eine Tasche präpariert, die ausreichend groß ist, um das Implantat aufzunehmen. Je nach Gruppenzugehörigkeit wird ein 17β-Östradiol-, Progesteron- oder Plazebo-Implantat eingebracht. Im Falle der Gruppe „P+Ö“ wird ein Progesteron-Implantat zusammen mit einem 17β-Östradiol-Implantat eingesetzt.

Bei der Gruppe der intakten Tiere erfolgen die gleichen Vorbereitungen einschließlich der Präparation der Hauttasche, jedoch ohne das Einsetzen eines Implantates.

Der Wundverschluss erfolgt bei allen Tieren mit Einzelheften und einem nicht-resorbierbaren Nahtmaterial (Prolene 4-0, Ethicon®). Nach erfolgtem Wundverschluss wird die Isofluran-Zufuhr beendet und das Tier bis zum Wiedereinsetzen der Spontanatmung mit reinem Sauerstoff weiter beatmet. Danach werden die Ratten extubiert und wieder in die mit Sauerstoff (6 l/min) geflutete Narkosebox gesetzt, bis sie sich ausreichend von der Narkose erholt haben.

Alle Tiere erhalten sofort nach dem Erwachen aus der Narkose und danach alle 12 Stunden über 3 Tage 0,05 ml einer Metamizol-Injektionslösung (Novaminsulfon-ratiopharm, 2,5g/5ml, ratiopharm GmbH, Ulm) subkutan zur postoperativen Schmerzausschaltung. Nach einer Stunde Nachbeobachtungszeit kehren die Versuchstiere wieder in ihre gewohnten Tiergruppen in den Tierstall zurück.

3.2.3.4 Vorbereitung und Durchführung der EKZ mit DHCA

3.2.3.4.1 Allgemeine und spezielle Vorbereitung der EKZ

Vier Wochen nach der Kastration bzw. Scheinkastration wird bei den Versuchstieren die extrakorporale Zirkulation (EKZ) mit 45-minütigem, tief hypothermem Kreislaufstillstand („deep hypothermic circulatory arrest“, DHCA) durchgeführt.

Am Tag vor dem Eingriff (im Rahmen der neurologischen Untersuchung) und direkt vor der EKZ findet bei den Tieren eine kurze klinische Allgemeinuntersuchung statt. Die körperlich gesunden Ratten werden für die Durchführung der EKZ in den OP-Bereich verbracht. Bis zu diesem Zeitpunkt befinden sie sich in ihrer gewohnten Haltungsumgebung, Wasser und Futter stehen ihnen ad libitum zur Verfügung. Die chirurgischen Eingriffe werden stets von der gleichen Person durchgeführt. Das Narkoseregime bei Einleitung der Anästhesie in einer durchsichtigen Plexiglasbox, die endotracheale Intubation und das System des Beatmungsgerätes mit vorgeschaltetem Präzisionsverdampfer sowie die allgemeinen OP-Vorbereitungen sind identisch mit dem Vorgehen bei der Scheinkastration/Kastration der Tiere.

Zur speziellen OP-Vorbereitung gehört das Rasieren der relevanten Körperstellen für Gefäßpräparationen und Messungen im Rahmen der EKZ. Dies sind der rechte Unterhals- und Brustbereich, die rechte Leiste und die rechte Schläfe. Die Schwanzbasis muss nicht rasiert werden.

Da die Überwachung der Körpertemperatur mit dem entsprechenden Temperaturmanagement für die EKZ mit DHCA grundlegend wichtig ist, finden gleichzeitig Messungen der rektalen und perikraniellen Temperatur statt. Die perikranielle Temperatur wird mithilfe einer Temperatursonde (Newport[®] Hypodermic Needle Temperatur Probes, Hyp-1, Newport Electronics, Santa Ana, USA) im rechten Musculus temporalis bestimmt. Die rektale Temperatur wird mit einer Temperatursonde im Enddarm bestimmt.

Es folgen die chirurgischen Gefäßpräparationen der Arteria sacralis mediana (A. sacralis mediana, Schwanzarterie), Arteria epigastrica cranialis superficialis (A. epigastrica cranialis superficialis, oberflächliche Baucharterie) und Vena jugularis externa (V. jugularis externa, äußere Drosselvene). Hierbei wird vor jeder Inzision die rasierte Hautstelle mit Cutasept[®] F desinfiziert und mit Lidocainhydrochlorid 2 % subkutan infiltriert. Nach 2-minütiger Wartezeit ist das grundsätzliche Vorgehen wie folgt: mit einem kleinen Schnitt wird die Haut

eröffnet und die Arterie bzw. Vene durch stumpfe Präparation freigelegt. Das Gefäß wird nun distal abgebunden (4-0 PH-Seide, Ethicon®) und proximal lediglich locker mit einer Ligatur umfasst. Durch diese vorgelegte proximale Ligatur kann der eingeführte Katheter später im Gefäß fixiert werden. Nun wird mit einer mikrochirurgischen Schere die Gefäßwand von oben vorsichtig inzidiert, um einen Katheter einbringen zu können, der mit heparinisierter Vollelektrolytlösung (Thomaejoninlösung®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen) gefüllt ist. Danach wird der Katheter durch die vorbereitete Ligatur im Gefäß fixiert.

Das arterielle Zuflussgefäß für den Umgehungskreislauf der EKZ ist die Schwanzarterie (A. sacralis mediana). Sie befindet sich auf der Ventralseite des Schwanzes und wird mit einem 20-G großen Venenverweilkatheter (Insyte-WTM, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) kanüliert. Sofort im Anschluss an die Kanülierung erhält die Ratte über dieses Gefäß 150 I.E. Heparin Natrium (Liquemin® N 25000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) sowie den ersten Bolus Fentanyl (0,05 µg).

Im Anschluss wird die A. epigastrica cranialis superficialis für die invasive Blutdruckmessung präpariert. Dafür wird ein angespitzter Polyethylen-Katheter (PE10, IntramedicTM, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) in die Arterie eingebracht, der über einen Druckdom (MX 960, Fa. Medexmedical, Lancashire, Großbritannien) an einen Monitor (Eagle® 4000, GE Medical Systems Deutschland, Solingen) angeschlossen ist.

Es folgt die Präparation der rechten V. jugularis externa, die paramedian im kaudoventralen Halsbereich verläuft. In diese wird ein 4,5 Fr großer, mehrfach perforierter Katheter (Dipl. Ing. M. Humbs, Valley) eingebracht, der daraufhin langsam bis zum rechten Vorhof vorgeschoben wird. Durch dieses Vorgehen erhält man den venösen Abfluss für die EKZ mit einer vollständigen venösen Drainage des rechten Vorhofes, der rechten hinteren Hohlvene und der rechten und linken vorderen Hohlvene. Um die Gefäße vor starker Austrocknung zu schützen, werden die Wundränder mit Einzelheften (Prolene 4-0, Ethicon®) adaptiert. Während der chirurgischen Präparation werden die Tiere mit 2,0–2,5 Vol% Isofluran in 40 % Sauerstoff und ca. 55 % Druckluft beatmet.

Für die Versuchsdurchführung existiert ein exaktes Zeitschema, nach welchem Messungen und Aufzeichnungen der verschiedenen physiologischen Parameter erfolgen. Werte für rektale und perikranielle Temperatur, MAP („mean arterial blood pressure“, mittlerer arterieller Blutdruck), Blutgase (temperaturkorrigiert, pH-stat) und Glukosekonzentration im Blut werden jeweils 10 min vor Beginn der EKZ („Baseline“), vor Beginn des DHCA („prä-

DHCA“), 5 min nach dem Start der Wiedererwärmung („post-DHCA“), am Ende der Wiedererwärmung („EKZ-Ende“) und 1 h nach der EKZ („1 h post EKZ“) erhoben. Mit dem Blutgasanalysegerät (Rapidlab TM 860, Bayer Vital GmbH, Fernwald) werden PaO₂ (arterieller Sauerstoffpartialdruck), BE (Basenüberschuss) und Hämoglobin bestimmt. Die Blutglukosekonzentration wird mit einem Schnelltestgerät (Glucometer® Elite TM, Bayer HealthCare AG, Diagnostics, USA) gemessen. Das hierfür benötigte Blut wird über einen zwischengeschalteten Dreiwegehahn dem arteriellen Teil des EKZ-Kreislaufs entnommen. Noch vor Beginn der EKZ wird außerdem Blut zur Herstellung von Blutserum für die spätere Analyse der Geschlechtshormonkonzentrationen entnommen (siehe Abschnitt 3.2.3.4.8).

3.2.3.4.2 Technischer Aufbau und Durchführung der EKZ

Die Herz- Lungen- Maschine (HLM) besteht aus folgenden Elementen: venöses Reservoir (Plexiglas®, Dipl. Ing. M. Humbs, Valley), Rollerpumpe (Masterflex®, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois), ein speziell für Ratten entwickelter Membranoxygenator (Füllungsvolumen 4 ml) mit integriertem Wärmetauscher und eine im arteriellen Abschnitt befindliche Flusssonde (T 208, Transonic Volume Flowmeter, Transonic Systems Inc., Ithaca), welche die Blutflussrate kontinuierlich erfasst. Diese Komponenten sind durch ein Schlauchsystem aus Plastik verbunden (Innendurchmesser 1,6 mm, Tygon®, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois) (siehe Abb. 12 und 13). Der eigens für Ratten entwickelte Membranoxygenator besteht aus zwei 12,8 x 12,8 x 2,7 cm großen Plexiglasplatten, zwischen denen sich eine dreischichtige, übereinander kreuzweise geklebte Diffusionsmembran (Hohlfasermembran, Jostra AG, Hirrlingen) befindet. Durch diese Konstruktion wird eine Gasaustauschfläche von 558 cm² erreicht. Der Wärmeaustausch findet über ein temperaturgesteuertes Wasserbad (Polystat Control cc2) statt. Dieses ist über ein Schlauchsystem an den Oxygenator angeschlossen und wird vom hindurchströmenden Blut nur durch eine dünne Plexiglasscheibe getrennt.

Vor Beginn der EKZ muss das Kreislaufsystem der HLM mithilfe eines Umgehungsschenkels entlüftet werden. Dies erfolgt durch Füllen des Kreislaufs mit 11 ml 6%iger Hydroxyethylstärke (HAES 60 mg/ml, Voluven®, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg) und wird in der Fachsprache auch als „Priming“ bezeichnet.

Ist mit Beginn der EKZ die Ratte in den Kreislauf der HLM eingebunden, erfolgt die Drainage des venösen Blutes aus dem rechten Vorhof in das venöse Reservoir. Das Blut gelangt vom venösen Reservoir mithilfe der Rollerpumpe durch den Oxygenator, wo es über

die Diffusionsmembran mit Sauerstoff sowie temperaturkorrigiert mit Kohlendioxid und 0,8 Vol% Isofluran angereichert wird. Über den arteriellen Schenkel der HLM wird das Blut nun über die Schwanzarterie in den Versorgungskreislauf des Versuchstieres zurückgeführt. Die angestrebte Blutflussrate zu Beginn der EKZ beträgt dabei 160–180 ml/min/kg, was dem physiologischen Herzzeitvolumen der Ratte in Ruhe entspricht.

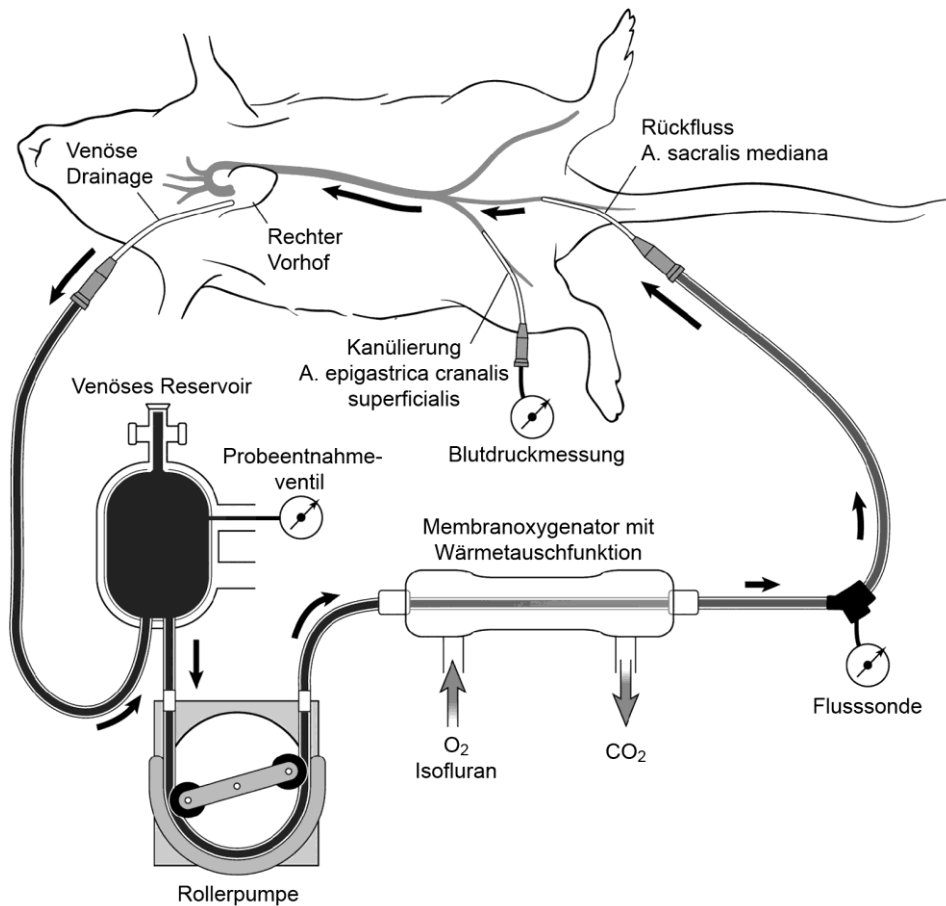


Abb. 12: Technischer Aufbau der EKZ (schematisch) mit Ratte (modifiziert nach LISLE et al., 2008).

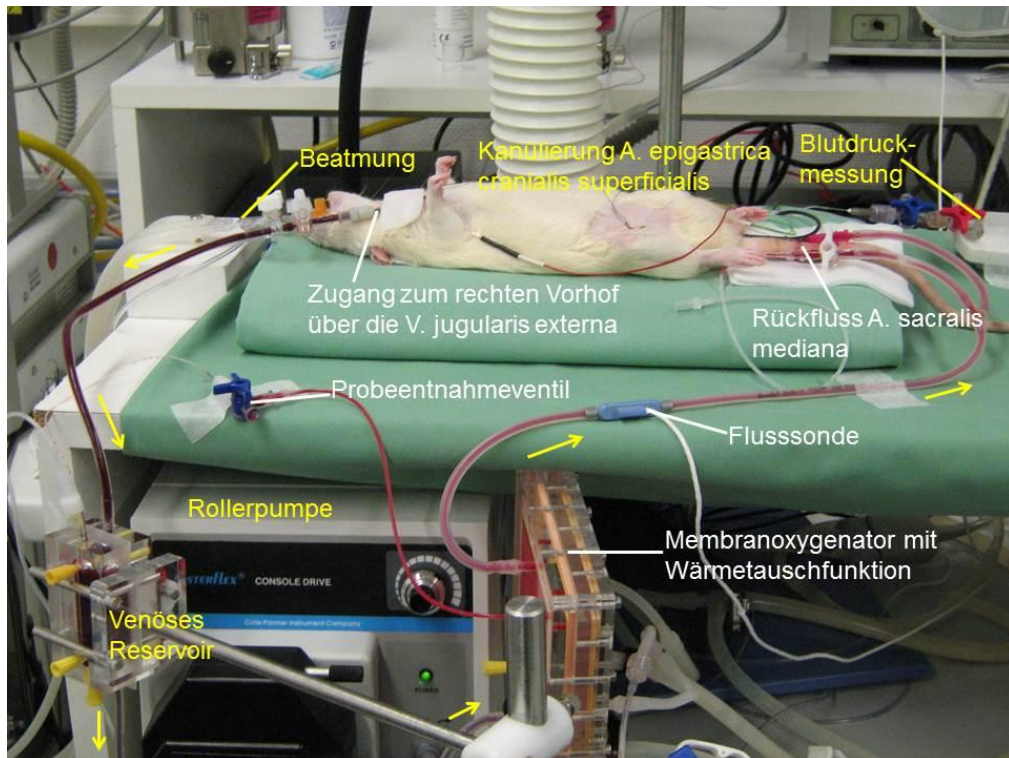


Abb. 13: Technischer Aufbau der EKZ (im Foto) mit Ratte

3.2.3.4.3 Abkühlungsphase

Zusammen mit dem Start der EKZ beginnt die Abkühlung des Versuchstieres durch Maßnahmen direkt am Tier (Kühlmatte, mit Eis gefüllte Handschuhe) und über die EKZ (Wärmetauscherfunktion des Oxygenators mithilfe des Wasserbades, das auf 4 °C eingestellt wird). Dabei wird das Tier im Verlauf von 30 min auf eine rektale Temperatur von 18–15 °C abgekühlt. Gleichzeitig wird die Blutflussrate auf 105 ml/min/kg reduziert.

Während der Abkühlungsphase wird die Anästhesie mit 0,8 Vol % Isofluran (zugeführt über den Oxygenator), repetitiven Fentanyl-Boli (0,05 µg) und dem Muskelrelaxans Zisatrakurium (1,6 mg/h, Nimbex[®], GlaxoSmithKline GmbH & Co KG, München) fortgesetzt.

Um Atelektasen in der Lunge zu verhindern, wird in dieser Phase der EKZ präventiv ein kontinuierlicher positiver endexpiratorischer Druck (5 cm H₂O) mit einem FiO₂ = 0,21 durch einen permanenten positiven Atemwegsdruck während der Beatmung aufrechterhalten.

3.2.3.4.4 DHCA

Sobald das Tier nach 30 min eine rektale Temperatur von 18–15 °C erreicht hat, wird die HLM abgeschaltet. Das Tier entblutet bei geschlossener arterieller Zuflusskanüle und offenem venösen Abfluss passiv in das venöse Reservoir. Es folgt die Phase des Herz-

Kreislaufstillstands in tiefer Hypothermie, in der sowohl Ventilation als auch Anästhesie eingestellt werden. Der Herzstillstand erfolgt temperaturbedingt spontan, d. h. ohne den Einsatz kardiopleger Lösungen. Es ergibt sich während des DHCA im EKG das Bild der Asystolie sowie bei der invasiven Blutdruckmessung ein mittlerer arterieller Druck (MAP) von 0. Der Herz-Kreislaufstillstand bei der gegebenen Körpertemperatur von 15–18 °C wird bei diesem Versuchsaufbau für 45 min aufrechterhalten.

3.2.3.4.5 Phase der Wiedererwärmung

Sofort im Anschluss an den 45-minütigen DHCA wird die EKZ wiederaufgenommen und das Versuchstier innerhalb von 40 min bis zu einer Körpertemperatur von 35,5 °C wiedererwärmt. Hierfür stehen ein Warmluftgebläse (WarmTouch® 5200, Nellcor, USA), sowie eine Heizmatte und die Wärmetauscherfunktion des Oxygenators zur Verfügung. Die Temperatur des Wasserbades, das Heizmatte und Oxygenator wärmt, wird dabei auf 38,5 °C eingestellt.

Die Blutflussrate innerhalb der HLM wird kontinuierlich gesteigert: von 105 ml/kg/min zu Beginn der Wiedererwärmung auf 120 ml/kg/min bei 20 °C, auf 150 ml/kg/min bei 30°C und schließlich bis zum Erreichen des physiologischen Ausgangswertes von 160–180 ml/kg/min.

Die Anästhesie wird wie zuvor in der Abkühlungsphase auch in der Phase der Wiedererwärmung mit 0,8 Vol% Isofluran, repetitiven Fentanyl-Boli (0,05 µg) und Zisatrakurium (1,6 mg/h) fortgeführt. Der CO₂-Anteil (O₂/CO₂-Gasmischung) in der Beatmung wird unter Kontrolle der arteriellen Blutgase nach dem pH-stat-Regime temperaturkorrigiert angepasst (PaCO₂ 31–40 mmHg). Ein positiver endexpiratorischer Druck (5 cm H₂O mit einem FiO₂ = 0,2 l) soll analog zur Abkühlungsphase Atelektasen verhindern.

Mit steigender Körpertemperatur setzt der Herzschlag des Versuchstieres ohne weitere Maßnahmen selbstständig wieder ein, wobei im EKG nach Kammerflattern und Ersatzrhythmen mit breiten QRS-Komplexen wieder ein physiologischer Sinusrhythmus sichtbar wird.

Weist der Blut-pH-Wert bei der Blutgasanalyse azidotische Verschiebungen auf, werden diese mit der Applikation von Natriumhydrogencarbonat 84 mg/ml (DeltaSelect GmbH, Pfullingen) nach der Formel Bikarbonat = – BE x 0,3 x kg KGW ausgeglichen. Im Falle einer Hypoglykämie werden 0,1–0,2 ml einer 50%igen Glukoselösung (DeltaSelect GmbH, Pfullingen) verabreicht. Ebenso wird die Kalziumkonzentration im Blut überprüft und bei

einem Absinken auf weniger als 1mmol/l mit dem Verabreichen von 0,1 ml einer 10%igen Kalziumglukonatlösung (Calcium Braun 10 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) erhöht.

Sobald die rektale Temperatur des Versuchstieres mindestens 30 °C beträgt und die Blutflussrate mindestens 150 ml/kg/min erreicht hat, bekommt das Tier bei Bedarf 20 µg/ml Norepinephrinhydrochlorid (Arterenol® 1 ml, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main) in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, um den MAP im Bereich von 45–50 mmHg zu halten.

3.2.3.4.6 Ende der EKZ und Einbringen der Telemetrie-Sonde

Ist bei dem Versuchstier eine rektale Körpertemperatur von 35,5 °C erreicht, wird die EKZ beendet. Hierfür wird die Beatmung wieder aufgenommen (0,8 Vol% Isofluran in 40 % Sauerstoff und ca. 55 % Druckluft), der venöse Abfluss und der arterielle Zufluss abgeklemmt und die Rollerpumpe gestoppt. Das in der HLM verbleibende Restblut wird in einer 20 ml Spritze gesammelt, zentrifugiert (2000 Umdrehungen pro Minute [„rounds per minute“, RPM], 10 min) und das gewonnene Erythrozytenkonzentrat anschließend mit HAES (6 %) und Kalziumglukonatlösung verdünnt sehr langsam über die Schwanzarterie retransfundiert. Für den Zeitraum von einer Stunde bleibt die Ratte nun mit 0,8–1,5 Vol% Isofluran anästhesiert und kontrolliert beatmet. Die Rektaltemperatur wird in dieser Stunde auf 36,5 °C angehoben, die Katheter in der V. jugularis externa und in der A. epigastrica superficialis cranialis entfernt, die Gefäße ligiert und die Wunden verschlossen. Der Katheter in der A. sacralis mediana verbleibt bis zur abschließenden Blutgasmessung.

Es folgt das Einbringen der Telemetrie-Transmittersonde (PhysioTel® CTA-F40, Data Sciences International, St. Paul, USA), die für die spätere Aufzeichnung der Vitalwerte und des EKGs des Versuchstieres benötigt wird.

Hierfür wird das Abdomen des Tieres rasiert und mit Cutasept® F desinfiziert. Die Schnittstelle wird mit Lidokainhydrochlorid 2 % zur Lokalanästhesie infiltriert. Nacheinander werden Haut mit Unterhaut, Linea alba und Peritoneum mit einem Schnitt von 1,5 cm Länge eröffnet. Nun wird der Transmitter parallel zur Körperachse, mit der Ösenleiste des Transmittergehäuses zur Schnittlinie und beiden Elektroden kaudal zeigend, in die Bauchhöhle eingebracht.

Für die bipolare Ableitung des EKGs müssen nun beide Elektroden des Transmitters durch die Bauchmuskulatur unter die getunnelte Haut platziert werden. Hierfür wird die

Bauchmuskulatur rechts und links vom kaudalen Schnittpunkt mit einer 14-G- Kanüle (100 Sterican, B. Braun) von außen nach innen durchstoßen und die jeweilige Elektrode durch das Lumen der Kanüle nach außen geführt. Für die rechte Elektrode (negative Ableitung) wird nun mithilfe eines Trokars mit umgebender Plastikhülse (beides Zubehör von Data Sciences International, St. Paul, USA) ein subkutaner Tunnel zwischen Schnittlinie und rechter Brustkorbseite geschaffen, der an der Zugangsstelle zur Vena jugularis externa endet. Nach Entfernung des Trokars kann die Elektrode durch die Plastikhülse gefädelt werden. Mithilfe eines Skalpells wird das Elektrodenende auf 1 cm Länge von der Silikonumhüllung befreit und eine Silikonschutzkappe gegen den Uhrzeigersinn auf das Drahtende aufgedreht. Nun kann das abisolierte Endstück der Elektrode mit 2 Heften (Prolene 7-0, Ethicon®) an der Brustwand befestigt werden. Die linke Elektrode (positive Ableitung) wird mit der gleichen Vorgehensweise subkutan getunnelt und befestigt. Hier liegt der Fixationspunkt allerdings im kaudalen Rippenbereich 2 cm links des Processus xiphoideus (siehe Abb. 14).

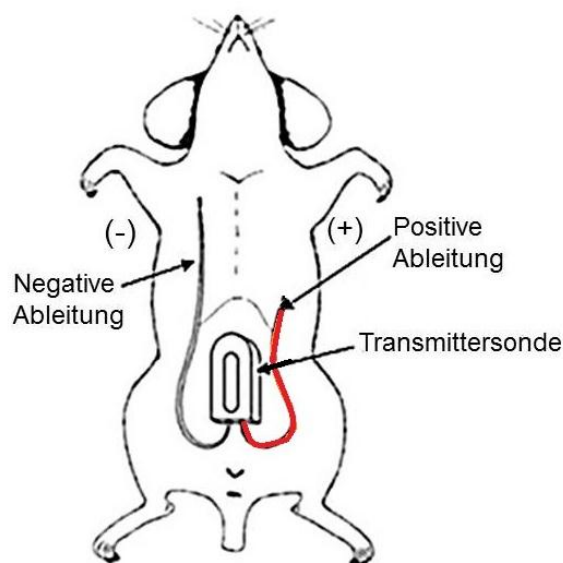


Abb. 14: Positionierung der Telemetrie-Transmittersonde und der beiden Elektroden für eine bipolare EKG-Ableitung im Tier (Schema) (modifiziert nach „ETA-CTA-EA-CA Surgical Manual“, Data Sciences International, St. Paul, USA)

Abschließend wird die Bauchdecke mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 3-0, Ethicon®) und Einzelheften verschlossen, wobei der Korpus des Transmitters mithilfe seiner Ösenleiste in die Naht miteinbezogen wird. Der Hautverschluss erfolgt mit einer Intrakutannaht, ebenfalls mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 3-0, Ethicon®) und Einzelheften. Alle noch vorhandenen Hautwunden werden ebenfalls mit einer Intrakutannaht und Einzelheften verschlossen. Das Einschalten des Transmitters erfolgt von außen mithilfe eines Magneten

und unter Kontrolle durch ein kleines Radiofrequenz-Empfangsgerät (beides Zubehör von Data Sciences International, St. Paul, USA)

Eine abschließende Blutgasmessung wird durchgeführt, bevor der Katheter in der A. sacralis mediana entfernt, das Gefäß ligiert und die Hautwunde mit Einzelheften verschlossen wird.

Anschließend wird die Isofluran-Zufuhr zur Beatmung gestoppt und das Versuchstier mit reinem Sauerstoff bis zum Einsetzen der Spontanatmung weiterbeatmet. Dann wird es in eine durchsichtige, mit Sauerstoff angereicherte Box verbracht, wo es bei ausreichender Spontanatmung und Wiedererlangen des Bewusstseins extubiert werden kann.

3.2.3.4.7 Postoperative Überwachung

Nach dem Erwachen aus der Narkose verbleibt die Ratte für einen Zeitraum von 3 h unter ständiger Beobachtung durch den Operateur in der mit Sauerstoff angereicherten Plexiglasbox. Tiere, deren Allgemeinbefinden nach der Operation leicht gestört ist (leichte Zyanose, schlechtes Aufwachen aus der Narkose) verbringen nach Ermessen des Operateurs noch 1–2 h länger in der Sauerstoffatmosphäre. Ist das Allgemeinbefinden des Versuchstieres postoperativ nachhaltig stark beeinträchtigt (schwere Dyspnoe, hochgradige zyanotische Veränderungen) oder liegt eine schwere neurologische Dysfunktion vor, wird es unmittelbar unter Isoflurannarkose euthanasiert.

Alle nach dem Allgemeinbefinden und neurologisch unauffälligen Tiere werden nach Ende der postoperativen Überwachungsphase in den Tierraum zurückgebracht, wo mit der telemetrischen Aufzeichnung der Vitalwerte und des EKGs begonnen werden kann.

3.2.3.4.8 Bestimmung der Geschlechtshormonkonzentration

Zur Bestimmung der Geschlechtshormonkonzentration werden von jedem Versuchstier Blutproben zur Herstellung von Blutserum vor Beginn der EKZ entnommen. Damit soll am Tag 0 des Versuchs der Erfolg der Hormonsubstitution durch die Hormonimplantate bei den kastrierten Tieren überprüft werden. Bei den intakten Tieren kann so der Zyklusstand abgeschätzt werden. Die Analyse der Geschlechtshormonkonzentration im Serum erfolgt mithilfe eines Elektrochemilumineszenz-Immunoassay-Analyseautomaten (Elecsys® 2010 analyzer, Roche Diagnostics, 68305 Mannheim). Testosteron, 17 β -Östradiol und Progesteron werden hierzu im Doppelansatz gemessen. Die Standardabweichung („root mean square deviation“, RMSD), der arithmetische Mittelwert („mean value“, MV) und die Referenzwerte („reference ranges“, ref) des Immunoassays lauten wie folgt:

Testosteron gesamt: % RMSD 4,43 %, MV 1,57 ng/ml, n = 45; ref 0,2–0,8 ng/ml.

17 β - Östradiol: % RMSD 9,26 %, MV 66,50 pg/ml, n = 44; ref 30–120 pg/ml prä- und postovulativ, 10–30 pg/ml postmenopausal.

Progesteron: % RMSD 5,56 %, MV 8,52 ng/ml, n = 42; ref 0,2–0,9 ng/ml prä- und postovulativ, 0,1–0,3 ng/ml postmenopausal.

3.2.3.5 Telemetrie

3.2.3.5.1 Systemaufbau und Aufzeichnung

Vitalwerte (Körperkerntemperatur und Herzfrequenz) und EKG der Studientiere werden mithilfe eines Kleintier-Telemetrie-Systems (DSI System, Data Sciences International, St. Paul, USA) aufgezeichnet. Dieses System besteht aus der implantierbaren Telemetrie-Transmittersonde (PhysioTel[®] CTA-F40, DSI, St. Paul, USA), der mit der Datenaustauschmatrix verbundenen Dataquest[®] PCI-Card (DSI, St. Paul, USA), einer Empfängerplatte (PhysioTel[®] Receiver-RPC-1, DSI, St. Paul, USA) und der korrespondierenden Software (Dataquest[®] A.R.T. 4.0, DSI, St. Paul, USA).

Die Transmittersonde misst ursprünglich 10,6 x 11,2 x 22,7 mm und wiegt 8,0 g. Sie besteht aus einer Batterie, einem Magnetschalter, einem Analog-Digital-Wandler samt Verstärker und Sendereinheit, einem Sensor sowie 2 Elektroden (siehe Abb. 15 und 16). Die gesamte Elektronik ist in Epoxidharz eingegossen und wird in Einheit mit der Batterie von einer Silikonhülle ummantelt. Die beiden flexiblen und ebenfalls von Silikon umhüllten Elektroden können individuell gekürzt und an den Enden mit einer Silikonschutzkappe versehen werden.

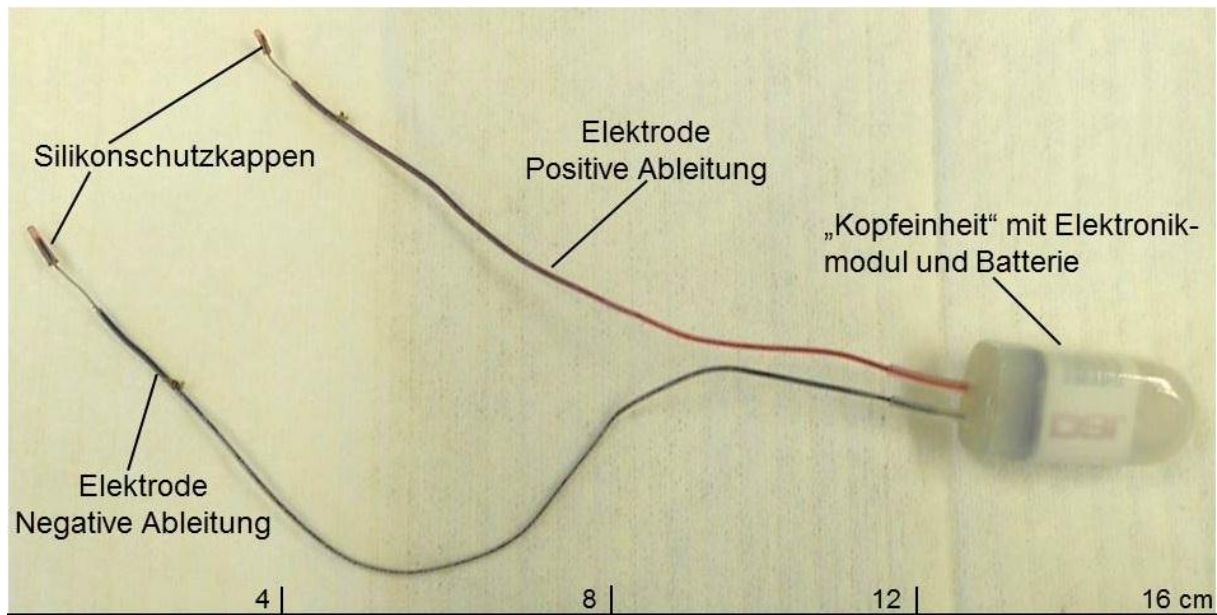


Abb. 15: Verwendete Telemetrie-Transmittersonde mit Elektroden (DSI System) (Foto)

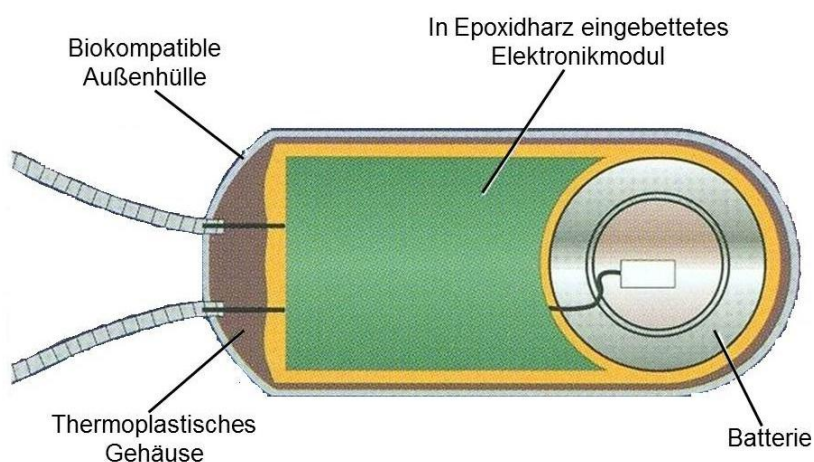


Abb. 16: Detailansicht der „Kopfheit“ der Transmittersonde (Schema) (modifiziert nach „Guide to the DSI System“, Data Sciences International, St. Paul, USA)

Die vom Sensor des Transmitters erfassten Werte der Körpertemperatur sowie die von den Elektroden abgeleiteten Biopotentiale (EKG) werden als digitalisierte Radiofrequenzsignale zu den 2 Empfangsantennen der zugehörigen Empfängerplatte gesendet. Alle 8 Empfängerplatten sind über die Datenaustauschmatrix mit der in einen PC integrierten Dataquest[®] PCI-Karte verbunden. Die Datenaustauschmatrix fungiert als Schaltstelle zwischen Datenübernahme durch die Empfängerplatte und der Einspeisung der gewonnenen Daten in die zugehörige Software. Dabei werden automatisch Modell- und Seriennummer der jeweiligen Platte von der Matrix erfasst und weitergeleitet, um so eine individuelle

Zuordnung der Daten zum einzelnen Versuchstier zu gewährleisten. Hierfür muss noch zusätzlich vor Beginn der Aufzeichnung über Software-Einstellungen eine Konfiguration der Hardware erfolgen, wobei Typ und Seriennummer des implantierten Transmitters, die verwendete Tierspezies, die Tier-Identität und die Empfängerplatte miteinander assoziiert werden.

Nach EKZ mit DHCA und postoperativer Überwachung wird das Versuchstier in den Tierraum zurückgebracht und dort in einem Haltungskäfig (Makrolon-Käfig Typ III) auf der Empfängerplatte platziert. Jedes Tier erhält zusätzlich zum gewohnten Futter- und Wasserangebot noch eine Schale mit aufgeweichtem Futter sowie eine Schale mit Wasser.

Die telemetrische Aufzeichnung erfolgt kontinuierlich und ist für die Auswertung in Zeitabschnitte von jeweils 60 Sekunden (s) gegliedert. Das heißt, Körpertemperatur und Herzfrequenz werden entsprechend alle 60 s angezeigt. Die Herzfrequenz wird von der Software selbstständig aus dem EKG berechnet. Die EKG-Ableitung entspricht dabei ungefähr einer Ableitung Typ II nach Einthoven. Die Körperkerntemperatur wird vom Sensor in der Transmittersonde erfasst und von der Software mit 1 Dezimalstelle angegeben.

Die Erfassung der Telemetrie-Daten erstreckt sich bei jedem überlebenden Versuchstier bis zum postoperativen Tag 4. Die Aufzeichnung wird hierbei lediglich für den Zeitraum der neurologischen Untersuchung des Tieres gestoppt und anschließend sofort weitergeführt.

3.2.3.5.2 Alarmsystem

Die telemetrische Aufzeichnung wird zusätzlich zur retrospektiven Datenanalyse auch zur Echtzeit-Überwachung des Allgemeinbefindens der Versuchstiere verwendet. Hierfür wurde ein Alarmsystem konfiguriert, welches bei einem Absinken der Herzfrequenz eines Tieres unter 150 BPM („beats per minute“, Schläge pro Minute) eine Kurznachricht auf das Mobiltelefon des zuständigen Betreuers sendet (siehe Abb. 17). Durch dieses System wird eine unnötige Belastung der Versuchstiere vermieden und es kann rechtzeitig eine Tötung mit Entnahme der Organe erfolgen. Daraus resultieren insgesamt ein geringerer Einsatz von Versuchstieren sowie das rechtzeitige Sichern von Organmaterial (KELLERMANN et al., 2012).

Zu diesem Zweck wird ein Makro des Microsoft-Programmes Excel 2003 (Alarm.xls; Microsoft, Redmond, USA) erstellt, in welches durch eine Einstellung fortlaufend die aktuell aufgezeichneten Daten aus dem Dataquest A.R.T.TM Analysis-Programm (DSI, St. Paul,

USA) importiert werden. Die Programmierung des Makros erfolgt derart, dass bei einem Absinken der Herzfrequenz unter 150 BPM automatisch eine Alarm-Email an ein vorher definiertes Email-Konto (in diesem Fall ein Email-Konto des Webanbieters GMX) gesendet wird, von welchem aus wiederum die Kurznachricht auf das Mobiltelefon des Betreuers abgeschickt wird. Die initiale und durch das Excel Makro ausgelöste Email wird durch MS Outlook 2003™ (Microsoft, Redmond, USA) versendet. Um die Sicherheitsabfrage des Outlook-Programmes automatisch zu bestätigen, wird die lizenzfreie Software „Express Click Yes 1.2“ (<http://ContextMagic.com>, Vancouver, Canada) auf dem benutzten Rechner installiert. Bei dem GMX-Email-Konto wird die Option „Kurznachrichten-Alarm“ aktiviert, wodurch bei jedem Empfang einer Email des Excel-Makros die Kurznachricht sofort weitergeleitet wird.

Mit dem Auslösen des Alarms stoppt die Datenübertragung aus dem Dataquest A.R.T.™-Analysis-Programm in das Excel-Makro. Dadurch sind die alarmauslösenden Werte des betroffenen Tieres für die betreuende Person sofort sichtbar.

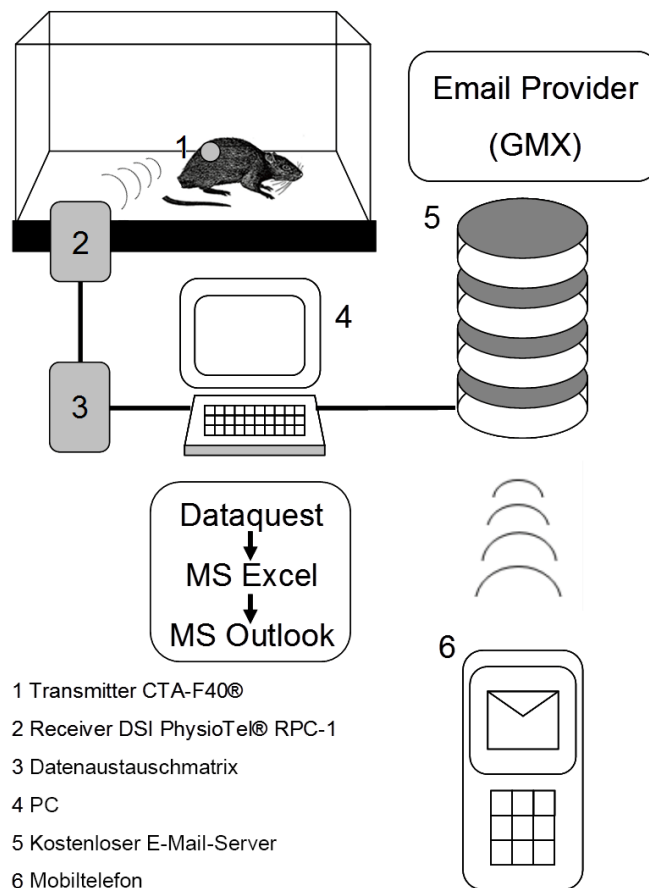


Abb. 17: Konfiguration des auf der telemetrischen Überwachung basierenden Alarmsystems. Die von der Telemetrie-Transmittersonde in der Ratte erfasste Herzfrequenz (1) wird über die Receiverplatte (2) und die Datenaustauschmatrix (3) in ein Microsoft(MS)-Excel-Programm auf einen PC (4) gespeist und löst bei einer Unterschreitung von 150 Schlägen/min das Versenden einer Alarm-Email über einem kostenlosen Email-Server (5) sowie das Versenden einer Kurznachricht auf das Mobiltelefon der betreuenden Person (6) aus (modifiziert nach KELLERMANN et al.,2012).

3.2.3.6 Untersuchung der neurologischen Funktion

Um induzierte neurologische Defizite bei den Versuchstieren erkennen zu können, wird eine neurologische Untersuchung im Sinne von sensomotorischen Tests durchgeführt. Hierfür wurde ein Test- und Punkteschema entworfen, welches das Verhalten des Tieres, die Leistung bei aktiv motorischen Tests und die Prüfung der Sensorik berücksichtigt.

Ein neurologisch unauffälliges Tier sollte nach diesem Schema insgesamt 0 bis maximal 1 Punkt erreichen. Beobachtete und gemessene Defizite spiegeln sich in einer abgestuft erhöhten Punktzahl bis – je nach Kategorie – maximal 4 Punkte wieder (siehe Tab. 01).

Die sensomotorischen Tests beginnen am präoperativen Tag -1 und werden an den postoperativen Tagen 1, 2, 3 und 4 fortgesetzt. Die Untersuchung am präoperativen Tag -1

dient zum einen der Gewöhnung der Versuchstiere an die ihnen unbekannten Aufgaben und Bewegungsabläufe, zum anderen der Erhebung einer Ausgangsbasis für jedes Tier. Die Ergebnisse der einzelnen Tests werden während der Untersuchung in einen Testbogen eingetragen und später in eine Excel-Tabelle überführt. Tageszeit, Test-Reihenfolge, untersuchende Person und grundsätzlicher Ablauf sind für jedes Tier identisch.

Zusätzlich zur Bewertung der neurologischen Funktion findet durch die Überprüfung von Bewusstsein, Pflegeverhalten und Körpergewicht des Tieres auch gleichzeitig eine Einschätzung des Allgemeinbefindens der Tiere statt.

Benötigte Hilfsmittel zur Bewertung der neurologischen Funktion:

- 2 Seitenstützen aus Holz: Höhe 53 cm
- Schaumstoffmatte: Höhe 5 cm, mit blauer Plastikfolie umsäumt
- Balken aus unbehandeltem Holz: 130 x 2,5 x 2,5 cm
- Balken aus unbehandeltem Holz: 130 x 1,5 x 1,5 cm
- Drahtgitter: 57 x 49 cm, Lochgitterabstand 0,8 cm, Drahtsteg 1 mm
- Drahtseil: 62 x 0,3 x 0,3 cm
- Styroporwürfel (40x40cm)
- Timer: Hanhart-Labor Timer, Labor 3, Berlin
- Digitale Waage: Kern & Sohn GmbH, Balingen

3.2.3.6.1 Allgemeinbefinden

3.2.3.6.1.1 Bewusstsein

Mit der Überprüfung des Bewusstseins wird bereits begonnen, wenn sich das Versuchstier noch im Haltungskäfig befindet. Dabei wird insbesondere darauf geachtet, wie das Tier in Ruhe und bei Veränderung äußerer Einflüsse reagiert. Neugieriges und aufmerksames Verhalten wird als normal und damit nach dem Punkteschema mit 0, gedämpftes (verminderte Reaktion) oder ruheloses Verhalten (z. B. Umherwandern) mit 1 und Lethargie (ohne jegliche Reaktion auf die Außenwelt) mit 2 Punkten bewertet (siehe Tab. 01).

3.2.3.6.1.2 Pflegeverhalten

Das Pflegeverhalten der Ratte wird anhand einiger äußerer Kriterien beurteilt. Der Untersucher achtet dabei vor allem auf verklebte Augen (rötliches Sekret aus den Harderschen Drüsen), struppiges Fell oder eine verschmutzte Analregion. Ein einwandfreier Pflegezustand wird gemäß dem Punkteschema mit 0 Punkten bewertet. Vermindertes Putzverhalten des Tieres (1 Punkt) oder völliges Ausbleiben der Fellpflege und Körperreinigung (2 Punkte) werden ebenfalls in die Bewertung mitaufgenommen (siehe Tab. 01).

3.2.3.6.1.3 Gewichtskontrolle

Das Gewicht aller Versuchstiere wird am präoperativen Tag -1 sowie an den vier postoperativen Tagen ermittelt.

3.2.3.6.2 Motorik

3.2.3.6.2.1 Gitter-Dreh-Test („Rotating-Grid“)

Beim Rotating-Grid-Test wird die Ratte auf ein horizontales (0 °) Drahtgitter gesetzt, welches dann nacheinander in eine vertikale (90°) und umgekehrt horizontale (180°) Position gebracht wird. In umgekehrt horizontaler Position sollte sich das Versuchstier kopfüber hängend 5 Sekunden (s) lang am Drahtgitter festhalten können. Die Bewertung erfolgt dem Bewertungsschema entsprechend (siehe Tab. 01). Mithilfe des Drahtgitter-Tests lassen sich Aussagen zu Muskelkraft, Gleichgewichtssinn und eventuellen Haltungsasymmetrien des Tieres treffen.

3.2.3.6.2.2 Balken-Gleichgewichts-Test („Beam-Balance“)

Für den Beam-Balance-Test werden 2 Seitenstützen aus Holz benötigt, auf denen ein unbehandelter Holzbalken (130 x 1,5 x 1,5 cm) in einer Höhe von ca. 55 cm befestigt wird. Eine Bodenmatte aus Schaumstoff sorgt, wie auch bei den nachfolgenden aktiven Tests, im Falle eines Abstürzens des Tieres für ausreichend Abfederung.

Die Ratte wird nun quer zur Verlaufsrichtung des Balkens und mittig auf dem Balken platziert. In dieser Position soll das Versuchstier 60 s lang das Gleichgewicht halten und auf dem Balken balancieren. Dieser Test wird insgesamt dreimal mit einem Abstand von jeweils 60 s durchgeführt. Die erreichten Zeiten in s bzw. die Unfähigkeit des Tieres, sich

festzuhalten, werden bei jedem Durchlauf notiert und bewertet (siehe Tab. 01). Mit diesem Test können Muskelkraft und Gleichgewicht des Versuchstieres bewertet werden.

3.2.3.6.2.3 Balken-Lauf-Test („Beam-Walking“)

Der Aufbau des Beam-Walking-Tests ähnelt demjenigen des Beam-Balance-Tests. Der unbehandelte Holzbalken (130 x 2,5 x 2,5 cm) hat jedoch eine vergrößerte Querschnittsfläche, um das Laufen auf dem Balken für das Versuchstier zu erleichtern.

Die Ratte muss dreimal eine Strecke von jeweils 100 cm auf dem Balken entlanglaufen, wobei Fußfehler (also deutliche Fehltritte neben den Balken) der Vorder- und Hinterbeine vom Untersuchenden gezählt und gemäß dem Punkteschema bewertet werden (siehe Tab. 01).

Der Beam-Walking-Test erlaubt es, Bewegungsstörungen, Beeinträchtigungen von Gleichgewichtssinn und Stellreflexen sowie Haltungsasymmetrien zu diagnostizieren und zu bewerten.

3.2.3.6.2.4 Greif-Zug-Test („Prehensile-Traction“)

Beim Prehensile-Traction-Test muss das Versuchstier mit beiden Vorderpfoten ein in ca. 53 cm Höhe gespanntes Drahtseil ergreifen und sich mindestens 15 s daran festhalten können. Der Test wird mit einem zeitlichen Abstand von 60 s zweimal durchgeführt und die erreichten Zeiten des Tieres werden vom Untersucher schriftlich festgehalten. Ebenso wird auf eine symmetrische Aktion der beiden Vorderpfoten des Tieres in der Greif- und Haltephase geachtet und eventuelle Auffälligkeiten diesbezüglich werden festgehalten. Die Bewertung erfolgt entsprechend dem Punkteschema (siehe Tab. 01).

Dieser Test eignet sich zur Beurteilung des Greif- und Haltevermögens, der allgemeinen Muskelkraft sowie der Bewegungssymmetrie.

3.2.3.6.3 Sensorik

3.2.3.6.3.1 Propriozeption

Bei der Überprüfung der Propriozeption oder Tiefensensibilität soll eine Einschätzung erfolgen, inwiefern das Versuchstier in der Lage ist, die Position seines Körpers im Raum, den Spannungszustand von Muskeln und Sehnen und Bewegungsrichtungen zu erkennen.

Alle Untersuchungen der sensorischen Funktionen werden auf einen mit Stoff bespannten Styroporwürfel (40 x 40 cm) durchgeführt.

Für einen ersten Überblick versucht die untersuchende Person, die Ratte durch seitliches Einwirken auf den Körper aus der Balance zu bringen. Neurologisch unauffällige Tiere versuchen prompt, die Lage ihres Körpers zu korrigieren während geschädigte Tiere ohne Gegenreaktion in eine Art Seitenlage gebracht werden können.

Des Weiteren wird versucht, Korrekturreaktionen bei einem passiven Überköten der Hinterpfoten zu provozieren, was bei gesunden Tieren sofort erfolgt.

Bei einer modifizierten „Tischkantenprobe“ wird das Versuchstier jeweils mit der Dorsalseite einer Vorderpfote an eine Kante des Styroporwürfels herangeführt, wobei physiologischerweise ein Aufpußen auf den Würfel erfolgen sollte.

Diese Tests werden jeweils zweimal für jede Körperhälfte durchgeführt und nach dem Punkteschema in Tabelle 01 bewertet.

3.2.3.6.3.2 Sehfähigkeit

Die Sehfähigkeit des Versuchstieres wird mit dem sog. „Wattebauschtest“ ermittelt. Dabei wird auf jeder Gesichtsseite einige Zentimeter vom Kopf des Tieres entfernt ein kleiner Wattebausch fallengelassen. Ein Hinwenden des Kopfes der Ratte zu der entsprechenden Seite spricht für ein intaktes Sehvermögen, was als normale Reaktion mit 0 Punkten im Punkteschema bewertet wird (siehe Tab. 01). Auch das Verhalten des Tieres bei vorherigen Tests kann schon Hinweise auf eine mögliche einseitige oder beidseitige Blindheit geben.

3.2.3.6.3.3 Hörvermögen

Das Hörvermögen der Ratte wird durch ein Fingerschnippen des Untersuchers – einige Zentimeter von jedem Ohr entfernt – untersucht. Ein hörfähiges Tier wendet sich dabei der Schallquelle zu. Zusätzlich kann meist ein Zucken der betreffenden Ohrmuschel beobachtet werden. Das Ergebnis wird für beide Seiten zusammengefasst, wobei eine normale Reaktion mit 0 Punkten, eine ausbleibende Reaktion mit 1 Punkt bewertet wird (siehe Tab. 01).

3.2.3.6.3.4 Vibrissen-Sensibilität

Bei der Bewertung der Vibrissen-Sensibilität streift der Untersucher mit einer Pinzette auf jeder Gesichtshälfte kurz die Vibrissen der Ratte und achtet auf deren Reaktion. Gesunde Tiere reagieren auf diesen Reiz mit einem Zucken oder Drehen des Kopfes und Augenblinzeln. Dieser Vorgang wird auf jeder Kopfseite zweimal durchgeführt. Die Bewertung erfolgt nach dem vorgegebenen Punkteschema (siehe Tab. 01).

Tab. 01: Test- und Bewertungsschema der neurologischen Untersuchung

Kategorie	Grad der Beeinträchtigung					Punkte	Normal
	0	1	2	3	4		
Bewusstsein	normal	gedämpft/ ruhelos	lethargisch	/	/	0 - 2	0
Pflegeverhalten	normal	eingeschränkt	nicht vorhanden	/	/	0 - 2	0
Motorik							
Kraft im Rotating-Grid-Test	≥ 5 s bei 180°	< 5 s bei 180°	nur bei 90°	nicht fähig	/	0 - 3	0
Gleichgewicht im Beam-Balance-Test	50 – 60 s	30 – 49 s	10 – 29 s	1 – 10 s	nicht fähig	0 - 4	0 - 1
Koordination im Beam-Walking-Test	1 – 3 Fehlritte	4 - 10 Fehlritte	11 - 20 Fehlritte	> 20 Fehlritte	nicht fähig	0 - 4	0
Kraft im Prehensile-Traction-Test	11 – 15 s	6 – 10 s	1 – 5 s	/	/	0 - 3	0
Sensorik							
Propriozeption	normal	eingeschränkt	nicht vorhanden	/	/	0 - 2	0
Sehen	Kopfdrehen	keine Reaktion	/	/	/	0 - 1	0
Hören	normale Reaktion	keine Reaktion	/	/	/	0 - 1	0
Vibrissensensibilität	normal	eingeschränkt	nicht vorhanden	/	/	0 - 2	0

3.2.3.7 Euthanasie, Probenentnahme und Blutanalyse

Am postoperativen Tag 4 werden die Versuchstiere nach einer abschließenden neurologischen Untersuchung in tiefer Isoflurannarkose (5 Vol%) durch Entbluten getötet. Hierbei werden das Rückenmark zwischen Atlas und Axis, umgebende Muskulatur sowie die großen Gefäße im Halsbereich (Vv. jugulares internae und externae, Aa. carotides internae und externae) mit einer Schere durchtrennt. Austretendes Blut wird sofort mit einem Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA-) Röhrchen (S-Monovette 2,7 ml, SARSTEDT AG &

Co., Nümbrecht) und einem Eppendorfer Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg) aufgefangen.

Das geronnene Blut im Eppendorfer Reaktionsgefäß wird zur Gewinnung von Blutserum mit 12.000 RPM bei einer Temperatur von 4 °C für 3 min zentrifugiert (Biofuge® fresco, Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, 63505 Langenselbold). Das abpipettierte Serum wird für weitere Analysen bei einer Temperatur von –80 °C in einem Eppendorfer Reaktionsgefäß eingefroren. Das EDTA-Blut wird zur Erstellung eines Blutbildes mithilfe eines Blutanalysegerätes (pocH-100iV Diff, Sysmex Corporation, Kobe, Japan) verwendet. Hierbei werden Leukozyten- („white blood cells“, WBC) und Erythrozytenzahl („red blood cells“, RBC), Hämoglobin (HGB), Hämatokrit („hematocrit“, HCT), durchschnittliches Erythrozyten-Volumen („mean corpuscular volume“, MCV), durchschnittliche Hämoglobinmenge pro Erythrozyt („mean corpuscular hemoglobin“, MCH), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration („mean corpuscular hemoglobin concentration“, MCHC) und Thrombozytenzahl („platelets“, PLT) aus dem Vollblut bestimmt.

Es folgt die Entnahme von Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Dünndarm und einer Niere. Vor dem Eröffnen von Brustkorb und Bauchhöhle müssen, nach einem großzügigen Hautschnitt, die beiden Elektroden der Transmittersonde vorsichtig von der Brustwand entfernt und kaudal umgeklappt werden.

Das Gehirn und alle weiteren Organe werden auf einem Metallplättchen liegend auf Trockeneis tiefgefroren und danach – in Aluminiumfolie verpackt – bei –80 °C gelagert.

Dann kann die Transmittersonde unter Durchtrennung der Verbindungsstellen mit der Bauchnaht komplett aus der Bauchhöhle entfernt werden.

Zur Reinigung und Desinfektion wird der Transmitter für mindestens 24 h in eine 1%ige Enzymlösung (Tergazyme®, ALCONOX, Inc., New York, USA), danach bei 37 °C im Wärmeschränk für mindestens 24 h in eine Desinfektionslösung (CIDEX OPA, Johnson & Johnson MEDICAL Limited, North Yorkshire, UK) und letztlich für mindestens 24 Stunden in eine isotone NaCl-Lösung (0,9 %, B.Braun) gelegt.

3.2.4 Tierausswahl zum Einschluss in die Studie und weiterführende Untersuchungen

3.2.4.1 Gezielte Tierausswahl durch Ausschlusskriterien

Die telemetrische Überwachung der Tiere und das hierauf aufbauende Alarmsystem machen es in der vorliegenden Studie möglich, Tiere mit sich rapide verschlechterndem Allgemeinbefinden zu euthanasieren, bevor sie versterben. Diese Tierschutzmaßnahme hat auch noch den Vorteil, dass bestimmte Organe, z. B. das Gehirn, rechtzeitig unbeeinträchtigt entnommen und für weitere Untersuchungen verwendet werden können. Aus diesem Grund und aufgrund der Komplexität des Versuchsaufbaus mit störanfälligen Komponenten (z. B. OP-Protokoll und telemetrische Überwachung) wird für die vorliegende Arbeit nach Ablauf der postoperativen vier Tage bei allen 10 Versuchstieren eine spezifische Auswahl von jeweils 10 Tieren pro Versuchsgruppe getroffen. Dabei stammen 5 dieser 10 Tiere aus den überlebenden und 5 aus den vorzeitig euthanasierten Versuchstieren jeder Versuchsgruppe (siehe Abb. 18). Der Anteil an vorzeitig euthanasierten Tieren in den einzelnen Versuchsgruppen stellt sich für die ursprüngliche Tierzahl von 20 Tieren pro Gruppe wie folgt dar: „Intakt“ 25 %, „Progesteron“ 55 %, „Plazebo“ 50 %, „P+Ö“ 25 %, „Östrogen“ 65 %. Dies hat zum Vorteil, dass nur jene Tiere in die Auswertung eingehen, bei denen möglichst vollständige Datensätze in allen hier untersuchten Bereichen vorliegen und bei denen keine irregulären Vorkommnisse, z. B. während der operativen Phase, aufgetreten sind. Die spezifische Auswahl von jeweils 5 überlebenden und 5 euthanasierten Tieren pro Versuchsgruppe macht es zudem möglich, einen adäquaten Vergleich zwischen diesen beiden Gruppierungen („Überlebend“ gg. „Euthanasiert“) anzustellen, zumindest bei den Analysen, die isoliert das Gehirn post mortem betrachten.

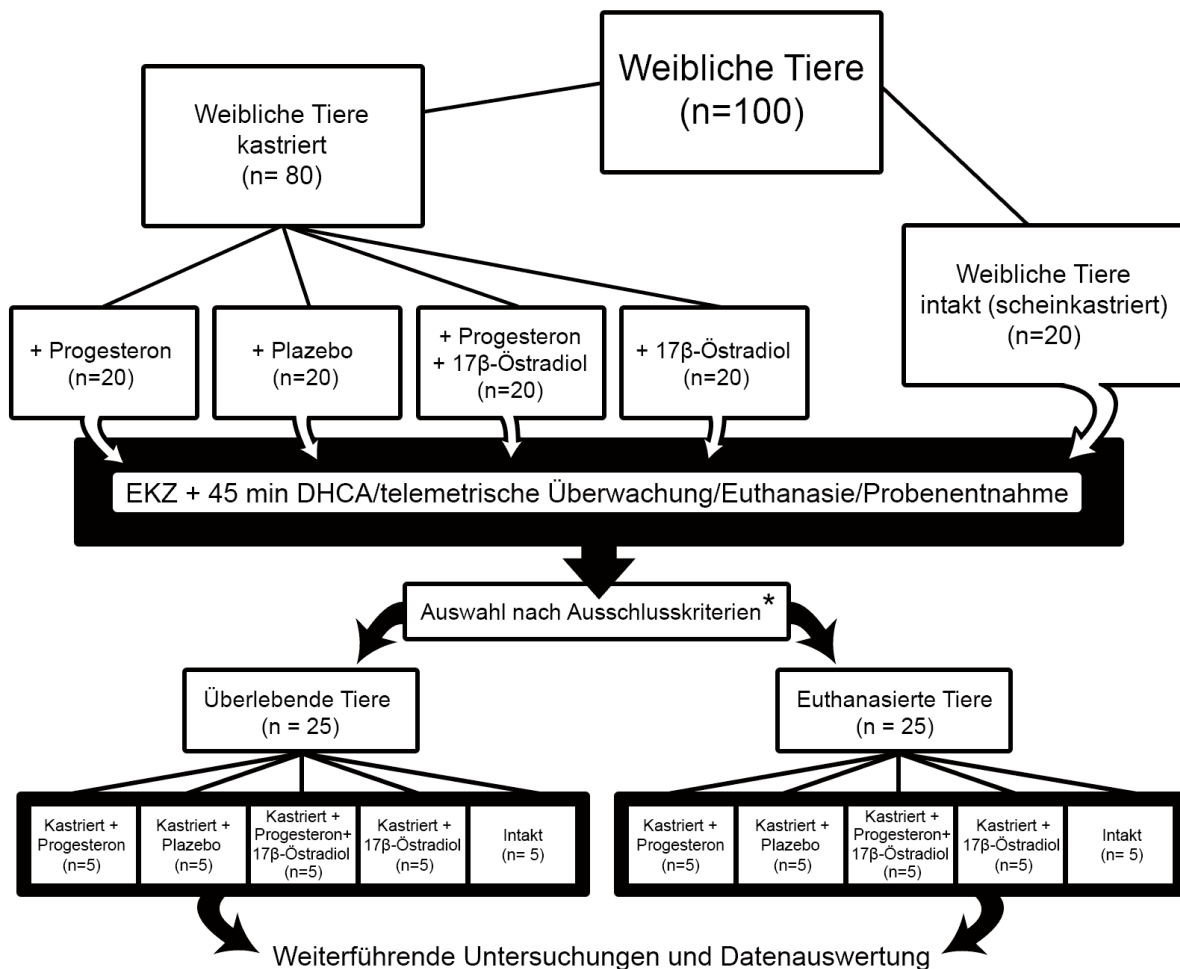


Abb. 18: Versuchsaufbau und Tierausswahl für weiterführende Untersuchungen.

* Unvollständige Datensätze Telemetrie (Messfehler, Systemausfall); Auffälligkeiten im OP-Protokoll (erschwerter Präparation, schlechte Einstellbarkeit des Blutdruckes)

3.2.4.2 TNFα-Konzentrationsbestimmung im Serum mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Bestimmung der TNFα-Konzentration im Serum der Versuchstiere (Serum „1h post EKZ“) erfolgt mithilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA-Test-Kits (Quantikine® ELISA, Rat TNF-α, R&D Systems Europe, Abingdon, Großbritannien). Das Test-Kit nutzt die Technik des klassischen quantitativen Sandwich-ELISA. Die Vertiefungen („wells“) der enthaltenen 96-Loch-Mikrotiterplatte sind mit einem monoklonalen Antikörper, spezifisch für Ratten-TNFα, beschichtet.

Die Durchführung des ELISA-Testverfahrens erfolgt exakt nach den Vorgaben des Herstellers. Dabei werden die Serumproben im Verhältnis 1:2 mit der dafür vorgesehenen gepufferten Proteinlösung („Calibrator Diluent“) in einem 1,5 ml Eppendorfer Reaktionsgefäß

verdünnt. Weiterhin wird ausgehend von nach Anleitung aufgelöstem rekombinantem TNF α der Ratte (Stammlösung, 800 pg/ml TNF α) eine Standardreihe pipettiert: Dafür werden jeweils 200 μ l Verdünnungslösung („Calibrator Diluent“) in 6 Eppendorfer Reaktionsgefäße pipettiert. Es entstehen durch fortlaufende Verdünnung im Verhältnis 1:2 TNF α -Lösungen mit den Konzentrationen 400 pg/ml, 200 pg/ml, 100 pg/ml, 50 pg/ml, 25 pg/ml und 12,5 pg/ml. Eine mitgelieferte TNF α -Positivkontrolle (rekombinantes Ratten TNF α) wird ebenfalls nach Anleitung aufgelöst. Das Befüllen der Mikrotiterplatte mit der Standardreihe, der Positivkontrolle und den verdünnten Serumproben erfolgt nach einem vorher festgelegten Pipettierschema mit den vorgegebenen Volumina, wobei die Standardreihe (800–0 pg/ml TNF α) in absteigender Konzentration in der ersten Spalte, also senkrecht (A1-H1) aufgetragen wird. Die Negativkontrolle (0 pg/ml TNF α) besteht aus Verdünnungslösung („Calibrator diluent“). Es folgt eine Inkubationszeit von 2 h bei Zimmertemperatur, im Laufe derer vorhandenes TNF α an den immobilisierten anti-TNF α -Antikörper binden kann. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgt das erste Waschen der Mikrotiterplatte, wobei alle „wells“ der Mikrotiterplatte insgesamt 5x mit Waschpufferlösung (hergestellt aus enthaltenem Waschpuffer-Konzentrat) gefüllt und sehr gründlich wieder entleert werden müssen. Daraufhin werden 100 μ l eines im Test-Kit enthaltenen polyklonalen Antikörpers, spezifisch für Ratten-TNF α , in jede „well“ pipettiert. Dieser mit Meerettichperoxidase („horseradish peroxidase“, HRP) konjugierte Antikörper bindet in der zweiten Inkubationszeit (2 h bei Zimmertemperatur) an den Beschichtungs-Antikörper gebundenes TNF α , das im Gegensatz zu freiem TNF α nicht durch den ersten Wasch-Schritt entfernt wurde. Es bildet sich der für den Sandwich-ELISA typische Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Nach Ablauf der zweiten Inkubationszeit folgt der zweite Wasch-Schritt, analog zum Vorgehen beim ersten Wasch-Schritt. Die Detektions-Lösung („Substrate Solution“) zur farblichen Darstellung des gebundenen polyklonalen Antikörpers besteht aus 2 Phasen („Color Reagent A“, stabilisiertes Wasserstoffperoxid, H₂O₂; „Color Reagent B“ stabilisiertes Tetramethylbenzidin, TMB), welche dafür 15 min vor Verwendung zu gleichen Teilen gemischt werden müssen. Zur Detektion werden 100 μ l der „Substrate Solution“ in jede „well“ pipettiert und es folgt eine lichtgeschützte Inkubationsphase von 30 min. Bei einer durch die HRP katalysierten Hydrolyse von H₂O₂ entstehen Sauerstoffradikale, welche eine Oxidierung von TMB bewirken. Oxidiertes TMB entwickelt eine Blaufärbung (JOSEPHY et al., 1982). Je mehr gebundenes TNF α mit gebundenem HRP-konjugierten-Detektions-Antikörper also in einer „well“ vorhanden ist, desto stärker entwickelt sich die Blaufärbung. Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubationsphase wird die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 μ l einer

Salzsäurelösung („Stop Solution“) in jede „well“ gestoppt. Dies hat außerdem einen Farbumschlag von blau auf gelb zur Folge.

Die Absorption der Proben wird mithilfe eines Photometers (Spectra II, SLT Labinstrument, Crailsheim) bei der vorgegebenen Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Das Photometer berechnet selbstständig eine Standardkurve anhand der vorgegebenen Standardreihe und benutzt diese dann zur Berechnung der Konzentration an TNF α in den vorgelegten Proben. Die Negativ- und Positivkontrolle zeigen die richtige Durchführung und den Erfolg des Testverfahrens an.

3.2.4.3 Histologische Untersuchungen

Für die vorliegende Arbeit wird lediglich das Gehirn der Versuchstiere für weitergehende Untersuchungen benötigt. Zur Herstellung von Gefrierschnitten für die Färbung und histologische Untersuchung werden die zuvor bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Gehirne für mindestens 12 h langsam auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiert und am nächsten Tag mit einem Kryostat-Mikrotom (HM 355, Microm International GmbH, Walldorf) geschnitten. Dem Hirnatlas der Ratte von Paxinos und Watson (1998) entsprechend werden hierbei koronare Schnitte $-0,3$ und $-3,3$ mm kaudal des Bregma hergestellt (PAXINOS und WATSON, 1998). Von den beiden Ebenen werden Schnitte mit einer Dicke von $7\text{ }\mu\text{m}$ bei einer Objekttemperatur von -20 bis $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ angefertigt, wobei jeweils 2 Schnitte auf einen Superfrost-Objektträger (Super Frost[®] Plus, Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen werden. Die fertiggestellten Gefrierschnitte und das restliche Gehirn werden wieder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Gefrierschrank aufbewahrt. Die Bestimmung des neuronalen Zellschadens erfolgt mithilfe einer Hämatoxylin-Eosin (HE-) Färbung. Die dem Gefrierschrank entnommenen Schnitte werden hierzu nach einem Standardprotokoll gefärbt (MULISCH und WELSCH, 2010), eingedeckt und in einem Objektträgerkasten bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Ein gegenüber den Versuchsgruppen „geblindeter“ Untersucher wertet die gefärbten Schnitte mithilfe eines Lichtmikroskops (Axiolab, Fa. Zeiss, Jena) durch manuelles Auszählen aus. Die neuronale Zellschädigung wird in 3 unterschiedlichen Gehirnnarealen, frontalem Kortex (Motorkortex, motorisches Zentrum), Hippokampus und Striatum, bei 400-facher Vergrößerung ermittelt. Dabei werden in beiden Hemisphären der Kortex und das Striatum anhand 5 sog. „hoch vergrößerter Felder“ („High Power Field“, HPF) ausgewertet und der Hippokampus durch das Auszählen des gesamten Zellbandes. Um den neuronalen Schaden in diesem Modell adäquat wiedergeben zu können, wurde zur Auswertung für jedes Gehirnnareal ein geeigneter Score entwickelt. Der Score – ausgerichtet an der gezählten Anzahl an geschädigten Neuronen – reicht dabei von

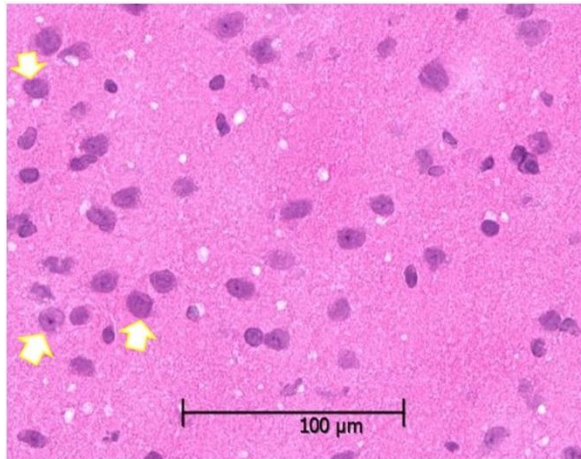
Werten um 0–3, wobei 0 für eine leichte Schädigung und 3 für eine maximale Schädigung steht. Die genaue Einteilung des Scores für jedes Gehirnnareal findet sich in Tabelle 02. Intakte Neurone stellen sich in der HE-Färbung rundlich, mit blassem und lilafarbenem Zytoplasma dar und zeigen einen gut erkennbaren Nukleus mit Nukleolus. Geschädigte Neurone weisen dagegen eine unregelmäßige bzw. dreieckige Form auf, mit eosinophilem, teils kräftig pinkem Zytoplasma. Ein kondensierter und dunkel gefärbter Zellkern sowie ein nicht mehr eindeutig erkennbarer Nukleolus weisen ebenfalls auf ein geschädigtes Neuron hin (GARMAN, 2011). Das Auftreten von sog. „Dark Neurons“ mit Kernpyknose, stark basophilem Zellkern und ohne erkennbaren Nukleolus wird ebenfalls als neuronaler Schaden gewertet (siehe Abb. 19).

Tab 02: Gehirnnareal-spezifischer Bewertungsscore für neuronale Schädigungen

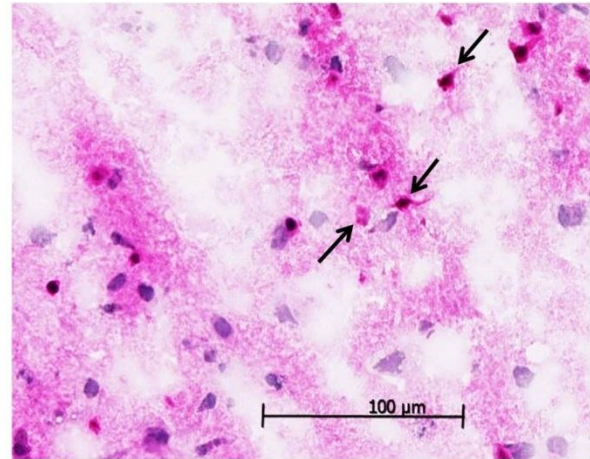
Score	Kortex	Hippokampus	Striatum
0	< 100	< 250	< 65
1	100 - 150	250 - 500	65 - 130
2	150 - 200	500 - 750	130 - 195
3	> 200 oder Infarkt	> 750 oder Infarkt	> 195 oder Infarkt

Die für das jeweilige Gehirnnareal eingetragenen Werte beziehen sich auf die Anzahl der vom Untersucher unter dem Lichtmikroskop gezählten geschädigten Neurone (400x Vergrößerung)

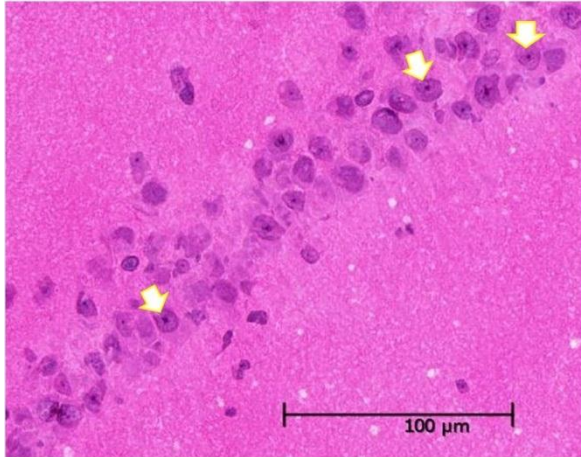
1)A



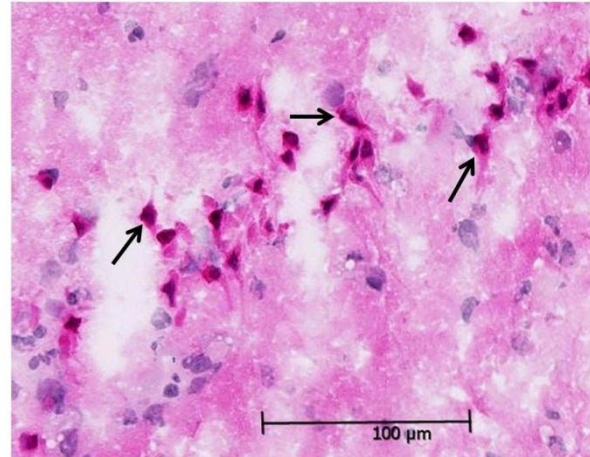
1)B



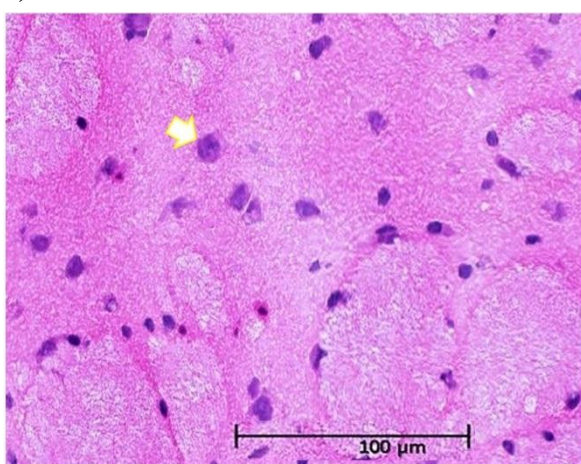
2)A



2)B



3)A



3)B

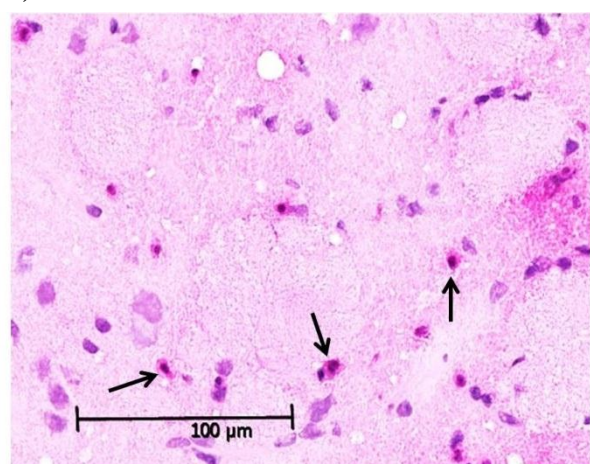


Abb. 19: Beispiele für HE-gefärbte histologische Schnitte aus den 3 untersuchten Gehirnbereichen Kortex, Hippokampus und Striatum. Auf der linken Seite (A) finden sich jeweils Beispiele für eine vergleichsweise leichte Schädigung des Areals, auf der rechten Seite (B) befinden sich Beispiele für einen stark geschädigten Hirnbereich. Große weiße Pfeile: intakte Neurone; dünne schwarze Pfeile: eosinophile Neurone und "Dark neurons"; 1) Motorkortex; 2) Ammonshorn, Cornu ammonis-Region 1 (CA1-Region) des Hippokampus; 3) Striatum.

3.2.4.4 Nachweis von Rezeptor-, Transporter- und Entzündungsproteinen im Gehirngewebe mittels Western-Blot-Verfahren

In der vorliegenden Studie wird die etablierte Methode des Western-Blot-Verfahrens zum semiquantitativen Nachweis bestimmter Rezeptoren, Transporter und entzündungsrelevanter Proteinen im Gehirn der Versuchstiere verwendet. Hierzu wird ein Proteingemisch mithilfe der Gelelektrophorese nach dem Molekulargewicht der einzelnen Proteine aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine werden dann auf eine Membran übertragen. Danach werden die gesuchten Proteine mittels spezifischer Antikörper und Chemilumineszenz-Reaktion detektiert.

3.2.4.4.1 Probenaufbereitung mit Proteinextraktion

Die Gehirnproben für den Western-Blot werden im Rahmen der histologischen Aufarbeitung der Gehirne der Versuchstiere gewonnen. Bei der Herstellung der Gehirnschnitte mit dem Kryostat-Mikrotom wird Gehirngewebe im relevanten Bereich (–0,3 und –3,3 mm kaudal des Bregma) gesammelt, in ein Eppendorfer Reaktionsgefäß gegeben und die Proben werden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

Um beim Vorgang der Proteinextraktion einen Proteinabbau, z. B. durch das Freisetzen intrazellulärer Enzyme, weitgehend zu verhindern, werden sämtliche Arbeitsschritte auf Wassereis bei 4 °C durchgeführt. Zusätzlich setzt man Proteaseinhibitoren ein. Den noch gefrorenen Gehirnproben werden in Eppendorfer Reaktionsgefäßen (1,5 ml) jeweils 500 µl einer zuvor hergestellten und ebenfalls gekühlten (4 °C) Lysepufferlösung zugesetzt. Es folgt die manuelle Homogenisierung der Proben mithilfe von 1 ml Spritzen (Omnifix[®]-F, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) und wechselnden Einmal-Injektions-Kanülen mit absteigendem Durchmesser (20, 22, 24 und 27 G) (Sterican[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Das derart entstandene Homogenisat wird bei 4 °C mit 3800 RPM für 10 min zentrifugiert (Biofuge[®] fresco). Der entstandene Überstand wird in ein 2 ml großes Eppendorfer Reaktionsgefäß überführt. Das abgesetzte Pellet wird mit 1 ml Pufferlösung resuspendiert und im 2. Zentrifugationsschritt mit 7000 RPM für 15 min bei 4° C zentrifugiert. Der nun entstandene Überstand wird dem ersten Überstand beigefügt und das Gesamtvolumen mit Puffer auf 2 ml Probenvolumen aufgefüllt. Es folgt der letzte Zentrifugationsschritt mit 10.000 RPM für 30 min bei 4 °C. Danach wird der entstandene Überstand verworfen und das zurückbleibende Pellet mit 102 µl Sodiumdodecylsulfat-Lösung (SDS) (SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg) zur Denaturierung versetzt und resuspendiert.

3.2.4.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um für die Gelelektrophorese die notwendige und immer gleiche Proteinmenge pro Geltasche auftragen zu können, muss die Proteinkonzentration jeder einzelnen Probe bekannt sein. Hierfür wird eine quantitative Proteinbestimmung mit dem Bio-Rad Detergent Compatible (DC) Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA) durchgeführt, der eine modifizierte Methode nach LOWRY (1951) verwendet (LOWRY et al., 1951). Der Assay nutzt die Reaktion von Proteinen mit alkalischer Kupfertartratlösung (Lösung A) und Folin-Reagens (Lösung B). Die Ausbildung eines Komplexes zwischen den Peptidbindungen der Proteine und den Kupfer-Ionen führt zu einer Reduktion des Folin-Reagens. Es entsteht Molybdänblau und damit die charakteristische Blaufärbung, welche zur photometrischen Bestimmung der Proteinmenge in der Probe genutzt werden kann.

Für ein möglichst genaues Ergebnis werden von den Proteinproben 2 Verdünnungen hergestellt (1:5 und 1:10) und es wird zusätzlich im Doppelansatz gearbeitet. Eine Mikrotiterplatte (BRANDplates®, BRAND GmbH & Co. KG) wird mit 5 µl beider Verdünnungsstufen befüllt und jeder Verdünnung werden 25 µl Lösung A und 200 µl Lösung B zugesetzt. Nach 10 min Inkubationszeit wird die Absorption der Proben mit einem Photometer (SpectraII, SLT Labinstrument, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 620 nm bestimmt. Mithilfe einer definierten Konzentrationsreihe bovines Serumalbumins (Bio-Rad Protein Assay Standard H, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) lässt sich eine Eichkurve erstellen, die daraus eine rechnerische Ableitung der Proteinkonzentration der gemessenen Proben erlaubt.

Für ihre Verwendung in der Gelelektrophorese müssen die Proteinproben weiter denaturiert und reduziert werden. Hierzu werden jeweils 97,5 µl der Proben mit 37,5 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) (Invitrogen AG, Carlsbad, USA) und 15 µl NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x) (Invitrogen AG, Carlsbad, USA) versetzt und im Thermomixer® (Eppendorf AG, Hamburg) 10 min bei 70 °C und 300 RPM inkubiert.

3.2.4.4.3 Gelelektrophoretische Proteinauftrennung

Für die Gelelektrophorese inklusive des Gießens der benötigten Gele wird das Mini-PROTEAN® Tetra Cell-System von Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA) verwendet. In der vorliegenden Studie erfolgt die Auftrennung der Proteine mithilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970). Bei diesem diskontinuierlichen Verfahren werden 2 horizontal aufeinandergeschichtete Gele mit

unterschiedlicher Porengröße und unterschiedlichem pH-Wert verwendet: Im grobporigen Sammelgel (pH 6,8) werden die Proteine zuerst aufgetrennt, während im feinporigen Trenngel (pH 8,8) dann die Auftrennung entsprechend der Proteingröße erfolgt. Durch unterschiedliche Polyacrylamid-Anteile im Trenngel (8, 10 und 12 %) wird die Durchlässigkeit des Gels an die Molekülgröße des gesuchten Proteins angepasst. Durch das anionische Detergens SDS erhalten alle Proteine eine negative Ladung und dies macht die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld einzig vom Molekulargewicht der Proteine abhängig.

Zum Gießen der Gele werden jeweils 2 Glasplatten, eine davon mit Abstandshalter (1,5 mm), in eine Gießkammer mit Halterungen eingespannt. Gummidichtungen am unteren Ende verhindern, dass das noch nicht auspolymerisierte Gel ausläuft. Die Gele werden direkt vor dem Gießen angemischt, wobei zuerst das Trenngel in einer Höhe von ca. 5 cm zwischen die Glasplatten pipettiert und dann sofort mit Isopropanol (Merck, KGaA, Darmstadt) überschichtet wird. Nach etwa einer Stunde ist das Trenngel auspolymerisiert und das Isopropanol kann abgegossen werden. Es folgt das Pipettieren des Sammelgels bis zum oberen Rand der Glasplatte, wobei sofort im Anschluss ein Kamm mit 10 Zähnen in das noch flüssige Gel gesteckt wird.

Nach der Auspolymerisation des Sammelgels können die Glasplatten mit den Gelen aus den Halterungen entnommen und in den Rahmen der Laufkammer eingespannt werden. Der Kamm wird vorsichtig aus dem Sammelgel entfernt und hinterlässt 10 Geltaschen für das Auftragen des zu untersuchenden Probenmaterials. Die innere und äußere Elektrophoresekammer und die Geltaschen werden anschließend mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt.

Von jeder zu untersuchenden Probe werden 25 µg in 1 Geltasche pipettiert. Die 1. Geltasche wird immer mit einem farbigen Molekulargewichtsmarker befüllt (10 µl, MagicMark™ XP Invitrogen und Novex® Invitrogen im Verhältnis 1:9). Anschließend führt man die Elektrophorese bei 200 Volt über 45 min durch.

3.2.4.4.4 Proteintransfer mittels „Blotting“ und Proteindetektion mittels Chemilumineszenz-Reaktion

Das „Blotting“, der Übertrag der Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham™ Hybond™-ECL, GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien) erfolgt mithilfe des Mini Trans-Blot Cell Moduls (Bio-Rad). Es wird das sog. „Nassblotting-

Verfahren“ mit Methanol-haltigem Transferpuffer angewendet. Gel, Filterpapier und Kunststoffschwämme werden in festgelegter Reihenfolge übereinandergeschichtet (sog. „Sandwich-Verfahren“) und mit einer Halterung in die Blotkammer eingespannt. Die Blotkammer wird mit einem Kühlelement und Transferpuffer gefüllt, bevor der Transfer über 60 min bei 35 Volt stattfindet.

Nach erfolgtem Proteintransfer werden die Membranen 3x für je 10 min auf einem Schüttler (Rocky 3D, Fröbel Labortechnik, Lindau) in TBS-T, einer Tris-gepufferten-Salzlösung („Tris-Buffered-Saline“, TBS) mit 0,1 % eines Detergens (Tween[®]20, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gewaschen. Vor jeder neuen Behandlung der Membranen bzw. vor jeder neuen Inkubation werden diese Waschschrte in gleicher Weise durchgeführt. Die unspezifischen Proteinbindungsstellen werden durch eine 2-stündige Inkubation in 5%iger Milchpulverlösung (Milchpulver, Kloster Apotheke, München) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler geblockt. Die Markierung der gesuchten Proteine erfolgt mit einem Primärantikörper (verdünnt in TBS-T) über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler sowie einem Sekundärantikörper (verdünnt in TBS-T, Meerrettichperioxodase-konjugiert, 2 h Inkubation bei Zimmertemperatur auf dem Schüttler).

Zur Darstellung der gesuchten Proteinbanden wird die gewaschene und abgetropfte Membran für 2 min mit einer zuvor angemischten Detektionslösung (Amersham[™] ECL[™]-Prime Western-Blotting Detection Reagent, GE Healthcare) bedeckt (0,125 ml/cm²). Die Peroxidase des Sekundärantikörpers katalysiert in Verbindung mit in der Detektionslösung enthaltenem H₂O₂ und Luminol die Chemilumineszenz-Reaktion. Die Membran wird dann luftblasenfrei auf die Kodak Image Station 440 CF (Kodak GmbH, Stuttgart) gelegt und für 15 min belichtet. Die Auswertung der Schwärzungsintensität erfolgt mithilfe der Software Kodak 1D Version 3,5 (Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA). Alle in der vorliegenden Studie mithilfe des Western-Blot-Verfahrens untersuchten Proteine mit den verwendeten Antikörpern und Gelen sind in Tabelle 03 dargestellt.

Tab. 03: Im Gehirngewebe detektierte Proteine mit ihren jeweiligen Primär- und Sekundärantikörpern in den gewählten Verdünnungsstufen und mit den Polyacrylamid-Anteilen der verwendeten Gele [%].

Protein	ER α	ER β	EAAT1	GLT-1b	CXCR2	IL-8	iNOS
Primärantikörper	Mouse Anti-ER α (monoklonal)	Rabbit Anti-ER β (polyklonal)	Rabbit Anti-EAAT1 (polyklonal)	Mouse Anti-GLT1b (monoklonal)	Rabbit Anti-CXCR2 (polyklonal)	Rabbit Anti-IL8 (polyklonal)	Rabbit Anti-iNOS (polyklonal)
Molekulargewicht	66 kDa	55 kDa	60 kDa	70 kDa	55 kDa	11 kDa	135 kDa
Hersteller	Santa Cruz Biotechnology Dallas, USA	Abcam plc, Cambridge, Großbritannien	Abcam plc, Cambridge, Großbritannien	Novus Europe, Cambridge, Großbritannien	Abcam plc, Cambridge, Großbritannien	Abcam plc, Cambridge, Großbritannien	Novus Europe, Cambridge, Großbritannien
Verdünnung	1:200 (TBS-T)	1:100 (TBS-T)	1:5000 (TBS-T)	1:500 (TBS-T)	1:500 (TBS-T)	1:100 (TBS-T)	1:200 (TBS-T)
Sekundärantikörper	Sheep ECL Anti-mouse IgG (HRP konjugiert)	Donkey ECL Anti-rabbit IgG (HRP konjugiert)	Donkey ECL Anti-rabbit IgG (HRP konjugiert)	Sheep ECL Anti-mouse IgG (HRP konjugiert)	Donkey ECL Anti-rabbit IgG (HRP konjugiert)	Donkey ECL Anti-rabbit IgG (HRP konjugiert)	Donkey ECL Anti-rabbit IgG (HRP konjugiert)
Hersteller	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
Verdünnung	1:2000 (TBS-T)	1:1000 (TBS-T)	1:5000 (TBS-T)	1:5000 (TBS-T)	1:2000 (TBS-T)	1:500 (TBS-T)	1:5000 (TBS-T)
Gel	10%	10%	10%	10%	10%	12%	8%

3.2.5 Statistische Grundlagen der Auswertung

Die im Rahmen des Versuchs gewonnenen physiologischen Rohdaten wurden mithilfe allgemeiner linearer Modelle statistisch ausgewertet. Als Zwischengruppenfaktor wurde dabei der Hormonstatus analysiert sowie der Innergruppenfaktor Zeit und deren Wechselwirkungen. Der Einflussfaktor Zeit wurde für die physiologischen Parameter hinsichtlich biphasischer Veränderungen im Untersuchungszeitraum quadratisch analysiert. Für die post hoc Analyse der 5 Messzeitpunkte („Baseline“, „prä-DHCA“, „post-DHCA“, „EKZ Ende“ und „1h post EKZ“) wurden die Daten mithilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse, gefolgt von Bonferroni t-Tests, analysiert.

Die Daten der neurologischen Untersuchung (Motorik und Sensorik) sind zunächst linear über die Zeit dargestellt. Ergänzt wird diese lineare Darstellung durch Box Plots der Mittelwerte aller 4 Untersuchungstage nach DHCA. Die Daten wurden mithilfe des allgemeinen linearen Modells mit dem Zwischengruppenfaktor Hormonstatus (Intakt, Plazebo, Östrogen, Progesteron und Progesteron + Östrogen), dem Innergruppenfaktor Zeit und den jeweiligen Wechselwirkungen der Einflussgrößen analysiert. Die Daten aus den neurologischen Untersuchungen der Motorik wurden quadratisch analysiert, gefolgt von post hoc einfaktorieller Varianzanalyse mit – falls angezeigt – Bonferroni t-Test.

Die histomorphologischen und biochemischen Ergebnisse wurden nicht parametrisch mit dem Kruskal Wallis-Test, gefolgt von – wo angezeigt – post hoc Mann-Whitney-U, analysiert. Die Daten sind als Boxplots dargestellt. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ angenommen. Die Datenauswertung erfolgte mithilfe des „Software Package Used for Statistical Analysis, IBM SPSS Statistics“, 21.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Physiologische Befunde vor, während und nach EKZ und DHCA

4.1.1 Parametrische physiologische Befunde während der OP-Phase

Es werden folgende physiologische Parameter im Verlauf der herzchirurgisch typischen EKZ mit DHCA zu 5 unterschiedlichen Messzeitpunkten erhoben und dokumentiert (siehe Abschnitt 3.2.3.4.1): der mittlere arterielle Blutdruck („mean arterial pressure“, MAP, mmHg); die Hämoglobinkonzentration (HGB, mg/dl); der arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO₂, mmHg); der Basenüberschuss („base excess“, BE, mmol/l) und die Blutglukosekonzentration (Glukose, mg/dl). Die Messzeitpunkte definieren sich wie folgt (siehe Tab. 04): 1.) 10 min vor Beginn der EKZ („Baseline“), 2.) vor dem Beginn des DHCA („prä-DHCA“), 3.) 5 min nach dem Start der Wiedererwärmung („post-DHCA“), 4.) 5 min vor dem Abgehen von der EKZ („EKZ Ende“) und 5.) 1 h nach Beendigung der EKZ („1h post EKZ“).

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) zeigt bei allen Versuchsgruppen während der operativen Phase einen Abfall gemäß dem Versuchsprotokoll. Es gibt aber zu den relevanten Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Bis zur 5. Messung eine Stunde nach EKZ erreicht der MAP, ebenfalls bei allen Gruppen, wieder annähernd das Ausgangsniveau. Um den Messzeitpunkt „EKZ Ende“ wird der MAP durch wiederholte Norepinephrin-Gaben (1-2 µg Boli) auf einem physiologischen Wert von etwa 50 mmHg gehalten (Norepinephrin-Dosen: Intakt 8 ± 7 µg; Progesteron 16 ± 10 µg; Plazebo 14 ± 8 µg; Progesteron + Östrogen 15 ± 10 µg; Östrogen 9 ± 7 µg) und durch dieses künstliche Eingreifen zu diesem Zeitpunkt auch nicht statistisch analysiert (siehe Tab. 04; 1).

Bei der **Hämoglobinkonzentration (HGB)** zeigen sich zu allen 5 Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die Werte zu Beginn des Versuchs („Baseline“) fallen bis vor Beginn des DHCA („prä-DHCA“) bei allen Gruppen ähnlich auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes ab und erreichen eine Stunde nach EKZ etwa 2/3 des Ausgangswertes.

Der **arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO₂)** unterscheidet sich zu allen 5 Messzeitpunkten nicht signifikant zwischen den Versuchsgruppen. Die Intakt-Gruppe und die Östrogen-Gruppe weisen 10 min vor Beginn der EKZ im Vergleich zu den übrigen Gruppen niedrigere Werte (unter 200 mmHg) auf. Die Werte aller Gruppen steigen im weiteren zeitlichen Verlauf

behandlungsbedingt stark an und erreichen eine Stunde nach EKZ wieder in etwa das Ausgangsniveau.

Der **Basenüberschuss (BE)** zeigt zu den vorgegebenen Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Ab dem Messzeitpunkt „EKZ Ende“ bis einschließlich des Messzeitpunktes „1 h post EKZ“ ist der BE mithilfe von Natriumbikarbonat (NaHCO_3) zwischen -3 und 3 mmol/l eingestellt worden (Natriumbikarbonat-Dosen: Intakt 34.0 ± 10.2 mg/ml; Progesteron 37.0 ± 14.9 mg/ml; Plazebo 37.8 ± 12.0 mg/ml; Progesteron + Östrogen 21.8 ± 9.0 mg/ml; Östrogen 27.7 ± 9.7 mg/ml). Wegen dieses aktiven Einstellens des BE innerhalb der physiologischen Grenzen hat zu diesen beiden Messzeitpunkten keine statistische Analyse stattgefunden (siehe Tab. 04; 2).

Die **Blutglukosekonzentration** weist zu allen 5 Messzeitpunkten keine signifikanten Abweichungen zwischen den 5 Versuchsgruppen auf. Vor Beginn des DHCA ist, außer bei der Gruppe der intakten Tiere, ein tendenzieller Anstieg der Blutglukosekonzentration im Vergleich zur „Baseline“ zu verzeichnen. Im weiteren zeitlichen Verlauf der Behandlung der Tiere steigen die Werte bei allen Gruppen kontinuierlich an und erreichen ein Maximum zum Ende der EKZ. Eine Stunde nach EKZ sind die Werte bei allen Gruppen wieder abgesunken. Sie haben aber dadurch immer noch nicht das Ausgangsniveau erreicht.

Tab 04: Mittlere (\pm STABW) parametrische physiologische Befunde bei den 5 Versuchsgruppen (VG) vor, während und nach EKZ und DHCA zu den vorgegebenen Messzeitpunkten

	VG	Baseline	prä-DHCA	post-DHCA	EKZ Ende	1 h post EKZ	Zeit ² x Gruppe	Zeit ²	Gruppe ²
Mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg]	Intakt	88 \pm 13	57 \pm 12	50 \pm 9	1)	90 \pm 17	n.s.	<0.001	n.s.
	Progesteron	94 \pm 13	59 \pm 31	45 \pm 12		90 \pm 17			
	Plazebo	94 \pm 21	52 \pm 10	49 \pm 14		90 \pm 9			
	P+Ö	90 \pm 15	57 \pm 21	53 \pm 16		95 \pm 20			
	Östrogen	91 \pm 17	67 \pm 26	46 \pm 14		90 \pm 14			
Hämoglobinkonzentration [mg/dl]	Intakt	14,1 \pm 0,9	6,9 \pm 0,5	6,4 \pm 0,6	6,6 \pm 0,7	10,3 \pm 0,6	n.s.	<0.001	n.s.
	Progesteron	14,6 \pm 0,9	7,2 \pm 0,6	6,9 \pm 0,6	6,9 \pm 0,6	10,6 \pm 0,7			
	Plazebo	14,1 \pm 0,6	6,9 \pm 0,9	6,6 \pm 0,9	6,9 \pm 0,9	10,1 \pm 0,4			
	P+Ö	14,3 \pm 0,6	7,0 \pm 0,4	6,7 \pm 0,5	6,9 \pm 0,6	9,1 \pm 3,1			
	Östrogen	13,6 \pm 1,5	7,2 \pm 0,6	7,0 \pm 0,4	7,0 \pm 0,4	10,4 \pm 0,5			
PaO₂ [mmHg]	Intakt	196 \pm 80	530 \pm 77	474 \pm 55	444 \pm 49	202 \pm 119	n.s.	<0.001	n.s.
	Progesteron	258 \pm 87	574 \pm 12	453 \pm 76	391 \pm 141	239 \pm 146			
	Plazebo	227 \pm 53	513 \pm 119	404 \pm 111	364 \pm 108	204 \pm 111			
	P+Ö	240 \pm 80	585 \pm 4	498 \pm 30	430 \pm 51	238 \pm 103			
	Östrogen	185 \pm 74	590 \pm 122	496 \pm 26	444 \pm 31	178 \pm 65			
BE [mmol/l]	Intakt	3,5 \pm 1,1	1,2 \pm 1,0	-3,7 \pm 1,0	2)	2)	n.s.	<0.001	n.s.
	Progesteron	3,8 \pm 1,3	1,4 \pm 1,6	-2,9 \pm 1,9					
	Plazebo	3,8 \pm 1,2	1,1 \pm 1,5	-3,3 \pm 1,4					
	P+Ö	3,3 \pm 1,7	2,4 \pm 1,6	-1,5 \pm 1,6					
	Östrogen	3,7 \pm 0,7	1,9 \pm 1,8	-2,7 \pm 1,4					
Glukose [mg/dl]	Intakt	140 \pm 20	138 \pm 21	211 \pm 31	270 \pm 33	205 \pm 50	n.s.	<0.001	n.s.
	Progesteron	150 \pm 30	162 \pm 19	248 \pm 38	318 \pm 61	258 \pm 89			
	Plazebo	143 \pm 22	151 \pm 28	234 \pm 31	274 \pm 63	211 \pm 19			
	P+Ö	158 \pm 26	171 \pm 26	247 \pm 45	300 \pm 67	238 \pm 103			
	Östrogen	156 \pm 23	163 \pm 20	233 \pm 21	299 \pm 32	211 \pm 51			

4.1.2 Geschlechtshormonspiegel am OP-Tag

Die Bestimmung der Geschlechtshormonspiegel im Serum erfolgt aus Blutproben, die am Tag 0 des Versuchs (OP-Tag), vor Beginn der EKZ mit DHCA bei den Versuchstieren entnommen werden (siehe Abschnitt 3.2.3.4.8). Die ermittelten Hormonwerte werden in Tabelle 05 (a) und in Tabelle 05 (b) jeweils für die gesamte Versuchsgruppe (überlebende und euthanasierte Tiere, = „Alle Tiere“, n=10), für die überlebenden Tiere der Versuchsgruppe (= „Überlebende Tiere“, n=5) und für die Tiere der Versuchsgruppe, die vorzeitig aufgrund sehr schlechten Allgemeinbefindens euthanasiert werden mussten (= „Euthanasierte Tiere“, n=5) angegeben.

Der 17 β -Östradiol-Spiegel unterscheidet sich in den Gruppierungen „Alle Tiere“, „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ nicht signifikant zwischen den Versuchsgruppen. Der Vergleich zwischen überlebenden und den euthanasierten Tieren innerhalb einer Tiergruppe zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im 17 β -Östradiol-Spiegel. In allen 3 Gruppierungen weist die Gruppe der intakten Tiere die höchsten 17 β -Östradiol-Spiegel auf (siehe Tab. 05(a)).

Der Progesteron-Serumspiegel ist in der Gruppierung „Alle Tiere“ bei der Gruppe „Progesteron+ Östrogen“ (=“P+Ö“) signifikant höher als bei allen anderen Versuchsgruppen. Des Weiteren weisen in dieser Gruppierung die Tiere der Gruppen „Progesteron“ und „Intakt“ signifikant höhere Progesteron-Spiegel als die Gruppen „Plazebo“ und „Östrogen“ auf. In den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ weist die Gruppe „Plazebo“ jeweils signifikant niedrigere Progesteron-Spiegel als die Gruppen „Intakt“, „Progesteron“ und „P+Ö“ auf. Der direkte Vergleich zwischen überlebenden und euthanasierten Tieren innerhalb einer Gruppe zeigt keine signifikanten Unterschiede im Progesteron-Spiegel (siehe Tab. 05 (b)).

Die untere Nachweisgrenze des Immunoassays für Testosteron liegt nach Herstellerangaben bei 0,03 ng/ml. Messergebnisse, die unterhalb dieser Nachweisgrenze liegen werden durch 0,02 ng/ml (als Arbeitswerte) ersetzt. Die Testosteron-Spiegel der 3 Tiergruppierungen stellen sich damit wie folgt dar. „Alle Tiere“: Gruppe Intakt $0,04 \pm 0,02$ ng/ml; Gruppe Progesteron $0,03 \pm 0,01$ ng/ml; Gruppe Plazebo $0,02 \pm 0,01$ ng/ml; Gruppe P+Ö $0,02 \pm 0,01$ ng/ml; Gruppe Östrogen $0,02 \pm 0,00$ ng/ml. „Überlebende Tiere“: Gruppe Intakt $0,04 \pm 0,03$ ng/ml; Gruppe Progesteron $0,03 \pm 0,01$ ng/ml; Gruppe Plazebo $0,02 \pm 0,01$ ng/ml; Gruppe P+Ö $0,03 \pm 0,01$ ng/ml; Gruppe Östrogen $0,02 \pm 0,00$ ng/ml. „Euthanasierte Tiere“: Gruppe Intakt $0,02$

$\pm 0,01$ ng/ml; Gruppe Progesteron $0,03 \pm 0,01$ ng/ml; Gruppe Plazebo $0,02 \pm 0,00$ ng/ml; Gruppe P+Ö $0,02 \pm 0,00$ ng/ml; Gruppe Östrogen $0,02 \pm 0,00$ ng/ml.

Tab. 05 (a): Mittlere (\pm STABW) 17 β -Östradiol-Konzentration im Serum der 5 Versuchsgruppen (VG) am Tag 0 vor Beginn der EKZ und DHCA

VG	17 β -Östradiol [pg/ml]			
		Alle Tiere (n=10)	Überlebende Tiere (n=5)	Euthanasierte Tiere (n=5)
Intakt	MW	26,91	28,62	24,78
	\pm STABW	21,14	25,39	17,91
Progesteron	MW	15,80	14,80	16,80
	\pm STABW	2,79	3,59	1,61
Plazebo	MW	14,18	15,53	12,83
	\pm STABW	3,11	3,60	2,17
P+Ö	MW	15,25	13,22	17,28
	\pm STABW	4,46	2,99	5,06
Östrogen	MW	12,55	14,06	11,04
	\pm STABW	4,53	6,04	1,99

Tab. 05 (b): Mittlere (\pm STABW) Progesteron-Konzentration im Serum der 5 Versuchsgruppen (VG) am Tag 0 vor Beginn der EKZ und DHCA

VG	Progesteron [ng/ml]						
		Alle Tiere (n=10)		Überlebende Tiere (n=5)		Euthanasierte Tiere (n=5)	
Intakt	MW	10,88	#	10,98		10,78	
	\pm STABW	7,67		9,16		6,97	
Progesteron	MW	11,50	§	12,46		10,54	
	\pm STABW	6,89		9,57		3,61	
Plazebo	MW	2,26		1,86	•	2,66	x
	\pm STABW	1,93		1,26		2,53	
P+Ö	MW	26,98	*	23,28		30,68	
	\pm STABW	10,84		5,03		14,32	
Östrogen	MW	5,08		8,24		1,92	
	\pm STABW	10,39		14,71		1,19	

Signifikanzen: * = $p < 0,05$ gg. alle anderen Gruppen („Alle Tiere“); # = $p < 0,05$ gg. „Plazebo“ und gg. „Östrogen“ („Alle Tiere“); § = $p < 0,05$ gg. „Plazebo“ und gg. „Östrogen“ („Alle Tiere“); • = $p < 0,05$ gg. „Intakt überlebend“, gg. „Progesteron überlebend“ und gg. „Progesteron + Östrogen (P+Ö) überlebend“; x = $p < 0,05$ gg. „Intakt euthanasiert“, gg. „Progesteron euthanasiert“ und gg. „P+Ö euthanasiert“

4.1.3 Körpergewichtsentwicklung im Versuchsverlauf

Die Versuchstiere werden an den Tagen -1, 0, 1, 2, 3 und 4 gewogen und die Einzeltiergewichte festgehalten. Bei Betrachtung der mittleren Körpergewichte (g) der Versuchsgruppen unterscheiden sich die Mittelwerte an den Tagen -1 und 0 nicht voneinander. Deshalb werden in Tabelle 06 nur die Werte zum Tag -1 angegeben. Der Verlauf des Körpergewichts im Versuchszeitraum ist lediglich für die Gruppierung „Überlebende Tiere“ statistisch ausgewertet worden. In der Gruppierung „Euthanasierte Tiere“ überlebten von 25 Tieren am Tag -1 lediglich 6 Tiere bis Tag 1 (4 Tiere der Gruppe „Intakt“, 1 Tier der Gruppe „P+Ö“, 1 Tier der Gruppe „Östrogen“) und nur 2 Tiere bis Tag 2 (Gruppe „Intakt“). Somit ist hier keine einheitliche Datenlage vorhanden. Die Einzelgewichte in diesen Gruppen für die Gruppierung „Euthanasierte Tiere“ stellen sich wie folgt dar: Gruppe „Intakt“ Tag 1: 306,5 g, 278,5 g, 335,0 g, 304,7 g; Gruppe „P+Ö“ Tag 1: 300,0 g; Gruppe „Östrogen“ Tag 1: 316,0 g; Gruppe „Intakt“ Tag 2 : 260,5 g, 296,9 g. Über den Versuchsverlauf gesehen zeigen die Ergebnisse bei den überlebenden Tieren einen signifikanten Einfluss der Zeit und der Gruppe (siehe Abb. 20 (A)). Präoperativ (Tag-1) zeigen sich Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen: In der Gruppierung „Alle Tiere“ (siehe Abb. 20 (B)) und in der Gruppierung „Euthanasierte Tiere“ (siehe Abb. 20 (C)) sind die Tiere der Gruppe Progesteron signifikant schwerer als die Tiere der Gruppen „Intakt“, „P+Ö“ und „Östrogen“. Zusätzlich weist in der Gruppierung „Alle Tiere“ die Gruppe „Plazebo“ ein signifikant höheres Gewicht als die Gruppen „Intakt“ und „Östrogen“ auf (siehe Abb. 20 (B)). In der Gruppierung „Überlebende Tiere“ weist lediglich die Gruppe „Progesteron“ gegenüber der Gruppe „Intakt“ ein signifikant höheres Körpergewicht auf (siehe Abb. 20 (C)). Am postoperativen Tag 4 (letzter Tag des Versuchs) zeigen sich in der Gruppierung „Überlebende Tiere“ keine signifikanten Gewichtsunterschiede mehr zwischen den Versuchsgruppen (siehe Abb. 20 (D)). In der Gruppierung „Euthanasierte Tiere“ sind keine Gewichtsdaten für den Tag 4 des Versuchs vorhanden, da kein Tier dieser Gruppierung diesen Tag erlebt hat.

Tab. 06: Prä- und postoperatives mittleres (\pm STABW) Körpergewicht (g) der 5 Versuchsgruppen (VG)

VG		Untersuchungstag							
		-1				1	2	3	4
		Alle Tiere (n=10)	Überlebende Tiere (n=5)	Euthanasierte Tiere (n=5)	Überlebende Tiere (n=5)				
Intakt	MW	310,1	317,1	303,0	312,2	305,5	309,0	314,3	
	\pm STABW	21,2	10,7	27,9	8,5	11,3	8,6	10,4	
Progesteron	MW	352,6	347,2	358,1	339,8	322,6	321,5	324,2	
	\pm STABW	16,9	17,2	16,5	14,0	9,9	17,4	20,1	
Plazebo	MW	351,0	358,7	341,4	345,9	332,2	325,3	327,0	
	\pm STABW	28,2	28,4	28,7	23,3	22,3	16,6	14,0	
P+Ö	MW	326,8	331,1	322,5	325,9	320,4	320,9	323,8	
	\pm STABW	15,1	10,7	18,7	9,6	12,5	16,1	14,8	
Östrogen	MW	315,1	320,5	309,7	313,6	303,8	299,7	306,1	
	\pm STABW	14,9	11,9	16,8	8,6	3,2	8,1	7,2	

Signifikanzen: * = $p < 0,05$ gg. „Intakt“, gg. „P+Ö“ und gg. „Östrogen“ („Alle Tiere“); # = $p < 0,05$ gg. „Intakt“ und gg. „Östrogen“ („Alle Tiere“); • = $p < 0,05$ gg. „Intakt überlebend“; × = $p < 0,05$ gg. „Intakt euthanasiert“, gg. „P+Ö euthanasiert“ und gg. „Östrogen euthanasiert“

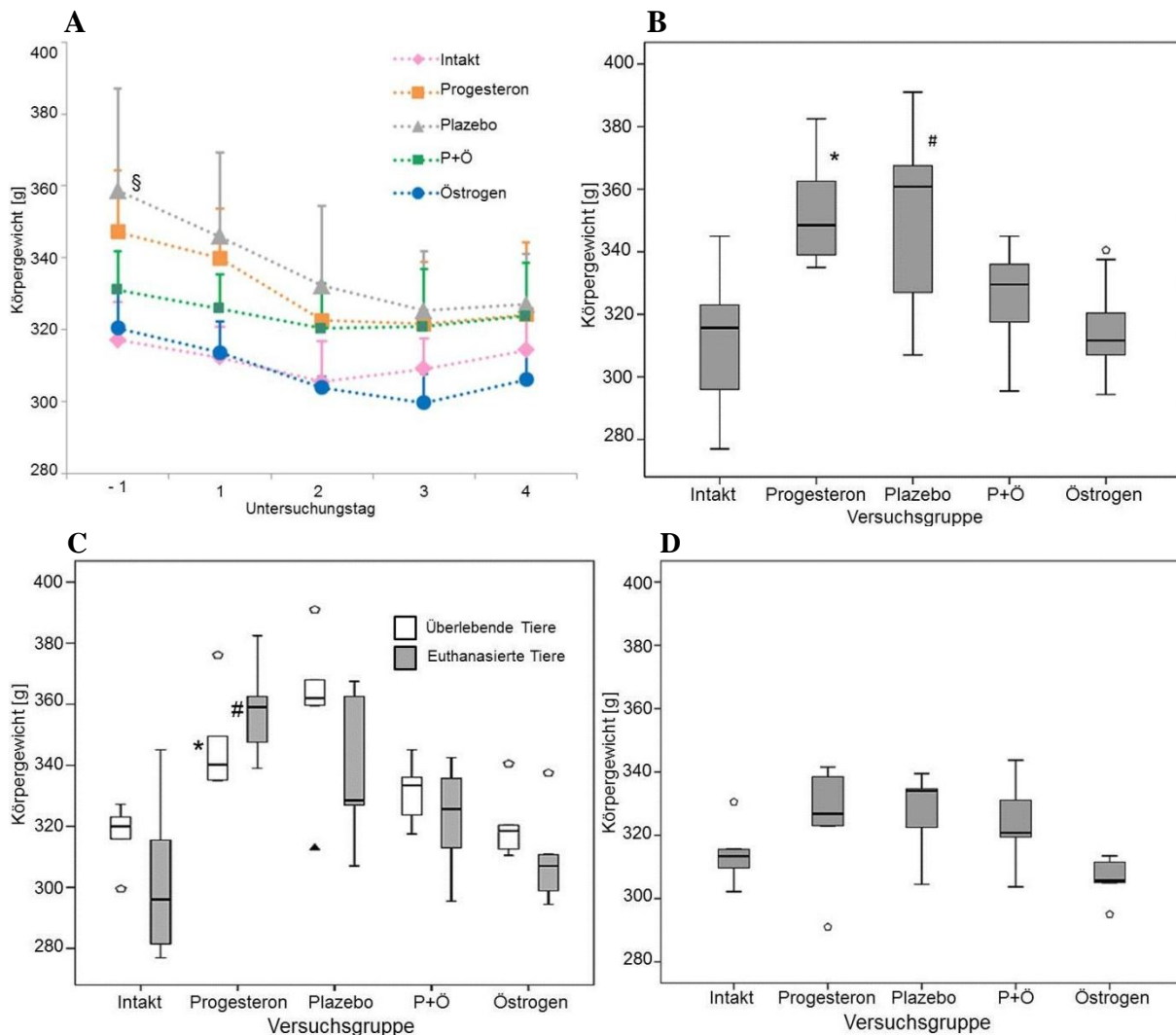


Abb. 20: Mittleres Körpergewicht in g (\pm STABW) der Tiere in den 5 Versuchsgruppen:

(A) Im zeitlichen Verlauf bei den überlebenden Tieren (Ein signifikanter Einfluss der Zeit: $\text{Zeit}^2 = p < 0,001$; sowie ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $\$ = p < 0,05$ Gruppe „Plazebo“ gg. Gruppe „Intakt“ und gg. Gruppe „Östrogen“;

(B) in der Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) für die Werte der Gruppierung „Alle Tiere“ am Tag -1 (signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $* = p < 0,05$ gg. „Intakt“, gg. „P+Ö“ und gg. „Östrogen“; $\# = p < 0,05$ gg. „Intakt“ und gg. „Östrogen“);

(C) im Vergleich der Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ am Tag -1 (signifikanter Einfluss folgender Versuchsgruppen: $* = p < 0,05$ gg. „Intakt überlebend“; $\# = p < 0,05$ gg. „Intakt euthanasiert“, gg. „P+Ö euthanasiert“ und gg. „Östrogen euthanasiert“);

(D) für die Gruppierung „Überlebende Tiere“ am Tag 4 (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,160$).

4.1.4 Verlauf der Körpertemperatur bei den 5 Versuchsgruppen in der postoperativen Phase

Die Körperkerntemperatur ($^{\circ}\text{C}$) jedes Versuchstieres wird in der postoperativen Phase durchgehend mithilfe des Telemetrie-Systems (DSI System, Data Sciences International, St. Paul, USA) durch die intraperitoneal implantierte Transmittersonde (PhysioTel[®] CTA-F40, DSI, St. Paul, USA) erfasst (siehe Abschnitt 3.2.3.5.1). Die Mittelwerte (\pm STABW) der

Körpertemperatur der Versuchsgruppen für den postoperativen Zeitraum von 4 Tagen (96 h) sind in Tabelle 07 für die überlebenden Tiere und in Tabelle 08 für die euthanasierten Tiere dargestellt. Dabei sind die ersten 24 h nach EKZ mit DHCA zusätzlich unterteilt in 4 h-Intervallen wiedergegeben. Eine statistische Auswertung der Körpertemperatur-Ergebnisse erfolgte lediglich für die Gruppierung „Überlebende Tiere“, da sich die Datenlage für die euthanasierten Tiere zu lückenhaft darstellte. In der Gruppierung „Euthanasierte Tiere“ konnten von 25 Tieren nur 19 Tiere für die telemetrische Aufzeichnung in den Tierraum verbracht werden. Kein Tier überlebte länger als 48 h nach EKZ und DHCA. Die genaue Anzahl der überlebenden Tiere in den 5 Versuchsgruppen zu den unterschiedlichen Zeitintervallen zeigt Tabelle 08. Für die Gruppierung „Überlebende Tiere“ hat lediglich die Zeit einen Einfluss auf die Körpertemperatur (Zeit²: $p < 0,001$). Bei allen 5 Versuchsgruppen steigt die Temperatur im Laufe der ersten 24 h nach EKZ mit DHCA deutlich an und bleibt bis zum postoperativen Tag 4 auf einem konstant erhöhten Niveau (siehe Abb. 21 (A)). Im Zeitraum „0–24 h“ nach EKZ und DHCA unterscheidet sich die Körpertemperatur für die Gruppierung „Überlebende Tiere“ nicht signifikant zwischen den Versuchsgruppen (Tiergruppe: $p = 0,84$) (siehe Abb. 21 (B))

Tab. 07: Verlauf der mittleren (\pm STABW) Körpertemperatur (°C) bei den überlebenden Versuchstieren (n = 5) der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA (Gesamtzeitraum: 96 h)

VG		Zeitintervalle nach EKZ mit DHCA									
		0-4 h	4-8 h	8-12 h	12-16 h	16-20 h	20-24 h	0-24 h	24-48 h	48-72 h	72-96 h
Intakt	MW	37,6	37,8	37,7	37,9	38,2	38,5	38,0	38,4	38,2	38,2
	\pm STABW	0,8	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,4	0,2	0,1	0,1
Progesteron	MW	36,4	36,1	36,2	36,7	37,5	38,2	36,9	38,3	38,0	37,9
	\pm STABW	0,7	0,5	1,1	1,1	1,1	1,3	0,9	1,2	1,4	1,0
Plazebo	MW	36,9	37,5	37,3	37,6	37,9	38,3	37,5	38,3	38,0	38,0
	\pm STABW	1,0	0,9	0,8	0,8	0,6	0,6	0,8	0,4	0,2	0,3
P+Ö	MW	36,8	37,5	37,6	38,0	38,2	38,6	37,8	38,5	38,2	38,0
	\pm STABW	0,7	0,5	0,2	0,2	0,3	0,4	0,3	0,2	0,3	0,5
Östrogen	MW	36,5	37,0	37,3	37,6	38,1	38,5	37,5	38,3	38,1	38,2
	\pm STABW	1,1	1,0	0,7	0,5	0,4	0,5	0,6	0,3	0,2	0,2

Tab. 08: Verlauf der mittleren (\pm STABW) Körpertemperatur ($^{\circ}\text{C}$) bei den euthanasierten Versuchstieren ($n = 5$) der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA (Gesamtzeitraum: 96 h)

VG		Zeitintervalle nach EKZ mit DHCA									
		0-4 h	4-8 h	8-12 h	12-16 h	16-20 h	20-24 h	0-24 h	24-48 h	48-72 h	72-96 h
Intakt	MV	35,5	36,3	36,6	37,0	37,0	36,9	36,6	35,7		
	\pm STABW	1,7	1,5	1,0	0,8	0,8	0,9	1,0	0,8		
Anzahl Tiere *		5	4	4	4	4	4	4	2	0	0
Progesteron	MV	35,5	33,4								
	\pm STABW	0,5	2,9								
Anzahl Tiere *		3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Plazebo	MV	35,2	34,2	33,6	36,3	36,3					
	\pm STABW	1,4	3,5	4,9	0,1						
Anzahl Tiere *		4	3	3	2	1	0	0	0	0	0
P+Ö	MV	34,4	33,6	37,3	38,6	39,1	38,6	37,6			
	\pm STABW	1,2	2,7								
Anzahl Tiere *		5	3	1	1	1	1	1	0	0	0
Östrogen	MV	35,8	37,0	37,2	37,2	34,8	37,7	37,6			
	\pm STABW	0,5	0,7	0,6	1,8	4,5					
Anzahl Tiere *		2	2	2	2	2	1	1	0	0	0

*) Tiere, die sich in diesem Zeitraum noch in der telemetrischen Aufzeichnung befinden (maximal 5)

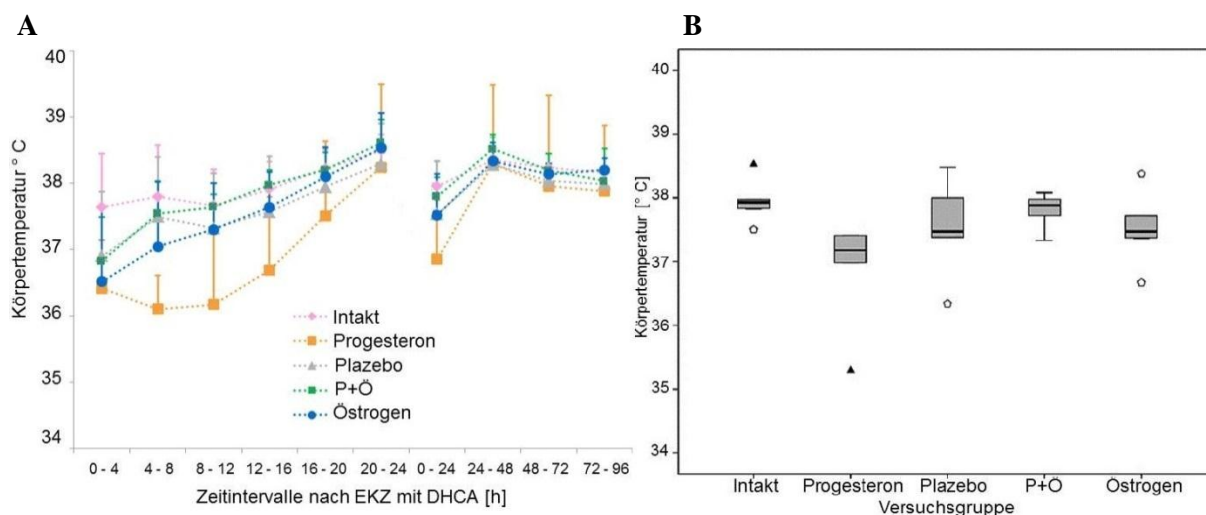


Abb. 21: Mittlere (\pm STABW) Körpertemperatur ($^{\circ}\text{C}$) für die überlebenden Versuchstiere in den 5 Versuchsgruppen nach EKZ mit DHCA:

(A) Darstellung des Verlaufs über den Zeitraum von 96 h (Die Körpertemperatur steigt bei allen 5 Gruppen im Verlauf der ersten 24 h nach EKZ und DHCA signifikant an: $\text{Zeit}^2: p < 0,001$);

(B) Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Werte für den Zeitraum von 0-24 h (Kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe auf die Körpertemperatur: $p = 0,84$).

4.2 Befunde bei der Untersuchung der neurologischen Funktion

Um neurologische und sensomotorische Defizite bei den Versuchstieren erfassen zu können, wird bei den Versuchsgruppen am Tag -1, 1, 2, 3 und 4 des Versuchs eine differenzierende neurologische Untersuchung durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.3.6). Die am Tag-1 erhobenen präoperativen Werte dienen als Ausgangsbasis (sog. „Baseline“) für die postoperativen Werte an den Tagen 1–4. Es werden lediglich die Ergebnisse der überlebenden Tiere dargestellt, da bei den euthanasierten Tieren ab Versuchstag 1 zu wenig Daten für einen informativen Vergleich der 5 Gruppen untereinander und der Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ vorliegen.

4.2.1 Sensorik

Folgende der sensorischen Untersuchung zugehörigen Parameter liefern in ihrer Punktbewertung die Gesamtbeurteilung der Sensorik: Propriozeption, Vibrissenreaktion, Sehen und Hören (siehe Abschnitt 3.2.3.6.3). Ein Gesamtergebnis von bis zu 12 Punkten kann maximal erreicht werden. Dies würde für eine maximal beeinträchtigte sensorische Funktion sprechen; 0 Punkte würden eine uneingeschränkte sensorische Funktion bedeuten (siehe Tab. 09). Über den Gesamtverlauf der Versuche betrachtet zeigen die Gesamtpunkte-Ergebnisse einen signifikanten Einfluss der Zeit (Zeit²: $p \leq 0,001$). Ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe ist nicht gegeben (Versuchsgruppe: $p = 0,281$) (siehe Abb 22 (A)). Abbildung 22 (B) bildet die Gesamtpunkte über alle postoperativen Tage versuchsspezifisch ab. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den 5 Versuchsgruppen (Versuchsgruppe: $p = 0,259$).

Tab. 09: Mittleres (\pm STABW) Gesamtpunkte-Ergebnis (Score) der Sensorikbeurteilung für die überlebenden Versuchstiere (n = 5) in den 5 Versuchsgruppen (VG)

VG		Untersuchungstag				
		-1	1	2	3	4
Intakt	MW	0,0	1,2	0,8	0,8	0,8
	\pm STABW	0,0	1,1	1,1	1,1	1,1
Progesteron	MW	0,0	0,8	2,0	2,0	1,6
	\pm STABW	0,0	1,1	1,4	1,4	1,7
Plazebo	MW	0,0	0,8	1,6	0,4	0,4
	\pm STABW	0,0	1,1	2,6	0,9	0,9
P+Ö	MW	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
	\pm STABW	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0
Östrogen	MW	0,0	0,4	0,8	0,4	0,8
	\pm STABW	0,0	0,9	1,8	0,9	1,8

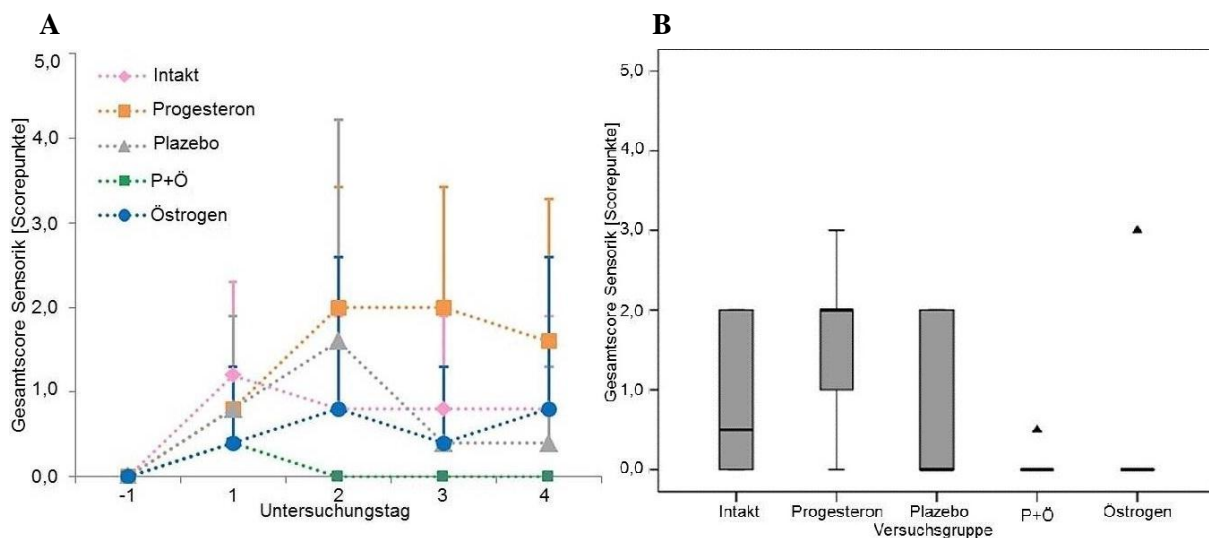


Abb. 22: Mittleres (\pm STABW) Gesamtpunkte-Ergebnis der Sensorikbeurteilung:

(A) Zeitlicher Verlauf über 4 Tage nach EKZ und DHCA (signifikanter Einfluss der Zeit: Zeit^2 : $p \leq 0,001$);

(B) Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Gesamtpunkte über den Zeitraum von 4 Tagen (Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant: Versuchsgruppe: $p = 0,259$).

4.2.2 Gitter-Dreh-Test („Rotating-Grid“)

Der Rotating-Grid-Test wird zur Beurteilung des Haltevermögens und der Greiffähigkeit der Versuchstiere auf einem um 180° schwenkbaren Drahtgitter verwendet. Als Optimalwert ist hierbei eine Haltezeit von mindestens 5 s vorgegeben (siehe Abschnitt 3.2.3.6.2.1).

Präoperativ können die Tiere aller Versuchsgruppen den Test annähernd fehlerfrei absolvieren (siehe Tab. 10). Die Abbildung 23 (A) zeigt den Verlauf des Parameters über 4 Tage nach EKZ und DHCA. Es besteht hier ein signifikanter Einfluss der Zeit (Zeit^2 : $p < 0,001$). Die Abbildung 23 (B) zeigt die erreichten Werte über 4 Tage nach EKZ und DHCA. Es zeigen sich hier keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Versuchsgruppe: $p = 0,406$).

Tab. 10: Mittlere (\pm STABW) Haltezeiten (s) beim Rotating-Grid-Test für die überlebenden Versuchstiere ($n = 5$) der 5 Versuchsgruppen (VG)

VG		Untersuchungstag				
		-1	1	2	3	4
Intakt	MW	4,8	4,6	5,0	4,9	5,0
	\pm STABW	0,4	0,9	0,0	0,2	0,0
Progesteron	MW	5,0	4,5	4,5	4,5	4,0
	\pm STABW	0,0	0,7	0,7	0,9	2,2
Plazebo	MW	4,7	4,3	4,9	4,7	5,0
	\pm STABW	0,4	1,6	0,2	0,7	0,0
P+Ö	MW	4,4	5,0	4,7	4,8	5,0
	\pm STABW	0,4	0,0	0,4	0,4	0,0
Östrogen	MW	4,7	5,0	5,0	5,0	4,9
	\pm STABW	0,4	0,0	0,0	0,0	0,2

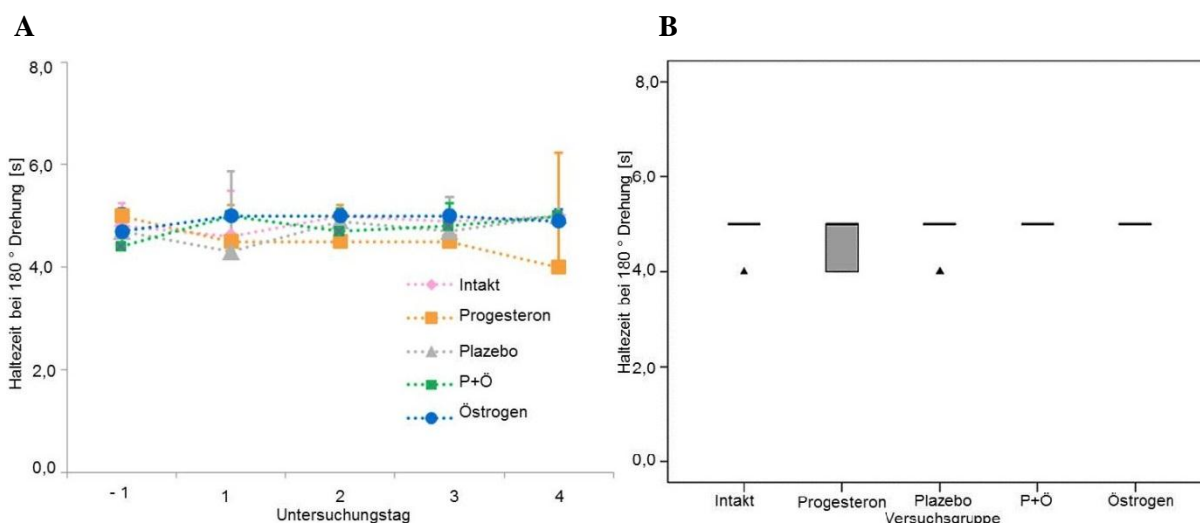


Abb. 23: Mittlere (\pm STABW) Haltezeiten (s) beim Rotating-Grid-Test:

(A) zeitlicher Verlauf über 4 Tage nach EKZ und DHCA (signifikanter Einfluss der Zeit: Zeit^2 : $p < 0,001$);

(B) Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der erreichten Werte über den Zeitraum von 4 Tagen (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,406$).

4.2.3 Balken-Gleichgewichts-Test („Beam-Balance“)

Beim Beam-Balance-Test werden Gleichgewicht und Muskelkraft der Tiere getestet (siehe Abschnitt 3.2.3.6.2.2). Die Ergebnisse zeigen, dass präoperativ alle Tiere den Test annähernd fehlerfrei (50–60 s unbeeinträchtigte Verweildauer auf dem Balken) absolvieren können (siehe Tab. 11). Die Abbildung 24 (A) zeigt den Verlauf des Parameters über 4 Tage nach EKZ und DHCA. Die Zeit hat hier einen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis (Zeit²: $p < 0,001$). Die Abbildung 24 (B) bildet die erreichten Werte über 4 Tage nach EKZ mit DHCA ab. Es gibt postoperativ keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Versuchsgruppe: $p = 0,159$).

Tab. 11: Mittlere (\pm STABW) Verweildauer (s) beim Beam-Balance-Test für die überlebenden Versuchstiere ($n = 5$) der 5 Versuchsgruppen (VG)

VG		Untersuchungstag				
		-1	1	2	3	4
Intakt	MW	60,0	28,0	35,3	54,0	60,0
	\pm STABW	0,0	29,5	23,3	13,4	0,0
Progesteron	MW	56,0	9,0	19,0	21,7	23,3
	\pm STABW	5,5	13,4	17,5	24,4	23,6
Plazebo	MW	56,0	18,4	26,5	44,0	48,0
	\pm STABW	8,9	16,5	21,5	25,1	26,8
P+Ö	MW	60,0	13,9	36,7	38,3	48,0
	\pm STABW	0,0	4,4	19,4	22,3	26,8
Östrogen	MW	60,0	29,0	35,0	46,0	44,0
	\pm STABW	0,0	29,2	23,5	16,7	22,2

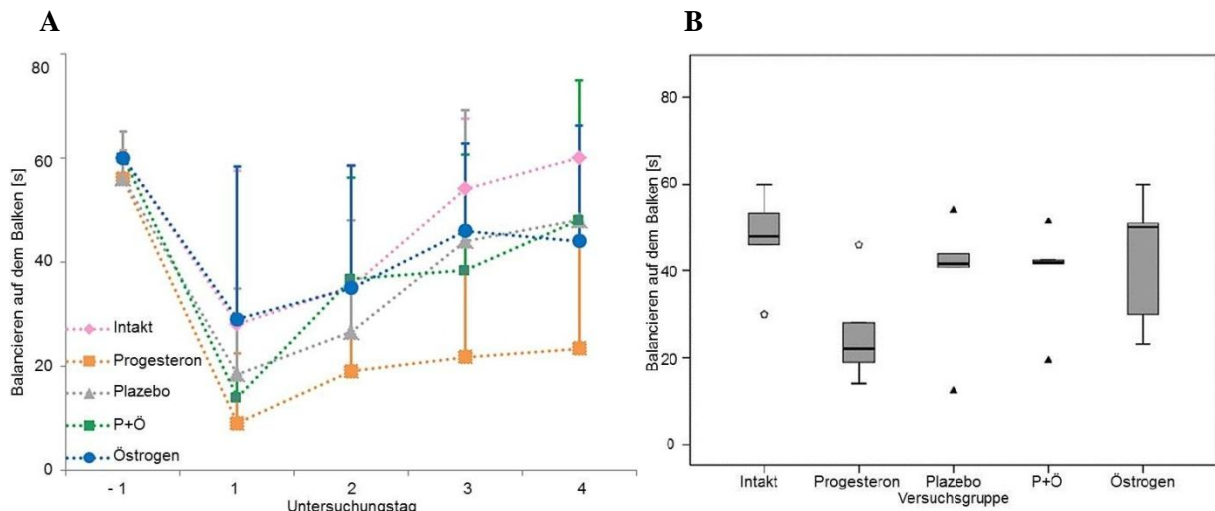


Abb. 24: Mittlere (\pm STABW) Verweildauer (s) beim Beam-Balance-Test:

(A) zeitlicher Verlauf über 4 Tage nach EKZ und DHCA (ein signifikanter Einfluss der Zeit: Zeit^2 : $p < 0,001$);

(B) Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der erreichten Werte über den Zeitraum von 4 Tagen (kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen: $p = 0,159$).

4.2.4 Balken-Lauf-Test („Beam-Walking“)

Beim Beam-Walking-Test, können der Gleichgewichtssinn, die Stellreflexe und eventuelle Haltungsasymmetrien der Tiere untersucht werden. Bis zu 3 Fehlritte (nr) werden als normal bewertet (siehe Abschnitt 3.2.3.6.2.3). Die für jede Versuchsgruppe gemittelte Anzahl der Fehlritte zeigt, dass präoperativ nahezu alle Tiere diese Aufgabe fehlerfrei bewältigen können (siehe Tab. 12). Die Abbildung 25 (A) zeigt den Verlauf der mittleren Zahl der Fehlritte über 4 Tage nach EKZ und DHCA. Ein signifikanter Einfluss der Zeit auf das Ergebnis ist gegeben (Zeit^2 : $p < 0,001$). Die Abbildung 25 (B) zeigt die Anzahl der Fehlritte über 4 Tage nach EKZ und DHCA. Ein signifikanter Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ist nicht gegeben (Versuchsgruppe: $p = 0,583$).

Tab. 12: Mittlere (\pm STABW) Anzahl der Fehlritte (nr) beim Beam-Walking-Test für die überlebenden Versuchstiere (n = 5) der 5 Versuchsgruppen (VG)

VG		Untersuchungstag				
		-1	1	2	3	4
Intakt	MW	1,0	20,8	14,4	25,8	23,0
	\pm STABW	0,7	14,6	15,3	42,7	43,3
Progesteron	MW	3,2	63,8	63,6	80,0	80,0
	\pm STABW	1,5	49,7	50,1	44,7	44,7
Plazebo	MW	2,0	62,2	24,8	40,2	40,0
	\pm STABW	2,9	51,8	42,2	54,6	54,8
P+Ö	MW	0,6	42,8	21,6	20,4	20,4
	\pm STABW	0,9	52,3	43,9	44,5	44,5
Östrogen	MW	1,2	41,0	41,6	40,2	40,0
	\pm STABW	0,8	53,9	53,3	54,6	54,8

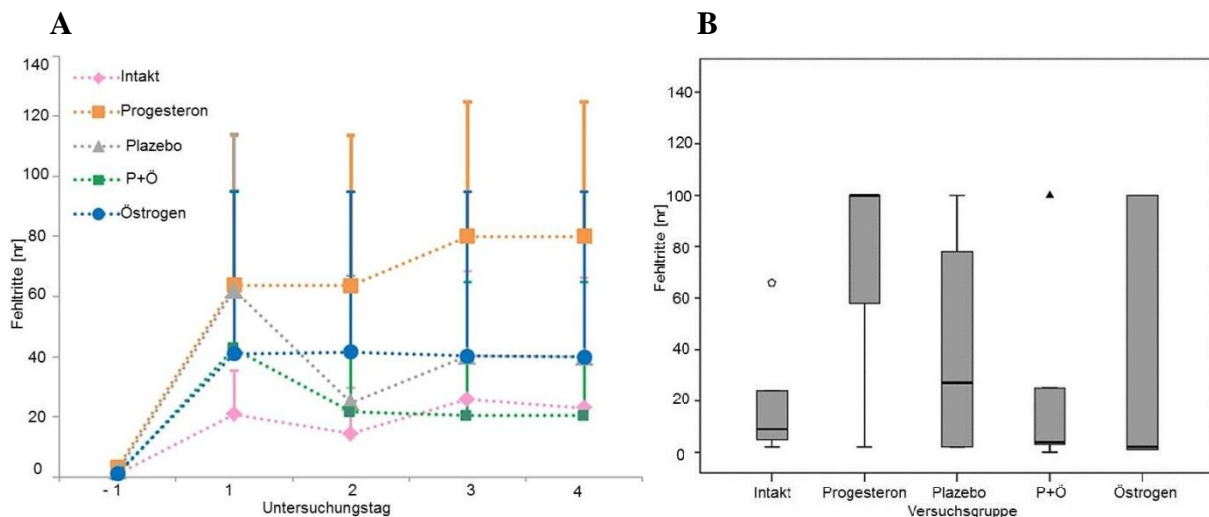


Abb. 25: Mittlere (\pm STABW) Anzahl der Fehlritte (nr) beim Beam-Walking-Test:

(A) zeitlicher Verlauf über 4 Tage nach EKZ und DHCA (ein signifikanter Einfluss der Zeit: Zeit²: $p < 0,001$);

(B) Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Werte über den Zeitraum von 4 Tagen (kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen: $p = 0,583$).

4.2.5 Greif-Zug-Test („Prehensile Traction“)

Der Prehensile-Traction-Test dient der Beurteilung von Greifvermögen, Muskelkraft und eventuellen Haltungsasymmetrien des Versuchstieres. Als neurologisch unauffällig wird dabei eine Haltezeit von 11–15 s zweimal hintereinander bewertet (siehe Abschnitt 3.2.3.6.2.4). Die Ergebnisse in Form der gemittelten Haltezeiten (s) der Versuchstiere der 5 Versuchsgruppen zeigen, dass bis auf die Versuchsgruppe „P+Ö“ alle weiteren Gruppen den Test präoperativ

nahezu fehlerfrei absolvieren können (siehe Tab. 13). Die Abbildung 26 (A) zeigt den Verlauf des Parameters „Greif-Haltezeit“ über 4 Tage nach EKZ und 45 min DHCA. Alle Gruppen zeigen eine signifikantere Verschlechterung der Ergebnisse nach dem Eingriff (Zeit²: $p < 0,001$). Die Abbildung 26 (B) zeigt die erreichten Haltezeiten über 4 Tage nach EKZ und DHCA. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Versuchsgruppe: $p = 0,271$).

Tab. 13: Mittlere (\pm STABW) Greif-Haltezeit (s) beim Prehensile-Traction-Test für die überlebenden Versuchstiere (n = 5) der 5 Versuchsgruppen (VG)

VG		Untersuchungstag				
		-1	1	2	3	4
Intakt	MW	12,1	9,0	7,1	10,0	10,5
	\pm STABW	3,9	4,7	4,7	4,9	4,8
Progesteron	MW	12,1	12,6	14,5	10,3	10,6
	\pm STABW	4,6	3,1	1,1	6,1	6,7
Plazebo	MW	11,4	9,6	7,0	11,2	10,8
	\pm STABW	5,4	2,9	3,5	4,8	3,7
P+Ö	MW	9,5	5,0	5,5	10,6	6,4
	\pm STABW	5,1	2,4	4,0	5,5	5,1
Östrogen	MW	13,1	12,3	9,7	11,2	10,6
	\pm STABW	3,2	5,2	6,2	5,9	5,1

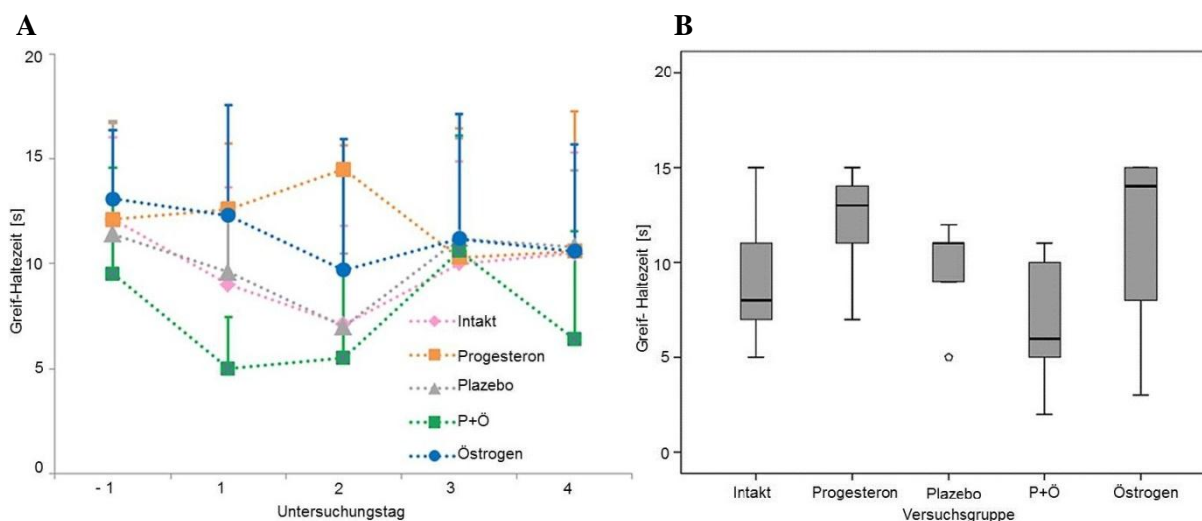


Abb. 26: Mittlere (\pm STABW) Greif-Haltezeit (s) beim Prehensile-Traction-Test:
 (A) zeitlicher Verlauf über 4 Tage nach EKZ und DHCA (ein signifikanter Einfluss der Zeit: Zeit²: $p < 0,001$);
 (B) Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Werte über den Zeitraum von 4 Tagen (kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen: $p = 0,271$).

4.3 Befunde beim Blutbild

Ein Blutbild wird am Tag 4 des Versuchs nach der Euthanasie der Tiere erstellt. Dafür werden Leukozyten- („white blood cells“, WBC) und Erythrozytenzahl („red blood cells“, RBC), Hämoglobin (HGB), Hämatokrit („hematocrit“, HCT), durchschnittliches Erythrozyten-Volumen („mean corpuscular volume“, MCV), durchschnittliche Hämoglobinmenge pro Erythrozyt („mean corpuscular hemoglobin“, MCH), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration („mean corpuscular hemoglobin concentration“, MCHC) und Thrombozytenzahl („platelets“, PLT) aus dem EDTA-Blut bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.3.7). Ergebnisse zu diesem Blutbild werden nur für die überlebenden Versuchstiere dargestellt, da bei den Tieren, die vorzeitig euthanasiert werden mussten, keine Blutentnahme möglich war. Des Weiteren ist nur bei den überlebenden Tieren ein einheitlicher Vergleich der Werte für den postoperativen Tag 4 möglich. Die Ergebnisse bei den Blutwerten zeigen, dass die Gruppe „Östrogen“ eine signifikant geringere Gesamtleukozytenzahl (WBC) im Vergleich zu allen anderen Gruppen aufweist. Außerdem ist die Leukozytenzahl der Gruppe „Progesteron“ im Vergleich zur Gruppe „P+Ö“ signifikant geringer. Das durchschnittliche Erythrozyten-Volumen (MCV) stellt sich bei der Gruppe „Progesteron“ gegenüber den Gruppen „Intakt“ und „Östrogen“ signifikant höher dar (siehe Tab. 14).

Tab. 14: Mittlere (\pm STABW) Blutbild-Werte für die überlebenden Versuchstiere (n = 5) der 5 Versuchsgruppen (VG) am postoperativen Tag 4 nach EKZ und DHCA

VG		WBC [Tsd./ μ l]		RBC [Mio./ μ l]	HGB [g/dl]	HCT [%]	MCV [fl]		MCH [pg]	MCHC [g/dl]	PLT [Tsd./ μ l]
Intakt	MW	11,60		4,60	9,22	27,12	58,90		20,08	34,06	529,40
	\pm STABW	4,51		0,52	1,02	2,80	1,60		0,73	0,61	491,37
Progesteron	MW	10,88	#	4,53	9,24	28,30	62,40	§	20,38	32,68	607,20
	\pm STABW	3,17		0,30	0,68	2,27	2,23		0,42	0,68	328,99
Plazebo	MW	13,30		4,78	9,74	29,20	60,65		20,38	33,42	559,20
	\pm STABW	4,76		0,47	0,96	2,54	2,44		0,87	0,58	568,35
P+Ö	MW	17,90		4,19	8,82	25,92	61,78		21,14	34,22	445,75
	\pm STABW	4,56		0,46	0,93	3,27	2,24		1,82	2,40	776,31
Östrogen	MW	2,68	*	4,45	8,62	25,26	57,00		19,36	34,00	43,80
	\pm STABW	1,59		0,80	1,62	4,13	3,48		1,25	1,20	30,96

Signifikanzen: * = $p < 0,05$ gg. alle übrigen Gruppen; # = $p < 0,05$ gg. P+Ö; § = $p < 0,05$ gg. Östrogen und gg. Intakt

4.4 Befunde zur Serumkonzentration von TNF α

Die Konzentration des pro-inflammatorischen Zytokins TNF α wird mithilfe eines ELISA-Test-Kits aus dem „1 h post EKZ“-Serum der Versuchstiere bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.4.2). Die gemittelte TNF α -Konzentration im Serum wird im Versuchsgruppenvergleich jeweils für die Gruppierungen „Alle Tiere“, „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ angegeben (siehe Tab. 15). Es existieren keine signifikanten Unterschiede bei der TNF α -Konzentration zwischen den Versuchsgruppen in der Gruppierung „Alle Tiere“ (siehe Abb. 27 (A)) sowie im Gruppenvergleich in der Gruppierung „Überlebende Tiere“ und in der Gruppierung „Euthanasierte Tiere“ sowie im Vergleich der überlebenden und euthanasierten Tiere innerhalb einer Versuchsgruppe (siehe Abb. 27 (B)).

Tab. 15: Mittlere (\pm STABW) Konzentration (pg/ml) an TNF α im Serum der 5 Versuchsgruppen (VG) 1 h nach EKZ und DHCA

VG		TNF α [pg/ml]		
		Alle Tiere (n=10)	Überlebende Tiere (n=5)	Euthanasierte Tiere (n=5)
Intakt	MW	260,02	157,49	362,54
	\pm STABW	177,90	103,62	184,92
Progesteron	MW	251,13	216,01	286,25
	\pm STABW	198,79	167,57	240,30
Plazebo	MW	240,72	183,35	298,10
	\pm STABW	135,94	112,25	144,06
P+Ö	MW	129,89	122,74	137,03
	\pm STABW	99,36	49,47	140,14
Östrogen	MW	268,23	219,75	316,72
	\pm STABW	180,65	200,30	165,62

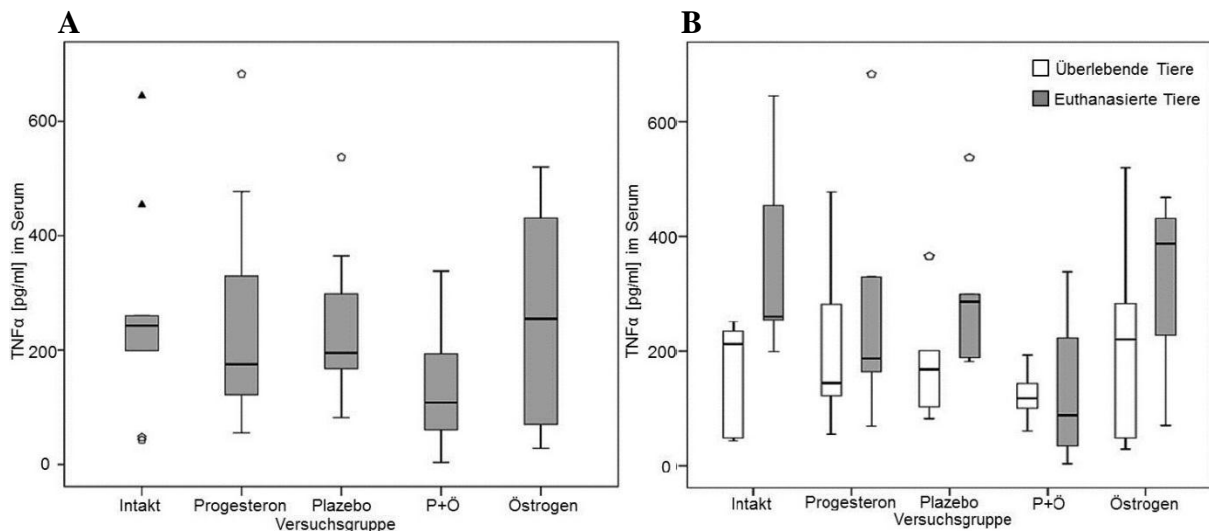


Abb. 27: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Konzentration (pg/ml) an TNF α im Serum der 5 Versuchsgruppen 1 h nach EKZ und DHCA:
(A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,258$);
(B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,237$).

4.5 Histologische Befunde

Im Rahmen der histologischen Untersuchungen kann mithilfe der HE- Färbung das Ausmaß der morphologischen Schädigung ermittelt werden. Dies geschieht manuell am Lichtmikroskop in 400-facher Vergrößerung, und zwar bei Motorkortex und Striatum bilateral anhand 5 hochvergrößerter Felder (HPF) sowie beim Hippokampus durch bilaterales Auszählen des Gesamtareals. Dabei wird die Anzahl der eosinophilen (= geschädigten) Neurone ermittelt (siehe Abschnitt 3.2.4.3). Der Beurteilungsscore reicht von Werten um **0** (= keine oder sehr geringe Schädigung), über **1** (= geringe bis mittlere Schädigung), **2** (= mittlere bis höhergradige Schädigung) bis **3** (= höchstgradige Schädigung bzw. Infarkt). Die Erhebung des Scores ist auf das jeweilige Gehirnnareal individuell abgestimmt (siehe Abschnitt 3.2.4.3, Tab. 02). Die Auswertung der hirnmorphologischen Scores für jedes Gehirnnareal (siehe Tab. 16 – Tab. 18) erfolgt in den 5 Versuchsgruppen für die Gruppierungen „Alle Tiere“, „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen in der Gruppierung „Alle Tiere“ beim Gesamtscore des Motorkortex (Versuchsgruppe: $p = 0,103$; siehe Abb. 28 (A)), des Striatums (Versuchsgruppe: $p = 0,842$; siehe Abb. 29 (A)) und des Hippokampus (Versuchsgruppe: $p = 0,850$; siehe Abb. 30 (A)). Zwischen den 5 Versuchsgruppen in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ sowie beim Vergleich von überlebenden und euthanasierten Tieren innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen gibt es ebenfalls keine

signifikanten Unterschiede beim Gesamtscore für den Motorkortex (Versuchsgruppe: $p = 0,235$; siehe Abb. 28 (B)), für das Striatum (Versuchsgruppe: $p = 0,913$; siehe Abb. 29 (B)) und für den Hippokampus (Versuchsgruppe: $p = 0,985$; siehe Abb. 30 (B)). Ebenfalls ausgewertete Kontrollgruppen (keine Durchführung der EKZ mit DHCA) erreichen für den Motorkortex, für das Striatum und für den Hippokampus jeweils einen Gesamtscore von $0,0 \pm 0$.

Tab. 16: Mittelwerte (\pm STABW) der histologischen Schadensbewertung (Score) im Motorkortex der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA

VG		Schäden im Motorkortex (Score)								
		Alle Tiere (n=10)			Überlebende Tiere (n=5)			Euthanasierte Tiere (n=5)		
		links	rechts	Gesamt	links	rechts	Gesamt	links	rechts	Gesamt
Intakt	MW	1,4	1,5	1,5	1,4	1,6	1,5	1,4	1,4	1,4
	\pm STABW	1,0	1,1	1,0	1,1	1,3	1,2	0,9	0,9	0,8
Progesteron	MW	1,5	1,4	1,5	1,2	1,2	1,2	1,8	1,6	1,7
	\pm STABW	1,0	1,1	1,0	0,8	0,8	0,8	1,1	1,3	1,2
Plazebo	MW	2,5	2,3	2,4	2,2	2,0	2,1	2,8	2,6	2,7
	\pm STABW	0,8	0,8	0,8	1,1	1,0	1,0	0,4	0,5	0,5
P+Ö	MW	1,6	1,3	1,5	1,8	1,6	1,7	1,4	1,0	1,2
	\pm STABW	0,7	0,8	0,8	0,8	0,9	0,8	0,5	0,7	0,6
Östrogen	MW	1,7	1,8	1,8	1,4	1,4	1,4	2,0	2,2	2,1
	\pm STABW	0,9	0,9	0,9	0,5	0,9	0,7	1,2	0,8	1,0

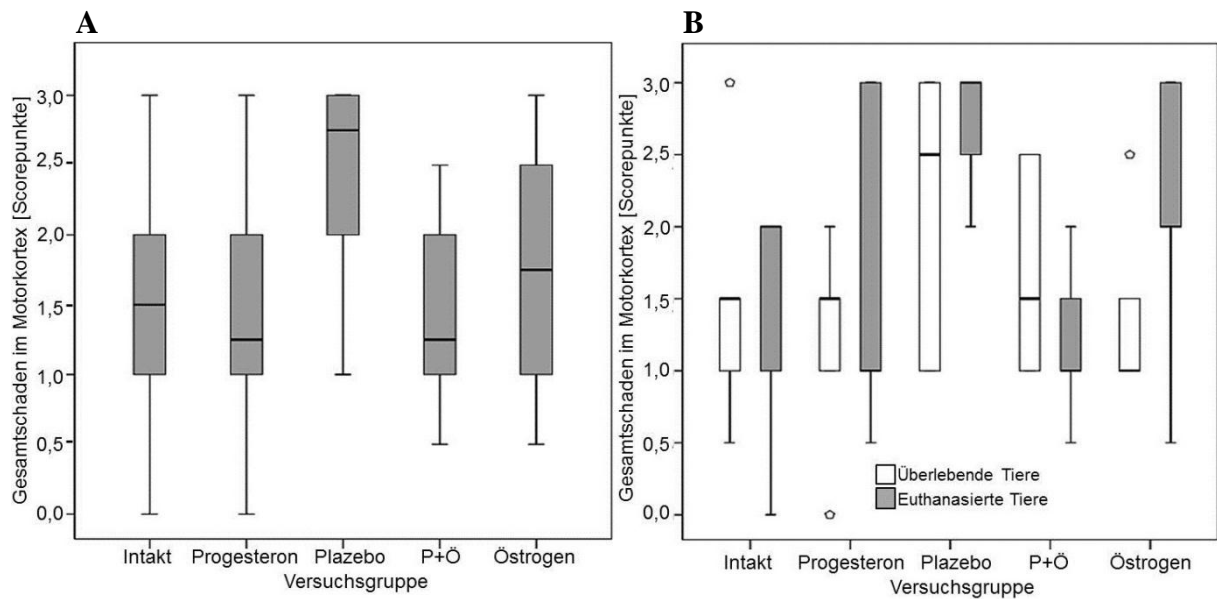


Abb. 28: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) des hirnmorphologischen Gesamtscores für Schäden im Motorkortex für die 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA: (A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,103$); (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,235$).

Tab. 17: Mittelwerte (\pm STABW) der histologischen Schadensbewertung (Score) im Striatum der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA

VG		Schäden im Striatum (Score)								
		Alle Tiere (n=10)			Überlebende Tiere (n=5)			Euthanasierte Tiere (n=5)		
		links	rechts	Gesamt	links	rechts	Gesamt	links	rechts	Gesamt
Intakt	MW	1,1	1,2	1,2	1,2	1,0	1,1	1,0	1,4	1,2
	\pm STABW	0,3	0,6	0,5	0,4	0,0	0,3	0,0	0,9	0,6
Progesteron	MW	1,1	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,2	1,0	1,1
	\pm STABW	0,3	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,3
Plazebo	MW	1,2	1,4	1,3	1,4	1,4	1,4	1,0	1,4	1,2
	\pm STABW	0,6	0,8	0,7	0,9	0,9	0,8	0,0	0,9	0,6
P+Ö	MW	1,0	1,2	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,4	1,2
	\pm STABW	0,0	0,4	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,4
Östrogen	MW	1,1	1,3	1,2	1,4	1,0	1,2	0,8	1,6	1,2
	\pm STABW	0,7	0,8	0,8	0,9	0,0	0,6	0,4	1,1	0,9

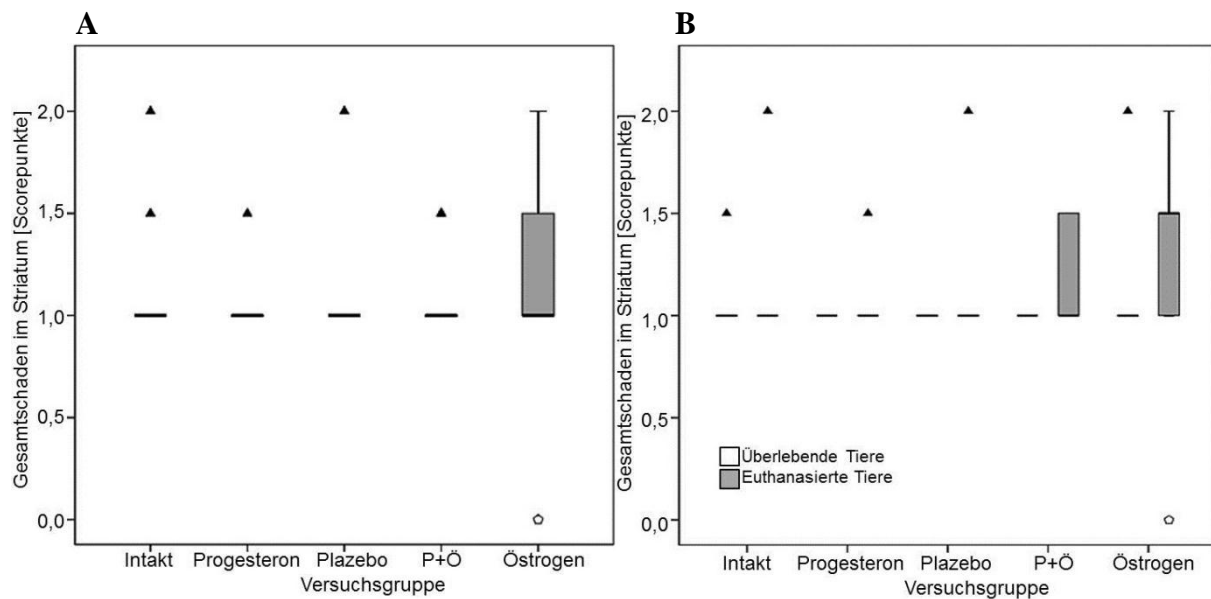


Abb. 29: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) des hirnmorphologischen Gesamtscores für Schäden im Striatum für die 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA: (A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,842$); (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,913$).

Tab. 18: Mittelwerte (\pm STABW) der histologischen Schadensbewertung (Score) im Hippokampus der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA

VG		Schäden im Hippokampus (Score)								
		Alle Tiere (n=10)			Überlebende Tiere (n=5)			Euthanasierte Tiere (n=5)		
		links	rechts	Gesamt	links	rechts	Gesamt	links	rechts	Gesamt
Intakt	MW	2,6	2,7	2,7	2,6	2,6	2,6	2,6	2,8	2,7
	\pm STABW	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5
Progesteron	MW	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
	\pm STABW	1,0	0,7	0,8	1,3	0,9	1,1	0,5	0,5	0,5
Plazebo	MW	2,4	2,5	2,5	2,4	2,6	2,5	2,4	2,4	2,4
	\pm STABW	0,7	0,5	0,6	0,9	0,5	0,7	0,5	0,5	0,5
P+Ö	MW	2,2	2,3	2,3	1,8	2,2	2,0	2,6	2,4	2,5
	\pm STABW	1,0	0,7	0,9	1,3	0,8	1,1	0,5	0,5	0,5
Östrogen	MW	2,3	2,3	2,3	2,2	2,0	2,1	2,4	2,6	2,5
	\pm STABW	0,9	1,1	1,0	1,3	1,4	1,3	0,5	0,5	0,5

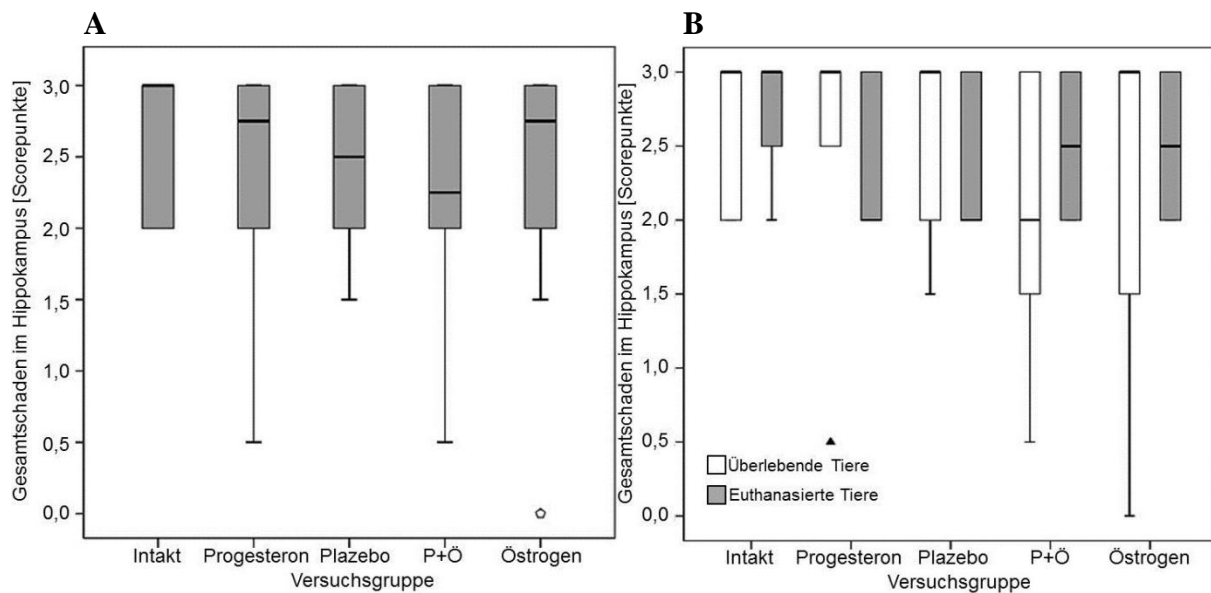


Abb. 30: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) des hirmorphologischen Gesamtscores für Schäden im Hippokampus für die 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA: (A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,850$); (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,985$).

4.6 Befunde zum Nachweis von Rezeptor-, Transporter- und Entzündungsproteinen im Gehirngewebe

Mithilfe des Western-Blot ist im Gehirn der Versuchstiere (Bereich zwischen $-0,3$ und $-3,3$ kaudal des Bregma) das Ausmaß der Expression folgender spezifischer Proteine semiquantitativ bestimmt worden: Östrogenrezeptor α („estrogen receptor α “, **ER α**), Östrogenrezeptor β („estrogen receptor β “, **ER β**), Glutamat-Aspartat-Transporter (auch „excitatory amino acid transporter 1“, **EAAT1**), Glutamat-Transporter-1b (**GLT-1b**), CXC-Motiv-Chemokinrezeptor-2 (**CXCR2**), Interleukin-8 (**IL-8**) und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (**iNOS**) (siehe Abschnitt 3.2.4.4). Das Schwärzungsintensitätsmaß der Chemoilumineszenz wird über eine Dichtemessung bestimmt und korreliert mit der Expression der gesuchten Proteine. Die Schwärzungsintensität wird für jedes Versuchstier und Protein zweimal ausgewertet. Der Mittelwert aus diesen Auswertungen geht in die Analyse ein. Die Schwärzungsintensität der Protein-Banden von sog. „Nativtieren“, unbehandelten Tieren mit gleichem Geschlecht, Alter und Hormonstatus, dient zur Orientierung bei der Bewertung der behandelten Tiere. Sie wird für jedes Protein auf den Wert 1 festgelegt.

4.6.1 ER α -Expression

Für die Gruppierungen „Alle Tiere“, „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ in den einzelnen Versuchsgruppen sind die Mittelwerte (\pm STABW) der Schwärzungsintensität für ER α in Tabelle 19 wiedergegeben. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bei der ER α -Expression zwischen den Versuchsgruppen für die Gruppierungen „Alle Tiere“ (Versuchsgruppe: $p = 0,802$; siehe Abb. 31 (A)), „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (Versuchsgruppe: $p = 0,821$; siehe Abb. 31 (B)). Es bestehen auch keine signifikanten Expressions-Unterschiede zwischen den überlebenden und den euthanasierten Tieren in den einzelnen Versuchsgruppen (siehe Abb. 31 (B)).

Tab. 19: Mittlere (\pm STABW) Schwärzungsintensität von ER α im Western-Blot im Gehirn der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA

VG		ER α -Expression		
		Alle Tiere (n=10)	Überlebende Tiere (n=5)	Euthanasierte Tiere (n=5)
Intakt	MW	1,00	0,98	1,02
	\pm STABW	0,49	0,67	0,29
Progesteron	MW	0,94	0,96	0,92
	\pm STABW	0,29	0,40	0,18
Plazebo	MW	0,90	0,93	0,87
	\pm STABW	0,22	0,27	0,19
P+Ö	MW	0,85	0,77	0,93
	\pm STABW	0,27	0,27	0,26
Östrogen	MW	0,84	0,77	0,90
	\pm STABW	0,36	0,31	0,43

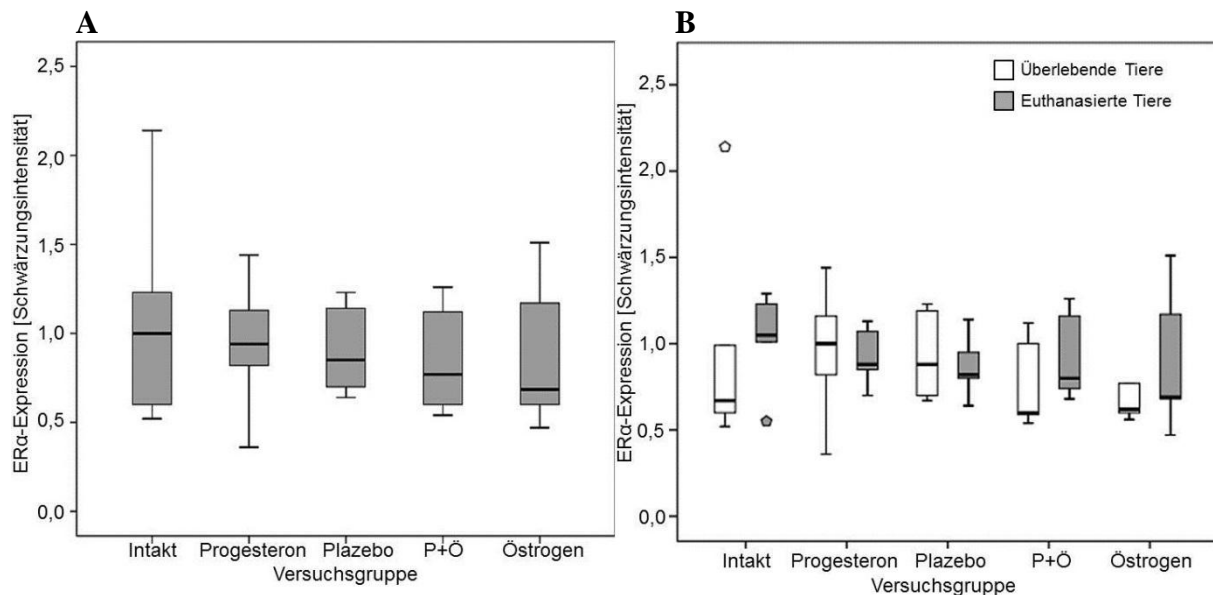


Abb. 31: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Schwärzungsintensität von ERα im Gehirn der 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA: (A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,802$); (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,821$).

4.6.2 ERβ-Expression

Die Mittelwerte (\pm STABW) der ERβ-Schwärzungsintensität für die 5 Versuchsgruppen, jeweils in den Gruppierungen „Alle Tiere“, „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“, sind in Tabelle 20 dargestellt. In der Gruppierung „Alle Tiere“ gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den 5 Versuchsgruppen bei der Expression von ERβ (Versuchsgruppe: $p = 0,518$; siehe [Abb. 32 \(A\)](#)). In der Gruppierung „Euthanasierte Tiere“ findet sich eine signifikant verringerte Expression von ERβ bei der Versuchsgruppe „Plazebo“ gegenüber den Versuchsgruppen „P+Ö“ und „Östrogen“ sowie bei der Gruppe „P+Ö“ gegenüber der Gruppe „Intakt“. In der Gruppe „Plazebo“ exprimieren die überlebenden Tiere signifikant mehr ERβ als die euthanasierten Tiere (siehe [Abb. 32 \(B\)](#)).

Tab. 20: Mittlere (\pm STABW) Schwärzungsintensität von ER β im Western-Blot im Gehirn der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA

VG		ER β -Expression				
		Alle Tiere (n=10)	Überlebende Tiere (n=5)		Euthanasierte Tiere (n=5)	
Intakt	MW	1,26	1,25		1,26	
	\pm STABW	0,13	0,16		0,10	
Progesteron	MW	1,27	1,13		1,40	
	\pm STABW	0,36	0,37		0,33	
Plazebo	MW	1,32	1,76	*	0,87	#
	\pm STABW	0,58	0,40		0,33	
P+Ö	MW	1,04	0,86		1,22	§
	\pm STABW	0,27	0,21		0,22	
Östrogen	MW	1,22	1,29		1,15	
	\pm STABW	0,52	0,60		0,48	

Signifikanzen: * = $p < 0,05$ gg. „Plazebo euthanasiert“; # = $p < 0,05$ gg. „Intakt euthanasiert“ und gg. „P+Ö euthanasiert“; § = $p < 0,05$ gg. „Intakt euthanasiert“

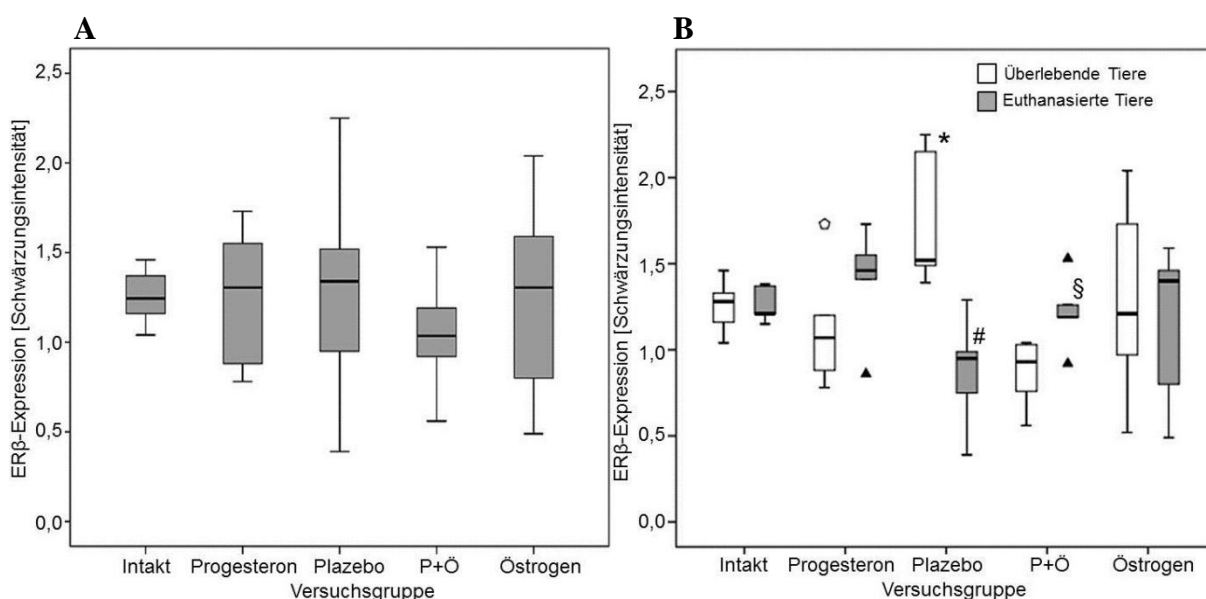


Abb. 32: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Schwärzungsintensität von ER β im Gehirn der 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA:

(A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,518$); (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,032$; * = $p < 0,05$ gg. „Plazebo euthanasiert“; # = $p < 0,05$ gg. „Intakt euthanasiert“ und gg. „P+Ö euthanasiert“; § = $p < 0,05$ gg. „Intakt euthanasiert“).

4.6.3 EAAT1-Expression

Die Mittelwerte (\pm STABW) der EAAT1-Schwärzungsintensität für die 5 Versuchsgruppen, jeweils in den Gruppierungen „Alle Tiere“, „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“, sind in Tabelle 21 zusammengefasst. In der Gruppierung „Alle Tiere“ gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den 5 Versuchsgruppen bei der Expression von EAAT1 im Gehirn (Versuchsgruppe: $p = 0,210$; siehe Abb. 33 (A)). In der Gruppierung „Überlebende Tiere“ weist die Gruppe „Plazebo“ eine signifikant geringere Expression von EAAT1 gegenüber der Gruppe „P+Ö“ auf. In der Gruppierung „Euthanasierte Tiere“ zeigt die Gruppe „Plazebo“ eine signifikant höhere EAAT1-Expression gegenüber der Gruppe „Intakt“ und die Gruppe „P+Ö“ eine signifikant geringere EAAT1-Expression gegenüber den Gruppen „Progesteron“, „Plazebo“ und „Östrogen“. In der Gruppe „P+Ö“ exprimieren die überlebenden Tiere signifikant mehr EAAT1 im Gehirn als die euthanasierten Tiere (siehe Abb. 33 (B)).

Tab. 21: Mittlere (\pm STABW) Schwärzungsintensität von EAAT1 im Western-Blot im Gehirn der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA

VG	EAAT1-Expression					
		Alle Tiere (n=10)	Überlebende Tiere (n=5)		Euthanasierte Tiere (n=5)	
Intakt	MW	1,92	1,98		1,86	
	\pm STABW	0,69	0,73		0,73	
Progesteron	MW	1,49	1,45		1,53	
	\pm STABW	0,56	0,49		0,69	
Plazebo	MW	1,58	1,16	•	1,99	§
	\pm STABW	0,69	0,36		0,73	
P+Ö	MW	1,73	2,26	*	1,21	#
	\pm STABW	0,64	0,39		0,29	
Östrogen	MW	1,26	1,24		1,27	
	\pm STABW	0,62	0,41		0,23	

Signifikanzen: • = $p < 0,05$ gg. „P+Ö überlebend“; * = $p < 0,05$ gg. „P+Ö euthanasiert“; § = $p < 0,05$ gg. „Intakt euthanasiert“; # = $p < 0,05$ gg. „Progesteron euthansiert“, gg. „Plazebo euthanasiert“ und gg. „Östrogen euthanasiert“

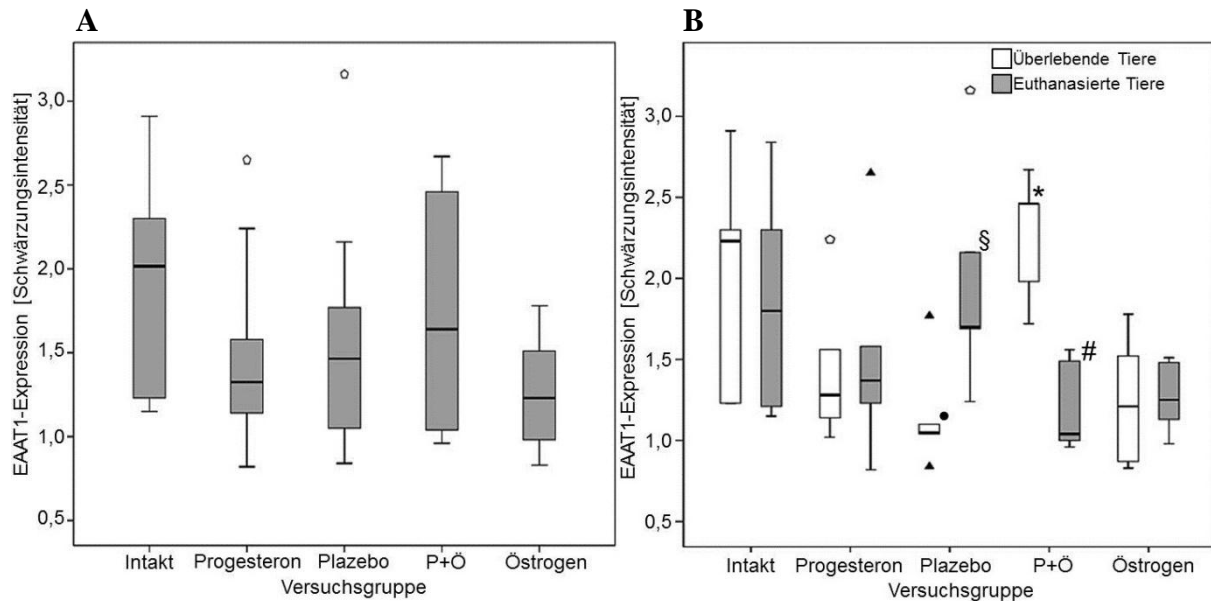


Abb. 33: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Schwärzungsintensität von EAAT1 im Gehirn der 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA:

(A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,210$); **(B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“** (signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,024$; • = $p < 0,05$ gg. „P+Ö überlebend“; * = $p < 0,05$ gg. „P+Ö euthanasiert“; § = $p < 0,05$ gg. „Intakt euthanasiert“; # = $p < 0,05$ gg. „Progesteron euthanasiert“, gg. „Plazebo euthanasiert“ und gg. „Östrogen euthanasiert“).

4.6.4 GLT-1b-Expression

Die Mittelwerte (\pm STABW) der GLT-1b-Schwärzungsintensität für die 5 Versuchsgruppen, jeweils in den Gruppierungen „Alle Tiere“, „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“, sind in Tabelle 22 zusammengefasst. In der Gruppierung „Alle Tiere“ weist die Versuchsgruppe „Östrogen“ eine signifikant geringere GLT-1b-Expression gegenüber den Versuchsgruppen „Intakt“, „Plazebo“ und „P+Ö“ auf (siehe [Abb. 34 \(A\)](#)). Zwischen den Versuchsgruppen in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ und zwischen den überlebenden und den euthanasierten Tieren in den einzelnen Versuchsgruppen gibt es keine signifikanten Unterschiede (Versuchsgruppe: $p = 0,113$, siehe [Abb. 34 \(B\)](#)).

Tab. 22: Mittlere (\pm STABW) Schwärzungsintensität von GLT-1b im Western-Blot im Gehirn der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA

VG	GLT-1b-Expression			
		Alle Tiere (n=10)	Überlebende Tiere (n=5)	Euthanasierte Tiere (n=5)
Intakt	MW	1,26	1,39	1,13
	\pm STABW	0,35	0,44	0,19
Progesteron	MW	1,12	1,13	1,11
	\pm STABW	0,32	0,41	0,25
Plazebo	MW	1,31	1,35	1,27
	\pm STABW	0,47	0,29	0,65
P+Ö	MW	1,20	1,07	1,34
	\pm STABW	0,41	0,42	0,39
Östrogen	MW	0,79	0,88	0,70
	\pm STABW	0,27	0,20	0,32

Signifikanzen: * = $p < 0,05$ gg. „Intakt“, gg. „Plazebo“ und gg. „P+Ö“

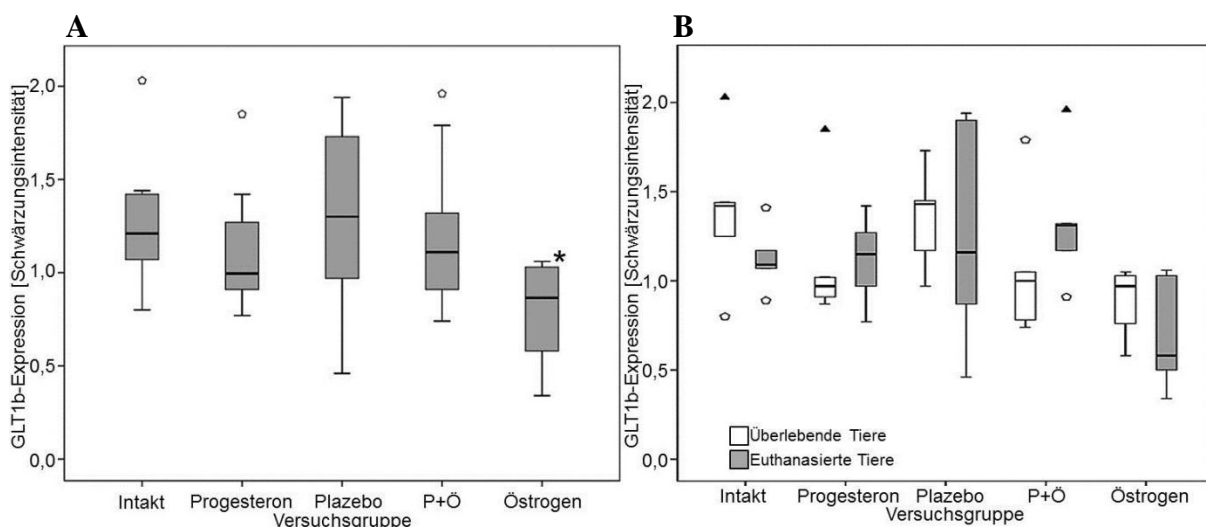


Abb. 34: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Schwärzungsintensität von GLT-1b im Gehirn der 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA:

(A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,031$; * = $p < 0,05$ gg. „Intakt“, gg. „Plazebo“ und gg. „P+Ö“);

(B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,113$).

4.6.5 CXCR2-Expression

Die Mittelwerte (\pm STABW) der CXCR2-Schwärzungsintensität für die 5 Versuchsgruppen, jeweils in den Gruppierungen „Alle Tiere“, „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“, sind in Tabelle 23 zusammengefasst. In der Gruppierung „Alle Tiere“ bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den 5 Versuchsgruppen in der CXCR2-Expression im

Gehirn (Versuchsgruppe: $p = 0,084$; siehe [Abb. 35 \(A\)](#)). Zwischen den Versuchsgruppen in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ und zwischen den überlebenden und euthanasierten Tieren in den einzelnen Versuchsgruppen zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Versuchsgruppe: $p = 0,224$; siehe [Abb. 35 \(B\)](#)).

Tab. 23: Mittlere (\pm STABW) Schwärzungsintensität von CXCR2 im Western-Blot im Gehirn der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA

VG		CXCR2-Expression		
		Alle Tiere (n=10)	Überlebende Tiere (n=5)	Euthanasierte Tiere (n=5)
Intakt	MW	1,87	1,78	1,97
	\pm STABW	0,88	1,00	0,84
Progesteron	MW	1,12	1,40	0,85
	\pm STABW	0,62	0,74	0,36
Plazebo	MW	1,04	1,05	1,04
	\pm STABW	0,56	0,54	0,65
P+Ö	MW	1,26	1,29	1,23
	\pm STABW	0,41	0,53	0,32
Östrogen	MW	0,95	0,87	1,02
	\pm STABW	0,33	0,26	0,42

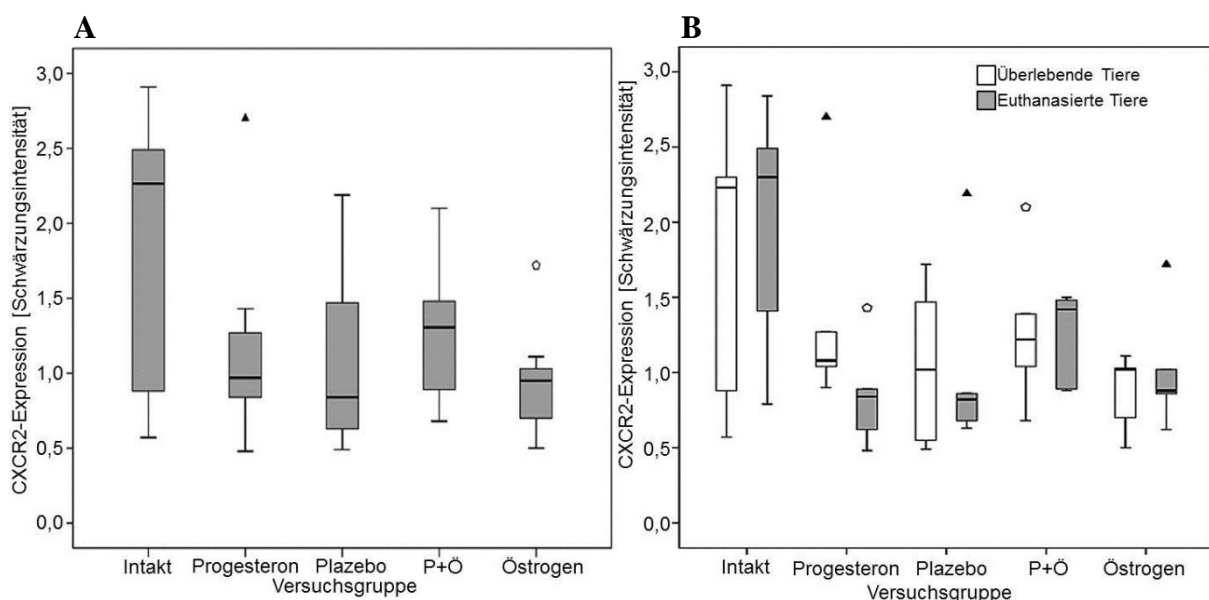


Abb. 35: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Schwärzungsintensität von CXCR2 im Gehirn der 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA:

(A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,084$);
 (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,224$).

4.6.6 IL-8-Expression

Die Mittelwerte (\pm STABW) der IL-8-Schwärzungsintensität für die 5 Versuchsgruppen, jeweils in den Gruppierungen „Alle Tiere“, „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“, sind in Tabelle 24 zusammengefasst. In der Gruppierung „Alle Tiere“ gibt es signifikante Unterschiede in der IL-8-Expression im Gehirn zwischen den Versuchsgruppen (Versuchsgruppe: $p = 0,001$; Abb. 36 (A)): Die Versuchsgruppe „P+Ö“ weist niedrigere Werte auf als die Gruppen „Intakt“ und „Östrogen“; die Gruppe „Plazebo“ exprimiert weniger IL-8 im Gehirn als die Gruppen „Intakt“, „Progesteron“ und „Östrogen“. Zwischen den Versuchsgruppen in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ gibt es signifikante Unterschiede in der IL-8-Expression im Gehirn (Versuchsgruppe: $p = 0,009$; Abb. 36 (B)): In der Gruppierung „Überlebende Tiere“ weist die Versuchsgruppe „Plazebo“ eine signifikant geringere IL-8-Expression auf als die Versuchsgruppe „Östrogen“. In der Gruppierung „Euthanasierte Tiere“ exprimiert die Versuchsgruppe „Plazebo“ signifikant weniger IL-8 im Gehirn als die Gruppen „Progesteron“ und „Östrogen“.

Tab. 24: Mittlere (\pm STABW) Schwärzungsintensität von IL-8 im Western-Blot im Gehirn der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA

VG		IL-8-Expression					
		Alle Tiere (n=10)		Überlebende Tiere (n=5)		Euthanasierte Tiere (n=5)	
Intakt	MW	2,89		3,37		2,41	
	\pm STABW	1,60		2,12		0,85	
Progesteron	MW	2,14		2,56		1,72	
	\pm STABW	0,96		0,87		0,95	
Plazebo	MW	1,07	#	0,98	♦	1,16	•
	\pm STABW	0,49		0,58		0,43	
P+Ö	MW	1,52	§	1,33		1,70	
	\pm STABW	0,60		0,64		0,55	
Östrogen	MW	2,40		2,41		2,39	
	\pm STABW	0,80		0,61		0,63	

Signifikanzen: # = $p < 0,05$ gg. „Intakt“, gg. „Progesteron“ und gg. „Östrogen“; § = $p < 0,05$ gg. „Intakt“ und gg. „Östrogen“; ♦ = $p < 0,05$ gg. „Östrogen überlebend“; • = $p < 0,05$ gg. „Progesteron euthanasiert“ und gg. „Östrogen euthanasiert“

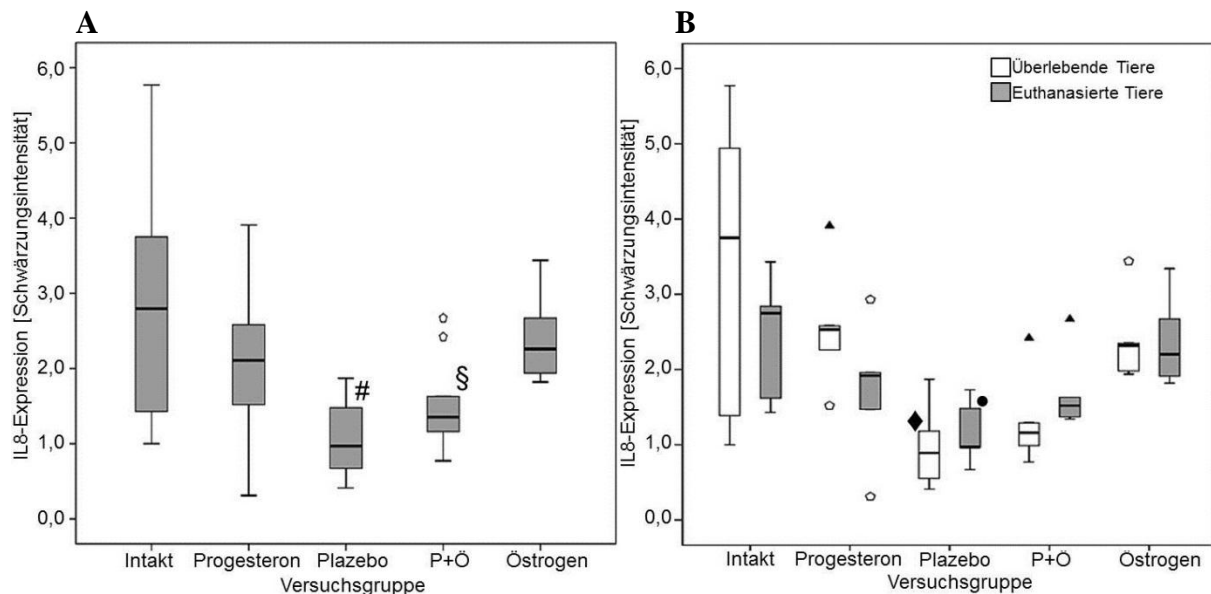


Abb. 36: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Schwärzungsintensität von IL-8 im Gehirn der 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA:

(A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,001$; # = $p < 0,05$ gg. „Intakt“, gg. „Progesteron“ und gg. „Östrogen“; § = $p < 0,05$ gg. „Intakt“ und gg. „Östrogen“);

(B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,009$; ♦ = $p < 0,05$ gg. „Östrogen überlebend“; • = $p < 0,05$ gg. „Progesteron euthanasiert“ und „Östrogen euthanasiert“).

4.6.7 iNOS-Expression

Die Mittelwerte (\pm STABW) der iNOS-Schwärzungsintensität für die 5 Versuchsgruppen, jeweils in den Gruppierungen „Alle Tiere“, „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“, sind in Tabelle 25 zusammengefasst. In der Gruppierung „Alle Tiere“ bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bei der Expression von iNOS im Gehirn (Versuchsgruppe: $p = 0,036$; Abb. 37 (A)): Die Versuchsgruppe „Intakt“ exprimiert signifikant weniger iNOS als die Gruppen „Plazebo“ und „P+Ö“. Zwischen den Versuchsgruppen in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ und zwischen den überlebenden und euthanasierten Tieren in den einzelnen Versuchsgruppen gibt es keine signifikanten Unterschiede (Versuchsgruppe: $p = 0,217$; siehe Abb. 37 (B)).

Tab. 25: Mittlere (\pm STABW) Schwärzungsintensität von iNOS im Western-Blot im Gehirn der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA

VG		iNOS-Expression		
		Alle Tiere (n=10)	Überlebende Tiere (n=5)	Euthanasierte Tiere (n=5)
Intakt	MW	1,02	*	1,04
	\pm STABW	0,43		0,54
Progesteron	MW	1,24		1,23
	\pm STABW	0,53		0,42
Plazebo	MW	1,49		1,51
	\pm STABW	0,26		0,34
P+Ö	MW	1,48		1,54
	\pm STABW	0,37		0,21
Östrogen	MW	1,16		1,00
	\pm STABW	0,43		0,51
				1,46
				0,19
				1,42
				0,50
				1,33
				0,57

Signifikanz: * = $p < 0,05$ gg. „Plazebo“ und gg. „P+Ö“

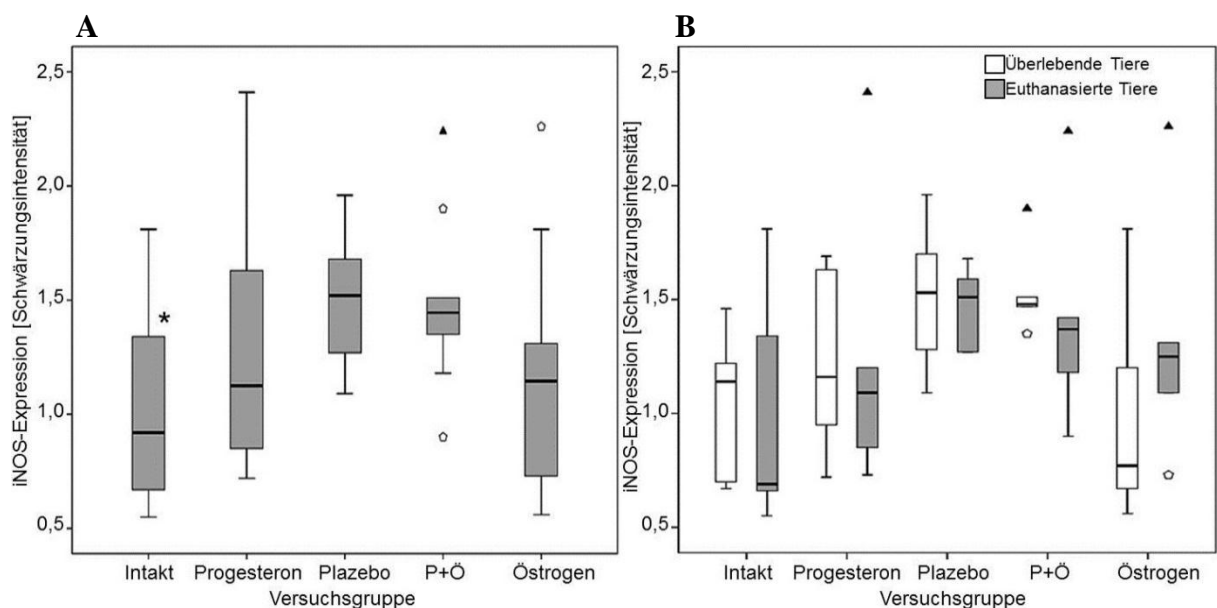


Abb. 37: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Schwärzungsintensität von iNOS im Gehirn der 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA:

(A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,036$; * = $p < 0,05$ gg. „Plazebo“ und gg. „P+Ö“);

(B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,217$).

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Zur Eignung der Hormonsubstitution

Der Geschlechtshormonstatus der Frau spielt nach aktuellem Forschungsstand eine wichtige Rolle bei zerebralen Ischämien wie dem Schlaganfall, aber auch bei neurologischen Komplikationen nach herzchirurgischen Eingriffen mit extrakorporaler Zirkulation (EKZ): Auch wenn Frauen – altersangepasst – grundsätzlich eine geringere Inzidenz und Mortalität beim Schlaganfall aufweisen (CARANDANG et al., 2006; REEVES et al., 2008), geht dieser Vorteil gegenüber den Männern im hohen Alter (PETREA et al., 2009) oder bei einem sehr frühen Einsetzen der Menopause (< 42 Jahre) verloren (LISABETH et al., 2009). Nach herzchirurgischen Eingriffen mit EKZ, wie z. B. dem Koronararterien-Bypass („coronary artery bypass graft“, CABG), sind Frauen gefährdeter für neurologische Komplikationen wie z. B. den Schlaganfall mit all seinen Folgeproblemen (HOGUE et al., 1999; HEDBERG et al., 2011). Die Bedeutung von Geschlecht und den Geschlechtshormonen im Zusammenhang mit neurologischen Folgeerscheinungen nach herzchirurgischen Eingriffen wird im Moment unterschiedlich diskutiert. So zeigte eine 17 β -Östradiol-Substitution bei postmenopausalen EKZ-Patientinnen vor dem Eingriff keine Verbesserung der postoperativen neurokognitiven Defizite (HOGUE et al., 2007). In einer retrospektiven Studie von VACCARINO et al. (2002) mit CABG-Patienten zeigten gerade die jüngeren Frauen (< 50 Jahre) die höchste Mortalität und die meisten neurologischen Komplikationen im Vergleich zu Männern (VACCARINO et al., 2002). In dieser Studie wurde allerdings der Geschlechtshormonstatus der betreffenden Frauen nicht überprüft. Da das Durchschnittsalter für den Eintritt in die Menopause etwa 51 Jahre beträgt (TRELOAR, 1981), ging man bei diesen Patientinnen von annähernd prämenopausalen Geschlechtshormonspiegeln aus. Um im Tierversuchsmodell die Hormonsituation der Menopause mit z. B. anschließender Östrogenersatztherapie („estrogen replacement therapy“, ERT) (RUSA et al., 1999; DUBAL und WISE, 2001) oder Hormonersatztherapie („Hormone replacement therapy“, HRT) (LITTLETON-KEARNEY et al., 2005) nachzustellen, ist die Ovariectomie eine anerkannte Methode (VAN KEMPEN et al., 2011). Für die Hormonsubstitution bei diesen ovariectomierten Labornagern gibt es unterschiedliche Methoden. Im Falle des 17 β -Östradiols sind bei Ratten z. B. tägliche subkutane Injektionen, subkutane Langzeit-Pellets, subkutane Silastic®-Implantate und auch eine orale Verabreichung beschrieben (ISAKSSON et al., 2011). Implantate aus Silastic®-

Schlauch haben bei der Substitution von 17 β -Östradiol und auch Progesteron den Vorteil, dass sie über eine kontinuierliche Hormonfreisetzung verfügen. Sie können so im Tier über einen relativ langen Zeitraum einen gleichmäßigen Hormonspiegel ohne bemerkenswerte pharmakokinetische Fluktuationen aufbauen (MANNINO et al., 2005). Ein gleichmäßiger Hormonspiegel ist in Tierversuchsmodellen besonders wichtig: Starke Schwankungen, z. B. im Östradiol-Serumspiegel, reduzieren die Validität gleichzeitig erhobener Daten. Supraphysiologische 17 β -Östradiol-Serumspiegel, wie sie z. B. durch manche kommerziell erhältliche Östrogen-Pellets initial nach der Implantation erzeugt werden, können im Tierexperiment nach zerebraler Ischämie zu einem vermehrten ischämischen Schaden im Gehirn führen (STROM et al., 2009). Subkutane Nacken-Implantate mit 17 β -Östradiol (180 μ g/ml 17 β -Östradiol in Sesamöl), die mithilfe von Silastic®-Schlauch hergestellt wurden, zeigten in einer Studie von STROM et al. (2008) bei ovariectomierten Ratten im Beobachtungszeitraum von 4 Wochen eine gleichmäßige, physiologische 17 β -Östradiol-Serumkonzentration (STROM et al., 2008). Mittels Silastic®-Schlauch-Implantaten, die kristallines Progesteron enthalten, konnten bei ovariectomierten Ratten ebenfalls stabile physiologische Progesteron-Serumspiegel im Beobachtungszeitraum von mehr als 3 Wochen erreicht werden (MANNINO et al., 2005). Für die vorliegende Studie wurden 17 β -Östradiol-Silastic®-Schlauch-Implantate analog zur Studie von STROM et al. (2008) hergestellt und implantiert. Die Herstellung der Progesteron-Implantate erfolgte analog zu den Vorgaben von MANNINO et al. (2005), wobei die Implantat-Länge von 30 mm gewählt wurde. Da in einer vorausgegangenen Studie der Arbeitsgruppe bei unkastrierten weiblichen Ratten Progesteronwerte von $17,7 \pm 12,6$ ng/ml im Serum gemessen wurden (KELLERMANN et al., 2013), wurden hier, unter Berücksichtigung einer Dosis-Wirkungs-Kurve von MANNINO et al. (2005), 80 mg kristallines Progesteron für jedes Implantat verwendet. Zusätzlich wurden die Progesteron-Implantate in Anlehnung an eine Studie von LU et al. (1982) vor dem Einsetzen mindestens 12 h in einer Phosphat-gepufferten physiologischen Kochsalzlösung („Phosphate Buffered Saline“, PBS) inkubiert, um ein gleichmäßigeres „Freisetzen“ des Hormons aus dem Implantat zu erreichen (LU und JUDD, 1982).

Bei der vorliegenden Studie wurden die Serumkonzentrationen von 17 β -Östradiol und Progesteron bei allen Ratten am Tag 0 (OP-Tag) des Versuchs erfasst (siehe Abschnitt 3.2.3.4.8). So konnte für den Zeitraum des Eingriffes mit EKZ und DHCA u. a. auch die Wirksamkeit der Hormonsubstitution überprüft werden. Als Vergleichsgruppen zu den kastrierten hormonsubstituierten Versuchsgruppen dienen die Versuchsgruppe „Intakt“ mit

physiologischem hormonellem Zyklus und die Versuchsgruppe „Plazebo“ mit zu erwartenden sehr niedrigen Geschlechtshormonspiegeln.

5.1.2 Zur Eignung des Versuchsmodells der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) mit tief hypothermem Kreislaufstillstand (DHCA) bei der Ratte

Seit der ersten erfolgreichen Anwendung einer Herz-Lungen-Maschine (HLM) beim Menschen im Jahre 1954 (GIBBON, 1954), hat sich das Verfahren der EKZ als Standardverfahren im Rahmen der Herzchirurgie etabliert (STONE, 2009). Das vergleichsweise schlechte Abschneiden von Frauen bei Eingriffen mit EKZ und unzureichende Erkenntnisse hierzu in Bezug auf den Geschlechtshormonstatus und die Rolle der weiblichen Geschlechtshormone (s. o.) lassen vermuten, dass hierfür komplexe pathophysiologische Mechanismen ursächlich sind, die sich in humanklinischen Studien nur unzulänglich untersuchen lassen.

Üblicherweise nutzt man dann in experimentellen Untersuchungen ein Versuchsmodell am Tier, das standardisierbar und zuverlässig reproduzierbar das wissenschaftlich zu bearbeitende Problemfeld abbildet und zusätzliche tierexperimentelle Maßnahmen, z.B. den Hormonstatus der Versuchstiere betreffend, zulässt. In der Anfangsphase der Etablierung eines Versuchsmodells der EKZ mit tief hypothermem Kreislaufstillstand („deep hypothermic circulatory arrest“, DHCA) wurde auf größere Tiere wie z. B. Lämmer (BOKESCH et al., 1996), Ferkel (MAULT et al., 1993) oder Hunde (WASS et al., 1998) zurückgegriffen. Dies war mit zahlreichen Nachteilen, z. B. dem Fehlen von standardisierten Testsystemen für die vielfältigen postoperativen Untersuchungen, der langen Generationenfolge bei der Nachzucht der Tiere und einem hohen Personal-, Material- und Kostenaufwand verbunden. Hinzu kommt, dass der Einsatz von typischen Haustieren in komplexen Versuchsanstellungen bei weiten Teilen der Bevölkerung wenig Akzeptanz erfährt (GINSBERG und BUSTO, 1989). Mit der Etablierung eines EKZ-Modells, das mit seinen technischen und physiologischen Parametern an die Laborratte adaptiert ist konnte im Jahr 2006 ein Großteil der oben genannten Nachteile vermieden werden (JUNGWIRTH et al., 2006). Laboranalytische Methoden sind für die Ratte als Versuchstier bestens etabliert und verfügbar, so dass postoperative laboranalytische Untersuchungen in Qualität und Umfang wie beim Menschen sehr gut möglich sind. Zudem wird durch das langfristige Überleben der Tiere in diesem Versuchsmodell die Untersuchung von postoperativ auftretenden neurologischen und neurokognitiven Funktionsstörungen *in vivo* ermöglicht. Eine Untersuchung des histopathologischen Outcomes mehrere Tage nach EKZ und DHCA ist durch das langfristige

Überleben der Versuchstiere in diesem Versuchsmodell ebenfalls möglich (JUNGWIRTH et al., 2006).

Auch wenn das vorliegende Versuchsmodell weitgehend die humanklinische Situation berücksichtigt, gibt es bei der Nutzung von Tierversuchsmodellen immer mehr oder weniger deutliche Einschränkungen in der Übertragbarkeit auf klinische Begebenheiten. So handelt es sich bei den eingesetzten Versuchstieren um junge und gesunde Tiere. Demgegenüber trifft die Herzchirurgie im Humanbereich auf ein sehr gemischtes Patientengut mit zahlreichen Komorbiditäten. Ziel der vorliegenden Studie ist es, grundsätzliche pathophysiologische Mechanismen von Schäden im Gehirn nach EKZ und DHCA im Zusammenhang mit dem weiblichen Geschlechtshormonstatus herauszuarbeiten. Für diesen grundsätzlichen Zweck sind junge und gesunde Versuchstiere ideal, weil hiermit weitestgehend einheitliche standardisierte und reproduzierbare Voraussetzungen geschaffen werden können. Die hier durchgeführte Studie soll dabei als Grundlage für weitere Fragestellungen dienen, im Rahmen derer dann Faktoren wie z. B. hohes Lebensalter, Komorbiditäten und chirurgische Traumata im Tierversuchsmodell Berücksichtigung finden sollen.

5.1.3 Zur Eignung der telemetrischen Überwachung der Körpertemperatur

Die Telemetrie bzw. Radiotelemetrie stellt den neuesten Stand der Technik bei der Überwachung von Vitalwerten bei Versuchstieren dar. Die telemetrische Überwachung bietet den Vorteil, dass die Aufzeichnung der Vitalwerte in der gewohnten Haltungsumgebung der Versuchstiere erfolgen kann und dadurch auch keine Beeinflussung der Werte durch z. B. Stress entsteht (KRAMER und KINTER, 2003). Telemetrie-Systeme des für die vorliegende Studie gewählten Herstellers (Data Sciences International, St. Paul, USA) wurden in zahlreichen Studien an Ratten erfolgreich zur Erfassung der Körperkerntemperatur verwendet, z. B. bei Versuchsmodellen zur Inflammation (GEGOUT-POTTIE et al., 1999) oder im Zusammenhang mit der Geschlechtshormon-abhängigen Temperaturregulation (COSMI et al., 2009). Für die vorliegende Studie erfolgten das operative Einbringen der Transmittersonde, der Aufbau der Hardware und die Installation der korrespondierenden Software nach den Vorgaben des Herstellers. Die auch mit der neurologischen Untersuchung betraute Person wurde vor Beginn des Versuchs eingehend in das System eingeführt (z. B. Bedienung der Software, Konfiguration der Hardware), um einen Ausfall des Systems oder fehlerhafte Werte durch Bedienungsfehler weitgehend auszuschließen. Da die Körpertemperatur von Ratten einer zirkadianen Rhythmik unterliegt (MATTHEW et al., 1999), wurden alle Tiere zum

gleichen Zeitpunkt einer EKZ mit DHCA unterzogen und nachfolgend zum gleichen Tageszeitpunkt zur Aufzeichnung der Körpertemperatur in den Tierraum verbracht. Somit lässt sich ein Einfluss der Zirkadianrhythmik als Ursache für Abweichungen bei der Temperaturerfassung ausschließen. Jedoch ist davon auszugehen, dass die neurologischen Untersuchungen als Stressor wirksam werden und dann zu verfälscht höheren Temperaturwerten führen können. Da die postoperativen neurologischen Untersuchungen allerdings erst 24 h nach EKZ und DHCA durchgeführt wurden, ist ein unmittelbarer Einfluss von Untersuchungsstress auf die Körpertemperatur innerhalb der als besonders wichtig erachteten ersten 24 h nach EKZ und DHCA auszuschließen. Es wurde auch darauf geachtet, dass alle neurologischen Untersuchungen im nachfolgenden Zeitraum bei allen Tieren zum gleichen Zeitpunkt und auf die gleiche Weise durchgeführt werden.

5.1.4 Zur Eignung der neurologischen Untersuchung

Von der postoperativen neurologischen Untersuchung war zu erwarten, dass sie mittels sensomotorischer Tests nach einem EKZ-Eingriff mit DHCA Defizite in diesem Bereich aufzeigt. Die Testung indizierter aktiver motorischer Aktivitäten liefert dafür eine bessere Bewertungsgrundlage als das alleinige Beobachten der zufälligen Motorik von unbeeinflussten Versuchstieren (COMBS und D'ALECY, 1987). Die neurologisch-motorische Untersuchung in der vorliegenden Studie besteht aus diversen bereits etablierten standardisierten Tests, in denen das motorische Verhalten mittels eines Scoring-Systems mit Punkten bewertet wird. Die sensorischen Tests zur Propriozeption, zur Vibrissen-Sensibilität sowie zum Seh- und Hörvermögen orientieren sich in der Ausführung am neurologischen Untersuchungsgang der veterinärmedizinischen Propädeutik (BAUMGARTNER, 2009). Die beobachteten Ergebnisse werden ebenfalls mithilfe eines Scoring-Systems dargestellt.

Der **Rotating-Grid-Test** entspricht einer Modifikation des sog. „Screen-Tests“ von COMBS und D'ALECY (1987) und wird zur Beurteilung der vorhandenen Muskelkraft und des Gleichgewichtssinnes verwendet. Der Test ist gut geeignet zur Beurteilung von Vorderhirn-Läsionen, wie sie bei Tieren in Versuchsmodellen zur globalen Ischämie vorkommen (COMBS und D'ALECY, 1987). Von Bedeutung ist hier eine sorgfältige und reproduzierbare Ausführung des Tests durch den Untersucher. Eine konstante zeitliche Abfolge der Handhabungen und eine passende Rotationsgeschwindigkeit bei der Drehung des Gitters (von einer 0°- in eine 90°- und schließlich 180°-Position) sind vonnöten, damit die Tiere sich zwar am Gitter festhalten können, aber nicht an diesem entlanglaufen.

Der **Beam-Balance-Test** ist ein komplexer umfassender Test, der Gleichgewichtssinn und vestibulomotorische Funktion untersucht, wobei Rückschlüsse auf die Kleinhirn-Integrität möglich sind (FUJIMOTO et al., 2004). Die Fähigkeit der Tiere, auf dem in seiner Größe standardisierten Balken (1,5 cm Kantenlänge im Querschnitt) zu balancieren bzw. die Dauer des fehlerfreien Balancierens (Vorgabe: 60 s) bietet eine probate Bewertungsgrundlage. Dieser Test ist weitverbreitet, er wird z. B. bei Tierversuchsmodellen zur globalen und fokalen Ischämie (COMBS und D'ALECY, 1987; DEGRABA et al., 1994) und zur traumatischen Hirnschädigung (DIXON et al., 1987) häufig verwendet.

Der **Beam-Walking-Test** ist ein etabliertes Testverfahren, um primär Schädigungen des Motorkortex zu erfassen, und um Gleichgewichts- und Koordinationsstörungen darstellen zu können. Er wurde erstmals im Jahr 1982 von FEENEY et al. zur Bewertung von traumatischen Kortexläsionen bei Ratten verwendet (FEENEY et al., 1982). Negativ bewertete Ereignisse sind Fehltritte neben den standardisierten Balken (FEENEY et al., 1982). Ein ruhiges Vorgehen vom stets gleichen Untersucher fördert das freiwillige Absolvieren des Tests durch die Tiere. Dies ermöglicht eine sehr gute Einschätzung, ob ein Tier aufgrund neurologischer Defizite oder aufgrund von Angst oder fehlender Motivation nicht auf dem Balken laufen will.

Der **Prehensile-Traction-Test** erlaubt es, Muskelkraft, Greif- und Haltevermögen der Versuchstiere zu erfassen und zu beurteilen. Weiterhin können Bewegungsasymmetrien z. B. bei Hemiparesen erkannt werden. Dieses Testverfahren kommt ebenfalls bei Tierversuchsmodellen zur globalen und zur fokalen Ischämie zum Einsatz (COMBS und D'ALECY, 1987; DEGRABA et al., 1994). Neurologisch beeinträchtigte Tiere haben Schwierigkeiten, sich mit einer oder beiden Vorderpfoten am Drahtseil für die geforderte Zeitspanne festzuhalten. Bei diesem Test ist auf einen ausreichend hohen Abstand zwischen Drahtseil und Schaumstoffmatte zu achten, um ein vorzeitiges Loslassen der Versuchstiere zu vermeiden.

Die Überprüfung der **Propriozeption** oder auch Tiefensensibilität gibt Aufschluss darüber, inwiefern das Versuchstier in der Lage ist, die Position seines Körpers und der Gliedmaßen im Raum einzuschätzen und Bewegungsrichtungen zu erkennen. In der vorliegenden Studie lassen sich bei propriozeptiven Defiziten insbesondere Rückschlüsse auf Vorderhirn- und Hirnstammläsionen ziehen. Hierfür können Tests angewendet werden, wie sie im klinisch-neurologischen Untersuchungsgang z. B. für Kleintiere üblich sind. Allerdings sind

Anpassungen an die Gegebenheiten bei der Ratte und die Rücksichtnahme auf diesbezügliche Einschränkungen erforderlich.

Die **Vibrissen-Sensibilität** eignet sich gut für die Überprüfung der Sensibilität im Gesichtsbereich und daher der Funktion des N. trigeminus. Durch die Berührung der Vibrissen mit einem Kugelschreiber kann beidseitig gut reproduzierbar ein Reiz gesetzt werden, der bei Tieren mit ungestörter Sensorik meist durch ein Zuwenden des Kopfes auf die Seite des Reizes beantwortet wird.

Die Beurteilung der **Sehfähigkeit** mithilfe des Wattebauchttests stellt sich bei Nagetieren und insbesondere bei Albino-Ratten besonders schwierig dar. Augenbewegungen beim Verfolgen des „Wattebauschfluges“ sind bei Albino-Ratten aufgrund der sehr hellen Pupille für den Untersucher nur schwer zu erkennen. Eine gute Einarbeitung der untersuchenden Person und ausreichend Routine dieser Person bei der Durchführung des Tests liefert allerdings gut verwertbare Ergebnisse. Bei zentraler Blindheit aufgrund von Großhirnläsionen kann auch das Verhalten der Tiere im Haltungskäfig weiteren Aufschluss geben.

Das **Hörvermögen** der Versuchstiere kann mithilfe von gezielt gesetzten reproduzierbaren akustischen Reizen (in vorliegender Studie per Fingerschnipsen) überprüft werden. Welche Strukturen bei einer eventuell auftretenden Verschlechterung des Hörvermögens betroffen sind, der N. vestibulocochlearis, der Hirnstamm oder die Großhirnrinde, lässt sich mit diesem Testverfahren allerdings nicht näher bestimmen.

Damit die neurologische Untersuchung so standardisiert wie möglich ablaufen konnte, wurden in vorliegender Studie die Tests in immer gleicher Ab- und Reihenfolge und stets von demselben Untersucher durchgeführt. Untersuchungsergebnisse von Tag -1 des Versuchs sollten als Ausgangs- und Vergleichswert („Baseline“) für die postoperativen Ergebnisse dienen. Außerdem konnte diese präoperative Untersuchung als „Lerneinheit“ für die Versuchstiere genutzt werden. Die Durchführung der neurologischen Tests in der Hell-Phase ist sicherlich nicht als optimal zu bewerten, da die Hell-Phase die eigentliche Ruhephase der Tiere ist. Aus diesem Grund wurden sämtliche Untersuchungen gegen Ende der Hell-Phase und damit zu Beginn der Dunkelphase (= Aktivitätsphase der Ratten) durchgeführt. Dies ist ein Kompromiss, der vorwiegend die Vorteile der guten Licht- und Sichtverhältnisse für den Untersucher nutzt und weniger die kurz bevorstehende gesteigerte Aktivität der Versuchstiere einbindet. Die Vermeidung von Fehleinschätzungen bei den Testergebnissen durch optimale äußere Bedingungen für den Untersucher wurde in diesem Fall als wichtiger erachtet.

5.1.5 Zur histologischen Darstellung neuronaler Schäden

Für die vorliegende Studie wurde eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung zur histologischen Beurteilung von Motorkortex, Striatum und Hippokampus verwendet. Die HE-Färbung gilt als klassische Standardmethode, mithilfe derer Morphologie, Struktur und pathologische Veränderung von vielen Geweben, auch neuronalem Gewebe, abgebildet und messbar gemacht werden können. Im Gehirn führen ischämische Ereignisse, wie sie auch im Zusammenhang mit EKZ und DHCA vorkommen können, zu einem Sauerstoff- und Energiemangel in den Neuronen (WERNER, 2000). Die daraus resultierenden Ansammlungen von kondensierten Mitochondrien in den ischämisch geschädigten Nervenzellen führen zu einer vermehrten Anfärbung mit dem Farbstoff Eosin, weshalb man bei diesen Neuronen auch von eosinophilen Neuronen spricht. Spezialfärbungen für degenerierte Neurone, wie z. B. bestimmte Silberfärbungen oder Fluoro-Jade-Färbungen können eine noch spezifischere lichtmikroskopische Diagnostik neuronaler Schädigung ermöglichen (GARMAN, 2011). Allerdings bedürfen diese Färbungen einer vorhergehenden Perfusionsfixation der Gehirne, die zu einer umfangreichen Denaturierung aller Proteine führt. Darauf wurde in der vorliegenden Studie verzichtet, um an den entnommenen Gehirnen das Western-Blot-Verfahren für eine differenzierende Proteinanalyse einsetzen zu können. Da die Proteinanalytik in der vorliegenden Studie eine wichtige und neue Zielgröße darstellt, ist die lichtmikroskopische Auswertung der Hirnmorphologie mithilfe der HE-Färbung hier lediglich als Orientierungshilfe für eingetretene Schäden im Gehirn anzusehen.

5.1.6 Zur Eignung der Western-Blot-Analyse

Seit seiner ersten Beschreibung in der biochemischen Forschung (TOWBIN et al., 1979) hat sich das Western-Blot-Verfahren als Standardmethode der Proteinanalyse in der modernen Medizin, in Forschung und Diagnostik, etabliert (KURIEN und SCOFIELD, 2006).

Das 2-tägige Verfahren wurde anhand eines in der Arbeitsgruppe bereits etablierten Labor-Protokolls durchgeführt. Die Bearbeitung der Proben erfolgte – ebenfalls nach etabliertem Protokoll – stets auf Wassereis und unter Addition von Protease-Inhibitoren, um autolytische Prozesse soweit wie möglich zu reduzieren. Um nachfolgend die Grauwerte auf den Membranen vergleichen zu können, wurde für jede Probe dieselbe Menge Protein pro Geltasche im Western-Blot-Verfahren verwendet.

Die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld erfolgte mithilfe der Gelelektrophorese nach LAEMMLI (LAEMMLI, 1970). Vorteil dieser Methode ist, dass die dreidimensionale

Proteinfaltung durch die Einwirkung von Hitze und Sodiumdodezylsulfat (SDS) aufgelöst wird, und Ladungsunterschiede zwischen den Molekülen aufgehoben werden. So erfolgt die elektrophoretische Auftrennung nur noch nach dem Molekulargewicht. Das Verfahren nach LAEMMLI (1970) nutzt zudem eine diskontinuierliche Gelstruktur, mit zunächst einer Aufkonzentrierung der Proteine im pH-neutralen Sammelgel und der nachfolgenden elektrophoretischen Auftrennung im basischen Trenngel. Dies führt insgesamt zu einer verbesserten Trennschärfe. Der Polyakrylamid-Anteil des Trenngels wurde dabei auf die Molekülgröße des gesuchten Proteins abgestimmt, um eine optimale Darstellung der gesuchten Proteine im Gel und auf der Membran sicherzustellen. Der Übertrag der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte in der vorliegenden Studie mit dem sog. „Nassblotting-Verfahren“. Hierbei wird mehr Transferpufferlösung verbraucht als beim sog. „halbtrockenen Blotting“, einer übermäßigen Erhitzung des Transfersystems und des Gels wird dadurch aber eher vorgebeugt.

Der nachfolgende Schritt der Blockierung (hier mit fettarmer Milchpulverlösung) dient der Ausschaltung unspezifischer Proteinbindungsstellen auf der Membran und erhöht die Spezifität des Ergebnisses. Die präzise Einhaltung von Anzahl und Dauer der Waschschrte ist besonders wichtig, um ein adäquates Binden des Primär- und Sekundärantikörpers bei allen „Blots“ und damit eine einheitliche Ausgangsbasis bei der abschließenden Bewertung zu erreichen. Die Chemilumineszenz-Detektion ist eine sehr weitverbreitete, sensitive und selektive Methode, um die Bindung des 2., enzymgekoppelten Antikörpers sichtbar zu machen (KURIEN und SCOFIELD, 2006).

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Physiologische Befunde

Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe verschiedener Versuchstechniken und Labormethoden tierexperimentelle Befunde zur Physiologie, zur neurologische Funktion, zur Hirnmorphologie sowie zur neuronalen Inflammation und Exzitotoxizität im Zeitraum von 4 Tagen nach extrakorporaler Zirkulation (EKZ) mit tief-hypothermem Kreislaufstillstand („deep hypothermic circulatory arrest“, DHCA) bei erwachsenen weiblichen Ratten mit unterschiedlichem Geschlechtshormonstatus zu erhalten. Zusätzlich sollte darauf geachtet werden, ob bei gewissen Befunden zu den genannten Parametern ein Zusammenhang mit dem

Überleben bzw. dem Nicht-Überleben der Versuchstiere im vorgegebenen Versuchszeitraum ersichtlich wird. Aus humanklinischen Studien ist bekannt, dass Frauen im Vergleich zu Männern postoperativ nach Eingriffen mit EKZ eine erhöhte Mortalität (O'CONNOR et al., 1993; KOCH et al., 1996; WOODS et al., 2003) und Morbidität aufweisen (HOGUE et al., 2001a; PHILLIPS BUTE et al., 2003). Außerdem ist unter EKZ-Patienten mit perioperativen neurologischen Ereignissen (wie z. B. dem Schlaganfall) die Mortalität bei Frauen ebenfalls höher (HOGUE et al., 2001a). Besonders betroffen vom schlechten Outcome nach EKZ sind nach einer Studie von VACCARINO et al. (2002) Frauen in der perimenopausalen Phase, also um das 50. Lebensjahr. Inwiefern der Geschlechtshormonstatus der Frauen hierbei eine wichtige Rolle spielt, ist nicht bekannt. Es gibt bisher z. B. keine prospektiv-randomisierten klinischen Humanstudien, die einen Zusammenhang zwischen Geschlechtshormonstatus und postoperativem Outcome herstellen könnten. Außerdem gibt es keine klinisch erstellten Daten über die molekularen Prozesse von zerebraler Inflammation und Exzitotoxizität ausgehend von der Variabilität der Geschlechtshormonkonzentrationen bei Patientinnen mit herzchirurgischen OP-Maßnahmen.

5.2.1.1 Endokrine physiologische Befunde

Das verwendete EKZ-Modell mit 45 min DHCA bei der Ratte hat gezeigt, dass es bei männlich intakten Ratten postoperativ funktionelle neurologische Defizite und milde histomorphologische zerebrale Schäden verursacht (JUNGWIRTH et al., 2006). Bei weiblichen und männlichen Ratten (jeweils intakt und kastriert) konnte für das verwendete Versuchsmodell mit EKZ und DHCA postoperativ ebenfalls eine negative Beeinträchtigung der motorischen Funktion sowie des histomorphologischen zerebralen Outcomes bei allen Tieren nachgewiesen werden, wobei die weiblichen Tiere hier jeweils bessere Ergebnisse erzielten als die männlichen Tiere (FRIEDRICH, 2013; KELLERMANN et al., 2013). Um den Einfluss des weiblichen Geschlechtshormonstatus auf postoperative Auswirkungen der EKZ mit DHCA untersuchen zu können, wurden im Rahmen der vorliegenden Studie 5 unterschiedliche Untersuchungsgruppen gebildet. Die Gruppe der intakten Tiere mit physiologischem Geschlechtshormonstatus und -zyklus soll sexualhormonelle Verhältnisse vergleichbar zu prämenopausalen Frauen abbilden. Die Gruppe der kastrierten Tiere mit Placebo-Implantat und den deshalb erwarteten sehr niedrigen 17 β -Östradiol- und Progesteron-Spiegeln soll hingegen den Hormonstatus postmenopausaler Frauen imitieren. Die Substitution mit Progesteron und 17 β -Östradiol bei kastrierten Weibchen in der Gruppe „Progesteron+Östrogen“ (P+Ö) untersucht die Wirkung einer stabilen Konzentration beider

Hormone, d. h. ohne zyklusbedingte Schwankungen, auf das Outcome nach EKZ und DHCA. Dieser Hormonstatus entspricht am ehesten gewissen Formen der Hormonersatztherapie bei Frauen mit Beginn der Menopause. Die Substitution von 17 β -Östradiol (Gruppe „Östrogen“) oder Progesteron (Gruppe „Progesteron“) bei kastrierten weiblichen Tieren alleine untersucht gezielt den Einfluss der beiden Hormone unabhängig voneinander. Dies soll der weiteren verbesserten Zuordnung bzw. Differenzierung der Wirkungen von 17 β -Östradiol und Progesteron in diesem Versuchsmodell dienen.

Die Ergebnisse der Serumhormonuntersuchungen überraschen dadurch, dass es nur beim Progesteron-Serumspiegel signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gibt. Entgegen den Erwartungen zeigt sich trotz der unterschiedlichen Behandlungen (Scheinkastration, Kastration mit oder ohne Hormonsubstitution) kein signifikanter Unterschied zwischen den 5 Versuchsgruppen bei den 17 β -Östradiol-Spiegeln. Lediglich die Gruppe der intakten weiblichen Ratten zeigt tendenziell die höchsten 17 β -Östradiol-Serumspiegel. In der vorliegenden Studie fand bei den intakten Tieren keine Zykluskontrolle statt. Die 17 β -Östradiol-Serumspiegel der Versuchstiere dieser Versuchsgruppe können von starken zyklischen Schwankungen mit hohen Spitzenwerten (insbesondere im Pro-Estrus) bei Einzeltieren beeinflusst sein. Die vergleichsweise hohen Standardabweichungen beim Mittelwert dieser Gruppe unterstützen diese Annahme. Unerwartet ist ebenfalls, dass die Versuchsgruppen „Progesteron“ und „Plazebo“ keine signifikant niedrigeren 17 β -Östradiol-Spiegel als die Gruppen „Intakt“, „Östrogen“ und „P+Ö“ aufweisen. Durch die Entfernung der Ovarien und nachfolgend keiner weiteren Östrogen-Substitution wären in diesen beiden Gruppen deutlich niedrigere 17 β -Östradiol-Serumkonzentrationen zu erwarten gewesen. Eine unvollständige Entfernung des ovariellen Gewebes im Rahmen der Kastration ist auszuschließen, da bei der Kastration streng auf die Entfernung beider Ovarien geachtet wurde. Gegen eine unvollständig erfolgte Entfernung der Ovarien spricht auch der erwartungsgemäß sehr niedrige Progesteron-Serumspiegel in der Versuchsgruppe „Plazebo“. Erklären könnte die unerwartet hohen 17 β -Östradiol-Serumkonzentrationen eine extragonadale Östrogen-Synthese mithilfe des Enzyms Aromatase u. a. in der Leber und im Fettgewebsstroma, wie sie für postmenopausale Frauen beschrieben ist. Die Vorstufen zur Östrogen-Synthese, insbesondere Androstendion, stammen dabei aus der Nebennierenrinde (SIMPSON, 2003). Zunehmende Östradiol-Spiegel im Blut von ovariectomierten Ratten über einen längeren Beobachtungszeitraum wurden beschrieben (ZHAO et al., 2005). Da die Tiere der Gruppen „Progesteron“ und „Plazebo“ ein höheres Körpergewicht (s. u.) und damit

wahrscheinlich auch einen höheren Fettgewebsanteil aufwiesen, wäre eine vermehrte Östrogen-Synthese im Fettgewebsstroma dieser Versuchsgruppen denkbar. Die Progesteron-Serumkonzentrationen der Gruppen „Intakt“ und „Progesteron“ liegen im physiologischen und erwartbaren Bereich. Die Gruppen „Östrogen“ und „Plazebo“ weisen, ebenfalls wie erwartet, sehr niedrige Konzentrationswerte für Progesteron auf. Unerwartet ist hingegen, dass die Gruppe „P+Ö“ die signifikant höchsten Progesteron-Serumkonzentrationen aufweist und dabei mehr als doppelt so hohe Werte wie die Gruppen „Intakt“ und „Progesteron“ erreicht. Ob 17β -Östradiol eventuell einen Einfluss auf die extragonadale de novo-Synthese von Progesteron nehmen kann, ist fraglich. Dies ist in der Literatur lediglich für das Gehirn beschrieben. Ovariell Östradiol kann die de novo-Synthese von Neuro-Progesteron im Gehirn stimulieren. Dieses Neuro-Progesteron nimmt dann Einfluss auf das hypothalamo-hypophysäre System und führt zur vermehrten Ausschüttung von luteinisierendem Hormon (LH) (MICEVYCH und SINCHAK, 2008). Da Progesteron auch in der Nebennierenrinde synthetisiert werden kann (RESKO, 1969), könnte spekuliert werden, dass das mittels Östradiol gebildete Neuro-Progesteron auch Einfluss auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse nimmt. Es bleibt aber weiterhin unklar, warum die höheren Progesteron-Serumkonzentrationen in unserem Fall lediglich bei „künstlicher“ Zufuhr von 17β -Östradiol mittels Hormonimplantat aufgetreten sind.

Betrachtet man die Entwicklung des Körpergewichts, so zeigen sich erwartungsgemäß Hormonstatus-bezogene Unterschiede. Die Gruppen „Progesteron“ und „Plazebo“ weisen präoperativ das höchste Körpergewicht auf. Allerdings ist die Gruppe „Plazebo“ nicht signifikant schwerer als die Gruppe „P+Ö“. Es ist seit Längerem aus der Verhaltenskunde bekannt, dass gonadale Steroidhormone bei Laborratten einen deutlichen Einfluss auf Futteraufnahme, körperliche Aktivität und damit auch auf das Körpergewicht haben. Ovariectomierte weibliche Ratten zeigten dabei eine vermehrte Futteraufnahme, geringere körperliche Aktivität und dadurch eine deutlich beschleunigte Gewichtszunahme im Vergleich zu intakten Tieren. Eine Östrogen-Substitution bewirkte bei ovariectomierten Ratten eine Wiederherstellung des ursprünglichen Aktivitäts- und Fressverhaltens und damit auch des Körpergewichts (WADE, 1976). Ein Überschuss an Progesteron durch tägliche Progesteron-Injektionen führte ebenfalls zu einer gesteigerten Gewichtszunahme bei weiblich intakten Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren. Es kam dabei jedoch zu einer überdurchschnittlichen Zunahme des Körperfettes bei den mit Progesteron behandelten Tieren (HERVEY und HERVEY, 1967). Erfahrungen aus der Klinik zeigen, dass eine kleinere

Körperoberfläche mit niedrigeren Hämatokritwerten und mit höherer Mortalität und Morbidität nach EKZ assoziiert werden kann (DEFOE et al., 2001). Allerdings nehmen die Körpergewichtsveränderungen in der hier vorliegenden Studie keinen Einfluss auf das Überleben bzw. Nicht-Überleben nach EKZ mit DHCA.

5.2.1.2 Parametrische physiologische Befunde während der OP-Phase

Die intraoperativ erhobenen physiologischen Parameter zeigen im Mittelwert keine signifikanten Unterschiede zwischen den 5 Versuchsgruppen. Die experimentelle Beeinflussung des Hormonstatus hat also in der vorliegenden Studie keinen signifikanten Einfluss auf den mittleren arteriellen Blutdruck („mean arterial pressure“, MAP, mmHg), die Hämoglobinkonzentration (Hb, mg/dl), den arteriellen Sauerstoffpartialdruck (PaO₂, mmHg), den Basenüberschuss („base excess“, BE, mmol/l) oder die Blutglukosekonzentration (Glukose, mg/dl) zu den 5 Messzeitpunkten. Dass die EKZ mit DHCA durchaus bei allen Versuchsgruppen Einfluss auf die Werte dieser physiologischen Parameter hat, zeigt der signifikante Einfluss der Zeit in deren Werteverlauf.

Der Abfall des **MAP** vor Beginn des DHCA bis 5 min nach Ende des DHCA entsteht infolge der Verringerung der physiologischen Blutflussrate von 160-180 ml/kg/min (zu Beginn der EKZ) auf 105 ml/kg/min (bei Beginn der Abkühlungs- und Wiedererwärmungsphase). Dies spiegelt durchaus die Situation beim Menschen in der Klinik wieder. Da eine während der operativen Phase auftretende zerebrale Hypoperfusion einen zusätzlichen Blutdruckabfall bedingen kann (GROCOTT et al., 2005), wird der MAP während der Wiedererwärmungsphase durch Norepinephrin-Gaben je nach Bedarf auf einem physiologischen Wert von etwa 50 mmHg gehalten.

Die **Hämoglobinkonzentration** reduziert sich bei allen Gruppen bis vor den Beginn des DHCA (2. Messzeitpunkt) auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes. Dies ist auf die protokollgemäße Hämodilution durch das Auffüllen des extrakorporalen Kreislaufs mit 6%iger Hydroxyethylstärke (HAES) zur Entlüftung zurückzuführen. Diese Hämodilution senkt aber auch die Viskosität des Blutes und führt damit zu einer Verbesserung der Blutzirkulation in der HLM. Sinkende Hämoglobinkonzentrationen durch Hämodilution im Rahmen der EKZ bringen stets auch die Gefahr einer Anämie und dadurch eine mangelhafte Sauerstoffversorgung der Gewebe mit sich. Diese Gefahr wird aber in der Regel durch das Herabsetzen der Blutviskosität und des peripheren Gefäßwiderstandes und einer damit

einhergehenden verbesserten Durchblutung kompensiert (DEFOE et al., 2001). Um die Hb-Werte nach Ende der EKZ wieder auf annähernd physiologische Werte anzuheben, wird das im Kreislauf der HLM zurückgebliebene Restblut zentrifugiert. Das so entstandene Erythrozyten-Konzentrat wird, mit HAES und Kalziumglukonatlösung verdünnt, in die Ratte retransfundierte. Auch bei herzchirurgischen Eingriffen in der Humanmedizin wird zunehmend versucht, auf die Verwendung von Fremdblut zum Auffüllen des extrakorporalen Kreislaufs zu verzichten, wodurch sich Parallelen zum vorliegenden Modell ergeben.

Der **arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO_2)** ist zu allen 5 Messzeitpunkten der OP-Phase bei den 5 Versuchsgruppen im physiologischen Bereich mit einem starken Anstieg vor Beginn des DHCA. Vor Beginn der EKZ wird die Sauerstoffversorgung durch die kontrollierte Beatmung sichergestellt. Mit Beginn der EKZ verursacht der Membranoxygenator eine überdurchschnittliche Sauerstoffversorgung bei den Versuchstieren, wodurch sich der starke Anstieg des PaO_2 vor Beginn des DHCA bis zum Ende der EKZ erklärt. Nach dem Ende der EKZ kehren die PaO_2 -Werte aufgrund der reinstallierten kontrollierten Beatmung wieder in etwa auf das Ausgangsniveau zurück.

Der **Basenüberschuss** als Messwert für das Säure-Basen-Gleichgewicht im Körper fällt bei allen 5 Versuchsgruppen im Verlauf der OP-Phase relativ stark ab, was als Zeichen für eine beginnende metabolische Azidose angesehen werden kann. Eine Hyperlaktatämie mit Laktatazidose kommt in der Klinik bei Eingriffen mit EKZ vergleichsweise häufig vor. Dies ist hauptsächlich auf eine mangelnde Sauerstoffversorgung mit anaerober Glykolyse in den Geweben und daraus folgender Laktatbildung zurückzuführen (RANUCCI et al., 2006).

Die **Blutglukose** steigt bei allen Versuchsgruppen bis zum Ende der EKZ kontinuierlich an. Dieser Anstieg um ca. 100 % ist in der Regel multifaktoriell. So kann z. B. eine globale zerebrale Ischämie im Verlauf einer (hypothermen) EKZ zu Störungen im Glukosestoffwechsel mit nachfolgender Hyperglykämie führen, was im Tierversuch an Hunden gezeigt werden konnte (FEERICK et al., 1995). Möglich ist aber auch eine sog. „Stress-Hyperglykämie“, wie sie in der Klinik bei Intensiv-Patienten beobachtet werden kann. Die Hyperglykämie wird hierbei durch unterschiedliche Faktoren, u. a. auch durch Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse mit Kortisol- und Katecholamin-Ausschüttung verursacht (DUNGAN et al., 2009). Ob eine strikte intraoperative Kontrolle und die dadurch ermöglichte Stabilisierung der

Blutglukosekonzentration zu einem verbesserten Outcome der Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen führt, ist noch nicht abschließend geklärt (VAN DEN BERGHE, 2007).

5.2.1.3 Befunde bei der Körpertemperatur

Alle Tiere, die postoperativ die vorgegebenen 4 Tage nach EKZ mit DHCA überlebt haben, zeigen in den ersten 24 h nach dem operativen Eingriff einen konstanten und signifikanten Anstieg der Körpertemperatur. Ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe konnte dabei nicht beobachtet werden.

Bei rektaler Messung beträgt die physiologische Körpertemperatur von Laborratten zwischen 35,9 und 37,5 °C (SHARP und LA REGINA, 1998). Die telemetrisch ermittelte Körperkerntemperatur und die rektal gemessene Körpertemperatur bei Ratten sind als sehr ähnlich anzusehen (DILSAVER et al., 1992). Im Zeitintervall „20-24 h post EKZ“ weisen alle überlebenden Versuchsgruppen eine Körpertemperatur von über 38 °C auf (Spanne von 38,2 bis 38,6 °C), was als milde Hyperthermie gewertet werden kann (LIEBREGTS et al., 2002). Auch die gemittelten Körpertemperaturwerte an den postoperativen Tagen 2-4 zeigen bei allen Versuchsgruppen noch Werte um 38 °C. Erhöhte gemittelte TNF α -Konzentrationen im Serum aller Versuchsgruppen 1h nach EKZ und DHCA und Leukozytenzahlen außerhalb des physiologischen Bereichs bei allen Versuchsgruppen am postoperativen Tag 4 machen leichtes Fieber aufgrund inflammatorischer Prozesse zur wahrscheinlichsten Ursache für die beobachtete Hyperthermie.

Körpertemperatur-Messergebnisse bei den vorzeitig euthanasierten Tieren wurden nicht statistisch ausgewertet, da in der Regel zu wenige Daten pro Versuchsgruppe für einen adäquaten Vergleich vorhanden waren. In den ersten 4 h nach EKZ und DHCA zeigen sich aber bei den Tieren der Versuchsgruppen „Intakt“ und „P+Ö“, die nachfolgend vorzeitig euthanasiert werden mussten (zu diesem Zeitpunkt war noch die volle Tierzahl gegeben) auffällig niedrigere Körpertemperaturwerte als bei den die 4 Tage überlebenden Tieren der gleichen Versuchsgruppe. Diese frühe erniedrigte Körpertemperatur der später euthanasierten Tiere der Gruppen „Intakt“ und „P+Ö“ könnte auf ein beginnendes Herz-Kreislaufversagen dieser Versuchstiere hinweisen. Auch in der Klinik wird eine sehr niedrige Körpertemperatur unmittelbar nach Eingriffen mit EKZ mit einem schlechteren Outcome und erhöhter Mortalität bei den betroffenen Patienten assoziiert (DEFOE et al., 2003). Umfassende Herz-

Kreislauf-Untersuchungen im Tierversuch könnten in dieser Hinsicht zu weiteren klärenden Erkenntnissen führen.

In einer klinischen Humanstudie konnte ein Zusammenhang zwischen der maximalen, erhöhten Körpertemperatur innerhalb von 24 h nach EKZ und einer sechs Wochen nach dem Eingriff beobachteten neurokognitiven Dysfunktion hergestellt werden (GROCOTT et al., 2002). Da sich in der vorliegenden Studie bei den 5 Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede bei der neurologischen Funktion *in vivo*, bei der Hirnmorphologie und bei der Körpertemperatur innerhalb von 24 h nach EKZ und DHCA gezeigt haben, ist hier eine abschließende Bewertung der Auswirkung der postoperativen Körpertemperatur auf das neurologische Outcome nicht möglich.

5.2.2 Sensomotorische neurologische Befunde

EKZ und DHCA haben in der vorliegenden Studie zu einer Beeinträchtigung der neurologischen Funktion bei den überlebenden Versuchstieren geführt. Dies zeigt sich am signifikanten Unterschied zwischen den präoperativ erhobenen Ausgangswerten („Baseline“) und den Ergebnissen der neurologischen Untersuchungen nach EKZ mit DHCA. Die 5 Versuchsgruppen zeigen sich jeweils sensorisch und motorisch homogen und sie liefern ähnliche Ergebnisse ohne statistisch signifikante Unterschiede. Da der weibliche Geschlechtshormonstatus in den 5 Versuchsgruppen, insbesondere das 17 β -Östradiol betreffend, nicht so variabel wie geplant war, lässt die vorliegende Studie keine Aussage über den Einfluss des angestrebten Geschlechtshormonstatus auf die neurologische Funktion nach EKZ und DHCA zu.

Klinische Studien, die sich mit dem Outcome der Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen mit EKZ (wie z. B. CABG) beschäftigen, vergleichen überwiegend Frauen und Männer (s. o.). Ob ein deutlicher Wechsel im Geschlechtshormonstatus bei den Frauen für die Ergebnisse nach EKZ eine wichtige Rolle spielt, ist weitgehend unbekannt. Dass in der Studie von VACCARINO et al. (2002) gerade die jüngeren Frauen (< 50 Jahre) schlechtere Ergebnisse als die gleichaltrigen Männer in Bezug auf die Mortalität und neurologische Funktion aufwiesen, ist unerwartet. Da allerdings keine Serumhormonspiegel bei den Patienten bestimmt wurden, könnte sich auch schon ein Großteil der operierten Frauen in der Menopause befunden haben, so dass man niedrigere Serumspiegel von z. B. 17 β -Östradiol bei diesen Frauen unterstellen müsste. In einer humanklinischen Studie von HOGUE et al. (2007) konnte bei postmenopausalen Frauen mit einer 17 β -Östradiol-Substitution keine

Verbesserung des neurokognitiven Outcomes nach herzchirurgischen Eingriffen erzielt werden. Allerdings erfolgte die Östrogen-Substitution lediglich vom ersten präoperativen bis zum 5. postoperativen Tag. Folgt man der aktuellen CABG-Richtlinie aus den USA, so wird dort von einer postmenopausalen HRT für Frauen bei CABG abgeraten (HILLIS et al., 2011). Seit der sog. „Women`s Health Initiative Study“ mit mehr als 16.000 teilnehmenden Frauen im Alter von 50 bis 79 Jahren ist die postmenopausale HRT grundsätzlich stark in die Kritik geraten. Die Studie wurde aufgrund eines erhöhten Brustkrebs- und Schlaganfallrisikos in der HRT-Gruppe abgebrochen (ROSSOUW et al., 2002). Die klinisch erzielten Ergebnisse zum Schlaganfallrisiko stehen jedoch in einem deutlichen Widerspruch zu den Befunden bei tierexperimentellen Studien mit 17 β -Östradiol-Substitution. Dort konnte gehäuft eine neuroprotektive Wirkung von 17 β -Östradiol in Tierversuchsmodellen zur fokalen zerebralen Ischämie gezeigt werden (RUSA et al., 1999; FUKUDA et al., 2000; DUBAL und WISE, 2001). Auch bei globaler zerebraler Ischämie, wie sie während EKZ und DHCA auftritt, konnte im Tierversuch ein positiver Effekt der 17 β -Östradiol-Substitution nachgewiesen werden (CHEN et al., 1998; WANG et al., 1999). Widersprüchliche Ergebnisse aus Klinik und Forschung legen den Schluss nahe, dass der Einfluss des physiologisch variablen weiblichen Geschlechtshormonstatus oder auch einer therapeutischen/prophylaktischen Geschlechtshormonsubstitution im Zusammenhang mit neurologischen Schädigungen sehr komplex ist. Zu viele Faktoren können hierbei mitbeteiligt sein: Art und Dauer einer ischämischen zerebralen Schädigung; Dauer und Konzentration der Hormonfreisetzung bei Substitution; Art und Herkunft der für die Substitution eingesetzten Geschlechtshormone (z. B. 17 β -Östradiol oder konjugiertes equines Östrogen; natürliches Progesteron oder synthetisches Medroxyprogesteronazetat); zeitlicher Abstand zwischen Menopause bzw. Ovariectomie und Beginn einer Hormonsubstitution; der Wirkungsunterschied zwischen dem zyklusbedingten physiologischen Geschlechtshormonstatus und dem Status während einer dauerhaften Hormonsubstitution.

In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal angestrebt, in 5 Versuchsgruppen den Einfluss der weiblichen Geschlechtshormone 17 β -Östradiol und/oder Progesteron (nach Substitution bzw. im geschlechtlich intakten weiblichen Tier) auf funktionelle, histomorphologische sowie auf inflammatorische und exzitotoxische neurologische Aspekte nach EKZ und DHCA in der Ratte darzustellen. Es zeigte sich jedoch, dass ohne eine Zykluskontrolle bei den intakten Tieren und ohne eine „Wirkungsblockade“ von endogenem Östrogen z. B. bei den „Plazebo“-Tieren der Einfluss von 17 β -Östradiol auf das postoperative Outcome nicht eindeutig herausgearbeitet werden kann.

5.2.3 Befunde beim Blutbild

Die Ergebnisse des am letzten postoperativen Tag (Tag 4) erstellten kleinen Blutbildes zeigen einen signifikanten Einfluss der Versuchsgruppe auf die Leukozytenzahl („white blood cells“, WBC, Tsd/ μ l) und auf das durchschnittliche Erythrozytenvolumen („mean corpuscular volume, MCV, fl) bei den überlebenden Versuchstieren. Weiterhin zeigen sich bei allen Versuchsgruppen ähnliche Auswirkungen der EKZ auf die Erythrozytenzahl („red blood cells“, RBC, Mio/ μ l), die Hämoglobinkonzentration (HGB, mg/dl), den Hämatokrit (HCT, %) und die Thrombozytenzahl (PLT, Tsd/ μ l). In der Literatur sind hämatologische Referenzwerte für junge und gesunde Sprague-Dawley Ratten, auch im Geschlechtervergleich, vorhanden (BERNARDI et al., 1996; LILLIE et al., 1996). Dabei sind allerdings Abweichungen in Abhängigkeit von der Entnahmestelle festgestellt worden. So können insbesondere die Leukozytenzahlen bei kleinen und peripheren Gefäßen (z. B. retrobulbärer Venenplexus) höher ausfallen als bei zentralen Gefäßen (z. B. Aorta abdominalis) (BERNARDI et al., 1996). Für die vorliegende Studie wurde das Blut zur Erstellung des Blutbildes im Rahmen der Euthanasie (tiefe Isoflurannarkose, Dekapitation und Entbluten) gewonnen. Da es sich bei dem gewonnenen Blut um arteriovenöses Mischblut aus den großen Gefäßen im Halsbereich (Vv. jugulares externae und internae, Aa. carotides externae und internae) handelt, ist eine exakte Zuordnung zu einer Entnahmestelle oder einem Blutgefäß nicht möglich. Es werden deshalb die Referenzwerte für die Entnahme aus der Aorta abdominalis verwendet.

In der Klinik zeigen sich bei Eingriffen mit EKZ deutliche Auswirkungen auf das Blutbild der Patienten. Während des Eingriffes können, größtenteils durch die Hämodilution bedingt eine Anämie mit Abfall von RBC, HGB und HCT (DEFOE et al., 2001), eine starke Reduktion der PLT (RINDER, 2000) sowie ein Abfall der WBC (BUTLER et al., 1993) beobachtet werden. In der vorliegenden Studie ist auch vier Tage nach EKZ und DHCA bei allen 5 Versuchsgruppen eine Reduktion von RBC, HGB und HCT um etwa 30 – 35 % zu verzeichnen. Die Versuchsgruppe „Progesteron“ weist im Vergleich zu den Gruppen „Intakt“ und „Östrogen“ ein signifikant höheres MCV auf. Es sind in der Literatur keine Effekte von weiblichen Geschlechtshormonen auf das Erythrozytenvolumen beschrieben. Da allerdings alle Versuchsgruppen etwas erhöhte MCV-Werte (+ 10–15 %) aufweisen, ist von einem erhöhten Anteil an Retikulozyten im Blut als Ausgleichsreaktion auf die Hämodilution auszugehen mit einem möglicherweise effizienteren und schnelleren Ablauf dieser Reaktion bei der Gruppe „Progesteron“. Eine separate Bestimmung der Retikulozyten wäre notwendig,

um weitere Erkenntnisse zu dem möglichen Zusammenhang von Progesteron und Erythropoese zu erlangen.

Auch die PLT ist bei den Versuchsgruppen im Mittel um mindestens 50 %, also sehr deutlich reduziert. Es sind jedoch bei allen Versuchsgruppen große Standardabweichungen zu verzeichnen. Dies könnte bedeuten, dass auch die Entnahmetechnik kritisch hinterfragt werden muss. Die Blutentnahme bei Tieren, die aufgrund der tiefen Isoflurannarkose kreislaufdepressiv sind, birgt die Gefahr einer vorzeitigen und makroskopisch noch nicht sichtbaren beginnenden Hämostase, wodurch die Messung der Thrombozytentzahl in der Blutprobe beeinflusst sein kann.

Bezogen auf die Referenzwerte in der Literatur weist die Versuchsgruppe „Östrogen“ eine Leukopenie auf. Alle übrigen Gruppen zeigen hingegen eine Leukozytose. In der Klinik ist eine Leukozytose bei Patienten nach operativen Eingriffen mit EKZ keine Seltenheit und spiegelt systemische inflammatorische Prozesse wider (BUTLER et al., 1993). Die Leukopenie der Gruppe „Östrogen“ wirft die Frage auf, ob ihr ein erhöhter Verbrauch oder eine mangelhafte Neubildung von Leukozyten zugrunde liegt. Im Rahmen des systemischen inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS) kann es während und nach EKZ zu einer Aktivierung von Leukozyten, insbesondere von neutrophilen Granulozyten (NG) kommen. Diese NG wandern dabei vermehrt ins Interstitium aus und können zu unterschiedlichen Organpathologien beitragen (MURPHY und ANGELINI, 2004). Gerade in der Gruppe „Östrogen“ hätten wir aber anti-inflammatorische Effekte der 17 β -Östradiol-Substitution mit einer verminderten Migration bzw. einem verminderten Verbrauch von Leukozyten erwartet, wie es auch schon im Tierexperiment bei ovariectomierten Ratten gezeigt werden konnte (XING et al., 2004). Möglich wäre aber auch eine verminderte Neubildung von Leukozyten im Knochenmark durch eine immunsuppressive Wirkung der 17 β -Östradiol-Substitution (JOSEFSSON et al., 1992). In der vorliegenden Studie sind die 17 β -Östradiol-Serumspiegel bei allen 5 Versuchsgruppen überraschenderweise ähnlich hoch, so dass derartige Zusammenhänge eigentlich nicht bestehen können. Die Serum-TNF α -Spiegel und die postoperative Körpertemperatur unterscheiden sich bei den 5 Versuchsgruppen nicht signifikant (s. u.). Dies spricht für ein ähnliches Entzündungsgeschehen in allen 5 Versuchsgruppen. Wir gehen deshalb davon aus, dass der Leukopenie bei der Gruppe „Östrogen“ keine anti-inflammatorischen Prozesse zugrunde liegen, sondern dass eher von einem vermehrten Verbrauch von Leukozyten auszugehen ist.

5.2.4 Befunde zur Serumkonzentration von TNF α

Die Ergebnisse beim ELISA zeigen keinen divergierenden Einfluss der 5 Versuchsgruppen-Behandlungen auf die Serum-TNF α -Konzentration eine Stunde nach EKZ und DHCA. Ebenfalls ohne signifikanten Unterschied sind die Serum-TNF α -Konzentrationen bei den Tieren, die nach EKZ und DHCA 4 Tage lang überlebt haben und bei den Tieren, die vorzeitig, also innerhalb dieser 4 Tage vor dem Ende der Untersuchung getötet werden mussten. Offensichtlich tritt im verwendeten Versuchsmodell nur eine vergleichsweise milde systemische Inflamationsreaktion nach EKZ und 45 min DCHA auf.

Das pro-inflammatorische Zytokin TNF α spielt eine Schlüsselrolle bei der systemischen Inflammation und bei Organschädigungen nach Eingriffen mit EKZ (MURPHY und ANGELINI, 2004). Bei EKZ-Patienten konnten 24 und 48 h nach dem Eingriff noch erhöhte TNF α -Plasmakonzentrationen festgestellt werden. (MATATA et al., 2000). Östrogen in Form von 17 β -Östradiol hat in zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Studien anti-inflammatorisches Potential gezeigt. So konnten z. B. chronisch erhöhte TNF α -Serumspiegel bei ovariectomierten weiblichen Ratten durch Östrogen-Substitution verhindert werden (ARENAS et al., 2005). Da die 17 β -Östradiol-Serumspiegel bei den Versuchsgruppen in der vorliegenden Studie ähnlich hoch sind, ist hier eine unterschiedliche Beeinflussung des TNF α -Serumspiegels ausgehend vom 17 β -Östradiol-Status nicht zu erwarten. Auch substituiertes Progesteron zeigt in unserem Fall keinen signifikanten Einfluss auf die TNF α -Serumspiegel, obwohl für Progesteron z. B. in einem Versuchsmodell zur traumatischen Hirnschädigung bei der Ratte eine verringerte intestinale TNF α -Konzentration nachgewiesen werden konnte (CHEN et al., 2007) Man geht mittlerweile also davon aus, dass auch Progesteron in dieser Hinsicht eine anti-inflammatorische Wirkung ausüben kann. Bei den vorliegenden Ergebnissen fällt auf, dass die Gruppe „P+Ö“ zumindest tendenziell die niedrigsten TNF α -Konzentrationen aufweist. Da bei dieser Versuchsgruppe die signifikant höchsten Progesteron-Serumspiegel vorliegen, ist ein hemmender Einfluss des Progesterons auf die TNF α -Serumkonzentration hier zumindest vorstellbar.

In der vorliegenden Studie wurde die systemische TNF α -Konzentration in Serum analysiert, das 1 Stunde nach Ende der EKZ gewonnen wurde („1 h post EKZ“-Serum). Voruntersuchungen mit dem zum Zeitpunkt der Euthanasie (am 4. postoperativen Tag) gewonnenen Serum „4 d post EKZ“ (nicht veröffentlichte Ergebnisse) ergaben keine messbaren TNF α -Konzentrationen mehr. Für zukünftige Studien denkbar wären an dieser Stelle noch zusätzliche Bestimmungen der TNF α -Konzentration in einem postoperativen

Zeitraum von 48 h nach EKZ und DHCA. Dies hätte allerdings weitere Blutentnahmen und zusätzlichen Stress für die Versuchstiere bedeutet. Da die Hauptzielgröße der Studie die Untersuchung der postoperativen Physiologie war, wurde hier eine unbeeinflusste telemetrische Überwachung als vorrangig erachtet.

5.2.5 Histologische Befunde

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung der entnommenen Gehirne decken sich mit den Ergebnissen zur neurologischen Funktion *in vivo*: In den besonders Ischämieempfindlichen Gehirnarealen Striatum, Kortex und Hippokampus (PULSINELLI et al., 1982) hat die Versuchsgruppe keinen signifikanten Einfluss auf die Hirnmorphologie nach EKZ und 45 min DHCA. Konnten bei der neurologischen Untersuchung nur Daten der Tiere einbezogen werden, die den geplanten Untersuchungszeitraum von 4 Tagen überlebt hatten, so wurden in die histologische Untersuchung auch die vorzeitig euthanasierten Versuchstiere miteinbezogen. Der Aspekt Überleben oder Nicht-Überleben der Versuchstiere hatte allerdings in der vorliegenden Untersuchung keinen erkennbaren Einfluss auf das hirnmorphologische Outcome.

Wie bei der neurologischen Funktion stellt sich auch bei der Hirnmorphologie die Frage, wie die Ergebnisse zu letzterem in der vorliegenden Studie vor dem Hintergrund des aktuellen Forschungsstandes zur neuroprotektiven Wirkung von weiblichen Geschlechtshormonen zu interpretieren sind. Östrogen in Form von 17 β -Östradiol hat in vielen *in vivo*- und *in vitro*-Studien sein neuroprotektives Potential bewiesen: *In vivo* z. B. in Schlaganfall-Modellen bei der Ratte (RUSA et al., 1999; FUKUDA et al., 2000; DUBAL und WISE, 2001) und *in vitro* z. B. mit anti-exzitotoxischen (PAWLAK et al., 2005) oder anti-inflammatorischen Wirkungen (GALEA et al., 2002). Auch durch Progesteron-Behandlung konnte im Versuchsmodell zur fokalen (CHEN et al., 1999) und zur globalen (MORALI et al., 2005) zerebralen Ischämie eine Reduktion des neuronalen Schadens erreicht werden. Das von uns verwendete EKZ-Modell mit 45 min DHCA führte bei weiblichen und männlichen Ratten (jeweils kastriert und intakt) am 14. postoperativen Tag nachweislich zu einem verschlechterten hirnmorphologischen Outcome im Vergleich zu Kontrolltieren (FRIERDICH, 2013; KELLERMANN et al., 2013). Allerdings ist die zerebrale Schädigung in diesem Versuchsmodell sehr mild verglichen mit beispielsweise den fokalen Ischämien, wie sie im Rahmen der Schlaganfall-Forschung induziert werden. Im Gegensatz zu einem klar abgrenzbaren Infarktbereich dort zeigten sich in der vorliegenden Untersuchung oft unregelmäßige und diffusere ischämische zerebrale Schädigungsareale, deren Flächen sich

vergleichsweise schwer erfassen und auf neuroprotektive Östrogen- und/oder Progesteron-Wirkungen überprüfen lassen. Mit einem Punkte-Score wird der Versuch unternommen, in Anbetracht des beobachteten sehr variablen Schädigungsmusters eine möglichst differenzierende Schadensbewertung in den 5 Versuchsgruppen zu ermöglichen. Allerdings bedeutet die Verwendung eines Scores auch immer einen gewissen Informationsverlust. Da sich die 17 β -Östradiol-Serumspiegel der 5 Versuchsgruppen nicht signifikant unterscheiden, ist eine klare und eindeutige Bewertung der Ergebnissituation bei der Hirnmorphologie unter Einbindung des Hormonstatus außerordentlich schwierig. Aufgrund des vergleichsweise hohen 17 β -Östradiol-Serumwertes bei den Gruppen „Plazebo“ und „Progesteron“ ist eine Hormonstatus-spezifische Abgrenzbarkeit deren Gehirnschäden zu den Schäden bei den Östrogen-substituierten und den intakten Tieren nicht möglich. Etwas klarer erscheint der Wirkungsbezug beim Progesteron. Die Versuchsgruppe „P+Ö“ mit dem signifikant höchsten Progesteron-Serumspiegel aller Versuchsgruppen weist hier kein geringeres Schadens-Ergebnis als die Gruppe „Plazebo“ mit sehr niedrigem Progesteron-Serumspiegel (ca. 1/13 der Serumkonzentration von „P+Ö“) auf. Die 17 β -Östradiol-Serumspiegel dieser beiden Versuchsgruppen sind ähnlich hoch und erlauben deshalb einen direkten Vergleich des Hirnschadens unter Berücksichtigung des Progesteron-Status.

5.2.6 Befunde zum Nachweis von Rezeptor-, Transporter- und Entzündungsproteinen im Gehirngewebe

Mithilfe des Western-Blot-Verfahrens wurde die Expression von spezifischen Rezeptorproteinen sowie von Proteinen des Inflammationsgeschehens und der Exzitotoxizität im Gehirn der Versuchstiere postoperativ erfasst, und zwar unter den besonderen Aspekten der gegebenen, unterschiedlichen Hormonsubstitutionen.

5.2.6.1 Expression von ER α und ER β

Sowohl Östrogenrezeptor α (ER α) als auch Östrogenrezeptor β (ER β) sind im Gehirn für die Vermittlung neuroprotektiver Eigenschaften von 17 β -Östradiol von Bedeutung. Tierexperimentell konnte dies im Fall von ER α bei fokaler zerebraler Ischämie im Gehirn von ovariectomierten Mäusen (DUBAL et al., 2001) und im Fall von ER β bei globaler zerebraler Ischämie im Gehirn von ovariectomierten Ratten (RAVAL et al., 2013) gezeigt werden. Für die vorliegende Studie wurde die Expression von ER α und ER β im Gehirn der Versuchstiere mithilfe des Western-Blot-Verfahrens bestimmt. Im gewählten Bereich des Gehirns von -0,3 bis -3,3 kaudal des Bregma (entsprechend der histologischen Aufarbeitung) finden sich

Versuchsgruppen-bezogene Unterschiede bei der Expression von ER β , aber nicht bei der Expression ER α . Außerdem zeigt sich in der Plazebo-Gruppe ein positiver Zusammenhang zwischen vermehrter ER β -Expression und einem Überleben der Tiere.

Auf Ribonukleinsäure-Ebene konnte in weiblichen Rattengehirnen eine großflächige Verteilung von ER β -messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) nachgewiesen werden. Dabei wurde punktuell eine Häufung, insbesondere in Kortex und Hippokampus, beschrieben (SHUGHRUE et al., 1997). Da die in der vorliegenden Studie untersuchten Gewebeproben vorwiegend Kortex und Hippokampus enthalten, ist es durchaus möglich, dass die Ergebnisse in Bezug auf die ER β -Expression hier aussagekräftiger sind. Möglicherweise ließen sich aus diesem Grund keine gruppenspezifischen Unterschiede bei der ER α -Expression nachweisen. Dass Hormonstatus und Östradiol-Substitution einen Einfluss auf die Expression von Östrogenrezeptoren haben, ist inzwischen mehrfach gezeigt worden. So kann ein Östrogen-Entzug z. B. durch Ovariectomie zu einer erhöhten Expression von Östrogenrezeptoren im Gehirn führen, während eine Östradiol-Substitution diesen Effekt wieder umkehrt. Dies konnte sowohl für ER α -mRNA (MOHAMED und ABDEL-RAHMAN, 2000) als auch für ER β -mRNA (SHIMA et al., 2003) im Gehirn weiblicher Ratten gezeigt werden. *In vitro*-Studien beobachteten Gegenteiliges: In Hippokampus-Zellkulturen der Ratte wurde eine Hochregulation von ER α und ER β durch 17 β -Östradiol-Einfluss festgestellt (AGUIRRE et al., 2010). Bei kortikalen neuronalen Zellkulturen menschlicher Embryos erhöhte eine Behandlung mit 17 β -Östradiol ebenfalls die ER β -Expression (FRIED et al., 2004).

In der hier vorliegenden Studie zeigen sich lediglich bei den Tieren, die vorzeitig euthanasiert werden mussten, signifikante Gruppenunterschiede in der ER β -Expression. Dabei weist die Versuchsgruppe „Plazebo“ eine geringere ER β -Expression auf als die Gruppen „Intakt“ und „P+Ö“. Es bleibt zu fragen, wieso es lediglich bei den vorzeitig euthanasierten Tieren Gruppenunterschiede gibt. Die mittleren 17 β -Östradiol-Serumspiegel der 5 Versuchsgruppen unterscheiden sich bei keinem der durchgeführten Gruppenvergleiche signifikant. Dennoch zeigt sich innerhalb der Versuchsgruppe „Plazebo“ ein Unterschied zwischen den Tieren, die vorzeitig euthanasiert werden mussten und denen die überlebten: Die Gruppierung „Plazebo euthanasiert“ zeigt eine deutlich geringere Expression von ER β als die Gruppierung „Plazebo überlebend“. Möglicherweise hat eine verminderte Expression von ER β bei den euthanasierten Tieren der Gruppe „Plazebo“ zu einer verminderten neuroprotektiven Wirkung von 17 β -Östradiol geführt. Die Ergebnisse der Hirnmorphologie zeigen diesbezüglich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den 5 Versuchsgruppen und auch nicht

zwischen den überlebenden und den euthanasierten Tieren innerhalb einer Versuchsgruppe. Denkbar wäre, dass bei den vor dem postoperativen Tag 4 euthanasierten Versuchstieren ischämische Schädigungsprozesse auf molekularer Ebene abgelaufen sind, die in dem relativ kurzen Zeitraum nach der Schädigung noch zu keinen nachweisbaren Veränderungen in der Hirnmorphologie geführt haben.

Die Tiere der Gruppe „P+Ö“, die vorzeitig euthanasiert werden mussten, zeigen eine tendenziell geringere ERβ-Expression als die vorzeitig euthanasierten Tiere der Gruppe „Intakt“. Die Gruppe „P+Ö“ weist im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen im Mittel aller Tiere hohe Progesteron-Serumspiegel auf. Progesteron kann *in vitro* eine verminderte ERβ-Expression bewirken. Dies konnte in Hippokampus-Zellkulturen der Ratte gezeigt werden (AGUIRRE et al., 2010).

5.2.6.2 Zur Exzitotoxizität: Expression von EAAT1 und GLT-1b

Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST oder auch „Excitatory-amino-acid-transporter 1“, EAAT1) und Glutamat-Transporter 1 (GLT-1 oder auch EAAT2) spielen eine entscheidende Rolle bei der Prävention von Exzitotoxizität im Gehirn, z. B. bei zerebralen Ischämien (ROTHSTEIN et al., 1996; ROSSI et al., 2000). Überwiegend in der Zellmembran von Astrozyten lokalisiert, entfernen diese Transporter potentiell neurotoxisches Glutamat aus dem Extrazellulärraum (GEGELASHVILI und SCHOUSBOE, 1997). Dabei existieren von GLT-1 mehrere Spleißvarianten, darunter GLT-1b. Die Variante GLT-1b, die GLT-1 in ihrer Funktion des Glutamat-Transports sehr ähnlich ist, konnte im Gehirn der Ratte nicht nur in Astrozyten, sondern auch in kortikalen Neuronen nachgewiesen werden (CHEN et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass GLT-1b insbesondere unter neuropathologischen Bedingungen vorrangig im Gehirn exprimiert wird (MARAGAKIS et al., 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen einen Einfluss der Versuchsgruppe auf die Expression von EAAT1 und GLT-1b in den untersuchten Gehirnbereichen. Da es sich bei den im Western-Blot-Verfahren untersuchten Gewebeproben immer um ein Zellgemisch handelt, ist mit dieser Methode keine Abgrenzung von astrozytärer und neuronaler Proteinexpression möglich. Um gezielt die astrozytäre GLT-1b-Expression zu bestimmen, müsste z. B. nachfolgend eine immunhistochemische Doppelfärbung durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit war dies nicht geplant und ist demzufolge auch nicht durchgeführt worden. Die Rolle der Astrozyten im inflammatorischen und exzitotoxischen Geschehen beginnt erst allmählich, wissenschaftlich konkret an Bedeutung zu gewinnen.

Es ist mittlerweile bekannt, dass weibliche Geschlechtshormone – insbesondere 17 β -Östradiol – einen Einfluss auf die extrazelluläre Glutamatkonzentration und auf die Expression von Glutamattransportern im Gehirn haben. Im Zyklusverlauf von gesunden Frauen konnte gezeigt werden, dass die Glutamatkonzentration im Blut mit steigendem Östradiol- und/oder Progesteronspiegel absinkt (ZLOTNIK et al., 2011). Eine 17 β -Östradiol-induzierte Hochregulation der Glutamat-Transporter-Expression im Gehirn konnte in *in vitro*-Studien für EAAT1 und GLT-1 in Astrozytenkulturen der Maus (PAWLAK et al., 2005) und kortikalen Astrozytenkulturen von Alzheimer-Patienten (LIANG et al., 2002) nachgewiesen werden. Effekte von Progesteron auf die Expression von EAAT1 und GLT-1 sind bisher nicht untersucht. Allerdings wirkt Progesteron eindeutig synergistisch bei der anti-exzitotoxischen Wirkung von 17 β -Östradiol in hippokampalen Neuronenkulturen der Ratte (NILSEN und BRINTON, 2002).

In der vorliegenden Studie zeigen die Tiere Versuchsgruppe „Plazebo“, welche die 4 Tage nach EKZ mit DCHA wie geplant überlebt haben, eine niedrigere EAAT1-Expression als die überlebenden Tiere der Gruppe „P+Ö“. Da sich die 17 β -Östradiol-Spiegel zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant unterscheiden, kann dieser Unterschied in der EAAT1-Expression nicht alleine auf die Wirkung von 17 β -Östradiol zurückgeführt werden. Möglich wäre, dass der im Vergleich zur Versuchsgruppe „P+Ö“ sehr niedrige Progesteron-Serumspiegel bei der Versuchsgruppe „Plazebo“ – korrespondierend zu den Ergebnissen von NILSEN und BRINTON (2002) (s. o.) – zu diesem Ergebnis beigetragen hat.

Vergleicht man die euthanasierten mit den überlebenden Tieren in den 5 Versuchsgruppen, so fällt auf, dass innerhalb der Gruppe „P+Ö“ signifikante Unterschiede bei der Expression von EAAT1 bestehen: Die vorzeitig euthanasierten Tiere dieser Gruppe exprimieren signifikant weniger zerebrales EAAT1; Außerdem ist ihre EAAT1-Expression im Gehirn im Vergleich zu den euthanasierten Tieren der Gruppen „Plazebo“, „Progesteron“ und „Östrogen“ signifikant niedriger. Obwohl sich das hirnmorphologische Outcome bei den überlebenden und euthanasierten „P+Ö“-Tieren nicht signifikant unterscheidet, scheinen sich doch bei der Exzitotoxizität, also auf molekularer Ebene, Unterschiede aufzutun. Da die Rolle der zerebralen Inflammation als *prima causa* neurologischer Defizite ohnehin sehr kritisch diskutiert wird (NUSSMEIER und SEARLES, 2010), kann man dieses Ergebnis als weiteren möglichen Hinweis auf die „Nebenschauplatz-Bedeutung“ der Inflammation im Zusammenhang mit der neurologischen Funktion nach EKZ mit DHCA werten. Es ist derzeit nicht klar, welche Mechanismen hinter diesem Unterschied bei der Exzitotoxizität zwischen

überlebenden und euthanasierten Tieren stehen. Denkbar wäre, dass bei den zu euthanasierenden Versuchstieren auf molekularer Ebene im Gehirn Prozesse aktiv geworden sind, die eine geschlechtshormonabhängige Minderung der Exzitotoxizität negativ beeinflussen, also diese gewissermaßen „aushebeln“.

GLT-1b wird in der Gruppe „Östrogen“ im Vergleich zu den Gruppen „Intakt“, „Plazebo“ und „P+Ö“ signifikant weniger exprimiert. Aufgrund der weitgehend identischen 17β -Östradiol-Serumspiegel bei den Tieren der 5 Versuchsgruppen hätten wir nach den Erkenntnissen aus der Literatur (LIANG et al., 2002; PAWLAK et al., 2005) (s. o.) eine in allen Gruppen ähnliche Expression von GLT-1b erwartet. Eine Erklärung wäre, dass die Expression der Spleißvariante GLT-1b nicht derartig von 17β -Östradiol beeinflusst wird, wie dies von LIANG et al. (2002) und PAWLAK et al. (2005) für GLT-1 nachgewiesen wurde. Möglich wäre auch, dass ein unterschiedlicher Astrozyten-Anteil im untersuchten Probenmaterial der 5 Versuchsgruppen zu dem abweichenden Ergebnis geführt hat.

5.2.6.3 Zur zerebralen Inflammation: Expression von CXCR2, IL-8 und iNOS

Der Vorgang der Inflammation mit der Expression inflammatorischer Mediatoren und der Migration von Leukozyten aus dem Blutgefäßsystem scheinen bei der Pathophysiologie zerebraler Ischämien eine wichtige Rolle zu spielen. Diese Prozesse können nach dem zerebralen Insult mehrere Tage anhalten und zu einer Verschlechterung des endgültigen neurologischen Outcomes führen (IADECOLA und ALEXANDER, 2001). Das von uns verwendete Versuchsmodell der EKZ mit 45 min DHCA an Ratten führt nachweislich zu Ischämie-bedingten Inflamationsprozessen im Gehirn (JUNGWIRTH et al., 2006; JUNGWIRTH et al., 2009). Interleukin-8 (IL-8) und sein zugehöriger Rezeptor CXCR2 werden von bzw. auf Leukozyten exprimiert und führen insbesondere in der Frühphase nach zerebraler Ischämie und Reperfusion im geschädigten Bereich zu einer Akkumulation von Leukozyten, insbesondere neutrophilen Granulozyten (NG). Dass CXCR2 eine gewisse Rolle im zerebralen Inflamationsgeschehen spielt, konnten GARAU et al. (2006) zeigen: Die pharmakologische Inhibition von CXCR2 führte nach fokaler zerebraler Ischämie bei der Ratte zu einer verminderten Infarktgröße und zu einer geringeren neurologischen Funktionsbeeinträchtigung (GARAU et al., 2006). Ovariectomie und 17β -Östradiol-Substitution nehmen einen Einfluss auf die Expression von CXCR2. Dies konnte im Tierexperiment an weiblichen Ratten gezeigt werden. Ovariectomie führte hier zu einer erhöhten CXCR2-Expression auf zirkulierenden Monozyten im Vergleich zu denen von intakten Tieren. Eine 17β -Östradiol-Substitution bei den ovariectomierten

Tieren konnte diese gesteigerte Rezeptor-Expression verhindern (LEI et al., 2003). Auch die Expression von IL-8 in mit Lipopolysaccharid-stimulierten humanen Monozytenkulturen konnte durch 17 β -Östradiol-Behandlung reduziert werden (PIOLI et al., 2007).

In der vorliegenden Studie zeigen sich keine Versuchsgruppen-spezifischen Unterschiede bei der CXCR2-Expression im untersuchten Bereich des Gehirns der Versuchstiere. Die Versuchsgruppe hat allerdings Einfluss auf die Expression von IL-8 in diesem Bereich. Da insbesondere 17 β -Östradiol bei der Expression von CXCR2 und IL-8 eine Rolle spielt (s. o.), sich aber die 17 β -Östradiol-Serumspiegel der 5 Versuchsgruppen in der vorliegenden Studie nicht signifikant unterscheiden, ist die Ähnlichkeit der CXCR2-Expression in den Versuchsgruppen nicht überraschend. Auch die systemische Inflammation, erkennbar an der TNF α -Serumkonzentration, und die Hirnmorphologie zeigen keine signifikanten Unterschiede bei den 5 Versuchsgruppen. Es kann deshalb auch nicht von einer unterschiedlich starken Leukozytenmigration ins Gehirn ausgegangen werden. Gegensätzlich dazu verhalten sich die Ergebnisse der IL-8 Expression. Es zeigen sich signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von der Behandlung der Versuchsgruppen. Die Versuchsgruppe „Plazebo“ zeigt im Vergleich zu den Gruppen „Intakt“, „Östrogen“ und „Progesteron“ um mehr als die Hälfte verringerte IL-8-Expression; ein Unterschied, der im Fall der Versuchsgruppe „Östrogen“ auch bei den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ bestehen bleibt. Da sich die 17 β -Östradiol-Serumspiegel der Gruppen „Plazebo“, „Intakt“, „Progesteron“ und „Östrogen“ nicht signifikant unterscheiden, kann der Einfluss von 17 β -Östradiol für dieses Ergebnis nicht der ausschlaggebende Faktor sein. Dass sich in Abhängigkeit von der endogenen zyklischen und exogenen permanenten Geschlechtshormonzufuhr bei der IL-8-Expression Unterschiede ergeben könnten, darauf deuten die Ergebnisse bei den Gesamtgruppen „Intakt“ und „P+Ö“ hin. Die Gruppe „Intakt“ mit der Möglichkeit von zyklisch bedingten Geschlechtshormonschwankungen weist eine vergleichsweise hohe Standardabweichung auch bei der gemittelten IL-8-Expression auf. Zudem ist der Mittelwert der Expression von IL-8 bei der Gruppe „Intakt“ höher als bei der Gruppe „P+Ö“, obwohl letztere Gruppe einen ähnlichen, allerdings exogen induzierten 17 β -Östradiol-Serumspiegel aufweist.

Für das Geschehen der postischämischen zerebralen Inflammation ist auch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) von Bedeutung. Dieses Enzym wird lediglich bei pathologischen Zuständen im Gehirn exprimiert und katalysiert dann die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), welches neurotoxisch wirksam werden kann (IADECOLA und ALEXANDER, 2001). Die Expression von iNOS im Gehirn nach zerebraler Ischämie steigt

durch Ovariectomie an und kann durch 17 β -Östradiol-Substitution nach Ovariectomie wieder reduziert werden. Dies konnte tierexperimentell bei Mäusen gezeigt werden (PARK et al., 2006). Auch durch Progesteron-Einfluss konnte *in vitro* eine verminderte iNOS-Expression in mikroglialen Zellkulturen von Ratten nachgewiesen werden (DREW und CHAVIS, 2000).

In der vorliegenden Studie hat die Art der Behandlung der Versuchstiere einen signifikanten Einfluss auf die iNOS-Expression im untersuchten Gehirnbereich der Versuchstiere nach EKZ mit DHCA. So zeigt die Gruppe „Intakt“ eine geringere iNOS-Expression als die Gruppen „Plazebo“ und „P+Ö“. Dieses Ergebnis lässt wiederum vermuten, dass in unserem Versuchsansatz einerseits tatsächlich der gemeinsame Einfluss von 17 β -Östradiol- und Progesteron und andererseits auch der physiologische zyklische Zustände gekommene Geschlechtshormonspiegel eine wichtige Rolle spielt. Die Gruppe „Intakt“ weist zwar keine signifikant höheren 17 β -Östradiol-Serumspiegel, aber sehr wohl signifikant höhere Progesteron-Serumspiegel auf als die Gruppe „Plazebo“. Die iNOS-Expression bei der mit 17 β -Östradiol- und Progesteron-substituierten Gruppe „P+Ö“ fällt um ca. 50 % höher aus als bei der Gruppe „Intakt“ und weist ähnliche Werte wie die Gruppe „Plazebo“ auf. Eine „Schutzfunktion“ gegenüber der erhöhten iNOS-Expression im Gehirn nach EKZ und DHCA am postoperativen Tag 4 weisen offensichtlich lediglich die Versuchstiere mit physiologischem Zyklusgeschehen unter dem gemeinsamen Einfluss von 17 β -Östradiol und Progesteron auf.

Bei keinem der mithilfe des Western-Blot-Verfahrens dargestellten, typischen Proteine für die zerebrale Inflammation hat das Überleben bis zum 4. postoperativen Tag innerhalb der Versuchsgruppen einen Einfluss auf das Ergebnis. Dadurch kann – zumindest die untersuchten Aspekte betreffend – von einem ähnlichen inflammatorischen Prozess im Gehirn von überlebenden und von vorzeitig euthanasierten Versuchstieren ausgegangen werden.

5.3 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Zusammenfassend gesehen untersucht die vorliegende Studie erstmals gezielt den Einfluss von 17 β -Östradiol und Progesteron auf die neurologische Funktion *in vivo*, die Hirnmorphologie und in Teilaspekten auf das zerebrale Inflammations- und Exzitotoxizitätsgeschehen bei überlebenden und euthanasierten weiblichen Ratten im postoperativen Zeitraum von 4 Tagen nach EKZ und 45 min DHCA. Nach spezifischen

Kriterien erfolgte vor Beginn der Auswertungen eine gezielte Auswahl von jeweils 5 überlebenden Tieren und 5 Tieren, die vorzeitig euthanasiert werden mussten, pro Versuchsgruppe (n = 20). Ziel dabei war es, grundlegende Erkenntnisse zur Bedeutung der weiblichen Geschlechtshormone insbesondere für diejenigen zerebralen pathophysiologischen Abläufe nach EKZ und DHCA zu erhalten, die im Zusammenhang mit sehr schlechtem Outcome nach dem Eingriff stehen könnten. Es galt auch, Hinweise auf eine Geschlechtshormon-abhängig unterschiedlich ablaufende Pathophysiologie zu finden, die dann wichtige Ansatzpunkte für weiterführende intensivere tierexperimentelle Studien sein könnten. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit auch geringere Tierzahlen mit einer etwas geringeren statistischen Power in Kauf genommen. Die Limitationen der vorliegenden Studie ergeben sich aus der Zielsetzung: Ein grundlegendes Verständnis zu zerebralen Pathomechanismen in Abhängigkeit vom weiblichen Geschlechtshormonstatus im verwendeten Versuchsmodell der EKZ mit DHCA zu schaffen. Die Situation des Humanpatienten in der Klinik konnte hier tierexperimentell nicht 1:1 abgebildet werden, da junge und gesunde Versuchstiere eingesetzt wurden und kein herzchirurgisches Trauma gesetzt wurde. Es könnte dann in gezielten, weitaus aufwendigeren Studien noch näher auf humanklinische Problemstellungen eingegangen werden z. B. durch den Einsatz von alten Tieren oder mittels Tierversuchsmodellen zu Diabetes, Hypertension und Atherosklerose. Der Verzicht auf die vergleichsweise aufwendige Zyklusbestimmung bei den weiblich intakten Tieren in der vorliegenden Studie erschwerte im Nachhinein die Geschlechtshormon-spezifische Auswertung der Ergebnisse. Diese Vorgehensweise sollte aber in zukünftigen, ähnlich ausgerichteten Studien unbedingt Berücksichtigung finden, da die große Streubreite der Serumhormonkonzentrationen bei den geschlechtlich intakten Tieren (Versuchsgruppe „Intakt“) ebenfalls eine Limitation darstellt. Wichtig für weitere Geschlechtshormonstatus-spezifische Untersuchungen wäre es auch, das Zustandekommen der unerwartet hohen 17 β -Östradiol-Serumspiegel bei den kastrierten Tieren der Versuchsgruppe „Plazebo“ vorab zu klären. Die Verfügbarkeit von weiblichen Tieren mit sehr niedrigen Geschlechtshormonspiegeln ist nicht nur als Kontrollgruppe für Geschlechtshormon-substituierte und intakte Tiere wichtig, sondern kann auch grundsätzlich zur Abbildung des humanklinischen postmenopausalen Hormonzustandes notwendig sein. Möglicherweise kann bei zukünftigen Studien mit kastrierten Ratten eine zusätzliche Behandlung dieser Tiere mit selektiven Östrogenrezeptorhemmern dabei helfen, eine Kontrollgruppe explizit ohne Östrogenwirkung zu schaffen.

6 Zusammenfassung

Zum Einfluss von 17 β -Östradiol und Progesteron auf die neurologische Funktion und die Gehirnmorphologie sowie auf molekulare Aspekte der zerebralen Inflammation und Exzitotoxizität vier Tage nach herzchirurgisch typischer extrakorporaler Zirkulation mit 45-minütigem tief hypothermem Kreislaufstillstand im Rattenmodell.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, den Einfluss von 17 β -Östradiol und/oder Progesteron auf die neurologische Funktion *in vivo* sowie auf die neuronale Morphologie und auf molekulare Aspekte der zerebralen Inflammation und Exzitotoxizität *in vitro* im Zeitraum von 4 Tagen nach herzchirurgisch typischer extrakorporaler Zirkulation (EKZ) mit 45 min tief hypothermem Kreislaufstillstand („deep hypothermic circulatory arrest“, DHCA) in einem Versuchsmodell an der Ratte zu untersuchen.

100 weibliche Sprague-Dawley-Ratten wurden in 5 Versuchsgruppen (n = 20) randomisiert: Eine Gruppe wurde scheinkastriert (Gruppe „Intakt“); die 4 weiteren Gruppen wurden kastriert und je nach Gruppenzugehörigkeit mit einem subkutanen Hormonimplantat versehen: Plazebo (Gruppe „Plazebo“), 17 β -Östradiol (Gruppe „Östrogen“), Progesteron (Gruppe „Progesteron“) sowie 17 β -Östradiol- und Progesteron (Gruppe „Progesteron + Östrogen“, „P+Ö“). 4 Wochen nach Kastration/Scheinkastration und gegebenenfalls nach Hormon-/Plazebo-Supplementierung wurden die Tiere mit Isofluran (2,0 – 2,5 Vol% in 40 % O₂) anästhesiert, intubiert, katheterisiert, mithilfe der EKZ über 30 min auf 16 °C rektale Körpertemperatur abgekühlt und der DHCA wurde für einen Zeitraum von 45 min durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere mittels EKZ über 40 min auf 35,5 °C rektale Körpertemperatur wiedererwärmt, die EKZ beendet, die Tiere 1 Stunde nachbeatmet und eine Telemetrie-Transmittersonde intraperitoneal eingesetzt, bevor die Anästhesie beendet, und die Tiere bei Einsetzen der Spontanatmung extubiert wurden. Die postoperative telemetrische Überwachung umfasste Körpertemperatur und Herzfrequenz, letztere gekoppelt mit einem Alarmsystem, um Tiere bei Bedarf (Herzfrequenz < 150 Schläge/min) rechtzeitig euthanasieren zu können. Alle Tiere wurden am präoperativen Tag 1 (Tag –1) neurologisch untersucht sowie an den postoperativen Tagen 1, 2, 3 und 4, sofern sie überlebt haben. Am postoperativen Tag 4 wurden die Tiere in tiefer Isoflurannarkose zur Blut- und Serum-Gewinnung entblutet sowie deren Gehirne entnommen und tiefgefroren (–80 °C). In Hämatoxylin-Eosin (HE-) gefärbten Gehirnschnitten wurde die Anzahl intakter und geschädigter Neurone lichtmikroskopisch in den Bereichen Striatum (Bregma –0,3 mm), Kortex und Hippokampus (Bregma –3,3 mm) ermittelt. Die TNF α -Konzentration im Serum

der Tiere wurde mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay bestimmt. Die zerebrale Expression von Östrogenrezeptor α (ER α), von Östrogenrezeptor β (ER β), von „Excitatory Amino Acid Transporter 1“ (EAAT1), von „Glutamat Transporter 1b“ (GLT-1b), von „CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2“, (CXCR2), von Interleukin-8 (IL-8) und von induzierbarer Stickoxid Synthase (iNOS) erfolgte mit dem Western-Blot-Verfahren. Die durchgeführten Auswertungen erfolgten für eine nach spezifischen Kriterien getroffene Auswahl von jeweils 5 überlebenden Tieren und 5 euthanasierten Tieren pro Versuchsgruppe. Die statistische Datenanalyse wurde mithilfe allgemeiner linearer Modelle mit post-hoc einfaktorieller Varianzanalyse und Bonferroni-t-Tests bzw. Kruskal-Wallis und post-hoc Mann-Whitney U ($p < 0,05$) durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen keine Versuchsgruppen-spezifischen Unterschiede bei den intra- und postoperativen physiologischen Parametern. Die Serumkonzentrationen von TNF α , die Gehirnmorphologie und die neurologische Funktion zeigten sich vom Versuchsansatz unbeeinflusst. Beim Nachweis der Expression von Rezeptor-, Transporter- und Entzündungsproteinen im Gehirngewebe mittels Western-Blot-Verfahren zeigten sich bei einigen Proteinen Versuchsgruppen-spezifische Unterschiede: Die vorzeitig euthanasierten Tiere der Gruppe „Plazebo“ zeigten eine niedrigere Expression von ER β als die überlebenden Tiere dieser Gruppe und als die ebenfalls vorzeitig euthanasierten Gruppen „Östrogen“ und „P+Ö“. Des Weiteren exprimierten die überlebenden Tiere der Gruppe „P+Ö“ signifikant mehr EAAT1 im Gehirn als die vorzeitig euthanasierten Tiere dieser Gruppe und auch als die überlebenden Tiere der „Plazebo“-Gruppe. Zusätzlich zeigte sich, dass physiologische hormonelle Schwankungen im Rahmen des Zyklusgeschehens bei der gemeinsamen Wirkung von 17 β -Östradiol und Progesteron (Gruppe „Intakt“) im Rahmen der postoperativen zerebralen Inflammation sowohl vorteilhaft (reduzierte iNOS-Expression) als auch von Nachteil (erhöhte IL-8-Expression) gegenüber einer Substitution dieser beiden Hormone (Gruppe „P+Ö“) sein können.

Zusammenfassend gesehen bieten aus der Vielzahl der untersuchten Parameter und Faktoren insbesondere die für die zerebrale Inflammation und Exzitotoxizität typischen spezifischen Proteine ausreichend Potential für weiterführende, tierexperimentell ähnlich gestaltete Untersuchungen. Langfristig könnten hier zusätzliche Tierversuchsmodelle wie z. B. Alterung, Diabetes, Atherosklerose und Hypertension eine weitere Annäherung an humanklinische Verhältnisse ermöglichen.

7 Summary

Investigating the influence of 17 β -estradiol and progesterone on neurologic function, brain morphology and on molecular aspects of cerebral inflammation and excitotoxicity four days after heart-surgery-characteristic cardiopulmonary bypass with 45 min of deep hypothermic circulatory arrest in the rat.

Aim of this study was to investigate the influence of 17 β -estradiol and/or progesterone on neurologic function *in vivo*, on neuronal morphology and on molecular aspects of cerebral inflammation and excitotoxicity *in vitro* over a period of 4 days after heart-surgery-characteristic cardiopulmonary bypass (CPB) with 45 min of deep hypothermic circulatory arrest (DHCA) in female rats.

100 female Sprague-Dawley rats were randomized into 5 experimental groups (n = 20): one group was sham-neutered (group “intact”); the other 4 groups were neutered and received hormone implants according to the group attribution: placebo (group “placebo”), 17 β -estradiol (group “estrogen”), progesterone (group “progesterone”) and progesterone plus 17 β -estradiol (group “progesterone + estrogen”, “p+e”). 4 weeks after neutering/sham-neutering and inserting hormonal/placebo implants rats were anesthetized with isoflurane (2.0–2.5 Vol% in 40 % O₂), intubated, surgically cannulated, connected to CPB, and cooled down to a rectal temperature of 16–18 °C within 30 min before DHCA was performed for 45 min. Then rats were rewarmed to a rectal temperature of 35.5 °C over 40 min utilizing CPB. CPB was then terminated. Rats remained anesthetized and a telemetry transmitter was implanted intraperitoneally. 1 hour after CPB, anesthesia was terminated and animals extubated once they resumed spontaneous breathing. The postoperative telemetric supervision of body core temperature and heart rate was connected to an alarm system that allowed timely euthanasia if necessary (heart rate < 150 beats/min). All animals were tested for neurologic function on preoperative day 1 and on postoperative days 1, 2, 3 and 4. On postoperative day 4 rats were anesthetized using isoflurane, decapitated, blood and blood serum was taken and brains were removed, snap frozen on dry ice and kept at –80 °C for further analyses. The number of intact and damaged neurons was counted in Striatum (Bregma –0.3 mm), Cortex and Hippocampus (Bregma –3.3 mm) using Hematoxylin-Eosin stained cryosections and a light microscope. The TNF α concentration in blood serum was determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Cerebral expression of Estrogen receptor α (ER α), of Estrogen receptor β (ER β), of Excitatory Amino Acid Transporter 1 (EAAT1), of Glutamate Transporter 1b (GLT-1b), of CXC-motif-chemokine Receptor 2 (CXCR2), of Interleukin 8 (IL-8) and of inducible Nitric

Oxide Synthase (iNOS) was assessed by Western Blotting. Analyses per experimental group were performed for a specific selection of 5 surviving animals and 5 animals euthanized ahead of schedul. Data were statistically analyzed using general linear models with post hoc one way analysis of variance and Bonferroni t-tests and further Kruskal-Wallis and post hoc Mann-Whitney U ($p < 0.05$).

Intra- and postoperative physiological parameters show no group-specific differences. $\text{TNF}\alpha$ blood serum concentrations, brain morphology and neurologic function were not influenced by the experimental design. There were some group-specific differences after analyzing receptors, transporters and inflammatory proteins by Western Blotting: Within the group “placebo” euthanized animals expressed significantly less $\text{ER}\beta$ compared to surviving animals of this group and compared to euthanized animals of the groups “estrogen” and “p+e”. Furthermore within the group “p+e”, surviving animals expressed significantly more EAAT1 compared to euthanized animals and compared to surviving animals of the “placebo” group. When expressed in the context of a physiological estrous cycle, 17β -estradiol in combination with progesterone (group “intact”) showed positive (less iNOS expression) as well as negative (higher IL-8 expression) effects on cerebral inflammation compared to substitution of both sex hormones (group “p+e”).

In summary this study identifies cerebral inflammation and excitotoxicity at protein level as promising targets for subsequent investigations with similar experimental design. Combining this rat model of CBP/DHCA with additional pathologies such as aging, diabetes, atherosclerosis and hypertension for example will certainly improve clinical relevance for future studies.

8 Literaturverzeichnis

- ABRAMOV A.Y., SCORZIELLO A. & DUCHEN M.R. *Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. J Neurosci* 2007; 27: 1129-38
- AGUIRRE C., JAYARAMAN A., PIKE C., BAUDRY M. *Progesterone inhibits estrogen-mediated neuroprotection against excitotoxicity by down-regulating estrogen receptor-beta. J Neurochem* 2010; 115: 1277-87
- AKTAS O., ULLRICH O., INFANTE-DUARTE C., NITSCH R., ZIPP F. *Neuronal damage in brain inflammation. Arch Neurol* 2007; 64: 185-9
- ALDEA G.S., GAUDIANI J.M., SHAPIRA O.M., JACOBS A.K., WEINBERG J., CUPPLES A.L., LAZAR H.L., SHEMIN R.J. *Effect of gender on postoperative outcomes and hospital stays after coronary artery bypass grafting. Ann Thorac Surg* 1999; 67: 1097-103
- ALKAYED N.J., HARUKUNI I., KIMES A.S., LONDON E.D., TRAYSTMAN R.J., HURN P.D. *Gender-linked brain injury in experimental stroke. Stroke* 1998; 29: 159-65; discussion 166
- ANDREASEN N.C., FLAUM M., SWAYZE V., 2ND, O'LEARY D.S., ALLIGER R., COHEN G., EHRHARDT J., YUH W.T. *Intelligence and brain structure in normal individuals. Am J Psychiatry* 1993; 150: 130-4
- ARDEKANI B.A., FIGARSKY K. & SIDTIS J.J. *Sexual Dimorphism in the Human Corpus Callosum: An MRI Study Using the OASIS Brain Database. Cereb Cortex* 2012; 10: 2514-20
- ARENAS I.A., ARMSTRONG S.J., XU Y., DAVIDGE S.T. *Chronic tumor necrosis factor-alpha inhibition enhances NO modulation of vascular function in estrogen-deficient rats. Hypertension* 2005; 46: 76-81
- ARONICA S.M., KRAUS W.L. & KATZENELLENBOGEN B.S. *Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994; 91: 8517-8521
- ASTRUP J., SIESJO B.K. & SYMON L. *Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. Stroke* 1981; 12: 723-5
- ATHANASIOU T., AL-RUZZEH S., DEL STANBRIDGE R., CASULA R.P., GLENVILLE B.E., AMRANI M. *Is the female gender an independent predictor of adverse outcome after off-pump coronary artery bypass grafting? Ann Thorac Surg* 2003; 75: 1153-60
- ATTELLA M.J., NATTINVILLE A. & STEIN D.G. *Hormonal state affects recovery from frontal cortex lesions in adult female rats. Behav Neural Biol* 1987; 48: 352-67
- BAENA R.C., BUSTO R., DIETRICH W.D., GLOBUS M.Y., GINSBERG M.D. *Hyperthermia delayed by 24 hours aggravates neuronal damage in rat hippocampus following global ischemia. Neurology* 1997; 48: 768-73
- BARTA E., KUZELA L., TORDOVA E., HORECKY J., BABUSIKOVA F. *The blood volume and the renin-angiotensin-aldosterone system following open-heart surgery. Resuscitation* 1980; 8: 137-46
- BAULIEU E.E., ROBEL P. & SCHUMACHER M. *Neurosteroids: beginning of the story. Int Rev Neurobiol* 2001; 46: 1-32

- BAUMGARTNER W. (Hrsg.), *Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere*, Parey bei Medizinverlage Stuttgart (MVS), Stuttgart 2009; 284-312
- BERG J.M., TYMOCZKO J.L. & STRYER L. *Biochemistry: International Edition*, Palgrave Macmillan, New York 2011, 7. Auflage; 807-813
- BERNARDI C., MONETAL D., BRUGHERA M., SALVO M., LAMPARELLI D., MAZUÉ G., IATROPOULOS M.J. *Haematology and clinical chemistry in rats: Comparison of different blood collection sites. Comparative Haematology International* 1996; 6: 160-166
- BHARDWAJ A., ALKAYED N.J., KIRSCH J.R., HURN P.D. *Mechanisms of ischemic brain damage. Curr Cardiol Rep* 2003; 5: 160-7
- BIBER K., NEUMANN H., INOUE K., BODDEKE H.W. *Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. Trends Neurosci* 2007; 30: 596-602
- BIGELOW W.G., LINDSAY W.K. & GREENWOOD W.F. *Hypothermia; its possible role in cardiac surgery: an investigation of factors governing survival in dogs at low body temperatures. Ann Surg* 1950; 132: 849-66
- BISHOP K.M. & WAHLSTEN D. *Sex differences in the human corpus callosum: myth or reality? Neurosci Biobehav Rev* 1997; 21: 581-601
- BLAND R. *Steroid hormone receptor expression and action in bone. Clin Sci (Lond)* 2000; 98: 217-40
- BLANKSTEIN R., WARD R.P., ARNSDORF M., JONES B., LOU Y.-B., PINE M. *Female Gender Is an Independent Predictor of Operative Mortality After Coronary Artery Bypass Graft Surgery: Contemporary Analysis of 31 Midwestern Hospitals. Circulation* 2005; 112: I-323-I-327
- BLAUSTEIN J.D. *Progesterone and progestin receptors in the brain: the neglected ones. Endocrinology* 2008; 149: 2737-8
- BOKESCH P.M., MARCHAND J., SEIRAFI P.A., DEISS J.M., WARNER K.G., BRONSON R.T., KREAM R.M. *Immediate-early gene expression in ovine brain after cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest. Anesthesiology* 1996; 85: 1439-46
- BONE R.C., BALK R.A., CERRA F.B., DELLINGER R.P., FEIN A.M., KNAUS W.A., SCHEIN R.M., SIBBALD W.J. *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest* 1992; 101: 1644-55
- BOULANGER L.M. & SHATZ C.J. *Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 521-531
- BOVERIS A. & CHANCE B. *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J* 1973; 134: 707-16
- BRAMBILLA R., BRACCHI-RICARD V., HU W.H., FRYDEL B., BRAMWELL A., KARMALLY S., GREEN E.J., BETHEA J.R. *Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. J Exp Med* 2005; 202: 145-56

- BRAMBILLA R., PERSAUD T., HU X., KARMALLY S., SHESTOPALOV V.I., DVORANTCHIKOVA G., IVANOV D., NATHANSON L., BARNUM S.R., BETHEA J.R. *Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation. J Immunol* 2009; 182: 2628-40
- BRANDRUP-WOGENSEN G., BERGGREN H., HARTFORD M., HJALMARSON A., KARLSSON T., HERLITZ J. *Female sex is associated with increased mortality and morbidity early, but not late, after coronary artery bypass grafting. Eur Heart J* 1996; 17: 1426-31
- BRANN D., RAZ L., WANG R., VADLAMUDI R., ZHANG Q. *Oestrogen signalling and neuroprotection in cerebral ischaemia. J Neuroendocrinol* 2012; 24: 34-47
- BRANN D.W., DHANDAPANI K., WAKADE C., MAHESH V.B., KHAN M.M. *Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: Basic mechanisms and clinical implications. Steroids* 2007; 72: 381-405
- BRASS L.M. *Hormone Replacement Therapy and Stroke: Clinical Trials Review. Stroke* 2004; 35: 2644-2647
- BRINTON R.D., THOMPSON R.F., FOY M.R., BAUDRY M., WANG J., FINCH C.E., MORGAN T.E., PIKE C.J., MACK W.J., STANCZYK F.Z., NILSEN J. *Progesterone receptors: form and function in brain. Front Neuroendocrinol* 2008; 29: 313-39
- BROWN G.C. & NEHER J.J. *Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. Mol Neurobiol* 2010; 41: 242-7
- BROWN P.P., MACK M.J., SIMON A.W., BATTAGLIA S., TARKINGTON L., HORNER S., CULLER S.D., BECKER E.R. *Outcomes experience with off-pump coronary artery bypass surgery in women. Ann Thorac Surg* 2002; 74: 2113-9; discussion 2120
- BURCH M., LUM L., ELLIOTT M., CARTER N., SLATER D., SMITH A., ATIONU A. *Influence of cardiopulmonary bypass on water balance hormones in children. Br Heart J* 1992; 68: 309-12
- BUSHNELL C.D., HURN P., COLTON C., MILLER V.M., DEL ZOPPO G., ELKIND M.S., STERN B., HERRINGTON D., FORD-LYNCH G., GORELICK P., JAMES A., BROWN C.M., CHOI E., BRAY P., NEWBY L.K., GOLDSTEIN L.B., SIMPKINS J. *Advancing the study of stroke in women: summary and recommendations for future research from an NINDS-Sponsored Multidisciplinary Working Group. Stroke* 2006; 37: 2387-99
- BUTLER J., ROCKER G.M. & WESTABY S. *Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg* 1993; 55: 552-9
- CAHILL L. *Why sex matters for neuroscience. Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 477-84
- CAI W., ZHU Y., FURUYA K., LI Z., SOKABE M., CHEN L. *Two different molecular mechanisms underlying progesterone neuroprotection against ischemic brain damage. Neuropharmacology* 2008; 55: 127-38
- CARANDANG R., SESHADRI S., BEISER A., KELLY-HAYES M., KASE C.S., KANNEL W.B., WOLF P.A. *Trends in incidence, lifetime risk, severity, and 30-day mortality of stroke over the past 50 years. Jama* 2006; 296: 2939-46
- CHAN P.H. *Role of oxidants in ischemic brain damage. Stroke* 1996; 27: 1124-9

- CHAN P.H. *Reactive Oxygen Radicals in Signaling and Damage in the Ischemic Brain. J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 2-14
- CHASSOT P.G., VAN DER LINDEN P., ZAUGG M., MUELLER X.M., SPAHN D.R. *Off-pump coronary artery bypass surgery: physiology and anaesthetic management†. British Journal of Anaesthesia* 2004; 92: 400-413
- CHEN G., SHI J., DING Y., YIN H., HANG C. *Progesterone prevents traumatic brain injury-induced intestinal nuclear factor kappa B activation and proinflammatory cytokines expression in male rats. Mediators Inflamm* 2007; 2007: 93431
- CHEN H., CHOPP M. & WELCH K.M. *Effect of mild hyperthermia on the ischemic infarct volume after middle cerebral artery occlusion in the rat. Neurology* 1991; 41: 1133-5
- CHEN H., YOSHIOKA H., KIM G.S., JUNG J.E., OKAMI N., SAKATA H., MAIER C.M., NARASIMHAN P., GOEDERS C.E., CHAN P.H. *Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage: Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection. Antioxidants & Redox Signaling* 2011; 14: 1505-1517
- CHEN J., ADACHI N., LIU K., ARAI T. *The effects of 17 β -estradiol on ischemia-induced neuronal damage in the gerbil hippocampus. Neuroscience* 1998; 87: 817-822
- CHEN J., CHOPP M. & LI Y. *Neuroprotective effects of progesterone after transient middle cerebral artery occlusion in rat. J Neurol Sci* 1999; 171: 24-30
- CHEN W., AOKI C., MAHADOMRONGKUL V., GRUBER C.E., WANG G.J., BLITZBLAU R., IRWIN N., ROSENBERG P.A. *Expression of a variant form of the glutamate transporter GLT1 in neuronal cultures and in neurons and astrocytes in the rat brain. J Neurosci* 2002; 22: 2142-52
- CHOPP M., FRINAK S., WALTON D.R., SMITH M.B., WELCH K.M. *Intracellular acidosis during and after cerebral ischemia: in vivo nuclear magnetic resonance study of hyperglycemia in cats. Stroke* 1987; 18: 919-23
- CHRISTAKIS G.T., WEISEL R.D., BUTH K.J., FREMES S.E., RAO V., PANAGIOTOPOULOS K.P., IVANOV J., GOLDMAN B.S., DAVID T.E. *Is body size the cause for poor outcomes of coronary artery bypass operations in women? The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1995; 110: 1344-1358
- CLARK J.A., BAR-YOSEF S., ANDERSON A., NEWMAN M.F., LANDOLFO K., GROCOTT H.P. *Postoperative hyperthermia following off-pump versus on-pump coronary artery bypass surgery. J Cardiothorac Vasc Anesth* 2005; 19: 426-9
- COLOM R., JUAN-ESPINOSA M., ABAD F., GARCA L.F. *Negligible Sex Differences in General Intelligence. Intelligence* 2000; 28: 57-68
- COMBS D.J. & D'ALECY L.G. *Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butanediol. Stroke* 1987; 18: 503-11
- CONOLLY S., ARROWSMITH J.E. & KLEIN A.A. *Deep hypothermic circulatory arrest. Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 2010; 10: 138-142
- COOK D.J., ORSZULAK T.A., DALY R.C., BUDA D.A. *Cerebral hyperthermia during cardiopulmonary bypass in adults. J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 111: 268-9
- COOKE B.M., TABIBNIA G. & BREEDLOVE S.M. *A brain sexual dimorphism controlled by adult circulating androgens. Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7538-40

- COSGROVE K.P., MAZURE C.M. & STALEY J.K. *Evolving Knowledge of Sex Differences in Brain Structure, Function, and Chemistry. Biological psychiatry* 2007; 62: 847-855
- COSMI S., PAWLYK A.C., ALFINITO P.D., ROMAN J., ZHOU T., DEECHER D.C. *Simultaneous telemetric monitoring of tail-skin and core body temperature in a rat model of thermoregulatory dysfunction. J Neurosci Methods* 2009; 178: 270-5
- COUSE J.F., LINDZEY J., GRANDIEN K., GUSTAFSSON J.A., KORACH K.S. *Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. Endocrinology* 1997; 138: 4613-21
- DAVIDSON J.M. *Activation of the male rat's sexual behavior by intracerebral implantation of androgen. Endocrinology* 1966; 79: 783-94
- DEFOE G.R., KRUMHOLZ C.F., DIODATO C.P., ROSS C.S., OLMSTEAD E.M., GROOM R.C., PIERONI J.W., FOREST R.J., O'CONNOR B.R., BOGOSIAN M.E., WARREN C.S., O'CONNOR G.T. *Lowest core body temperature and adverse outcomes associated with coronary artery bypass surgery. Perfusion* 2003; 18: 127-33
- DEFOE G.R., ROSS C.S., OLMSTEAD E.M., SURGENOR S.D., FILLINGER M.P., GROOM R.C., FOREST R.J., PIERONI J.W., WARREN C.S., BOGOSIAN M.E., KRUMHOLZ C.F., CLARK C., CLOUGH R.A., WELDNER P.W., LAHEY S.J., LEAVITT B.J., MARRIN C.A., CHARLESWORTH D.C., MARSHALL P., O'CONNOR G.T. *Lowest hematocrit on bypass and adverse outcomes associated with coronary artery bypass grafting. Northern New England Cardiovascular Disease Study Group. Ann Thorac Surg* 2001; 71: 769-76
- DEGRABA T.J., OSTROW P., HANSON S., GROTTA J.C. *Motor performance, histologic damage, and calcium influx in rats treated with NBQX after focal ischemia. J Cereb Blood Flow Metab* 1994; 14: 262-8
- DELACOSTE-UTAMSING C. & HOLLOWAY R.L. *Sexual dimorphism in the human corpus callosum. Science* 1982; 216: 1431-2
- DGTHG (2013), *Pressemitteilung vom 15.01.2013 "Herzbericht 2011: Schonende Herzoperationen im Kontext des demographischen Bevölkerungswandels"* [Online], Deutsche Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, erhältlich: http://www.dgthg.de/PM_2013, abgerufen am 04.01.2014
- DILSAVER S.C., OVERSTREET D.H. & PECK J.A. *Measurement of temperature in the rat by rectal probe and telemetry yields compatible results. Pharmacol Biochem Behav* 1992; 42: 549-52
- DIXON C.E., LYETH B.G., POVLISHOCK J.T., FINDLING R.L., HAMM R.J., MARMAROU A., YOUNG H.F., HAYES R.L. *A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. J Neurosurg* 1987; 67: 110-9
- DREW P.D. & CHAVIS J.A. *Female sex steroids: effects upon microglial cell activation. J Neuroimmunol* 2000; 111: 77-85
- DU C., HU R., CSERNANSKY C.A., HSU C.Y., CHOI D.W. *Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 195-201
- DU L., BAYIR H., LAI Y., ZHANG X., KOCHANIEK P.M., WATKINS S.C., GRAHAM S.H., CLARK R.S.B. *Innate Gender-based Proclivity in Response to Cytotoxicity and Programmed Cell Death Pathway. Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 38563-38570

- DUBAL D.B., SHUGHRUE P.J., WILSON M.E., MERCHENTHALER I., WISE P.M. *Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. J Neurosci* 1999; 19: 6385-93
- DUBAL D.B. & WISE P.M. *Neuroprotective effects of estradiol in middle-aged female rats. Endocrinology* 2001; 142: 43-8
- DUBAL D.B., ZHU H., YU J., RAU S.W., SHUGHRUE P.J., MERCHENTHALER I., KINDY M.S., WISE P.M. *Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1952-7
- DUFFIELD J.S. *The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. Clin Sci (Lond)* 2003; 104: 27-38
- DUNGAN K.M., BRAITHWAITE S.S. & PREISER J.C. *Stress hyperglycaemia. Lancet* 2009; 373: 1798-807
- EDWARDS F.H., CAREY J.S., GROVER F.L., BERO J.W., HARTZ R.S. *Impact of gender on coronary bypass operative mortality. Ann Thorac Surg* 1998; 66: 125-131
- EIFERT S., KILIAN E., BEIRAS-FERNANDEZ A., JUCHEM G., REICHART B., LAMM P. *Early and mid term mortality after coronary artery bypass grafting in women depends on the surgical protocol: retrospective analysis of 3441 on- and off-pump coronary artery bypass grafting procedures. Journal of Cardiothoracic Surgery* 2010; 5: 90
- FABRY Z., RAINE C.S. & HART M.N. *Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. Immunology Today* 1994; 15: 218-X
- FALKEBORN M., PERSSON I., TERENT A., ADAMI H.O., LITHELL H., BERGSTROM R. *Hormone replacement therapy and the risk of stroke. Follow-up of a population-based cohort in Sweden. Arch Intern Med* 1993; 153: 1201-9
- FEDER H.H. *Hormones and sexual behavior. Annu Rev Psychol* 1984; 35: 165-200
- FEENEY D.M., GONZALEZ A. & LAW W.A. *Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury. Science* 1982; 217: 855-7
- FEERICK A.E., JOHNSTON W.E., JENKINS L.W., LIN C.Y., MACKAY J.H., PROUGH D.S. *Hyperglycemia during hypothermic canine cardiopulmonary bypass increases cerebral lactate. Anesthesiology* 1995; 82: 512-20
- FINK G. *Oestrogen and progesterone interactions in the control of gonadotrophin and prolactin secretion. Journal of Steroid Biochemistry* 1988; 30: 169-178
- FRIED G., ANDERSSON E., CSOREGH L., ENMARK E., GUSTAFSSON J.A., AANESEN A., OSTERLUND C. *Estrogen receptor beta is expressed in human embryonic brain cells and is regulated by 17beta-estradiol. Eur J Neurosci* 2004; 20: 2345-54
- FRIEDRICH S. *Zum Einfluss von Geschlecht und Geschlechtshormonstatus auf neurologische und neurokognitive Funktionen sowie auf die Gehirnmorphologie 14 Tage nach herzchirurgisch typischer extrakorporaler Zirkulation mit tief hypothermem Kreislaufstillstand im Rattenmodell, Vet Med Diss, München* 2013;
- FUJIMOTO S.T., LONGHI L., SAATMAN K.E., CONTE V., STOCCHETTI N., MCINTOSH T.K. *Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. Neurosci Biobehav Rev* 2004; 28: 365-78

- FUKUDA K., YAO H., IBAYASHI S., NAKAHARA T., UCHIMURA H., FUJISHIMA M., HALL E.D. *Ovariectomy exacerbates and estrogen replacement attenuates photothrombotic focal ischemic brain injury in rats. Stroke* 2000; 31: 155-60
- GALEA E., SANTIZO R., FEINSTEIN D.L., ADAMSOM P., GREENWOOD J., KOENIG H.M., PELLIGRINO D.A. *Estrogen inhibits NF kappa B-dependent inflammation in brain endothelium without interfering with I kappa B degradation. Neuroreport* 2002; 13: 1469-72
- GARAU A., BERTINI R., MOSCA M., BIZZARRI C., ANACARDIO R., TRIULZI S., ALLEGRETTI M., GHEZZI P., VILLA P. *Development of a systemically-active dual CXCR1/CXCR2 allosteric inhibitor and its efficacy in a model of transient cerebral ischemia in the rat. Eur Cytokine Netw* 2006; 17: 35-41
- GARCIA-SEGURA L.M., AZCOITIA I. & DONCARLOS L.L. *Neuroprotection by estradiol. Prog Neurobiol* 2001; 63: 29-60
- GARMAN R.H. *Histology of the central nervous system. Toxicol Pathol* 2011; 39: 22-35
- GEGELASHVILI G. & SCHOUSBOE A. *High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. Mol Pharmacol* 1997; 52: 6-15
- GEGOUT-POTTIE P., PHILIPPE L., SIMONIN M.A., GUINGAMP C., GILLET P., NETTER P., TERLAIN B. *Biotelemetry: an original approach to experimental models of inflammation. Inflamm Res* 1999; 48: 417-24
- GERABEK W.E., HAAGE B.D., KEIL G., WEGNER W. (Hrsg.), *Enzyklopädie Medizingeschichte, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin* 2005; 458
- GERRIETS T., STOLZ E., WALBERER M., KAPS M., BACHMANN G., FISHER M. *Neuroprotective effects of MK-801 in different rat stroke models for permanent middle cerebral artery occlusion: adverse effects of hypothalamic damage and strategies for its avoidance. Stroke* 2003; 34: 2234-9
- GIANGRANDE P.H. & MCDONNELL D.P. *The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. Recent Prog Horm Res* 1999; 54: 291-313; discussion 313-4
- GIBBON J.H., JR. *Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. Minn Med* 1954; 37: 171-85; passim
- GIEDD J., RAZNAHAN A., MILLS K., LENROOT R. *Review: magnetic resonance imaging of male/female differences in human adolescent brain anatomy. Biology of Sex Differences* 2012; 3: 19
- GILLIES G.E. & MCARTHUR S. *Estrogen Actions in the Brain and the Basis for Differential Action in Men and Women: A Case for Sex-Specific Medicines. Pharmacological Reviews* 2010; 62: 155-198
- GINSBERG M.D. & BUSTO R. *Rodent models of cerebral ischemia. Stroke* 1989; 20: 1627-42
- GINSBERG M.D. & BUSTO R. *Combating hyperthermia in acute stroke: a significant clinical concern. Stroke* 1998; 29: 529-34

GO A.S., MOZAFFARIAN D., ROGER V.L., BENJAMIN E.J., BERRY J.D., BORDEN W.B., BRAVATA D.M., DAI S., FORD E.S., FOX C.S., FRANCO S., FULLERTON H.J., GILLESPIE C., HAILPERN S.M., HEIT J.A., HOWARD V.J., HUFFMAN M.D., KISSELA B.M., KITTNER S.J., LACKLAND D.T., LICHTMAN J.H., LISABETH L.D., MAGID D., MARCUS G.M., MARELLI A., MATCHAR D.B., MCGUIRE D.K., MOHLER E.R., MOY C.S., MUSSOLINO M.E., NICHOL G., PAYNTER N.P., SCHREINER P.J., SORLIE P.D., STEIN J., TURAN T.N., VIRANI S.S., WONG N.D., WOO D., TURNER M.B. *Heart Disease and Stroke Statistics—2013 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation* 2013; 127: e6-e245

GOLOMB M.R., FULLERTON H.J., NOWAK-GOTTL U., DEVEBER G. *Male predominance in childhood ischemic stroke: findings from the international pediatric stroke study. Stroke* 2009; 40: 52-7

GRAHAM J.D.& CLARKE C.L. *Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. Endocrine Reviews* 1997; 18: 502-519

GRIGORE A.M., GROCOTT H.P., MATHEW J.P., PHILLIPS-BUTE B., STANLEY T.O., BUTLER A., LANDOLFO K.P., REVES J.G., BLUMENTHAL J.A., NEWMAN M.F. *The rewarming rate and increased peak temperature alter neurocognitive outcome after cardiac surgery. Anesth Analg* 2002; 94: 4-10, table of contents

GROCOTT H.P.,HOMI H.M.& PUSKAS F. *Cognitive dysfunction after cardiac surgery: revisiting etiology. Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2005; 9: 123-9

GROCOTT H.P., MACKENSEN G.B., GRIGORE A.M., MATHEW J., REVES J.G., PHILLIPS-BUTE B., SMITH P.K., NEWMAN M.F. *Postoperative hyperthermia is associated with cognitive dysfunction after coronary artery bypass graft surgery. Stroke* 2002; 33: 537-41

GRUBER C.J., TSCHUGGUEL W., SCHNEEBERGER C., HUBER J.C. *Production and actions of estrogens. N Engl J Med* 2002; 346: 340-52

GRUYS E., TOUSSAINT M.J., NIEWOLD T.A., KOOPMANS S.J. *Acute phase reaction and acute phase proteins. J Zhejiang Univ Sci B* 2005; 6: 1045-56

GUERRA-ARAIZA C.,COYOY-SALGADO A.& CAMACHO-ARROYO I. *Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. Brain Res Bull* 2002; 59: 105-9

GUERRA-ARAIZA C., VILLAMAR-CRUZ O., GONZALEZ-ARENAS A., CHAVIRA R., CAMACHO-ARROYO I. *Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. J Neuroendocrinol* 2003; 15: 984-90

GÜNTÜRKÜN O.& HAUSMANN M. *Funktionelle Hirnorganisation und Geschlecht, In: LAUTENBACHER S, GÜNTÜRKÜN O & HAUSMANN M (Hrsg.) Gehirn und Geschlecht: Neurowissenschaft des kleinen Unterschieds zwischen Frau und Mann, Springer Medizin Verlag, Heidelberg* 2007; 88-100

GUR R.C., TURETSKY B.I., MATSUI M., YAN M., BILKER W., HUGHETT P., GUR R.E. *Sex differences in brain gray and white matter in healthy young adults: correlations with cognitive performance. J Neurosci* 1999; 19: 4065-72

GURU V.,FREMES S.E.& TU J.V. *Time-related mortality for women after coronary artery bypass graft surgery: a population-based study. J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 127: 1158-65

GV-SOLAS Gesellschaft für Versuchstierkunde. *Planung und Struktur von Versuchstierbereichen tierexperimentell tätiger Institutionen*, Verlag GV-Solas, Biberach an der Riß 1988;

HABIB R.H., ZACHARIAS A., SCHWANN T.A., RIORDAN C.J., DURHAM S.J., SHAH A. *Adverse effects of low hematocrit during cardiopulmonary bypass in the adult: should current practice be changed? The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2003; 125: 1438-1450

HACKE W. *Neurologie*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2010, 13. Auflage Auflage; 169-175

HAGBERG H., WILSON M.A., MATSUSHITA H., ZHU C., LANGE M., GUSTAVSSON M., POITRAS M.F., DAWSON T.M., DAWSON V.L., NORTHINGTON F., JOHNSTON M.V. *PARP-1 gene disruption in mice preferentially protects males from perinatal brain injury. Journal of Neurochemistry* 2004; 90: 1068-1075

HALPERN D.F.& LAMAY M.L. *The Smarter Sex: A Critical Review of Sex Differences in Intelligence. Educational Psychology Review* 2000; 12: 229-246

HAMPSON E.& KIMURA D. *Reciprocal effects of hormonal fluctuations on human motor and perceptual-spatial skills. Behav Neurosci* 1988; 102: 456-9

HAN T.M.& DE VRIES G.J. *Organizational effects of testosterone, estradiol, and dihydrotestosterone on vasopressin mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis. J Neurobiol* 2003; 54: 502-10

HANISCH U.K.& KETTENMANN H. *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci* 2007; 10: 1387-94

HARUKUNI I.& BHARDWAJ A. *Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. Neurol Clin* 2006; 24: 1-21

HARUKUNI I., HURN P.D.& CRAIN B.J. *Deleterious effect of beta-estradiol in a rat model of transient forebrain ischemia. Brain Res* 2001; 900: 137-42

HAUSMANN M., SLABBEKOORN D., VAN GOOZEN S.H., COHEN-KETTENIS P.T., GUNTURKUN O. *Sex hormones affect spatial abilities during the menstrual cycle. Behav Neurosci* 2000; 114: 1245-50

HAYDEN M.S., WEST A.P.& GHOSH S. *NF-kappaB and the immune response. Oncogene* 2006; 25: 6758-80

HE J., EVANS C.O., HOFFMAN S.W., OYESIKU N.M., STEIN D.G. *Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. Exp Neurol* 2004; 189: 404-12

HEDBERG M., BOIVIE P.& ENGSTROM K.G. *Early and delayed stroke after coronary surgery - an analysis of risk factors and the impact on short- and long-term survival. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2011; 40: 379-387

HERMANN D.M. *Anatomie und Physiologie des zerebralen Gefäßsystems*, In: HERMANN DM, STEINER T & DIENER HC (Hrsg.) *Vaskuläre Neurologie: Zerebrale Ischämien, Hämorrhagien, Gefäßmissbildungen, Vaskulitiden und vaskuläre Demenz*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2010; 1-13

HERVEY E.& HERVEY G.R. *The effects of progesterone on body weight and composition in the rat. Journal of Endocrinology* 1967; 37: 361-384

HILDEBRAND M.& GOSLOW G.E. *Vergleichende und funktionelle Anatomie der Wirbeltiere*, Springer-Verlag, Berlin und Heidelberg 2004, 5. Auflage; 359-386

HILLIS L.D., SMITH P.K., ANDERSON J.L., BITTL J.A., BRIDGES C.R., BYRNE J.G., CIGARROA J.E., DISESA V.J., HIRATZKA L.F., HUTTER J.A.M., JESSEN M.E., KEELEY E.C., LAHEY S.J., LANGE R.A., LONDON M.J., MACK M.J., PATEL M.R., PUSKAS J.D., SABIK J.F., SELNES O., SHAHIAN D.M., TROST J.C., WINNIFORD M.D. *2011 ACCF/AHA Guideline for Coronary Artery Bypass Graft Surgery: Executive Summary. A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration With the American Association for Thoracic Surgery, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, and Society of Thoracic Surgeons. Journal of the American College of Cardiology* 2011; 58: 2584-2614

HINDMAN B.J., MOORE S.A., CUTKOMP J., SMITH T., ROSS-BARTA S.E., DEXTER F., BRIAN J.E., JR. *Brain expression of inducible cyclooxygenase 2 messenger RNA in rats undergoing cardiopulmonary bypass. Anesthesiology* 2001; 95: 1380-8

HINES M., CHIU L., MCADAMS L.A., BENTLER P.M., LIPCAMON J. *Cognition and the corpus callosum: verbal fluency, visuospatial ability, and language lateralization related to midsagittal surface areas of callosal subregions. Behav Neurosci* 1992; 106: 3-14

HOGUE C.W., FUCETOLA R., HERSHEY T., FREEDLAND K., DAVILA-ROMAN V.G., GOATE A.M., THOMPSON R.E. *Risk factors for neurocognitive dysfunction after cardiac surgery in postmenopausal women. Ann Thorac Surg* 2008; 86: 511-6

HOGUE C.W., JR., BARZILAI B., PIEPER K.S., COOMBS L.P., DELONG E.R., KOUCHOUKOS N.T., DAVILA-ROMAN V.G. *Sex differences in neurological outcomes and mortality after cardiac surgery: a society of thoracic surgery national database report. Circulation* 2001a; 103: 2133-7

HOGUE C.W., JR., FREEDLAND K., HERSHEY T., FUCETOLA R., NASSIEF A., BARZILAI B., THOMAS B., BIRGE S., DIXON D., SCHECHTMAN K.B., DAVILA-ROMAN V.G. *Neurocognitive outcomes are not improved by 17beta-estradiol in postmenopausal women undergoing cardiac surgery. Stroke* 2007; 38: 2048-54

HOGUE C.W., JR., MURPHY S.F., SCHECHTMAN K.B., DAVILA-ROMAN V.G. *Risk factors for early or delayed stroke after cardiac surgery. Circulation* 1999; 100: 642-7

HOGUE C.W., JR., SUNDT T., 3RD, BARZILAI B., SCHECHTMAN K.B., DAVILA-ROMAN V.G. *Cardiac and neurologic complications identify risks for mortality for both men and women undergoing coronary artery bypass graft surgery. Anesthesiology* 2001b; 95: 1074-8

HUANG J., UPADHYAY U.M. & TAMARGO R.J. *Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. Surg Neurol* 2006; 66: 232-45

IADECOLA C. & ALEXANDER M. *Cerebral ischemia and inflammation. Curr Opin Neurol* 2001; 14: 89-94

IADECOLA C., ZHANG F. & XU X. *Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. Am J Physiol* 1995; 268: R286-92

ISAKSSON I.M., THEODORSSON A., THEODORSSON E., STROM J.O. *Methods for 17beta-oestradiol administration to rats. Scand J Clin Lab Invest* 2011; 71: 583-92

JACKSON D.N. & RUSHTON J.P. *Males have greater g: Sex differences in general mental ability from 100,000 17- to 18-year-olds on the Scholastic Assessment Test. Intelligence* 2006; 34: 479-486

- JOSEFSSON E., TARKOWSKI A. & CARLSTEN H. *Anti-inflammatory properties of estrogen. I. In vivo suppression of leukocyte production in bone marrow and redistribution of peripheral blood neutrophils. Cell Immunol* 1992; 142: 67-78
- JOSEPHY P.D., MASON R.P. & ELING T. *Cooxidation of the clinical reagent 3,5,3'5'-tetramethylbenzidine by prostaglandin synthase. Cancer Res* 1982; 42: 2567-70
- JOVER T., TANAKA H., CALDERONE A., OGURO K., BENNETT M.V., ETGEN A.M., ZUKIN R.S. *Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. J Neurosci* 2002; 22: 2115-24
- JUNGWIRTH B., KELLERMANN K., QING M., MACKENSEN G.B., BLOBNER M., KOCHS E.F. *Cerebral tumor necrosis factor alpha expression and long-term neurocognitive performance after cardiopulmonary bypass in rats. J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 138: 1002-7
- JUNGWIRTH B., MACKENSEN G.B., BLOBNER M., NEFF F., REICHART B., KOCHS E.F., NOLLERT G. *Neurologic outcome after cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest in rats: description of a new model. J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 131: 805-12
- KATO J., HIRATA S., NOZAWA A., YAMADA-MOURI N. *Gene expression of progesterone receptor isoforms in the rat brain. Horm Behav* 1994; 28: 454-63
- KATSURA K.-I. *44 - Acidosis as a Complicating Factor in Cerebral Ischemia, Primer on Cerebrovascular Diseases*, Academic Press, San Diego 1997; 159-162
- KELLERMANN K., GORDAN L.M., BLOBNER M., LUPPA P., KOCHS E.F., JUNGWIRTH B. *Functional outcome in female rats after 45 minutes of deep hypothermic circulatory arrest: gender matters. Thorac Cardiovasc Surg* 2013; 61: 052-065
- KELLERMANN K., GORDAN M.L., NOLLERT G., BLOBNER M., KOCHS E.F., JUNGWIRTH B. *Long-term assessment of NFkappaB expression in the brain and neurologic outcome following deep hypothermic circulatory arrest in rats. Perfusion* 2009; 24: 429-36
- KELLERMANN K., KREUZER M., OMEROVICH A., HOETZINGER F., KOCHS E., JUNGWIRTH B. *A mobile phone based alarm system for supervising vital parameters in free moving rats. BMC Research Notes* 2012; 5: 119
- KEMPSKI O. *Pathologische Neurophysiologie*, In: JANTZEN J-PAH & LÖFFLER W (Hrsg.) *Neuroanaesthesie*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2000; 91-104
- KIMURA D. *Sex Differences In The Brain. Scientific American* 1992; 267: 119-125
- KOCH C.G., HIGGINS T.L., CAPDEVILLE M., MARYLAND P., LEVENTHAL M., STARR N.J. *The risk of coronary artery surgery in women: a matched comparison using preoperative severity of illness scoring. J Cardiothorac Vasc Anesth* 1996; 10: 839-43
- KOCH C.G., KHANDWALA F., CYWINSKI J.B., ISHWARAN H., ESTAFANOUS F.G., LOOP F.D., BLACKSTONE E.H. *Health-related quality of life after coronary artery bypass grafting: a gender analysis using the Duke Activity Status Index. J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 128: 284-95
- KOCH C.G., WENG Y.-S., ZHOU S.X., SAVINO J.S., MATHEW J.P., HSU P.H., SAIDMAN L.J., MANGANO D.T. *Prevalence of risk factors, and not gender per se, determines short- and long-term survival after coronary artery bypass surgery. Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 2003; 17: 585-593

KÖNIG H.E., LIEBICH H.-G. & CERVENY C. *Nervensystem (Systema nervosum)*, In: KÖNIG HE & LIEBICH H-G (Hrsg.) *Anatomie der Haussäugetiere*, Schattauer GmbH, Stuttgart 2005; 3. Auflage; 490-514

KRAMER K. & KINTER L.B. *Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals. Physiol Genomics* 2003; 13: 197-205

KREZEL W., DUPONT S., KRUST A., CHAMBON P., CHAPMAN P.F. *Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor beta -deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 12278-82

KUHL H. *Pharmacology of Progestogens. Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie* 2011; 8: 157

KUMAR V., ABBAS A.K., FAUSTO N., ASTER J.C. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*, Saunders/Elsevier, Philadelphia 2009, 8. Auflage; 43-78

KURIEN B.T. & SCOFIELD R.H. *Western blotting. Methods* 2006; 38: 283-293

LAEMMLI U.K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature* 1970; 227: 680-5

LAI A.Y. & TODD K.G. *Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. Can J Physiol Pharmacol* 2006; 84: 49-59

LARSEN R. *Anästhesie und Intensivmedizin in Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 2012; 73-78

LAURITZEN C. *History of Estrogen Research*, In: OETTEL M & SCHILLINGER E (Hrsg.) *Handbook of Experimental Pharmacology: Estrogens and Antiestrogens I*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 1999; 1-14

LAZAR H.L., BOKESCH P.M., VAN LENTA F., FITZGERALD C., EMMETT C., MARSH H.C., JR., RYAN U. *Soluble human complement receptor 1 limits ischemic damage in cardiac surgery patients at high risk requiring cardiopulmonary bypass. Circulation* 2004; 110: II274-9

LAZAR H.L., KEILANI T., FITZGERALD C.A., SHAPIRA O.M., HUNTER C.T., SHEMIN R.J., MARSH H.C., JR., RYAN U.S. *Beneficial effects of complement inhibition with soluble complement receptor 1 (TP10) during cardiac surgery: is there a gender difference? Circulation* 2007; 116: I83-8

LEI Z.B., FU X.J., LU Z.T., WANG B.C., LIU X.L., YOU N.Z. *Effect of estradiol on chemokine receptor CXCR2 expression in rats: implications for atherosclerosis. Acta Pharmacol Sin* 2003; 24: 670-4

LEONARD C.M., TOWLER S., WELCOME S., HALDERMAN L.K., OTTO R., ECKERT M.A., CHIARELLO C. *Size matters: cerebral volume influences sex differences in neuroanatomy. Cereb Cortex* 2008; 18: 2920-31

LEVIN E.R. *Plasma membrane estrogen receptors. Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 477-82

LEVINE S. *Sex differences in the brain. Scientific American* 1966; 214: 84-90

LEWIS F.J. & TAUFIC M. *Closure of atrial septal defects with the aid of hypothermia; experimental accomplishments and the report of one successful case. Surgery* 1953; 33: 52-9

- LIANG Z., VALLA J., SEFIDVASH-HOCKLEY S., ROGERS J., LI R. *Effects of estrogen treatment on glutamate uptake in cultured human astrocytes derived from cortex of Alzheimer's disease patients. J Neurochem* 2002; 80: 807-14
- LIEBREGTS M.T., MCLACHLAN R.S. & LEUNG L.S. *Hyperthermia induces age-dependent changes in rat hippocampal excitability. Ann Neurol* 2002; 52: 318-326
- LILLIE L.E., TEMPLE N.J. & FLORENCE L.Z. *Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: weight gain, hematology and clinical chemistry. Hum Exp Toxicol* 1996; 15: 612-6
- LIM E., DRAIN A., DAVIES W., EDMONDS L., ROSENGARD B.R. *A systematic review of randomized trials comparing revascularization rate and graft patency of off-pump and conventional coronary surgery. J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 132: 1409-13
- LISABETH L.D., BEISER A.S., BROWN D.L., MURABITO J.M., KELLY-HAYES M., WOLF P.A. *Age at natural menopause and risk of ischemic stroke: the Framingham heart study. Stroke* 2009; 40: 1044-9
- LITTLETON-KEARNEY M.T., KLAUS J.A. & HURN P.D. *Effects of combined oral conjugated estrogens and medroxyprogesterone acetate on brain infarction size after experimental stroke in rat. J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 421-6
- LIU M., KELLEY M.H., HERSON P.S., HURN P.D. *Neuroprotection of sex steroids. Minerva Endocrinol* 2010; 35: 127-43
- LOOSE D.S. & STANCEL G.M. *Estrogens and Progestins, In: BRUNTON LL, LAZO JS & PARKER K (Hrsg.) Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill Higher Education, New York 2005; 11. Auflage; 1541-1571
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem* 1951; 193: 265-75
- LU J.K. & JUDD H.L. *Silastic implants of progesterone produce high circulating levels of both progesterone and 20 alpha-hydroxyprogesterone in ovariectomized, adrenalectomized rats. Biol Reprod* 1982; 26: 385-90
- LUDERS E., GASER C., NARR K.L., TOGA A.W. *Why sex matters: brain size independent differences in gray matter distributions between men and women. J Neurosci* 2009; 29: 14265-70
- LYNN R. *Sex differences in intelligence and brain size: A paradox resolved. Personality and Individual Differences* 1994; 17: 257-271
- MACK M.J., BROWN P., HOUSER F., KATZ M., KUGELMASS A., SIMON A., BATTAGLIA S., TARKINGTON L., CULLER S., BECKER E. *On-pump versus off-pump coronary artery bypass surgery in a matched sample of women: a comparison of outcomes. Circulation* 2004; 110: II1-6
- MANNINO C.A., SOUTH S.M., INTURRISI C.E., QUINONES-JENAB V. *Pharmacokinetics and effects of 17beta-estradiol and progesterone implants in ovariectomized rats. J Pain* 2005; 6: 809-16
- MARAGAKIS N.J., DYKES-HOBERG M. & ROTHSTEIN J.D. *Altered expression of the glutamate transporter EAAT2b in neurological disease. Ann Neurol* 2004; 55: 469-77
- MARKIEWICZ I. & LUKOMSKA B. *The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2006; 66: 343-58

- MATATA B.M., SOSNOWSKI A.W. & GALINANES M. *Off-pump bypass graft operation significantly reduces oxidative stress and inflammation. Ann Thorac Surg* 2000; 69: 785-91
- MATTHEW C.B., SILS I.V. & TARTARINI K.A. *The effects of estrogen on thermoregulation, heart rate, and activity in the female rat with comparisons to males. Journal of Thermal Biology* 1999; 24: 167-174
- MAULT J.R., OHTAKE S., KLINGENSMITH M.E., HEINLE J.S., GREELEY W.J., UNGERLEIDER R.M. *Cerebral metabolism and circulatory arrest: effects of duration and strategies for protection. Ann Thorac Surg* 1993; 55: 57-63; discussion 63-4
- MCGLONE J. *Sex differences in human brain asymmetry: a critical survey. Behavioral and Brain Sciences* 1980; 3: 215-227
- MEFFRE D., DELESPERRE B., GOUEZOU M., LECLERC P., VINSON G.P., SCHUMACHER M., STEIN D.G., GUENNOUN R. *The membrane-associated progesterone-binding protein 25-Dx is expressed in brain regions involved in water homeostasis and is up-regulated after traumatic brain injury. J Neurochem* 2005; 93: 1314-26
- MELLON S.H. & DESCHEPPER C.F. *Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. Brain Res* 1993; 629: 283-292
- MICEVYCH P. & SINCHAK K. *Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain. Mol Cell Endocrinol* 2008; 290: 44-50
- MILLER N.R., JOVER T., COHEN H.W., ZUKIN R.S., ETGEN A.M. *Estrogen Can Act via Estrogen Receptor α and β to Protect Hippocampal Neurons against Global Ischemia-Induced Cell Death. Endocrinology* 2005; 146: 3070-3079
- MOHAMED M.K. & ABDEL-RAHMAN A.A. *Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. Eur J Endocrinol* 2000; 142: 307-14
- MORALI G., LETECHIPIA-VALLEJO G., LOPEZ-LOEZA E., MONTES P., HERNANDEZ-MORALES L., CERVANTES M. *Post-ischemic administration of progesterone in rats exerts neuroprotective effects on the hippocampus. Neurosci Lett* 2005; 382: 286-90
- MULISCH M. & WELSCH U.H. (Hrsg.), *ROMEIS-Mikroskopische Technik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg* 2010
- MÜLLER F. & KAUPP U.B. *Nervensystem, In: SCHARTL M, GESSLER M & ECKARDSTEIN AV (Hrsg.) Biochemie und Molekularbiologie des Menschen, Urban & Fischer Verlag, München* 2009; 912-920
- MURPHY G.J. & ANGELINI G.D. *Side Effects of Cardiopulmonary Bypass. Journal of Cardiac Surgery* 2004; 19: 481-488
- NATHAN H.J., RODRIGUEZ R., WOZNY D., DUPUIS J.Y., RUBENS F.D., BRYSON G.L., WELLS G. *Neuroprotective effect of mild hypothermia in patients undergoing coronary artery surgery with cardiopulmonary bypass: five-year follow-up of a randomized trial. J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133: 1206-11
- NICKEL R., SCHUMMER A. & SEIFERLE E. *Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen, In: BÖHME G (Hrsg.) Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band IV, Parey Verlag, Stuttgart* 2004; 4. Auflage; 62-209

- NILSEN J.& BRINTON R.D. *Impact of progestins on estrogen-induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by medroxyprogesterone acetate. Endocrinology* 2002; 143: 205-212
- NORBURY R., CUTTER W.J., COMPTON J., ROBERTSON D.M., CRAIG M., WHITEHEAD M., MURPHY D.G. *The neuroprotective effects of estrogen on the aging brain. Exp Gerontol* 2003; 38: 109-17
- NUSSMEIER N.A.& SEARLES B.E. *Inflammatory Brain Injury After Cardiopulmonary Bypass: Is It Real? Anesthesia & Analgesia* 2010; 110: 288-290
- NYBORG H. *Sex-related differences in general intelligence g, brain size, and social status. Personality and Individual Differences* 2005; 39: 497-509
- O'BRIEN L.M., ZIEGLER D.A., DEUTSCH C.K., KENNEDY D.N., GOLDSTEIN J.M., SEIDMAN L.J., HODGE S., MAKRI N., CAVINESS V., FRAZIER J.A., HERBERT M.R. *Adjustment for Whole Brain and Cranial Size in Volumetric Brain Studies: A Review of Common Adjustment Factors and Statistical Methods. Harvard Review of Psychiatry* 2006; 14: 141-151
- O'CONNOR G.T., MORTON J.R., DIEHL M.J., OLMSTEAD E.M., COFFIN L.H., LEVY D.G., MALONEY C.T., PLUME S.K., NUGENT W., MALENKA D.J. *Differences between men and women in hospital mortality associated with coronary artery bypass graft surgery. The Northern New England Cardiovascular Disease Study Group. Circulation* 1993; 88: 2104-10
- O'NEILL L.A.& KALTSCHMIDT C. *NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. Trends Neurosci* 1997; 20: 252-8
- OKAMURA T., ISHIBASHI N., ZURAKOWSKI D., JONAS R.A. *Cardiopulmonary bypass increases permeability of the blood-cerebrospinal fluid barrier. Ann Thorac Surg* 2010; 89: 187-94
- OLNEY J.W. *Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. Science* 1969; 164: 719-21
- ÖSTERLUND M.K., GUSTAFSSON J.-Å., KELLER E., HURD Y.L. *Estrogen Receptor β (ER β) Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) Expression within the Human Forebrain: Distinct Distribution Pattern to ER α mRNA. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000; 85: 3840-3846
- PADOSCH S.A., VOGEL P.& BÖTTIGER B.W. *Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie Grundlagen, Pathophysiologie und Interventionsmöglichkeiten. Der Anaesthesist* 2001; 50: 905-920
- PAGANINI-HILL A. *Estrogen replacement therapy and stroke. Progress in Cardiovascular Diseases* 1995; 38: 223-242
- PAGANINI-HILL A., ROSS R.K.& HENDERSON B.E. *Postmenopausal oestrogen treatment and stroke: a prospective study. BMJ* 1988; 297: 519-22
- PAHL H.L. *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene* 1999; 18: 6853-66
- PARK E.M., CHO S., FRY S.K.A., GLICKSTEIN S.B., ZHOU P., ANRATHER J., ROSS M.E., IADECOLA C. *Inducible nitric oxide synthase contributes to gender differences in ischemic brain injury. J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 392-401
- PAWLAK J., BRITO V., KUPPERS E., BEYER C. *Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen. Brain Res Mol Brain Res* 2005; 138: 1-7

- PAXINOS G.& WATSON C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, New York 1998;
- PERRY V.H. *The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. Brain, Behavior, and Immunity* 2004; 18: 407-413
- PETITO C.K.& PULSINELLI W.A. *Delayed neuronal recovery and neuronal death in rat hippocampus following severe cerebral ischemia: possible relationship to abnormalities in neuronal processes. J Cereb Blood Flow Metab* 1984; 4: 194-205
- PETREA R.E., BEISER A.S., SESHADRI S., KELLY-HAYES M., KASE C.S., WOLF P.A. *Gender differences in stroke incidence and poststroke disability in the Framingham heart study. Stroke* 2009; 40: 1032-7
- PHILLIPS BUTE B., MATHEW J., BLUMENTHAL J.A., WELSH-BOHMER K., WHITE W.D., MARK D., LANDOLFO K., NEWMAN M.F. *Female gender is associated with impaired quality of life 1 year after coronary artery bypass surgery. Psychosom Med* 2003; 65: 944-51
- PIOLI P.A., JENSEN A.L., WEAVER L.K., AMIEL E., SHEN Z., SHEN L., WIRA C.R., GUYRE P.M. *Estradiol attenuates lipopolysaccharide-induced CXC chemokine ligand 8 production by human peripheral blood monocytes. J Immunol* 2007; 179: 6284-90
- POPIVANNOVA B.K., KOIKE K., TONCHEV A.B., ISHIDA Y., KONDO T., OGAWA S., MUKAIDA N., INOUE M., YAMASHIMA T. *Accumulation of microglial cells expressing ELR motif-positive CXC chemokines and their receptor CXCR2 in monkey hippocampus after ischemia-reperfusion. Brain Res* 2003; 970: 195-204
- POWERS J.B. *Facilitation of lordosis in ovariectomized rats by intracerebral progesterone implants. Brain Res* 1972; 48: 311-325
- PRESS M.F.& GREENE G.L. *Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progestin receptor. Endocrinology* 1988; 122: 1165-75
- PROSSNITZ E.R., ARTERBURN J.B.& SKLAR L.A. *GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. Mol Cell Endocrinol* 2007; 265-266: 138-42
- PULSINELLI W.A., BRIERLEY J.B.& PLUM F. *Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. Ann Neurol* 1982; 11: 491-8
- RABINOWICZ T., DEAN D.E., PETETOT J.M., DE COURTEN-MYERS G.M. *Gender differences in the human cerebral cortex: more neurons in males; more processes in females. J Child Neurol* 1999; 14: 98-107
- RANUCCI M., DE TOFFOL B., ISGRO G., ROMITTI F., CONTI D., VICENTINI M. *Hyperlactatemia during cardiopulmonary bypass: determinants and impact on postoperative outcome. Crit Care* 2006; 10: R167
- RAVAL A.P., BORGES-GARCIA R., JAVIER MORENO W., PEREZ-PINZON M.A., BRAMLETT H. *Periodic 17beta-estradiol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via estrogen receptor-beta. PLoS ONE* 2013; 8: e60716
- RAZ N., GUNNING-DIXON F., HEAD D., RODRIGUE K.M., WILLIAMSON A., ACKER J.D. *Aging, sexual dimorphism, and hemispheric asymmetry of the cerebral cortex: replicability of regional differences in volume. Neurobiology of Aging* 2004; 25: 377-396

- REEVES M.J., BUSHNELL C.D., HOWARD G., GARGANO J.W., DUNCAN P.W., LYNCH G., KHATIWODA A., LISABETH L. *Sex differences in stroke: epidemiology, clinical presentation, medical care, and outcomes. Lancet Neurol* 2008; 7: 915-26
- REHNCRONA S., ROSEN I. & SIESJO B.K. *Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: 1. Biochemistry and neurophysiology. J Cereb Blood Flow Metab* 1981; 1: 297-311
- REITMEIR R. & HERMANN D.M. *Pathophysiologie vaskulär-neurologischer Erkrankungen, In: HERMANN D, STEINER T & DIENER HC (Hrsg.) Vaskuläre Neurologie: Zerebrale Ischämien, Hämorrhagien, Gefäßmissbildungen, Vaskulitiden und vaskuläre Demenz, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2010; 8-13*
- RENOLLEAU S., FAU S., GOYENVALLE C., JOLY L.-M., CHAUVIER D., JACOTOT E., MARIANI J., CHARRIAUT-MARLANGUE C. *Specific caspase inhibitor Q-VD-OPh prevents neonatal stroke in P7 rat: a role for gender. Journal of Neurochemistry* 2007; 100: 1062-1071
- RESKO J.A. *Endocrine control of adrenal progesterone secretion in the ovariectomized rat. Science* 1969; 164: 70-1
- RIBEIRO R.C., KUSHNER P.J. & BAXTER J.D. *The nuclear hormone receptor gene superfamily. Annu Rev Med* 1995; 46: 443-53
- RINDER C.S. *Hematologic Effects of Cardiopulmonary Bypass, In: GRAVLEE GP, DAVIS RF, KURUSZ M & UTLEY JR (Hrsg.) Cardiopulmonary Bypass: Principles and Practice, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2000; 2. Auflage; 492-505*
- RISSMAN E.F., WERSINGER S.R., TAYLOR J.A., LUBAHN D.B. *Estrogen Receptor Function as Revealed by Knockout Studies: Neuroendocrine and Behavioral Aspects. Hormones and Behavior* 1997; 31: 232-243
- ROCHE-LEXIKON *Roche Lexikon Medizin, Urban & Fischer Verlag, München/Jena 2003, 5. Auflage; 947f.*
- ROOF R.L., DUVDEVANI R., HEYBURN J.W., STEIN D.G. *Progesterone rapidly decreases brain edema: treatment delayed up to 24 hours is still effective. Exp Neurol* 1996; 138: 246-51
- ROSSI D.J., OSHIMA T. & ATTWELL D. *Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. Nature* 2000; 403: 316-21
- ROSSOUW J.E., ANDERSON G.L., PRENTICE R.L., LACROIX A.Z., KOOPERBERG C., STEFANICK M.L., JACKSON R.D., BERESFORD S.A., HOWARD B.V., JOHNSON K.C., KOTCHEN J.M., OCKENE J. *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. Jama* 2002; 288: 321-33
- ROTHSTEIN J.D., DYKES-HOBERG M., PARDO C.A., BRISTOL L.A., JIN L., KUNCL R.W., KANAI Y., HEDIGER M.A., WANG Y., SCHIELKE J.P., WELTY D.F. *Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. Neuron* 1996; 16: 675-686
- RUSA R., ALKAYED N.J., CRAIN B.J., TRAYSTMAN R.J., KIMES A.S., LONDON E.D., KLAUS J.A., HURN P.D. *17 β -estradiol reduces stroke injury in estrogen-deficient female animals. Stroke* 1999; 30: 1665-1670
- RUSHTON J.P. & ANKNEY C.D. *Brain size and cognitive ability: Correlations with age, sex, social class, and race. Psychonomic Bulletin & Review* 1996; 3: 21-36

- RÜSSE I. & SINOWATZ F. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*, München 2008, 3. Auflage; 221-234
- SCHLAEPFER T.E., HARRIS G.J., TIEN A.Y., PENG L., LEE S., PEARLSON G.D. *Structural differences in the cerebral cortex of healthy female and male subjects: a magnetic resonance imaging study. Psychiatry Res* 1995; 61: 129-35
- SCHMID C. & PHILIPP A. *Leitfaden Extrakorporale Zirkulation*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2011; 1-69
- SCHOLZ W. *Topistic lesions*, In: SCHADÉ JP & MCMENEMEY WH (Hrsg.) *Selective Vulnerability of the Brain in Hypoxaemia*, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1963; 257-268
- SCHRECK R., RIEBER P. & BAEUERLE P.A. *Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. EMBO J* 1991; 10: 2247-58
- SEALY W.C. *Hypothermia: its possible role in cardiac surgery. Ann Thorac Surg* 1989; 47: 788-91
- SEGHAYE M.C., QING M. & VON BERNUTH G. *Systemic inflammatory response to cardiac surgery: does female sex really protect? Crit Care* 2001; 5: 280-2
- SESSLER D.I. *Hyperthermia after cardiac surgery: mechanism and importance. J Cardiothorac Vasc Anesth* 2005; 19: 423-5
- SHARP P.E. & LA REGINA M.C. *The Laboratory Rat*, CRC Press Boca Raton 1998;
- SHAYWITZ B.A., SHAYWITZ S.E., PUGH K.R., CONSTABLE R.T., SKUDLARSKI P., FULBRIGHT R.K., BRONEN R.A., FLETCHER J.M., SHANKWEILER D.P., KATZ L., GORE J.C. *Sex differences in the functional organization of the brain for language. Nature* 1995; 373: 607-609
- SHIMA N., YAMAGUCHI Y. & YURI K. *Distribution of estrogen receptor beta mRNA-containing cells in ovariectomized and estrogen-treated female rat brain. Anat Sci Int* 2003; 78: 85-97
- SHUGHRUE P.J., LANE M.V. & MERCHENTHALER I. *Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. The Journal of Comparative Neurology* 1997; 388: 507-525
- SIMPSON E.R. *Sources of estrogen and their importance. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2003; 86: 225-230
- SINGER C.A., ROGERS K.L., STRICKLAND T.M., DORSA D.M. *Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. Neurosci Lett* 1996; 212: 13-6
- SINGH M. & SU C. *Progesterone and neuroprotection. Horm Behav* 2013; 63: 284-90
- SINGH M., SUMIEN N., KYSER C., SIMPKINS J.W. *Estrogens and progesterone as neuroprotectants: what animal models teach us. Front Biosci* 2008; 13: 1083-9
- SMITH R.J. *Relative Size versus Controlling for Size: Interpretation of Ratios in Research on Sexual Dimorphism in the Human Corpus Callosum. Current Anthropology* 2005; 46: 249-273
- SOFRONIEW M.V. *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. Trends in neurosciences* 2009; 32: 638-647

STATISTISCHES_BUNDESAMT (2013a), *Pressemitteilung Nr. 422 vom 12.12.2013 "Anstieg der Todesfälle im Vergleich zum Vorjahr um 2 %"* [Online], erhältlich: https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2013/12/PD13_422_232.html, abgerufen am 04.01.2014

STATISTISCHES_BUNDESAMT (2013b), *Todesursachen-Sterbefälle insgesamt 2012 nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10* [Online], erhältlich: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html>, abgerufen am 04.01.2014

STOFFEL M.H. *Funktionelle Neuroanatomie für die Tiermedizin*, Enke Verlag, Stuttgart 2011; 3-28

STONE W.S. *Evolution of Cardiopulmonary Bypass*. *Circulation* 2009; 119: 2844-2853

STRAUB R.H. *The complex role of estrogens in inflammation*. *Endocr Rev* 2007; 28: 521-74

STROM J.O., THEODORSSON A. & THEODORSSON E. *Dose-related neuroprotective versus neurodamaging effects of estrogens in rat cerebral ischemia: a systematic analysis*. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29: 1359-72

STROM J.O., THEODORSSON E., HOLM L., THEODORSSON A. *Different methods for administering 17beta-estradiol to ovariectomized rats result in opposite effects on ischemic brain damage*. *BMC Neurosci* 2010; 11: 39

STROM J.O., THEODORSSON E. & THEODORSSON A. *Order of magnitude differences between methods for maintaining physiological 17beta-oestradiol concentrations in ovariectomized rats*. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68: 814-22

SUZUKI S., BROWN C.M., DELA CRUZ C.D., YANG E., BRIDWELL D.A., WISE P.M. *Timing of estrogen therapy after ovariectomy dictates the efficacy of its neuroprotective and antiinflammatory actions*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 6013-8

TAIT A.S., BUTTS C.L. & STERNBERG E.M. *The role of glucocorticoids and progestins in inflammatory, autoimmune, and infectious disease*. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 924-931

TAKAHASHI L.K. & LISK R.D. *Estrogen action in anterior and ventromedial hypothalamus and the modulation of heterosexual behavior in female golden hamsters*. *Physiol Behav* 1985; 34: 233-9

TAMBUYZER B.R., PONSARTS P. & NOUWEN E.J. *Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology*. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 352-70

TAYLOR K.M. *Brain damage during cardiopulmonary bypass*. *Ann Thorac Surg* 1998; 65: S20-6; discussion S27-8

THEWS G., MUTSCHLER E., VAUPEL P., SCHAIBLE H.-G. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2007; 323-327; 837-844

THOMPSON R.F. *Das Gehirn: Von der Nervenzelle zur Verhaltenssteuerung*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2001, 3. Auflage; 1-24

TIAN L., MA L., KAARELA T., LI Z. *Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases*. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 155

TIAN L., RAUVALA H. & GAHMBERG C.G. *Neuronal regulation of immune responses in the central nervous system*. *Trends in immunology* 2009; 30: 91-99

- TOWBIN H., STAEHELIN T. & GORDON J. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350-4
- TRAYSTMAN R.J. *Animal models of focal and global cerebral ischemia. ILAR J* 2003; 44: 85-95
- TRELOAR A.E. *Menstrual cyclicity and the pre-menopause. Maturitas* 1981; 3: 249-64
- TROTTER A., GRILL H.-J., HEMMER W., HANNEKUM A., LANG D. *Sex steroids in cardiopulmonary bypass. Crit Care* 1997; 1: 1-3
- TROTTER A., MUCK K., GRILL H.J., SCHIRMER U., HANNEKUM A., LANG D. *Gender-related plasma levels of progesterone, interleukin-8 and interleukin-10 during and after cardiopulmonary bypass in infants and children. Crit Care* 2001; 5: 343-8
- TURRIN N.P., GAYLE D., ILYIN S.E., FLYNN M.C., LANGHANS W., SCHWARTZ G.J., PLATA-SALAMÁN C.R. *Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide. Brain Res Bull* 2001; 54: 443-453
- UOTINEN N., PUUSTINEN R., PASANEN S., MANNINEN T., KIVINEVA M., SYVALA H., TUOHIMAA P., YLIKOMI T. *Distribution of progesterone receptor in female mouse tissues. Gen Comp Endocrinol* 1999; 115: 429-41
- VACCARINO V., ABRAMSON J.L., VELEDAR E., WEINTRAUB W.S. *Sex differences in hospital mortality after coronary artery bypass surgery: evidence for a higher mortality in younger women. Circulation* 2002; 105: 1176-81
- VACCARINO V., LIN Z.Q., KASL S.V., MATTERA J.A., ROUMANIS S.A., ABRAMSON J.L., KRUMHOLZ H.M. *Gender differences in recovery after coronary artery bypass surgery. J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 307-14
- VAN DEN BERGHE G. *Does tight blood glucose control during cardiac surgery improve patient outcome? Ann Intern Med* 2007; 146: 307-8
- VAN DER SLUIS S., POSTHUMA D., DOLAN C.V., DE GEUS E.J.C., COLOM R., BOOMSMA D.I. *Sex differences on the Dutch WAIS-III. Intelligence* 2006; 34: 273-289
- VAN DIJK D., KEIZER A.M., DIEPHUIS J.C., DURAND C., VOS L.J., HIJMAN R. *Neurocognitive dysfunction after coronary artery bypass surgery: a systematic review. J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 120: 632-9
- VAN KEMPEN T.A., MILNER T.A. & WATERS E.M. *Accelerated ovarian failure: a novel, chemically induced animal model of menopause. Brain Res* 2011; 1379: 176-87
- VEGETO E., SHAHBAZ M.M., WEN D.X., GOLDMAN M.E., O'MALLEY B.W., MCDONNELL D.P. *Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. Mol Endocrinol* 1993; 7: 1244-55
- VERKHRATSKY A. & BUTT A.M. *Glial Physiology and Pathophysiology*, Wiley-Blackwell, Oxford 2013; 343-376
- VON SEGESSER L. *Prinzipien und Entwicklungsschritte der extrakorporalen Zirkulation*, In: ZIEMER G & HAVERICH A (Hrsg.) *Herzchirurgie: Die Eingriffe am Herzen und an den herznahen Gefäßen*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 2010; 106 f.

- VRIES H.E.D., KUIPER J., BOER A.G.D., BERKEL T.J.C.V., BREIMER D.D. *The Blood-Brain Barrier in Neuroinflammatory Diseases. Pharmacological Reviews* 1997; 49: 143-156
- WADE G.N. *Sex Hormones, Regulatory Behaviors and Body Weight*, In: ROSENBLATT JS (Hrsg.) *Advances In The Study Of Behavior* (6) Academic Press Inc., New York 1976; 201-267
- WANG Q., SANTIZO R., BAUGHMAN V.L., PELLIGRINO D.A., IADECOLA C. *Estrogen provides neuroprotection in transient forebrain ischemia through perfusion-independent mechanisms in rats. Stroke* 1999; 30: 630-7
- WASS C.T., CABLE D.G., SCHAFF H.V., LANIER W.L. *Anesthetic technique influences brain temperature during cardiopulmonary bypass in dogs. Ann Thorac Surg* 1998; 65: 454-60
- WELSH F.A., GINSBERG M.D., RIEDER W., BUDD W.W. *Deleterious effect of glucose pretreatment on recovery from diffuse cerebral ischemia in the cat. II. Regional metabolite levels. Stroke* 1980; 11: 355-63
- WEN Y., YANG S., LIU R., PEREZ E., YI K.D., KOULEN P., SIMPKINS J.W. *Estrogen attenuates nuclear factor-kappa B activation induced by transient cerebral ischemia. Brain Res* 2004; 1008: 147-54
- WERNER C. *Neuroprotektion*, In: JANTZEN J-PAH & LÖFFLER W (Hrsg.) *Neuroanaesthesie*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2000; 121-142
- WHO (2013), *Fact sheet N°310 "The top 10 causes of death"* [Online], World Health Organization, erhältlich: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>, abgerufen am 04.01.2014
- WILLIAMS C.L., BARNETT A.M. & MECK W.H. *Organizational effects of early gonadal secretions on sexual differentiation in spatial memory. Behav Neurosci* 1990; 104: 84-97
- WITTE A.V., SAVLI M., HOLIK A., KASPER S., LANZENBERGER R. *Regional sex differences in grey matter volume are associated with sex hormones in the young adult human brain. Neuroimage* 2010; 49: 1205-12
- WOODS S.E., NOBLE G., SMITH J.M., HASSELFELD K. *The influence of gender in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: an eight-year prospective hospitalized cohort study. Journal of the American College of Surgeons* 2003; 196: 428-434
- WRIGHT D.W., KELLERMANN A.L., HERTZBERG V.S., CLARK P.L., FRANKEL M., GOLDSTEIN F.C., SALOMONE J.P., DENT L.L., HARRIS O.A., ANDER D.S., LOWERY D.W., PATEL M.M., DENSON D.D., GORDON A.B., WALD M.M., GUPTA S., HOFFMAN S.W., STEIN D.G. *ProTECT: a randomized clinical trial of progesterone for acute traumatic brain injury. Ann Emerg Med* 2007; 49: 391-402, 402 e1-2
- WYSOWSKI D.K. & GOVERNALE L.A. *Use of menopausal hormones in the United States, 1992 through June, 2003. Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2005; 14: 171-6
- XING D., MILLER A., NOVAK L., ROCHA R., CHEN Y.F., OPARIL S. *Estradiol and progestins differentially modulate leukocyte infiltration after vascular injury. Circulation* 2004; 109: 234-41
- YAO X.L., LIU J., LEE E., LING G.S., MCCABE J.T. *Progesterone differentially regulates pro- and anti-apoptotic gene expression in cerebral cortex following traumatic brain injury in rats. J Neurotrauma* 2005; 22: 656-68
- YILMAZ G. & GRANGER D.N. *Leukocyte recruitment and ischemic brain injury. Neuromolecular Med* 2010; 12: 193-204

ZHANG L., LI P.P., FENG X., BARKER J.L., SMITH S.V., RUBINOW D.R. *Sex-related differences in neuronal cell survival and signaling in rats. Neurosci Lett* 2003; 337: 65-8

ZHANG Q.G., RAZ L., WANG R., HAN D., DE SEVILLA L., YANG F., VADLAMUDI R.K., BRANN D.W. *Estrogen attenuates ischemic oxidative damage via an estrogen receptor alpha-mediated inhibition of NADPH oxidase activation. J Neurosci* 2009; 29: 13823-36

ZHANG Q.G., WANG R., KHAN M., MAHESH V., BRANN D.W. *Role of Dickkopf-1, an antagonist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway, in estrogen-induced neuroprotection and attenuation of tau phosphorylation. J Neurosci* 2008; 28: 8430-41

ZHAO H., TIAN Z., HAO J., CHEN B. *Extragenadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. Reproductive Biology and Endocrinology* 2005; 3: 1-9

ZHU W.& SMART E.J. *Caveolae, estrogen and nitric oxide. Trends in Endocrinology & Metabolism* 2003; 14: 114-117

ZLOTNIK A., GRUENBAUM B.F., MOHAR B., KUTS R., GRUENBAUM S.E., OHAYON S., BOYKO M., KLIN Y., SHEINER E., SHAKED G., SHAPIRA Y., TEICHBERG V.I. *The effects of estrogen and progesterone on blood glutamate levels: evidence from changes of blood glutamate levels during the menstrual cycle in women. Biol Reprod* 2011; 84: 581-6

ZULOAGA D.G., MCGIVERN R.F. & HANDA R.J. *Organizational influence of the postnatal testosterone surge on the circadian rhythm of core body temperature of adult male rats. Brain Res* 2009; 1268: 68-75

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 01:	Test- und Bewertungsschema der neurologischen Untersuchung.....	85
Tabelle 02:	Gehirnareal-spezifischer Bewertungsscore für neuronale Schädigungen.....	91
Tabelle 03:	Im Gehirngewebe detektierte Proteine mit ihren jeweiligen Primär- und Sekundärantikörpern in den gewählten Verdünnungsstufen und mit den Polyacrylamid-Anteilen der verwendeten Gele [%].....	97
Tabelle 04:	Mittlere (\pm STABW) parametrische physiologische Befunde bei den 5 Versuchsgruppen (VG) vor, während und nach EKZ und DHCA zu den vorgegebenen Messzeitpunkten.....	101
Tabelle 05 (a):	Mittlere (\pm STABW) 17β-Östradiol-Konzentration im Serum der 5 Versuchsgruppen (VG) am Tag 0 vor Beginn der EKZ und DHCA.....	103
Tabelle 05 (b):	Mittlere (\pm STABW) Progesteron-Konzentration im Serum der 5 Versuchsgruppen (VG) am Tag 0 vor Beginn der EKZ und DHCA.....	103
Tabelle 06:	Prä- und postoperatives mittleres (\pm STABW) Körpergewicht (g) der 5 Versuchsgruppen (VG).....	105
Tabelle 07:	Verlauf der mittleren (\pm STABW) Körpertemperatur (°C) bei den überlebenden Versuchstieren (n = 5) der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA (Gesamtzeitraum: 96 h).....	107
Tabelle 08:	Verlauf der mittleren (\pm STABW) Körpertemperatur (°C) bei den euthanasierten Versuchstieren (n = 5) der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA(Gesamtzeitraum: 96 h).....	108
Tabelle 09:	Mittleres (\pm STABW) Gesamtpunkte-Ergebnis (Score) der Sensorikbeurteilung für die überlebenden Versuchstiere (n = 5) in den 5 Versuchsgruppen (VG).....	110
Tabelle 10:	Mittlere (\pm STABW) Haltezeiten (s) beim Rotating-Grid-Test für die überlebenden Versuchstiere (n = 5) der 5 Versuchsgruppen (VG).....	111
Tabelle 11:	Mittlere (\pm STABW) Verweildauer (s) beim Beam-Balance-Test für die überlebenden Versuchstiere (n = 5) der 5 Versuchsgruppen (VG).....	112
Tabelle 12:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl der Fehlritte (nr) beim Beam-Walking-Test für die überlebenden Versuchstiere (n = 5) der 5 Versuchsgruppen (VG).....	114
Tabelle 13:	Mittlere (\pm STABW) Greif-Haltezeit (s) beim Prehensile-Traction-Test für die überlebenden Versuchstiere (n = 5) der 5 Versuchsgruppen (VG).....	115

Tabelle 14:	Mittlere (\pm STABW) Blutbild-Werte für die überlebenden Versuchstiere (n = 5) der 5 Versuchsgruppen (VG) am postoperativen Tag 4 nach EKZ und DHCA.....	116
Tabelle 15:	Mittlere (\pm STABW) Konzentration (pg/ml) an TNFα im Serum der 5 Versuchsgruppen (VG) 1 h nach EKZ und DHCA	117
Tabelle 16:	Mittelwerte (\pm STABW) der histologischen Schadensbewertung (Score) im Motorkortex der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA.....	119
Tabelle 17:	Mittelwerte (\pm STABW) der histologischen Schadensbewertung (Score) im Striatum der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA.....	120
Tabelle 18:	Mittelwerte (\pm STABW) der histologischen Schadensbewertung (Score) im Hippokampus der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA....	121
Tabelle 19:	Mittlere (\pm STABW) Schwärzungsintensität von ERα im Western-Blot im Gehirn der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA.....	123
Tabelle 20:	Mittlere (\pm STABW) Schwärzungsintensität von ERβ im Western-Blot im Gehirn der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA.....	125
Tabelle 21:	Mittlere (\pm STABW) Schwärzungsintensität von EAAT1 im Western-Blot im Gehirn der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA	126
Tabelle 22:	Mittlere (\pm STABW) Schwärzungsintensität von GLT-1b im Western-Blot im Gehirn der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA.....	128
Tabelle 23:	Mittlere (\pm STABW) Schwärzungsintensität von CXCR2 im Western-Blot im Gehirn der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA.....	129
Tabelle 24:	Mittlere (\pm STABW) Schwärzungsintensität von IL-8 im Western-Blot im Gehirn der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA	130
Tabelle 25:	Mittlere (\pm STABW) Schwärzungsintensität von iNOS im Western-Blot im Gehirn der 5 Versuchsgruppen (VG) nach EKZ und DHCA.....	132

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 01:	Blutversorgung des menschlichen Gehirns ausgehend vom Aortenbogen (modifiziert nach DORNDORF, 1983).....	11
Abbildung 02:	Biochemische Synthese von Östron, Östradiol und Östriol (modifiziert und vereinfacht nach LOOSE und STANCEL, 2005).....	18
Abbildung 03:	Vermittlung der Neuroprotektion durch 17 β -Östradiol über nukleäre und extranukleäre Östrogenrezeptoren („estrogen receptors“, ER) (modifiziert nach BRANN et al., 2007).....	26
Abbildung 04:	Vorstufen der Progesteron-Synthese (vereinfacht und modifiziert nach DEWICK, 2001).....	28
Abbildung 05:	Schematische Darstellung der beiden Isoformen des Progesteronrezeptors (modifiziert nach GRAHAM et al.; 1995).....	31
Abbildung 06:	Durch die Zytokine Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin-1 (IL-1) vermittelte lokale und sytemische Effekte im Rahmen der Entzündungsantwort (modifiziert nach KUMAR et al., 2009).....	48
Abbildung 07:	Entstehung und Regulation des „Systemischen inflammatorischen Response-Syndroms“ (SIRS) und des „Multiorgandysfunktions-Syndroms“(MODS) (modifiziert nach JAFFER et al., 2010).....	50
Abbildung 08:	Schematische Darstellung der drei Hauptphänotypen von Mikrogliazellen (modifiziert nach VERKHRATSKY und BUTT, 2013).....	52
Abbildung 09:	Zeitplan des Versuchsablaufs.....	61
Abbildung 10:	Schema der Versuchsgruppeneinteilung nach zu erfolgreicher Behandlung.....	62
Abbildung 11:	Fotografische und schematische Wiedergabe der Hormonimplantate nach Herstellung.....	64
Abbildung 12:	Technischer Aufbau der EKZ (schematisch) mit Ratte (modifiziert nach LISLE et al., 2008).....	70
Abbildung 13:	Technischer Aufbau der EKZ (im Foto) mit Ratte.....	71
Abbildung 14:	Positionierung der Telemetrie-Transmittersonde und der beiden Elektroden für eine bipolare EKG-Ableitung im Tier (Schema) (modifiziert nach „ETA-CTA-EA-CA Surgical Manual“, Data Sciences International, St. Paul, USA).....	74
Abbildung 15:	Verwendete Telemetrie-Transmittersonde mit Elektroden (DSI System) (Foto).....	77

Abbildung 16:	Detailansicht der „Kopfeinheit“ der Transmittersonde (Schema) (modifiziert nach „Guide to the DSI System“, Data Sciences International, St. Paul, USA).....	77
Abbildung 17:	Konfiguration des auf der telemetrischen Überwachung basierenden Alarmsystems (modifiziert nach KELLERMANN et al., 2012).....	80
Abbildung 18:	Versuchsaufbau und Tierausswahl für weiterführende Untersuchungen.....	88
Abbildung 19:	Beispiele für HE-gefärbte histologische Schnitte aus den drei untersuchten Gehirnbereichen Kortex, Hippokampus und Striatum.....	92
Abbildung 20:	Mittleres Körpergewicht in g (\pm STABW) der Tiere in den 5 Versuchsgruppen: (A) Im zeitlichen Verlauf bei den überlebenden Tieren (<i>Ein signifikanter Einfluss der Zeit: $Zeit^2 = p < 0,001$; sowie ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $\xi = p < 0,05$ Gruppe „Plazebo“ gg. Gruppe „Intakt“ und gg. Gruppe „Östrogen“</i>); (B) in der Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) für die Werte der Gruppierung „Alle Tiere“ am Tag -1 (<i>signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $* = p < 0,05$ gg. „Intakt“, gg. „P+Ö“ und gg. „Östrogen“; $\# = p < 0,05$ gg. „Intakt“ und gg. „Östrogen“</i>); (C) im Vergleich der Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ am Tag -1 (<i>signifikanter Einfluss folgender Versuchsgruppen: $* = p < 0,05$ gg. „Intakt überlebend“; $\# = p < 0,05$ gg. „Intakt euthanasiert“, gg. „P+Ö euthanasiert“ und gg. „Östrogen euthanasiert“</i>); (D) für die Gruppierung „Überlebende Tiere“ am Tag 4 (<i>kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,160$</i>).....	106
Abbildung 21:	Mittlere (\pm STABW) Körpertemperatur ($^{\circ}$ C) für die überlebenden Versuchstiere in den 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA: (A) Darstellung des Verlaufs über den Zeitraum von 96 h (<i>Die Körpertemperatur steigt bei allen 5 Gruppen im Verlauf der ersten 24 h nach EKZ und DHCA signifikant an: $Zeit^2: p < 0,001$</i>); (B) Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Werte für den Zeitraum von 0-24 h (<i>Kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe auf die Körpertemperatur: $p = 0,84$</i>).....	108
Abbildung 22:	Mittleres (\pm STABW) Gesamtpunkte-Ergebnis der Sensorikbeurteilung : (A) Zeitlicher Verlauf über 4 Tage nach EKZ und DHCA (<i>signifikanter Einfluss der Zeit: $Zeit^2: p \leq 0,001$</i>); (B) Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Gesamtpunkte über den Zeitraum von 4 Tagen (<i>Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant: Versuchsgruppe: $p = 0,259$</i>).....	110
Abbildung 23:	Mittlere (\pm STABW) Haltezeiten (s) beim Rotating-Grid-Test : (A) zeitlicher Verlauf über 4 Tage nach EKZ und DHCA (<i>signifikanter Einfluss der Zeit: $Zeit^2: p < 0,001$</i>); (B) Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der erreichten Werte über den Zeitraum von 4 Tagen (<i>kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,406$</i>)	111

Abbildung 24:	Mittlere (\pm STABW) Verweildauer (s) beim Beam-Balance-Test : (A) zeitlicher Verlauf über 4 Tage nach EKZ und DHCA (<i>ein signifikanter Einfluss der Zeit: $Zeit^2$: $p < 0,001$</i>); (B) Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der erreichten Werte über den Zeitraum von 4 Tagen (<i>kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen: $p = 0,159$</i>).....	113
Abbildung 25:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl der Fehltritte (nr) beim Beam-Walking-Test : (A) zeitlicher Verlauf über 4 Tage nach EKZ und DHCA (<i>ein signifikanter Einfluss der Zeit: $Zeit^2$: $p < 0,001$</i>); (B) Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Werte über den Zeitraum von 4 Tagen (<i>kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen: $p = 0,583$</i>).....	114
Abbildung 26:	Mittlere (\pm STABW) Greif-Haltezeit (s) beim Prehensile-Traction-Test : (A) zeitlicher Verlauf über 4 Tage nach EKZ und DHCA (<i>ein signifikanter Einfluss der Zeit: $Zeit^2$: $p < 0,001$</i>); (B) Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Werte über den Zeitraum von 4 Tagen (<i>kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen: $p = 0,271$</i>).....	115
Abbildung 27:	Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der Konzentration (pg/ml) an TNFα im Serum der 5 Versuchsgruppen 1 h nach EKZ und DHCA: (A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (<i>kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,258$</i>); (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (<i>kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,237$</i>).....	118
Abbildung 28:	Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) des hirnmorphologischen Gesamtscores für Schäden im Motorkortex für die 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA: (A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (<i>kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,103$</i>); (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (<i>kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,235$</i>).....	120
Abbildung 29:	Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) des hirnmorphologischen Gesamtscores für Schäden im Striatum für die 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA: (A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (<i>kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,842$</i>); (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (<i>kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,913$</i>).....	121
Abbildung 30:	Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) des hirnmorphologischen Gesamtscores für Schäden im Hippokampus für die 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA: (A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (<i>kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,850$</i>); (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (<i>kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,985$</i>).....	122

- Abbildung 31: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der **Schwärzungsintensität von ER α** im Gehirn der 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA: (A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (*kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,802$*); (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (*kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,821$*)..... 124
- Abbildung 32: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der **Schwärzungsintensität von ER β** im Gehirn der 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA: (A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (*kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,518$*); (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (*signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,032$; * = $p < 0,05$ gg. „Plazebo euthanasiert“; # = $p < 0,05$ gg. „Intakt euthanasiert“ und gg. „P+Ö euthanasiert“; § = $p < 0,05$ gg. „Intakt euthanasiert“*)..... 125
- Abbildung 33: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der **Schwärzungsintensität von EAAT1** im Gehirn der 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA: (A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (*kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,210$*); (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (*signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,024$; • = $p < 0,05$ gg. „P+Ö überlebend“; * = $p < 0,05$ gg. „P+Ö euthanasiert“; § = $p < 0,05$ gg. „Intakt euthanasiert“; # = $p < 0,05$ gg. „Progesteron euthanasiert“, gg. „Plazebo euthanasiert“ und gg. „Östrogen euthanasiert“*)..... 127
- Abbildung 34: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der **Schwärzungsintensität von GLT-1b** im Gehirn der 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA: (A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (*ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,031$; * = $p < 0,05$ gg. „Intakt“, gg. „Plazebo“ und gg. „P+Ö“*); (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (*kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,113$*)..... 128
- Abbildung 35: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der **Schwärzungsintensität von CXCR2** im Gehirn der 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA: (A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (*kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,084$*); (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (*kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,224$*)..... 129
- Abbildung 36: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der **Schwärzungsintensität von IL- 8** im Gehirn der 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA: (A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (*ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,001$; # = $p < 0,05$ gg. „Intakt“, gg. „Progesteron“ und gg. „Östrogen“; § = $p < 0,05$ gg. „Intakt“ und gg. „Östrogen“*); (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (*ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,009$; ♦ = $p < 0,05$ gg. „Östrogen überlebend“; • = $p < 0,05$ gg. „Progesteron euthanasiert“ und gg. „Östrogen euthanasiert“*)..... 131

Abbildung 37: Boxplot-Darstellung (Median, 25% und 75% Perzentile) der **Schwärzungsintensität von iNOS** im Gehirn der 5 Versuchsgruppen nach EKZ und DHCA: (A) in der Gruppierung „Alle Tiere“ (*ein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,036$; $* = p < 0,05$ gg. „Plazebo“ und gg. „P+Ö“*); (B) in den Gruppierungen „Überlebende Tiere“ und „Euthanasierte Tiere“ (*kein signifikanter Einfluss der Versuchsgruppe: $p = 0,217$*).....132

11 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
§	Paragraph
°	Grad
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
σ1R	Sigma-1-Rezeptor
2-VO	<i>two-vessel-occlusion</i> ; Okklusion der Aa. carotides communes
4-VO	<i>four-vessel-occlusion</i> ; Okkl. der Aa. carotides communes und Aa. vertebrales
A.	Arterie
Aa.	Arterien
Abb.	Abbildung
AF (1; 2)	Aktivierungsfunktion 1 und 2 (Transaktivierungsdomänen)
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
APP	Akute-Phase-Protein
APR	Akute-Phase-Reaktion
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	BCL-2-Antagonist of Cell Death
BAX	BCL-2-assoziiertes X-Protein
BBB	<i>blood-brain barrier</i> ; Blut-Hirn-Schranke
BCL-2	B-Zell-Lymphoma-2-Gen
BE	<i>base excess</i> ; Basenüberschuss
BGB	Bürgerliches Gesetzbuch
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BPM	<i>beats per minute</i> ; Schläge pro Minute
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
CA	<i>cornu ammonis</i> ; Ammonshorn
Ca ²⁺	Kalzium
CABG	<i>coronary artery bypass graft</i> ; Koronararterien-Bypass-OP
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Caspase	Cysteiny-Aspartat-spezifische Proteasen
CD 22	<i>Cluster of differentiation 22</i> ; Unterscheidungsgruppe 22
CEE	<i>conjugated equine estrogens</i> ; konjugierte equine Östrogene
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPB	<i>cardiopulmonary bypass</i> ; kardiopulmonaler Bypass
CVD	<i>cardiovascular diseases</i> ; kardiovaskuläre Erkrankungen
CXCL10	CXC-Motiv-Chemokin-10

CXCR2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor-2
d. h.	das heißt
DBD	DNA-bindene-Domäne
DGTHG	Deutsche Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
DHCA	<i>deep hypothermic circulatory arrest</i> ; tief hypothermer Kreislaufstillstand
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAAT1	<i>excitatory amino acid transporter 1</i> ; Exzitatorischer Aminosäuretransporter 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER (α ; β)	<i>estrogen receptor</i> , Östrogenrezeptor (alpha; beta)
ERK (1; 2)	extrazelluläre-signalregulierte-Kinase-1 und -2
ERT	<i>estrogen replacement therapy</i> ; Östrogenersatztherapie
ESR (-1; -2)	<i>estrogen receptor (1, 2) gene</i> ; Östrogenrezeptor-1- (2-) Gen
et. al	und andere
FiO ₂	Sauerstoffkonzentration
fl	Femtoliter
Fr	French
g	Gramm
G	Gauge
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter (auch EAAT1)
GLT-1	Glutamat-Transporter-1
GPR30	G-Protein-gekoppelte-Rezeptor 30
GSH-Px	Glutathion-Peroxidase
GV	Gesellschaft für Versuchstierkunde
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCT	<i>hematocrit</i> ; Hämatokrit
HAES	Hydroxyethylstärke
HGB	Hämoglobin
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HO·	Hydroxyl-Radikal
HPF	<i>high power field</i> ; hoch vergrößertes Feld
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
HRT	<i>hormone replacement therapy</i> ; Hormonersatztherapie
HSP	Hitzeschockprotein
I.E.	Internationale Einheiten
IFN- γ	Interferon-Gamma
IL-1	Interleukin-1

IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP3K	Phosphoinositid-3-Kinase
IQ	Intelligenzquotient
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
LBD	Liganden-bindene-Domäne
LH	Luteinisierendes Hormon
LTB4	Leukotrien-B4
LPS	Lipopolysaccharide
MAP	<i>mean arterial pressure</i> ; mittlerer arterieller Blutdruck
MCAO	<i>middle cerebral artery occlusion</i> ; Verschluss der mittleren Hirnarterie
MCH	<i>mean corpuscular hemoglobin</i> ; mittlerer Hämoglobingehalt/Erythrozyt
MCHC	<i>mean corpuscular hemoglobin concentration</i> ; mittlere HGB-Konzentration/Ery
MCV	<i>mean corpuscular volume</i> ; mittleres Erythrozytenvolumen
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule (Torr)
mmol	Millimol
MODS	Multiorgandysfunktions-Syndrom
MPA	Medroxyprogesteronacetat
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
MV	mean value, arithmetischer Mittelwert
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- κ B	nukleärer Faktor kappa B
ng	Nanogramm
NG	Neutrophile Granulozyten
NGF	<i>nerve growth factor</i> ; Nervenwachstumsfaktor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NOX2	NADPH-Oxidase-2
NR	nukleärer Rezeptor
O ₂	molekularer Sauerstoff

O ₂ ^{·-}	Superoxid-Anion
OP	Operation
OPCAB	<i>off-pump coronary artery bypass</i> ; Bypass-OP ohne Herz-Lungen-Maschine
P+Ö	Progesteron plus Östrogen
PaCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PaO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
PARP	Poly-Adenosinbiphosphat-Ribose-Polymerase
PC	<i>personal computer</i> ; privater Rechner
pg	Pikogramm
pH	pH-Wert
PHOX	Phagozytische NADPH-Oxidase
PLT	<i>platelets</i> ; Thrombozytenzahl
PNS	peripheres Nervensystem
PR (-A; -B)	Progesteronrezeptor-A und -B
PRE	Progesteron-responsives Element
PRR	<i>pattern recognition receptors</i> ; Mustererkennungsrezeptoren
ref	<i>reference ranges</i> , Referenzwerte
RBC	<i>red blood cells</i> ; Erythrozytenzahl
RMSD	<i>root mean square deviation</i> ; Standardabweichung
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
RPM	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SIRS	systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SOD	Superoxid-Dismutase
sog.	sogenannt
STABW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tween20-haltige Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TGF-β1	<i>transforming growth factor-β1</i> ; Transformierender Wachstumsfaktor-β1
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TP10	löslicher humaner Komplement-Rezeptor Typ 1
Tsd.	Tausend
u. a.	unter anderem
V.	Vene
Vv.	Venen
v. a.	vor allem
VEL	Vollelektrolytlösung

VG	Versuchsgruppe
Vol %	Volumenprozent
WBC	<i>white blood cells</i> ; Leukozytenzahl
WHO	<i>World Health Organization</i> ; Weltgesundheitsorganisation
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
ZSF	Zerebrospinalflüssigkeit

12 Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde durch ein Stipendium der Hanns-Seidel-Stiftung e.V. aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert.

Ich bedanke mich nach Abschluss dieser Doktorarbeit ganz herzlich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger für die Übernahme der Arbeit an das Institut für Physiologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und ebenso für seine großartige Unterstützung bei der Bewerbung um das Stipendium und bei allen weiteren Fragen in Bezug auf die Dissertation.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Univ.-Prof. Dr. med., Dipl. phys. E. Kochs, Direktor der Klinik für Anaesthesiologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, Herrn Prof. Dr. med. M. Blobner, Oberarzt der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München und Fau PD Dr. med. Bettina Jungwirth für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Überlassung des Themas. Bei Herrn Prof. Dr. med. M. Blobner bedanke ich mich zusätzlich sehr herzlich für seine Hilfe bei der Bewerbung um das Stipendium.

Schwer mit Worten auszudrücken ist mein Dank an meine Betreuerin Frau Dr. med. vet. Kristine Kellermann, die mit ihrer immer freundlich-geduldigen, freundschaftlichen und dennoch professionellen Art der „Mitarbeiterführung“ ein Vorbild für alle Chefs dieser Welt sein sollte. Danke für die Motivation, die Hilfen, Anleitungen und Anregungen, für die schnellen und präzisen Korrekturen und für vieles vieles Weitere! Du bist und bleibst die Beste!

Großer Dank gilt auch allen Verantwortlichen und Mitarbeitern des Instituts für Begabtenförderung der Hanns-Seidel-Stiftung in München für die immer freundliche und zuvorkommende Unterstützung im Rahmen meiner Förderung. Annika Menke von der Hochschulgruppe München VIII danke ich ganz besonders für die tolle Leitung der Hochschulgruppe und für die Hilfe bei allen Fragen rund um das Stipendium.

Meinen Mitdoktoranden Julia Scheer, Dr. med. vet. Diana Fendl, Johanna Walter und Vojta Kadera und unseren MTA's Nina Bayer und Lisa Barachkova danke ich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit und für die tolle Kollegialität, die in dieser Form bestimmt nicht überall zu finden ist. Das Arbeiten mit Euch hat wirklich immer Spaß gemacht! Herausheben möchte ich an dieser Stelle meine liebe Kollegin Martina Stigler, die mit mir die Betreuung des Tierraumes übernommen hat: Ich hätte mir keine bessere Mitstreiterin wünschen können! Danke Martina! Unseren Vorgängern Susan Vlachakis und Dr. med. vet. Stefan Friedrich danke ich für die gute Einarbeitung und für alle weitere Hilfe.

Weiterhin möchte ich den Tierpflegerinnen und Tierpflegern sowie den OP-Schwestern des Zentrums für präklinische Forschung sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit und das stets freundliche Miteinander danken. Ebenso ein großes Dankeschön an Herrn Sepp Straßmair und Frau Doris Droese für die tadellose Versorgung des Labors und die freundlichen Worte!

Ebenfalls ein großes Dankeschön an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe EEG und Signalverarbeitung der Klinik für Anaesthesiologie des Klinikums rechts der Isar, insbesondere an Herrn Adem Omerovic und Herrn Matthias Kreuzer, für ihre große fachliche Unterstützung, Zeit und Mühe bei der Entwicklung des telemetrischen Alarmsystems und meine Einarbeitung in die zugehörige Software.

Am Ende aller Danksagungen stehen diejenigen, für die ein einfacher Dank niemals ausreichen wird: meine Eltern, die mir all dies ermöglicht haben und die mich immer mit einer Selbstverständlichkeit, die nun einmal keine ist, unterstützt haben. Meine Großeltern Anna (+) und Rupert (+), die mir die Liebe zu und den Respekt vor den Tieren nähergebracht haben und gleichzeitig meinen Sinn für das Praktische, Einfache und Wesentliche im Leben geschärft haben. Und der Mann an meiner Seite, der immer bedingungslos an mich geglaubt hat und schon alleine deshalb einen großen Anteil an dieser Arbeit hat.