

Klinik für Anästhesiologie der Technischen Universität München  
des Klinikums rechts der Isar

**Einfluss des Geschlechts und des  
Geschlechtshormonstatus auf die zerebrale Inflammation  
und Apoptose 14 Tage nach extrakorporaler Zirkulation  
mit 45-minütigem tief hypothermem Kreislaufstillstand  
bei der Ratte**

**Lisa Jäger**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
**Doktors der Medizin**  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Manfred Blobner  
2. Prof. Dr. Gerhard Schneider.

Die Dissertation wurde am 13.03.2020 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 30.12.2020 angenommen.

**In liebevoller Erinnerung an  
meinen Großvater  
Max Caroli**

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Extrakorporale Zirkulation und tief hypothermer Kreislaufstillstand</b>	<b>1</b>
1.1.1 Anwendungsgebiete beim Erwachsenen	1
1.1.2 Neuroprotektion durch Hypothermie	2
1.1.3 Komplikationen	4
<b>1.2 Zerebrale Ischämie, Inflammation und Apoptose</b>	<b>5</b>
1.2.1 Parameter der Inflammation und Apoptose	8
1.2.2 Geschlechtsspezifische Inflammation und Apoptose	12
<b>1.3 Einfluss des Geschlechts auf das Outcome nach herzchirurgischen Operationen beim Menschen</b>	<b>13</b>
1.3.1 Vorbestehende kardiovaskuläre Risikofaktoren	14
1.3.2 Interaktion zwischen Geschlechts- und Altersunterschieden	14
1.3.3 Vorbestehende psychosoziale Risikofaktoren	15
1.3.4 Unterschiede im operativen Prozedere	16
1.3.5 Unterschiede im postoperativen Management	16
<b>1.4 Geschlechtshormone und zerebrale Ischämietoleranz</b>	<b>17</b>
1.4.1 Weibliche Geschlechtshormone	17
1.4.2 Unterschiede zwischen prä- und postmenopausalen Frauen	19
1.4.3 Androgene	20
1.4.4 Die männliche Andropause	22
<b>2 PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>23</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Versuchsaufbau</b>	<b>25</b>
3.1.1 Gruppeneinteilung	25
3.1.2 Haltungsbedingungen der Tiere	26
3.1.3 Zeitlicher Versuchsablauf	27
<b>3.2 Versuchsdurchführung</b>	<b>29</b>
3.2.1 Durchführung der Kastration	29
3.2.2 Durchführung der Scheinkastration	30

3.2.3	Durchführung der EKZ mit DHCA	31
3.2.4	Untersuchung der neurologischen Funktion	36
3.2.5	Untersuchung der kognitiven Funktion	37
3.2.6	Entnahme und Präparation des Gehirns	38
3.2.7	Aufbereitung des Gehirns	39
3.2.8	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	39
3.2.9	Immunhistochemische Doppelfärbung	40
3.2.10	Auswertung der Histologie	41
3.2.11	Serumuntersuchungen	42
3.2.12	Statistische Auswertung	42
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Immunhistochemische Doppelfärbungen der neuronalen Inflammationsparameter</b>	<b>43</b>
4.1.1	Nukleärer Faktor "κ-Leichtketten-Enhancer" aktivierter B-Zellen (NFκB)	43
4.1.2	Tumornekrosefaktor α (TNF-α)	45
4.1.3	Stickstoffmonoxid-Synthase i (iNOS)	47
<b>4.2</b>	<b>Immunhistochemische Doppelfärbungen der neuronalen Apoptoseparameter</b>	<b>49</b>
4.2.1	Caspase-3	49
4.2.2	Polyadenosinribosepolymerase-1 (PARP-1)	51
<b>4.3</b>	<b>Ergebniszusammenfassung: Physiologische Parameter, modifizierter Holeboardtest, neurologische Untersuchung, Gehirnmorphologie und Mortalität</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>54</b>
<b>5.1</b>	<b>Ergebniszusammenfassung</b>	<b>54</b>
<b>5.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>54</b>
5.2.1	NFκB	54
5.2.2	TNF-α und iNOS	56
5.2.3	PARP-1 und Caspase-3	57
<b>5.3</b>	<b>Diskussion der Methoden und Limitierungen</b>	<b>58</b>
5.3.1	Histologische Untersuchung	58
5.3.2	Rattenmodell der EKZ mit 45minütigem DHCA	59
5.3.3	Der hormonelle Status der Tiere	60
5.3.4	Die Ratte als Modell für den Menschen	61

<b>5.4</b>	<b>Abschließende Betrachtung</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>64</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>65</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>77</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>78</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>84</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Extrakorporale Zirkulation und tief hypothermer Kreislaufstillstand

Seit der Erfindung und erstmaligen Durchführung der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) im Sinne eines kardiopulmonalen Bypasses (cardiopulmonary bypass, CPB) durch Gibbon im Jahr 1953 ermöglicht diese Technik die Durchführung von Operationen am offenen Herzen mit einem blutleeren, bewegungsarmen und übersichtlichen Operationsfeld. Das venöse Blut wird unter Umgehung von Herz und Lunge in ein künstliches Kurzschlussystem außerhalb des Körpers gelenkt, welches aus Apparaturen zur künstlichen Aufrechterhaltung des Blutflusses und Gasaustausches besteht. Nach der Passage dieser Herz-Lungen-Maschine (HLM) fließt das nun mit Sauerstoff (O<sub>2</sub>) angereicherte Blut wieder zurück in den Körperkreislauf [GIBBON, 1954].

Besonders komplizierte thorakale Eingriffe am Herzen und darüber hinaus auch an der Aorta und anderen größeren Gefäßen können, neben der Anwendung der EKZ, den zusätzlichen Einsatz des tief hypothermen Kreislaufstillstandes (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) erforderlich machen. Der DHCA ermöglicht komplizierte Gefäßrekonstruktionen ohne Gefäßklemmen und Kanülen [GUPTA und andere (et alii/aliae/alia, al.), 2018; CHAU et al., 2013; KOUCHOUKOS et al., 2012]. Die Kombination des Kreislaufstillstandes mit der tiefen Hypothermie dient dazu, trotz einer globalen Ischämie des Gehirns postoperative neurologische Defizite zumindest zu minimieren [CHAU et al., 2013]. Beide Techniken wurden zunächst im pädiatrischen Bereich eingesetzt. Lewis und Taufic führten den DHCA erstmals erfolgreich an einem 5-jährigen Patienten im Jahr 1953 durch [LEWIS et al., 1953].

### 1.1.1 Anwendungsgebiete beim Erwachsenen

Die EKZ wird auch heute noch vielfältig im Bereich der pädiatrischen Herzchirurgie, wie bei der operativen Versorgung kongenitaler Herzfehler, eingesetzt. Doch auch beim erwachsenen Patienten erfordern bestimmte Operationen, wie die Versorgung mit einem Herzklappenersatz oder einem aortokoronaren Bypass (coronary artery bypass graft, CABG), den Einsatz dieser Technik.

Bei Rekonstruktionen oder einem prothetischen Ersatz der aufsteigenden thorakalen Aorta oder des Aortenbogens [KOUCHOUKOS 2012; SVYATETS et al., 2010], wird in der Regel

zusätzlich der DHCA benötigt. Er ermöglicht dem Gefäßchirurgen die Beurteilung des Gefäßinneren bezüglich der Notwendigkeit einer Umgehung beziehungsweise (bzw.) eines prothetischen Ersatzes arteriosklerotischer Segmente. Mögliche Indikationen sind Aortenaneurysmen sowie chronische Aortendissektionen [CORVERA *et al.*, 2012]. Sehr seltene Fälle von intravaskulär wachsenden Tumoren, wie die intravenöse Leiomyomatose [ZHANG *et al.*, 2010] oder das Nierenzellkarzinom mit einem Tumorthrombus Grad IV in der Vena cava inferior, erfordern umfangreiche Zwei-Höhlen-Eingriffe mit ausgedehnten Vasotomien, um die Tumormassen komplett zu entfernen. Auch für diese Eingriffe kann der DHCA einen bestmöglichen Schutz des Organismus vor einer ischämischen Schädigung gewährleisten [ZHU *et al.*, 2018; DASHKEVICH *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2010].

### 1.1.2 Neuroprotektion durch Hypothermie

Der Einsatz der Hypothermie als therapeutische Maßnahme zur Neuroprotektion bei verschiedenen zerebralen Funktionsstörungen und Schädigungen, wie zum Beispiel (z.B.) bei Schlaganfällen, traumatischen Gehirnschädigungen, globaler Ischämie nach einem Kreislaufstillstand oder hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie bei Neugeborenen, war zeitweise sehr verbreitet [KURISU *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018a]. Grundlage hierfür waren experimentelle Studien, die zeigen konnten, dass die Hypothermie nahezu alle bereits erforschten Zelltodmechanismen, einschließlich der Signalwege, die zu Exzitotoxizität, Azidose, Inflammation und der Produktion von freien Radikalen führen, abmildert [GUPTA *et al.*, 2018; KURISU *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2017; THASILI-FAHADAN *et al.*, 2018; SCHMITT *et al.*, 2014; YENARI & HAN, 2012]. Schon eine geringe Reduktion der Temperatur während einer Gehirnschämie begrenzt das Ausmaß des ischämischen Neuronenschadens erheblich [YANG *et al.*, 2009]. Die Hypothermie senkt den Energiebedarf der Zellen und kann dadurch den Substratmetabolismus zum Erhalt der Zellaktivität in gewissem Umfang aufrechterhalten. Eine Senkung der Körpertemperatur um 1 Grad Celsius (°C) bewirkt im menschlichen Gehirn eine Abnahme des Grundumsatzes um 5 – 7 % [KURISU *et al.*, 2018; KARNATOVSKAIA *et al.*, 2014; ZIGANSHIN *et al.*, 2013; SVYATETS *et al.*, 2010; ARRICA *et al.*, 2007]. Somit stellt die Hypothermie-induzierte Neuroprotektion zunächst einen passiven Prozess dar, der die Substraterschöpfung und die damit einhergehende terminale Depolarisation der Zellen verzögern kann. Auch alle nachgeschalteten pathologischen Prozesse können durch die Hypothermie abgemildert werden [YANG *et al.*, 2009]. Über die Modifikation des zerebralen Blutflusses wird auch die für den postischämischen Reperfusionsschaden verantwortliche Hyperämie abgeschwächt [YENARI & HAN, 2012]. Somit werden die Gefäßpermeabilität, die Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke sowie die Entstehung von vaskulären Ödemen reduziert [THASILI-FAHADAN *et al.*, 2018; SCHMITT *et al.*, 2014; YENARI & HAN, 2012; CAMPOS *et al.*, 2012].

Darüber hinaus werden der Hypothermie auch antiinflammatorische und antiapoptotische Effekte im Sinne einer aktiven Neuroprotektion zugesprochen. Sie reduziert die Aktivierung, Translokation und DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors „nukleärer Faktor „ $\kappa$ -Leichtketten-Enhancer‘ aktivierter B-Zellen“ (nuclear factor „ $\kappa$ -light-chain-enhancer“ of activated B-cells, NF $\kappa$ B) [KURISU et al., 2018; LEE et al., 2017; CAMPOS et al., 2012; YENARI & HAN., 2012; KELLERMANN et al., 2009]. Die Freisetzung von Zytochrom C sowie die Aktivierung von Cysteinproteasen, die Zielproteine an einer Peptidbindung C-terminal von Aspartat schneiden (cysteinyl-aspartate specific protease, Caspase), werden durch die Hypothermie ebenfalls vermindert. Außerdem kann sie die Expression der B-Zell-Lymphom-2 (B cell lymphoma-2, BCL-2) -Familie verändern [KURISU et al., 2018; TAHSILI-FAHADAN et al., 2018; LEE et al., 2017; YENARI & HAN, 2012]. Diese zusätzliche aktive Komponente der Hypothermie bei der Reduktion der zerebralen Inflammation und Apoptose erklärt auch den nichtproportionalen Zusammenhang zwischen der Temperaturabnahme und dem Ausmaß der Neuroprotektion. Dieser kann nicht allein durch die Einsparung von Adenosintriphosphat (ATP) erklärt werden. Während ATP-Verlust und Exzitotoxizität im Ischämiegebiet innerhalb von wenigen Minuten auftreten, kann die Hypothermie auch dann noch wirken, wenn damit erst einige Zeit nach der eigentlichen Schädigung begonnen wird [KURISU et al., 2018; YENARI & HAN, 2012]. Und schließlich profitiert das Gehirn auch von einer erhöhten Überlebensrate der Mikroglia unter hypothermen Bedingungen. Mikroglia steht in der postischämischen Phase für Reparationsmechanismen, wie die Phagozytose des nekrotischen Zelldebris, vermehrt zur Verfügung [WEBSTER et al., 2009].

Die beschriebenen zerebroprotektiven Effekte der Hypothermie sind abhängig von der Temperaturtiefe. In tierexperimentellen Studien scheinen extrem niedrige Temperaturen (5 – 7 °C) während des DHCA eine potenziell bessere Neuroprotektion zu gewährleisten als die üblichen 18 °C. Im Gegensatz dazu besteht beim Menschen ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der intraoperativen Hypothermie und der postoperativen Entwicklung einer Choreoathetose (Hierunter versteht man eine hyperkinetische neurologische Störung, die durch einen Wechsel zwischen plötzlich einschließenden und langsam schraubenden unwillkürlichen Bewegungen der Extremitäten und der Gesichtsmuskulatur gekennzeichnet ist). Daher haben sich in der klinischen Praxis Temperaturen über 15 °C bewährt. Ebenso spielt auch der Zeitfaktor eine Rolle. Eine Kühlungszeit von über 20 Minuten (min) ist notwendig, um eine homogene Kühlung des Gehirns sowie eine effektive Neuroprotektion zu gewährleisten [ARRICA et al., 2007]. Andererseits nimmt ab einer Dauer des DHCA von mehr als 40 min wiederum die Mittel- und Langzeitinvalidität zu [KUO et al., 2011; ARRICA et al., 2007]. Im Rahmen der Wiedererwärmung nach DHCA sollten hypertherme Episoden vermieden werden, die

bekanntermaßen den postischämischen Reperfusionsschaden nach EKZ in gut durchbluteten Geweben verschlimmern können. [VAN HARTEN *et al.*, 2012]. Der neuroprotektive Erfolg der Hypothermie hängt mitunter von der Wiedererwärmungsgeschwindigkeit des Organismus ab. Eine langsame Wiedererwärmung verursacht einen geringeren histologischen Gehirnschaden als eine schnelle Wiedererwärmung [GORDAN *et al.*, 2010].

### 1.1.3 Komplikationen

Bis zu 80 % der Patienten leiden nach Herzoperationen an kognitiven Dysfunktionen mit Einschränkungen des Kurzzeitgedächtnisses, der Konzentration und des Sprachverständnisses sowie daraus folgender sozialer Isolation [HUDETZ *et al.*, 2011]. Diese Beeinträchtigungen sind auf Gehirnschädigungen verschiedener Schweregrade zurückzuführen, deren Bandbreite von vorübergehenden, relativ leichten neurokognitiven Defiziten bis hin zu schweren Hirninfarkten reicht [BERGER *et al.*, 2018; DANIELSON *et al.*, 2018; GUPTA *et al.*, 2018; OKITA, 2018; KNIPP *et al.*, 2017]. Sie führen zu einer erhöhten Mortalität und längeren Krankenhausaufenthalten nach herzchirurgischen Operationen [GOTO *et al.*, 2007].

Die Ursachen dieser neurologischen Komplikationen sind vielfältig. So kann es beispielsweise beim Kontakt des Blutes mit den künstlichen Oberflächen der HLM zur Aktivierung des Gerinnungssystems mit der Bildung von Mikrothromben kommen, die in zahlreichen Organen kleine Infarkte verursachen können [BERGER *et al.*, 2018; DANIELSON *et al.*, 2018; KNIPP *et al.*, 2017; VAN HARTEN *et al.*, 2012]. Größere Infarkte können durch den Abgang vorbestehender arteriosklerotischer Plaques oder Thromben im Bereich der kanülierten Gefäße entstehen [BERGER *et al.*, 2018; OKITA, 2018]. Ferner werden auch Entzündungszellen aktiviert und Entzündungsmediatoren freigesetzt, wobei die Ursachen hierfür sowohl in der Anwendung der HLM als auch in der Traumatisierung durch den operativen Eingriff selbst liegen können [BERGER *et al.*, 2018; DANIELSON *et al.*, 2018; SUGITA & FUJII, 2018]. Ödeme und durch Mikrozirkulationsstörungen verursachte fokale Ischämien führen in ihrer Gesamtheit zu einer systemischen Inflammation, die insbesondere bei Zytokin-vermittelten Störungen der Blut-Hirn-Schranke auch das Gehirn betreffen kann [DANIELSON *et al.*, 2018; ABRAHAMOV *et al.*, 2017; VAN HARTEN *et al.*, 2012]. Da der systemischen Inflammation während der EKZ eine Schlüsselrolle für anschließende Komplikationen sowie der damit verbundenen Morbidität und Mortalität zugeschrieben wird, stellt auch jegliche Form der Prädisposition für proinflammatorische Zustände einen Risikofaktor dar. Sowohl genetische Prädispositionen, z.B. spezielle Genotypen von Apolipoprotein B, P-Selektin, C-reaktivem Peptid, Interleukin-6 et cetera (etc.), als auch Komorbiditäten, wie Atherosklerose, periphere arterielle

Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus oder Autoimmunerkrankungen, zählen dazu [VAN HARTEN *et al.*, 2012].

Auch die neuroprotektive Wirkung des DHCA hat ihre Grenzen. Die Kühlung des gesamten Körpers geht mit Schüttelfrost und einem erhöhten postoperativen O<sub>2</sub>-Bedarf einher. Veränderungen der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik zahlreicher Medikamente führen unter anderem (u.a.) zu einem erhöhten Anästhetikabedarf unter hypothermen Bedingungen. Außerdem erhöht sich das Risiko einer arteriellen Hypotonie sowie von Arrhythmien, postoperativen Infektionen und Sepsis [KUO *et al.*, 2011]. Überdies induziert die Hypothermie eine systemische Hyperglykämie, Abweichungen im Elektrolythaushalt und einen Anstieg des arteriellen Kohlenstoffdioxidpartialdrucks (paCO<sub>2</sub>) sowie des Fettmetabolismus. Dies kann zu einer metabolischen Azidose führen, die intraoperativ kontrolliert und behandelt werden muss. Veränderungen der Plättchenfunktion, Thrombozytopenien [CAMPOS *et al.*, 2012] sowie verminderte Fibrinogen- und Thrombinproduktion [YENARI & HAN, 2012] können zu Gerinnungsstörungen und Blutungen führen. Ferner zeigen sich Erhöhungen der Amylase- und Lipasewerte bis hin zur Pankreatitis [CAMPOS *et al.*, 2012], akutes oder chronisches Nierenversagen, pulmonale Insuffizienz sowie Linksherzinsuffizienz. Die Mortalitätsraten für Operationen der Aorta, die den DHCA erfordern, liegen bei 10 – 20 % [SVYATETS *et al.*, 2010].

## 1.2 Zerebrale Ischämie, Inflammation und Apoptose

Das Gehirn weist einen hohen Umsatz an Glukose und O<sub>2</sub> auf und ist auf die kontinuierliche Zufuhr dieser Substrate angewiesen. Daher führt die Unterbrechung des zerebralen Blutflusses zunächst zu einem Energiemangel, der bei Nichtbeheben in einer Gehirnschädigung mündet. Neurone sind früher betroffen als Gliazellen oder Endothelzellen [PUIG *et al.*, 2018]. Aktionspotentiale und synaptische Aktivität kommen während der zerebralen Ischämie zum Erliegen, da diese Vorgänge circa (ca.) 75 % der Energie benötigen. Die ATP-Verarmung führt zu einer allgemeinen Abnahme an Phosphorylierungsvorgängen. Daher verlieren die Neurone die Fähigkeit, ihr negatives Ruhemembranpotential mittels der Natrium-Kalium-ATPase (jeweils ionisiert: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) aufrecht zu erhalten [FRICKER *et al.*, 2018; MAYOR *et al.*, 2018; PUIG *et al.*, 2018; TAHSILI-FAHADAN *et al.*, 2018; XIANG *et al.*, 2016; IADECOLA *et al.*, 2011; WATTERS *et al.*, 2011; STROSZNAIJDER *et al.*, 2010; SVYATETS *et al.*, 2010]. Die neuronale Depolarisation führt zur Aktivierung spannungsgesteuerter Kalzium (Ca<sup>2+</sup>, ionisiert)-Kanäle. Die resultierende intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Überladung kann über einen osmotischen Flüssigkeitseinstrom in die Zelle ein toxisches Zellödem verursachen. Hierdurch wird der neuronale Zelltod in Form einer Nekrose unmittelbar induziert. Alternativ tritt er über Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signalwege im Sinne eines

programmierten Zelltodes (Apoptose) verzögert ein [AMANTEA et al., 2018; FRICKER et al., 2018; PUIG et al., 2018; GIRIJALA et al., 2017; KOSTANDY, 2012; LUOMA et al., 2012; SVYATETS et al., 2010]. Unter der Apoptose versteht man eine genetisch kontrollierte Form des Zelltodes, die durch die Caspasen-katalysierte Spaltung zytoskelettaler Bestandteile, Kondensation des Chromatins, DNA-Fragmentierung und Ausbildung von Plasmamembran-Vesikeln gekennzeichnet ist. Sie wird durch eine Zerstörung von Zellbestandteilen, welche die zelleigenen Reparaturkapazitäten übersteigt, eingeleitet [HOTCHKISS et al., 2009].  $\text{Ca}^{2+}$  ist hierbei durch die Aktivierung der Xanthin-Oxidase oder der Calpaine involviert, die zur Zerstörung von Zellstrukturen beitragen [MAYOR et al., 2018; LI et al., 2017; SVYATETS et al., 2010]. Zusätzlich deaktivieren die Calpaine verschiedene antiapoptotische Proteine und aktivieren proapoptotische Proteine, wie Caspase-3 [KOSTANDY, 2012]. Außerdem aktiviert  $\text{Ca}^{2+}$  die sogenannte (sog.) Permeabilitäts-Transitions-Pore (permeability transition pore, PTP) in der inneren Mitochondrienmembran, was zum Austritt proapoptotischer Proteine, wie Zytochrom C, über die PTP führt [ZHAO et al., 2019; FRICKER et al., 2018; ANDRABI et al., 2017; ESPINOSA-GARCÍA, 2013]. Im Extrazellulärraum zeigt sich durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte exzessive neuronale Depolarisation eine massive Akkumulation von exzitatorischen Neurotransmittern [KURISU et al., 2018; LEE et al., 2018; MAYOR et al., 2018; TAHSILI-FAHADAN et al., 2018; ZHANG et al., 2018a]. Die Konversion des Glutamats zu Glutamin sowie dessen rasche neuronale Wiederaufnahme sind aufgrund des Energiemangels gestört [KOSTANDY, 2012; STROSZNAJDER et al., 2010; SVYATETS et al., 2010]. Durch Aktivierung verschiedener Glutamatrezeptoren kann das Glutamat-Überangebot den Zelltod induzieren. Der metabotrope Glutamatrezeptor (mGluR) 1 ist an der Aktivierung der reduzierten Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase beteiligt. Andere Glutamatrezeptoren verstärken wiederum die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Na}^{+}$ - und Chloridionen ( $\text{Cl}^{-}$ , ionisiert) -Akkumulation [ZHANG et al., 2018a; LI et al., 2017; ANRATHER et al., 2016; GUO et al., 2011; IADECOLA et al., 2011; SVYATETS et al., 2010]. Das Phänomen der allgemeinen Überaktivierung von neuronalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und Glutamatrezeptoren wird Exzitotoxizität genannt [FRICKER et al., 2018; MAYOR et al., 2018; VIDALE et al., 2017; ANRATHER et al., 2016]. Eine weitere Komponente des Zelltodes stellt die ischämisch bedingte gewebliche Azidose dar. Sie entsteht durch die Glutamatoxizität sowie durch Säureäquivalente aus der anaeroben Glykolyse und Protonen aus der ATP-Hydrolyse [SIMON et al., 2006]. Während einer schweren Ischämie fällt der extrazelluläre pH-Wert unter 6,0. Hierdurch wird die oxidative Phosphorylierung weiter gehemmt und die Entstehung von oxidativem Stress begünstigt [KOSTANDY, 2012]. Durch Aktivierung von säuresensitiven Ionenkanälen reichert sich  $\text{Ca}^{2+}$  zusätzlich auch spannungsunabhängig im Intrazellulärraum an [VIDALE et al., 2017; SIMON et al., 2006], wodurch wiederum die Glutamatfreisetzung weiter gefördert wird. Außerdem

denaturieren im Rahmen der Azidose viele Proteine und Enzyme im Sinne einer direkten Zellschädigung [SVYATETS *et al.*, 2010].

Nach Beendigung des DHCA bedingt die Wiederherstellung des Blutflusses und die damit einhergehende Reoxigenierung des Gewebes u.a. eine Intensivierung der Inflamationsreaktion [KURISU *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2018; ELTZSCHIG *et al.*, 2011]. Diese beginnt bereits während des chirurgischen Traumas bzw. der EKZ als systemische Anpassungsreaktion, die ursprünglich darauf abzielt, Verletzungen zu begrenzen und die Heilung zu beschleunigen [YENARI & HAN, 2012]. Ihre akute und chronische Überaktivierung führt jedoch zu Schädigungen im gesamten Körper bis hin zum Multiorganversagen und zum Tod [GIATTI *et al.*, 2012]. Ihren Anfang nimmt die Inflammation mit der intravaskulären Initiierung der Koagulationskaskade. Thrombozyten und Endothelzellen translozieren Adhäsionsmoleküle an ihre Membranoberflächen und aktivieren hierdurch Leukozyten. Diese migrieren dann transendothelial in das perivaskuläre Interstitium und setzen durch IL-1 $\alpha$ -Sekretion die Inflammationskaskade in Gang [MALONE *et al.*, 2019; VIDALE *et al.*, 2017; ANRATHER *et al.*, 2016; IADECOLA *et al.* 2011]. In ihrem Verlauf werden u.a. reaktive Sauerstoffradikale (reactive oxygen species, ROS), Agonisten exzitatorischer Neurotransmitter-Rezeptoren, proinflammatorische Zytokine, Chemokine und Tumornekrosefaktoren (TNF) durch aktivierte Mastzellen, Astrozyten, Mikroglia sowie auch von Neuronen selbst produziert [KOSHNAM *et al.*, 2017; THORNTEN *et al.*, 2012]. Im Rahmen des sog. Reperfusionsschadens wird die Inflammation durch Autoimmunreaktionen verstärkt [GUPTA *et al.*, 2018]. Aus apoptotischen Zellen im Gehirnparenchym entweichen Purine und andere Moleküle in den extrazellulären Raum. Diese unter physiologischen Bedingungen nur intrazellulär vorkommenden Partikel werden auch als Gefahren-assoziierte Molekularmuster-Moleküle (danger-associated molecular pattern molecules, DAMP) bezeichnet. Die DAMP aktivieren Muster-Erkennungs-Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRR), wie die Toll-like-Rezeptoren (TLR), und induzieren über die Aktivierung von NF $\kappa$ B die Expression von proinflammatorischen Proteinen [LEE *et al.*, 2018; KOSHNAM *et al.*, 2017; VIDALE *et al.*, 2017; ELTZSCHIG *et al.*, 2011; IADECOLA *et al.*, 2011; DENES *et al.*, 2010]. Die Exazerbation der Gewebsverletzung durch oxidativen Stress stellt eine weitere Komponente des Reperfusionsschadens dar [GUPTA *et al.*, 2018]. Das Gehirn ist aufgrund seiner hohen oxidativen metabolischen Aktivität, seines hohen Gehalts an ungesättigten Fettsäuren [LEE *et al.*, 2017], seiner relativ geringen antioxidativen Kapazität sowie seiner inadäquaten Reparaturaktivität besonders empfindlich gegenüber oxidierenden Substanzen [UCHIDA *et al.*, 2010]. Als Quellen der ROS im postischämischen Hirngewebe wurden drei verschiedene Produktionsstätten identifiziert, nämlich die mitochondriale Atmungskette, die Xanthin-Oxidase und die NADPH-Oxidase [BRANN *et al.*, 2012]. So wird

z.B. das ROS Disauerstoff ( $O_2^-$ ) durch die NADPH-Oxidase gebildet. Gleichzeitig produziert die de novo exprimierte induzierbare Stickstoff-Monoxid-Synthase i (inducible isoform of nitric oxide synthase, iNOS) große Mengen an Stickstoffmonoxid (NO). NO reagiert vorzugsweise mit  $O_2^-$  zum zytotoxischen Peroxinitrat [MAYOR et al., 2018; IADECOLA et al., 2011]. Die freien Radikale induzieren die Lipidperoxidation und reduzieren die vasokonstriktorische Antwort auf eine arterielle Hypokapnie. Dadurch erhöht sich die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und die Diapedese der Leukozyten wird erleichtert. Gleichzeitig schränkt die gesteigerte Gefäßpermeabilität die  $O_2$ -Verfügbarkeit durch das entstehende perivaskuläre Ödem weiter ein [ELTZSCHIG et al., 2011]. Außerdem stören die oxidierenden Substanzen die Proteinbiosynthese und die respiratorische Funktion der Mitochondrien. Durch Schädigung der DNA können sie den Zelltod direkt induzieren [GUO et al., 2011].

### 1.2.1 Parameter der Inflammation und Apoptose

#### 1.2.1.1 Stickstoffmonoxid-Synthase i (iNOS)

Die iNOS wird nach einer Gehirnschämie in infiltrierenden Entzündungszellen, in den zerebralen Blutgefäßen [PARK et al., 2006] sowie in Neuronen [ZHENG et al., 2016; CORSANI et al., 2008] der ischämischen Region exprimiert. Sie katalysiert die Bildung von NO bei der Umwandlung von L-Arginin zu Zitrullin unter Mitwirkung von NADP als Kofaktor. NO ist an vielen Prozessen, wie Vasodilatation, Inflammation, Muskelkontraktion und Neurotransmission, beteiligt [LUO et al., 2007; ZHU et al., 2006]. In großen Mengen verursacht es jedoch oxidativen Stress [PARK et al., 2006]. Dabei scheint ein Unterschied zu bestehen, ob NO durch die iNOS oder die neuronale NOS (nNOS) produziert wird [LUO et al., 2007]. Die Expression der iNOS nimmt in den Interneuronen unter ischämischen Bedingungen zu, während diejenige der nNOS abnimmt [CORSANI et al., 2008; LUO et al., 2007]. Bei der nNOS handelt es sich um eine unter physiologischen Bedingungen aktive kalziumabhängige Enzym-Isoform, die für eine kurzzeitige NO-Freisetzung als Antwort auf physiologische Stimuli sorgt. Ihr NO unterdrückt die iNOS-Expression durch Hemmung von NFκB. Außerdem unterdrückt die nNOS die Neurogenese über die Hemmung der NMDA-Rezeptoraktivität, des cAMP-antwortenden Element-Bindungsproteins (cAMP response element binding protein, CREB) und der iNOS-Expression [ZHU et al., 2006]. Während einer Ischämie werden Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , freigesetzt, welche die Aktivität der nNOS reduzieren und dadurch indirekt die Expression der iNOS fördern. Außerdem wird die Expression der iNOS im Rahmen der Exzitotoxizität kalziumgesteuert über die Transkriptionssteigerung von NFκB gefördert. Im Gegensatz zur nNOS ist die iNOS

konstant aktiv und produziert NO kalziumunabhängig über einen längeren Zeitraum. Dies steigert die Phosphorylierung von CREB und damit die Neurogenese [CORSANI *et al.*, 2008; LUO *et al.*, 2007]. Allerdings produziert die iNOS NO völlig unreguliert und in exzessiven Mengen. Daher weist sie neben ihren neuroprotektiven Eigenschaften, genau wie auch TNF- $\alpha$  und NF $\kappa$ B, ein neurotoxisches Potential auf. Sowohl die nNOS als auch die iNOS können über eine durch NO und Peroxynitrat induzierte DNA-Schädigung die Apoptose einleiten [FRICKER *et al.*, 2018; BLANCO *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2009]. Nach Amitai ist die iNOS jedoch nicht ausschließlich induzierbar, sondern wird auch unter physiologischen Bedingungen konstitutiv in Astrozyten exprimiert. Im Neokortex der gesunden Maus macht ihre Aktivität ca. 10 % der gesamten NOS-Aktivität aus und sie ist an der Modulation der Neurotransmission beteiligt [AMITAI, 2010].

### **1.2.1.2 Der nukleäre Faktor „ $\kappa$ -Leichtketten-Enhancer“ aktivierter B-Zellen (NF $\kappa$ B)**

Seinen Namen verdankt NF $\kappa$ B seiner erstmaligen Entdeckung als Regulator für die Expression des  $\kappa$ -Leichtketten-Gens in B-Zellen. NF $\kappa$ B ist jedoch ubiquitär vorhanden und ermöglicht durch seine Induzierbarkeit schnelle transiente Änderungen der Genexpression als Anpassung an eine veränderte Zellumgebung [HAYDEN *et al.*, 2012].

NF $\kappa$ B besteht aus fünf Untereinheiten (Eigennamen: p50, p52, c-Rel, p65 (= RelA) und RelB), die Homo- und Heterodimere in verschiedenen Kombinationen bilden. In ihrer inaktiven Form liegen diese Dimere im Komplex mit NF $\kappa$ B-inhibitorischen Proteinen (I $\kappa$ B) im Zytoplasma vor [ZHANG *et al.*, 2018b; HAYDEN *et al.*, 2012; CHUANG *et al.*, 2010; RIDDER *et al.*, 2009; VALLABHAPURAPU & KARIN, 2009]. Ihre Aktivierung erfolgt durch proinflammatorische Zytokine, intrazelluläre mikrobielle Bestandteile oder zytotoxisch wirksame Agenzien, wie Chemotherapeutika, ionisierende Strahlung, UV-Strahlung, oxidativer Stress und Hypoxie [RIDDER *et al.*, 2009]. Neben seiner Bedeutung bei pathologischen Vorgängen im Gehirn erfüllt NF $\kappa$ B auch physiologische Aufgaben im Bereich der Gehirnentwicklung und der Verhaltenssteuerung durch Transkription in Abhängigkeit von der synaptischen Aktivität [CHUANG *et al.*, 2010]. Während der zerebralen Ischämie wird NF $\kappa$ B hauptsächlich in Neuronen, aber auch in Endothelzellen, Astrozyten und Mikroglia, aktiviert. Diese Aktivierung erfolgt über verschiedene Wege, die jeweils in der Phosphorylierung von I $\kappa$ B-Kinasen (IKK) münden. Zu den möglichen Aktivatoren zählen proinflammatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$ . Auch DAMP aus apoptotischen oder nekrotischen Zellen können u.a. über die Aktivierung von TLR die IKK-Aktivität steigern. Die Hypoxie während der Ischämie führt über die Hemmung der Propylhydrolase ebenfalls zu einer NF $\kappa$ B-Aktivierung. Die IKK phosphorylieren und deaktivieren wiederum die I $\kappa$ B, so dass NF $\kappa$ B aus dem Komplex mit I $\kappa$ B dissoziiert und in den Zellkern gelangt [RIDDER *et al.*, 2009]. Als Transkriptionsfaktor erfüllt

NFκB Funktionen als zentraler Regulator der Immunantwort und Inflammation. Er ist an zellulären Stressreaktionen sowie an der Regulation der Zellproliferation und Apoptose beteiligt. In Folge seiner vielfältigen Funktionen führt eine dysregulierte Aktivierung von NFκB zu schweren Erkrankungen, wie Autoimmunerkrankungen und Tumoren [SHIH *et al.*, 2015]. Durch Bindung an spezifische DNA-Abschnitte induziert er die Expression vieler verschiedener proinflammatorischer Proteine, u.a. von TNF-α, IL-1α und β, IL-6 und iNOS [SHIH *et al.*, 2015; RIDDER *et al.*, 2009]. NFκB kann sowohl pro- als auch antiapoptotische Wirkungen entfalten [CHUANG *et al.*, 2010; TAMATANI *et al.*, 2000]. Seine Untereinheiten p50 und p65 induzieren eine pro-apoptotische Genexpression. Tatsächlich ist das p50/p65-Dimer in Verbindung mit Pathologien des zentralen Nervensystems die vorherrschende NFκB-Form. Im Gegensatz dazu werden der Untereinheit c-Rel antiapoptotische Eigenschaften zugeschrieben [LANZILLOTTA *et al.*, 2015; SHIH *et al.*, 2015; CHUANG *et al.*, 2010]. Die sog. ischämische Präkonditionierung kann auf die NFκB-Funktion zurückgeführt werden. Nach einer kurzen Episode der Gehirnschämie unterhalb der Schwelle zum Zelltod wird NFκB in Neuronen aktiviert und wirkt bei einer anschließenden längeren Gehirnschämie neuroprotektiv. Möglicherweise basiert dieser Effekt darauf, dass NFκB die Transkription seines eigenen Inhibitors IκBα im Sinne eines negativen Feedbacks induziert [RIDDER *et al.*, 2009; VALLABHAPURAPU & KARIN, 2009]. Außerdem sind neuroprotektive Mediatoren bekannt, wie Calbindin und die Mangan-Superoxid-Dismutase [WATTERS *et al.*, 2011] sowie Bcl-2 und Bcl-x als Zytochrom-C-Inhibitoren [ZHANG *et al.*, 2018b; TAMATANI *et al.*, 2000], deren Expression durch NFκB hochreguliert wird.

### 1.2.1.3 Tumornekrosefaktor α (TNF-α)

Das durch NFκB induzierbare Zytokin TNF-α wirkt multifunktionell proinflammatorisch mit sowohl neurotoxischen als auch neuroprotektiven Eigenschaften [TAHSILI-FAHADAN *et al.*, 2018; CEULEMANS *et al.*, 2010]. Es ist an der Regulation der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, oxidativem Stress, Rekrutierung von Immunzellen, Apoptose, Wundheilung und gewebsspezifischen Reparaturmechanismen beteiligt [DENES *et al.*, 2010]. Ebenso beeinflusst TNF-α Veränderungen der Gefäßpermeabilität und Ödembildung durch Verstärkung der Koagulation und Endothelzellpermeabilität sowie durch Expressionsinduktion von Adhäsionsmolekülen [GUO *et al.*, 2011; DENES *et al.*, 2010]. Zusätzlich besitzt TNF-α auch neuromodulatorische Funktionen, wie die Aktivierungsregulation von Mikroglia und Astrozyten [THORNTON *et al.*, 2012; DENES *et al.*, 2010] oder die Modulation der glutamatergen Neurotransmission und Plastizität [LAMBERTSON *et al.*, 2019]. Als wichtiger Mitverursacher der Exzitotoxizität stimuliert TNF-α die exzessive Glutamatfreisetzung aus Mikroglia durch Glutaminaseaktivierung [TAKEUCHI *et al.*, 2006]. TNF-α entfaltet seine Wirkungen durch

Bindung an die TNF- $\alpha$ -Rezeptoren (TNFR) 1 und 2, die sich auf den Zelloberflächen von Neuronen, Gliazellen und Endothelzellen befinden. TNFR1 ist aufgrund seiner intrazellulären Todesdomänensequenz auch als „Todesrezeptor“ bekannt. Durch Internalisierung des aktivierten TNFR1 kann das Adapterprotein TNFR1-assoziiertes Todes-Domänen-Protein (TNFR1-associated DEATH domain protein, TRADD) an diese intrazelluläre Todesdomänensequenz binden [WATTERS *et al.*, 2011]. Mit Hilfe von TRADD kann TNFR1 auch ohne intrinsische katalytische Aktivität intrazelluläre Signale generieren, die über IKK-Phosphorylierung zur NF $\kappa$ B-Aktivierung [VALLABHAPURAPU & KARIN, 2009] oder über Caspasenaktivierung zur Apoptose führen. Auch das Fas (Eigenname eines Todesrezeptors, der zur TNF- $\alpha$ -Rezeptor-Superfamilie gehört)-assoziierte Todes-Domänen-Protein (Fas-associated death domain protein, FADD) kann entweder direkt an die Todesdomänensequenz von TNFR1 oder an den TNFR1-TRADD-Komplex binden und damit die autokatalytische Spaltung der Pro-Caspase-8 induzieren [FRICKER *et al.*, 2018; WATTERS *et al.*, 2011]. Ein anderer Signalweg führt über die Bindung des TNF- $\alpha$ -Rezeptor-assoziierten Faktors-2 (TNF- $\alpha$ -receptor-associated factor-2, TRAF-2) an TRADD zur Aktivierung der Caspase-2. TRAF-2 wurde ursprünglich als Signalmolekül des TNFR2 identifiziert. Es kann direkt an seine intrazelluläre Domäne binden. Somit führt die Aktivierung beider Rezeptorsubtypen zu ähnlichen intrazellulären Signalkaskaden. Unterschiede bestehen im zeitlichen Verlauf der NF $\kappa$ B-Aktivierung. Während bei der Aktivierung von TNFR1 die NF $\kappa$ B-Aktivierung schnell und transient erfolgt, führt die TNFR2-Aktivierung zu einer langsameren und persistierenden Antwort. Durch Variationen des TNFR1-TNFR2-Quotienten auf der Zelloberfläche wird letztlich die Wirkung von TNF- $\alpha$  bestimmt [WATTERS *et al.*, 2011]. Eine neuroprotektive Rolle wird TNF $\alpha$  hauptsächlich über seine Wirkung an TNFR2 zugeschrieben [THORNTON *et al.*, 2012].

### 1.2.1.4 Poly-Adenosintriphosphat-Ribose-Polymerase 1 (PARP-1)

Unter physiologischen Bedingungen fungiert die nukleäre PARP-1 als Schlüsselenzym zur Erhaltung der Genom-Stabilität durch Detektion von DNA-Strangbrüchen. Nach Bindung von geschädigter DNA katalysiert die aktivierte PARP-1 die Spaltung von Nikotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) in Adenosindiphosphat (ADP) und Nikotinamid. Anschließend bilden sich Polymere aus ADP-Ribose (PAR), welche die DNA-Reparatur regulieren. Bei einem ausgedehnten DNA-Schaden im Rahmen von oxidativem Stress kommt es jedoch zu einer PARP-1-Überaktivierung, was zu einer NAD<sup>+</sup>-Verarmung der Zelle führt. Die Glykolyse und Atmungskette in den Mitochondrien werden bei NAD<sup>+</sup>-Mangel beeinträchtigt, was wiederum durch ATP-Verarmung zum Energiemangel der Zelle führt [ZHAO *et al.*, 2019; FRICKER *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018; STROSNAJDER *et al.*, 2010]. Außerdem haben

die übermäßig synthetisierten PAR neurotoxische Wirkungen, deren Ausmaß scheinbar mit der Länge der PAR-Ketten korreliert. Diese Neurotoxizität äußert sich u.a. in Form einer PAR-vermittelten Porenbildung in der Mitochondrienmembran, was zur Induktion der Apoptose führt, sowie einer Aktivierung von proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren [WANG *et al.*, 2011; STROSZNAJDER *et al.*, 2010]. Der PARP-1-vermittelte Zelltod ist Caspase-unabhängig und wird durch den Apoptose-induzierenden Faktor (apoptosis inducing factor, AIF) verursacht. AIF induziert nach seiner Translokation in den Zellkern die Kondensation des Chromatins sowie eine charakteristische hochmolekulare DNA-Fragmentierung [FRICKER *et al.*, 2018; SIEGEL *et al.*, 2010].

### 1.2.1.5 Caspase-3

Die Cysteinprotease Caspase-3 gilt, neben Cytochrom C und oligonukleosomaler DNA-Fragmentierung, als phänotypisches Kennzeichen des Caspase-gesteuerten Zelltods [DU *et al.*, 2004]. Die Apoptose kann entweder über einen intrinsischen Signalweg mit Beteiligung von Cytochrom C und Caspase-9 oder über einen extrinsischen Signalweg mit Aktivierung von membranständigen Todesrezeptoren, wie TNFR1, und Caspase-8 eingeleitet werden. Beide Mechanismen spielen bei der globalen Ischämie des Gehirns eine Rolle. Caspase-3 ist, neben den Caspasen-6 und -7, als Effektorcaspase in beide Signalwege involviert. Die Effektorcaspasen spalten zahlreiche Proteine und aktivieren DNAsen, welche die DNA in eine Vielzahl kleiner Spaltprodukte fragmentieren [SIEGEL *et al.*, 2010; HOTCHKISS *et al.*, 2009]. Außerdem induziert Caspase-3 die Translokation der Proteinkinase C $\delta$  in den Zellkern und die Mitochondrien. Diese Proteinkinase-C-Isoform trägt zur ischämischen Schädigung bei. [YENARI & HAN, 2012]. Unter physiologischen Bedingungen spielt Caspase-3 eine Rolle beim physiologischen Tod von Neuronen während der Entwicklung und Differenzierung des ZNS [D'AMELIO *et al.*, 2010]. Nicht alle Funktionen von Caspase-3 sind mit dem Zelltod assoziiert. Zu ihren nicht apoptotischen Funktionen zählen Modulation der synaptischen Plastizität durch Beteiligung an der Langzeitpotenzierung und Bindung von Untereinheiten des  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, AMPA) -Rezeptors sowie normale Differenzierung und Neuronenwanderung in den Bulbus olfactorius [NORTHINGTON *et al.*, 2011].

### 1.2.2 Geschlechtsspezifische Inflammation und Apoptose

Experimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass junge weibliche Nagetiere im Vergleich zu ihren männlichen Artgenossen verminderte Entzündungsreaktionen nach Verletzungen aufweisen [CAHILL *et al.*, 2017a; MANWANI *et al.*, 2013], während es sich bei älteren Nagetieren genau umgekehrt verhält [MANWANI *et al.*, 2013; LIU & MCCULLLOUGH, 2012]. Ein

umfangreicheres Ausmaß der Gehirnschädigung bei älteren weiblichen Tieren korrelierte bei Liu & McCullough mit einer hochregulierten NF $\kappa$ B-Aktivität. Daraus folgte die Annahme, dass NF $\kappa$ B eine Schlüsselrolle bei der geschlechtsspezifischen ischämischen Gehirnschädigung innehat [LIU & MCCULLOUGH, 2012]. Die Altersabhängigkeit der geschlechtsspezifischen Inflammation impliziert einen Einfluss von Geschlechtshormonen (siehe (s.) Kapitel 1.4).

In Bezug auf die Apoptose zeigt die aktuelle Studienlage noch prägnantere geschlechtsspezifische Unterschiede auf. Nach einem ischämischen Insult im Gehirn werden bei beiden Geschlechtern sowohl der PARP-1- als auch der Caspase-abhängige Apoptoseweg aktiviert [LIU et al., 2011]. Allerdings ist der PARP-1-abhängige Apoptoseweg bei männlichen Individuen vorherrschend, während der weibliche Apoptoseweg vornehmlich Caspase-abhängig ist. Männliche Neurone reagieren empfindlicher auf den PARP-1-vermittelten Apoptoseweg, während weibliche Gehirnzellen empfindlicher gegenüber dem Caspase-abhängigen Apoptoseweg sind [RAHIMIAN et al., 2019; MANWANI et al., 2015; SIEGEL et al., 2010; LIU et al., 2011]. Dieser Geschlechtsunterschied wird ebenfalls auf den Einfluss von Geschlechtshormonen zurückgeführt [LANG & MCCULLOUGH, 2008]. Mögliche Erklärungen hierfür sind eine Induktion der PARP-1-Expression durch die Einwirkung von Androgenen [VAGNEROVA et al., 2010] und/oder eine Interaktion von PARP-1 bei Frauen mit dem Östrogenrezeptor  $\alpha$  (estrogen receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ ). PARP-1 kann im Komplex mit ER $\alpha$  keine DNA-Strangbrüche mehr erkennen [STROSZNAJDER et al., 2010]. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass physiologische Hormonspiegel angeborene Geschlechtsunterschiede maskieren. Daher existiert die alternative Hypothese, dass der programmierte Zelltod auf molekularer Ebene geschlechtsspezifisch ist [LANG & MCCULLOUGH, 2008].

### **1.3 Einfluss des Geschlechts auf das Outcome nach herzchirurgischen Operationen beim Menschen**

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Frauen bezüglich der Mortalität, der Komplikationsrate und der postoperativen Morbidität nach EKZ gegenüber Männern benachteiligt sind [VEEN et al., 2018; KURLANSKY et al., 2017]. Insbesondere ist das Risiko für neurologische Komplikationen bei Frauen größer als bei Männern [MARTIN et al., 2012; HOGUE et al., 2008; GOTO et al., 2007].

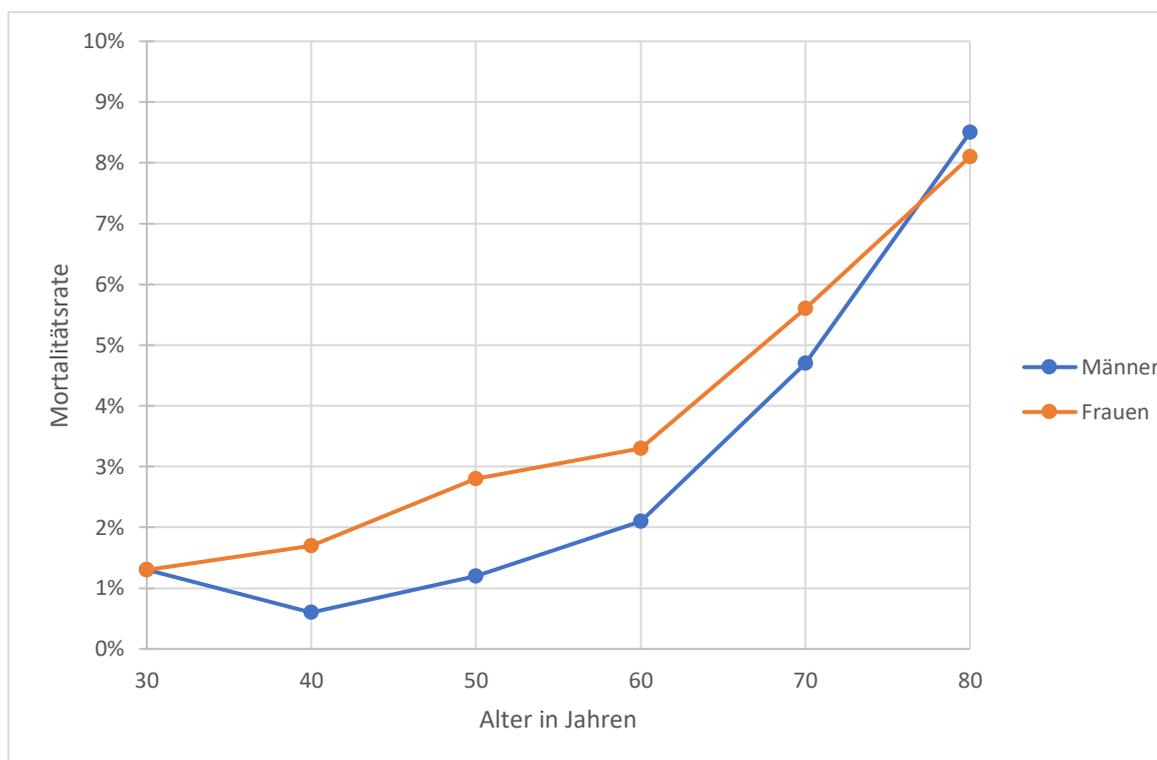
### **1.3.1 Vorbestehende kardiovaskuläre Risikofaktoren**

Statistisch gesehen haben Frauen, die aufgrund eines Koronararterienverschlusses oder eines Herzklappenfehlers einen operativen Eingriff am Herzen mit EKZ benötigen, vergleichsweise mehr signifikante Komorbiditäten, wie arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus oder Herzinsuffizienz [VEEN *et al.*, 2018; FAERBER *et al.*, 2017; KURLANSKY *et al.*, 2017; MARTIN *et al.*, 2012]. Außerdem liegt bei Frauen zum Zeitpunkt der Indikationsstellung einer kardialen Operation häufig eine schwerere Symptomatik bzw. ein späteres Stadium der Herzerkrankung vor als bei Männern [GIRARDI *et al.*, 2019; VEEN *et al.*, 2018; ATTIA *et al.*, 2017; MARTIN *et al.*, 2012; BUKKAPATNAM *et al.*, 2010]. Daher sind Frauen zum Zeitpunkt des Eingriffs, bedingt durch ihren schlechteren Gesundheitszustand, in ihren Alltagsaktivitäten bereits eingeschränkter als Männer [LEHMKUHL *et al.*, 2012; KENDEL *et al.*, 2011]. Das Verteilungsmuster der Arteriosklerose, die den kardiovaskulären Erkrankungen zu Grunde liegt, ist geschlechtsspezifisch. Frauen leiden im Vergleich zu gleichaltrigen Männern häufiger an intrakraniellen Arterienstenosen, während Männer eher zu Stenosen der Aorta ascendens und der Karotiden neigen [GOTO *et al.*, 2007]. Herzkranke Männer hingegen rauchen öfter als Frauen und sie leiden häufiger unter einer linksventrikulären Dysfunktion [KURLANSKY *et al.*, 2017]. Außerdem ist die Rate an Voreingriffen an Herz und Gefäßen bei Männern höher [FAERBER *et al.*, 2017; BUKKAPATNAM *et al.*, 2010; GOTO *et al.*, 2007].

### **1.3.2 Interaktion zwischen Geschlechts- und Altersunterschieden**

Frauen sind im Durchschnitt zum Zeitpunkt eines kardialen Eingriffs älter als Männer [GIRARDI *et al.*, 2019; VEEN *et al.*, 2018; ATTIA *et al.*, 2017; FAERBER *et al.*, 2017; KURLANSKY *et al.*, 2017; LEHMKUHL *et al.*, 2012; KENDEL *et al.*, 2011; BUKKAPATNAM *et al.*, 2010]. Ihr höheres Lebensalter stellt einen unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktor dar und kann z.B. mit einer mittleren bis schweren aortalen Arteriosklerose, einem Hauptrisikofaktor für perioperative Schlaganfälle, assoziiert sein [GOTO *et al.*, 2007]. Dennoch ist das Alter zwar eine relevante, jedoch keine alleinerklärende Ursache für den Zusammenhang zwischen nachteiligen Folgen kardialer Operationen und dem weiblichen Geschlecht [LEHMKUHL *et al.*, 2012]. Song *et al.* untersuchten im Rahmen von Herzklappenoperationen ein breites Altersintervall von Patienten. Auf diese Weise gelang ihnen die Darstellung einer Interaktion zwischen den beiden Einflussfaktoren Geschlecht und Alter. Es zeigte sich eine Zunahme des relativen Risikos der operativen Mortalität bei Frauen ab dem 40. Lebensjahr von einem vergleichbaren Risiko bis hin zum 2,5-fachen Risiko von risikoadaptierten Männern. Im 6. Lebensjahrzehnt bestand immerhin noch das doppelte relative Mortalitätsrisiko für Frauen im Vergleich zu Männern, während es sich in den nachfolgenden Altersdekaden wieder stetig an das der Männer anglich. Anhand dieser Ergebnisse kann die sinkende ovarielle

Funktion in der Perimenopause als eine mögliche Ursache der Geschlechts-Alters-Interaktion angesehen werden, da ca. 80 % der Frauen die Menopause im Zeitraum zwischen dem 45. und dem 55. Lebensjahr durchlaufen [SONG *et al.*, 2008].



**Abbildung 1.1: Mortalitätsrate nach Herzklappenoperationen von Männern und Frauen in Abhängigkeit vom Alter**

Graphische Darstellung der Interaktion zwischen Geschlecht und Alter in Bezug auf die Mortalitätsrate nach Herzklappenoperationen, modifiziert nach einer Tabelle von Song *et al.* [Song *et al.*, 2008].

### 1.3.3 Vorbestehende psychosoziale Risikofaktoren

Frauen haben eine höhere Neigung zu Depressionen und Angststörungen, wodurch die Lebensqualität vor und nach herzchirurgischen Operationen negativ beeinflusst werden kann [HOGUE *et al.*, 2008]. Dies zeigt sich in einer persistierenden Signifikanz des Geschlechtsunterschieds in der gesundheitsbezogenen Lebensqualität trotz Angleichung des Grundgesundheitszustandes und der perioperativen Variablen in einer Studie von Kendel *et al.* [KENDEL *et al.*, 2011]. Generell berichten Frauen über stärkere Ängste im Hinblick auf die Operation selbst sowie die anschließende Genesungsphase. Zudem bestehen bei ihnen vergleichsweise mehr Unsicherheiten bezüglich des Krankheitsverlaufs als bei Männern [MARTIN *et al.*, 2012]. Dies könnte die allgemein spätere Durchführung operativer Maßnahmen bei herzkranken Frauen mitbegründen [BUKKAPATNAM *et al.*, 2010].

### 1.3.4 Unterschiede im operativen Prozedere

Da Frauen durchschnittlich in einem späteren Stadium ihrer Herzerkrankung vorstellig werden, befinden sie sich zum Operationszeitpunkt häufiger im kardiogenen Schock und müssen sich daher häufiger Notoperationen unterziehen, was eine höhere Komplikationsrate mit sich bringen kann [FAERBER *et al.*, 2017; RIEß *et al.*, 2017; BUKKAPATNAM *et al.*, 2010]. Da Frauen im Vergleich zu Männern im Durchschnitt eine geringere Körpergröße und kleinere Gefäße aufweisen, sind die Operationsbedingungen häufig ungünstiger. Die Wahrscheinlichkeit für technische Schwierigkeiten nach einem CABG sowie für eine schlechtere Durchgängigkeit der Gefäßtransplantate ist bei Frauen höher [GIRARDI *et al.*, 2019; ANGRAAL *et al.*, 2018; ATTIA *et al.*, 2017; FAERBER *et al.*, 2017; RIEß *et al.*, 2017; BUKKAPATNAM *et al.*, 2010]. Da Frauen beim CABG weniger häufig die Arteria (A.) mammaria interna als Bypassgefäß erhalten, kann dies zumindest bei manchen Frauen zu einer unvollständigeren Revaskularisierung führen, mit der Folge einer geringeren Symptomlinderung als bei Männern. Die A. mammaria interna gilt gemeinhin als das am besten geeignete Gefäßtransplantat zur Gewährleistung eines guten Outcomes nach CABG [ATTIA *et al.*, 2017; FAERBER *et al.*, 2017; RIEß *et al.*, 2017; BUKKAPATNAM *et al.*, 2010; HOGUE *et al.*, 2008]. Allerdings erhalten Männer häufiger drei oder mehr Bypässe als Frauen [LEHMKUHL *et al.*, 2012; BUKKAPATNAM *et al.*, 2010]. Im Rahmen von chirurgischen Herzklappenkorrekturen benötigen Frauen häufiger Prothesen, während die Rate erfolgreicher Rekonstruktionen der körpereigenen Herzklappen bei Männern höher liegt. Die Herzklappenrekonstruktion ist dem prothetischen Herzklappenersatz überlegen. Ihre Vorteile liegen in einer geringeren Mortalität, einem besseren Erhalt der Herzfunktion, geringeren postoperativen Liegezeiten sowie geringeren Komplikationsraten [VASSILEVA *et al.*, 2013].

### 1.3.5 Unterschiede im postoperativen Management

Frauen benötigen nach CABG mehr Bluttransfusionen als Männer, wodurch die Hämodilution bei Frauen während der EKZ verstärkt wird. Generell sind Transfusionen – unabhängig vom Geschlecht – mit einer höheren Mortalität, vermehrten postoperativen Infektionen sowie mit längeren Intensivbehandlungen assoziiert [RANUCCI *et al.*, 2008].

Trotz all dieser Faktoren, die einen direkten Vergleich zwischen Männern und Frauen bezüglich des Outcomes nach EKZ erschweren, besteht die Annahme, dass das weibliche Geschlecht einen unabhängigen Risikofaktor im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe darstellt [BUKKAPATNAM *et al.*; 2010; SONG *et al.*, 2008].

## 1.4 Geschlechtshormone und zerebrale Ischämietoleranz

Das Nervensystem stellt ein wichtiges Zielorgan für die Geschlechtshormone dar. Die physiologischen Effekte der Geschlechtshormone auf das Gehirn werden sowohl auf zirkulierende Hormone aus peripheren Organen, wie der Nebennierenrinde, den Hoden oder den Ovarien, als auch auf lokal im Gehirn synthetisierte Hormone, die sog. Neurosteroiden, zurückgeführt [CÉSPEDES RUBIO *et al.*, 2018; DIOTEL *et al.*, 2018]. Geschlechtsunterschiede werden u.a. durch unterschiedliche Hormonkonzentrationen bei Frauen und Männern generiert.

### 1.4.1 Weibliche Geschlechtshormone

Den weiblichen Geschlechtshormonen Östrogen und Progesteron wird eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen [CÉSPEDES RUBIO *et al.*, 2018; DIOTEL *et al.*, 2018; ZÁRATE *et al.*, 2017].

#### 1.4.1.1 Östrogene

Dabei sind Östrogene, insbesondere das aktivste von ihnen, nämlich 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>), die am besten erforschten neuroprotektiven Sexualhormone. Das anhaltende Interesse an Östrogenen als Neuroprotektiva kann durch zwei Kernbeobachtungen erklärt werden [HERSON *et al.*, 2009]. Zum einen zeigte sich innerhalb einer weiblichen Rattenpopulation, bei der experimentell eine fokale Gehirnschämie erzeugt wurde, dass die Infarktgröße von der jeweiligen Phase des Menstruationszyklus beeinflusst wird. Die präovulatorische Follikelphase mit hohem E<sub>2</sub>-Spiegel geht mit einer geringeren Infarktgröße einher als die postovulatorische Lutealphase mit geringer E<sub>2</sub>-Produktion [DIOTEL *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2017; SCHREIHOFFER & MA, 2013; HERSON *et al.*, 2009]. Zum anderen erleiden weibliche Ratten oder Mäuse geringere Gewebeschädigungen durch vergleichbare ischämische oder traumatische Insulte als männliche Tiere. Dieser Vorteil des weiblichen Geschlechts ist nach der Menopause oder nach Ovariectomie aufgehoben und kann durch eine Östrogenersatztherapie wiederhergestellt werden [RAHIMIAN *et al.*, 2019; CÉSPEDES RUBIO *et al.*, 2018; CHAUHAN *et al.*, 2017; CAHILL *et al.*, 2017a; SCHREIHOFFER & MA, 2013; SIEGEL *et al.*, 2010; HERSON *et al.*, 2009].

Zu den neuroprotektiven Eigenschaften der Östrogene zählt z.B. die Hirnödemreduktion durch Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke [AU *et al.*, 2016; SIDDIQUI *et al.*, 2016]. E<sub>2</sub> erhöht den Blutfluss während und nach einer Ischämie durch Freisetzung von vasodilatierenden Substanzen. Es fördert die Genexpression antiinflammatorischer Proteine und Mediatoren des Zellüberlebens [LIU & MCCULLOUGH, 2012; LEON *et al.*, 2011; CARSWELL *et al.*, 2010; HERSON

*et al., 2009; LIU et al., 2009; SUZUKI et al., 2009*] und supprimiert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$  [*BROWN et al., 2010*] und iNOS, sowie die Expression von NF $\kappa$ B. Die Aktivität proapoptotischer Proteine, wie Caspase-3 [*GIRIJALA et al., 2017*], wird über eine Reduktion der postischämischen Induktion des Fas-FADD-Signalwegs vermindert [*LIU & MCCULLOUGH, 2012; LIU et al., 2009; CARSWELL et al., 2010; SUZUKI et al., 2009*]. Außerdem entfaltet E<sub>2</sub> eine konzentrationsabhängige antioxidative und anti-Lipid-peroxidative Wirkung, u.a. durch Hemmung der NADPH-Oxidase [*CARSWELL et al., 2010*] oder Blockade von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren in höheren Dosen und damit einhergehender Reduktion der Exzitotoxizität [*LEON et al., 2011; HERSON et al., 2009*]. Das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Synthese bleiben durch die Einwirkung von E<sub>2</sub> erhalten. Des Weiteren vermindert E<sub>2</sub> die ROS-Produktion durch Beeinflussung der Expression mitochondrialer Gene [*ZÁRATE et al., 2017; SCHREIHOFFER & MA, 2013*]. Es mildert die Exzitotoxizität durch Steigerung der Glutamataufnahme in Astrozyten ab [*CHISHOLM et al., 2016*] und trägt schließlich zur Verbesserung der Regeneration und Plastizität von Neuronen nach einem ischämischen Insult bei [*LIU & MCCULLOUGH, 2012; HERSON et al., 2009; LIU et al., 2009; SUZUKI et al., 2009*].

Im Detail werden die Wirkungen der Östrogene sowohl auf die Beeinflussung der Transkription von Genen mit oder ohne Östrogen-abhängige Elemente (estrogen response elements, EREs) [*RAHIMIAN et al., 2019; CÉSPEDES RUBIO et al., 2018; BROWN et al., 2010; HERSON et al., 2009*], als auch auf nicht transkriptionelle schnelle Signalwege über die Interaktion mit membrangebundenen ER und Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden zurückgeführt [*RAHIMIAN et al., 2019; CÉSPEDES RUBIO et al., 2018; HERSON et al., 2009*]. Die ER unterteilen sich in die klassischen „nukleären“ ER $\alpha$  und ER $\beta$ , die ebenso in der Membran lokalisiert sein können, als auch in andere, neu entdeckte Östrogenrezeptoren, wie dem G-Proteingekoppelten Rezeptor (GPR) 30. Ihre Aktivierung induziert die Modifikation der Proteinphosphorylierung sowie Konzentrationsveränderungen intrazellulärer Second Messenger, wie cAMP oder Ca<sup>2+</sup> [*CÉSPEDES RUBIO et al., 2018; GILLIES & MCARTHUR, 2010; LIU et al., 2009*]. Schließlich kann Östrogen auch rezeptorunabhängig in pharmakologischen Konzentrationen eine direkte antioxidative Wirkung entfalten [*CÉSPEDES RUBIO et al., 2018; LIU & MCCULLOUGH, 2012*].

### **1.4.1.2 Progesteron**

Auch das Gestagen Progesteron scheint eine neuroprotektive Wirkung zu besitzen. So konnte im Rahmen von experimentell erzeugten traumatischen Hirnverletzungen u.a. gezeigt werden, dass Progesteron die vasogene und zytotoxische Ödembildung reduziert [*HERSON et al., 2009*]. Durch die Beeinflussung intrazellulärer Signalkaskaden erhöht es die

Expression von antiapoptotischen Proteinen und vermindert diejenige von proapoptotischen Proteinen [ANDRABI *et al.*, 2017; ESPINOSA-GARCÍA *et al.*, 2013; HERSON *et al.*, 2009]. Als antiinflammatorisch wirkendes Agens erweist sich Progesteron als Inhibitor der NFκB-Aktivität sowie der nachgeschalteten NFκB-induzierten proinflammatorischen Gentranskription [PAN *et al.*, 2007]. Durch eine Verbesserung der respiratorischen Funktion neuronaler Mitochondrien kann Progesteron auch eine verminderte oxidative Stressreaktion bewirken [CÉSPEDES RUBIO *et al.*, 2018; ANDRABI *et al.*, 2017; GAINARD *et al.*, 2016; MANNELLA *et al.*, 2009]. Weiterhin spielt Progesteron ebenfalls eine Rolle bei der Remyelinisierung nach einer Gehirnverletzung [HERSON *et al.*, 2009] sowie bei der postischämischen Neurogenese durch Modulation der iNOS-Expression als Antwort auf inflammatorische Stimuli [MANNELLA *et al.*, 2009].

Analog zu den Östrogenen entfaltet Progesteron seine Wirkungen sowohl über klassische nukleäre Progesteronrezeptoren und Rekrutierung von Koregulatoren der Transkription von Zielgenen als auch über verschiedene membrangebundene Progesteronrezeptoren [CÉSPEDES RUBIO *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2017; SIDDIQUI *et al.*, 2016] Außerdem reguliert Progesteron spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle sowie auch K<sup>+</sup>- und Na<sup>2+</sup>-Kanäle unabhängig von Progesteronrezeptoren [LUOMA *et al.*, 2012]. Zudem moduliert Progesteron die Aktivität und Expression von Glutamat-Rezeptoren und vermindert so exzitatorische neuronale Antworten [LIU *et al.*, 2009]. Insgesamt scheint das neuroprotektive Potential der Gestagene jedoch geringer zu sein als das der Östrogene. So zeigten experimentelle Studien, dass E<sub>2</sub> allein oder in Kombination mit Progesteron einen größeren neuroprotektiven Effekt im Rahmen einer neurotoxischen Glutamatexposition kortikaler Neurone aufweist als Progesteron allein [MANNELLA *et al.*, 2009]. Die Kombination von Progesteron mit E<sub>2</sub> zeigt kontroverse Ergebnisse mit teilweise synergistischen, teilweise antagonistischen Wirkungen [CÉSPEDES RUBIO *et al.*, 2018]. Somit bleibt die Sonderstellung von E<sub>2</sub> unter den neuroprotektiven Sexualhormonen unbestritten.

### 1.4.2 Unterschiede zwischen prä- und postmenopausalen Frauen

Die Menopause geht, im Rahmen des physiologischen Rückgangs der ovariellen Funktion, mit einer signifikanten Abnahme des E<sub>2</sub>-Spiegels einher. Mit zunehmender Lebenserwartung, bei einem gleichzeitig konstant bleibenden Eintrittsalter in die Menopause von ca. 51 Jahren, kommt es zu einer wachsenden Anzahl von Frauen, die einen immer größer werdenden Anteil ihres Lebens in einem chronischen Östrogenmangelzustand verbringen [FIOCCHETTI *et al.*, 2012; SUZUKI *et al.*, 2009; WISE *et al.*, 2009]. Dabei verlieren Frauen ca. 90 % ihrer prämenopausalen Östrogenkonzentration im Blut, was ca. ¼ der durchschnittlichen Östrogenkonzentration im Blut gesunder Männer

vergleichbaren Alters entspricht [BARRETT-CONNOR & LAUGHLIN, 2009]. Dieser Östrogenmangel geht mit verschiedenen Konsequenzen für den weiblichen Körper, wie einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, einher [FIOCCHETTI et al., 2012]. Zu den neurologischen Manifestationen der postmenopausalen Periode zählen Hitzewallungen, Schlafstörungen, emotionale Instabilität sowie ein größeres Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden oder an Morbus Alzheimer zu erkranken [WISE et al., 2009]. Es kommt im Alter zu physiologischen Veränderungen der neuroinflammatorischen Reaktionen des Gehirns, die vor allem durch eine vermehrte und/oder nicht ausreichend regulierte Produktion proinflammatorischer Zytokine gekennzeichnet sind. Diese dysfunktionellen Reaktionen werden durch den postmenopausalen Östrogenmangel verstärkt. Die Blutkonzentrationen proinflammatorischer Zytokine erhöhen sich physiologischerweise bei postmenopausalen Frauen signifikant im Vergleich zu prämenopausalen Frauen [ZÁRATE et al., 2017; AU et al., 2016; BROWN et al., 2010]. Die Empfindlichkeit des Gehirns gegenüber Pathogenen, Umweltfaktoren und Stress steigt nach der Menopause an [GIATTI et al., 2012]. Veränderungen der Endothelzellfunktion und der Inflammationsreaktion postmenopausaler Frauen könnten den Reperfusionsschaden nach einer Gehirnschämie verschlimmern und somit einen ungünstigeren Ausgang nach kardialen Operationen, insbesondere bei älteren postmenopausalen Frauen, bedingen [SONG et al., 2008].

### 1.4.3 Androgene

Androgene beeinflussen die Gehirnschädigung nach einer Ischämie sowohl im positiven als auch im negativen Sinne. Junge männliche kastrierte Ratten oder Mäuse zeigen im Vergleich zu intakten Tieren nach fokaler und globaler Ischämie einen verminderten bis gleichbleibenden histologischen Gehirnschaden. Eine exogene Testosterongabe kann dabei die neuronale Schädigung dosisabhängig erhöhen, u.a. durch eine Steigerung der Exzitotoxizität [CHAUHAN et al., 2017; LIU & MCCULLOUGH, 2012; NAKANO et al., 2010; SIEGEL et al., 2010; VAGNEROVA et al., 2010; LIU et al., 2009; UCHIDA et al., 2009]. Nakano et al. konnten außerdem eine Relativierung des neurotoxischen Testosteroneffektes durch den spezifischen Androgenrezeptor (AR)-Antagonisten Flutamid zeigen. In ihrer Zellkulturstudie detektierten Nguyen et al. eine antiapoptotische Wirkung des Testosterons auf hippokampale Neurone, die verschiedenen neurotoxischen Substanzen ausgesetzt wurden. Doch speziell bei oxidativen Stressoren versagten die Androgene in ihrer neuroprotektiven Funktion [NGUYEN et al., 2010]. Diese Ergebnisse lassen einen Beitrag des Testosterons zum „Ischämie-sensitiven Phänotyp“ von Männern vermuten [SIEGEL et al., 2010]., der aber hauptsächlich dem Mangel an protektiven Effekten des E<sub>2</sub> zugeschrieben wird [MCCULLOUGH et al., 2016]. Neben seinen offensichtlich neurotoxischen Wirkungen scheint Testosteron Neurone auch

vor oxidativem Stress zu schützen [KIM et al., 2013; LIU & MCCULLOUGH, 2012; LIU et al., 2009; UCHIDA et al., 2009]. Cheng et al. zeigten einen günstigen Testosteroneffekt in vorher Testosteron-defizienten männlichen Ratten mittleren Alters nach einer fokalen Gehirnschämie. Sie interpretierten ihre Studienergebnisse im Sinne einer altersabhängig steigenden Sensitivität männlicher Ratten gegenüber einer Gehirnschämie, die im direkten Zusammenhang mit einem Abfall des Testosteronspiegels ab dem mittleren Alter steht [CHAUHAN et al., 2017; CHENG et al., 2009]. Uchida et al. stellten einen dosisabhängigen Testosteroneffekt nach fokaler Gehirnschämie bei kastrierten männlichen Mäusen fest, wobei niedrige Dosen die Infarktgröße verringerten, während hohe Dosen die neuronale Schädigung verschlimmerten [UCHIDA et al., 2009]. Auch in klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Männer mit einem hohen Testosteronspiegel nach einem Herzstillstand mit erfolgreicher Reanimation bessere neurologische Ergebnisse erzielen als Männer mit vergleichsweise niedrigerem Testosteronspiegel [KIM et al., 2013]. Die vordergründig kontroversen Studienergebnisse haben zu der Annahme geführt, dass Androgene in der Akutphase einer Ischämie eher zur Schädigung beitragen, während ihre Wirkung die Regenerationsprozesse in der postischämischen Erholungsphase günstig beeinflusst. Diese Theorie korreliert auch mit dem natürlichen Verlauf der Testosteronkonzentration im Rahmen eines ischämischen Insults. Dieser stellt eine Stresssituation dar, die zu einer akuten Reduktion der Testosteronkonzentration im Plasma führt. Postischämisch normalisiert sich diese innerhalb von 6 Monaten [HERSON et al., 2009]. Die Wirkung von Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) wird direkt über den einzig bisher bekannten AR in Form einer Beeinflussung der Gentranskription vermittelt. Zusätzlich spielen schnelle, nicht genomische Effekte eine Rolle [NAKANO et al., 2010; CHENG et al., 2009; LIU et al., 2009]. Alternativ können die Metabolite des Testosterons auch Östrogenrezeptoren binden und aktivieren [SIMPKINS et al., 2012; GILLIES & MCARTHUR, 2010; CHENG et al., 2009]. So kann zirkulierendes Testosteron von einer ortsständigen Aromatase im Gehirn zu Östrogen metabolisiert werden. Diese Aromatase wird im Gehirn beider Geschlechter nach einer Ischämie vermehrt exprimiert [CÉSPEDES RUBIO et al., 2018; MANWANI et al., 2015]. Die wichtige Rolle des Östrogens im männlichen Gehirn, das in Neuronen und Gliazellen gebildet wird, findet zunehmende wissenschaftliche Beachtung [GILLIES & MCARTHUR, 2010]. Neuroprotektive Effekte der Androgene können jedoch nicht auf ihre indirekte Wirkung nach Aromatisierung zu Östrogen allein zurückgeführt werden, da auch nicht aromatisierbares DHT ein antioxidatives und antiapoptotisches Potential aufweist [SIDDIQUI et al., 2016; UCHIDA et al., 2009]. Möglicherweise kann das Verhältnis der direkten zur indirekten Wirkung des Testosterons seine dosisabhängige Wirkung erklären [NAKANO et al., 2010].

#### **1.4.4 Die männliche Andropause**

Bei Männern spielt, wenn auch in weitaus geringerem Ausmaß als bei Frauen, ebenfalls eine altersabhängige hormonelle Umstellung eine Rolle bei der Ischämietoleranz. Niedrige Testosteronspiegel im Alter sind mit ausgedehnteren Hirninfarktgrößen und schlechterer funktioneller Genesung im Vergleich zu jüngeren Männern assoziiert [CHENG *et al.*, 2009]. Physiologischerweise nimmt die Testosteronkonzentration bei Männern ab dem dritten Lebensjahrzehnt um etwa 1-2 % pro Jahr ab [DECAROLI *et al.*, 2017]. Teilweise analog zur weiblichen Menopause geht diese sog. Andropause mit einer Beeinträchtigung von Gehirnfunktionen, wie der Stimmung, des Gedächtnisses und der Kognition, einher [NGUYEN *et al.*, 2010]. Des Weiteren nimmt auch die Krankheitsanfälligkeit und Mortalität mit sinkender Testosteronkonzentration zu, und das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen steigt bei Androgen-defizienten Männern durch eine verminderte fibrinolytische Aktivität an [YEAP, 2013]. Der zusätzliche Testosteronabfall als akute Stressreaktion im Rahmen einer Herzoperation mit EKZ kann einen Teil der Komplikationen, wie eine akute Anämie oder Mobilitätseinschränkungen im Rahmen des Proteinkatabolismus, verstärken [MAGGIO *et al.*, 2012]. Der Hauptunterschied zwischen den Geschlechtern in höherem Alter besteht in einer männlichen Immunoseneszenz, die sich in einem verminderten Anstieg proinflammatorischer Zytokine im postischämischen Hirngewebe manifestiert. Diese kann zumindest theoretisch als ein neuroprotektiver Mechanismus im alternden männlichen Gehirn angesehen werden, der Männern womöglich einen Vorteil bei der Bewältigung eines ischämischen Insults gegenüber Frauen verschafft [LIU & MCCULLOUGH., 2012].

## 2 Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses des Geschlechts sowie des hormonellen Status auf die Expression von Inflammations- und Apoptoseparametern bei der Ratte 14 Tage nach EKZ und DHCA.

Dabei sind folgende Fragestellungen von besonderem Interesse:

1. Gibt es einen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren bei der Ausprägung der Inflammation und Apoptose im Gehirn 14 Tage nach EKZ und DHCA?
2. Welchen Einfluss haben die Geschlechtshormone? Gibt es Expressionsunterschiede zwischen kastrierten und nicht kastrierten Tieren?
3. Korrelieren die Ergebnisse mit den klinischen Beobachtungen in der Humanmedizin?

Da die vermuteten Zusammenhänge im klinischen Bereich am Menschen nicht gezielt untersucht werden können, bietet unser Rattenmodell die Möglichkeit eines direkten Zugangs zum Gehirn. Die weiblichen kastrierten Ratten dienen als Modell für die Postmenopause bei Frauen, während die intakten weiblichen Ratten die prämenopausalen Frauen repräsentieren. Analog dazu verhält es sich mit den männlichen kastrierten und intakten Ratten entsprechend der Post- und Präandropause bei Männern. Die vier Gruppen sollen im Hinblick auf die Expression der Inflammations- und Apoptoseparameter einander gegenübergestellt werden.

## Problemstellung

---

Die Studie wurde von einem großen Team durchgeführt, die Ergebnisse sind bereits in dem internationalen Journal „The thoracic and cardiovascular surgeon“ unter folgendem Titel veröffentlicht worden [Kellermann et al., 2013]:

---

*„Functional outcome in female rats after 45 minutes of deep hypothermic circulatory arrest: gender matters.“*

---

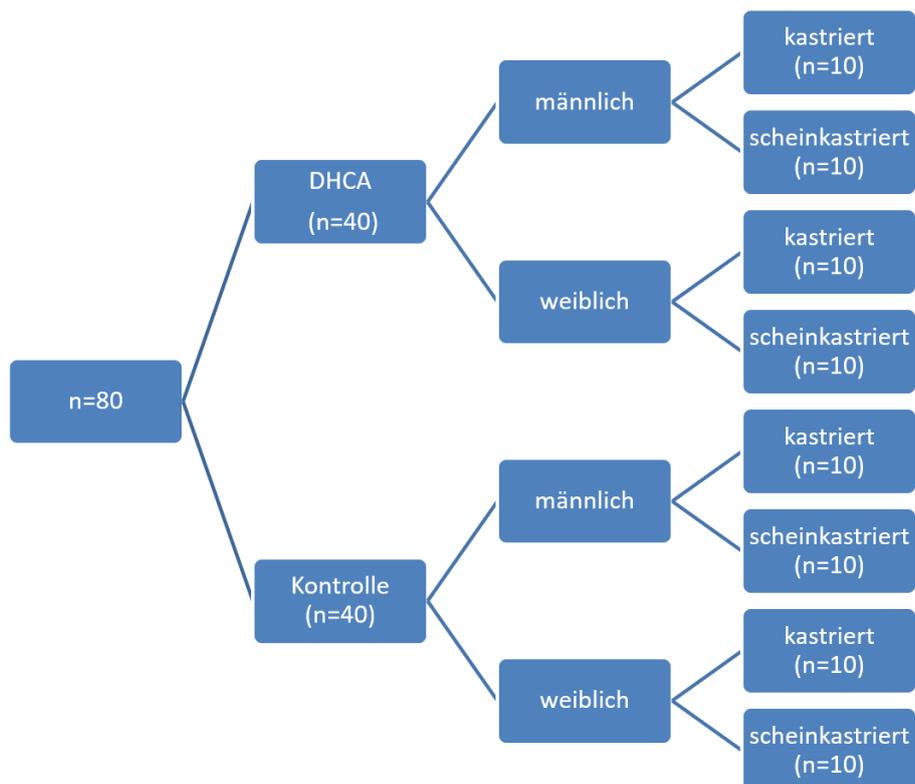
Aus der Studie entstand auch bereits eine weitere Promotion von meinem Kollegen Dr. med. vet. Stefan Friedrich mit dem Titel „Zum Einfluss von Geschlecht und Geschlechtshormonstatus auf neurologische und neurokognitive Funktionen sowie auf die Gehirnmorphologie 14 Tage nach herzchirurgisch typischer extrakorporaler Zirkulation mit 45-minütigem tief hypothermem Kreislaufstillstand im Rattenmodell“ [FRIEDRICH, tiermedizinische Dissertation 2013]. Diese beinhaltet die Ergebnisse der physiologischen Parameter, der Körpergewichtsentwicklung und der Geschlechtshormonspiegel der Tiere sowie des modifizierten Holeboardtests (mHBT), der neurologischen Untersuchung und der Gehirnmorphologie.

## 3 Material und Methodik

### 3.1 Versuchsaufbau

#### 3.1.1 Gruppeneinteilung

Die im Folgenden beschriebenen Eingriffe und Untersuchungen werden an 40 männlichen und 40 weiblichen, zu Versuchsbeginn 12 Wochen alten Sprague-Dawley-Ratten (Firma (Fa.) Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) durchgeführt. Das Tierversuchsvorhaben wurde zuvor gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes (Tierschutzgesetz in der Fassung vom 18. Mai 2006, BGBl. I S. 1206, 1313, zuletzt geändert am 21. Dezember 2006, BGBl. I S. 3294) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: 55.2.1.54-2531-20-10). Zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs beträgt die Gewichtsspanne der weiblichen Ratten 180 – 240 Gramm (g), diejenige der männlichen Ratten 250 – 300 g. Die 80 Versuchstiere werden in 8 Gruppen zu jeweils 10 Tieren unterteilt (s. Abbildung 3.1). An den Tieren der „DHCA-Gruppen“ wird ein operativer Eingriff mit EKZ und 45-minütigem DHCA durchgeführt, während die Kontrollgruppen ohne diesen Eingriff die ansonsten gleichen Tests durchlaufen. Die Hälfte der männlichen bzw. weiblichen Tiere wird kastriert und die andere Hälfte scheinkastriert.



**Abbildung 3.1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere**

Gruppenschema zur Einteilung der Tiere in die Versuchsgruppen mit jeweiliger Tieranzahl.

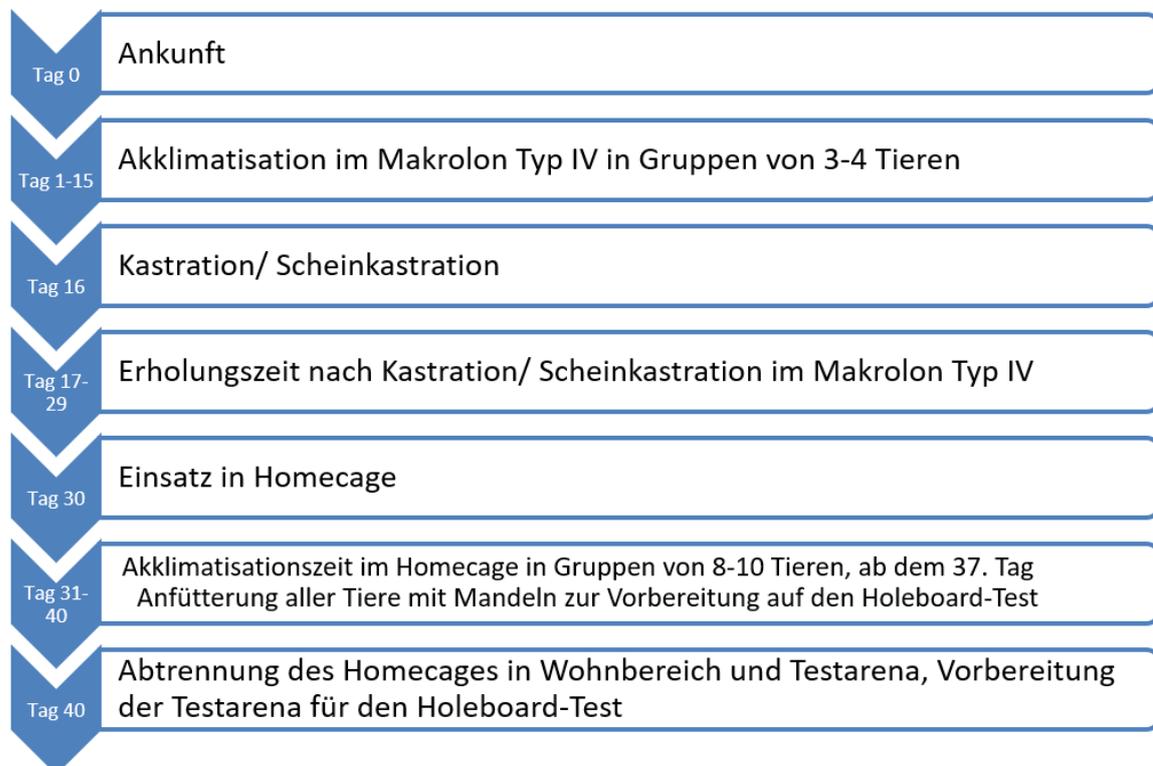
### 3.1.2 **Haltungsbedingungen der Tiere**

Während des gesamten Versuchsablaufs von der Ankunft der Tiere bis hin zum Ende des Versuchs wird eine strenge Routine eingehalten. Mit Ausnahme der Zeiträume, die für die Eingriffe an den Tieren benötigt werden, befinden sich die Ratten kontinuierlich in einem fensterlosen, klimatisierten Tierhaltungsraum der experimentellen Anästhesie bei einer konstanten Raumtemperatur von durchschnittlich  $22 \pm 2$  °C sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $60 \pm 15$  %. Dieser Tierhaltungsraum dient auch gleichzeitig zur Durchführung der funktionellen Untersuchung, so dass die Tiere möglichst viel Zeit in ihrer gewohnten Umgebung verbringen. Außerdem regelt eine Zeitschaltuhr den kontinuierlichen Hell-/Dunkelrhythmus von jeweils 12 Stunden, wobei sich die Hellphase von 3:00 bis 15:00 Uhr und die Dunkelphase von 15:00 bis 3:00 Uhr erstreckt. Um die empfindlichen Augen der Albino-Ratten nicht zu schädigen, beträgt die Lichtintensität in den Käfigen maximal 60 Lux (GV-SOLAS, 1988). Ebenso ist ein Radio (Radio GX, Panasonic) mit der Zeitschaltuhr gekoppelt, welches die Ratten während der Hellphase mit leiser Musik und Stimmen beschallt. Hierdurch wird eine Gewöhnung der Tiere an die menschliche Geräuschkulisse erreicht. Bezüglich der Unterbringung der einzelnen Tiere lassen sich 2 verschiedene Phasen unterscheiden. Die erste Phase vor dem eigentlichen Versuchsbeginn verbringen die Tiere in Makrolon Käfigen Typ IV (55 x 35 x 20 Zentimeter (cm)) in Gruppen von jeweils 3-4 Tieren. Danach werden sie in den sog. „Homecage“ (undurchsichtiges graues PVC, Fa. Josef Weiss Plastik GmbH, München) umgesetzt. Beide Käfige werden vergleichbar ausgestattet. Die Einstreu bildet entstaubtes und entkeimtes Weichholzgranulat (Lignocel, J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg). Zusätzlich erhalten die Ratten eine Handvoll autoklaviertes Heu und eine Lage Zellstoff als Nestbaumaterial. Jeweils montags und donnerstags findet ein kompletter Einstreuwechsel statt. Die Nippeltränken werden donnerstags ausgetauscht. An beiden Tagen erfolgt außerdem die Reinigung und Desinfektion des Fußbodens und der freien Flächen im Tierhaltungsraum. Futter (Altromin 1324, spezialbehandeltes Haltungsfutter für Ratten, Altromin GmbH, Lage) und Leitungswasser stehen den Tieren kontinuierlich über Futterraufen und Nippeltränken zur Verfügung. Alle Tiere werden täglich gewogen.

### 3.1.3 Zeitlicher Versuchsablauf

#### 3.1.3.1 Präoperative Phase

Die Eingewöhnungsphase verbringen die Ratten nach ihrer Ankunft (Tag 0 ab Ankunft, s. Abbildung 3.2) zunächst 15 Tage lang in den Makrolon Käfigen Typ IV in Gruppengrößen von maximal 4 Tieren. Am 16. Tag findet die Kastration bzw. Scheinkastration der Tiere statt. Danach wird den Tieren eine Erholungszeit von 14 Tagen gewährt, während der sie weiterhin in den gleichen Gruppen in Makrolon Käfigen Typ IV gehalten werden. Schließlich findet am 30. Tag nach ihrer Ankunft der Einsatz der Tiere in den Homecage statt, der zunächst auf seiner gesamten Fläche von 80 x 60 x 50 cm eingestreut ist. Dieser dient nach Abtrennung einer Testarena postoperativ zur Durchführung eines Verhaltenstests. Weibliche Rattengruppen haben nun eine Größe von 10 Tieren, sie setzen sich aus 3 Makrolon-Typ-IV-Gruppen, die nach dem Schema 3+3+4 verteilt waren, zusammen. Die männlichen Rattengruppen bestehen im Homecage aus 8 Tieren entsprechend 2 der vorherigen Gruppen, da Größe und Gewicht der Männchen im Hinblick auf die nachfolgende Abtrennung der Testarena eine Gruppengröße von 10 Tieren nicht zulassen.

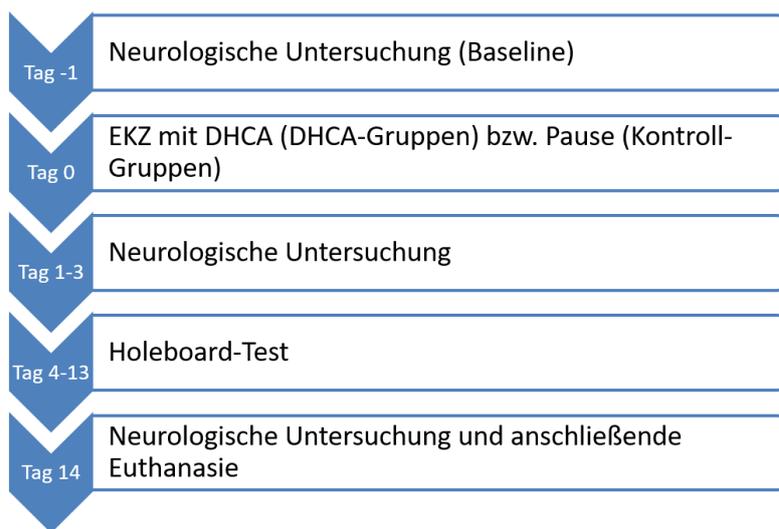


**Abbildung 3.2: Zeitplan von der Ankunft der Ratten bis zur Abtrennung des Homecages**

Zeitlicher Ablauf der präoperativen Phase. Die Nummerierung der Tage erfolgt hier ausgehend vom Tag der Ankunft der Tiere im Labor (= Tag 0 ab Ankunft).

### 3.1.3.2 Postoperative Phase

Tag 0 ab EKZ/DHCA bezeichnet den Tag, an dem die Tiere der DHCA-Gruppen der EKZ mit DHCA unterzogen werden, die Tiere der Kontrollgruppen erhalten stattdessen einen Tag Pause ohne Testung (s. Abbildung 3.3). Nach Tag 0 beginnt die 14-tägige Testphase für jedes Tier. Um eine Baseline zu erhalten, wird die erste neurologische Untersuchung jedes Tieres bereits einen Tag vor Tag 0 ab EKZ/DHCA durchgeführt (Tag -1). Die postoperativen neurologischen Untersuchungen finden dann an den Tagen 1-3 sowie an Tag 14 statt. Nach der Testphase werden die Tiere in tiefer Narkose getötet und die Gehirne entnommen. Dies dient zur nachfolgenden histologischen Untersuchung des Gehirngewebes.



**Abbildung 3.3: Zeitplan von der ersten NU bis zur Tötung der Tiere**

Zeitlicher Ablauf der Testphase. Die Nummerierung der Tage erfolgt hier ausgehend vom Tag der EKZ mit DHCA (DHCA-Gruppen) bzw. von der eintägigen Pause bei den Kontrollgruppen (= Tag 0 ab EKZ/DHCA).

## 3.2 Versuchsdurchführung

### 3.2.1 Durchführung der Kastration

Am jeweiligen Kastrations- bzw. Scheinkastrationstag wird die Rattengruppe in mit Zellstoff ausgelegten Transportkäfigen, in denen jeweils 2 Tiere Platz finden, in den Operationsraum gebracht. Während der Wartezeiten vor und nach der Operation stehen den Tieren das gewohnte Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Die Narkoseeinleitung erfolgt für alle Tiere in einer durchsichtigen Plexiglasbox, in die 5,0 Volumenprozent (Vol.-%) Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbott GmbH & Compagnie (Co.) Kommanditgesellschaft (KG), Wiesbaden) und 6 Liter (l)/min O<sub>2</sub> eingeleitet werden.

#### 3.2.1.1 Weibliche Tiere

Das anästhesierte Tier wird im Bereich des Unterbauchs rasiert und anschließend mit einer modifizierten 14-Gauge (G) -Kanüle intubiert sowie über ein Kleintierbeatmungsgerät (Small Animal Ventilator KTR-4, Hugo-Sachs-Elektronik, March) ventiliert. Das Beatmungsgerät versorgt die Ratte über einen vorgeschalteten Präzisionsverdampfer (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) mit 1-2,5 Vol.-% Isofluran, außerdem mit 40 Vol.-% O<sub>2</sub> sowie Luft im halboffenen System ohne Rückatmung. Dabei beträgt die konstante Frischgaszufuhr 0,8 l/min, die Beatmungsfrequenz 50 - 60 Atemzüge pro min und der Beatmungsdruck 11 bis 15 Millimeter Quecksilbersäule (mmHg). Nach Anpassung dieser Beatmungsparameter wird der Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) -Partialdruck in der Expirationsluft bei ca. 30 mmHg konstant gehalten. Um Austrocknungserscheinungen zu vermeiden, wird die Cornea mittels einer Augensalbe (Bepanthen<sup>®</sup> Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen) geschützt und die Mundschleimhaut mit einem in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Tupfer benetzt. Nach zweimaliger Hautdesinfektion mit Cutasept<sup>®</sup> (Fa. Bode, Hamburg) wird das Lokalanästhetikum Lidocainhydrochlorid (Xylokain 2 %, Astra Zeneca, Großbritannien) im Bereich des Unterbauchs subkutan injiziert. Zusätzlich erfolgt zur Schmerzbehandlung die Gabe von 0,05 Millilitern (ml) Fentanyl intraperitoneal. Der Hautschnitt wird median unterhalb des Bauchnabels gesetzt und mit einer feinen Schere geweitet. Anschließend wird die Bauchhöhle in der Linea alba eröffnet. Dorsal der Blase werden die Y-förmigen Uterushörner aufgesucht, an denen man sich zur Auffindung der Ovarien orientieren kann. Etwas proximal der vorgesehenen Ligationsstelle setzt man zunächst eine Klemme an das Ligamentum (Lig.) ovarii proprium. Danach wird die Ligatur der im Lig. ovarii proprium verlaufenden Rami (Rr.) ovarii der A. und Vena (V.) uterina mittels eines resorbierbaren Safilfadens (3.0 Safil, Ethicon<sup>®</sup>, Ethicon GmbH, Norderstedt) durchgeführt. Eine weitere Klemme setzt man proximal der

vorgesehenen Ligationsstelle der A. und V. ovarica im Lig. suspensorium ovarii, bevor die erste Klemme entfernt und das Ovar vom Lig. ovarii abgesetzt wird. Danach führt man einen weiteren resorbierbaren Safilfaden dorsal der Bursa ovarica um die A. und V. ovarica herum, um diese anschließend ebenfalls zu ligieren. Schließlich wird das Ovar vollständig abgesetzt und die ligierten Gefäßstümpfe werden wieder zurück in die Bauchhöhle verlagert. Mit Vicrylfäden (3.0 Vicryl, Ethicon®, Ethicon GmbH, Norderstedt) verschließt man die muskuläre Bauchdecke mit einer Diagonalnaht sowie die Haut mit einer Intrakutannaht. Zuletzt erfolgt ein oberflächlicher Hautverschluss durch 1-2 Einzelknopfnähte (2-0 Prolene™, Ethicon®, Ethicon GmbH, Norderstedt).

### **3.2.1.2 Männliche Tiere**

Die anästhesierten männlichen Tiere werden im Bereich des Skrotums rasiert. Die weitere Operationsvorbereitung ist analog zu der der weiblichen kastrierten Tiere. Der mediane Hautschnitt wird kranial des Skrotums durchgeführt und ebenfalls mit einer feinen Schere geweitet. Danach wird jeweils links und rechts durch einen paramedianen Schnitt der Processus (Proc.) vaginalis testis eröffnet, um den jeweiligen Hoden vorlagern zu können. Der Funiculus spermaticus und die darin verlaufenden Strukturen werden proximal abgeklemmt, mit resorbierbarem Faden ligiert und nach Entfernung der Klemme durchtrennt. Der nun abgesetzte Hoden wird entfernt. Anschließend erfolgt der Wundverschluss durch jeweils 2 Einzelknopfnähte links und rechts (3-0 Vicryl, Ethicon®, Ethicon GmbH, Norderstedt) sowie ebenfalls durch 2 Einzelknopfnähte im Bereich des medianen Hautschnittes (2-0 Prolene™, Ethicon®, Ethicon GmbH, Norderstedt).

## **3.2.2 Durchführung der Scheinkastration**

### **3.2.2.1 Weibliche Tiere**

Die Operationsvorbereitung ist analog zu derjenigen der weiblichen kastrierten Tiere. Jedoch entfallen die Gefäßligaturen und die Entnahme des Ovars. Stattdessen übt man lediglich einen kurzen Zug an den Uterushörnern aus. Anschließend werden die Bauchdecken wie bei den weiblichen kastrierten Tieren wieder verschlossen.

### **3.2.2.2 Männliche Tiere**

Auch bei den männlichen Ratten gleicht die Operationsvorbereitung der der männlichen kastrierten Tiere. Es entfallen aber sowohl die Eröffnung der Procc. vaginales testes links und rechts als auch die Entnahme des Hodengewebes. Der mediane Hautschnitt kranial

des Skrotums wird lediglich mit der feinen Schere aufgeweitet und anschließend wieder mit 2 Einzelknopfnähten verschlossen.

Nach ihrem jeweiligen Eingriff werden alle Tiere wieder in die mit O<sub>2</sub> angereicherte Plexiglasbox verbracht und extubiert, sobald sie sich selbstständig umdrehen. Danach erhalten sie Metamizol (Novalgin®, Sanofi Aventis, Frankfurt am Main) oral zur postoperativen Schmerzbehandlung. Sobald die Ratten wieder einen wachen Eindruck machen, werden sie zurück in den Transportkäfig gesetzt und verbleiben dort, bis alle Ratten der Gruppe von 8 bis 10 Tieren operiert sind. Zum Schluss kommen die Tiere wieder in ihre gewohnte Umgebung zurück. Am ersten postoperativen Tag erhalten sie dann noch einmal Metamizol oral.

### **3.2.3 Durchführung der EKZ mit DHCA**

#### **3.2.3.1 Operationsvorbereitung**

Analog zur Narkoseeinleitung bei den Kastrationen und Scheinkastrationen wird das Tier in der durchsichtigen Plexiglasbox mit 5,0 Vol.-% Isofluran sowie 6 l/min O<sub>2</sub> anästhesiert. Sobald die Bewusstlosigkeit bei der Ratte eingetreten ist, wird das Fell im Bereich der rechten Kopfhälfte, des Abdomens und der rechten Leiste rasiert. Die Vorgehensweise bei der anschließenden Intubation, der Beatmung und dem Schutz der Cornea und Mundschleimhaut vor Austrocknung gleicht ebenfalls derjenigen bei den Kastrationen und Scheinkastrationen. Die Körpertemperatur wird sowohl rektal als auch perikraniell gemessen. Hierzu sticht man eine Nadeltemperatursonde (Newport® Hypodermic Needle Temperature Probes, Hyp-1, Newport Electronics, Santa Ana, Vereinigte Staaten von Amerika (United States of America, USA) in den rechten Musculus (M.) temporalis ein. Die Rektaltemperatursonde wird in das Rektum der Ratte eingeführt. Für die Elektrokardiogramm (EKG) -Ableitung platziert man drei Nadelelektroden nach dem Einthovenschema subkutan. Rektaltemperatur, EKG und später auch der mittlere arterielle Blutdruck (mean arterial blood pressure, MAP) werden mit einem Monitor (Eagle® 4000, GE Medical Systems Deutschland, Solingen) ermittelt. Die Normwerte liegen bei 37 °C rektaler Temperatur, einer Herzfrequenz um 400/min und einem MAP von 80-120 mmHg.

#### **3.2.3.2 Gefäßkanülierung**

Für die Durchführung der EKZ werden drei Gefäßzugänge benötigt. Die venöse Drainage erfolgt über die V. jugularis externa und die Rückführung des mit O<sub>2</sub> angereicherten Blutes über die A. sacralis mediana (Schwanzarterie). Ein zusätzlicher Gefäßzugang in der A. epigastrica cranialis superficialis dient zur invasiven Blutdruckmessung. Die chirurgische

Gefäßpräparation beginnt mit der Hautdesinfektion an der jeweils vorgesehenen Inzisionsstelle. Anschließend infiltriert man das subkutane Gewebe mit dem Lokalanästhetikum Lidocainhydrochlorid (2 %). Nach dem initialen Hautschnitt folgt die stumpfe Durchtrennung des Fettgewebes, um das jeweilige Gefäß ohne dessen Verletzung darzustellen. Die Blutstillung wird mittels eines Kauters durchgeführt. Danach wird das Gefäß distal ligiert (4-0 PH-Seide, Ethicon®, Ethicon GmbH, Norderstedt), proximal erfolgt eine lose Ligatur, um später den eingeführten Katheter fest mit der Gefäßwand zu verbinden. Zur Kathetereinführung schneidet man mit einer mikrochirurgischen Schere die Gefäßwand vorsichtig ein. Alle Katheter sind jeweils mit heparinisierter Vollelektrolytlösung (Thomaejoninlösung®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen) gefüllt. Nachdem der Katheter in das jeweilige Gefäß eingebracht wurde, fixiert man diesen durch die vorgelegte Ligatur. Außerdem adaptiert man die Wundränder mit Einzelheften (4-0 Prolene™, Ethicon®, Ethicon GmbH, Norderstedt), um die Gefäße vor zu starker Austrocknung zu schützen. Die Schwanzarterie wird mit einem 20G-Venenverweilkatheter (Insyte-W™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) kanüliert, den man zur besseren Fixierung durch eine doppelte Ligatur mit der Gefäßwand verbindet sowie durch eine Einzelknopfnah an der Schwanzhaut befestigt. Über den Katheter erhält die Ratte 150 Internationale Einheiten (I.E.) Heparin Natrium (Liquemin® N 25000, Hoffmann – La Roche Aktiengesellschaft (AG), Grenzach-Whylen) zur Vollheparinisierung und 5 Mikrogramm (µg) Fentanyl zur Analgesie. Um den Ausgangswert des MAP zu erhalten, wird nun vorübergehend während der Präparation der A. epigastrica cranialis superficialis ein Druckdom (MX 960, Fa. Medexmedical, Lancashire, Großbritannien) an die Schwanzarterie angeschlossen. Um weiterhin eine kontinuierliche Messung des MAP zu gewährleisten, erfolgt die Kanülierung der A. epigastrica cranialis superficialis mit einem angespitzten Polyethylenkatheter (PE 10, Intramedic™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg). Sobald dieser Katheter fixiert ist, wird der Druck über dieses Gefäß gemessen. Über die rechte A. jugularis externa wird ein 4,5 French (Fr) großer, mehrfach perforierter und mit künstlichem Speichel (Saliva natura Mundspray, Medac GmbH, Wedel) angefeuchteter Katheter (Diplom-Ingenieur (Dipl.-Ing.) M. Humbs, Valley) bis in den rechten Vorhof vorgeschoben. Dieser Katheter gewährleistet später die vollständige Drainage des rechten Vorhofs, der V. cava caudalis sowie der bei Ratten regelmäßig vorkommenden Vv. cavae craniales dextra und sinistra. 10 min vor dem Beginn der EKZ wird die erste Blutentnahme (Baseline) zur Bestimmung von Blutgasparametern und Blutglukose durchgeführt. Das Blutgasanalysegerät (Rapidlab™ 860, Bayer Vital GmbH, Fernwald) bestimmt folgende physiologische Parameter aus dem arteriellen Blut: pH-Wert,  $\text{pCO}_2$ , arterieller Sauerstoffpartialdruck ( $\text{pO}_2$ ), Bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ), Basenabweichung (base excess, BE), Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hkt) sowie die Elektrolyte  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Cl}^-$ . Die Blutglukosekonzentration wird mit einem separaten

Schnelltestgerät (Glucometer® Elite™, Bayer HealthCare AG, USA) gemessen. Außerdem wird ein Teil der Blutprobe zentrifugiert. Das auf diese Weise gewonnene Serum dient zur Hormonbestimmung im Institut für klinische Chemie des Klinikums Rechts der Isar. Weitere Blutentnahmen erfolgen während des Eingriffs zu definierten Zeitpunkten, um erneut die Blutgase und Blutglukosekonzentration zu ermitteln: am Ende der Abkühlungsphase, in der Wiedererwärmungsphase nach Erreichen von über 20°C rektaler Temperatur, am Ende der Wiedererwärmungsphase nach Erreichen von 35,5°C rektaler Temperatur und eine Stunde nach Ende der EKZ.

### **3.2.3.3 Aufbau und Start der EKZ**

Die HLM für Ratten besteht aus folgenden Komponenten: venöses Reservoir (Plexiglas®, Dipl.-Ing. M. Humbs, Valley), Rollerpumpe (Masterflex®, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois) und Membranoxygenator mit einem Füllungsvolumen von 4 ml, integriertem Wärmetauscher und einer im arteriellen Anschnitt befindlichen Flusssonde zur kontinuierlichen Messung der Blutflussrate (T 208, Transonic Volume Flowmeter, Transonic Systems Incorporated (Inc.), Ithaca). Diese Einzelteile werden durch ein Schlauchsystem aus Kunststoff verbunden (Innendurchmesser 1,6 mm, Tygon®, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois). Der speziell für Ratten konstruierte Membranoxygenator besteht aus 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. Diese Konstruktion gewährleistet eine Gasaustauschfläche von 558 cm<sup>2</sup>. Der Wärmeaustausch erfolgt über ein temperaturgesteuertes Wasserbad (Polystat Control cc2, Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg), welches über ein Schlauchsystem an den Oxygenator angeschlossen ist. Das temperierte Wasser ist im Oxygenator nur durch eine dünne Plexiglasscheibe vom vorbeiströmenden Blut getrennt. Auf diese Weise wird ein Temperatenausgleich zwischen Blut und temperiertem Wasser nach dem Gegenstromprinzip ermöglicht. Zur Entlüftung des HLM-Kreislaufs vor Beginn der EKZ wird dieser mit 10 ml 6 %iger Hydroxyethylstärke (HAES, 60 Milligramm (mg)/ml, Voluven®, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg) gefüllt. Um die EKZ zu starten, wird das Schlauchsystem zunächst mit den Kathetern in der V. jugularis externa dextra und der A. sacralis mediana verbunden. Das venöse Blut aus dem rechten Vorhof fließt in das venöse Reservoir der HLM. Anschließend wird es über die Rollerpumpe in den Oxygenator gepumpt, wo es über die Diffusionsmembran mit O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und Isofluran angereichert wird. Die Rollerpumpe gewährleistet dabei einen kontinuierlichen Blutfluss. Nach der Passage des Oxygenators fließt das sauerstoffreiche Blut retrograd über die Schwanzarterie wieder zurück in den Körperkreislauf der Ratte.

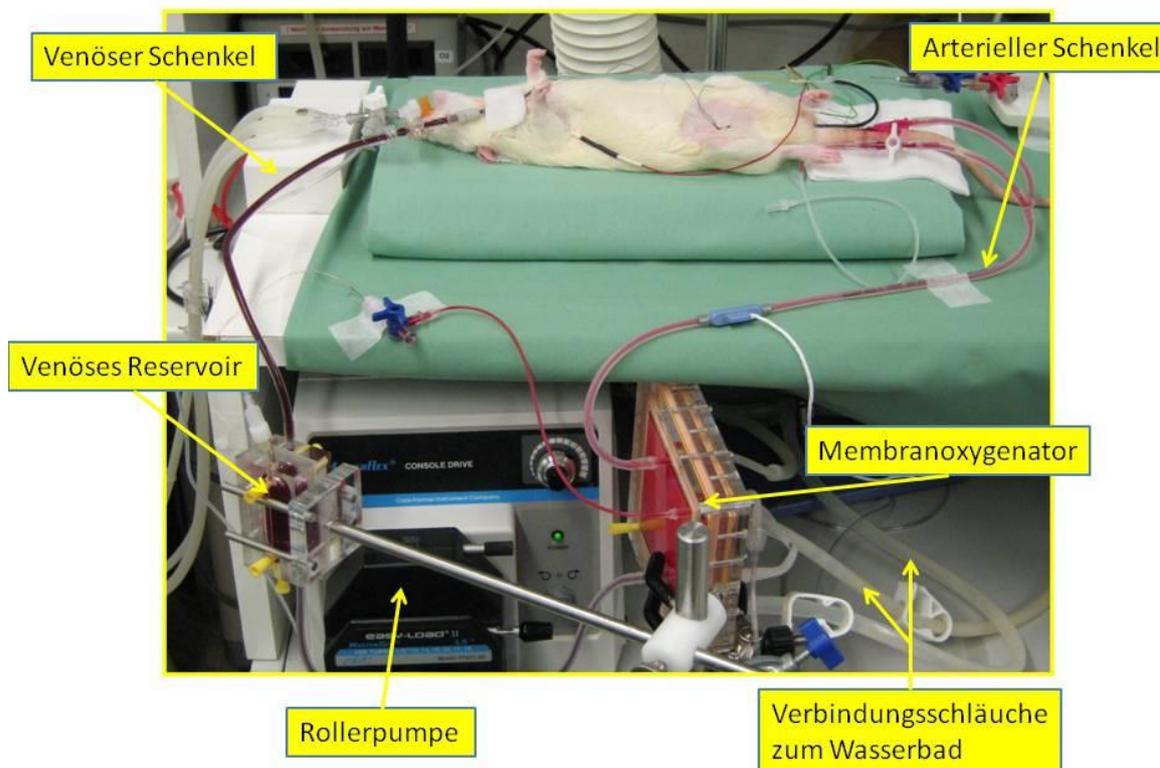


Abbildung 3.4: Aufbau der EKZ

### 3.2.3.4 Abkühlungsphase

Die Blutflussrate beträgt anfangs 160 – 180 ml/Kilogramm (kg)/min und entspricht damit dem physiologischen Herzzeitvolumen der Ratte. Im Verlauf der 30 min dauernden Abkühlungsphase wird diese schrittweise auf 105 ml/kg/min reduziert. Gleichzeitig erfolgt eine Senkung der rektalen Temperatur von physiologischen 37°C auf 18 – 15 °C. Dies geschieht zum einen direkt mithilfe von Eisbeuteln und einer durch das Wasserbad gespeisten Kühl- bzw. Wärmematte, zum anderen indirekt über die ebenfalls durch das Wasserbad ermöglichte Wärmeaustauschfunktion des Oxygenators. Die Anästhesie wird mit 0,8 Vol.-% Isofluran fortgesetzt und es erfolgen weiterhin MAP-abhängig repetitive Gaben von jeweils 5 µg -Boli Fentanyl. Zusätzlich appliziert man mittels einer Pumpe 1,6 mg/Stunde (hour, h) Cisatracurium (Nimbex®, GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, München) in das im Oxygenator befindliche Blut. Am Ende der Abkühlungsphase wird dann die zweite Blutgasanalyse (pre-DHCA) durchgeführt.

Während der gesamten EKZ werden die Tiere mit einem konstanten positiven endexpiratorischen Druck von 5 – 10 cm Wassersäule und einem inspiratorischen O<sub>2</sub>-

Anteil (fraction of inspired oxygen,  $FiO_2$ ) von 0,21 (Continuous Positive Airway Pressure, CPAP) mit einer Frequenz von 10 Atemzügen/min beatmet.

### 3.2.3.5 DHCA

Ist die rektale Temperatur von 18 – 15 °C erreicht, werden HLM, Isofluran- und Nimbexzufuhr sowie CPAP beendet. Um das Blut im HLM-System während des DHCA zirkulieren lassen zu können, richtet man mittels eines Kunststoffschlauchs einen Kurzschluss zwischen dem arteriellen und venösen Schenkel des extrakorporalen Kreislaufs ein. Anschließend wird der arterielle Zufluss in die Schwanzarterie Kanülen-nah abgeklemmt. Über den noch offenen venösen Abfluss wird das Tier alle 10 min während des 45-minütigen Kreislaufstillstandes entblutet. Dieser Zustand des DHCA wird nun für 45 min bei konstanter rektaler Temperatur von 18 – 15 °C aufrechterhalten.

### 3.2.3.6 Wiedererwärmung an der EKZ

Gegen Ende des DHCA entfernt man den Kurzschluss zwischen dem arteriellen und venösen Schenkel des Schlauchsystems wieder. Nach 45 min beginnt dann die Wiedererwärmung. Die Isofluran- und Nimbexzufuhr werden gestartet, der arterielle Zufluss in die Schwanzarterie freigegeben und die HLM mit einer anfänglichen Blutflussrate von 105 ml/kg/min in Gang gesetzt. Innerhalb von 40 min wird die Ratte wieder zum einen direkt unter Verwendung der mit dem Wasserbad verbundenen Heizmatte und eines Warmluftgebläses (42 – 45 °C, WarmTouch®, 5200, Nellcor, USA) sowie indirekt mittels der Wärmeaustauschfunktion des Oxygenators kontinuierlich wiedererwärmt. Die Blutflussrate wird dabei kontinuierlich bis auf den Ausgangswert von 160 – 180 ml/kg/min erhöht. Die erste Blutgasanalyse nach dem DHCA wird bei 20 °C rektaler Temperatur durchgeführt. Dabei wird die Beatmung dem  $paCO_2$  (Normbereich 31 - 40 mmHg) angepasst. Liegt eine Hypoglykämie mit Blutzuckerwerten unter 80 mg/Deziliter (dl) vor, bekommt das Tier 0,1 - 0,2 ml 50 %ige Glukoselösung (DeltaSelect GmbH, Pfullingen). Bei Azidose wird 84 mg/ml Natriumhydrogenkarbonat (DeltaSelect GmbH, Pfullingen) nach der Formel  $HCO_3^- = -BE \times 0,3 \times \text{kg Körpergewicht}$  verabreicht und bei Hypokalzämie unter 1 Millimol (mmol)/l erfolgt eine Substitution mit 0,1 ml einer 10 %igen Kalziumglukonatlösung (Calcium Braun 10 %, B Braun Melsungen AG, Melsungen). Mit zunehmender Wiedererwärmung wandelt sich das EKG von Asystolie über Kammerflimmern oder -flattern und ersten Ersatzrhythmen mit breiten QRS-Komplexen bis hin zum ursprünglichen Sinusrhythmus. Danach steigen Herzfrequenz und MAP wieder an. Liegt der MAP bei einer rektalen Temperatur von mindestens 30 °C und einer Blutflussrate von mindestens 150 ml/kg/min noch unter 45 mmHg, bekommt das Tier über das Reservoir als Bolus

20 µg/ml Noradrenalinhydrochlorid (Arterenol® 1 ml, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main) in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Wiedererwärmung endet nach 40 min bei einer rektalen Temperatur von 35,5 °C. Dazu wird vor dem Beenden der EKZ mit dem Abklemmen der venösen Drainage und arteriellen Zufuhr die Beatmung wieder eingeschaltet. Die Beatmung des Tieres erfolgt mit 0,8 Vol.-% Isofluran in 40 Vol.-% O<sub>2</sub> und Luft. Zu diesem Zeitpunkt werden die Blutgase erneut analysiert (Ende EKZ).

### **3.2.3.7 Nachbeatmungsphase**

Insgesamt bleibt die Ratte nach Abgang von der EKZ noch eine Stunde lang mit 1,0 – 1,5 Vol.-% Isofluran anästhesiert, intubiert und kontrolliert beatmet. Das in der HLM verbleibende Blut wird gesammelt und mit 2000 Umdrehungen/min (rounds per minute, rpm) 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das so gewonnene Erythrozytenkonzentrat mit 6 %iger HAES verdünnt, so dass das entstehende Erythrozytenkonzentrat einen Hkt von 0,5 erreicht. Außerdem gibt man pro ml HAES 0,1 ml Kalziumglukonat in die Lösung. Dieses Konzentrat wird anschließend langsam über die Schwanzarterie retransfundiert. Der Hkt der Ratte soll dabei auf Werte über 0,3 angehoben werden. Eine Stunde nach EKZ erfolgt die letzte Blutgasanalyse (1h post-EKZ). Danach werden alle Katheter, Temperatursonden und Nadelelektroden entfernt. Man ligiert die Gefäße und verschließt die Hautwunden anschließend mit Einzelheften. Eine Stunde nach Ende der EKZ wird die Narkose beendet. Bei Anzeichen suffizienter Spontanatmung wird das Tier in eine Sauerstoffbox verbracht und extubiert, sobald es sich selbstständig von der Rückenlage in die Bauchlage dreht.

### **3.2.3.8 Postoperative Überwachung**

In den ersten vier Stunden nach Beendigung der Narkose steht die Ratte noch unter ständiger Beobachtung des Operateurs. Insgesamt verbleibt sie für ca. 18 Stunden in der mit O<sub>2</sub> angereicherten Plexiglasbox bei freiem Zugang zu Wasser und Futter. Zeigt ein Tier jedoch nach der Operation schwerwiegende neurologische Dysfunktionen oder ein auf andere Weise nachhaltig gestörtes Allgemeinbefinden, wie Dyspnoe oder Zyanose, wird es unmittelbar getötet. Ist dies nicht der Fall, wird die Ratte am Morgen des ersten postoperativen Tages wieder zurück in ihre vertraute Umgebung gebracht.

### **3.2.4 Untersuchung der neurologischen Funktion**

Die neurologische Funktion der Tiere wird anhand eines standardisierten Protokolls untersucht. Dieses beinhaltet Tests zu Motorik, Kraft, Gleichgewicht, Bewegungssymmetrie (s. Abbildung 3.5) und Sensorik (Propriozeption, Tastempfindung der Schnurrhaare,

Sehsinn und Gehörsinn). Bewusstsein, Pflegeverhalten und Laufverhalten können schon im Vorfeld durch bloße Beobachtung der Ratte im Homecage beurteilt werden. Die Defizite werden im jeweiligen Test durch Punkte (Score) beschrieben und anschließend addiert, wobei in der gesamten neurologischen Untersuchung (NU) maximal 54 Punkte erreicht werden können. 0 - 3 Punkte werden als physiologisch angesehen, die maximale Punktzahl entspricht einem maximalen neurologischen Defizit. Um bereits vorbestehende neurologische Defizite zu detektieren, erfolgt die erste NU bereits einen Tag vor dem operativen Eingriff bzw. vor der Pause bei den Kontrollen (Baseline). Postoperative neurologische Defizite werden dann am 1., 2., 3. und 14. Tag getestet.



**Abbildung 3.5: Testung der neurologischen Funktion**

Beispiele für die Testung der neurologischen Funktion (von links nach rechts): Gleichgewichtssinn beim „Beam-Balance-Test“, Kraft und Bewegungssymmetrie beim „Prehensile-Traction-Test“, Kraft beim „Rotating-Grid-Test“.

### 3.2.5 Untersuchung der kognitiven Funktion

Kognitive Defizite werden in der postoperativen Phase in einem zehntägigen mHBT untersucht. Dieser schließt sich der NU am 4. Tag nach dem DHCA bzw. der Pause bei den Tieren der Kontrollgruppen an. Für die Durchführung dient die zuvor abgetrennte Testarena im Homecage (s. Abbildung 3.6). In der Testarena befindet sich ein Board mit 10 Steckzylindern, von denen drei mit einem weißen Klebebandstreifen markiert sind. Diese drei Zylinder werden an jedem Testtag an unterschiedliche festgelegte Stellen des Boards gesteckt und mit einer Mandel versehen. Die Tiere sollen im Lauf der 10 Testtage erlernen, eine Verbindung zwischen der Markierung am Zylinder und der darin enthaltenen Mandel zu erkennen und dementsprechend schnell und gezielt die drei Mandeln zu finden. Um eine Orientierung am Mandelgeruch auszuschließen, befinden sich in allen 10 Zylindern Mandeln unterhalb eines Gitters, die für die Ratten zwar riechbar, aber nicht erreichbar sind. Zusätzlich werden alle Zylinder am oberen Rand mit einer Johannisbeerlösung bestrichen. An jedem Testtag werden vier Testdurchläufe mit der gleichen Zylinderkombination pro Tier durchgeführt. Ein Durchlauf läuft folgendermaßen ab: Zu Beginn setzt man die Ratte immer in die gleiche Ecke der Testarena. Gleichzeitig startet der Untersucher am Computer das

Beobachtungsprogramm The Observer® Version 5.0. Dieses Programm ermöglicht die Beobachtung des Verhaltens der Ratte unter gleichzeitiger Kodierung der einzelnen Verhaltensweisen, wie z.B. Männchen machen, das Board betreten, einen markierten oder nicht markierten Zylinder aufsuchen, durch Eingabe von definierten Tastenkombinationen auf der Computertastatur. Ein Durchlauf dauert so lange, bis die Ratte alle drei Mandeln gefunden hat, bzw. maximal 300 Sekunden. Während des Tests zeichnet eine Kamera die Durchläufe auf, damit eventuelle Eingabefehler ohne zusätzliche Durchläufe korrigiert werden können. Neben den beiden kognitiven Parametern Lernen und Gedächtnis können mittels des mHBT auch Verhaltensparameter und motorische Parameter erfasst werden.



**Abbildung 3.6: modifizierter Holeboardtest (mHBT)**

Testarena mit einer Ratte auf dem 10-Zylinder-Holeboard, im Vordergrund abgetrennter Wohn-Schlaf-Bereich des Homecages.

### 3.2.6 Entnahme und Präparation des Gehirns

Am 14. postoperativen Tag werden die Tiere nach Beendigung ihrer letzten neurologischen Untersuchung in tiefer Isoflurannarkose (5 Vol.-%) durch Dekapitation getötet. Analog zur Kastration/Scheinkastration bzw. EKZ mit DHCA wird die Narkoseeinleitung in der durchsichtigen Plexiglasbox durchgeführt. Nach der Intubation erfolgt unter maschineller Beatmung die Eröffnung des Thorax, um dem Tier Blut direkt aus dem linken Ventrikel zu entnehmen. Nach Zentrifugation für 3 min bei 12 000 rpm wird das Serum aus dem Blut

durch Abpipettierung gewonnen. Dieses dient späteren serologischen Untersuchungen und wird zunächst in einem Eppendorfgefäß bei  $-80\text{ °C}$  eingefroren. Sobald die Ratte weitgehend entblutet ist, wird sie von der maschinellen Beatmung genommen und zwischen Okziput und dem ersten Halswirbelkörper mittels einer Schere von dorsal dekapitiert. Das Gehirn wird anschließend durch Abtragung von einzelnen Teilen der Schädelkalotte freigelegt und mittels eines Spatels aus der Schädelbasis gelöst. Zum Gefrieren platziert man das etwa walnussgroße Rattengehirn mit der Unterseite auf einem Metallplättchen, welches in einem Behälter auf Trockeneis gelagert ist. Nach diesem primären Gefriervorgang erfolgt die Lagerung in einem Aluminiumzylinder bei  $-80\text{ °C}$  im Gefrierschrank.

### **3.2.7 Aufbereitung des Gehirns**

Zur histologischen Untersuchung werden Gefrierschnitte des Rattengehirns angefertigt. Nach Entfernung des Aluminiumzylinders wird das gefrorene Gehirn auf dem Objektisch des Kryostat Mikrotoms (HM 500 QM, Microtom GmbH, Walldorf) mittels Gefriermedium (Tissue Freezing Medium<sup>®</sup>, Jung, Leica Instruments, Nussloch) fixiert. Bei einer Temperatur von  $-20\text{ °C}$  werden von rostral beginnend bei Bregma  $-0,3\text{ mm}$  und Bregma  $-3,3\text{ mm}$   $7\text{ }\mu\text{m}$  dicke Hirnschnittpräparate angefertigt. Jeweils zwei Hirnschnittpräparate einer Ebene werden auf einem Superfrostobjektträger (Super Frost<sup>®</sup> Plus, Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen und in Objektträgerkästen bis zu ihrer weiteren Verwendung bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

### **3.2.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)**

Die zu färbenden Schnitte werden aus dem Gefrierschrank entnommen und zunächst 10 min in 100 % Ethanol fixiert. Anschließend erfolgt eine Hydrierung in absteigender Alkoholreihe (96 %, 70 % Ethanol, Fa. Merck, Darmstadt). Man taucht die Schnitte kurz in destilliertes Wasser und färbt danach für 2 min in Hämalaun nach Mayer (hausinterne Apotheke), bevor die Schnitte für 10 min unter fließendem Wasser gebläut werden. Nach zweimaligem Eintauchen in destilliertes Wasser werden die Schnitte für 20 s in ein Eosinbad (wässrige Eosin-Dinatrium-Lösung, hausinterne Apotheke) getaucht, anschließend erneut mit destilliertem Wasser gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 % Ethanol) dehydriert und abschließend mit Roti-Histokit eingedeckt, getrocknet und bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert.

### 3.2.9 Immunhistochemische Doppelfärbung

Zur Detektion von inflammatorischen und apoptotischen Vorgängen innerhalb der Neurone werden immunhistochemische Färbeverfahren angewendet. Hierbei erfolgt eine Doppelfärbung, bei der zunächst das jeweilige gesuchte Protein und im zweiten Schritt die Neurone angefärbt werden. Das Vorgehen entspricht bei allen Färbungen einem standardisierten Protokoll:

#### 3.2.9.1 Anfärbung der Proteine

Zuerst wird der Gefrierschnitt aus dem Gefrierschrank entnommen und sofort für 10 min in 4 % Paraformaldehyd (PFA, eigene Herstellung) fixiert. Es folgt ein Waschvorgang mit Phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline, PBS, eigene Herstellung), bevor die endogene Peroxidase mit 3 %igem Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) -Methanol (eigene Herstellung) blockiert wird. Nach einer Inkubationszeit von 10 min und erneutem zweimaligen Waschen mit PBS wird das Reagenz DAKO Serum-Free Protein Block (DakoCytomation, Denmark A/S, Glostrup Denmark) aufgebracht und für 20 min inkubiert. Anschließend wird diese Blockierung ohne Waschen entfernt und der Primärantikörper aufgebracht, der an das jeweilige gesuchte Protein (TNF $\alpha$ , NF $\kappa$ B, iNOS, Caspase-3, PARP) bindet. Die verschiedenen Primärantikörper sind in Abbildung 3.7: aufgeführt. Sie benötigen jeweils eine Inkubationszeit von 60 min.

Primärantikörper	gerichtet gegen:	Verdünnung
Polyklonaler rabbit anti-cleaved Caspase-3 (ASP175) (Cell Signaling, USA)	<b>Caspase-3</b>	1 : 250
Polyklonaler rabbit anti-NF $\kappa$ B p65 (Abcam, Cambridge, UK)	<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	1 : 100
Polyklonaler rabbit anti-cleaved PARP (BioVision, USA)	<b>PARP-1</b>	1:25
Polyklonaler rabbit anti-nitric oxide synthase type 2 (Acris Antibodies, Herford)	<b>iNOS</b>	1 : 50
Polyklonaler rabbit anti-TNF- $\alpha$ (Acris Antibodies, Hiddenhausen)	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	1:500

**Abbildung 3.7: Verdünnungen der Primärantikörper**

Nach diesen 60 min und zweimaligem Waschen mit PBS wird der mit Biotin konjugierte Sekundärantikörper (Biotinylated Anti-rabbit IgG, BA-1000, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) in einer Verdünnung von 1:200 für 45 min aufgetragen. Nach erneutem Waschen mit PBS trägt man mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin (R.T.U. Horseradish Peroxidase Streptavidin, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) auf und

inkubiert 30 min. Danach wird wieder zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit Diaminobenzidin (DAB, DakoCytomation, Denmark A/S, Glostrup, Denmark) braun gefärbt.

### **3.2.9.2 Anfärbung der Neurone**

In einem zweiten Färbeschritt werden die Neurone durch Färbung des neuronalen Strukturproteins Neuronen-spezifisches Kernprotein (Neuron specific nuclear Protein, NeuN) markiert. Dazu inkubiert man nach Anfärbung des jeweils gesuchten Proteins die bereits vorbehandelten Gefrierschnitte 60 min lang mit einem Primärantikörper gegen NeuN (Mouse NeuN, Monoclonal antibody; Chemicon International Inc., Temecula, USA) in einer Verdünnung von 1:1000. Nach zweimaligem Waschen in PBS trägt man den mit Biotin konjugierten Sekundärantikörper (Biotinylated anti-mouse IgG, BA-2001, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) in einer Verdünnung von 1:100 für ebenfalls 60 min auf. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS inkubiert man mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Streptavidin (Alkaline Phosphatase Streptavidin, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) für 45 min in einer Verdünnung von 1:10, bevor wieder zweimal mit PBS gewaschen wird. Schließlich erfolgt die Färbung durch Vector Red (Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) für 30 min. Danach werden die Schnitte erneut in PBS gewaschen, anschließend mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 % Ethanol) dehydriert, in Roti-Histol (Fa. Roth, Karlsruhe) für zweimal 2 min fixiert und mit Roti-Histokit (Fa. Roth, Karlsruhe) eingedeckt, getrocknet und bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert.

### **3.2.10 Auswertung der Histologie**

Ein geblinderter Untersucher ermittelt durch manuelles Auszählen unter dem Lichtmikroskop (Axiolab, Fa. Zeiss, Jena, Vergrößerung 400-fach) das Ausmaß des neuronalen Zellschadens im Hippokampus, Kortex und Striatum in jeweils beiden Hirnhemisphären. Dabei wird der Hippokampus im Schnitt Bregma -3,3 komplett ausgezählt, wogegen in Kortex und Striatum jeweils 5 sog. Haupt Gesichtsfelder (High Power Fields, HPF) ausgezählt werden. Der Kortex wird ebenfalls im Schnitt Bregma -3,3 und das Striatum im Schnitt Bregma -0,3 ausgewertet. Dabei wird die Anzahl geschädigter Neurone ermittelt. Ungeschädigte Neurone zeigen sich in der HE-Färbung blassblau gefärbt und von runder Form. Geschädigte Neurone sind dagegen kräftig pink und weisen dabei eine dreieckige bzw. unregelmäßige Form auf und die Zellkerne sind nicht mehr klar erkennbar. In den immunhistochemischen Färbungen wird die Anzahl der Neurone im Hippokampus und Kortex ermittelt, die das jeweils gesuchte Protein exprimieren. Die entsprechenden

Neurone zeigen dabei die Farben rot und braun, da sowohl NeuN als auch das jeweils gesuchte Protein Caspase-3, PARP, NFκB, TNFα oder iNOS angefärbt sind.

### 3.2.11 Serumuntersuchungen

Serumproben werden bei allen Tieren am Tag der Euthanasie entnommen. Diese dienen zur Hormonbestimmung als Erfolgskontrolle der Kastrationen bzw. zur Kontrolle der physiologischen Hormonproduktion bei den scheinkestrierten Tieren am Tag 14 nach EKZ/DHCA. Bei allen Tieren werden die Serumhormonspiegel von E<sub>2</sub>, Progesteron und Testosteron im Institut für klinische Chemie des Klinikums rechts der Isar bestimmt. Hierzu wird der Elecsys® 2010 Analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Alle drei Hormone werden im Doppelansatz gemessen. Abbildung 3.8 zeigt die jeweilige Standardabweichung (root mean square deviation, RMSD), den arithmetischen Mittelwert (mean value, MV) und die Referenzwerte (reference ranges, ref) des Elektrochemilumineszenz-Immunoassays.

Geschlechtshormon	RMSD	MV	ref
<b>Testosteron</b>	4,43%	1,57 ng/dl, n = 45	0,2 - 0,8 ng/ml
<b>17β-Estradiol</b>	9,26%	66,5 pg/ml, n = 44	30 -120 pg/ml prä- und postovulatorisch 10 -30 pg/ml postmenopausal
<b>Progesteron</b>	5,56%	8,52 ng/ml, n = 42	0,2 -0,9 ng/ml prä- und postovulatorisch 0,1 -0,3 ng/ml postmenopausal

**Abbildung 3.8: Geschlechtshormone**  
RMSD, MV und ref der Geschlechtshormone

### 3.2.12 Statistische Auswertung

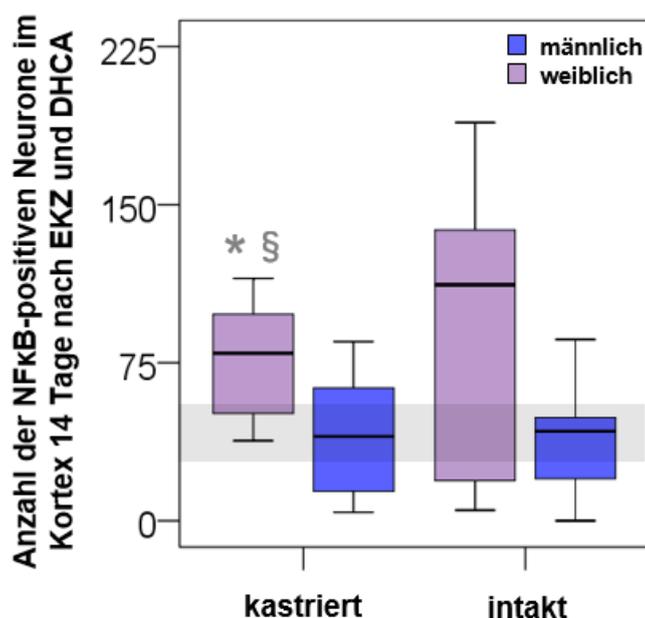
Die biochemischen Ergebnisse werden mit dem Kruskal-Wallis-Test sowie dem post hoc Mann-Whitney-U-Test ausgewertet und mittels Box Plots präsentiert. Wann immer das Geschlecht und/oder der Hormonstatus in den Kontrollgruppen keinen Einfluss auf den jeweils untersuchten Parameter zeigt, werden die 4 unbehandelten Kontrollgruppen mit einem gemeinsamen 95 %-Konfidenzintervall als graues Areal zusammengefasst. Beeinflussen Geschlecht und/oder Hormonstatus jedoch den jeweiligen Parameter, wird das 95 %-Konfidenzintervall der korrespondierenden unbehandelten Kontrollgruppe mittels separater grauer Balken dargestellt. Ein statistisch signifikantes Ergebnis wird bei einem Signifikanzwert (probability value, p) < 0,05 angenommen. Die statistische Auswertung erfolgt mit SPSS Version 19.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Immunhistochemische Doppelfärbungen der neuronalen Inflammationsparameter

#### 4.1.1 Nukleärer Faktor “κ-Leichtketten-Enhancer” aktivierter B-Zellen (NFκB)

Die neuronale Expression des Inflammationsparameters NFκB ist im Motorkortex der weiblichen kastrierten Tiere im Vergleich zu den beiden männlichen DHCA-Gruppen 14 Tage postoperativ signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Somit weist das Geschlecht (männlich vs. weiblich) einen signifikanten Einfluss auf die kortikale NFκB-Expression auf. Bei der Gruppe der weiblichen intakten Ratten besteht hingegen kein Unterschied gegenüber den anderen DHCA-Gruppen. Bei den beiden männlichen sowie auch bei den beiden weiblichen DHCA-Gruppen zeigen sich untereinander keine signifikanten Unterschiede in der kortikalen NFκB-Expression, sodass hier kein signifikanter Einfluss des Geschlechtshormonstatus nachweisbar ist (s. Abbildung 4.1).



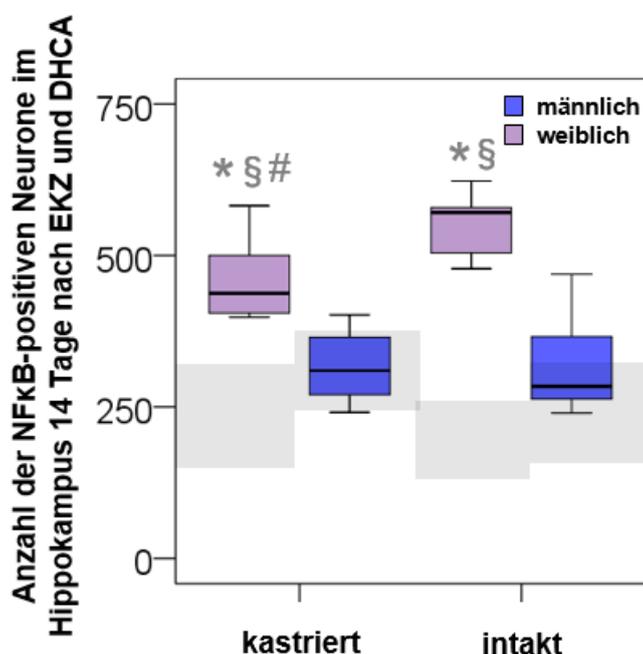
**Abbildung 4.1: NFκB im Kortex**

Boxplot-Darstellung der NFκB-positiven Neurone im Motorkortex aller 4 DHCA-Gruppen. Das graue Areal beschreibt das obere 95 %-Konfidenzintervall aller unbehandelten Kontrollgruppen. Da das Geschlecht und/oder der Geschlechtshormonstatus bei den Kontrollgruppen keinen Einfluss auf die NFκB-Expression im Kortex hat, werden diese zusammengefasst.

Signifikanz: \* =  $p < 0,05$  vs. männlich intakt, § =  $p < 0,05$  vs. männlich kastriert

Im Hippokampus zeigt die DHCA-Gruppe der intakten weiblichen Ratten die signifikant höchste NFκB-Expression im Vergleich zu allen anderen Gruppen ( $p < 0,05$ ). Die Gruppe der weiblichen kastrierten Ratten weist im Vergleich zu beiden männlichen DHCA-Gruppen eine signifikant höhere Expression von NFκB auf ( $p < 0,05$ ). Untereinander besteht bei den beiden männlichen DHCA-Gruppen kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die NFκB-Expression. Somit haben sowohl das Geschlecht (männlich vs. weiblich) als auch der Hormonstatus bei den Weibchen (kastriert vs. intakt) einen signifikanten Einfluss auf die Expression von NFκB im Hippokampus (s. Abbildung 4.2).

Bei den Kontrollgruppen, welche jeweils graphisch durch die grauen 95%-Konfidenzintervall-Balken dargestellt werden, weisen die männlichen kastrierten Tiere die tendenziell höchste NFκB-Expression auf, wobei beide männliche Gruppen höhere Expressionsraten zeigen als die beiden weiblichen Gruppen. Innerhalb der weiblichen Kontrollgruppen zeigen die kastrierten Tiere eine tendenziell höhere hippocampale NFκB-Expression als die intakten.



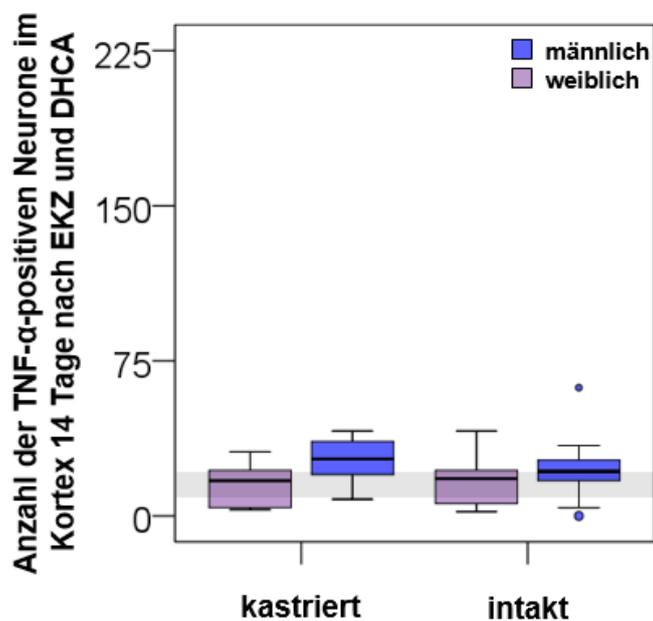
**Abbildung 4.2: NFκB im Hippokampus**

Anteil der hippocampalen Neurone, die den Inflammationsparameter NFκB exprimieren. Die Box Plots stellen die 4 DHCA-Gruppen dar, während die separaten grauen Areale die oberen 95 %-Konfidenzintervalle der jeweils korrespondierenden Kontrollgruppen beschreiben, bei denen Geschlecht und/oder Geschlechtshormonstatus einen Einfluss auf die NFκB-Expression im Hippokampus haben.

Signifikanzen: \* =  $p < 0,05$  vs. männlich intakt, # =  $p < 0,05$  vs. weiblich intakt, § =  $p < 0,05$  vs. männlich kastriert

### 4.1.2 Tumornekrosefaktor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

Zwischen den vier DHCA-Gruppen bestehen sowohl im Motorkortex ( $p = 0,153$ ) als auch im Hippokampus ( $p = 0,166$ ) keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Expression von TNF- $\alpha$ . (s. Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4).

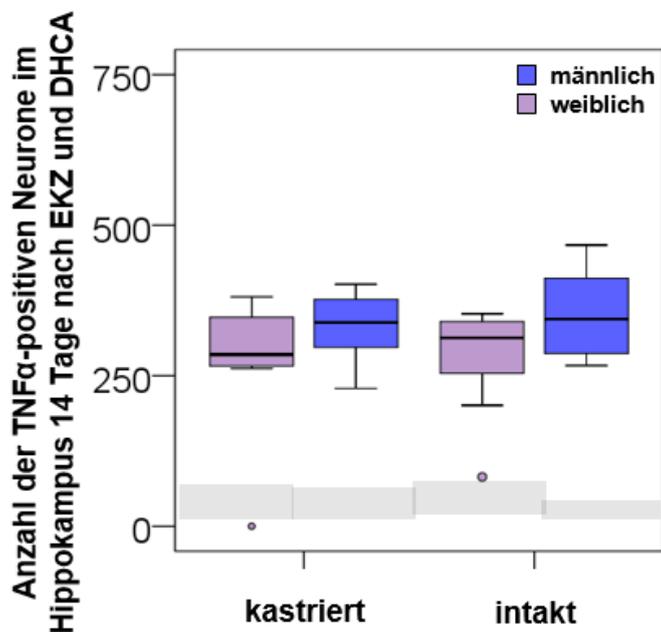


**Abbildung 4.3: TNF- $\alpha$  im Kortex**

Anteil der kortikalen Neurone, die den Inflammationsparameter TNF- $\alpha$  exprimieren, jeweils aller DHCA-Gruppen im Vergleich. Das graue Areal beschreibt das obere 95 %-Konfidenzintervall aller unbehandelten Kontrollgruppen. Da das Geschlecht und/oder der Geschlechtshormonstatus bei den Kontrollgruppen keinen Einfluss auf die TNF- $\alpha$ -Expression im Kortex hat, werden diese zusammengefasst.

## Ergebnisse

Bei den Kontrollgruppen weisen die weiblichen intakten Tiere die tendenziell höchste TNF- $\alpha$ -Expression im Hippokampus auf, wobei beide weiblichen Gruppen höhere Expressionsraten zeigen als die beiden männlichen Gruppen. Innerhalb der männlichen Kontrollgruppen zeigen die kastrierten Tiere eine tendenziell höhere hippocampale TNF- $\alpha$ -Expression als die intakten.

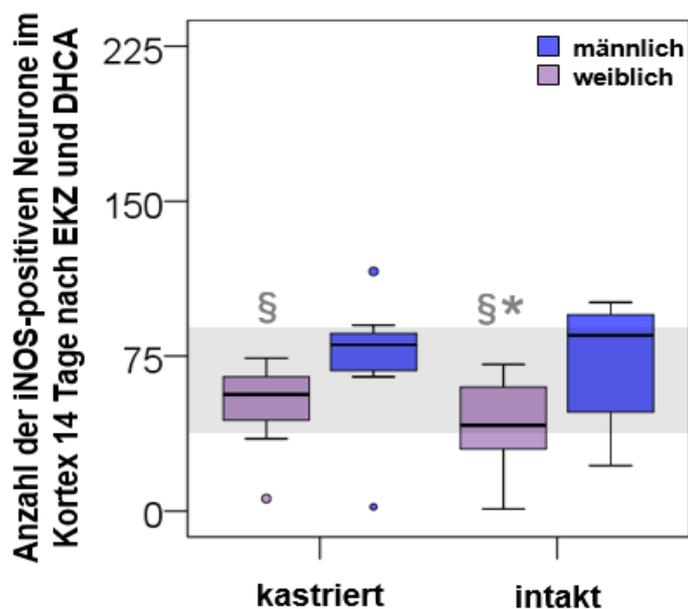


**Abbildung 4.4: TNF- $\alpha$  im Hippokampus**

TNF- $\alpha$ -positive Neurone im Hippokampus von männlichen und weiblichen kastrierten und intakten Ratten 14 Tage nach EKZ und DHCA. Die grauen Balken stellen das obere 95 %-Konfidenzintervall der jeweils korrespondierenden unbehandelten Kontrollgruppen dar, bei denen Geschlecht und/oder Geschlechtshormonstatus einen Einfluss auf die TNF- $\alpha$ -Expression im Hippokampus haben.

### 4.1.3 Stickstoffmonoxid-Synthase i (iNOS)

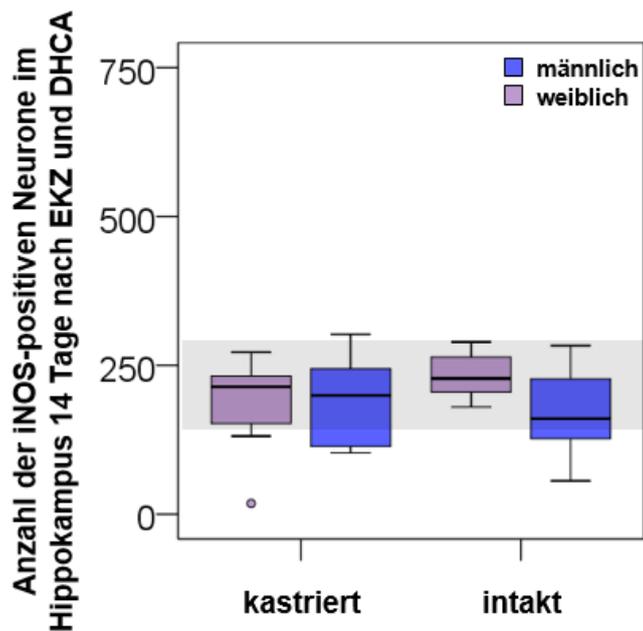
Im Motorkortex zeigt sich die iNOS-Expression in den beiden männlichen Gruppen höher als in den beiden weiblichen Gruppen ( $p < 0,05$ ) (s. Abbildung 4.5). Dennoch verbleibt sie sowohl im Motorkortex als auch im Hippokampus ( $p = 0,257$ ) (s. Abbildung 4.6) innerhalb des 95 %-Konfidenzintervalls der Kontrolltiere. Geschlecht und Kastration beeinflussen die iNOS-Expression in beiden Gehirnarealen somit nicht.



**Abbildung 4.5: iNOS im Kortex**

Anteil der iNOS-positiven Neurone im Motorkortex männlicher und weiblicher kastrierter und intakter Ratten. Das graue Areal stellt das 95 %-Konfidenzintervall aller unbehandelten Kontrollgruppen dar. Da das Geschlecht und/oder der Geschlechtshormonstatus bei den Kontrollgruppen keinen Einfluss auf die iNOS-Expression im Kortex hat, werden diese zusammengefasst.

Signifikanzen: \* =  $p < 0,05$  vs. männlich intakt, § =  $p < 0,05$  vs. männlich kastriert



**Abbildung 4.6: iNOS im Hippokampus**

Boxplotdarstellung der Anzahl iNOS-positiver Neurone im Hippokampus aller 4 DHCA-Gruppen. Das graue Areal zeigt das obere 95 %-Konfidenzintervall aller unbehandelten Kontrollgruppen. Da das Geschlecht und/oder der Geschlechtshormonstatus bei den Kontrollgruppen keinen Einfluss auf die iNOS-Expression im Hippokampus hat, werden diese zusammengefasst.

## 4.2 Immunhistochemische Doppelfärbungen der neuronalen Apoptoseparameter

### 4.2.1 Caspase-3

Die Expression des Apoptoseparameters Caspase-3 im Motorkortex zeigt keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den DHCA-Gruppen. Daher kann im Motorkortex kein signifikanter Einfluss des Geschlechts (weiblich vs. männlich) oder des Geschlechtshormonstatus (kastriert vs. intakt) auf die Caspase-3-Expression nachgewiesen werden ( $p = 0,551$ ) (s. Abbildung 4.7).

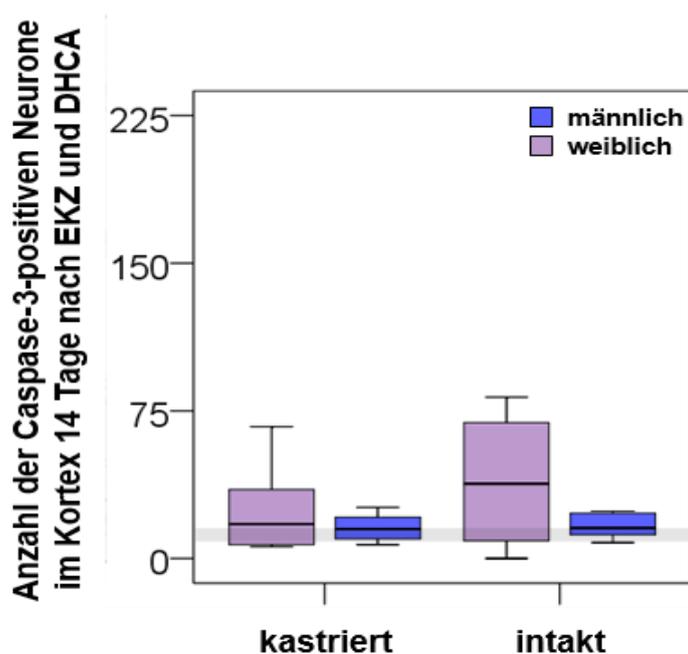
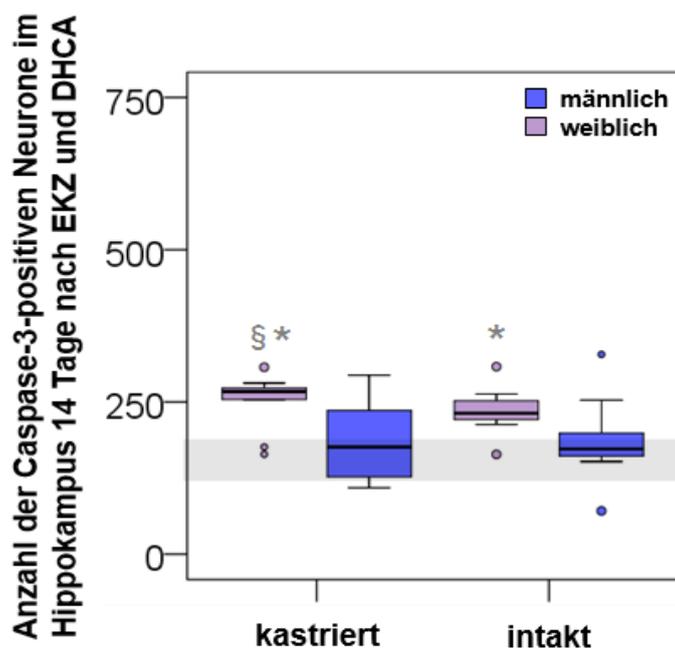


Abbildung 4.7: Caspase-3 im Kortex

Anteil der Caspase-3-positiven Neurone im Motorkortex aller 4 DHCA-Gruppen. Das graue Areal zeigt das obere 95 %-Konfidenzintervall aller unbehandelten Kontrollgruppen. Da das Geschlecht und/oder der Geschlechtshormonstatus bei den Kontrollgruppen keinen Einfluss auf die Caspase-3-Expression im Kortex hat, werden diese zusammengefasst.

Im Hippokampus ist Caspase-3 in der DHCA-Gruppe der weiblichen kastrierten Ratten im Vergleich zu den beiden männlichen DHCA-Gruppen signifikant hochreguliert ( $p < 0,05$ ). Die weiblichen intakten Tiere zeigen zumindest im Vergleich zu den männlichen intakten Tieren eine signifikant höhere Caspase-3-Expression ( $p < 0,05$ ). Beide Geschlechter Tieren eine signifikant höhere Caspase-3-Expression ( $p < 0,05$ ). Beide Geschlechter weisen untereinander keine signifikanten Expressionsunterschiede von Caspase-3 auf. Somit besteht im Hippokampus ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die Caspase-3-Expression, während der Geschlechtshormonstatus diese nicht signifikant beeinflusst (s. Abbildung 4.8).



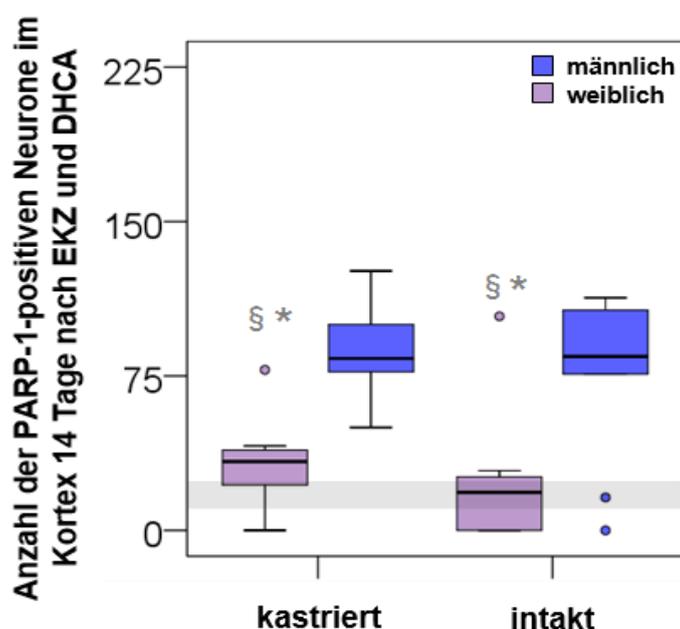
**Abbildung 4.8: Caspase-3 im Hippokampus**

Boxplotdarstellung der hippocampalen Neurone der DHCA-Gruppen, die Caspase-3 exprimieren. Das graue Areal stellt das obere 95 %-Konfidenzintervall der unbehandelten Kontrollgruppen dar. Da das Geschlecht und/oder der Geschlechtshormonstatus bei den Kontrollgruppen keinen Einfluss auf die Caspase-3-Expression im Hippokampus hat, werden diese zusammengefasst.

Signifikanzen: \* =  $p < 0,05$  vs. männlich intakt, § =  $p < 0,05$  vs. männlich kastriert.

#### 4.2.2 Polyadenosinribosepolymerase-1 (PARP-1)

Die Expression von PARP-1 ist in beiden männlichen DHCA-Gruppen sowohl im Motorkortex als auch im Hippokampus im Vergleich zu den beiden weiblichen DHCA-Gruppen signifikant hochreguliert ( $p < 0,05$ ). Unterschiede zwischen kastrierten und nicht kastrierten Tieren erreichen in beiden Gehirnarealen kein Signifikanzniveau. Daher besteht für die Expression von PARP-1 sowohl im Motorkortex als auch im Hippokampus ein signifikanter Einfluss des Geschlechts (männlich vs. weiblich), nicht jedoch des Geschlechtshormonstatus (kastriert vs. intakt) (s. Abbildung 4.9 und Abbildung 4.10).

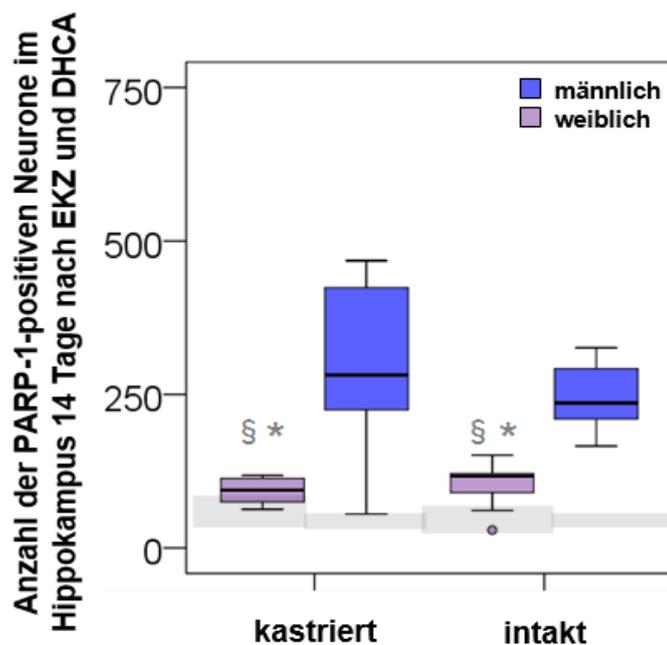


**Abbildung 4.9: PARP-1 im Kortex**

Anzahl der PARP-1-positiven Neurone im Motorkortex männlicher und weiblicher kastrierter und intakter Tiere. Das graue Areal stellt das obere 95 %-Konfidenzintervall der unbehandelten Kontrolltiere dar. Da das Geschlecht und/oder der Geschlechtshormonstatus bei den Kontrollgruppen keinen Einfluss auf die PARP-1-Expression im Kortex hat, werden diese zusammengefasst.

Signifikanzen: \* =  $p < 0,05$  vs. männlich intakt, § =  $p < 0,05$  vs. männlich kastriert.

Bei den Kontrollgruppen weisen die beiden weiblichen Gruppen tendenziell höhere PARP-1-Expressionsraten im Hippokampus auf als die beiden männlichen. Dabei zeigen die weiblichen kastrierten Tiere eine tendenziell höhere hippocampale PARP-1-Expression als die intakten, bei den männlichen Kontrollgruppen verhält es sich umgekehrt.



**Abbildung 4.10: PARP-1 im Hippokampus**

Anteil der hippocampalen Neurone aller 4 DHCA-Gruppen, welche PARP-1 exprimieren. Die grauen Balken stellen das obere 95 %-Konfidenzintervall der jeweils korrespondierenden unbehandelten Kontrollgruppen dar, bei denen Geschlecht und/oder Geschlechtshormonstatus einen Einfluss auf die PARP-1-Expression im Hippokampus haben.

Signifikanzen: \* =  $p < 0,05$  vs. männlich intakt, § =  $p < 0,05$  vs. männlich kastriert.

### 4.3 Ergebniszusammenfassung: Physiologische Parameter, modifizierter Holeboardtest, neurologische Untersuchung, Gehirnmorphologie und Mortalität

Die Ergebnisse der physiologischen Parameter, des mHBT, der neurologischen Untersuchung, der Gehirnmorphologie sowie der Mortalität, welche in der Dissertation von Stefan Friedrich ausführlich zur Darstellung kommen, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die durch Blutgasanalyse erhobenen Parameter Hb-Konzentration,  $\text{PaO}_2$ , BE und Blutglukosekonzentration sowie der MAP, welche im Rahmen des Eingriffs mit EKZ und DHCA an fünf definierten Messzeitpunkten dokumentiert werden, verändern sich in Abhängigkeit von der Zeit. Dabei beeinflusst die Gruppenzugehörigkeit alle Parameter mit Ausnahme des MAP. Blutproben zur Bestimmung der Geschlechtshormonspiegel werden bei allen Tieren zum Zeitpunkt ihrer Tötung am Ende der 14-tägigen Testphase entnommen. Erwartungsgemäß sind signifikante Auswirkungen von Geschlecht und Geschlechtshormonstatus auf alle Hormonspiegel feststellbar. Die weiblichen intakten Tiere weisen jeweils den höchsten  $\text{E}_2$ - und Progesteron-Spiegel aller Tiere auf, während

die männlichen intakten Tiere den höchsten Testosteronspiegel aller Tiere aufweisen. Zusätzlich besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den DHCA-Gruppen und ihren jeweils korrespondierenden Kontrollgruppen bezüglich des E<sub>2</sub>-Spiegels. Und innerhalb der DHCA-Gruppen haben die männlichen intakten Tiere einen signifikant niedrigeren Progesteron-Spiegel als die männlichen kastrierten Tiere. Der Geschlechtshormonstatus der männlichen Ratten beeinflusst also die Progesteronproduktion im Rahmen des DHCA. Gleiches gilt für die männlichen intakten DHCA-Tiere gegenüber ihren korrespondierenden Kontrollen. Hieraus lässt sich ein signifikanter Einfluss des operativen Eingriffes auf den Progesteronspiegel bei den männlichen intakten Tieren ableiten. Das Geschlecht, der Hormonstatus sowie auch der operative Eingriff bei den DHCA-Gruppen haben eine signifikante Auswirkung auf das Körpergewicht der Tiere in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf. Bereits zu Beginn sind die männlichen Ratten trotz gleichen Alters signifikant schwerer als die weiblichen. Sowohl in den DHCA- als auch in den Kontrollgruppen weisen die männlichen intakten Tiere das signifikant höchste Körpergewicht auf. Innerhalb der weiblichen Gruppen sind hingegen die kastrierten Tiere signifikant schwerer als die intakten. Die Kognitions- und Verhaltensparameter aller vier DHCA-Gruppen sind in der zweiwöchigen Testphase nach EKZ und 45-minütigem DHCA mit denjenigen der unbehandelten Kontrollgruppen vergleichbar. Ein Einfluss des Geschlechts oder des Geschlechtshormonstatus lässt sich hier nicht nachweisen. Zwar zeigen die kastrierten Tiere im Vergleich zu den intakten Tieren ein vermehrtes Angstverhalten sowie auch ein besseres Arbeitsgedächtnis, aber auch diese Parameter verbleiben im Vergleich zu den Kontrollgruppen im Normbereich. Die motorische Funktion erweist sich bei den weiblichen Tieren als signifikant besser als bei den männlichen. Dies korreliert auch mit einem signifikant geringeren morphologischen Schaden im Gehirn der weiblichen Gruppen im Vergleich zu den männlichen Gruppen. Somit hat das Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf die Motorik und den morphologischen Gehirnschaden der Tiere, während beide Parameter vom Geschlechtshormonstatus unbeeinflusst bleiben. Die weiblichen DHCA-Gruppen weisen eine hohe Mortalitätsrate während der frühen postoperativen Phase auf. 16 von 37 weiblichen DHCA-Tieren gegenüber 2 von 23 männlichen DHCA-Tieren überleben die ersten Tage nach EKZ und DHCA nicht. Alle verstorbenen Tiere werden ersetzt, um eine gleichbleibende Gruppengröße von n = 10 zu gewährleisten. Da unsere Studie nicht darauf ausgelegt war, die Mortalitätsrate zu untersuchen, handelt es sich hier um eine Zufallsentdeckung ohne statistische Aussagekraft [FRIEDRICH, *tiermedizinische Dissertation 2013*].

## 5 Diskussion

### 5.1 Ergebniszusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt den Einfluss des Geschlechts und des Geschlechtshormonstatus auf die zerebrale Expression der Inflammations- und Apoptoseparameter NF $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , iNOS, Caspase-3 und PARP-1 14 Tage nach EKZ und DHCA bei der Ratte. Da sowohl das Geschlecht [MCCULLOUGH *et al.*, 2016] als auch die Geschlechtshormone einen Einfluss auf die Immunantwort nach einer zerebralen Ischämie haben [CÉSPEDES RUBIO *et al.*, 2018; RITZEL *et al.*, 2013], wurde von uns im Vorfeld angenommen, für jede der vier verschiedenen DHCA-Gruppen, welche sich hinsichtlich des Geschlechts und/oder des Geschlechtshormonstatus unterscheiden, ein jeweils individuelles Expressionsmuster der untersuchten Inflammations- und Apoptoseparameter zu ermitteln. Diese Annahme bestätigt sich jedoch nur zum Teil. Die Ergebnisse zeigen, dass das weibliche Geschlecht mit einer signifikant erhöhten NF $\kappa$ B- und Caspase-3-Expression im Vergleich zum männlichen Geschlecht einhergeht. Das männliche Geschlecht ist hingegen signifikant mit einer erhöhten PARP-1-Expression assoziiert. Die weiblichen Geschlechtshormone beeinflussen NF $\kappa$ B im Sinne einer signifikant erhöhten Expressionsrate bei den weiblichen intakten Tieren im Vergleich zu den weiblichen kastrierten Tieren. Im Gegensatz dazu bleiben sämtliche untersuchten Inflammations- und Apoptoseparameter vom Testosteronspiegel unbeeinflusst. Für iNOS und TNF- $\alpha$  ergeben sich keinerlei signifikante Expressionsunterschiede zwischen den DHCA-Gruppen.

### 5.2 Diskussion der Ergebnisse

#### 5.2.1 NF $\kappa$ B

Für NF $\kappa$ B kann eine sowohl Geschlechts- als auch Geschlechtshormonstatus-abhängige Expression gezeigt werden. Bei den weiblichen DHCA-Gruppen werden sowohl im Hippokampus als auch im Motorkortex eine signifikant höhere Anzahl NF $\kappa$ B-positiver Neurone nachgewiesen als bei den männlichen DHCA-Gruppen. Der postulierte „proinflammatorische“ Phänotyp des männlichen Geschlechts [SIEGEL *et al.*, 2010] scheint sich somit auf den ersten Blick nicht zu bestätigen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre der geschlechtsabhängige Hypothermieeffekt, der sich u.a. in einer verminderten NF $\kappa$ B-Aktivierung beim männlichen Geschlecht äußern kann [CAMPOS *et al.*, 2012; YENARI & HAN, 2012; KELLERMANN *et al.*, 2009]. Außerdem nimmt NF $\kappa$ B eine Schlüsselrolle bei der geschlechtsspezifischen Inflammation ein, wobei allerdings junge und weibliche Tiere

normalerweise verminderte Inflamationsantworten aufweisen [LIU & MCCULLOUGH, 2012]. Interessanterweise ist die höhere NFκB-Expression der weiblichen Tiere in unserer Studie mit einem geringeren neuronalen Schaden sowie einer besseren motorischen Funktion vergesellschaftet. Vermeintliche Nachteile der weiblichen Tiere gegenüber den Männchen, wie z.B. ein durchschnittlich niedrigeres Körpergewicht oder geringeres Blutvolumen, wirken sich somit nicht negativ in Bezug auf die neuronale Schädigung aus [FRIEDRICH, tiermedizinische Dissertation 2013]. In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte im Gegensatz dazu eine Korrelation zwischen der erhöhten NFκB-Expression und eosinophilen geschädigten Neuronen festgestellt werden. Allerdings erfolgte die Detektion hier bereits am postoperativen Tag 1 [GORDAN et al., 2010], also in der frühen subakuten Phase. Eine Studie von Clemens et al. wies ein Expressionsmaximum der proapoptotischen Untereinheiten p50 und p65 von NFκB im Rattenhippokampus 12 und 48 h nach transients globaler Gehirnschämie nach. 96 h postischämisch sank die hippokampale p50- und p65-Expression jedoch schon wieder ab [CLEMENS et al., 1997]. Auch durch uns wird mittels eines p65-spezifischen NFκB-Antikörpers eine bekanntermaßen proapoptotische Untereinheit von NFκB nachgewiesen [SHIH et al., 2015; CHUANG et al., 2010]. Dieser Antikörper wurde auch deshalb von uns ausgewählt, weil das p65/p50-Heterodimer die häufigste NFκB-Form im Gehirn ist [ROLOVA et al., 2016]. Seine Expression wird mit der Pathogenese der postischämischen Gehirnschädigung in Verbindung gebracht. Möglicherweise überwiegen am postoperativen Tag 14 jedoch die antiapoptotischen Funktionen von NFκB, welche über die c-Rel-haltigen Dimere dieses Proteins vermittelt werden [LANZILOTTA et al., 2015; CHUANG et al., 2010; TAMATANI et al., 2000]. Diese Hypothese vertritt auch die Arbeitsgruppe Hu et al., die 3 Tage nach einer traumatischen Gehirnschädigung im Rattenmodell einen p65-peak detektierte, während C-Rel erst am 10. posttraumatischen Tag ein Expressionsmaximum zeigte. Die zusätzliche Aktivierung der c-Rel-Untereinheit von NFκB wird als Wechsel der zellulären Antwort vom Todes- zum Überlebensmodus interpretiert [HU et al., 2014]. Des Weiteren erlaubt die in unserer Studie verwendete Form der NFκB-Detektierung keinerlei Aussage über den Aktivierungszustand des Proteins. Es wäre also möglich, dass NFκB zum Detektionszeitpunkt IκB-gebunden und damit inaktiviert im Zytoplasma vorliegt. Ein Hinweis hierauf findet sich in den Ergebnissen einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe, in der das NFκB-inhibitorische Protein IκBα 14 Tage nach EKZ und DHCA ein Expressionsmaximum aufwies [KELLERMANN et al., 2009]. Ob ein Zusammenhang zwischen dem weiblichen Geschlecht und einem neuroprotektiven Aktivierungsmuster von NFκB besteht, kann somit anhand der vorliegenden Studie nicht abschließend beantwortet werden.

Weiterhin zeigt sich, dass die NFκB-Expression ebenfalls durch den Geschlechtshormon-Status beeinflusst wird. Im Einzelnen wird eine höhere Expressionsrate von NFκB im Hippokampus intakter weiblicher Ratten im Vergleich zu weiblichen Kastraten nachgewiesen. Im Hinblick darauf, dass Frauen nach der Menopause gegenüber Frauen vor der Menopause benachteiligt zu sein scheinen, ist dieses Ergebnis ebenfalls überraschend. Womöglich spielt auch hier ein neuroprotektiver Aktivierungsmodus von NFκB eine Rolle. Eine generelle Expressionshemmung von NFκB durch E<sub>2</sub> [LIU & MCCULLOUGH, 2012; LIU et al., 2009; SUZUKI et al., 2009] bzw. Progesteron [PAN et al., 2007] bestätigt sich 14 Tage nach EKZ und DHCA jedenfalls nicht. E<sub>2</sub> ist jedoch dazu in der Lage, die Translokation von NFκB in den Nukleus und damit seine Fähigkeit zur Beeinflussung der Genexpression zu reduzieren [GHISLETTI et al., 2005]. Daher könnte NFκB bei den weiblichen intakten Tieren in einer inaktiven Form im Zytoplasma vorliegen. Die männlichen intakten Tiere zeigen im Vergleich zu ihren kastrierten Geschlechtsgenossen keinen signifikanten Unterschied der NFκB-Expression. Daher existiert also weder ein Hinweis auf eine Neurotoxizität des Testosterons bei jungen Tieren noch auf eine Neuroprotektion in der beginnenden Regenerationsphase [CHAUHAN et al., 2017] 14 Tage nach EKZ/DHCA.

### 5.2.2 TNF-α und iNOS

Interessanterweise können sowohl für TNF-α als auch für iNOS keine signifikanten Unterschiede im Expressionsmuster der 4 DHCA-Gruppen nachgewiesen werden. Die Expression beider Inflammationsparameter wird durch NFκB induziert [SHIH et al., 2015; RIDDER et al., 2009]. Somit wäre für iNOS und TNF-α ein mit NFκB korrelierendes geschlechtsspezifisches und vom Hormonstatus abhängiges Expressionsmuster zu erwarten gewesen. TNF-α erreicht bekanntermaßen bereits 12 - 36 Stunden nach einer zerebralen Ischämie die höchste Konzentration, welche anschließend wieder absinkt [LAMBERTSON et al., 2019; JUNGWIRTH et al., 2009]. Der 14. postoperative Tag könnte also bereits zu spät sein, um mögliche Unterschiede zu sehen. Dagegen sprechen allerdings die Ergebnisse der bereits oben erwähnten Studie von Hu et al., die ein zweites Expressionsmaximum von TNF-α am Tag 10 und 14 nach einer traumatischen Gehirnschädigung im Rattenmodell detektierte [HU et al., 2014]. Dieses Ergebnis sowie die vor allem im Hippokampus vermehrte Expression von TNF-α im Vergleich zu den Kontrollgruppen spricht eher dafür, dass TNF-α unabhängig vom Geschlecht und vom Geschlechtshormonstatus nach ischämischer Gehirnschädigung in Neuronen exprimiert wird. Die Konzentration von TNF-α im postischämischen Hirngewebe bleibt über viele Monate erhöht, allerdings stammt es zum größten Teil aus Mikroglia und Makrophagen [XIANG et al., 2016]. Im Gegensatz zu TNF-α besteht für iNOS kaum ein Unterschied zwischen

den DHCA-Gruppen und den Kontrollgruppen. Eine Erklärung hierfür könnte natürlich, wie auch bei TNF- $\alpha$ , ein zu später Detektionszeitpunkt sein, da die iNOS-Aktivität im Zeitraum von 12 Stunden bis eine Woche nach einem ischämischen Insult erhöht ist [CHEN *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2016]. Eine verminderte Expression von iNOS unter E<sub>2</sub>-Einfluss [SUZUKI *et al.*, 2009] bei den intakten weiblichen Tieren bestätigt sich 14 Tage nach EKZ und DHCA gleichwohl nicht.

### 5.2.3 PARP-1 und Caspase-3

Die neuronale Apoptose tritt sowohl unmittelbar als auch über eine Zeitspanne von mehreren Wochen nach der globalen Ischämie des Gehirns auf [CLEMENS *et al.*, 1997]. Erwartungsgemäß kann in unserer Studie eine geschlechtsspezifische neuronale Expression der Apoptoseparameter PARP-1 und Caspase-3 gezeigt werden. Diese wurden bereits in anderen Studien als Indikatoren der neuronalen Apoptose identifiziert [WANG *et al.*, 2011; SIEGEL *et al.*, 2010; STROSZNAJDER *et al.*, 2010; HOTCHKISS *et al.*, 2009; DU *et al.*, 2004]. Die Expression ist unabhängig vom Geschlechtshormonstatus der Tiere, da jeweils in beiden männlichen DHCA-Gruppen die PARP-1-Expression und in den beiden weiblichen DHCA-Gruppen die Caspase-3-Expression signifikant erhöht ist. Zwischen kastrierten und nicht kastrierten Tieren bestehen keine signifikanten Expressionsunterschiede. Es ergibt sich somit eine Korrelation mit den Ergebnissen einiger vorangegangener experimenteller Studien. Diese zeigten unter Zuhilfenahme eines Mäusemodells mit einer genetischen PARP-1-Deletion, dass der weibliche Zelltod vorzugsweise über die Aktivierung von Caspase-abhängigen Signalwegen abläuft, während die Ischämie bei männlichen Individuen den Caspase-unabhängigen, PARP-1-abhängigen Zelltod induziert. [CHAUHAN *et al.*, 2017; MANWANI *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011; MCCULLOUGH *et al.*, 2005]. Ein Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen NF $\kappa$ B-Expression bei männlichen und weiblichen DHCA-Tieren und dem ebenfalls unterschiedlichen Expressionsmuster der Apoptoseparameter erschließt sich aus unserer Studie letztlich nicht. NF $\kappa$ B kann über eine Aktivierung von Bcl-2 den Caspase-abhängigen Apoptoseweg hemmen [TAMATANI *et al.*, 2000]. Umgekehrt wird NF $\kappa$ B durch PARP-1 aktiviert [WANG *et al.*, 2011; STROSZNAJDER *et al.*, 2010]. Daher besteht also weder eine Korrelation zwischen der erhöhten NF $\kappa$ B- und Caspase-3-Expression bei den weiblichen DHCA-Tieren noch zwischen der verminderten NF $\kappa$ B- und vermehrten PARP-1-Expression bei den männlichen DHCA-Tieren. Möglicherweise besteht hier ein weiterer Hinweis auf ein antiapoptotisches und damit wiederum neuroprotektives Aktivierungsmuster von NF $\kappa$ B.

## 5.3 Diskussion der Methoden und Limitierungen

### 5.3.1 Histologische Untersuchung

Da die CA1-Region des Hippokampus bei der globalen Ischämie normalerweise die höchste Sensitivität gegenüber ischämischen Insulten aufweist, gefolgt vom Neokortex [LEE *et al.*, 2018; SCHMIDT-KASTNER, 2015], wählten wir diese Gehirnregionen der Ratte für die histologische Untersuchung aus. Dabei wurde von uns vorausgesetzt, dass die Inflammationsreaktion 14 Tage nach der globalen Ischämie zur sekundären Zellschädigung und verzögerten Apoptose führt [MCCULLOUGH *et al.*, 2016; XIANG *et al.*, 2016]. Erwartungsgemäß gelingt auch der Nachweis sämtlicher untersuchten Parameter zu diesem Zeitpunkt in beiden Hirnregionen der Ratte. Es ergeben sich jedoch Hinweise darauf, dass die postischämische Inflammationsreaktion keineswegs ausschließlich zur neuronalen Schädigung beiträgt. Vielmehr scheint sie, in moderater Ausprägung, eine neuroprotektive Funktion im Rahmen von postischämischen Reparations- und Regenerationsvorgängen innezuhaben [LAMBERTSON *et al.*, 2019; ROLOVA *et al.*, 2016]. Dafür spricht auch, dass verschiedene antiinflammatorische Medikamente trotz einer Reduktion der neuronalen Inflammationsreaktion keinen positiven Einfluss auf das neurokognitive Outcome nach herzchirurgischen Operationen mit EKZ zeigen konnten [SALAMEH *et al.*, 2016]. Somit kann die Inflammation zwar akut und in exzessiver Form den Zelltod induzieren, auf längere Sicht gesehen vermindert sie jedoch den Schaden und trägt dazu bei, die Balance des Körpers letztlich wiederherzustellen [CEULEMANS *et al.* 2010]. Unsere Detektion der Parameter am postoperativen Tag 14 repräsentiert eine Übergangsphase zwischen der einige Stunden bis einige Tage dauernden subakuten Phase der neuroinflammatorischen und apoptotischen Antwort auf die akute zerebrale Ischämie und der bis zu einigen Monaten andauernden chronischen Reparations- und Regenerationsphase [CEULEMANS *et al.*, 2010]. Zu diesem Zeitpunkt ist mutmaßlich bereits ein Großteil der gefährdeten Neurone untergegangen, während sich die Überlebenden im Regenerationsprozess befinden, was auch unsere Ergebnisse der NF $\kappa$ B-Expression vermuten lassen. Natürlich gilt für sämtliche untersuchte Inflammations- und Apoptoseparameter, dass der 14. postoperative Tag nur eine Momentaufnahme darstellt, die keinerlei Rückschluss auf den Verlauf der Expressionsmuster während der Untersuchungsphase nach EKZ und DHCA bis zur Tötung der Tiere zulässt. Dies stellt eine versuchsbedingte Limitierung dar. Insbesondere wäre der Expressionsverlauf unserer untersuchten Parameter für die empfindlichste Phase während der ersten vier postoperativen Tage aufschlussreich gewesen. In dieser Zeit zeigt die Gruppe der weiblichen intakten Tiere die höchste Mortalitätsrate im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Daher kann das bessere histologische Outcome dieser Gruppe nur unter

der Voraussetzung betrachtet werden, dass die weiblichen intakten Tiere auch bis zum 14. postoperativen Tag überleben. Allerdings besitzt das Studiendesign nicht genügend statistische Aussagekraft, um statistisch relevante Schlussfolgerungen aus dieser Beobachtung zu ziehen [FRIEDRICH, tiermedizinische Dissertation 2013]. Eine weitere Limitierung ist durch die begrenzte Auswahl der untersuchten Parameter gegeben. Neben NFκB, TNF-α, iNOS, Caspase-3 und PARP-1 gibt es noch viele weitere Inflammations- und Apoptoseparameter, deren geschlechtsspezifische Expression bereits bekannt ist, wie z.B. NAD<sup>+</sup>, AIF, Glutathion, Akt, astrozytische Aromatase, saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acid protein, GFAP), Angiotensin-II-Typ-2-Rezeptor und die lösliche Epoxid-Hydrolase [CAHILL et al., 2017b]. Der Zeitpunkt des maximalen histologischen Schadens wäre bereits 24 h nach EKZ und DHCA gewesen [GORDAN et al. 2010]. Möglicherweise hätte die Untersuchung der Expressionsmuster von Inflammations- und Apoptoseparametern zu einem früheren Zeitpunkt ein aussagekräftigeres Profil ergeben als der 14. Post-OP-Tag. Ein früherer Detektionszeitpunkt hätte jedoch die Untersuchung der Kognition und der neurologischen Funktion der Tiere, welche in der Dissertation von Stefan Friedrich dargestellt wurde [FRIEDRICH, tiermedizinische Dissertation, 2013], unmöglich gemacht.

### 5.3.2 Rattenmodell der EKZ mit 45minütigem DHCA

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Rattenmodell der EKZ mit 45-minütigem DHCA wurde im Jahr 2006 von Jungwirth et al. eingeführt [JUNGWIRTH et al., 2006]. Es ermöglicht eine kliniknahe Nachbildung der Gegebenheiten im humanmedizinischen Setting. So kann, durch den verwendeten miniaturisierten CPB-Kreislauf sowie den speziell für Ratten entwickelten Oxygenator, das Überleben der Tiere über die 14-tägige Testphase nach dem Eingriff gewährleistet werden. Das Verhältnis des Primärvolumens im CPB-Kreislauf von 10 ml zum gesamten Blutvolumen der Ratte von 25 ml ist mit demjenigen, welches normalerweise auch beim Menschen verwendet wird, vergleichbar (2 l Primärvolumen zu 5 l Blutvolumen). Mit diesem verwendeten Primärvolumen resultieren im Anschluss an den Eingriff ähnliche Hämatokritwerte wie in der klinischen Routine, die einen Verzicht auf Bluttransfusionen bei der Ratte erlauben [JUNGWIRTH et al., 2006]. Da das schlechtere Outcome von Frauen nach herzchirurgischen Operationen möglicherweise mit einer höheren Transfusionsrate assoziiert ist [RANUCCI et al., 2008], kann dieser Confounder somit ausgeschlossen werden. Zudem ermöglicht unser Modell CPB-Flussraten, die mit 160 – 180 ml/kg/min zur physiologischen Herzleistung der Ratte äquivalent sind. Dies führt zu einer suffizienten Oxygenierung der nicht beatmeten Tiere [JUNGWIRTH et al., 2006]. Bezüglich der Untersuchung der zerebralen Inflammation und Apoptose hat sich das besagte Modell bereits in einer vorangegangenen Studie im Sinne von signifikanten

Veränderungen der Expressionsmuster ausgewählter Parameter nach 14 Tagen bewährt [KELLERMANN *et al.* 2011]. Das Modell unterliegt natürlich einigen Limitierungen, die keine umfassende Übertragung auf die klinischen Gegebenheiten in der Humanmedizin erlauben. So wurde auf das chirurgische Prozedere, wie z.B. die in der Herzchirurgie übliche mediane Sternotomie, die direkte Kanülierung des Herzens oder die eigentliche Operation am offenen Herzen, verzichtet, um das postoperative Überleben der Ratten sicher zu stellen. Bekanntermaßen tragen diese chirurgischen Maßnahmen selbst zur systemischen Inflammation [SUBRAMANIYAN *et al.*, 2019; DANIELSON *et al.*, 2018; SUGITA & FUJII, 2018] und damit zur Beeinflussung der zerebralen Expression der Inflammations- und Apoptoseparameter bei [DÉNES *et al.*, 2011; SVJATETS *et al.*, 2010]. Somit können aber auch die Einflüsse von EKZ und DHCA isoliert untersucht werden. Die EKZ allein induziert bei der Ratte weder eine für unsere Zwecke ausreichende Inflammation und Apoptose noch eine mit dem Menschen vergleichbare Beeinträchtigung der Kognition [JUNGWIRTH *et al.*, 2009; DE LANGE *et al.*, 2007]. Im Gegensatz dazu wurden beim Menschen neurokognitive Defizite nach EKZ nachgewiesen [BERGER *et al.*, 2018; KNIPP *et al.*, 2017; HUDETZ *et al.*, 2011]. Dies wirft die Frage auf, ob nicht eher andere Faktoren neben der EKZ, aber auch dem DHCA und den entsprechenden Inflammationsreaktionen, zu schlechten neurokognitiven Ergebnissen nach Herz- und Gefäß-chirurgischen Operationen beim Menschen beitragen. Hierbei sei insbesondere an den vorbestehenden physischen und psychischen Gesundheitszustand der Patienten gedacht [NUSSMEIER *et al.*, 2010]. Zudem entfaltet der DHCA seine Effekte, als globales Ischämiemodell, nicht ausschließlich im Gehirn. Vielmehr betrifft er genauso auch das kardiovaskuläre System und die viszerale Organe, wie z.B. die Nieren, den Respirationstrakt, die Leber und den Magen-Darm-Trakt [ENGELS *et al.*, 2014]. Diese Organsysteme wurden in unserer Studie nicht gesondert untersucht, sodass deren Berücksichtigung nachfolgenden wissenschaftlichen Studien vorbehalten bleibt.

### 5.3.3 Der hormonelle Status der Tiere

Ein weiterer wichtiger Bestandteil unserer Studie ist die Nachbildung von prä- und postmenopausalen bzw. prä- und postandropausalen Hormonverhältnissen. Hierzu verbleibt die Hälfte unserer Versuchstiere in einem intakten hormonellen Status, während die andere Hälfte kastriert wird. Wie Stefan Friedrich in seiner tiermedizinischen Dissertation bereits darlegte, befinden sich die Geschlechtshormonspiegel im Serum aller Ratten am Tag der Tötung jeweils im erwarteten Bereich [FRIEDRICH, *tiermedizinische Dissertation* 2013]. Daher können die kastrierten Tiere, abgesehen vom fehlenden Altersunterschied, zumindest im hormonellen Sinne als Modell für die Postmeno- bzw. Postandropause angesehen werden. Die Ovariectomie gilt in der präklinischen Forschung

als Goldstandard, um hormonelle Effekte bei weiblichen Tieren zu untersuchen [KOEBELE et al., 2016]. Bezüglich des Hormonstatus wird bei den weiblichen intakten Ratten auf eine Zyklusüberwachung, welche relativ aufwendig gewesen wäre, verzichtet, so dass in diesen Gruppen größere Schwankungen der Serumhormonspiegel zum Zeitpunkt des DHCA von uns in Kauf genommen werden. Bei den weiblichen kastrierten Tieren, die als Modell für die weibliche Postmenopause dienen sollen, ergeben sich ebenfalls Limitierungen. Der Unterschied der chirurgisch herbeigeführten Menopause zur natürlichen Menopause besteht im Wesentlichen darin, dass der Reproduktionstrakt nicht erhalten bleibt. Der plötzliche Verlust sämtlicher ovarieller Steroide ist für die Mehrheit der menopausalen Frauen nicht charakteristisch. Dies ist jedoch für unsere Studie nicht relevant, da die Menopause selbst als Übergangsphase nicht Gegenstand unserer Untersuchung ist. Die postmenopausalen Ovarien setzen aber zudem weiterhin Androgene und niedrige Dosen anderer Steroide frei [AU et al., 2016; KOEBELE et al., 2016]. Somit unterscheidet sich das hormonelle Profil der kastrierten Tiere von demjenigen von postmenopausalen Tieren mit intaktem Reproduktionstrakt sowie auch von postmenopausalen Frauen. Andererseits unterscheidet sich die natürliche Menopause der Ratte auch erheblich von derjenigen beim Menschen. Im Gegensatz zu Frauen weisen intakte weibliche Ratten nach der Menopause keine signifikante Verarmung an Follikeln auf. Daher gleichen die Konzentrationen der zirkulierenden gonadalen Hormone in intakten älteren Rattenweibchen nicht annähernd denen von postmenopausalen Frauen [ZÁRATE et al., 2017; AU et al., 2016; KOEBELE et al., 2016]. Somit verbleibt die Ovariectomie das bestmögliche zur Verfügung stehende Modell, um den postmenopausalen hormonellen Status der Frau bei der weiblichen Ratte nachzubilden.

### **5.3.4 Die Ratte als Modell für den Menschen**

Unsere Studie zielt darauf ab, den isolierten Einfluss des Geschlechts bzw. des Geschlechtshormonstatus 14 Tage nach EKZ und DHCA auf die zerebrale Inflammation und Apoptose im Tiermodell zu detektieren. Daher werden junge, geschlechtsreife und gesunde männliche und weibliche Ratten verwendet, um die beiden Confounder Alter und Komorbiditäten auszuschließen. Zudem gewährleisten die fehlenden Komorbiditäten und Alterserscheinungen der Tiere bestmögliche Überlebenschancen des Eingriffs. Unserem Rattenmodell steht ein Kollektiv von überwiegend älteren und/oder multimorbiden Herz- und Gefäß-chirurgischen Patienten gegenüber. Bekanntermaßen ist ein höheres Lebensalter per se mit einer vermehrten Inflammationsantwort assoziiert, welche aus einer Dysregulation des Immunsystems sowie einer fortschreitenden Unfähigkeit, mit pathologischen Stimuli adäquat umzugehen, resultiert. Außerdem akkumulieren ROS vermehrt im alternden Gehirn bei gleichzeitig verminderter Aktivität von antioxidativen

Enzymen [ZÁRATE *et al.*, 2017; LEON *et al.*, 2011]. Die parallel zum Lebensalter zunehmende Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke führt sehr wahrscheinlich zu einem vermehrten Zellverlust unter ischämischen Bedingungen [CHISHOLM *et al.*, 2016]. Zudem nimmt die Fähigkeit zur Neurogenese nach einem ischämischen Insult mit zunehmendem Alter ab [ROLOVA *et al.*, 2016]. Häufig vorbestehende Risikofaktoren kardiovaskulärer Patienten, wie z.B. Adipositas, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Arteriosklerose, gelten als stille Mitverursacher eines chronischen proinflammatorischen Status. Dieser kann die Grundlage für neurokognitive Funktionsstörungen bilden. Die durch EKZ und DHCA verursachte akute Neuroinflammation kann einen solchen vorbestehenden Schaden verschlimmern und somit zu Depression, Demenz und Neurodegeneration führen [SANDU *et al.*, 2015]. In Zusammenschau mit dem Hormonstatus ergeben sich zusätzliche Aspekte eines vorbestehenden proinflammatorischen Status. So kann bei Diabetes mellitus die Östrogenwirkung, welche normalerweise neuroprotektiv ist, einen schädigenden Effekt haben [CARSWELL *et al.*, 2010]. Des Weiteren scheint die Wirkung von Geschlechtshormonen im Gehirn, insbesondere von Östrogenen, altersabhängig zu sein [LEON *et al.*, 2011]. Weibliche Tiere in höherem Lebensalter haben per se eine vermehrte Inflammationsreaktion im Vergleich zu gleichaltrigen Männchen [CHAUHAN *et al.*, 2017]. In Bezug auf das neurokognitive Outcome nach einer zerebralen Ischämie sind in tierexperimentellen Studien ältere Weibchen gegenüber jüngeren benachteiligt. Bei den Männchen zeigen sich die Studienergebnisse jedoch kontrovers [CHISHOLM *et al.*, 2016]. Die komplizierten Wechselwirkungen zwischen altersspezifischen und hormonellen Veränderungen sowie auch Komorbiditäten können im Rahmen unserer Studie nicht untersucht werden. Daher bleibt es Gegenstand weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen, ob Geschlechtsunterschiede und/oder Unterschiede des Geschlechtshormonstatus nur im Zusammenhang mit vorbestehenden, mit einem proinflammatorischen Status assoziierten Risikofaktoren, nach EKZ und DHCA in der beim Menschen beobachteten Form zu Tage treten. Möglicherweise sind junge und gesunde Ratten nur bedingt geeignet, um als Modell für einen Eingriff, der hauptsächlich bei älteren und multimorbiden Patienten durchgeführt wird, zu fungieren [DE LANGE *et al.*, 2007].

## 5.4 Abschließende Betrachtung

Zusammenfassend gelingt eine Reproduktion des im humanmedizinischen Setting beobachteten schlechteren neurologischen Outcomes der postmenopausalen Frauen gegenüber Männern und prämenopausalen Frauen im Rattenmodell nicht. Vielmehr führt die geschlechtsspezifische und vom Geschlechtshormonstatus abhängige Expression des Inflammationsparameters NFκB, vor dem Hintergrund der mangelnden Korrelation mit den

## Diskussion

---

nachgeschalteten Parametern TNF- $\alpha$  und iNOS sowie dem Nachweis der geschlechtsspezifischen Apoptose, zur Hypothese einer überwiegend neuroprotektiven Funktion von NF $\kappa$ B 14 Tage nach EKZ und DHCA.

## 6 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die extrakorporale Zirkulation (EKZ) und der tief hypotherme Kreislaufstillstand (DHCA) sind Techniken, die beim Menschen eine Vielzahl von Operationen am Herzen ermöglichen. In Kombination werden sie beim Erwachsenen bei komplizierten chirurgischen Eingriffen an den herznahen großen Gefäßen verwendet. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass es Unterschiede bezüglich der Mortalität, der Komplikationsrate und der Morbidität nach kardialen Operationen mit Anwendung der EKZ zwischen Männern und Frauen sowie zwischen prä- und postmenopausalen Frauen gibt. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss des Geschlechts und des Geschlechtshormonstatus auf die Expression von Inflammations- und Apoptoseparametern 14 Tage nach EKZ mit 45-minütigem DHCA.

**Methoden:** Nach Genehmigung der Tierschutzbehörde werden 40 männliche und 40 weibliche Ratten randomisiert jeweils 4 Gruppen zugeteilt: kastriert mit EKZ/DHCA ( $n = 10$ ), scheinkastriert mit EKZ/DHCA ( $n = 10$ ), kastrierte Kontrollgruppe ( $n = 10$ ) und scheinkastrierte Kontrollgruppe ( $n = 10$ ). Vier Wochen nach der Kastration bzw. Scheinkastration werden die Tiere der EKZ/DHCA-Gruppen einem Eingriff mit Anästhesie, Intubation und Beatmung, Katheterisierung, EKZ und einem 45-minütigem DHCA mit einer rektalen Körpertemperatur von 15 – 18 °C unterzogen. Die Tiere der Kontrollgruppen bleiben hingegen unbehandelt. Nach einer 14-tägigen Testphase mit neurologischer und neurokognitiver Untersuchung der Tiere werden die Inflammationsparameter NF $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , iNOS sowie die Apoptoseparameter PARP-1 und Caspase-3 in Neuronen im Hippokampus und Motorkortex der Ratten quantitativ erfasst. Anschließend erfolgt die statistische Datenauswertung mit dem Kruskal-Wallis-Test sowie dem post hoc Mann-Whitney-U-Test.

**Ergebnisse:** NF $\kappa$ B zeigt die signifikant höchste Expressionsrate unter dem Einfluss der weiblichen Geschlechtshormone bei den weiblichen intakten Ratten ( $p < 0,05$ ), gefolgt von der weiblichen kastrierten EKZ/DHCA-Gruppe ( $p < 0,05$ ). TNF- $\alpha$  und iNOS weisen hingegen zwischen kastrierten und nicht kastrierten Tieren beiderlei Geschlechts keine signifikanten Expressionsunterschiede auf. PARP-1 zeigt eine signifikant erhöhte Expressionsrate in beiden männlichen im Vergleich zu den weiblichen EKZ/DHCA-Gruppen ( $p < 0,05$ ), Caspase-3 ist bei den weiblichen Tieren erhöht ( $p < 0,05$ ). Erwähnenswert ist der Sekundärbefund einer erhöhten Sterblichkeitsrate in der Gruppe der weiblichen intakten Tiere in der frühen postoperativen Phase.

**Schlussfolgerung:** Die EKZ mit DHCA verursacht zum einen eine Geschlechts- und vom Geschlechtshormonstatus abhängige zerebrale Inflammation, bei der NF $\kappa$ B eine Schlüsselrolle einnimmt. Zum anderen zeigt sich eine geschlechtsspezifische, jedoch vom Geschlechtshormonstatus unabhängige neuronale Apoptose. Die Ergebnisse lassen eine neuroprotektive Funktion von NF $\kappa$ B beim weiblichen Geschlecht und unter dem Einfluss der weiblichen Geschlechtshormone vermuten. Die zufällige Beobachtung einer erhöhten Mortalitätsrate beim weiblichen Geschlecht erfordert weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen mit der Mortalität als primärem Endpunkt sowie unter Berücksichtigung weiterer Organsysteme neben dem Gehirn.

## Literaturverzeichnis

Abrahamov, Dan; Levran, Oren; Naparstek, Sharon; Refaeli, Yael; Kaptson, Shani; Abu Salah, Mahmud et al. (2017): Blood-Brain Barrier Disruption After Cardiopulmonary Bypass: Diagnosis and Correlation to Cognition. In: *Ann. Thorac. Surg* 104 (1), S. 161–169. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2016.10.043.

Amantea, Diana; Greco, Rosaria; Micieli, Giuseppe; Bagetta, Giacinto (2018): Paradigm Shift to Neuroimmunomodulation for Translational Neuroprotection in Stroke. In: *Frontiers in neuroscience* 12, S. 241. DOI: 10.3389/fnins.2018.00241.

Amitai, Yael (2010): Physiologic role for "inducible" nitric oxide synthase: a new form of astrocytic-neuronal interface. In: *Glia* 58 (15), S. 1775–1781. DOI: 10.1002/glia.21057.

Andrabi, Syed Suhail; Parvez, Suhel; Tabassum, Heena (2017): Progesterone induces neuroprotection following reperfusion-promoted mitochondrial dysfunction after focal cerebral ischemia in rats. In: *Disease models & mechanisms* 10 (6), S. 787–796. DOI: 10.1242/dmm.025692.

Angraal, Suveen; Khera, Rohan; Wang, Yun; Lu, Yuan; Jean, Raymond; Dreyer, Rachel P. et al. (2018): Sex and Race Differences in the Utilization and Outcomes of Coronary Artery Bypass Grafting Among Medicare Beneficiaries, 1999-2014. In: *Journal of the American Heart Association* 7 (14). DOI: 10.1161/JAHA.118.009014.

Anrather, Josef; Iadecola, Costantino (2016): Inflammation and Stroke: An Overview. In: *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 13 (4), S. 661–670. DOI: 10.1007/s13311-016-0483-x.

Arrica, Mauro; Bissonnette, Bruno (2007): Therapeutic hypothermia. In: *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 11 (1), S. 6–15.

Attia, Tamer; Koch, Colleen G.; Houghtaling, Penny L.; Blackstone, Eugene H.; Sabik, Ellen Mayer; Sabik, Joseph F. (2017): Does a similar procedure result in similar survival for women and men undergoing isolated coronary artery bypass grafting? In: *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 153 (3), 571-579.e9. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2016.11.033.

Au, April; Feher, Anita; McPhee, Lucy; Jessa, Ailya; Oh, Soojin; Einstein, Gillian (2016): Estrogens, inflammation and cognition. In: *Front Neuroendocrinol* 40, S. 87–100. DOI: 10.1016/j.yfrne.2016.01.002.

Barrett-Connor, Elizabeth; Laughlin, Gail A. (2009): Endogenous and exogenous estrogen, cognitive function, and dementia in postmenopausal women: evidence from epidemiologic studies and clinical trials. In: *Semin. Reprod. Med* 27 (3), S. 275–282. DOI: 10.1055/s-0029-1216280.

Berger, Miles; Terrando, Niccolò; Smith, S. Kendall; Browndyke, Jeffrey N.; Newman, Mark F.; Mathew, Joseph P. (2018): Neurocognitive Function after Cardiac Surgery: From Phenotypes to Mechanisms. In: *Anesthesiology* 129 (4), S. 829–851. DOI: 10.1097/ALN.0000000000002194.

Blanco, Santos; Hernández, Raquel; Franchelli, Gustavo; Ramos-Álvarez, Manuel Miguel; Peinado, María Ángeles (2017): Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage. In: *Nitric oxide: biology and chemistry* 62, S. 32–43. DOI: 10.1016/j.niox.2016.12.001.

Brann, D.; Raz, L.; Wang, R.; Vadlamudi, R.; Zhang, Q. (2012): Oestrogen signalling and neuroprotection in cerebral ischaemia. In: *J. Neuroendocrinol* 24 (1), S. 34–47. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2011.02185.x.

- Brown, Candice M.; Mulcahey, Tara A.; Filipek, Nicole C.; Wise, Phyllis M. (2010): Production of proinflammatory cytokines and chemokines during neuroinflammation: novel roles for estrogen receptors alpha and beta. In: *Endocrinology* 151 (10), S. 4916–4925. DOI: 10.1210/en.2010-0371.
- Bukkapatnam, Radhika Nandur; Yeo, Khung Keong; Li, Zhongmin; Amsterdam, Ezra A. (2010): Operative mortality in women and men undergoing coronary artery bypass grafting (from the California Coronary Artery Bypass Grafting Outcomes Reporting Program). In: *Am. J. Cardiol* 105 (3), S. 339–342. DOI: 10.1016/j.amjcard.2009.09.035.
- Cahill, Larry; Dotson, Abby L.; Offner, Halina (2017a): Sex differences in the immune response to experimental stroke: Implications for translational research. In: *Journal of Neuroscience Research* 95 (1-2), S. 437–446. DOI: 10.1002/jnr.23784.
- Cahill, Larry; Spychala, Monica S.; Honarpisheh, Pedram; McCullough, Louise D. (2017b): Sex differences in neuroinflammation and neuroprotection in ischemic stroke. In: *Journal of Neuroscience Research* 95 (1-2), S. 462–471. DOI: 10.1002/jnr.23962.
- Campos, Francisco; Blanco, Miguel; Barral, David; Agulla, Jesús; Ramos-Cabrer, Pedro; Castillo, José (2012): Influence of temperature on ischemic brain: basic and clinical principles. In: *Neurochem. Int* 60 (5), S. 495–505. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.02.003.
- Carswell, Hilary V. O.; Macrae, I. Mhairi; Farr, Tracy D. (2010): Complexities of oestrogen in stroke. In: *Clin. Sci* 118 (6), S. 375–389. DOI: 10.1042/CS20090018.
- Céspedes Rubio, Ángel Enrique; Pérez-Alvarez, Maria José; Lapuente Chala, Catalina; Wandosell, Francisco (2018): Sex steroid hormones as neuroprotective elements in ischemia models. In: *J. Endocrinol* 237 (2), R65-R81. DOI: 10.1530/JOE-18-0129.
- Ceulemans, An-Gaëlle; Zgavc, Tine; Kooijman, Ron; Hachimi-Idrissi, Said; Sarre, Sophie; Michotte, Yvette (2010): The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. In: *J Neuroinflammation* 7, S. 74. DOI: 10.1186/1742-2094-7-74.
- Chau, Katherine H.; Friedman, Tamir; Tranquilli, Maryann; Eleftheriades, John A. (2013): Deep hypothermic circulatory arrest effectively preserves neurocognitive function. In: *Ann. Thorac. Surg* 96 (5), S. 1553–1559. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2013.06.127.
- Chauhan, Anjali; Moser, Hope; McCullough, Louise D. (2017): Sex differences in ischaemic stroke: potential cellular mechanisms. In: *Clin. Sci* 131 (7), S. 533–552. DOI: 10.1042/CS20160841.
- Chen, Zhou-Qing; Mou, Ru-Tao; Feng, Dong-Xia; Wang, Zhong; Chen, Gang (2017): The role of nitric oxide in stroke. In: *Medical gas research* 7 (3), S. 194–203. DOI: 10.4103/2045-9912.215750.
- Cheng, Jian; Hu, Weidong; Toung, Thomas J.; Zhang, Zhizheng; Parker, Susan M.; Roselli, Charles E.; Hurn, Patricia D. (2009): Age-dependent effects of testosterone in experimental stroke. In: *J. Cereb. Blood Flow Metab* 29 (3), S. 486–494. DOI: 10.1038/jcbfm.2008.138.
- Chisholm, Nioka C.; Sohrabji, Farida (2016): Astrocytic response to cerebral ischemia is influenced by sex differences and impaired by aging. In: *Neurobiology of Disease* 85, S. 245–253. DOI: 10.1016/j.nbd.2015.03.028.
- Chuang, Yao-Chung; Chen, Shang-Der; Lin, Tsu-Kung; Chang, Wen-Neng; Lu, Cheng-Hsien; Liou, Chia-Wei et al. (2010): Transcriptional upregulation of nitric oxide synthase II by nuclear factor-kappaB promotes apoptotic neuronal cell death in the hippocampus following experimental status epilepticus. In: *J. Neurosci. Res* 88 (9), S. 1898–1907. DOI: 10.1002/jnr.22369.
- Clemens, J. A.; Stephenson, D. T.; Dixon, E. P.; Smalstig, E. B.; Mincy, R. E.; Rash, K. S.; Little, S. P. (1997): Global cerebral ischemia activates nuclear factor-kappa B prior to evidence of DNA fragmentation. In: *Brain research. Molecular brain research* 48 (2), S. 187–196.

- Corsani, Letizia; Bizzoco, Elisa; Pedata, Felicita; Gianfriddo, Marco; Fausone-Pellegrini, Maria Simonetta; Vannucchi, Maria Giuliana (2008): Inducible nitric oxide synthase appears and is co-expressed with the neuronal isoform in interneurons of the rat hippocampus after transient ischemia induced by middle cerebral artery occlusion. In: *Exp. Neurol* 211 (2), S. 433–440. DOI: 10.1016/j.expneurol.2008.02.008.
- Corvera, Joel S.; Fehrenbacher, John W. (2012): Open Repair of Chronic Aortic Dissections Using Deep Hypothermia and Circulatory Arrest. In: *The Annals of Thoracic Surgery* 94 (1), S. 78–83. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2012.03.081.
- D'Amelio, M.; Cavallucci, V.; Cecconi, F. (2010): Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. In: *Cell Death Differ* 17 (7), S. 1104–1114. DOI: 10.1038/cdd.2009.180.
- Danielson, Mattias; Reinsfelt, Björn; Westerlind, Anne; Zetterberg, Henrik; Blennow, Kaj; Ricksten, Sven-Erik (2018): Effects of methylprednisolone on blood-brain barrier and cerebral inflammation in cardiac surgery—a randomized trial. In: *J Neuroinflammation* 15 (1), S. 283. DOI: 10.1186/s12974-018-1318-y.
- Dashkevich, Alexey; Bagaev, Erik; Hagl, Christian; Pichlmaier, Maximilian; Luehr, Maximilian; Dossow, Vera von et al. (2016): Long-term outcomes after resection of Stage IV cavoatrial tumour extension using deep hypothermic circulatory arrest. In: *Eur J Cardiothorac Surg* 50 (5), S. 892–897. DOI: 10.1093/ejcts/ezw136.
- Decaroli, Maria Chiara; Rochira, Vincenzo (2017): Aging and sex hormones in males. In: *Virulence* 8 (5), S. 545–570. DOI: 10.1080/21505594.2016.1259053.
- Dénes, Adám; Ferenczi, Szilamér; Kovács, Krisztina J. (2011): Systemic inflammatory challenges compromise survival after experimental stroke via augmenting brain inflammation, blood-brain barrier damage and brain oedema independently of infarct size. In: *J Neuroinflammation* 8, S. 164. DOI: 10.1186/1742-2094-8-164.
- Denes, A.; Thornton, P.; Rothwell, N. J.; Allan, S. M. (2010): Inflammation and brain injury: acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. In: *Brain Behav. Immun* 24 (5), S. 708–723. DOI: 10.1016/j.bbi.2009.09.010.
- Diotel, Nicolas; Charlier, Thierry D.; Lefebvre d'Hellencourt, Christian; Couret, David; Trudeau, Vance L.; Nicolau, Joel C. et al. (2018): Steroid Transport, Local Synthesis, and Signaling within the Brain: Roles in Neurogenesis, Neuroprotection, and Sexual Behaviors. In: *Frontiers in neuroscience* 12, S. 84. DOI: 10.3389/fnins.2018.00084.
- Du, Lina; Bayir, Hülya; Lai, Yichen; Zhang, Xiaopeng; Kochanek, Patrick M.; Watkins, Simon C. et al. (2004): Innate gender-based proclivity in response to cytotoxicity and programmed cell death pathway. In: *J. Biol. Chem* 279 (37), S. 38563–38570. DOI: 10.1074/jbc.M405461200.
- Eltzschig, Holger K.; Eckle, Tobias (2011): Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. In: *Nat. Med* 17 (11), S. 1391–1401. DOI: 10.1038/nm.2507.
- Engels, Melanie; Bilgic, Esra; Pinto, Antonio; Vasquez, Edwin; Wollschläger, Lena; Steinbrenner, Holger et al. (2014): A cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest rat model for the investigation of the systemic inflammation response and induced organ damage. In: *Journal of inflammation (London, England)* 11, S. 26. DOI: 10.1186/s12950-014-0026-3.
- Espinosa-García, Claudia; Viguera-Villaseñor, Rosa María; Rojas-Castañeda, Julio César; Aguilar-Hernández, Alejandra; Monfil, Tomas; Cervantes, Miguel; Morali, Gabriela (2013): Post-ischemic administration of progesterone reduces caspase-3 activation and DNA fragmentation in the hippocampus following global cerebral ischemia. In: *Neurosci. Lett* 550, S. 98–103. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.06.023.

- Faerber, Gloria; Zacher, Michael; Reents, Wilko; Boergermann, Jochen; Kappert, Utz; Boening, Andreas et al. (2017): Female sex is not a risk factor for post procedural mortality in coronary bypass surgery in the elderly: A secondary analysis of the GOPCABE trial. In: *PLoS ONE* 12 (8), e0184038. DOI: 10.1371/journal.pone.0184038.
- Fiocchetti, Marco; Ascenzi, Paolo; Marino, Maria (2012): Neuroprotective effects of 17 $\beta$ -estradiol rely on estrogen receptor membrane-initiated signals. In: *Front Physiol* 3, S. 73. DOI: 10.3389/fphys.2012.00073.
- Fricker, Michael; Tolkovsky, Aviva M.; Borutaite, Vilmante; Coleman, Michael; Brown, Guy C. (2018): Neuronal Cell Death. In: *Physiological reviews* 98 (2), S. 813–880. DOI: 10.1152/physrev.00011.2017.
- Friedrich Stefan (2013): 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. LMU, München. Tierärztliche Fakultät. Online verfügbar unter <https://edoc.uni-muenchen.de/16091/>.
- Gaignard, Pauline; Fréchou, Magalie; Schumacher, Michael; Théron, Patrice; Mattern, Claudia; Slama, Abdelhamid; Guennoun, Rachida (2016): Progesterone reduces brain mitochondrial dysfunction after transient focal ischemia in male and female mice. In: *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 36 (3), S. 562–568. DOI: 10.1177/0271678X15610338.
- Ghisletti, Serena; Meda, Clara; Maggi, Adriana; Vegeto, Elisabetta (2005): 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization. In: *Molecular and cellular biology* 25 (8), S. 2957–2968. DOI: 10.1128/MCB.25.8.2957-2968.2005.
- Giatti, Silvia; Boraso, Mariaserena; Melcangi, Roberto Cosimo; Viviani, Barbara (2012): Neuroactive steroids, their metabolites, and neuroinflammation. In: *J. Mol. Endocrinol* 49 (3), R125-34. DOI: 10.1530/JME-12-0127.
- GIBBON, J. H. (1954): Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. In: *Minn Med* 37 (3), 171–85; passim.
- Gillies, Glenda E.; McArthur, Simon (2010): Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. In: *Pharmacol. Rev* 62 (2), S. 155–198. DOI: 10.1124/pr.109.002071.
- Girardi, Leonard N.; Leonard, Jeremy R.; Lau, Christopher; Ohmes, Lucas B.; Gambardella, Ivancarmine; Iannacone, Erin M. et al. (2019): Gender-related outcomes after open repair of descending thoracic and thoracoabdominal aortic aneurysms. In: *Journal of vascular surgery* 69 (4), 1028-1035.e1. DOI: 10.1016/j.jvs.2018.06.213.
- Girijala, Raghavendra L.; Sohrabji, Farida; Bush, Ruth L. (2017): Sex differences in stroke: Review of current knowledge and evidence. In: *Vascular medicine (London, England)* 22 (2), S. 135–145. DOI: 10.1177/1358863X16668263.
- Gordan, M. Lucia; Kellermann, Kristine; Blobner, Manfred; Nollert, Georg; Kochs, Eberhard F.; Jungwirth, Bettina (2010): Fast rewarming after deep hypothermic circulatory arrest in rats impairs histologic outcome and increases NFkB expression in the brain. In: *Perfusion* 25 (5), S. 349–354. DOI: 10.1177/0267659110377946.
- Goto, Tomoko; Baba, Tomoko; Ito, Asuka; Maekawa, Kengo; Koshiji, Takaaki (2007): Gender differences in stroke risk among the elderly after coronary artery surgery. In: *Anesth. Analg* 104 (5), 1016-22, tables of contents. DOI: 10.1213/01.ane.0000263279.07361.1f.
- Guo, Min-Fang; Yu, Jie-Zhong; Ma, Cun-Gen (2011): Mechanisms related to neuron injury and death in cerebral hypoxic ischaemia. In: *Folia Neuropathol* 49 (2), S. 78–87.

Gupta, Prity; Harky, Amer; Jahangeer, Saleem; Adams, Benjamin; Bashir, Mohamad (2018): Varying Evidence on Deep Hypothermic Circulatory Arrest in Thoracic Aortic Aneurysm Surgery. In: *Texas Heart Institute Journal* 45 (2), S. 70–75. DOI: 10.14503/THIJ-17-6364.

Hayden, Matthew S.; Ghosh, Sankar (2012): NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. In: *Genes Dev* 26 (3), S. 203–234. DOI: 10.1101/gad.183434.111.

Herson, Paco S.; Koerner, Ines P.; Hurn, Patricia D. (2009): Sex, sex steroids, and brain injury. In: *Semin. Reprod. Med* 27 (3), S. 229–239. DOI: 10.1055/s-0029-1216276.

Hogue, Charles W.; Fucetola, Robert; Hershey, Tamara; Nassief, Abullah; Birge, Stanley; Dávila-Román, Victor G. et al. (2008): The role of postoperative neurocognitive dysfunction on quality of life for postmenopausal women 6 months after cardiac surgery. In: *Anesth. Analg* 107 (1), S. 21–28. DOI: 10.1213/ane.0b013e3181606a65.

Hotchkiss, Richard S.; Strasser, Andreas; McDunn, Jonathan E.; Swanson, Paul E. (2009): Cell death. In: *N. Engl. J. Med* 361 (16), S. 1570–1583. DOI: 10.1056/NEJMra0901217.

Hu, Yang-Chun; Sun, Qing; Li, Wei; Zhang, Ding-Ding; Ma, Biao; Li, Song et al. (2014): Biphasic activation of nuclear factor kappa B and expression of p65 and c-Rel after traumatic brain injury in rats. In: *Inflamm. Res.* 63 (2), S. 109–115. DOI: 10.1007/s00011-013-0677-1.

Hudetz, Judith A.; Gandhi, Sweeta D.; Iqbal, Zafar; Patterson, Kathleen M.; Pagel, Paul S. (2011): Elevated postoperative inflammatory biomarkers are associated with short- and medium-term cognitive dysfunction after coronary artery surgery. In: *J Anesth* 25 (1), S. 1–9. DOI: 10.1007/s00540-010-1042-y.

Iadecola, Costantino; Anrather, Josef (2011): The immunology of stroke: from mechanisms to translation. In: *Nat. Med* 17 (7), S. 796–808. DOI: 10.1038/nm.2399.

Jungwirth, Bettina; Eckel, Barbara; Blobner, Manfred; Kellermann, Kristine; Kochs, Eberhard F.; Mackensen, G. Burkhard (2010): The impact of cardiopulmonary bypass on systemic interleukin-6 release, cerebral nuclear factor-kappa B expression, and neurocognitive outcome in rats. In: *Anesth. Analg* 110 (2), S. 312–320. DOI: 10.1213/ANE.0b013e31811bbc42e.

Jungwirth, Bettina; Kellermann, Kristine; Qing, Ma; Mackensen, G. Burkhard; Blobner, Manfred; Kochs, Eberhard F. (2009): Cerebral tumor necrosis factor alpha expression and long-term neurocognitive performance after cardiopulmonary bypass in rats. In: *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 138 (4), S. 1002–1007. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2009.06.022.

Jungwirth, Bettina; Mackensen, G. Burkhard; Blobner, Manfred; Neff, Frauke; Reichart, Bruno; Kochs, Eberhard F.; Nollert, Georg (2006): Neurologic outcome after cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest in rats: description of a new model. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 131 (4), S. 805–812. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2005.11.017.

Karnatovskaia, Lioudmila V.; Wartenberg, Katja E.; Freeman, William D. (2014): Therapeutic Hypothermia for Neuroprotection. In: *The Neurohospitalist* 4 (3), S. 153–163. DOI: 10.1177/1941874413519802.

Kellermann, Kristine; Dertinger, Nadja; Blobner, Manfred; Kees, Frieder; Kochs, Eberhard F.; Jungwirth, Bettina (2011): Perioperative moxifloxacin treatment in rats subjected to deep hypothermic circulatory arrest: reduction in cerebral inflammation but without improvement in cognitive performance. In: *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 141 (3), S. 796–802. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2010.04.017.

Kellermann, Kristine; Gordan, M. Lucia; Nollert, Georg; Blobner, Manfred; Kochs, Eberhard F.; Jungwirth, Bettina (2009): Long-term assessment of NFkappaB expression in the brain and neurologic outcome following deep hypothermic circulatory arrest in rats. In: *Perfusion* 24 (6), S. 429–436. DOI: 10.1177/0267659109358655.

Kellermann, Kristine; Gordan, Lucia M.; Blobner, Manfred; Lupp, Peter; Kochs, Eberhard F.; Jungwirth, Bettina (2013): Functional outcome in female rats after 45 minutes of deep hypothermic circulatory arrest: gender matters. In: *Thorac Cardiovasc Surg* 61 (1), S. 52–65. DOI: 10.1055/s-0032-1331501.

Kendel, Friederike; Dunkel, Anne; Müller-Tasch, Thomas; Steinberg, Kerstin; Lehmkuhl, Elke; Hetzer, Roland; Regitz-Zagrosek, Vera (2011): Gender differences in health-related quality of life after coronary bypass surgery: results from a 1-year follow-up in propensity-matched men and women. In: *Psychosom Med* 73 (3), S. 280–285. DOI: 10.1097/PSY.0b013e3182114d35.

Khoshnam, Seyed Esmail; Winlow, William; Farzaneh, Maryam; Farbood, Yaghoob; Moghaddam, Hadi Fathi (2017): Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. In: *Neurol Sci* 26 (7–8), S. 1055. DOI: 10.1007/s10072-017-2938-1.

Kim, Jin Joo; Oh, Se Jong; Shin, Jong Hwan; Hwang, Seong Youn; Hyun, Sung Youl; Yang, Hyuk Jun; Lee, Gun (2013): Testosterone related good neurologic outcome on the patients with return of spontaneous circulation after cardiac arrest: A prospective cohort study. In: *Resuscitation* 84 (5), S. 645–650. DOI: 10.1016/j.resuscitation.2012.10.022.

Knipp, Stephan C.; Weimar, Christian; Schlamann, Marc; Schweter, Sebastian; Wendt, Daniel; Thielmann, Matthias et al. (2017): Early and long-term cognitive outcome after conventional cardiac valve surgery. In: *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 24 (4), S. 534–540. DOI: 10.1093/icvts/ivw421.

Koebele, Stephanie V.; Bimonte-Nelson, Heather A. (2016): Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. In: *Maturitas* 87, S. 5–17. DOI: 10.1016/j.maturitas.2016.01.015.

Kostandy, Botros B. (2012): The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. In: *Neurol. Sci* 33 (2), S. 223–237. DOI: 10.1007/s10072-011-0828-5.

Kouchoukos, Nicholas T. (2012): Thoracoabdominal aortic aneurysm repair using hypothermic cardiopulmonary bypass and circulatory arrest. In: *Ann Cardiothorac Surg* 1 (3), S. 409–411. DOI: 10.3978/j.issn.2225-319X.2012.08.09.

Kuo, Jinn-Rung; Lo, Chong-Jeh; Chang, Ching-Ping; Lin, Mao-Tsun; Chio, Chung-Ching (2011): Attenuation of brain nitrostatic and oxidative damage by brain cooling during experimental traumatic brain injury. In: *J. Biomed. Biotechnol* 2011, S. 145214. DOI: 10.1155/2011/145214.

Kurusu, Kota; Yenari, Midori A. (2018): Therapeutic hypothermia for ischemic stroke; pathophysiology and future promise. In: *Neuropharmacology* 134 (Pt B), S. 302–309. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.08.025.

Kurlansky, Paul; Herbert, Morley; Prince, Syma; Mack, Michael (2017): Coronary bypass versus percutaneous intervention: sex matters. The impact of gender on long-term outcomes of coronary revascularization. In: *Eur J Cardiothorac Surg* 51 (3), S. 554–561. DOI: 10.1093/ejcts/ezw375.

Lambertsen, Kate Lykke; Finsen, Bente; Clausen, Bettina Hjelm (2019): Post-stroke inflammation-target or tool for therapy? In: *Acta neuropathologica* 137 (5), S. 693–714. DOI: 10.1007/s00401-018-1930-z.

Lang, Jesse T.; McCullough, Louise D. (2008): Pathways to ischemic neuronal cell death: are sex differences relevant? In: *J Transl Med* 6, S. 33. DOI: 10.1186/1479-5876-6-33.

Lange, F. de; Dieleman, J. M.; Jungwirth, B.; Kalkman, C. J. (2007): Effects of cardiopulmonary bypass on neurocognitive performance and cytokine release in old and diabetic rats. In: *British Journal of Anaesthesia* 99 (2), S. 177–183. DOI: 10.1093/bja/aem116.

Lanzillotta, Annamaria; Porrini, Vanessa; Bellucci, Arianna; Benarese, Marina; Branca, Caterina; Parrella, Edoardo et al. (2015): NF- $\kappa$ B in Innate Neuroprotection and Age-Related Neurodegenerative Diseases. In: *Front. Neurol.* 6. DOI: 10.3389/fneur.2015.00098.

Lee, Reggie H. C.; Lee, Michelle H. H.; Wu, Celeste Y. C.; Couto E Silva, Alexandre; Possoit, Harlee E.; Hsieh, Tsung-Han et al. (2018): Cerebral ischemia and neuroregeneration. In: *Neural regeneration research* 13 (3), S. 373–385. DOI: 10.4103/1673-5374.228711.

Lee, Jin Hwan; Zhang, James; Yu, Shan Ping (2017): Neuroprotective mechanisms and translational potential of therapeutic hypothermia in the treatment of ischemic stroke. In: *Neural regeneration research* 12 (3), S. 341–350. DOI: 10.4103/1673-5374.202915.

Lehmkuhl, E.; Kendel, F.; Gelbrich, G.; Dunkel, A.; Oertelt-Prigione, S.; Babitsch, B. et al. (2012): Gender-specific predictors of early mortality after coronary artery bypass graft surgery. In: *Clin Res Cardiol* 101 (9), S. 745–751. DOI: 10.1007/s00392-012-0454-0.

Leon, Rachel L.; Huber, Jason D.; Rosen, Charles L. (2011): Potential age-dependent effects of estrogen on neural injury. In: *Am. J. Pathol* 178 (6), S. 2450–2460. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.01.057.

LEWIS, F. J.; TAUFIC, M. (1953): Closure of atrial septal defects with the aid of hypothermia; experimental accomplishments and the report of one successful case. In: *Surgery* 33 (1), S. 52–59.

Li, Sijie; Hafeez, Adam; Noorulla, Fatima; Geng, Xiaokun; Shao, Guo; Ren, Changhong et al. (2017): Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia. In: *Progress in Neurobiology*. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2017.01.001.

Li, Peiyong; Stetler, R. Anne; Leak, Rehana K.; Shi, Yejie; Li, Yan; Yu, Weifeng et al. (2018): Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery. In: *Neuropharmacology* 134 (Pt B), S. 208–217. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.11.011.

Liu, Mingyue; Dziennis, Suzan; Hurn, Patricia D.; Alkayed, Nabil J. (2009): Mechanisms of gender-linked ischemic brain injury. In: *Restor. Neurol. Neurosci* 27 (3), S. 163–179. DOI: 10.3233/RNN-2009-0467.

Liu, Fudong; Lang, Jesse; Li, Jun; Benashski, Sharon E.; Siegel, Matthew; Xu, Yan; McCullough, Louise D. (2011): Sex differences in the response to poly (ADP-ribose) polymerase-1 deletion and caspase inhibition after stroke. In: *Stroke* 42 (4), S. 1090–1096. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.594861.

Liu, Fudong; McCullough, Louise D. (2012): Interactions between age, sex, and hormones in experimental ischemic stroke. In: *Neurochem. Int* 61 (8), S. 1255–1265. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.10.003.

Luo, Chun Xia; Zhu, Xin Jian; Zhou, Qi Gang; Wang, Bin; Wang, Wei; Cai, Hui et al. (2007): Reduced neuronal nitric oxide synthase is involved in ischemia-induced hippocampal neurogenesis by up-regulating inducible nitric oxide synthase expression. In: *J. Neurochem* 103 (5), S. 1872–1882. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04915.x.

Luoma, Jessie I.; Stern, Christopher M.; Mermelstein, Paul G. (2012): Progesterone inhibition of neuronal calcium signaling underlies aspects of progesterone-mediated neuroprotection. In: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol* 131 (1-2), S. 30–36. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2011.11.002.

Maggio, Marcello; Nicolini, Francesco; Cattabiani, Chiara; Beghi, Cesare; Gherli, Tiziano; Schwartz, Robert S. et al. (2012): Effects of testosterone supplementation on clinical and rehabilitative outcomes in older men undergoing on-pump CABG. In: *Contemp Clin Trials* 33 (4), S. 730–738. DOI: 10.1016/j.cct.2012.02.019.

Malone, Kyle; Amu, Sylvie; Moore, Anne C.; Waeber, Christian (2019): The immune system and stroke: from current targets to future therapy. In: *Immunology and cell biology* 97 (1), S. 5–16. DOI: 10.1111/imcb.12191.

Mannella, Paolo; Sanchez, Angel Matias; Giretti, Maria Silvia; Genazzani, Andrea Riccardo; Simoncini, Tommaso (2009): Oestrogen and progestins differently prevent glutamate toxicity in cortical neurons

depending on prior hormonal exposure via the induction of neural nitric oxide synthase. In: *Steroids* 74 (8), S. 650–656. DOI: 10.1016/j.steroids.2009.02.011.

Manwani, Bharti; Bentivegna, Kathryn; Benashski, Sharon E.; Venna, Venugopal Reddy; Xu, Yan; Arnold, Arthur P.; McCullough, Louise D. (2015): Sex differences in ischemic stroke sensitivity are influenced by gonadal hormones, not by sex chromosome complement. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 35 (2), S. 221–229. DOI: 10.1038/jcbfm.2014.186.

Manwani, Bharti; Liu, Fudong; Scranton, Victoria; Hammond, Matthew D.; Sansing, Lauren H.; McCullough, Louise D. (2013): Differential effects of aging and sex on stroke induced inflammation across the lifespan. In: *Exp. Neurol.* DOI: 10.1016/j.expneurol.2013.08.011.

Martin, Lisa M.; Holmes, Sari D.; Henry, Linda L.; Schlauch, Karen A.; Stone, Lori E.; Roots, Abigail et al. (2012): Health-related quality of life after coronary artery bypass grafting surgery and the role of gender. In: *Cardiovasc Revasc Med* 13 (6), S. 321–327. DOI: 10.1016/j.carrev.2012.09.002.

Mayor, Diana; Tymianski, Michael (2018): Neurotransmitters in the mediation of cerebral ischemic injury. In: *Neuropharmacology* 134 (Pt B), S. 178–188. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.11.050.

McCullough, Louise D.; Mirza, Mehwish A.; Xu, Yan; Bentivegna, Kathryn; Steffens, Eleanor B.; Ritzel, Rodney; Liu, Fudong (2016): Stroke sensitivity in the aged: sex chromosome complement vs. gonadal hormones. In: *aging* 8 (7), S. 1432–1441. DOI: 10.18632/aging.100997.

Nakano, Takaaki; Hurn, Patricia D.; Herson, Paco S.; Traystman, Richard J. (2010): Testosterone exacerbates neuronal damage following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mouse. In: *Brain Res* 1357, S. 124–130. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.08.013.

Nguyen, T. V.; Jayaraman, A.; Quagliano, A.; Pike, C. J. (2010): Androgens selectively protect against apoptosis in hippocampal neurons. In: *J. Neuroendocrinol* 22 (9), S. 1013–1022. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2010.02044.x.

Northington, Frances J.; Chavez-Valdez, Raul; Martin, Lee J. (2011): Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. In: *Ann. Neurol* 69 (5), S. 743–758. DOI: 10.1002/ana.22419.

Nussmeier, Nancy A.; Searles, Bruce E. (2010): Inflammatory brain injury after cardiopulmonary bypass: is it real? In: *Anesth. Analg* 110 (2), S. 288–290. DOI: 10.1213/ANE.0b013e3181c8b1bb.

Okita, Yutaka (2018): Neuro-protection in open arch surgery. In: *Ann Cardiothorac Surg* 7 (3), S. 389–396. DOI: 10.21037/acs.2018.04.01.

Pan, De-Sheng; Liu, Wei-Guo; Yang, Xiao-Feng; Cao, Fei (2007): Inhibitory effect of progesterone on inflammatory factors after experimental traumatic brain injury. In: *Biomed. Environ. Sci* 20 (5), S. 432–438.

Park, Eun-Mi; Cho, Sunghee; Frys, Kelly A.; Glickstein, Sara B.; Zhou, Ping; Anrather, Josef et al. (2006): Inducible nitric oxide synthase contributes to gender differences in ischemic brain injury. In: *J. Cereb. Blood Flow Metab* 26 (3), S. 392–401. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600194.

Puig, Berta; Brenna, Santra; Magnus, Tim (2018): Molecular Communication of a Dying Neuron in Stroke. In: *International journal of molecular sciences* 19 (9). DOI: 10.3390/ijms19092834.

Rahimian, Reza; Cordeau, Pierre; Kriz, Jasna (2019): Brain Response to Injuries: When Microglia Go Sexist. In: *Neuroscience* 405, S. 14–23. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.02.048.

Ranucci, Marco; Pazzaglia, Alfredo; Bianchini, Chiara; Bozzetti, Giuseppe; Isgrò, Giuseppe (2008): Body size, gender, and transfusions as determinants of outcome after coronary operations. In: *Ann. Thorac. Surg* 85 (2), S. 481–486. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2007.10.014.

Ridder, D. A.; Schwaninger, M. (2009): NF-kappaB signaling in cerebral ischemia. In: *Neuroscience* 158 (3), S. 995–1006. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.07.007.

- Rieß, Friedrich-Christian; Behrendt, Christian-Alexander; Amin, Wagma; Heller, Stefan; Hansen, Lorenz; Winkel, Stephan et al. (2017): Complete arterial revascularization using bilateral internal mammary artery in T-graft technique for multivessel coronary artery disease in on- or off-pump approach: does gender lose its historical impact on clinical outcome? In: *Eur J Cardiothorac Surg* 52 (5), S. 917–923. DOI: 10.1093/ejcts/ezx287.
- Ritzel, Rodney M.; Capozzi, Lori A.; McCullough, Louise D. (2013): Sex, stroke, and inflammation: the potential for estrogen-mediated immunoprotection in stroke. In: *Horm Behav* 63 (2), S. 238–253. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2012.04.007.
- Rolova, Taisia; Dhungana, Hiramani; Korhonen, Paula; Valonen, Piia; Kolosowska, Natalia; Kontinen, Henna et al. (2016): Deletion of Nuclear Factor kappa B p50 Subunit Decreases Inflammatory Response and Mildly Protects Neurons from Transient Forebrain Ischemia-induced Damage. In: *Aging and disease* 7 (4), S. 450–465. DOI: 10.14336/AD.2015.1123.
- Salameh, Aida; Dhein, Stefan; Dähnert, Ingo; Klein, Norbert (2016): Neuroprotective Strategies during Cardiac Surgery with Cardiopulmonary Bypass. In: *IJMS* 17 (11), S. 1945. DOI: 10.3390/ijms17111945.
- Sandu, Raluca Elena; Buga, Ana Maria; Uzoni, Adriana; Petcu, Eugen Bogdan; Popa-Wagner, Aurel (2015): Neuroinflammation and comorbidities are frequently ignored factors in CNS pathology. In: *Neural regeneration research* 10 (9), S. 1349–1355. DOI: 10.4103/1673-5374.165208.
- Schmidt-Kastner, Rainald (2015): Genomic approach to selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia-hypoxia. In: *Neuroscience* 309, S. 259–279. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.08.034.
- Schmitt, Katharina Rose Luise; Tong, Giang; Berger, Felix (2014): Mechanisms of hypothermia-induced cell protection in the brain. In: *Molecular and cellular pediatrics* 1 (1), S. 7. DOI: 10.1186/s40348-014-0007-x.
- Schreihöfer, Derek A.; Ma, Yulin (2013): Estrogen receptors and ischemic neuroprotection: Who, what, where and when? In: *Brain Res*. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.02.051.
- Shih, Ruey-Horng; Wang, Chen-Yu; Yang, Chuen-Mao (2015): NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. In: *Front. Mol. Neurosci.* 8 (e4093), S. 3244. DOI: 10.3389/fnmol.2015.00077.
- Siddiqui, Ali Nasir; Siddiqui, Nahida; Khan, Rashid Ali; Kalam, Abul; Jabir, Nasimudeen R.; Kamal, Mohammad Amjad et al. (2016): Neuroprotective Role of Steroidal Sex Hormones: An Overview. In: *CNS neuroscience & therapeutics* 22 (5), S. 342–350. DOI: 10.1111/cns.12538.
- Siegel, Chad; Turtzo, Christine; McCullough, Louise D. (2010): Sex differences in cerebral ischemia: possible molecular mechanisms. In: *J. Neurosci. Res* 88 (13), S. 2765–2774. DOI: 10.1002/jnr.22406.
- Simon, R.; Xiong, Z. (2006): Acidotoxicity in brain ischaemia. In: *Biochem. Soc. Trans* 34 (Pt 6), S. 1356–1361. DOI: 10.1042/BST0341356.
- Simpkins, James W.; Singh, Meharvan; Brock, Courtney; Etgen, Anne M. (2012): Neuroprotection and estrogen receptors. In: *Neuroendocrinology* 96 (2), S. 119–130. DOI: 10.1159/000338409.
- Song, Howard K.; Grab, Joshua D.; O'Brien, Sean M.; Welke, Karl F.; Edwards, Fred; Ungerleider, Ross M. (2008): Gender differences in mortality after mitral valve operation: evidence for higher mortality in perimenopausal women. In: *Ann. Thorac. Surg* 85 (6), 2040–4; discussion 2045. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2008.02.082.
- Strosznajder, Robert Piotr; Czubowicz, Kinga; Jesko, Henryk; Strosznajder, Joanna Benigna (2010): Poly (ADP-ribose) metabolism in brain and its role in ischemia pathology. In: *Mol. Neurobiol* 41 (2-3), S. 187–196. DOI: 10.1007/s12035-010-8124-6.

- Subramaniyan, Saraswathi; Terrando, Niccolò (2019): Neuroinflammation and Perioperative Neurocognitive Disorders. In: *Anesth. Analg* 128 (4), S. 781–788. DOI: 10.1213/ANE.0000000000004053.
- Sugita, Junichi; Fujii, Katsuhito (2018): Systemic Inflammatory Stress Response During Cardiac Surgery. In: *International heart journal* 59 (3), S. 457–459. DOI: 10.1536/ihj.18-210.
- Suzuki, Shotaro; Brown, Candice M.; Wise, Phyllis M. (2009): Neuroprotective effects of estrogens following ischemic stroke. In: *Front Neuroendocrinol* 30 (2), S. 201–211. DOI: 10.1016/j.yfrne.2009.04.007.
- Svyatets, Marina; Tolani, Kishore; Zhang, Ming; Tulman, Gene; Charchaflied, Jean (2010): Perioperative management of deep hypothermic circulatory arrest. In: *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth* 24 (4), S. 644–655. DOI: 10.1053/j.jvca.2010.02.010.
- Tahsili-Fahadan, Pouya; Farrokh, Salia; Geocadin, Romergryko G. (2018): Hypothermia and brain inflammation after cardiac arrest. In: *Brain circulation* 4 (1), S. 1–13. DOI: 10.4103/bc.bc\_4\_18.
- Takeuchi, Hideyuki; Jin, Shijie; Wang, Jinyan; Zhang, Guiqin; Kawanokuchi, Jun; Kuno, Reiko et al. (2006): Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. In: *J. Biol. Chem* 281 (30), S. 21362–21368. DOI: 10.1074/jbc.M600504200.
- Tamatani, M.; Mitsuda, N.; Matsuzaki, H.; Okado, H.; Miyake, S.; Vitek, M. P. et al. (2000): A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: roles of nuclear factor- $\kappa$ B and Bcl-2. In: *Journal of neurochemistry* 75 (2), S. 683–693.
- Thornton, Claire; Rousset, Catherine I.; Kichev, Anton; Miyakuni, Yasuka; Vontell, Regina; Baburamani, Ana A. et al. (2012): Molecular mechanisms of neonatal brain injury. In: *Neurol Res Int* 2012, S. 506320. DOI: 10.1155/2012/506320.
- Uchida, Hiroto; Fujita, Yuki; Matsueda, Misato; Umeda, Masahiro; Matsuda, Shunsuke; Kato, Hiroyuki et al. (2010): Damage to neurons and oligodendrocytes in the hippocampal CA1 sector after transient focal ischemia in rats. In: *Cell. Mol. Neurobiol* 30 (7), S. 1125–1134. DOI: 10.1007/s10571-010-9545-5.
- Uchida, Masayoshi; Palmateer, Julie M.; Herson, Paco S.; DeVries, A. Courtney; Cheng, Jian; Hurn, Patricia D. (2009): Dose-dependent effects of androgens on outcome after focal cerebral ischemia in adult male mice. In: *J. Cereb. Blood Flow Metab* 29 (8), S. 1454–1462. DOI: 10.1038/jcbfm.2009.60.
- Vagnerova, K.; Liu, K.; Ardeshiri, A.; Cheng, J.; Murphy, S. J.; Hurn, P. D.; Herson, P. S. (2010): Poly (ADP-ribose) polymerase-1 initiated neuronal cell death pathway--do androgens matter? In: *Neuroscience* 166 (2), S. 476–481. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.12.041.
- Vallabhapurapu, Sivakumar; Karin, Michael (2009): Regulation and function of NF- $\kappa$ B transcription factors in the immune system. In: *Annu. Rev. Immunol* 27, S. 693–733. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132641.
- van Harten, A. E.; Scheeren, T. W. L.; Absalom, A. R. (2012): A review of postoperative cognitive dysfunction and neuroinflammation associated with cardiac surgery and anaesthesia. In: *Anaesthesia* 67 (3), S. 280–293. DOI: 10.1111/j.1365-2044.2011.07008.x.
- Vassileva, Christina M.; McNeely, Christian; Mishkel, Gregory; Boley, Theresa; Markwell, Stephen; Hazelrigg, Stephen (2013): Gender Differences in Long-Term Survival of Medicare Beneficiaries Undergoing Mitral Valve Operations. In: *Ann. Thorac. Surg.* DOI: 10.1016/j.athoracsur.2013.04.055.
- Veen, Kevin M.; Mokhles, Mostafa M.; Braun, Jerry; Versteegh, Michel I. M.; Bogers, Ad J. J. C.; Takkenberg, Johanna J. M. (2018): Male-female differences in characteristics and early outcomes of patients undergoing tricuspid valve surgery: a national cohort study in the Netherlands. In: *Eur J Cardiothorac Surg.* DOI: 10.1093/ejcts/ezy390.

- Vidale, Simone; Consoli, Arturo; Arnaboldi, Marco; Consoli, Domenico (2017): Postischemic Inflammation in Acute Stroke. In: *Journal of clinical neurology (Seoul, Korea)* 13 (1), S. 1–9. DOI: 10.3988/jcn.2017.13.1.1.
- Wang, Yingfei; Kim, No Soo; Haince, Jean-Francois; Kang, Ho Chul; David, Karen K.; Andrabi, Shaida A. et al. (2011): Poly (ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). In: *Sci Signal* 4 (167), ra20. DOI: 10.1126/scisignal.2000902.
- Watters, Orla; O'Connor, John J. (2011): A role for tumor necrosis factor- $\alpha$  in ischemia and ischemic preconditioning. In: *J Neuroinflammation* 8, S. 87. DOI: 10.1186/1742-2094-8-87.
- Webster, Carla M.; Kelly, Stephen; Koike, Maya A.; Chock, Valerie Y.; Giffard, Rona G.; Yenari, Midori A. (2009): Inflammation and NFkappaB activation is decreased by hypothermia following global cerebral ischemia. In: *Neurobiol. Dis* 33 (2), S. 301–312. DOI: 10.1016/j.nbd.2008.11.001.
- Wise, Phyllis M.; Suzuki, Shotaro; Brown, Candice M. (2009): Estradiol: a hormone with diverse and contradictory neuroprotective actions. In: *Dialogues Clin Neurosci* 11 (3), S. 297–303.
- Xiang, Yanxiao; Zhao, Hua; Wang, Jiali; Zhang, Luetao; Liu, Anchang; Chen, Yuguo (2016): Inflammatory mechanisms involved in brain injury following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation (Review). In: *biom rep*. DOI: 10.3892/br.2016.677.
- Yang, Wei; Ma, Qing; Mackensen, G. Burkhard; Paschen, Wulf (2009): Deep hypothermia markedly activates the small ubiquitin-like modifier conjugation pathway; implications for the fate of cells exposed to transient deep hypothermic cardiopulmonary bypass. In: *J. Cereb. Blood Flow Metab* 29 (5), S. 886–890. DOI: 10.1038/jcbfm.2009.16.
- Yeap, Bu B. (2013): Hormones and health outcomes in aging men. In: *Exp. Gerontol* 48 (7), S. 677–681. DOI: 10.1016/j.exger.2012.07.012.
- Yenari, Midori A.; Han, Hyung Soo (2012): Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. In: *Nat. Rev. Neurosci* 13 (4), S. 267–278. DOI: 10.1038/nrn3174.
- Zárate, Sandra; Stevensner, Tinna; Gredilla, Ricardo (2017): Role of Estrogen and Other Sex Hormones in Brain Aging. Neuroprotection and DNA Repair. In: *Frontiers in aging neuroscience* 9, S. 430. DOI: 10.3389/fnagi.2017.00430.
- Zhang, Chaoji; Miao, Qi; Liu, Xingrong; Zhang, Heng; Ma, Guotao; Chen, Guangjun; Deng, Haibo (2010): Intravenous leiomyomatosis with intracardiac extension. In: *Ann. Thorac. Surg* 89 (5), S. 1641–1643. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2009.09.044.
- Zhang, Zheng; Zhang, Linlei; Ding, Yuchuan; Han, Zhao; Ji, Xunming (2018a): Effects of Therapeutic Hypothermia Combined with Other Neuroprotective Strategies on Ischemic Stroke: Review of Evidence. In: *Aging and disease* 9 (3), S. 507–522. DOI: 10.14336/AD.2017.0628.
- Zhang, Huasheng; Zhang, Dingding; Li, Hua; Yan, Huiying; Zhang, Zihuan; Zhou, Chenhui et al. (2018b): Biphasic activation of nuclear factor- $\kappa$ B and expression of p65 and c-Rel following traumatic neuronal injury. In: *International journal of molecular medicine* 41 (6), S. 3203–3210. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3567.
- Zhao, Xiu-Yun; Lu, Mei-Hong; Yuan, De-Juan; Xu, De-En; Yao, Pei-Pei; Ji, Wen-Li et al. (2019): Mitochondrial Dysfunction in Neural Injury. In: *Frontiers in neuroscience* 13, S. 30. DOI: 10.3389/fnins.2019.00030.
- Zheng, Li; Ding, Junli; Wang, Jianwei; Zhou, Changman; Zhang, Weiguang (2016): Effects and Mechanism of Action of Inducible Nitric Oxide Synthase on Apoptosis in a Rat Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. In: *Anatomical record (Hoboken, N.J.: 2007)* 299 (2), S. 246–255. DOI: 10.1002/ar.23295.

Zhu, Peng; Du, Songlin; Chen, Shijun; Zheng, Shaobin; Hu, Yu; Liu, Li; Zheng, Shaoyi (2018): The role of deep hypothermic circulatory arrest in surgery for renal or adrenal tumor with vena cava thrombus: a single-institution experience. In: *Journal of cardiothoracic surgery* 13 (1), S. 85. DOI: 10.1186/s13019-018-0772-z.

Zhu, Xiaoyan; Fréchou, Magalie; Liere, Philippe; Zhang, Shaodong; Pianos, Antoine; Fernandez, Neïké et al. (2017): A Role of Endogenous Progesterone in Stroke Cerebroprotection Revealed by the Neural-Specific Deletion of Its Intracellular Receptors. In: *J. Neurosci* 37 (45), S. 10998–11020. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3874-16.2017.

Zhu, X. J.; Hua, Y.; Jiang, J.; Zhou, Q. G.; Luo, C. X.; Han, X. et al. (2006): Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide inhibits neurogenesis in the adult dentate gyrus by down-regulating cyclic AMP response element binding protein phosphorylation. In: *Neuroscience* 141 (2), S. 827–836. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.04.032.

Ziganshin, Bulat A.; Elefteriades, John A. (2013): Deep hypothermic circulatory arrest. In: *Annals of cardiothoracic surgery* 2 (3), S. 303–315. DOI: 10.3978/j.issn.2225-319X.2013.01.05.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Mortalitätsrate nach Herzklappenoperationen von Männern und Frauen in Abhängigkeit vom Alter .....	15
Abbildung 3.1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere .....	25
Abbildung 3.2: Zeitplan von der Ankunft der Ratten bis zur Abtrennung des Homecages 27	
Abbildung 3.3: Zeitplan von der ersten NU bis zur Tötung der Tiere .....	28
Abbildung 3.4: Aufbau der EKZ.....	34
Abbildung 3.5: Testung der neurologischen Funktion .....	37
Abbildung 3.6: modifizierter Holeboardtest (mHBT) .....	38
Abbildung 3.7: Verdünnungen der Primärantikörper .....	40
Abbildung 3.8: Geschlechtshormone .....	42
Abbildung 4.1: NFκB im Kortex .....	43
Abbildung 4.2: NFκB im Hippokampus .....	44
Abbildung 4.3: TNF-α im Kortex.....	45
Abbildung 4.4: TNF-α im Hippokampus .....	46
Abbildung 4.5: iNOS im Kortex .....	47
Abbildung 4.6: iNOS im Hippokampus.....	48
Abbildung 4.7: Caspase-3 im Kortex.....	49
Abbildung 4.8: Caspase-3 im Hippokampus.....	50
Abbildung 4.9: PARP-1 im Kortex .....	51
Abbildung 4.10: PARP-1 im Hippokampus .....	52

## Abkürzungsverzeichnis

### A

A./Aa.	Arteria/Arteriae (lat.) = Arterie/Arterien
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Aktiengesellschaft
AIF	apoptosis inducing factor (engl.) = Apoptose-induzierender Faktor
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid = $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (Untergruppe der Glutamatrezeptoren)
AR	Androgenrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat

### B

BCL-2	B-cell lymphoma-2 (engl.) = B-Zell Lymphom-2, ein Protein zur Regulation des programmierten Zelltods
BE	base excess (engl.) = Basenabweichung
bzw.	beziehungsweise

### C

°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	ionisiertes Kalzium
CABG	Coronary artery bypass graft (engl.) = Koronararterien-Bypass
cAMP	cyclic adenosinemonophosphate (engl.) = zyklisches Adenosinmonophosphat
Caspase	cysteinyln-aspartate specific protease (engl.) = Cysteinproteasen, die Zielproteine an einer Peptidbindung C-terminal von Aspartat schneiden
Cl <sup>-</sup>	ionisiertes Chlorid
cm	Zentimeter
Co.	Compagnie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPAP	continuous positive airway pressure (engl.) = konstanter positiver endexpiratorischer Druck

## Abkürzungsverzeichnis

---

CPB	cardiopulmonary bypass (engl.) = kardiopulmonaler Bypass
CREB	cAMP response element binding protein (engl., Transkriptionsfaktor)
c-Rel	Eigenname einer Untereinheit von NFκB
<b><u>D</u></b>	
DAMP	danger-associated molecular pattern molecules (engl.) = Gefahren-assoziierte molekulare-Muster-Moleküle
DHCA	deep hypothermic circulatory arrest (engl.) = Tief hypothermer Kreislaufstillstand
DHT	Dihydrotestosteron
dl	Deziliter
Dipl.-Ing.	Diplom-Ingenieur
<b><u>E</u></b>	
E <sub>2</sub>	17β-Estradiol
EKG	Elektrokardiogramm
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
engl.	englisch
ERα	Östrogen-Rezeptor α
ERE	estrogen-responsive element (engl., Transkriptionsfaktor)
et al.	et alii/aliae/alia (lat.) = und andere
etc.	et cetera
<b><u>F</u></b>	
Fa.	Firma
FADD	fas-associated death domain protein (engl.) = Fas-assoziiertes Todesdomänen-Protein
Fas	Eigenname eines Todesrezeptors, der zur TNF-α-Rezeptor-Superfamilie gehört
FiO <sub>2</sub>	fraction of inspired oxygen (engl.) = inspiratorischer O <sub>2</sub> -Anteil
Fr	French (Maßeinheit für Katheter)
<b><u>G</u></b>	
G	Gauge (Maßeinheit für Kanülen)
g	Gramm

GFAP	glial fibrillary acid protein (engl.) = saures Gliafaserprotein
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GPR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
<b>H</b>	
h	hour (engl.) = Stunde
H <sup>+</sup>	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HAES	Hydroxyethylstärke
Hb	Hämoglobin
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonat
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hkt	Hämatokrit
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HPF	high power field (engl.) = Haupt Gesichtsfeld
<b>I</b>	
I.E.	Internationale Einheiten
IκB	NFκB-inhibitorisches Protein
IKK	IκB-Kinase
IL	Interleukin
Inc.	Incorporated
iNOS	inducible isoform of nitric oxide synthase (engl.) = Stickstoffmonoxid-Synthase i
<b>K</b>	
K <sup>+</sup>	ionisiertes Kalium
kg	Kilogramm
KG	Kommanditgesellschaft
<b>L</b>	
lat.	lateinisch
Lig. /Ligg.	Ligamentum/Ligamenta (lat.) = Band/Bänder
l	Liter
<b>M</b>	
M.	Musculus (lat.) = Muskel
MAP	mean arterial blood pressure (engl.) = mittlerer arterieller Druck
mg	Milligramm

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
min	Minute
mmol	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteasen
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
µg	Mikrogramm = 1/1000 mg
MV	mean value (engl.) = arithmetischer Mittelwert
<b><u>N</u></b>	
Na <sup>+</sup>	ionisiertes Natrium
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	(Reduziertes) Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (Koenzym für Redox-Reaktionen des Zellstoffwechsels)
NeuN	neuronal specific nuclear protein (engl.) = Neuronenspezifisches Kernprotein
NFκB	nuclear factor „κ-light-chain-enhancer“ of activated B-cells (engl.) = Nukleärer Faktor „κ-Leichtketten-Enhancer“ aktivierter B-Zellen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronal isoform of nitric oxide synthase (engl.) = neuronale Isoform der Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NU	neurologische Untersuchung
<b><u>O</u></b>	
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Disauerstoff (O <sub>2</sub> -Radikal)
<b><u>P</u></b>	
p	probability value (engl.) = Signifikanzwert
p50	Eigenname einer Untereinheit von NFκB
p52	Eigenname einer Untereinheit von NFκB
PAR	Polymere aus ADP-Ribose
PARP-1	Poly-Adenosintriphosphat-Ribose-Polymerase 1
PBS	phosphate buffered saline (engl.) = Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
paCO <sub>2</sub>	Arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck

---

PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
paO <sub>2</sub>	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
Proc.	Processus (lat.) = Fortsatz
PRR	pattern-recognition receptor (engl.) = Mustererkennung-Rezeptor
PTP	permeability transition pore (engl.) = Permeabilitäts-Transitions-Pore (in der inneren Mitochondrienmembran)
<b><u>R</u></b>	
R./Rr.	Ramus/Rami (lat.) = Ast/Äste
ref	reference ranges (engl.) = Referenzwerte
RelA/RelB	Eigename einer Untereinheit von NFκB
RMSD	root mean square deviation (engl.) = Standardabweichung
ROS	reactive oxygen species (engl.) = reaktive Sauerstoffradikale
rpm	rounds per minute (engl.) = Umdrehungen pro min
<b><u>S</u></b>	
s.	siehe
s.u.	siehe unten
sog.	sogenannte/-n/-r
STABW	Standardabweichung
<b><u>T</u></b>	
t	time (engl.) = Zeit
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TNFR	TNF-α-Rezeptor
TRADD	TNFR1-associated death domain protein (engl.) = TNFR1-assoziiertes Todes-Domänen-Protein
TRAF-2	TNF-α-receptor-associated factor-2 (engl.) = TNF-α-Rezeptor-assoziiierter Faktor-2
<b><u>U</u></b>	
u.a.	unter anderem

## Abkürzungsverzeichnis

---

USA	United States of America (engl.) = vereinigte Staaten von Amerika
usw.	und so weiter
<u>V</u>	
V./Vv.	Vena/Venae (lat.) = Vene/Venen
Vol.-%	Volumenprozent = Anteil eines Stoffes an einem Gemisch bezogen auf das Volumen
vs.	versus (lat.) = gegen(übergestellt)
<u>Z</u>	
z.B.	Zum Beispiel

## Danksagung

Nach Abschluss dieser Doktorarbeit bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. M. Blobner, Leitender Oberarzt der Klinik für Anästhesiologie der Technischen Universität München, für die Übernahme der Arbeit an der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Univ.-Prof. Dr. med., Dipl. phys. E. Kochs, Direktor des Instituts für Anästhesiologie der Technischen Universität München, sowie auch seinem Nachfolger Univ.-Prof. Dr. med. Gerhard Schneider, und Frau Prof. Dr. med. Bettina Jungwirth für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie die Möglichkeit, diese innerhalb des Instituts für experimentelle Anästhesie erstellen zu können.

Bei Herrn Prof. Dr. med. M. Blobner bedanke ich mich besonders für die sorgfältige und schnelle Durchsicht und Korrektur des Manuskripts sowie die stets freundliche Unterstützung und Beratung.

Meinen Betreuerinnen Frau Dr. med. vet. Kristine Kellermann und Frau Dr. med. vet. Nadja Dertinger möchte ich ganz herzlich für die intensive Betreuung danken. Beide haben mich bei der Einarbeitung in die Methodik und bei der Versuchsdurchführung permanent unterstützt und motiviert. Außerdem stellte sich Frau Dr. med. vet. Kristine Kellermann für die intensive und schnelle Korrektur meiner schriftlichen Dissertation zur Verfügung, wofür ich mich an dieser Stelle noch einmal gesondert bedanken möchte. Des Weiteren bedanke ich mich auch herzlichst bei unserer Projektleiterin Frau Prof. Dr. med. Bettina Jungwirth sowie bei Herrn Dr. med. Sebastian Schmid für die Übernahme dieser Aufgabe zum Ende hin. Ohne ihre abschließende Korrektur wäre die Fertigstellung dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt ebenfalls meiner Vorgängerin Frau Dr. med. vet. Simone Denzler, die sich zu Beginn meiner Arbeit sehr aufopferungsvoll dafür eingesetzt hat, ihr Wissen und ihre Erfahrung an mich und meinen Mitdoktoranden, Herrn Dr. med. vet. Stefan Friedrich, weiterzugeben. Außerdem bedanke ich mich bei meinen Kollegen, allen voran Herrn Dr. med. vet. Stefan Friedrich, für die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei der Durchführung der Experimente, sowie auch bei Frau Julia Scheer und Frau Susann Vlachakis für das gute Arbeitsklima innerhalb der Arbeitsgruppe sowie die gute Organisation im Labor.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Großeltern Irmgard und Max Caroli, und vor allem meinen Eltern Heide und Rudolf Auster, die mir das Studium der Humanmedizin und diese Doktorarbeit erst ermöglicht haben. Für eure Geduld sowie moralische und finanzielle Unterstützung in den letzten Jahren möchte ich mich bei euch von ganzem Herzen bedanken! Und zu guter Letzt – Danke dir, Rafael, für alles!