

Aus der Klinik für Neonatologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Effekte von Progesteron auf
Hyperoxie-bedingte
Schädigungsmechanismen in der C8-D1A
Astrozytenzellkultur

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von Friederike Sophie Weber
aus Karl-Marx-Stadt, jetzt Chemnitz

Datum der Promotion: 22. Juni 2014

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
Abstrakt	8
1 Einleitung	10
1.1 Frühgeborene	10
1.2 Intrauterine Hypoxie und postpartale Hyperoxie	11
1.3 Organschäden bei Frühgeborenen durch Sauerstoff	11
1.3.1 Sauerstoff als Therapeutikum	11
1.3.2 Neurokognitive Entwicklung von Frühgeborenen	12
1.3.3 Sauerstoffbedingte Schäden der Lunge	13
1.3.4 Die Frühgeborenenretinopathie	14
1.4 Auswirkung von Hyperoxie auf die Zellen des Gehirns	15
1.4.1 In vitro Studien	15
1.4.2 In vivo Studien	16
1.5 C8-D1A Astrozyten	17
1.6 Progesteron – ein protektives Agenz?	17
1.7 Fragestellung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Geräte	20
2.2 Chemikalien	20
2.2.1 Biologisches Material	20
2.2.2 Puffer	20
2.2.3 Oligonukleotide	20
2.3 Zellkultur	24
2.3.1 C8-D1A Astrozyten	24
2.3.2 Phenolrot-freies RPMI 1640 Medium und kohlefiltriertes fetales Kälberserum	24
2.3.3 Passagieren und Mediumwechsel	25
2.3.4 Zelldichtebestimmung	25

2.3.5	Progesteron und RU 486	25
2.3.6	Hyperoxie	26
2.3.7	Zellmorphologie	26
2.4	Zellvitalitätstest	26
2.5	Laktatdehydrogenase-Test	27
2.6	Cell Death Detection ELISA ^{plus}	28
2.7	Durchflusszytometrie	29
2.7.1	Untersuchung der Zellproliferation	29
2.8	Molekularbiologische Methoden	30
2.8.1	Ribonukleinsäure-Isolierung	30
2.8.2	Ribonukleinsäure-Extraktion	31
2.8.3	Reverse Transkription	31
2.8.4	β -Aktin Kontroll-PCR	32
2.8.5	RT-PCR: Nachweis der Progesteron-Rezeptorexpression	32
2.8.6	qRT-PCR: Nachweis quantitativer Rezeptorexpression	33
2.9	Software und Statistik	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Morphologie der C8-D1A Astrozyten in Normoxie und Hyperoxie	36
3.2	Vitalität der C8-D1A Astrozyten in Normoxie und Hyperoxie	38
3.2.1	Hyperoxie-bedingte Abnahme der Zellvitalität der C8-D1A Astrozyten	38
3.3	Hyperoxie-induzierter Zelltod in C8-D1A Astrozyten	39
3.3.1	Hyperoxie induziert Apoptose in C8-D1A Astrozyten	39
3.3.2	Nekrose ist kein Hyperoxie-induzierter Schädigungsmechanismus in C8-D1A Astrozyten	41
3.4	Hyperoxie hemmt die Proliferation von C8-D1A Astrozyten	41
3.5	Die Expression von Cyclin D2 sinkt unter Hyperoxie	44
3.6	Die Rezeptoren PR-AB und PR-B werden auf C8-D1A Astrozyten exprimiert	45
3.6.1	Progesteron hat keinen protektiven Nutzen bei Hyperoxie-bedingter Schädigung der C8-D1A Astrozyten	45
3.6.2	Progesteron reduziert die Zellvitalität von C8-D1A Astrozyten in Normoxie	47

3.6.3	Die Progesteron-induzierte Depletion der Zellzahl ist mit dem Antagonisten RU 486 reversibel	49
3.6.4	RU 486 mindert Hyperoxie-Effekte auf C8-D1A Astrozyten	50
3.6.5	Progesteron induziert keinen Zelltod in C8-D1A Astrozyten	51
3.6.6	Progesteron hat keinen protektiven Nutzen auf Hyperoxie-bedingte Zellschädigung	52
3.7	Progesteron induziert keine Nekrose in C8-D1A Astrozyten	53
3.8	Untersuchung der Proliferation	54
3.8.1	Proliferationsverhalten der C8-D1A Astrozyten unter Progesteron	54
3.9	Die Expression der Progesteronrezeptoren sinkt unter Hyperoxie	56
4	Diskussion	58
4.1	Induktion von Apoptose durch Hyperoxie	58
4.1.1	Hyperoxie induziert Apoptose in C8-D1A Astrozyten	58
4.1.2	Schädigungen durch Hyperoxie in primären Astrozyten	58
4.1.3	Auswirkung von Hyperoxie in vivo	59
4.2	Untersuchungen zur Hyperoxie in weiteren zerebralen Zellen	62
4.2.1	Oligodendrozyten	62
4.2.2	Neuronen	63
4.3	Hyperoxie hemmt die Proliferation von C8-D1A Astrozyten	64
4.4	Pro und Contra: Protektives Potential von Progesteron	65
4.4.1	Protektion vor Hyperoxie-bedingten Schädigungen: Was sind mögliche Ansätze?	67
4.4.2	Klinische Studien	68
4.5	Einschränkungen der Studie	69
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	70
	Literatur	71
	Eidesstattliche Versicherung	80
	Lebenslauf	81
	Publikationsliste	83

Abbildungsverzeichnis

1	Morphologie der C8-D1A Astrozyten 24 h in 21 % O ₂	37
2	Morphologie der C8-D1A Astrozyten 24 h in 80 % O ₂	37
3	Morphologie der C8-D1A Astrozyten 48 h in 21 % O ₂	37
4	Morphologie der C8-D1A Astrozyten 48 h in 80 % O ₂	37
5	MTT-Test 24 h 80 % O ₂	38
6	MTT-Test 24 - 72 h 80 % O ₂	39
7	Cell Death Detection ELISA 24 h 80 % O ₂	40
8	Zytotoxizitätstest 24 - 72 h 80 % O ₂	40
9	Durchflusszytometrie 24 h 21 und 80 % O ₂	42
10	Durchflusszytometrie 48 h 21 % O ₂ exemplarische Messung	43
11	Durchflusszytometrie 48 h 80 % O ₂ exemplarische Messung	43
12	qRT-PCR Expression von Cyclin D2	44
13	RT-PCR Expression der PR-Rezeptoren	45
14	MTT-Test 24 h 21 und 80 % O ₂	46
15	MTT-Test 48 h 80 % O ₂	46
16	MTT-Test 24 h 21 % O ₂	47
17	MTT-Test 48 h 21 % O ₂	48
18	MTT-Test 72 h 21 % O ₂	48
19	MTT-Test RU 486 21 % O ₂	50
20	MTT-Test RU 486 80 % O ₂	51
21	Zytotoxizitätstest 24 h 21 und 80 % O ₂	52
22	Cell Death Detection ELISA 24 und 48 h 21 % O ₂	53
23	Durchflusszytometrie 24 und 48 h 21 % O ₂	54
24	Durchflusszytometrie 48 h 21 % O ₂ exemplarische Messung	55
25	Durchflusszytometrie 48 h 80 % O ₂ exemplarische Messung	56
26	qRT-PCR Expression der PR-Rezeptoren	57

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Geräte	21
2	Verwendete Chemikalien	22
3	Biologisches Material	23
4	Puffer	23
5	Primer und Sonden	23
6	Reaktionskomponenten für den Mastermix der Reversen Transkription .	32
7	Reaktionskomponenten für den Mastermix der quantitativen Realtime-PCR	35

Abstrakt

Einleitung. Die Fortschritte der neonatologischen Intensivmedizin haben das Überleben extrem kleiner Frühgeborener deutlich verbessert. Neurokognitive Defizite im Laufe der Entwicklung ehemaliger Frühgeborener zählen zu häufigen Problemen in der sozialpädiatrischen Nachsorge. Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten ist ein möglicher negativer Einfluss der unphysiologisch hohen Sauerstoffkonzentrationen, denen das unreife Kind postnatal ausgesetzt ist. Ziel dieser Arbeit war, die Auswirkung einer experimentellen Hyperoxie (80 % O₂) auf kultivierte Astrozyten im Hinblick auf einen möglichen protektiven Einfluss von Progesteron zu untersuchen.

Methodik. C8-D1A Astrozyten wurden für 24, 48 und 72 h in 21 % O₂ oder 80 % O₂ in Gegenwart von Progesteron (P 10⁻⁵ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁹ M) und dem Progesteron-Antagonisten RU 486 (10 μM) kultiviert. Zellvitalität und Zellschädigung wurden mittels Methyl-Tetrazolium-Metabolisierungs-Test und Laktatdehydrogenase-Freisetzung evaluiert. Die Spezifizierung von Apoptose und Nekrose wurde durch DNA-Fragmentierung mit dem Cell Death Detection ELISA gemessen. Die Zellproliferation wurde nach Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie untersucht. Die Expression der Progesteron-Rezeptoren PR-AB und PR-B sowie des Zellzyklusmediators Cyclin D2 wurde mit Realtime-PCR ermittelt.

Ergebnisse. Hyperoxie induzierte eine signifikante Abnahme der Zellvitalität um 35 %, die mit einem parallelen Anstieg von Zelltod und Apoptose einherging. Darüber hinaus bewirkte die Inkubation in 80 % O₂ eine Abnahme der Proliferation, die sowohl in der Durchflusszytometrie, als auch über eine reduzierte Expression von Cyclin D2 ermittelt wurde. Progesteron erhöhte nicht die Zellvitalität der Astrozyten nach Inkubation in Hyperoxie. Die Progesteronrezeptor-Expression sank nach Exposition in 80 % O₂ signifikant auf 25 % (PR-AB) beziehungsweise 40 % (PR-B) ab. In Normoxie fand eine signifikante 25 %-ige Abnahme der Zellvitalität unter Progesteron statt, die durch RU 486 antagonisiert werden konnte.

Schlussfolgerung. Protektive Effekte von Progesteron konnten in dieser Untersuchung nicht bestätigt werden. Die Hyperoxie-induzierte Abnahme der Rezeptor-Expression ist eine mögliche Ursache dafür.

Abstract

Introduction. The birth of most mammals features a dramatic increase of oxygen while placenta-derived hormones such as β -estradiol and progesterone plummet. In experimental newborn animals, transiently elevated oxygen concentrations cause death of neurons and oligodendrocyte precursors. High oxygen has been associated with cerebral palsy in human preterm infants while progesterone is being used to prevent preterm delivery and investigated as a neuroprotective agent. In this study, we investigated the effects of hyperoxia (80 % O₂) on cultured C8-D1A astrocytes in the presence or absence of progesterone.

Methods. C8-D1A astrocytes were exposed to oxygen levels of 21 % and 80 %, both with and without progesterone (P 10⁻⁵ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁹ M) and RU 486 (10 μ M) for 24 to 72 hours. Methyl tetrazolium metabolism, lactate dehydrogenase release and Cell Death Detection ELISA were used to assess cell survival and damaging mechanisms. Evaluating cell proliferation, astrocytes were labeled with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) and measured by flow cytometry. Realtime PCR analysis detected progesterone-receptor signaling and expression of cyclin D2 and modifications by hyperoxia.

Results. Hyperoxia decreased metabolism of MTT by 35 %, increased significantly the release of LDH, reduced CFSE-assessed cell proliferation by 55 % and downregulated Cyclin D2 expression. Progesterone at concentrations ranging from 10⁻⁹ M to 10⁻⁵ M did not affect any of these hyperoxia-mediated indicators of cell death or malfunctioning. Realtime PCR analysis showed that hyperoxia caused downregulation of the progesterone receptors PR-AB by about 25 % and PR-B by about 40 %. In normoxia progesterone decreased cell viability by 25 %, RU 486 antagonized this effect significantly.

Conclusion. In this study we could not show a protective effect of progesterone regarding hyperoxia-induced cell damage which might be linked to receptor-downregulation in hyperoxia.

1 Einleitung

1.1 Frühgeborene

Die Geburt eines unreifen Kindes ist auch heute noch ein ausschlaggebender Faktor für die Mortalität Neugeborener [1]. Frühgeburt bezeichnet das Ende einer Schwangerschaft vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche. Das frühe Ende einer Schwangerschaft ist zu 28 % der Grund für den Tod Neugeborener, die nicht an angeborenen Malformationen leiden [2]. Sehr kleine Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1.500 g gelten als *very low birth weight infants*, extrem leichte Frühgeborene (Geburtsgewicht unter 1.000 g) werden als *extreme low birth infants* bezeichnet. Unter den Frühgeborenen sind männliche Neonaten häufiger als weibliche [3]. In Deutschland tritt das frühe Ende einer Schwangerschaft aktuell mit einer Häufigkeit von 6,5 % auf [4]. Die höchsten Frühgeborenenraten sind weltweit in Nordamerika (10.6 %) und Afrika (11.9 %) zu verzeichnen [5]. Eine Zunahme der Frühgeburtenrate ist zu beobachten, was mit der steigenden Zahl induzierter früher Geburten aufgrund maternaler Komplikationen im Zusammenhang steht. Aber auch der technische Fortschritt spielt eine Rolle: Die Reproduktionsmedizin und die damit verbundenen Mehrlingsschwangerschaften tragen zu einer steigenden Frühgeborenenrate bei [6].

Es gibt viele Einflussfaktoren, die zum Risiko einer Frühgeburt beitragen. Besonders junge Mütter (jünger als 20 Jahre) und Erstgebärende über 40 Jahren weisen ein erhöhtes Risiko auf [7] [8]. Aber auch andere maternale Merkmale wie vorausgegangene Totgeburten, Schwangerschaftsabbrüche und Aborte haben einen Einfluss auf die Frühgeborenenrate [9]. In vielen Industrieländern ist es heute Konsens, ab der vollendeten 24. Schwangerschaftswoche das Kind mit intensivmedizinischen Maßnahmen zu unterstützen. Es gibt jedoch einen undefinierten Zeitraum, in dem der Wunsch der Eltern maßgeblich ist. In Deutschland ist dieser zwischen der 22. und 23. Woche [10].

Die Möglichkeiten und Fortschritte der neonatologischen Intensivmedizin und die damit verbundenen gestiegenen Überlebensraten sind auch mit einer zunehmenden Zahl von Folgeerkrankungen verknüpft. Dazu zählen neurologische Schäden, Hör- und Sehstörungen sowie chronische Erkrankungen der Lunge [11]. Die mit einer Frühgeburt verbundene Morbidität ist oft lebenslang persistierend und verursacht bei Betroffenen psycho-emotionale und physische Leiden [12]. Die Weiterentwicklungen in der Neonato-

logie haben die Mortalitätsrate deutlich verbessert. Dennoch bleibt die Betreuung Frühgeborener eine beachtenswerte medizinische und ökonomische Herausforderung [13].

1.2 Intrauterine Hypoxie und postpartale Hyperoxie

Das Frühgeborene erfährt mit seiner Geburt eine, zu diesem Zeitpunkt unphysiologische, Zunahme des Sauerstoffpartialdrucks. Unreife Kinder sind besonders empfindlich gegenüber den toxischen Eigenschaften von Sauerstoff, da sie an die intrauterinen geringen Sauerstoffkonzentrationen gewohnt sind. Der Beginn der Lungenatmung bewirkt einen Anstieg des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks von 27 – 35 mmHg auf 60 – 100 mmHg, was zu einer Erhöhung der Sauerstoffspannung im Gewebe führt [14]. Der postnatal herrschende Sauerstoffgehalt der Raumluft bedeutet also schon eine relative Hyperoxie für den unreifen Organismus, der an intrauterine Bedingungen angepasst ist. Darüber hinaus werden in der neonatologischen Intensivmedizin häufig supraphysiologische Sauerstoffkonzentrationen zur Behandlung respiratorischer und zirkulatorischer Instabilität eingesetzt.

1.3 Organschäden bei Frühgeborenen durch Sauerstoff

1.3.1 Sauerstoff als Therapeutikum

Die optimale Einstellung des Sauerstoffpartialdruckes, zum Beispiel während einer Reanimationssituation, ist von besonderer Bedeutung. Es gibt Hinweise, dass Hypoxie zu Organschäden führt, aber es gibt auch immer mehr Indizien, dass das Outcome Frühgeborener durch den Einsatz hoher Sauerstoffkonzentrationen verschlechtert werden könnte. Unter Anderem konnte die Forschungsgruppe um Gaute Dohlen (2005) zeigen, dass oxidativer Stress durch die Zufuhr hoher Sauerstoffkonzentrationen eine Entzündungsreaktion im Gehirn auslösen kann. Dafür wurden Mäuse zunächst zwei Stunden 4% Sauerstoff ausgesetzt und anschließend entweder mit 21% oder 100% Sauerstoff reoxygeniert. Dabei wurde unter 100% Sauerstoff eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B festgestellt, welcher ein bedeutender Regulator der Immunantwort ist und somit für ein Entzündungsgeschehen im Gehirn steht [15]. Ähnlich bedeutende Ergebnisse konnten Fabian et al. (2008) am Tiermodell der Ratte erlangen. Sieben

Tage alte Ratten wurden nach einseitigem Verschluss der Arteria carotis mit supra- oder physiologischer Sauerstoffkonzentration reanimiert. Dabei wurde eine Abnahme der zerebralen Durchblutung des ischämischen Kortex bei den Tieren festgestellt, denen 100 % Sauerstoff zugeführt wurde [16]. Aufgrund dieser Erkenntnisse empfiehlt die *American Heart Association* in den Guidelines von 2010 für reife Neugeborene und Frühgeborene den Einsatz von Raumluft (21 % O₂) beziehungsweise eine regulierbare Sauerstoffzufuhr über einen Sauerstoff-Raumluft-Mischer zur Reanimation [17].

Zu bedenken ist, dass den dargelegten Fakten andere Studien gegenüber stehen. Eine in vivo Studie mit Ferkeln untersuchte die Auswirkung der Reoxygenierung nach einem experimentell etablierten hypoxisch-ischämischen Ereignis. Das Outcome der Ferkel, die mit 100 % Sauerstoff reoxygeniert wurden, zeigte einen besseren mittleren arteriellen Druck und Perfusion zerebraler Gefäße, als jene von bei Raumluft reanimierten Tieren [18].

Klinische Studien konnten zeigen, dass die Reanimation asphyktischer Neugeborener mit 100 % Sauerstoff im Vergleich zur Anwendung von Raumluft zu Gewebeschäden am Myokard und den Nieren führt [19]. Es ist bereits erforscht, dass hohe Sauerstoffkonzentrationen einen toxischen Effekt auf die unreife Lunge, Retina und Neuronen haben können, worauf im Folgenden eingegangen wird. Die exakten Schädigungsmechanismen, das Zusammenführen sowie die weitere Vertiefung der bisher erlangten Erkenntnisse sind Gegenstand aktueller Forschung.

1.3.2 Neurokognitive Entwicklung von Frühgeborenen

Neurologische Beeinträchtigungen, insbesondere motorische und kognitive Defizite, kommen bei ehemals frühgeborenen Kindern häufig vor [20]. Sehr kleine Frühgeborene weisen einen signifikant niedrigeren Intelligenzquotienten und damit verbunden niedrigere akademische Leistungen auf [21]. Die Frühgeburtlichkeit konnte auch als einer der Hauptgründe für neurologische und psychiatrische Krankheiten wie Schizophrenie und Autismus bei Kindern und Jugendlichen eruiert werden [22] [23]. Einige Studien belegen den Zusammenhang zwischen intensiver Sauerstofftherapie und der Pathogenese neurokognitiver Morbiditäten. Das Risiko für die Entwicklung motorischer Behinderungen bei Frühgeborenen, zum Beispiel durch eine infantile Zerebralparese, wird durch eine Beatmung mit Hypokapnie ($P_{CO_2} < 35$ mmHg) und Hyperoxie ($P_{O_2} > 60$ mmHg) zwei-

bis dreifach erhöht [24]. Im experimentellen Tiermodell gibt es Hinweise, dass die erhöhte Zufuhr von Sauerstoff zu einer Aktivierung des apoptotischen Zelltods bei infantilen Ratten führt, wobei besonders Nucleus Caudatus, Cortex, die weiße Substanz und periventriculäre Regionen betroffen sind [25]. In bildgebenden Studien konnte bei ehemals Frühgeborenen ein kleineres Hirnvolumen und eine signifikante Vergrößerung der Ventrikel ermittelt werden [26]. Diese Veränderungen legen nahe, dass sowohl der Verlust von Neuronen, als auch eine globale Veränderung des Gehirns mit den neurologischen Morbiditäten von Frühgeborenen verbunden sind und diese wiederum möglicherweise im Zusammenhang mit der häufig eingesetzten Sauerstofftherapie stehen. Die Defizite in der kognitiven Entwicklung können im Verlauf der Kindheit verbessert werden. Möglicherweise kann sich das entwickelnde Gehirn erholen und Verletzungen kompensieren [27]. Eine Erklärung dafür ist im dynamischen Prozess der Gehirnentwicklung begründet. Die Synaptogenese, die Ausbildung synaptischer Kontakte, entwickelt sich zum Beispiel vom zweiten Schwangerschaftstrimester bis in das zweite Lebensjahr [28].

1.3.3 Sauerstoffbedingte Schäden der Lunge

Die Unreife des Atemwegssystems bei Frühgeborenen macht häufig den Einsatz einer atemunterstützenden Therapie mit künstlicher Beatmung und Sauerstoffzufuhr notwendig. Dabei haben gerade Frühgeborene ein erhöhtes Risiko für eine toxische Wirkung des Sauerstoffs in den Lungen, die vermutlich in der Unreife des Organs und dem unreifen antioxidativen System begründet ist [29]. Eine chronische Folgeerkrankung der Lunge bei ehemals Frühgeborenen ist die bronchopulmonale Dysplasie. Die Prävalenz dieser Krankheit ist eng mit der Entwicklungsreife des Kindes bei Geburt verknüpft. 67,3 % der Neonaten, die in der 22. - 25. Schwangerschaftswoche geboren werden, entwickeln eine bronchopulmonale Dysplasie, während nur 36,6 % unter den in der 26. - 30. Woche Geborenen betroffen sind [30]. Diese chronische Lungenerkrankung ist bedeutend für die Morbidität und Mortalität Frühgeborener. Noch als junge Erwachsene leiden Erkrankte unter einer abnormalen Lungenfunktion [31]. Die bronchopulmonale Dysplasie wird durch eine langanhaltende Beatmung und Zufuhr von hohen Sauerstoffkonzentrationen verursacht. Die Fortschritte in der Behandlung frühgeborener Kinder haben das Muster des Krankheitsbildes verändert. Die extrem unreifen Lungen erleiden ein Volumentrauma durch die künstliche Beatmung, die supraphysiologische Sauerstoffzufuhr bewirkt eine Inflammation. Die Frühgeburt und der damit verbundene Beginn

des Gasaustauschs unterbricht die normale Entwicklung der Alveolen und die Vaskularisierung, welche erst in der 36. Schwangerschaftswoche abgeschlossen ist [32]. Die postnatale Gabe von Surfactant konnte die Mortalität von sehr kleinen Frühgeborenen um 30 % senken, von Kindern mit bronchopulmonaler Dysplasie um bis zu 40 % [33].

1.3.4 Die Frühgeborenenretinopathie

Die Entwicklung des visuellen Systems ist bei Frühgeborenen aber auch bei reifen Neugeborenen, noch nicht abgeschlossen. Sowohl die betreffenden Hirnareale als auch die optischen Komponenten unterliegen nach der Geburt einem Reifungsprozess. Frühgeborene, die während eines sehr frühen Stadiums der visuell-neurologischen Entwicklung geboren werden, haben ein besonders hohes Risiko für bleibende Beeinträchtigungen der Sehfunktion. Es gibt Hinweise, dass die okulomotorischen Störungen auf einem Defizit an Ernährungsstoffen, die unter physiologischen intrauterinen Bedingungen durch die plazentare Versorgung gewährleistet werden, beruhen. Dazu zählt zum Beispiel die Docosahexaensäure, die besonders wichtig für die Zellreifung des Gehirns und der Retina ist [34]. Frühgeborene, die nicht unter einer Frühgeborenenretinopathie leiden, zeigen signifikant häufiger Anomalien der Refraktionsfähigkeit des Auges (Myopie und Hyperopie) im Vergleich zu Reifgeborenen [35].

Die steigenden Überlebensraten sehr kleiner Frühgeborener machen die Frühgeborenenretinopathie zum Hauptgrund für Erblindung in der Kindheit. Denn die Frühgeborenenretinopathie betrifft besonders kleine Frühgeborene, die einer ausgedehnten Sauerstofftherapie ausgesetzt waren. Der Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks durch den Einsatz der Atmung und eventueller therapeutischer Sauerstoffzufuhr bewirkt in der unreifen Retina eine Konstriktion der Gefäße und Schädigung des Epithels. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass auf die hohen Sauerstoffkonzentrationen eine Vasoproliferation der retinalen Gefäße folgt [36]. Dabei spielen reaktive Sauerstoffspezies, die bei hohem Sauerstoffpartialdruck in der Retina produziert werden, eine entscheidende Rolle. Eine zurückhaltende Zufuhr von Sauerstoff kann das Risiko für die Entstehung der Frühgeborenenretinopathie reduzieren. Dies konnte bereits in klinischen Studien bestätigt werden. Ein transkutaner Sauerstoffdruck über 80 mmHg für mehr als 12 Stunden führte zu einer signifikant häufigeren Entwicklung der Frühgeborenenretinopathie [37]. In einer weiteren klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass das Überleben Frühgebo-

rener (< 28. Woche) mit einer durchschnittlichen Sauerstoffsättigung von 70 - 90 % gleich ist zu Kindern mit einer angestrebten Sauerstoffsättigung von 88 - 98 %. Die Inzidenz der Frühgeborenenretinopathie betrug jedoch in der Gruppe der restriktiven Sauerstofftherapie 6 % und 28 % in der Gruppe mit hoher O₂-Sättigung [38].

1.4 Auswirkung von Hyperoxie auf die Zellen des Gehirns

Der dramatische Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks nach der Geburt und der oft notwendige Einsatz von Sauerstoff im Rahmen der neonatologischen Intensivmedizin können eine Hyperoxie im frühgeborenen Kind hervorrufen. Die Auswirkungen von Hyperoxie auf neuronale und nicht-neuronale Zellen des Gehirns ist Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Dieses Interesse besteht durch einen vermuteten Zusammenhang zwischen dem langfristigen neurologischen und neurokognitiven Outcome Frühgeborener und dem therapeutischen Einsatz von Sauerstoff.

1.4.1 In vitro Studien

In vitro erlangte Ergebnisse lassen sich nicht immer direkt auf den Menschen beziehungsweise die Natur übertragen. Trotzdem ist das Durchführen von Experimenten in einer kontrollierten, künstlichen Umgebung ein wichtiger Grundbaustein in der naturwissenschaftlichen Forschung. Vor allem da die Forschung am Menschen und insbesondere am frühgeborenen Kind sehr limitiert ist.

Eine in vitro Studie konnte eine durch Hyperoxie verursachte Zellschädigung der C8-D1A Astrozytenkultur feststellen. Astrozyten, als wichtige nicht-neuronale zerebrale Zellspezies, zeigten eine achtfach erhöhte Aktivität der Caspase-3 im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 24 h Inkubation in 80 % O₂ [39]. Caspase-3 ist ein wichtiges Enzym im Verlauf der Apoptose, welches die Fragmentation der DNA initiiert [40]. Oligodendrozyten spielen eine entscheidende Rolle in der Entstehung der periventrikulären Leukomalazie. Die Zellreihe OLN-93 der Oligodendrozyten zeigte eine konstant abnehmende Zellvitalität im Methyl Tetrazolium-Metabolisierungstest in einem Zeitraum von 24 bis 96 h. Damit ging eine parallele Zunahme des apoptotischen Zelltods einher. Nach 48 h waren nur noch 60 % der untersuchten Zellen vital, nach 96 h erweisen sich nahezu alle Zellen avital [41]. Untersuchungen durch in vitro Studien liefern somit Hinweise

für eine Hyperoxie-bedingte Schädigung zerebraler Zellen. Wahrscheinlich ist, dass die reduzierte Zellvitalität auf apoptotische Prozesse zurückzuführen ist.

1.4.2 In vivo Studien

In vivo Untersuchungen dienen unter anderem der Überprüfung der in vitro erzielten Resultate. Sie lassen möglicherweise mehr Rückschlüsse auf Prozesse im humanen Organismus zu. Nicht immer stimmen die Ergebnisse von in vivo und in vitro Studien überein, doch viele Resultate zur Auswirkung von Hyperoxie auf die Zellen des Gehirns lassen sich in vivo reproduzieren.

Primäre Oligodendrozyten der neugeborenen Ratte zeigen eine zeitabhängige Zunahme des Zelltodes unter 80 % O₂. Nach 12 h Inkubation reduzierte sich die Zahl überlebender Zellen auf 25 %. Nach 24 h in Hyperoxie waren nahezu alle Zellen apoptotisch [42]. Besonders unreife Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen reagierten mit einer signifikanten Abnahme der Zellvitalität im Methyl-Tetrazolium-Metabolisierungs-Test [41]. Hyperoxie bewirkte darüber hinaus eine verzögerte Reifung der weißen Substanz bei neugeborenen Mäusen: Nach 48 h Inkubation in 80 % O₂ zeigte sich eine signifikante Abnahme um 56,4 % der Expression von Myelin basic protein (MBP). Dieses Myelin-Protein markiert den Beginn der Myelinisierung. Neben Hypoxie könnte möglicherweise auch Hyperoxie eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Störungen der weißen Substanz darstellen.

In vivo Versuche konnten auch an Neuronen einen neurotoxischen Effekt von Hyperoxie zeigen. Die Inkubation von Rattenjungen in 80 % O₂ für 24 h führte zu einer histologisch eruierbaren Zelldegeneration im Nucleus caudatus, Nucleus accumbens und im frontalen Kortex. Die apoptotische Neurodegeneration konnte außerdem mittels erhöhter Caspase-3-Aktivität nachgewiesen werden [25]. In Thalamus, Striatum und Cortex cingularis ist bereits nach 2 h Hyperoxie eine angestiegene Expression des Zytokins Il-1 β nachweisbar. Ebenso ist das für die Expression von IL-18 im laterodorsalen Thalamus, Striatum und in der Regio retrosplenialis nachgewiesen. Der Anstieg dieser proinflammatorischen Zytokine ist mit den Prozessen des Zelltodes verbunden [43].

1.5 C8-D1A Astrozyten

Der Astrozyt, die Sternzelle, trägt seinen Namen auf Grund der vielen Zellausläufer, die ihm ein sternförmiges Aussehen verleihen. Astrozyten zählen zu den Gliazellen. Diese kommen in einem Verhältnis von 9:1 im Vergleich zu Neuronen vor und stellen somit die größte Zellgruppe im Gehirn dar [44]. Die Astroglia werden durch ein spezielles Protein im Intermediärfilament im Zytoplasma, dem sauren Gliafaserprotein (glial fibrillary acid protein GFAP), identifiziert. Astrozyten sind die wichtigsten nicht-neuronalen Zellen im menschlichen Gehirn. Zu ihren Aufgaben zählen die Unterstützung, der Erhalt und die Modulation von Neuronen, mit welchen sie über Zell-Zell Kontakte verbunden sind. Sie agieren somit dynamisch als signalgebende Elemente, die benachbarte Neurone modulieren [45]. Wahrscheinlich ist, dass die Fasern der Astrogliazellen ein Gerüst für sich entwickelnde Neuronen im Gehirn darstellen [46].

Aktuelle Forschungsarbeiten zeigen, dass Gliazellen eine bedeutende Rolle in der Verbindung von endokrinem System und Zentralnervensystem zukommt. Zum einen exprimieren Astrozyten Rezeptoren für Steroidhormone (z.B. Östrogen- und Progesteronrezeptoren), zum anderen nehmen sie aktiv am Metabolismus dieser Hormone teil. Gliazellen synthetisieren außerdem endogen neuroaktive Steroide wie Progesteron. Im Gehirn der Ratte wurde nachgewiesen, dass Astrozyten Progesteron aus Cholesterol über das Cytochrom P 450 scc beziehungsweise aus zirkulierendem Pregnenolon synthetisieren können [47] [48] [49]. Für Astrozyten der Maus konnte sogar eine Art Stammzellfunktion dargestellt werden. Berninger et al. (2007) berichten, dass mit Hilfe des Proteins Neurogenin-2 eine Transformation der Astrozyten zu Neuronen stattfinden kann und somit möglicherweise ein Mechanismus zu Reparaturvorgängen der nicht-proliferierenden Neuronen vorliegen könnte [50].

1.6 Progesteron – ein protektives Agenz?

Der Einsatz von Sauerstoff bei neonatologischen Notfällen ist trotz aller erforschten Nebenwirkungen unerlässlich in lebensbedrohlichen Situationen. Daher ist die Suche nach protektiven Substanzen, die die Sauerstoff-vermittelte Toxizität und apoptotische Degeneration reduziert oder verhindert, von großer Wichtigkeit. Dass 17- β -Estradiol eine bedeutende Rolle bei zerebralen Regulationsprozessen spielt, wurde am Gehirn der

Ratte nachgewiesen [51]. Huppmann et al. (2008) konnten zeigen, dass C8-D1A Astrozyten durch das Hormon 17- β -Estradiol vor Hyperoxie-vermittelter Apoptose geschützt werden [39]. Weiterhin kann festgehalten werden, dass 17- β -Estradiol ebenso einen protektiven Effekt auf die Oligodendrozyten Zelllinie OLN-93 hat. Die 24-stündige Inkubation der Zellen in Hyperoxie löste eine Verdopplung der Caspase-3-Aktivität aus. Unter Zugabe von 17- β -Estradiol war die Caspase-3-Aktivität um 30 % rückläufig. Darüber hinaus zeigte sich ein protektiver Effekt in vivo. Die Vorbehandlung von Rattenjungen per intraperitonealer 17- β -Estradiol-Injektion führte zu einer abgemilderten Schädigung der weißen Substanz nach 24 h 80 % O₂ [42]. Auf dieser Erkenntnis stützt sich die Vermutung, dass Progesteron einen gleichermaßen protektiven Effekt auf Astrozyten haben könnte. Das wird in dieser Arbeit untersucht.

Die plazentare Versorgung mit Progesteron und Östrogen wird für Frühgeborene zu einem unphysiologischen Zeitpunkt rapide abgebrochen. Daher war die Substitution des Hormons Gegenstand klinischer Studien. In einer sechswöchigen randomisierten klinischen Studie wurde der Effekt postnataler Zufuhr von Östrogen und Progesteron in sehr kleinen und extrem kleinen Frühgeborenen untersucht. Unter der Behandlung wurde die Tendenz zu einer verbesserten Knochenmineralisierung und eine geringere Inzidenz von chronischen Lungenerkrankungen festgestellt [52] [53]. Ein Follow-up der Hormon-substituierten Kinder nach 15 Monaten offenbarte eine tendenziell verbesserte neurologische Entwicklung der behandelten Gruppe [54].

Auch im Rahmen der Alzheimerforschung ist Progesteron als neuroendokrin aktive Substanz im Fokus der Forschung. Für den Metaboliten des Progesteron, Allopregnenolon, wurde ein fördernder Effekt auf die Proliferation von humanen neuronalen Stammzellen festgestellt. Damit geht die vermehrte Expression von promitotischen Genen, zum Beispiel ein achtfacher Anstieg von Cyclin E, welches den Zellzyklus beeinflusst, einher [55]. Darüber hinaus konnte für Progesteron und Allopregnenolon eine protektive Wirkung bei traumatischer Hirnverletzung ermittelt werden. Die Entwicklung des Gedächtnisses nach bilateraler Verletzung des präfrontalen Kortex bei Ratten verbesserte sich signifikant nach Progesteron- und Allopregnenolon-Injektionen. Außerdem zeigte sich nach einigen Tagen eine Abnahme des Zelltods im Thalamus nach Injektion von Progesteron [56]. Progesteron fördert die Expression des Myelin Basic Protein (MBP) im Zerebellum der Ratte und Maus, in Gegenwart des Antagonisten RU 486 (Mifepriston) wird dieser Effekt wieder aufgehoben [57]. Eine gleichermaßen antagonisierende

Wirkung durch RU 486 konnte bei Oligodendrozyten demonstriert werden, die in Gegenwart von Progesteron vermehrt proliferierten [58]. Zusammenfassend zeigen viele Forschungserkenntnisse einen möglicherweise protektiven Nutzen von Progesteron auf zerebrale Zellen. Diese Erkenntnisse dienen als Arbeitshypothese für die vorliegende Abhandlung im Hinblick auf die neonatologische Hyperoxie-Problematik.

1.7 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Effekte von Hyperoxie (80 % O₂) auf die C8-D1A Astrozytenzellkultur zu untersuchen und zu differenzieren. Die C8-D1A Astrozyten dienen als Modell für proliferierende nicht-neuronale Zellen. Ein Schwerpunkt lag auf der Analyse Hyperoxie-vermittelter Schädigungsmechanismen. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob es sich bei Hyperoxie-bedingter Zellschädigung um apoptotische beziehungsweise nekrotische Prozesse handelt. Außerdem wurde eine mögliche Auswirkung hoher Sauerstoffkonzentrationen auf das Proliferationsverhalten der Astrozytenkultur erforscht.

Weiterhin sollte dargelegt werden, ob Progesteron (2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Complex) als ein protektives Agens gegen Hyperoxie-induzierte Zellschädigung in der hier untersuchten Zellreihe wirksam ist. Außerdem wurde die Auswirkung des Progesteronantagonisten Mifepriston (RU 486) auf die Effekte von Progesteron bearbeitet. Im Verlauf der experimentellen Arbeit entstand die Frage, ob die Gegenwart von Progesteron einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der C8-D1A Astrozytenkultur hat.

2 Material und Methoden

Zur Übersicht werden die verwendeten Geräte und Materialien im Folgenden tabellarisch aufgeführt.

2.1 Geräte

In den beschriebenen Versuchen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 1 dokumentierten Geräte verwendet.

2.2 Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien, biologisches Material und Puffer sind in den Tabellen 2, 3 und 4 aufgeführt.

2.2.1 Biologisches Material

2.2.2 Puffer

2.2.3 Oligonukleotide

In der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 5 dargestellten Primer und Sonden der Firmen TIB MOLBIOL und BioTeZ (Berlin Buch GmbH, Deutschland) verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Biofuge fresco	Heraeus Instruments. Hanau, D ^a
Biometra PP 3000(Elektrophorese)	Biometra. Göttingen, D
Biometra UV Solo	Biometra. Göttingen, D
Biometra Mitsubishi Printer	Biometra. Göttingen, D
Einmalfilter, 0,2 µm Celluloseacetat	Whatman. Maidstone, UK ^b
Easypet Pipettierhilfe	Eppendorf AG. Hamburg, D
Einmal-Injektionskanülen 0,9 x 70 mm	Braun, Melsungen. D
Einmalpipetten 1 - 2 - 5 - 10 - 25 ml	Falcon. Lincoln Park, USA ^c
Einmalröhrchen 5 - 15 - 50 ml	Falcon. Lincoln Park, USA
Einmalspritzen 10 - 20 ml	Braun. Melsungen, D
Elisa Reader: Microplate Reader	Bio-Rad Laboratories. Hercules, USA
Einmalfilter, steril	Whatman. Maidstone, UK
FACS Canto II Durchflusszytometer	BD Biosciences USA
Finnpipette	Thermo Labsystems. Egelsbach, D
Hera-Cell Brutschrank	Heraeus Instruments. Hanau, D
Heizblock	Eppendorf AG. Hamburg, D
Kulturflaschen 25 - 75 - 150 cm ²	Becton Dickinson Labware. Franklin Lakes, USA
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf AG. Hamburg, D
Mikrotiterplatte: 96 Well und 6 Well	Becton Dickinson Labware. Franklin Lakes, USA
Mikroskop Olympus, Modell CK 2	Olympus. Tokio, Japan
Neubauer Improved Zählkammer	Laboroptik GmbH. Friedrichsdorf, D
Olympus Camedia Digital Camera; C-3030	Olympus Europa GmbH, Hamburg. D
Pipettenspitzen	Eppendorf AG. Hamburg, D
Reagenzien Reservoir 50 ml	Costar Corning Incorporated. Corning, USA
Spectrophotometer NO-100 Nanodrop	Thermo Scientific, Wilmington, USA
StepOnePlus RealTime-PCR-System Cyler	Applied Biosystems. Carlsbad, USA
Sterile Werkbank, HB 2448	Heraeus Instruments. Hanau, D
Vortex Genie 2	Scientific Industries. New York, USA
Waage	peqLab Biotechnologie. Erlangen, D
Zellschaber, 2-position blade	Sarstedt. Newton, USA
Zentrifuge: Modell Minifuge GL	Heraeus Instruments. Hanau, D
Zentrifuge: Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments. Hanau, D

^aD steht für Deutschland^bUK steht für United Kingdom^cUSA steht für United States of America

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarosegel 2 %	Life Technologies. Paisley, UK
Aktivkohle (Activated Charcoal)	Sigma Aldrich. St. Louis, USA
Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi. Bad Homburg, D
Cell Trace Cell Proliferation Kit (Carboxyfluorescein diacetate succinimidylester)	Molecular Probes. Eugene, USA
Cell Death Detection ELISA	Roche Diagnostics. Mannheim, D
Chloroform	Merck. Darmstadt, D
Chlorwasserstoff	Merck. Darmstadt, D
Cytotoxicity Detection Kit	Roche Diagnostics. Mannheim, D
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Promega. Mannheim, D
Dextran 0,05 %	Sigma Aldrich. St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich. St. Louis, USA
DNase	Qiagen. Hilden, D
DNA-Längenstandard	Fermentas. St. Leon-Rot, D
DreamTaq™ DNA-Polymerase	Fermentas. St. Leon-Rot, D
Dulbecco's Medium	Biochrome AG. Berlin, D
Ethidiumbromid	Roth. Karlsruhe, D
Ethanol Emsure	Merck KGaA. Darmstadt, D
Hanks Salt Solution L2050	Biochrom. Berlin, D
InviTrap Spin Universal RNA Mini Kit	Strattec Molecular. Berlin, D
Isopropanol	Merck. Darmstadt, D
KAPA™ PROBE FAST qPCR Kit	KAPA Biosystems. Boston, USA
L-Glutamin (200mM), K-0283	Biochrom. Berlin, D
Methylthiazol Tetrazolium Formazan	Sigma Aldrich. St. Louis, USA
Mifepristone RU 486 100mg	Sigma Aldrich. St. Louis, USA
M-MLV RT Reaktionspuffer	Promega. Mannheim, D
PeqGold RNA-Pure	PeqLab. Erlangen, D
Phosphatgebufferte Salzlösung mit Calcium und Magnesium	Biochrom. Berlin, D
Progesteron – wasserlösliches Pulver	Sigma Aldrich. St. Louis, USA
Reverse Transkriptase	Promega. Mannheim, D
RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot mit 2,0 g/l NaHCO ₃	Biochrom. Berlin, D
RNasin® RNase Inhibitor	Promega. Mannheim, D
ROX Reference Dye	Roche Diagnostics. Mannheim, D
Sodium Dodecyl Sulfat L-4509	Sigma Aldrich. St. Louis, USA
Triton X-100	Sigma Aldrich. St. Louis, USA
Trypanblau(0,4%), T-8154	Sigma Aldrich. St. Louis, USA
Zufallsoligonukleotide (Random Hexamere)	Promega. Mannheim, D

Tabelle 3: Biologisches Material

C8-D1A astrocytic type I clone	American Type Culture Collection
GFAP positiv, Zerebellum der Maus	Manassas, USA
Fetales Kälberserum S-0115	Biochrom. Berlin, D

Tabelle 4: Puffer

PC-Puffer	192 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ + 8 ml 0,1 M Zitronensäure (pH 7,8)
TAE-Puffer	10xTAE Tris-Acetat-EDTA (pH 7,7) aus 10 mM EDTA (pH 8,0) + 2,3% Essigsäure + 0,5 M Tris
TBE-Puffer	54 g Tris Base + 27.5 g Borsäure + 4.15 g EDTA in 500 ml H ₂ O

Tabelle 5: Primer und Sonden

PR AB I Sense Primer	5'CAg Tgg Tgg ATT TCA TCC ATg
PR AB I Antisense Primer	5'CTT CCA gAG ggT Agg Tg
PR B I Sense Primer	5'ggA ggC AgA AAT TCC AgA CC
PR B I Antisense Primer	5'gAC AAC AAC CCT TTg gTA gC
PR AB II Sense Primer	5'TCC gCT TCT AAA gAg CAA ACCT 3'
PR AB II Antisense Primer	5'Agg AgC AgA AAA CCg TgA ATCT 3'
PR AB II Sonde	5'FAM TgT CAC TCT ggT CCC AAA TAMRA 3'
PR B II Sense Primer	5'CTC ATA ggg AAg gAg gCA gAAA 3'
PR B II Antisense Primer	5'ggA ggg AgT CAA CAA CgA gTC TAA 3'
PR B II Sonde	5'FAM AgC AgA CTC TTA gAC AgT gT TAMRA 3'
Cyclin D2 Sense Primer	5' CgT ACA TgC gCA ggA TggT 3'
Cyclin D2 Antisense Primer	5' AAT TCA Tgg CCA gAg gAA AgAC 3'
Cyclin D2 Sonde	5' FAM Tgg ATg CTA gAg gTC TgT gA TAMRA 3'
mHPRT Sense Primer	5'ATC ATT ATg CCg Agg ATT Tgg AA 3'
mHPRT Antisense Primer	5'TTg AgC ACA CAg Agg gCCA 3'
mHPRT Sonde	5'FAM-Tgg ACA ggA CTg AAA gAC TTg CTC gAg ATg TAMRA 3'
β-Aktin Sense Primer	5'CCC TAA ggC CAA CCg TgA AAA AgA Tg 3'
β-Aktin Antisense Primer	5'gAA CCg CTC gTT gCC AAT AgT GATg 3'

2.3 Zellkultur

2.3.1 C8-D1A Astrozyten

Die C8-D1A Astrozytenzelllinie (astrocytic type I clone, GFAP positive) aus dem Zerebellum der Maus stammt aus der American Type Culture Collection [59]. Die Zellkultur wurde in unbeschichteten 75 und 150 cm² Kulturflaschen kultiviert. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Biochrome AG, Berlin), das mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS; Sigma, St. Louis, USA) und 1 % Glutamin (Biochrome AG) versetzt wurde, diente als Kultivierungsmedium. Die Astrozytenzellkultur wurde konstant bei 37 °C, 5 % Kohlendioxid und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator (Water-Jacketed-Incubator; Forma Scientific Incorporation, USA) kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.3.2 Phenolrot-freies RPMI 1640 Medium und kohlefiltriertes fetales Kälberserum

Um die Effekte von Progesteron (Sigma Aldrich) auf Astrozyten zu untersuchen, wurde die Zellkultur in Phenolrot-freies Medium (RPMI Biochrome) – mit 10 % kohlefiltriertem Kälberserum (Biochrom) und 2 % L-Glutamin (Biochrom) – überführt und einmal passagiert [60]. Phenolrot kann mit den nachstehend beschriebenen photometrischen Messungen interferieren und weiterhin konnte somit eine Interaktion von Hormonen im fetalen Kälberserum mit dem zu untersuchenden Progesteron weitestgehend ausgeschlossen werden. Um mögliche Verunreinigungen im fetalen Kälberserum zu absorbieren, wurde zunächst eine Kohlefiltration mit Aktivkohle durchgeführt. Eine Mischung aus 0,5 g Kohle (0,5 % Sigma Aldrich) und 0,05 g Dextran (0,05 % Sigma Aldrich) wurde in 100 ml Natriumchlorid 0,9 % hergestellt [61]. Die Suspension wurde für 24 h bei -8 °C gekühlt. Anschließend wurden 5 ml der Lösung mit 100 ml fetalem Kälberserum für 45 Minuten inkubiert. Zur Hitze-Inaktivierung wurde dieser Schritt wiederholt. Die Lösung wurde für 10 Minuten bei 500 Umdrehungen zentrifugiert und im Anschluss der Überstand mit einem sterilen Filter (Whatman) filtriert. Das hergestellte kohlefiltrierte Serum wurde bei -20 °C stabil gelagert.

2.3.3 Passagieren und Mediumwechsel

Das Passagieren und der Wechsel des Zellkulturmediums fanden unter einer sterilen Werkbank (Laminar-Flow-Bench, Heraeus) statt. Alle vier bis fünf Tage wurden die Zellen bei ausreichender Konfluenz mit einem Schaber von der Zellkulturflasche abgelöst. Die im Medium abgelösten Zellen wurden in einem sterilen 50 ml Falcon Röhrchen (BD Biosciences) bei 22° C für fünf Minuten bei 1.000 Umdrehungen zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in neuem Medium aufgenommen.

2.3.4 Zelldichtebestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die C8-D1A Astrozyten aus den Kulturflaschen abgeschabt und passagiert. Um eine möglichst exakte Bestimmung der Zellzahl zu erreichen, wurde eine Suspension aus 10 µl der zu untersuchenden Zellsuspension und 90 µl Trypanblau (Sigma Aldrich) hergestellt. Von dieser Lösung wurden 10 µl in eine Neubauer Improved Zählkammer aufgegeben. Die Markierung der toten Zellen durch Trypanblau, welches an zytosolische Proteine bindet, ermöglichte eine Unterscheidung zu den vitalen farblosen Zellen. Je 16 Außenfelder der Neubauer Improved Zählkammer wurden ausgezählt, ein Mittelwert und die mittlere Dichte in einem Milliliter der Suspension ermittelt.

2.3.5 Progesteron und RU 486

Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurde ein Stock des wasserlöslichen Progesterons (Sigma Aldrich) angelegt. Dafür wurde eine in Aqua gelöste Stockkonzentration von 1 mM gewählt, die vor Versuchsbeginn auf die zu untersuchenden Konzentrationen 10^{-5} M, 10^{-7} M und 10^{-9} M verdünnt wurde. Weiterhin wurde ein Stock des Progesteronantagonisten Mifepriston (RU 486, Sigma Aldrich) angefertigt. Die Konzentration betrug 10 mM, gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO). Bei Durchführung eines Versuchs wurde jeweils ein Aliquot bei Raumtemperatur aufgetaut und die Arbeitskonzentration von 10 µM hergestellt. Beide Stocklösungen wurden bei -20 °C gelagert.

2.3.6 Hyperoxie

Die nachfolgend dargelegten Versuche wurden an C8-D1A Astrozyten in 96 Well Platten oder 6 Well Platten nach 24 h Adhärenz in Normoxie (21 % O₂) vorgenommen. Es folgte die Exposition in Hyperoxie (80 % O₂, 5 % CO₂, 15 % N₂) beziehungsweise in Normoxie (21 % O₂, 5 % CO₂, 15 % N₂) in den jeweils angegebenen Zeiträumen. Die Sauerstoffkonzentration der Hyperoxie wurde gewählt, um den rapiden drei- bis vierfachen Anstieg der Sauerstoffspannung des Gewebes nach der Geburt nachzuahmen. Nach den verschiedenen Inkubationszeiten (24–72 h) mit den zu untersuchenden Agenzien – Progesteron und RU 486 – wurden die Zellen den entsprechenden Untersuchungsmethoden zugeführt.

2.3.7 Zellmorphologie

Die mikroskopische Auswertung der C8-D1A Astrozyten nach Inkubation mit Progesteron in den Konzentrationen 10⁻⁵ M, 10⁻⁷ M und 10⁻⁹ M und dem Progesteronantagonisten RU 486 10 µM erfolgte mit dem Olympus CK 2 Mikroskop. Die fotografische Dokumentation wurde bei einer Vergrößerung von 1:40 mit der Olympus Camedia Digitalkamera C-3030 durchgeführt.

2.4 Zellvitalitätstest

Die Auswirkung der zu untersuchenden Substanzen auf die Zellvitalität der C8-D1A Astrozyten wurde anhand des MTT-Tests (Methyl Tetrazolium Formazan) untersucht. Diese Methode beruht auf der Reduktion des Tetrazoliumsalses 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,3-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu violetten Formazankristallen durch zelluläre Dehydrogenasen. Diese Reduktion kann nur in aktiven Mitochondrien lebender Zellen stattfinden. Die Umwandlung von MTT zu Formazan dient somit als direktes Maß für die Vitalität der Zellen, da die Mitochondrien in beschädigten Zellen den Farbstoff nicht umwandeln können [62].

Für die nachfolgend beschriebenen Tests wurde eine 96-Well Mikrotiterplatte mit C8-D1A Astrozyten bestückt. Dabei wurde eine Zelldichte von 30.000 Astrozyten in 100 µl Medium pro Well gewählt. Die Bestimmung der optimalen Aussaatdichte wurde experimentell ermittelt. Nach 24 h Inkubation, die der Adhärenz der Zellen diente, wurde

der Mediumüberstand abgesaugt und durch 100 μl Suspension mit den zu untersuchenden Agenzien ersetzt. Bezugnehmend auf Wong et al. 2009 wurde für Progesteron eine Konzentrationen von 10^{-7} M gewählt [63]. Um die Auswirkung verschiedener Konzentrationen zu beobachten, wurden zusätzlich Progesteronkonzentrationen von 10^{-5} M und 10^{-9} M untersucht.

RU 486 wurde in einer Konzentration von 10 μM mit Progesteron 10^{-7} M hergestellt [58]. Nach 24, 48 und 72 h Inkubation in Normoxie oder Hyperoxie wurde 5 μl MTT in jedes Well pipettiert. Zuvor wurden 50 μl des Überstandes in jedem Well für den Zytotoxizitäts-Test (LDH Assay) in eine weitere 96-Well Platte überführt. Nach drei Stunden Inkubation bei 37 °C wurde die Reduktion durch das Hinzufügen von 50 μl 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) in Isopropanol und Chlorwasserstoff beendet. Die Absorption wurde nach weiteren 24 h mit dem Microplate Elisa Reader (Biorad) bei einer Wellenlänge von 570 nm und Referenzwellenlängen von 630 nm gemessen. In diesem photometrischen Spektrum wird das Substrat MTT nicht absorbiert. Die Eigenabsorption des Mediums wurde mit einer Blank-Reihe, nur aus Medium bestehend, kontrolliert.

2.5 Laktatdehydrogenase - Test

Zur Differenzierung der Ergebnisse des Zellvitalitätstests wurde die Messung der Laktatdehydrogenase-Freisetzung (LDH-Test) mit dem Cell Cytotoxicity Detection Kit (Roche) durchgeführt. Dieses Verfahren wurde gewählt, um die Zytotoxizität, also die potentiell zellschädigende Eigenschaft der zu untersuchenden Substanzen zu eruieren. Der Test beruht auf der Messung der Aktivität des zytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase, welches von zerstörten Zellen freigegeben wird und als stabiler Marker gilt. Das Enzym reduziert das Tetrazolium Salz INT (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazoliumchlorid) zu Formazan, welches photometrisch quantifiziert werden kann. Die Intensität der Rotfärbung ist proportional zur Anzahl der lysierten Zellen [64]. Der Versuchsaufbau des LDH-Tests wurde parallel zum MTT-Test durchgeführt. Wie vorangehend beschrieben, erfolgte die Aussaat der Zellen auf einer 96-Well Platte, die Zugabe von Progesteron beziehungsweise RU 486 nach 24 h Adhärenz bei Normoxie. Als Positivkontrolle diente das stark zytotoxische Triton X-100 (Sigma). Nach Inkubation der ausgesäten Zellen für weitere 24, 48 oder 72 h mit den zu untersuchenden

Substanzen wurde 50 µl zellfreier Überstand aus jedem Well abpipettiert und korrespondierend in eine neue Mikrotiterplatte überführt. Die verbleibenden 50 µl Zellsuspension wurden zur Durchführung des MTT-Tests verwendet.

Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde eine Suspension aus Katalysator, bestehend aus Diaphorase (Nicotinamidadenindinukleotid NAD⁺), sowie dem Farbstoff – INT und Natriumlaktat – hergestellt. Je 50 µl dieser Lösung wurden auf jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 20 - 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit wurde der Farbumschlag des Formazansalzes photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 600 nm ermittelt. Zur Darstellung der ermittelten Werte wurde folgende Formel angewandt:

$$\text{Zytotoxizität in \%} = \frac{\text{Absorption des Wertes} - \text{Blank}}{\text{Mittelwert(Triton X-100)} - \text{Blank}} \cdot 100$$

2.6 Cell Death Detection ELISA^{plus}

Eine direkte Differenzierung und Quantifizierung von Nekrose und Apoptose wurde mittels Cell Death Detection ELISA^{plus} (Roche) vorgenommen. Dieses Verfahren basiert auf dem Sandwich-Enzym-Immunoassay Prinzip: Monoklonale Antikörper der Maus binden an DNA und Histone der Zellproben. So kann ein spezifischer Nachweis von Nukleosomen als Zeichen einer DNA-Fragmentierung erfolgen [65]. Apoptose wurde über Auswertung des Zelllysats, Nekrose über Analyse des Zellkulturüberstandes nachgewiesen.

Der Aufbau des Experiments erfolgte wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 2.4 , Zellvitalitätstest). Um die Proben auf nekrotische Zellen zu prüfen, wurde 20 µl Überstand aus jedem Well einer 96-Well Platte in eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte überführt. Die verbleibenden 80 µl Überstand wurden abgesaugt und die Zellen anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 1.100 Umdrehungen wurden 20 µl jeder Probe ebenfalls in eine Streptavidin-beschichtete 96-Well Platte überführt. Ab diesem Arbeitsschritt ist das Vorgehen zur Nekrose- und Apoptose-Detektion identisch. Eine Mischung aus Anti-Histon-Biotin (ein Biotin-markierter monoklonaler Antikörper) und Anti-DNA-POD (ein Peroxidase-konjugierter monoklonaler Antikörper) wurde hinzugegeben und die Platten dann zwei Stunden inkubiert. In dieser Zeit bindet der Biotin-markierte Anti-Histon-Antikörper

an die Histonkomponente des Nukleosoms und der entstandene gesamte Komplex an die Streptavidin-Platte. Weiterhin verbindet sich der Peroxidase-markierte DNA-spezifische Antikörper mit den DNA-Komponenten des Nukleosoms. Anschließend wurde die ELISA-Platte dreimal mit Inkubationspuffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Den Proben wurden je 100 µl ABTS (2,2'-Azino-di[3-Ethylbenzthiazolin-Sulfonat]), ein Substrat der Peroxidase, zugegeben. Nach circa 20 Minuten erfolgte eine kolorimetrische Messung der sich entwickelnden grünen Farbe bei 405 nm mit einer Referenzwellenlänge von 490 nm. Für jede Probe wurde der Enrichment Factor ermittelt. Dieser entspricht der Quantität der in das Zytoplasma gelangten Mono- und Oligonukleosomen. Die Hintergrundkontrolle bestand aus Inkubationspuffer, ABTS Lösung und ABTS Stopplösung, die Negativkontrolle entsprach den unbehandelten Zellen [66].

$$\text{Enrichment Factor} = \frac{\text{Absorption der Probe} - \text{Hintergrundkontrolle}}{\text{Negativkontrolle}}$$

2.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein etabliertes optisches Messverfahren, um eine große Anzahl an Zellen (in der vorliegenden Arbeit 10.000 Zellen je Probe) auf verschiedene Parameter zu untersuchen. Die Charakterisierung der Zellen erfolgt anhand eines Laserstrahls, an dem jede Zelle durch einen laminaren Probestrom vorbeigeleitet wird. Durch Lichtstreuung und die Fluoreszenz gekoppelter Fluoreszenzfarbstoffe wird Licht mit charakteristischen Wellenlängen abgegeben. Der Forwardscatter, also die Strahlen, die nach vorn abgelenkt werden, ist ein Maß für die relative Größe der Zellen. Der Sidescatter, zu 90 Grad abgelenktes Streulicht, entspricht dem Maß für die Zellgranularität.

Bei der vorliegenden Abhandlung wurde das FACS Canto II Durchflusszytometer verwendet. Die Datenerfassung erfolgte anhand der FACS Diva Software (BD Biosciences).

2.7.1 Untersuchung der Zellproliferation

Um die Auswirkung der Agenzien Progesteron und RU 486 auf das Proliferationsverhalten der kultivierten C8-D1A Astrozyten zu eruieren, wurde eine Fluoreszenzfärbung der Zellen mit Carbofluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE) vorgenommen. Dieses

farblose Substrat diffundiert in die Zellen, wo Acetatgruppen von intrazellulären Esterasen abgespalten werden. Auf diesem Weg entsteht das fluoreszierende CFSE. Bei der Mitose wird der Farbstoff der Mutterzelle zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen übertragen, also jeweils halbiert. Steigende Proliferation resultiert somit in abnehmender Fluoreszenz [67].

Aus einem bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Stock (5 mM, gelöst in DMSO) wurde direkt vor der Anwendung die Arbeitskonzentration von $5\text{ }\mu\text{M}$ CFSE in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; Biochrom) hergestellt. Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens wurden die Astrozyten zunächst passagiert, gezählt und mit PBS gewaschen. Durch Zentrifugation (fünf Minuten, 1.000 Umdrehungen pro Minute) wurde ein Zellpellet hergestellt, welches mit 5 ml der vorher angewärmten $5\text{ }\mu\text{M}$ CFSE Lösung resuspendiert wurde. Die Konzentration betrug dabei 10^{-6} Zellen/ml. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation der Suspension bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nach wiederholter Zentrifugation und Resuspension in frischem Medium wurden je 200.000 Astrozyten in 1 ml Medium pro Well einer 6-Well Platte ausgesät. Nach 24 h Inkubation der fluoreszenz-markierten Zellen wurde das Medium abpipettiert und durch die beschriebenen Konzentrationen von Progesteron und RU 486 ersetzt. Die Versuchsdauer betrug 24 bis 48 h in Hyperoxie und Normoxie. Pro Versuch wurden vier Proben je untersuchter Konzentration ausgewertet.

Am Tag der durchflusszytometrischen Messung wurden unbehandelte Astrozyten mit CFSE wie bereits beschrieben gefärbt. Diese Probe diente der Markierung der Fluoreszenz-Intensität nicht-proliferierter Astrozyten. Die exponierten Zellen wurden vorsichtig aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte abgelöst, zentrifugiert, in PBS resuspendiert und in FACS Tubes transferiert. Die Messung am Durchflusszytometer erfolgte im FITC Kanal. Um die Zellfraktionen zu sortieren, wurden Analysefenster (Gates) um die Punktwolkendiagramme erstellt. Die Ergebnisse wurden in Streudiagrammen und Histogrammen dargestellt.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Ribonukleinsäure-Isolierung

Der Nachweis der Expression der Progesteronrezeptoren erfolgte auf RNA-Ebene. Die C8-D1A Astrozyten wurden wie bereits beschrieben kultiviert. Der qualitative Nach-

weis der Rezeptorexpression wurde mit den Primerpaaren I geführt. Die zelluläre RNA wurde anhand des InviTrap Spin Universal RNA Mini Kits (Strattec molecular) isoliert. Das weitere Vorgehen ist im Abschnitt 2.8.5 beschrieben. Der quantitative Rezeptornachweis wurde mit den Primerpaaren II durchgeführt (siehe Kapitel 2.8.6).

2.8.2 Ribonukleinsäure-Extraktion

Zur Extraktion der Ribonukleinsäure (RNS) wurde folgendermaßen vorgegangen: Die C8-D1A Astrozytenzellkultur wurde auf einer 6-Well Platte à 200.000 Zellen ausgesät und die bereits beschriebenen Progesteronkonzentrationen nach 24 h Adhärenz hinzugefügt. Nach weiteren 24 h Inkubation in 21 % O₂ bzw. 80 % O₂ wurde das Medium entfernt und 800 µl RNA-Pure (PecLab) in jedes Well pipettiert. Durch Auf- und Abpipettieren erfolgte die gleichmäßige Vermischung; anschließend eine Inkubation bei Raumtemperatur für fünf Minuten. Die Gewinnung der RNS erfolgte durch die Phenol-Chloroform-Extraktion. 160 µl Chloroform (Merck) wurden der Probe hinzugefügt, diese 10 Minuten auf Eis gekühlt und sieben Minuten bei 12.000 Umdrehungen und 4 °C zentrifugiert. Die entstandene obere wässrige Phase mit enthaltener RNS wurde vorsichtig abgenommen und mit der gleichen Menge an eiskaltem Isopropanol (Merck) gemischt. Nach 15 Minuten auf Eis erfolgte wiederum eine Zentrifugation (10 Minuten, 12.000 g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit eiskaltem 75 %-igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (10 Minuten, 12.000 g, 4 °C). Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und die RNS größenabhängig in 20 - 50 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und für drei Minuten im Heizblock bei 55 °C erwärmt. Um Rest-Desoxyribonukleinsäure (DNS) zu entfernen, wurde im Anschluss eine DNase-I-Behandlung durchgeführt. Die Qualität und Quantität der gewonnenen RNS wurde mit dem Nanodrop-Spektrophotometer überprüft.

2.8.3 Reverse Transkription

Um die Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) in komplementäre DNS (cDNA) umzuschreiben, wurde 1 µl Gesamt-RNS mit 1 µl Zufallsoligonukleotiden (Promega, 500 µl/ml) versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf 22,5 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde zunächst für 10 Minuten bei 70 °C und daraufhin für drei Minuten auf Eis inkubiert, um eine Renaturierung zu verhindern. Mit der Zugabe von 11,5 µl des Mastermix (siehe

Tabelle 6) erfolgte eine DNase-Behandlung (Roche) bei 37 °C für 30 Minuten und anschließende Enzyminaktivierung bei 75 °C für fünf Minuten, um eventuell vorhandene DNA-Verunreinigungen abzubauen. Das Umschreiben der mRNA in cDNA fand für eine Stunde bei 42 °C, unter Zugabe von 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl; Promega) – ein Genprodukt des Moloney Murine Leukemia Virus mit RNS-abhängiger DNS-Polymeraseaktivität – und 0,5 µl RNasin[®] RNase Inhibitor (40 U/µl; Promega), statt. Die fünfminütige Inkubation des Reaktionsansatzes bei 95 °C gewährleistete die Enzyminaktivierung. Die cDNA wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 6: Reaktionskomponenten für den Mastermix der Reversen Transkription

Komponente	Volumen (µl)	Endkonzentration
M-MLV RT 5x Reaktionspuffer	8	1 x
dNTPs je 10 mM (Promega)	1	0,3 mM
DNase (2 U/µl) (Qiagen)	2	4 U
RNasin [®] RNase Inhibitor 40 U/µL	0,5	20 U
Gesamtvolumen des Mastermixes	11,5	–

2.8.4 β-Aktin Kontroll-PCR

Zur internen Kontrolle wurde eine β-Aktin Kontroll-PCR durchgeführt. Die verwendeten Primer stammen von der Firma BioTez Berlin-Buch GmbH und sind in Tabelle 5 aufgeführt (siehe Seite 23).

2.8.5 RT-PCR: Nachweis der Progesteron-Rezeptorexpression

Der Nachweis des Progesteron AB I - und des Progesteron B I-Rezeptors in der C8-D1A Astrozytenzelllinie erfolgte mittels Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Die verwendeten Oligonukleotid Primer stammen aus der Firma TIB MOL-BIOL Berlin und sind in Tabelle 5 dokumentiert. Die Auswahl der Primer erfolgte nach der Veröffentlichung von Rodriguez-Dorantes et al. (2007) [68].

Die PCR ermöglicht die selektive Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte. Dies geschieht in drei Reaktionsschritten. Zunächst wird die Doppelstrang DNA durch starkes Erhitzen in Einzelstränge denaturiert. Danach erfolgt das Primer-Annealing bei dem die

Primer sich an die komplementären DNA-Abschnitte anlagern und kurze Doppelstrangabschnitte bilden. Die Extension beinhaltet die Ergänzung der Doppelstrang-DNA durch DNA-Polymerasen, welche neue DNA-Stränge synthetisieren. Die complementary DNA (cDNA) wurde durch 40 Zyklen amplifiziert: eine Minute bei 95 °C zur Denaturierung, Primer-Annealing bei 58 °C für eine Minute und Extension bei 65 °C für eine Minute. Die amplifizierte cDNA wurde anschließend der Agarose-Gelelektrophorese zur Fluoreszenzmessung und qualitativen Analyse zugeführt. Die Agarose-Gelherstellung gliederte sich wie folgt: 2 % Agarose und 6 μ l Ethidiumbromid (Lösung 1 %) wurden mit 200 ml TBE-Puffer für drei Minuten gekocht und nach Abkühlen auf 50 °C in das Gelta-blett eingefüllt. Ethidiumbromidmoleküle interkalieren zwischen Basen der DNA. Auf diese Weise wird das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und durch UV-Licht eine Fluoreszenz der Substanz messbar. Somit leuchten Stellen im Agarosegel hell auf, an denen sich Nukleinsäuren befinden. Die Intensität ist proportional zum Vorkommen der DNA.

2.8.6 qRT-PCR: Nachweis quantitativer Rezeptorexpression

Mit der RT-PCR wurde die Expression der Progesteronrezeptoren (PR) AB I und B I in der C8-D1A Astrozytenzellkultur nachgewiesen. Um über diesen Nachweis der Rezeptoren hinaus einen potentiellen Einfluss von Hyperoxie auf die quantitative Expression der Progesteronrezeptoren zu untersuchen, wurde die quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Hyperoxie auf die Expression von Cyclin D2 untersucht. Die Quantifizierung dieses Proteins, das während des Zellzyklus exprimiert wird, sollte über die Durchflusszytometrie hinaus den Einfluss der Hyperoxie auf das Proliferationsverhalten der C8-D1A Astrozyten untersuchen.

Die Quantifizierung der mRNA-Expression der PR-AB II und PR-B II Zielgene sowie des Referenzgens Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) erfolgte mit der $\Delta\Delta C_T$ Methode. Bei diesem Verfahren wird die Expression des untersuchten Zielgens anhand eines Referenzgens relativ quantifiziert. Dieses Referenzgen wird *house-keeping gene* genannt, da es nicht reguliert ist und konstant exprimiert wird. Zunächst wird der C_T -Wert des Referenzgens vom C_T -Wert des Zielgens abgezogen und somit der ΔC_T -Wert ermittelt. Danach wird vom ΔC_T -Wert der behandelten Zellen der ΔC_T -Wert der Kontrollzellen subtrahiert (ermittelt den $\Delta\Delta C_T$ -Wert). Schließlich wird die

Ratio mit folgender Formel berechnet [69]:

$$\text{Expressionsunterschied(Ratio)} = 2^{-\Delta\Delta C_T}.$$

Die qRT-PCR wurde mit dem KAPATM PROBE FAST Universal qPCR Mastermix (Kapa Biosystems) ausgeführt. Bei einer angenommenen vollständigen Umschreibung wurde eine cDNA-Menge von 114 ng gewählt und diese mit RNase freiem Wasser auf die gewünschte Konzentration (12 ng) verdünnt, die qRT-PCR nach dem TaqMan-Prinzip durchgeführt. Dafür wurden Oligonukleotide (Hydrolysesonden) eingesetzt, deren 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff 6-carboxy-fluoresceine (FAM) und 3'-Ende mit dem Quencherfarbstoff 6-carboxy-tetramethylrhodamin (TAMRA) fluoreszenzmarkiert waren. Die verwendeten Primer (von BioTez Berlin) sind in der vorangehenden Tabelle 5 dokumentiert. Eine DNA-Kontamination der Proben wurde durch die DNase-I-Behandlung und eine -RT-Kontrolle ausgeschlossen.

Um die jeweiligen Zielgene zu quantifizieren wurde ein Mastermix hergestellt (Tabelle 7). Die beschriebene Zusammensetzung bezieht sich auf je einen Reaktionansatz. Je 8 μ l des Mastermixes wurde in Triplikaten in die Wells einer 96-Well-Platte pipetiert und 3 μ l cDNA in der jeweiligen Konzentration hinzugefügt. Für jedes Gen wurde eine Negativ-Kontrolle (NTC) mit 3 μ l destilliertem Wasser statt cDNA mitgeführt. Die mit einer Folie abgeklebte 96-Well-Platte wurde für circa 20 Sekunden bei 4.000 g zentrifugiert, um eventuell entstandene Luftblasen zu beseitigen. Danach wurde die PCR im StepOnePlus RealTime-PCR-System Cyler gestartet. Zunächst wurde mit einem Zyklus zur Hydrolyse möglicher kontaminierender Uracil-haltiger PCR-Fragmente aus früheren PCR-Reaktionen mittels Uracil-N-Glycosidase bei 50 °C für zwei Minuten begonnen. Das weitere Programm umfasste einen dreiminütigen Zyklus zur initialen Denaturierung und Aktivierung der Polymerase bei 95 °C sowie 45 Zyklen à 15 Sekunden bei 95 °C zur zyklischen Denaturierung. Schließlich erfolgte die Hybridisierung und Extension der Oligonukleotide durch 45 einminütige Zyklen bei 65 °C. Während der Quantifizierung wurde die Änderung der Fluoreszenzsignale gemessen (ΔR_n) und in einem Diagramm gegen die Zyklenzahl aufgetragen (Amplifikationskurve). Weiterhin wurde eine Standardkurve erstellt, in der der Cycle Threshold (C_T) gegen die eingesetzte cDNA-Menge dargestellt wurde. Der C_T -Wert steht für die erste Zyklenzahl, die über dem Hintergrundrauschen (threshold) detektiert wird. Das mRNA-Expressionsniveau

wurde relativ quantifiziert durch die Berechnung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, die bereits beschrieben wurde.

Tabelle 7: Reaktionskomponenten für den Mastermix der quantitativen Realtime-PCR

Komponente	Volumen (μl)	Endkonzentration im Gesamtansatz pro Vertiefung
KAPA PROBE FAST qPCR MM (2x) mit ROX Reference Dye High (50x) ^a	5	2x
Primer-Mix (je 10 μM)	2,5	2 μM
Sonde (5 μM)	0,5	0,2 μM
cDNA	3	je nach Verdünnungsstufe
Gesamtmenge des Ansatzes	11	–

^azu 300 μl KAPA PROBE FAST qPCR MM (2x) wurden 12 μl ROX Reference Dye High (50x) hinzugegeben

2.9 Software und Statistik

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Textverarbeitungsprogramm L^AT_EX (GNU General Public Licence) verfasst. Die statistische Auswertung erfolgte mit Graph Pad Prism 4 (GraphPad Software, Inc.). Die in den Diagrammen angegebenen Werte bestehen aus Mittelwert und Standardabweichung. Die Experimente wurden an Zellen unterschiedlicher Passagen in Mehrfachbestimmungen durchgeführt. Zum Vergleich mehrerer Gruppen wurde die univariate Varianzanalyse ANOVA (analysis of variance) angewendet. Der multiple Vergleichstest Bonferonis Test ermöglichte die Bestimmung von signifikanten Unterschieden zwischen den Mittelwerten der einzelnen Versuchsgruppen. Außerdem wurde der Student's t-Test zur Signifikanzprüfung zweier Proben verwendet. Als signifikant wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ beurteilt.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die C8-D1A Astrozytenzelllinie als ein Modellsystem nicht-neuronaler Zellen verwendet. Die nachstehend aufgeführten Ergebnisse wurden mehrfach in unabhängigen Versuchen mit unterschiedlichen Zellpassagen durchgeführt.

3.1 Morphologie der C8-D1A Astrozyten in Normoxie und Hyperoxie

Das Wachstum und die morphologische Entwicklung der Zellreihe wurde mikroskopisch beobachtet und dokumentiert. In Abbildung 2 ist eine Aufnahme der C8-D1A Astrozyten nach 24 h Hyperoxie dargestellt. Es zeigten sich Ausstülpungen der Zellmembran (Pfeil) und Zellkernkondensationen (Pfeilspitze). Nach 48 h Inkubation in Hyperoxie bildeten sich Vakuolen – ein weiterer Hinweis auf apoptotische Mechanismen in der Astrozytenzellkultur (Pfeil zeigt ein Beispiel). Nach 48 h Inkubation in Normoxie zeigten unbehandelte C8-D1A Astrozyten eine Zunahme der Zellzahl im Vergleich zur Inkubation nach 24 h, sowie eine vermehrte Ausprägung von Zellausläufern und Verzweigungen (Vergleich Abbildung 1 und 3). Unter allen drei untersuchten Progesteronkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-7} M und 10^{-9} M) war nach 24 und 48 h Inkubation in Normoxie eine geringere Zelldichte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen zu sehen (nicht dargestellt).

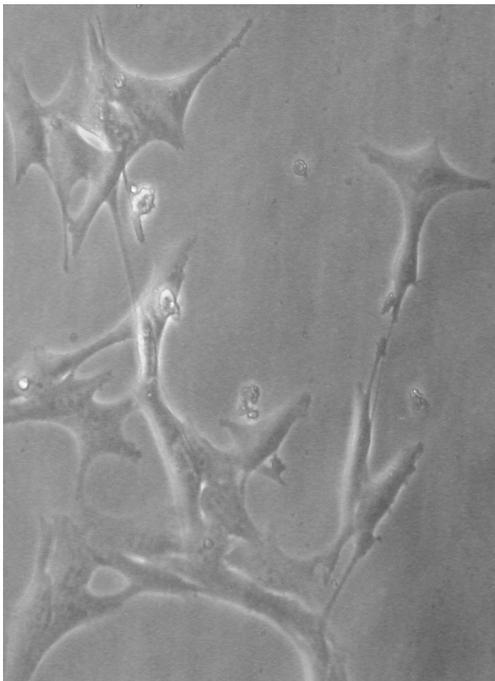


Abb. 1: C8-D1A Astrozyten nach 24 h Normoxie

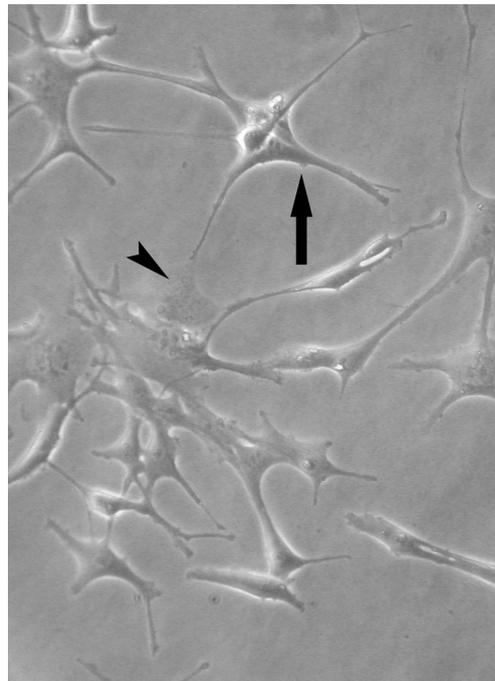


Abb. 2: C8-D1A Astrozyten nach 24 h Hyperoxie

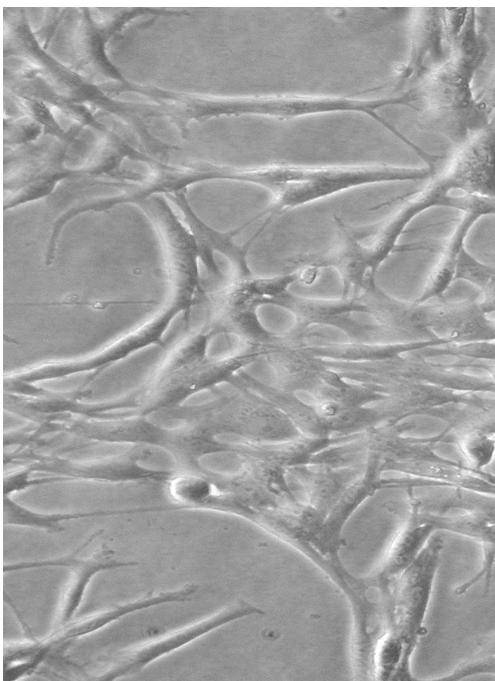


Abb. 3: C8-D1A Astrozyten nach 48 h Normoxie

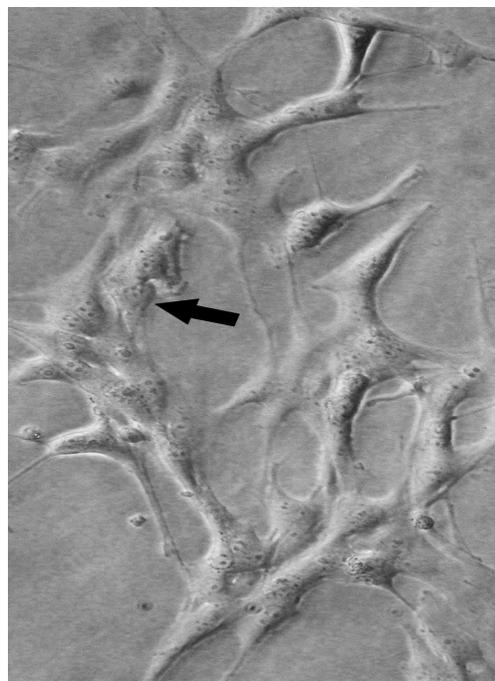


Abb. 4: C8-D1A Astrozyten nach 48 h Hyperoxie

3.2 Vitalität der C8-D1A Astrozyten in Normoxie und Hyperoxie

3.2.1 Hyperoxie-bedingte Abnahme der Zellvitalität der C8-D1A Astrozyten

Die Auswirkung der Hyperoxie-Exposition auf die Zellvitalität der untersuchten C8-D1A Astrozytenzellkultur wurde mittels Methyl-Tetrazolium-Metabolisierung (MTT-Test) bestimmt. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Messung des kolorimetrischen Umschlags des MTT zu violetten Formazankristallen durch zelluläre Dehydrogenasen. In 80 % O₂ inkubierte Astrozyten zeigten nach 24 h eine signifikante Reduktion vitaler Zellen. Im Vergleich zu Zellen, die in Normoxie inkubiert wurden, verminderte sich die Zellvitalität um 35 % (dargestellt in Abbildung 5).

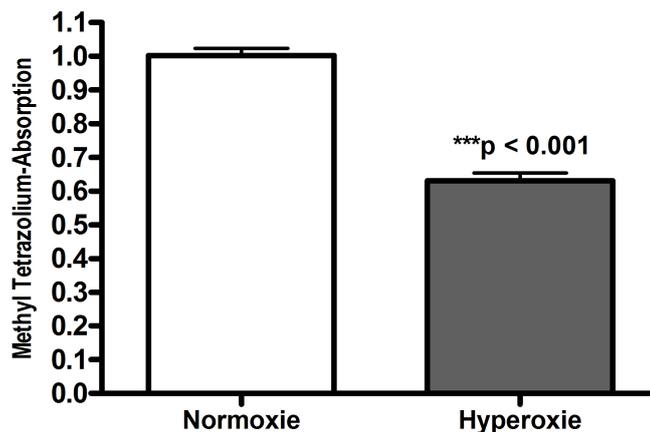


Abbildung 5: MTT-Test: Nach 24 h in 80 % O₂ ist die Anzahl vitaler Astrozyten signifikant um 35 % gemindert. (4 Versuche; n=6; Student's t-Test).

Die reduzierte Vitalität der Astrozytenkultur zeigte eine zeitabhängige Progredienz innerhalb der gemessenen Zeitfenster von 24 bis 72 h. Nach 48 h Inkubation in Hyperoxie war der kolorimetrische Umschlag des Formazansalzes um 45 % vermindert, nach 72 h um 50 % (siehe Diagramm 6).

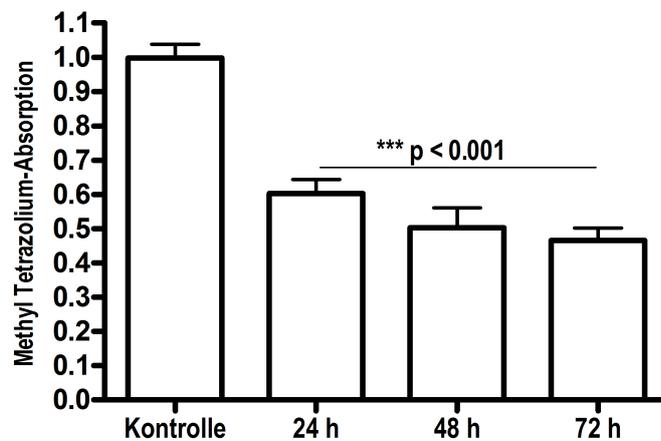


Abbildung 6: MTT-Test nach 24 - 72 h: Die MTT-Metabolisierung beträgt nach 24 h in 80 % O₂ 65 %, nach 48 h 55 %. Eine Inkubation für 72 h reduziert die Zellvitalität um 50 % (zwei unabhängige Versuche, n > 5, Student's t-Test).

3.3 Hyperoxie-induzierter Zelltod in C8-D1A Astrozyten

Die Messung der freigesetzten Laktatdehydrogenase (LDH) im Zytotoxizitätstest und der Cell Death Detection ELISA wurden zur quantitativen Bestimmung von Zelltod sowie Differenzierung von Apoptose und Nekrose in C8-D1A Astrozyten durchgeführt.

3.3.1 Hyperoxie induziert Apoptose in C8-D1A Astrozyten

Der Cell Death Detection ELISA misst Apoptose-bedingte DNA-Fragmentierung. Mono- and Oligonukleosomen werden von apoptotischen Zellen in das Zytoplasma freigesetzt, nekrotische Zellen zeigen hingegen keine nukleosomale Fragmentation. Nach 24 h Inkubation in 80 % O₂ wurde ein signifikanter Anstieg apoptotischer Zellen dokumentiert (Graphik 7). Das im Cell Death Detection ELISA ermittelte Ergebnis wurde mittels Quantifizierung der Freisetzung von Laktatdehydrogenase nach Hyperoxie-Exposition bestätigt (siehe Abbildung 21: Gegenüberstellende Auswertung der LDH-Freisetzung in Normoxie beziehungsweise Hyperoxie).

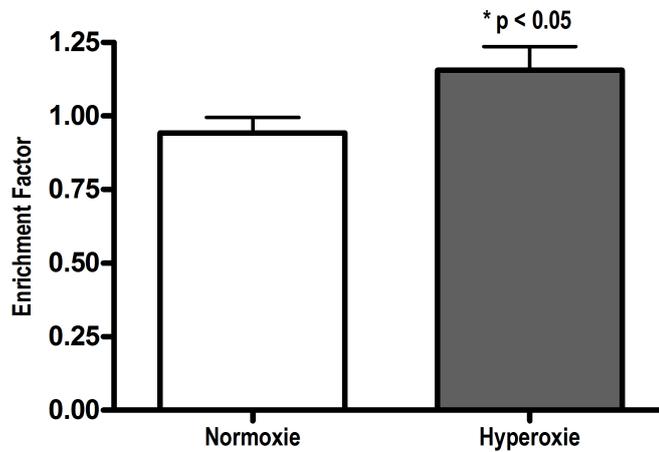


Abbildung 7: Cell Death Detection ELISA 24 h: Signifikante Zunahme von Apoptose in C8-D1A Astrozyten nach 24 h Inkubation in 80 % O₂. Der Enrichment Factor wurde als Parameter für Apoptose verwendet. (4 Versuche, n=4; Student's t-Test).

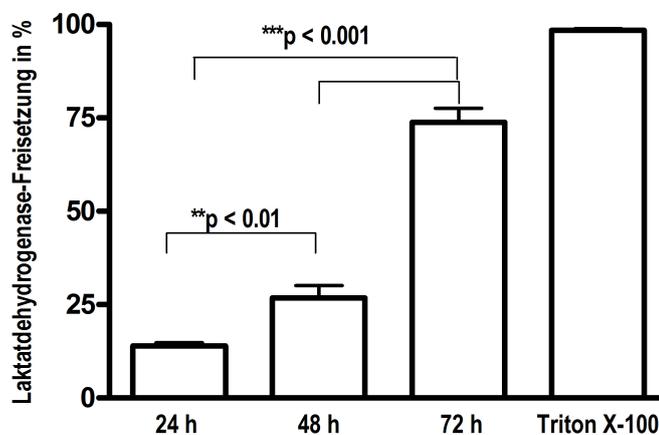


Abbildung 8: Zytotoxizitätstest: Nach 24 bis 72 h in 80 % O₂ zeigte sich eine progrediente Zunahme der LDH-Freisetzung. Nach 48 h verdoppelte sich das freigesetzte LDH auf 25 %, nach 72 h stieg die Absorption weiter auf 75 %. Als Positivkontrolle diente das zytotoxische Triton-X 100. (3 Versuche, für 72 h 2 Versuche, n > 5; One-Way Anova Varianzanalyse mit Bonferoni Post-Test).

Korrespondierend zur progredienten Abnahme der MTT-Metabolisierung im Verlauf der Inkubationsdauer wurde die LDH-Freisetzung von 24 bis 72 h Inkubation in 80 % O₂ bestimmt. In Abbildung 8 ist die signifikante Zunahme der Enzym Freisetzung dargestellt. Die Hyperoxie-bedingte Zellschädigung intensivierte sich abhängig zur Dauer der Exposition. Während nach einer 24-stündigen Inkubation 12,5 % freies LDH gemessen wurde, war nach 72 h ein starker Anstieg auf 75 % zu verzeichnen. C8-D1A Astrozyten scheinen mit zunehmender Inkubationsdauer besonders sensibel auf hohe Sauerstoffkonzentrationen zu reagieren. Als Referenzwert diene das zytotoxische Triton X-100.

3.3.2 Nekrose ist kein Hyperoxie-induzierter Schädigungsmechanismus in C8-D1A Astrozyten

Der Cell Death Detection ELISA diene weiterhin der Detektion möglicher nekrotischer Prozesse innerhalb der Hyperoxie-evozierten Schädigungsmechanismen in C8-D1A Astrozyten. Die Inkubation in supraphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen evozierte keine Nekrose in der C8-D1A Astrozytenkultur (nicht dargestellt).

3.4 Hyperoxie hemmt die Proliferation von C8-D1A Astrozyten

Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens der C8-D1A Astrozytenkultur wurde nach 24 und 48 h Inkubation in 80 % O₂ durchgeführt. In Abbildung 9 ist die Auswertung der Durchflusszytometrie nach CFSE-Markierung vergleichend für 24 h Hyperoxie und Normoxie dargestellt. Eine signifikante Minderung der Zellproliferation nach Hyperoxie-Exposition wurde für unbehandelte und Progesteron-exponierte Astrozyten gemessen. Zellen, die in Normoxie inkubiert wurden, teilten sich durchschnittlich zu 55 %. Unter supraphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen reduzierte sich die Proliferationsrate auf circa 23 %. Die signifikant markierten Werte beziehen sich jeweils auf die Vergleichsgruppe in Normoxie.

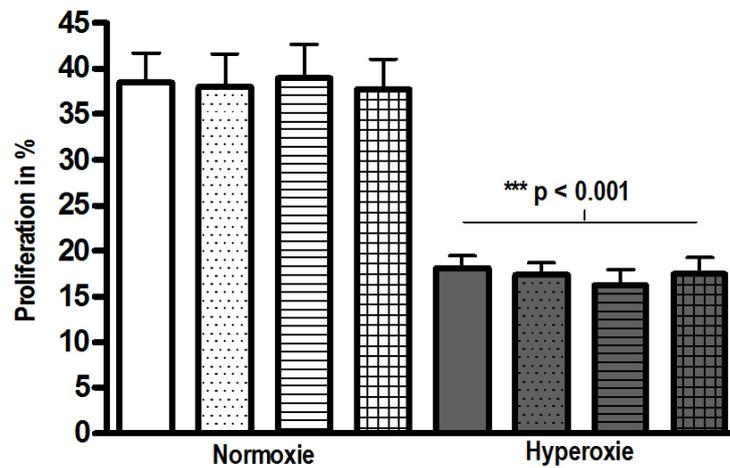


Abbildung 9: Durchflusszytometrie nach 24 h: Signifikante Abnahme der Proliferationsrate um circa 20 % in nativen Astrozyten und Progesteron-behandelten Zellen (4 Versuche, $n > 4$; One-Way Anova Varianzanalyse mit Bonferoni Post-Test. Weiße Balken: Normoxie, graue Balken: Hyperoxie, Punkte - P 10^{-5} M, Streifen - P 10^{-7} M, Kästchen - P 10^{-9} M).

Nach 48 h Hyperoxie zeigte sich weiterhin eine signifikant reduzierte Proliferation der Astrozyten. Zur Veranschaulichung ist die Auswertung der Durchflusszytometrie nach CFSE-Markierung in Normoxie und Hyperoxie in den Abbildungen 10 und 11 exemplarisch dargestellt. In den Diagrammen wird das Proliferationsverhalten der getageten Zellpopulation dargestellt. In 21 % O₂ inkubierte Zellen zeigten eine hohe Zellteilungsrate um ca. 70 %, welche im Verhältnis zu einer maximalen CFSE Konzentration nicht-proliferierter Zellen ermittelt wurde. Der Proliferationsstopp der Hyperoxie-exponierten Zellen ist im Vergleich erkennbar. Nach 48 h Normoxie sind nach Inkubation in Hyperoxie nur 27,4 % der Zellen geteilt (dargestellt sind zwei repräsentative Messungen aus vier Messungen je Versuch).

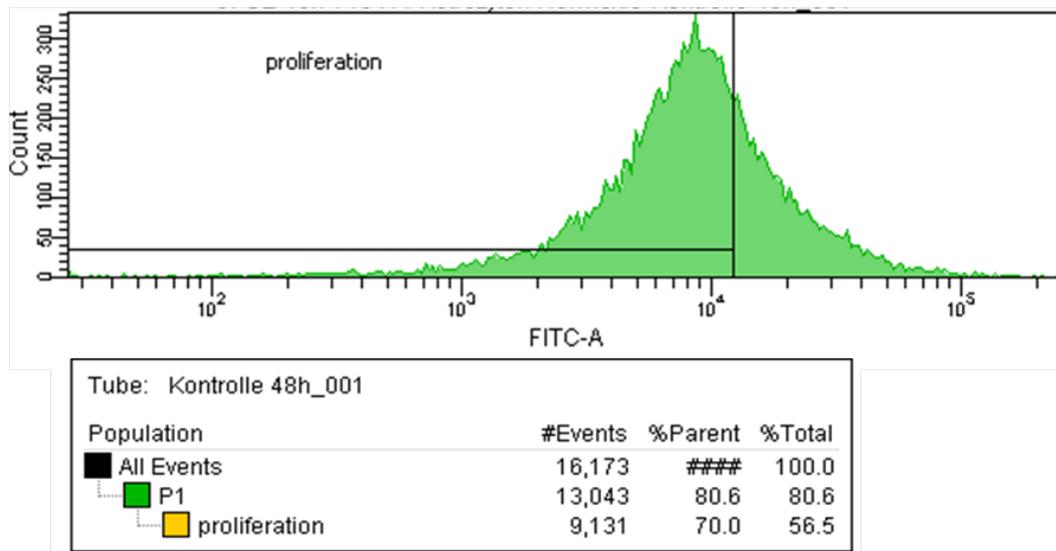


Abbildung 10: Durchflusszytometrie mit CFSE-Labeling: Nach 48 h in 21 % O₂ waren 70% der getageten Astrozyten proliferiert (grün markierte Fläche bis 10⁴ Zellen).

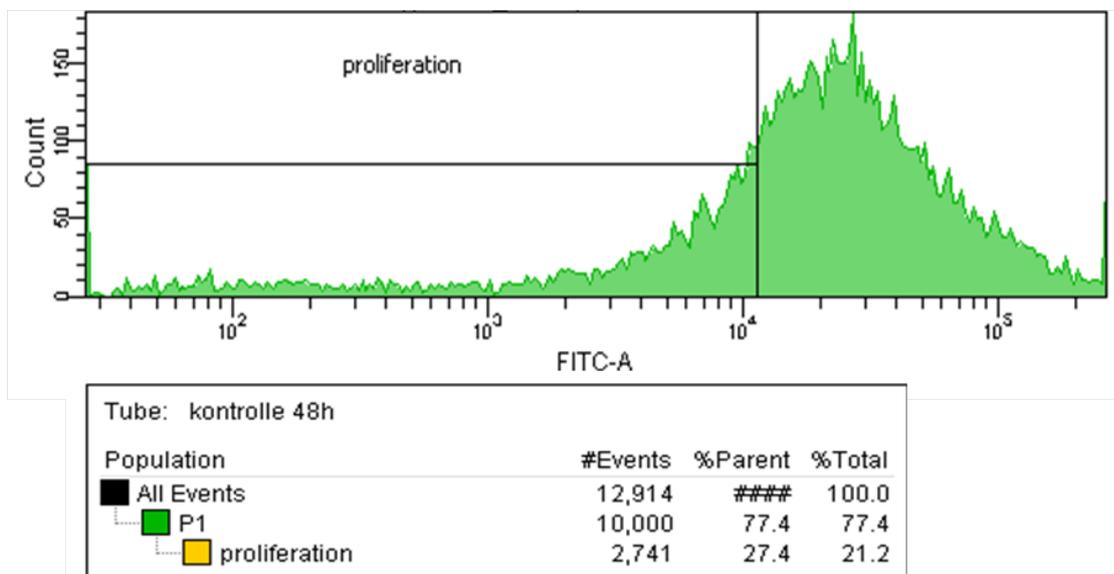


Abbildung 11: Durchflusszytometrie mit CFSE-Labeling: Nach 48 h in 80 % O₂ waren 27,4% der Zellen proliferiert (grün markierte Fläche bis 10⁴ Zellen).

3.5 Die Expression von Cyclin D2 sinkt unter Hyperoxie

Die Durchflusszytometrie mit CFSE-Markierung der C8-D1A Astrozyten zeigte eine inhibierte Proliferation nach 24 und 48 h Inkubation in 80 % O₂. Um dieses Ergebnis zu evaluieren, wurde die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) zur Untersuchung des Zellzyklusmediators Cyclin D2 durchgeführt. Bereits nach 24 h Inkubation in Hyperoxie verringerte sich die Expression des Zellzyklus-Proteins signifikant. Die Abbildung 12 illustriert, dass nur noch 80 % der Menge des Proteins, im Vergleich zu den in physiologischer Sauerstoffkonzentration inkubierten Zellen, exprimiert wird. Cycline sind die Motoren des Zellzyklus. Über die Bildung von Cyclin/CDK Komplexen ermöglichen sie das Fortschreiten des Zellzyklus. Der reduzierte Nachweis spricht für eine Hemmung der Zellteilungsrate.

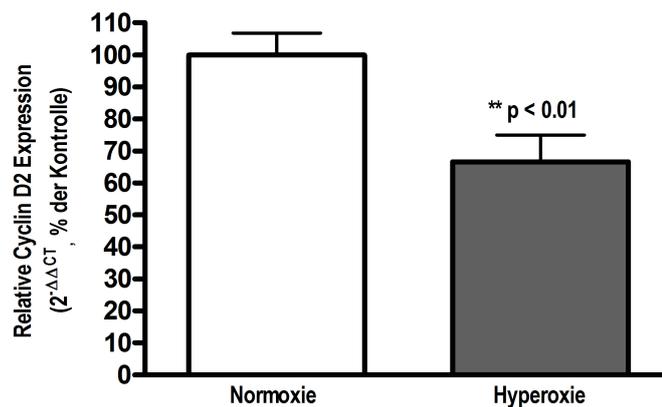


Abbildung 12: qRT-PCR nach 24 h: Die Expression von Cyclin D2 reduzierte sich signifikant unter dem Einfluss von 80 % O₂ um ca. 20 % (3 Versuche mit n=4, Student's t-Test).

3.6 Die Rezeptoren PR-AB und PR-B werden auf C8-D1A Astrozyten exprimiert

Als Grundlage aller folgenden Experimente wurde der Nachweis der Gensequenzen für die Progesteronrezeptoren PR-AB und PR-B mittels RT-PCR geführt. Für den Versuch wurden kultivierte Astrozyten in 21 % O₂ inkubiert. Abbildung 13 stellt die Auswertung der RT-PCR dar, beide PR-Rezeptoren werden exprimiert. PR-AB hat bei 204 Basenpaaren gebunden, PR-B bei 196 Basenpaaren.

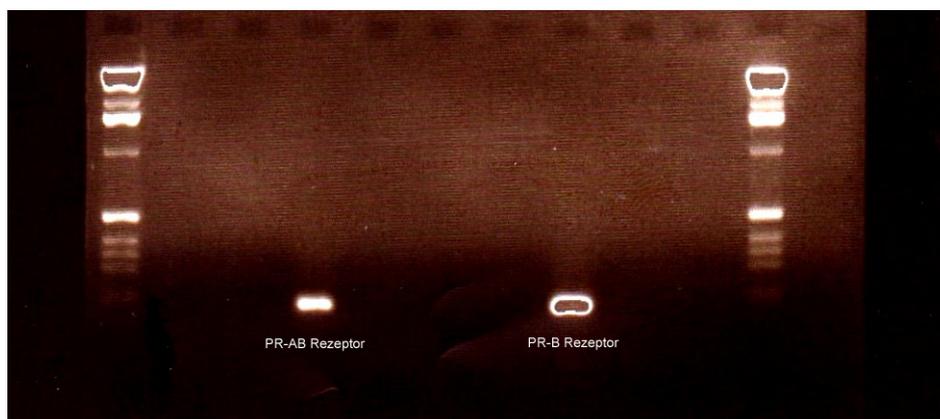


Abbildung 13: RT-PCR Analyse der Progesteron Rezeptoren PR-AB und PR-B

3.6.1 Progesteron hat keinen protektiven Nutzen bei Hyperoxie-bedingter Schädigung der C8-D1A Astrozyten

Die in Kapitel 3.1 bis 3.5 beschriebenen Experimente zeigen eine Hyperoxie-bedingte Schädigung der C8-D1A Astrozytenzellkultur. Um potentiell protektive Effekte von Progesteron bei supraphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen zu evaluieren, wurde der Zellvitalitätstest unter Einfluss der beschriebenen Progesteronkonzentrationen nach Inkubation in 80 % O₂ durchgeführt. In Diagramm 14 wird gegenüberstellend die MTT-Metabolisierung der Zellkultur nach 24 h in Normoxie und Hyperoxie dokumentiert. Wie bereits in Kapitel 3.3.1 beschrieben war nach 24 h Inkubation in 80 % O₂ die Zahl vitaler Astrozyten um 35 % gemindert. Normoxie-exponierte Zellen zeigten eine reduzierte Zellzahl unter den beschriebenen Progesteronkonzentrationen. Im Gegensatz zur inhibierenden Wirkung in Normoxie zeigte Progesteron keinen Einfluss auf die Zellvitalität bei Inkubation in Hyperoxie.

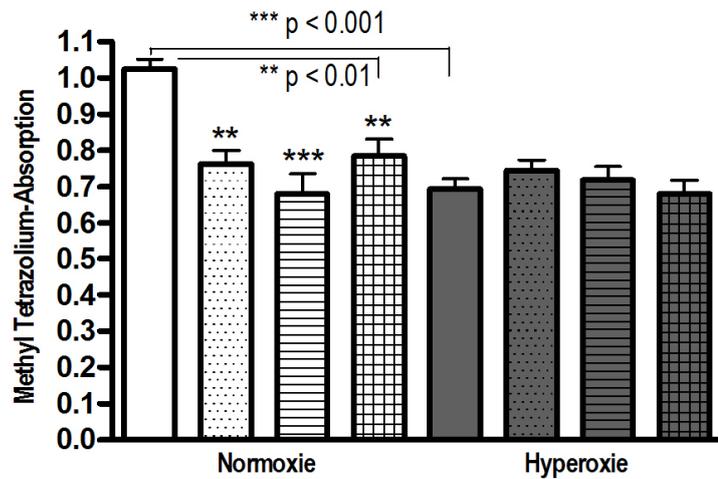


Abbildung 14: MTT-Test nach 24h: Progesteron induzierte eine erniedrigte Zellvitalität in 21 % O₂. Die Vitalität der Astrozyten war nach 24h in Hyperoxie signifikant reduziert (** $p > 0.001$), die Exposition mit Progesteron hatte keinen Einfluss auf den MTT-Metabolismus in supraphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen. (5 Versuche; $n > 5$; One-Way Anova Varianzanalyse, Bonferoni Post-Test. Weiße Balken: Normoxie, graue Balken: Hyperoxie, Uni - Kontrollzellen, Punkte - P 10⁻⁵ M, Streifen - P 10⁻⁷ M, Kästchen - P 10⁻⁹ M).

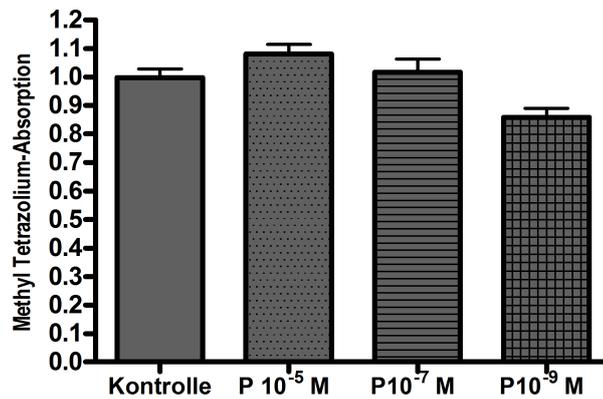


Abbildung 15: MTT-Test nach 48h in 80% O₂: Die untersuchten Progesteronkonzentrationen zeigen keinen protektiven Einfluss auf die Vitalität der C8-D1A Astrozyten nach Hyperoxie-induzierter Zellschädigung (4 Versuche; $n=4$; One-Way Varianzanalyse mit Bonferoni Post-Test).

Auch die Inkubation der C8-D1A Astrozyten mit Progesteron über 48 h in 80 % O₂ bewirkte keine Steigerung des MTT - Metabolismus. Somit konnte kein protektiver Nutzen des Hormons hinsichtlich der Hyperoxie-induzierten verminderten Zellaktivität festgestellt werden (Abbildung 15).

Die Auswertung des Zellvitalitätstests nach 72 h Hyperoxie wird nicht dargestellt. Die überwiegende Anzahl der Astrozyten war nach der Dauer der Hyperoxie-Exposition bereits avital und die Auswertung somit nicht aussagekräftig.

3.6.2 Progesteron reduziert die Zellvitalität von C8-D1A Astrozyten in Normoxie

Die Auswirkungen des Hormons Progesteron auf die C8-D1A Astrozytenkultur wurde ebenfalls in Normoxie untersucht. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT-Metabolisierung evaluiert. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis nach 24 h in 21 % O₂. Die Exposition der Astrozyten mit P 10⁻⁵ M, 10⁻⁷ M und 10⁻⁹ M reduzierte die Zellvitalität signifikant. Dabei zeigte sich ein Dosis-abhängiger Effekt: Unter der höchsten Konzentration von 10⁻⁵ M waren nur noch 65 % der Astrozyten vital, circa 80 % unter 10⁻⁷ M und 10⁻⁹ M Progesteron.

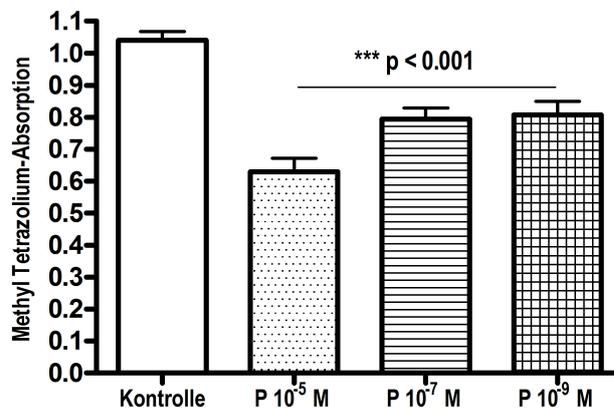


Abbildung 16: MTT-Test nach 24 h in 21 % O₂: Signifikante Reduktion der MTT-Absorption unter allen untersuchten Progesteronkonzentrationen. Die Dosis P 10⁻⁵ M induzierte die ausgeprägteste Abnahme der Zellvitalität auf 65 %. P 10⁻⁷ M und P 10⁻⁹ M reduzierten auf circa 80 % (5 Versuche, n > 5, One-Way Anova Varianzanalyse mit Bonferoni Post-Test).

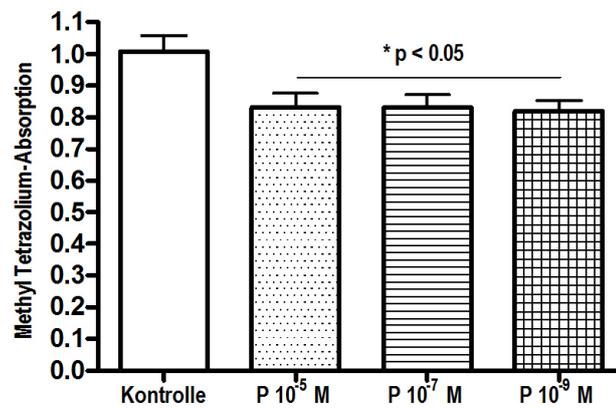


Abbildung 17: MTT-Test nach 48 h in 21 % O₂. Signifikante Reduktion der MTT-Absorption unter allen untersuchten Progesteronkonzentrationen um circa 15 % (3 Versuche, n = 5, One-Way Anova Varianzanalyse mit Bonferoni Post-Test).

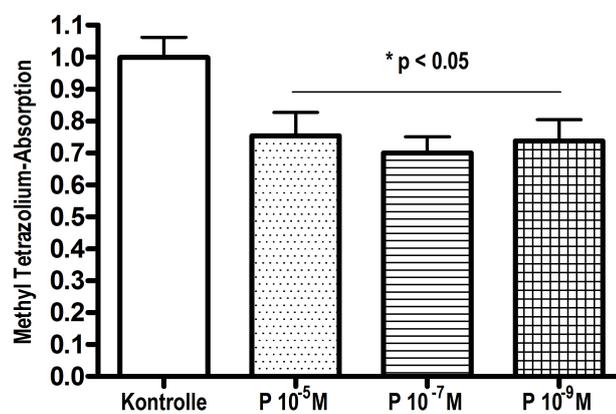


Abbildung 18: MTT-Test nach 72 h in 21 % O₂: Signifikante Reduktion der Zellvitalität unter allen Progesteronkonzentrationen (2 Versuche, n=5, One-Way Anova Varianzanalyse mit Bonferoni Post-Test).

Um die zeitliche Abhängigkeit der Zellschädigung durch Progesteron zu verfolgen, wurde die MTT-Metabolisierung im Verlauf nach 48 und 72 h gemessen (siehe Abbildungen 17 und 18). In beiden Zeitfenstern stellte sich ein signifikant geringerer Farbumschlag des Formazansalzes unter Progesteron dar. Dieses Ergebnis korreliert mit der Anzahl aktiver Mitochondrien – unter Progesteroneinwirkung sank demzufolge in allen drei beschriebenen Zeitfenstern die Zahl vitaler Astrozyten. Die inhibierende Wirkung von Progesteron auf die Astrozytenzellkultur hatte im Gegensatz zum Ergebnis nach 24 h keine Dosis-abhängige Auswirkung auf die Zellvitalität nach 48 und 72 h.

3.6.3 Die Progesteron-induzierte Depletion der Zellzahl ist mit dem Antagonisten RU 486 reversibel

Der Zellvitalitätstest zeigte nach 24, 48 und 72 h Inkubation in Normoxie eine signifikante Abnahme des MTT-Metabolismus bei Exposition mit Progesteron. Die Reversibilität des Hormoneffekts wurde mittels des Progesteronantagonisten RU 486 (Mifepriston) geprüft. Das Diagramm 19 bildet ab, dass die Absorptionswerte im MTT-Test in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ RU 486 um 25 % höher lagen, als bei Astrozyten, die nur mit Progesteron in einer Konzentration von 10^{-7} M behandelt wurden. Die Zahl vitaler Zellen wurde durch RU 486 von 65 % bei alleiniger Zugabe von 10^{-7} M auf 85 % erhöht. Da RU 486 in 0,1 % DMSO gelöst ist, wurde zusätzlich eine Kontrollreihe mit diesem Agens geführt. DMSO-behandelte Astrozyten zeigten eine reduzierte Zellvitalität um 45 %. Die Ergebnisse sprechen somit für ein antizytotoxisches Potenzial von RU 486. Die MTT-Absorption lag bei Zugabe des Progesteronantagonisten signifikant höher, als bei alleiniger Exposition mit DMSO.

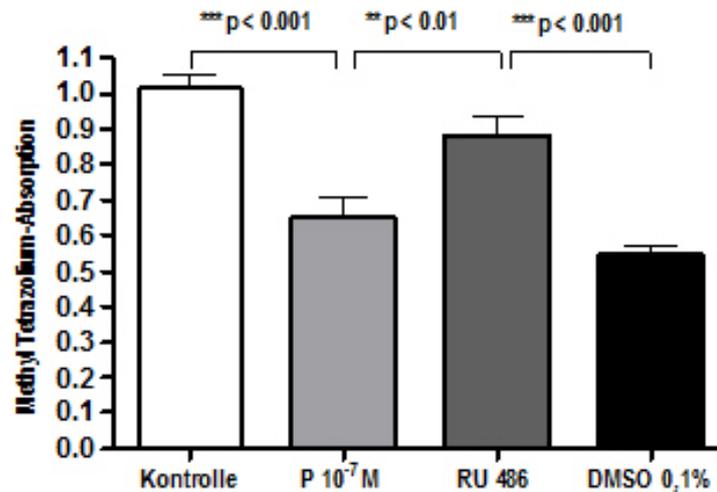


Abbildung 19: MTT-Test nach 24 h in 21 % O₂: P 10^{-7} M induzierte eine signifikante Reduktion vitaler Astrozyten auf 65 %. RU 486 antagonisierte signifikant den Effekt von Progesteron. Die Zytotoxizität von DMSO wird durch RU 486 abgemindert (4 Versuche; n > 5, One-Way Anova Varianzanalyse, Bonferoni Post-Test).

3.6.4 RU 486 mindert Hyperoxie-Effekte auf C8-D1A Astrozyten

Das Potenzial des Progesteronantagonisten RU 486 wurde weiterhin in Hyperoxie exploriert. Nach 24 h Inkubation in 80 % O₂ zeigte der MTT-Metabolisierungs-Test (dargestellt im Graphen 20) eine unveränderte Zellvitalität unter 10^{-7} M Progesteron. Die Zugabe von 10 μ M RU 486 erhöhte signifikant den kolorimetrischen Umschlag des Formazansalzes um 20 % und liegt damit über dem der unbehandelten Kontrollzellen. Der Einfluss des zytotoxischen DMSO war bei den durch Hyperoxie gestressten Zellen deutlich zu beobachten, die Metabolisierungsrate reduzierte sich auf 45 % . RU 486 zeigte in den Untersuchungen einen protektiven Effekt auf die Zytotoxizität von DMSO, die Zahl vitaler Astrozyten stieg auf 65 %.

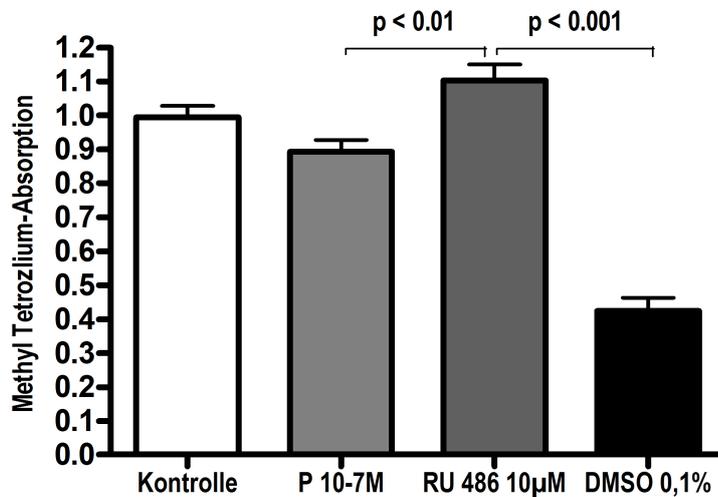


Abbildung 20: MTT-Metabolisierung nach 24 h in 80 % O₂: Die Exposition von C8-D1A Astrozyten mit Progesteron 10⁻⁷ M hatte keinen Einfluss auf die Zellvitalität. RU 486 induzierte eine signifikante Zunahme vitaler Zellen mit einem Anstieg der Metabolisierungsrate um 15 % gegenüber der Kontrolle. Die DMSO-Toxizität wurde signifikant durch RU 486 bei gleicher Konzentration abgemildert. (6 Versuche, n > 5; One-Way Anova Varianzanalyse, Bonferoni Post-Test).

3.6.5 Progesteron induziert keinen Zelltod in C8-D1A Astrozyten

Um die den Ergebnissen des MTT-Tests zugrunde liegenden Mechanismen in der Zellkultur bei Normoxie zu definieren, wurde der Zytotoxizitätstest (LDH-Test) durchgeführt. Anhand dieser Untersuchung sollte eine mögliche Induktion des Zelltods durch das Agenz Progesteron geprüft werden. Im LDH-Test wurde nach 24 h in 21 % O₂ keine erhöhte LDH-Freisetzung unter Zugabe von Progesteron (P 10⁻⁵ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁹ M) gemessen. Somit ergibt sich kein Anhalt für einen Progesteron-induzierten Zelltod beziehungsweise Apoptose (Abbildung 21).

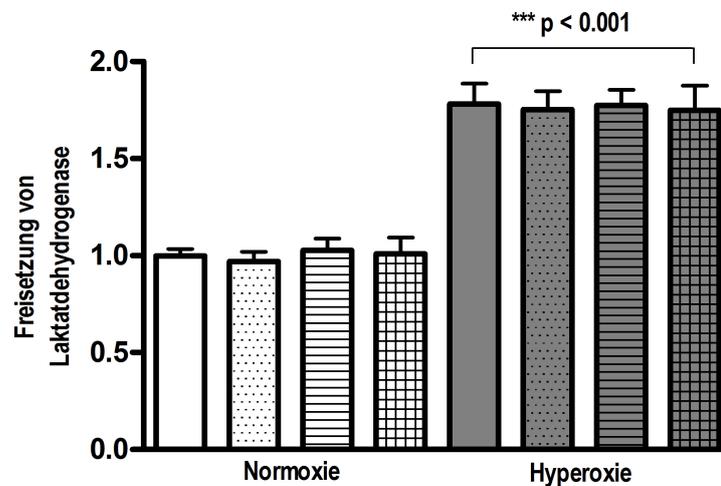


Abbildung 21: Zytotoxizitätstest nach 24 h: Innerhalb der Normoxie-exponierten Astrozyten war keine gesteigerte LDH-Freisetzung zu verzeichnen. In supraphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen inkubierte Zellen zeigten vermehrten Zelltod bzw. Apoptose, Progesteron hatte keinen protektiven Einfluss auf die Hyperoxie-induzierte Apoptose. Die signifikant markierten Balken beziehen sich auf die zugehörigen Vergleichsgruppen in Normoxie (4 Versuche, $n > 5$; Blank - Kontrolle, Punkte - P 10^{-5} M, Streifen - P 10^{-7} M, Kästchen - P 10^{-9} M; One-Way Anova Varianzanalyse mit Bonferoni Post-Test).

3.6.6 Progesteron hat keinen protektiven Nutzen auf Hyperoxie-bedingte Zellschädigung

Die Quantifizierung des Zelltodes mittels LDH-Messung zeigte eine signifikante Steigerung des Zelltods bzw. Apoptose durch Exposition der Zellkultur in Hyperoxie. Um das protektive Potenzial von Progesteron zu überprüfen, wurde die LDH-Freisetzung nach Exposition der Zellen mit den beschriebenen Progesteron-Konzentrationen gemessen. Die Abbildung 21 zeigt die vergleichende Darstellung des LDH-Tests nach 24 h in Normoxie beziehungsweise Hyperoxie. Die Zugabe von Progesteron minderte nicht den Hyperoxie-bedingten Zelltod. Ebenso fand keine verstärkte Freisetzung von LDH bei Anwesenheit von Progesteron, sowohl bei Inkubation in 21 % O₂, als auch in 80 % O₂, statt.

3.7 Progesteron induziert keine Nekrose in C8-D1A Astrozyten

Die im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation der C8-D1A Astrozytenkultur mit Progesteron keinen Zelltod induzierte. Zur Differenzierung möglicher nekrotischer Prozesse wurde der Cell Death Detection ELISA durchgeführt. Nekrotische Zellen setzen Oligo- und Nukleosomen in das Kultivierungsmedium aus und können so im ELISA-Verfahren detektiert werden.

Abbildung 22 zeigt im Überblick die Auswertung des ELISA-Tests für 24 bis 48 h in 21 % O₂. In Gegenwart des untersuchten Agens Progesteron war keine Nekrose nachweisbar. Der Enrichment Factor, als Parameter zur Nekrose-Quantifizierung, erhöhte sich nicht signifikant zu den unbehandelten Astrozyten-Kontrollzellen. Auch innerhalb der Kontrollgruppen fand im Verlauf der Inkubationsdauer keine zunehmende Nekrose in der Zellkultur statt.

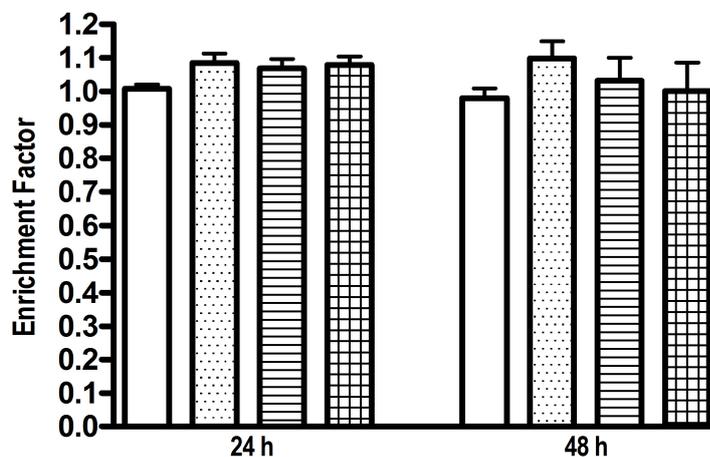


Abbildung 22: Cell Death Detection ELISA: Nach 24 und 48 h in 21 % O₂ zeigte die Exposition der Zellen mit Progesteron keinen Einfluss auf die Quantität von Nekrose in der C8-D1A Astrozytenkultur (Blank - Kontrolle, Punkte - P 10⁻⁵ M, Streifen - P 10⁻⁷ M, Kästchen - P 10⁻⁹ M; 3 Versuche, n > 5; One-Way Anova Varianzanalyse mit Bonferoni Post-Test).

3.8 Untersuchung der Proliferation

3.8.1 Proliferationsverhalten der C8-D1A Astrozyten unter Progesteron

Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse zeigen eine reduzierte Zellvitalität der C8-D1A Astrozytenkultur in Gegenwart von Progesteron. Eine Zellschädigung im Sinne von Apoptose oder Nekrose konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Bilanz ließ eine Hemmung der Astrozytenproliferation durch Progesteron möglich erscheinen. Um dies zu untersuchen, wurde eine Durchflusszytometrie nach Markierung mit dem Farbstoff Carbofluorescein Succinimidylester (CFSE) durchgeführt. CFSE verteilt sich bei der Zellteilung in gleichen Mengen auf die Tochterzellen. Somit nimmt die Fluoreszenz des Farbstoffs mit steigender Proliferation der Zelllinie ab.

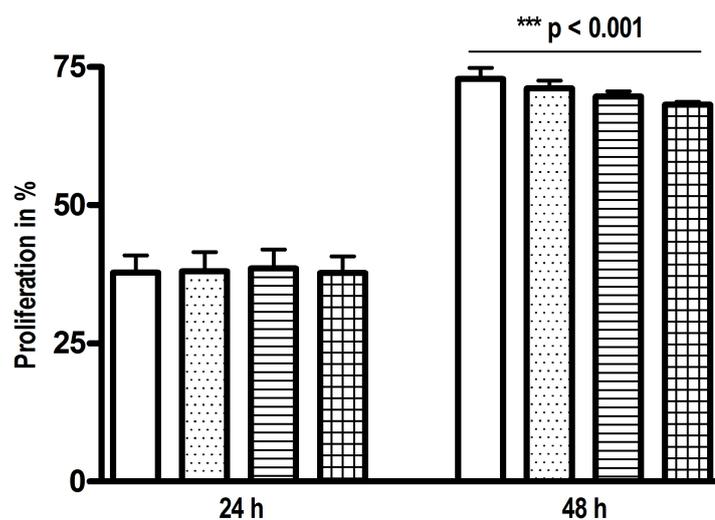


Abbildung 23: Durchflusszytometrie Normoxie: Signifikanter Anstieg der Zellteilungsrate nach 48 h im Vergleich zu 24 h. Progesteron zeigte keinen inhibierenden Effekt auf die Proliferation der C8-D1A Astrozyten. Blank - Kontrolle, Punkte - P 10⁻⁵ M, Streifen - P 10⁻⁷ M, Kästchen - P 10⁻⁹ M. (5 Versuche für 24 h, 3 Versuche für 48 h, n=4; One-Way Anova Varianzanalyse mit Bonferoni Post-Test).

In Abbildung 23 ist die Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchung des Proliferationsverhaltens nach 24 und 48 h Normoxie der C8-D1A Astrozyten dargestellt. Nach 24 h sind die mit Progesteron inkubierten Astrozyten im gleichen Maße wie native Zellen proliferiert (circa 35 %). Nach 48 h in 21 % O₂ proliferierten durchschnittlich 75 % der Astrozyten der unbehandelten Kontrollgruppe. In Gegenwart von Progesteron 10⁻⁹ M teilten sich hingegen nur 65 % der Zellen, was statistisch jedoch nicht signifikant darstellbar war.

Die Abbildungen 24 und 25 stellen jeweils eine repräsentative Darstellung der Durchflusszytometrie nach 48 h Normoxie dar. Die grün markierte Fläche des Diagramms stellt die ausgewählte Zellpopulation der C8-D1A Astrozyten dar. Um eine Quantifizierung der Proliferation vorzunehmen, wurden frisch gefärbte C8-D1A Astrozyten als Ausgangswert für die maximale CFSE Konzentration bei nicht-proliferierten Zellen gated (Senkrechte bei 10⁴) und somit die prozentuale Proliferation der behandelten Zellen ermittelt. Während unbehandelte Astrozyten zu 78,1 % proliferierten, teilten sich 64,5 % in Gegenwart von Progesteron 10⁻⁹ M.

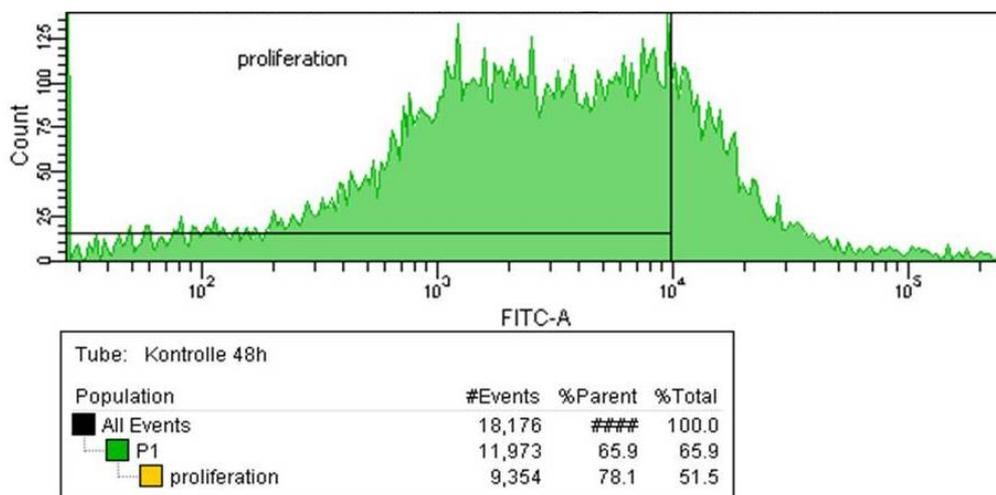


Abbildung 24: Durchflusszytometrie Normoxie 48 h: Repräsentatives Beispiel der FACS-Messungen nach Markierung mit CFSE. 78,1 % der unbehandelten Astrozyten teilten sich innerhalb von 48 h.

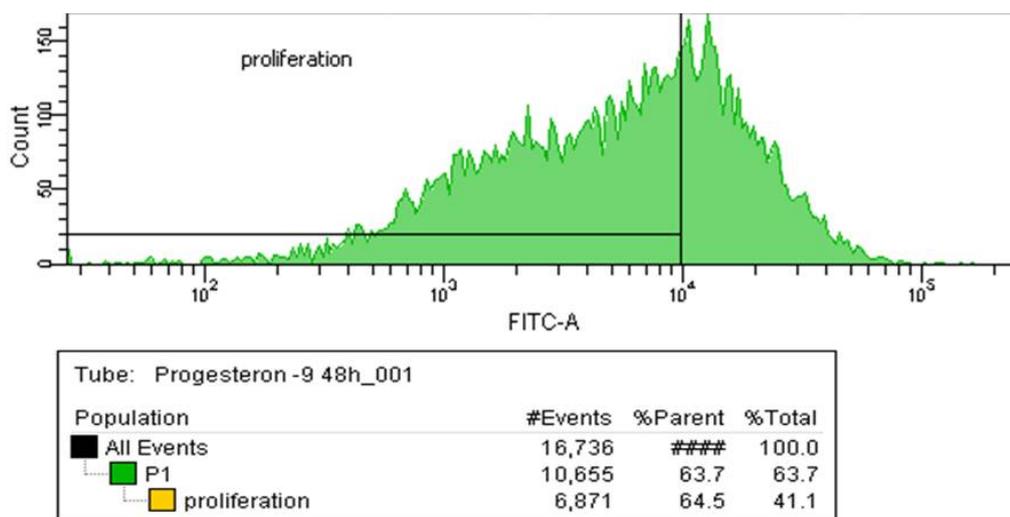


Abbildung 25: Durchflusszytometrie Normoxie 48 h: Bei Exposition mit $P 10^{-9}$ M proliferierten innerhalb 48 h 64,5 % der Astrozyten (Dargestellt ist eine repräsentative Messung).

3.9 Die Expression der Progesteronrezeptoren sinkt unter Hyperoxie

Der vorliegenden Arbeit liegt die Hypothese zu Grunde, dass Progesteron über protektives Potenzial bei Hyperoxie-bedingter Zellschädigung verfügt. In den beschriebenen Experimenten zeigte sich eine inhibierende Wirkung von Progesteron (10^{-5} M, 10^{-7} M und 10^{-9} M) auf die C8-D1A Astrozytenzellkultur bei Inkubation in 21 % O_2 . Nach Hyperoxie-Exposition (80 % O_2) konnte kein protektiver Effekt des Hormons auf die Vitalität der untersuchten Zellreihe nachgewiesen werden. Das Durchführen der quantitativen Real-Time PCR sollte die daraus entstandene Frage nach einem möglichen Einfluss der Hyperoxie auf die Progesteronrezeptor-Regulation in C8-D1A Astrozyten bearbeiten. Die folgende Abbildung 26 zeigt den signifikanten Abfall der Expression der Rezeptoren PR-AB II und PR-B II unter Hyperoxie. Bereits nach 24 h in 80 % O_2 wurden die Progesteronrezeptoren auf 25 % (PR-AB II) beziehungsweise 40 % (PR-B II) des Ausgangswertes bei Normoxie herunterreguliert. In dem dargestellten Modell kann also eine Wirkung von Progesteron auf die Astrozytenkultur bei Hyperoxie-Exposition nur bedingt stattfinden.

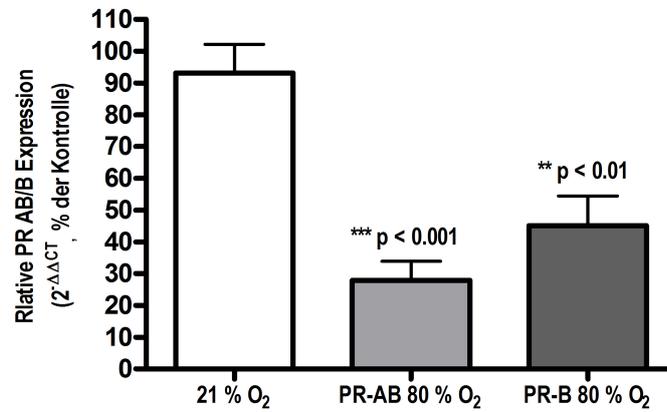


Abbildung 26: qRT-PCR: Nach 24 h in 80 % O₂ sank die Expression der Progesteron-Rezeptoren signifikant auf 25 % (PR-AB II) beziehungsweise 40 % (PR-B II). (3 Versuche; n = 4; Student's t-Test).

4 Diskussion

4.1 Induktion von Apoptose durch Hyperoxie

4.1.1 Hyperoxie induziert Apoptose in C8-D1A Astrozyten

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von Hyperoxie (80 % O₂) auf die C8-D1A Astrozytenzellkultur untersucht. Nach 24 h Inkubation zeigte der Zellvitalitätstest eine signifikante Reduktion der überlebenden Zellen um 35 % im Vergleich zu Astrozyten, die bei 21 % O₂ inkubiert wurden. Zur Evaluation des geminderten Zellüberlebens wurde der Laktatdehydrogenase-Test und der Cell Death Detectin ELISA zur Differenzierung von Apoptose und Nekrose durchgeführt. Beide Verfahren zeigten nach 24 h Inkubation bei 80 % O₂ eine signifikante Zunahme von Zelltod und Apoptose in der Hyperoxie-inkubierten Versuchsgruppe. Hinweise für apoptotischen Zelltod konnten weiterhin bei der morphologischen Untersuchung der Zellen unter dem Lichtmikroskop gefunden werden. Bereits nach 24 h Inkubation zeigten sich morphologische Zeichen des Zelltods. Dazu zählten beispielsweise Ausstülpungen der Zellmembran und Kondensation der Zellkerne, nach 48 h Hyperoxie entstanden Vakuolen. In der Publikation von Huppmann et al. (2008) wird das Ergebnis der vorliegenden Arbeit unterstützt. In dieser Untersuchung verursachte Hyperoxie ein signifikantes Zellsterben in der C8-D1A Astrozytenzellkultur. Dies ging einher mit einem achtfachen Anstieg der Caspase 3 nach 24 h Inkubation in 80 % O₂. Das Ergebnis spricht für einen Anstieg apoptotischer Prozesse in der untersuchten Zellkultur, die ebenso zellmorphologisch bestätigt wurde [39]. Sowohl die zellmorphologischen Zeichen des Zelltods als auch die reduzierte Zellvitalität bedingt durch Apoptose konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

4.1.2 Schädigungen durch Hyperoxie in primären Astrozyten

Der Einfluss hoher Sauerstoffkonzentrationen wurde auch an primären Astrozytenzellkulturen untersucht. So reagieren nicht nur die hier untersuchte Astrozytenkultur *in vitro*, sondern auch primär gewonnene Zellen sensibel auf hohe Sauerstoffkonzentrationen. Bruno et al. (2011) zeigten, dass die Zellvitalität primärer neonataler Astrozyten der Maus signifikant nach 48 h Inkubation in 95 % O₂ sinkt. Dieses Ergebnis wurde per

quantitativer morphometrischer Evaluation ermittelt [70]. Weitere Untersuchungen geben Hinweise, dass Astrozyten unter bestimmten oxidativen Stressoren noch empfindlicher auf den Einfluss von Sauerstoff reagieren. Ein Beispiel dafür ist der Entzug von Glukose und Sauerstoff. In primären Astrozytenzellkulturen der Ratte verursachte diese Deprivation in der mikroskopischen Untersuchung der Propidium-Jodid gefärbten Zellen schon bei einer Sauerstoffkonzentration von 20 % signifikant mehr tote Zellen. Die Vergleichsgruppe wurde in dieser Untersuchung bei 7 % O₂ inkubiert [71]. Diese Untersuchung könnte ein Hinweis sein, dass Astrozyten bereits auf ein niedrigeres Sauerstofflevel sensibel reagieren, als im hier gewählten Versuchsaufbau.

Da Astrozyten sowohl metabolisch als auch strukturell eine wichtige unterstützende Rolle für Neuronen übernehmen, wurde auch ein möglicher Effekt des oxidativ-vermittelten Zellsterbens der Astrozyten auf Neuronen untersucht. Nach 24 h Inkubation in Hyperoxie wurden zu den oxidativ-geschädigten Astrozyten Neuronen ausgesät und die Co-Kultur für weitere 24 h inkubiert. In diesem experimentellen Aufbau zeigte sich ein signifikanter Anstieg apoptotischer Neuronen. Als Vergleichsgruppe diente eine Co-Kultur aus normoxisch-präinkubierten Astrozyten und Neuronen [72]. Auch Oligodendrozyten sind möglicherweise von der Hyperoxie-induzierten Schädigung von Astrozyten beeinflusst. Die Inkubation primärer Astrozyten der Ratte für 48 h in 80 % O₂ verursachte eine reduzierte Aktivität der Glutamat-Aufnahme. Bei experimentell extrazellulär erhöhtem Glutamatspiegel führte diese Hyperoxie-verursachte Modifikation der Astrozyten zu einer verminderten Anzahl der Vorläufer-Oligodendrozyten (oligodendrocyte progenitor cells OPCs) in dieser Co-Kultur [73]. Die in dieser Arbeit bestätigte Hyperoxie-induzierte Schädigung von Astrozyten könnte somit über die Deprivation der Zelllinie hinaus einen Untergang weiterer zerebraler Zellen bewirken

4.1.3 Auswirkung von Hyperoxie in vivo

Um hypothetische Rückschlüsse auf die Mechanismen im Gehirn des Menschen ziehen zu können, haben Untersuchungen am Tiermodell in vivo besondere Bedeutung. In der Literatur beschäftigen sich einige Forschungsarbeiten mit dem Verhalten zerebraler Zellkulturen auf supraphysiologische Sauerstoffkonzentrationen in vivo. In der vorliegenden Arbeit wurde in der C8-D1A Astrozytenkultur nach 24 h Inkubation in Hyperoxie ein Anstieg der Apoptose um 35 % nachgewiesen, nach 72 h waren nur noch

50 % der Astrozyten vital. Es wurde keine signifikante Änderung der Zellvitalität zwischen 24 und 48 h in 80 % O₂ festgestellt. Ein ähnliches Ergebnis wurde in einer Studie von Felderhoff-Müser et al. (2004) am unreifen Gehirn der Ratte erlangt: Bereits nach 6 beziehungsweise 12 h Inkubation in 80 % O₂ zeigte sich in der histopathologischen Analyse des Gehirns eine signifikante Degeneration. Am Ausgeprägtesten erschien die Hyperoxie-induzierte Neurodegeneration jedoch nach 24 h, wobei keine weitere Zunahme der Apoptose bei längerer Inkubation zu beobachten war. Außerdem wurde bereits bei einer Sauerstoffkonzentration von 60 % signifikant zunehmende Apoptose dokumentiert. Auch die Reife der untersuchten Tiere ist bei der Betrachtung Hyperoxie-induzierter Schädigungsmechanismen von Bedeutung. So zeigte sich in dieser Studie eine besondere Vulnerabilität gegenüber der Toxizität von Sauerstoff bei drei bis sieben Tage alten Rattenjungen [25]. Die Empfindlichkeit des unreifen Gehirns gegenüber dem Einfluss hoher Sauerstoffkonzentrationen konnten auch Yis et al. (2008) demonstrieren. Rattenjunge wurde postnatal für fünf Tage in 80 % O₂ exponiert. Die Messung des Zelltods mittels ELSIA zeigte eine massive Zunahme der Zellschädigung in der Hyperoxie-Gruppe sowie einen signifikanten Verlust von Hirnmasse [74]. Diese zeitabhängige Vulnerabilität des unreifen Gehirns gilt möglicherweise auch für andere toxische Agenzien: Unreife Ratten sind ebenso in der ersten Lebenswoche besonders empfindlich gegenüber den proapoptotischen Einflüssen von Antikonvulsiva [75]. Die erste Lebenswoche scheint eine besonders vulnerable Phase zu sein, in der toxische Effekte von Sauerstoff und anderer Agenzien besonders intensiv wirken. Möglicherweise besteht die Gefahr der Schädigung des unreifen Gehirns besonders bei einer zeitlich ausgedehnten Zufuhr von Sauerstoff. Außerdem könnten apoptotische Prozesse in zerebralen Zellen schon ab einer geringeren Konzentrationen von Sauerstoff (als im hier gewählten Versuchsaufbau) beginnen.

Ein Hinweis, dass oxidativer Stress zur Steigerung der Apoptose im Gehirn führt, fanden Taglialatela et al. (1998). Zwei Tage alte Ratten wurden in einer Sauerstoffkammer 95 % O₂ ausgesetzt. Anschließend wurden im Zerebellum, Hippocampus und Striatum Apoptose und der Nerve Growth Factor (NGF), welcher Neuronen vor Apoptose schützt, über ein ELISA-Verfahren evaluiert. Hyperoxie bewirkte eine Zunahme des Zelltods und eine Reduktion des NGF. Die Kombination aus Hyperoxie und reduziertem antioxidativen Schutz (durch Buthionin Sulfoxid - ein Inhibitor der Gluthationsynthese) führte zu einem radikalen Anstieg des programmierten Zelltodes. Ein reduziertes oxidatives

Schutzsystem, wie es bei Frühgeborenen vorkommt, könnte möglicherweise im Zusammenhang mit Hyperoxie-bedingten Schädigungsmechanismen stehen beziehungsweise die fehlende Protektion den Schaden verstärken [76]. Auch in einem klinisch-orientierten Forschungsmodell stellte sich eine Hyperoxie-bedingte Schädigung des Gehirns ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit dar. Die Forschungsgruppe um Dalen et al. (2012) untersuchte das Gehirn neonataler Ratten, die zerebraler Hypoxie durch eine Ligatur der Arteria carotis ausgesetzt wurden. Nach Reanimation mit 100 % O₂ zeigte sich histopathologisch eine Hirnschädigung in Cortex, Hippocampus und den Basalganglien. Die histologische Auswertung wurde durch eine neurologische Untersuchung der Versuchstiere gestützt: Die benötigte Zeit für eine 180 °-Rotation verlängerte sich signifikant bei Ratten, die Hyperoxie ausgesetzt waren (Reanimation mit 100 % O₂). Darüber hinaus war ein Resultat dieser Arbeit, dass die neuroprotektiven Effekte von therapeutischer Hypothermie durch die 30-minütige Inhalation von 100 % O₂ aufgehoben werden [77]. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen an neugeborenen Mäusen. Nach der Etablierung eines hypoxischen Ereignis (siehe oben) wurden den Versuchstieren wiederum 30 Minuten 100 % oder 21 % O₂ zugeführt. Unter den supraphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen wurde ebenfalls eine Schädigung des Gehirns histopathologisch nachgewiesen und darüber hinaus eine gestörte Myelinisierung, die zu motorischen Defiziten der Tieren führte [78]. Auch das Gehirn von Ferkeln reagiert sensibel auf hohe Sauerstoffkonzentrationen. Die Zufuhr von 100 %-igem Sauerstoff bei Reanimation neugeborener asphyktischer Ferkel führte zu einer signifikanten Schädigung des Zerebrums. Glycerol wurde in dieser Untersuchung zu 50 % mehr in den Extrazellulärraum freigesetzt – ein Zeichen für die Hirnschädigung – als bei Reanimation mit Raumluft (21 % O₂) [79]. Diese Studien bestätigen die Wichtigkeit des überdachten Einsatz hoher Sauerstoffkonzentrationen bei Neu- und Frühgeborenen. Die in dieser Arbeit dargelegte Schädigung der C8-D1A Astrozytenzellkultur durch experimentelle Hyperoxie könnte als Modell für die Schädigung des unreifen Gehirns im Zusammenhang mit dem postnatalen und therapeutischen Sauerstoffanstieg stehen.

Den vorangehend dargelegten Ergebnissen steht eine Untersuchung von Grafe et al. (2008) gegenüber. In dieser Studie wurde das perinatale hypoxisch-ischämische Modell an der Ratte angewendet. Die histologische Auswertung zeigte keine Verschlechterung bei Reanimation mit 100 % O₂ im Vergleich zu Raumluft (21 % O₂) im Langzeit-Outcome. Im Fokus der histopathologischen Auswertung stand der parietale Kortex,

welcher hinsichtlich des Verlusts von Neuronen, Gliose und Unterbrechung des Zellskeletts untersucht wurde. Die Zufuhr erhöhter Sauerstoffkonzentrationen (40% O₂) wirkte sich positiv auf das Outcome der männlichen Versuchstiere aus [80]. Bei der Betrachtung Hyperoxie-bedingter Schädigungsmechanismen ist möglicherweise auch das Geschlecht, und damit verbundene hormonelle Unterschiede, ein entscheidender Einflussfaktor.

4.2 Untersuchungen zur Hyperoxie in weiteren zerebralen Zellen

4.2.1 Oligodendrozyten

Potentielle Schädigungsmechanismen durch supraphysiologische Sauerstoffkonzentrationen wurden in der Literatur auch an weiteren Zellspezies des Gehirns untersucht. Oligodendrozyten haben in der Erforschung des unreifen Gehirns des Neonaten eine besondere Bedeutung. Die periventriculäre Leukomalazie ist eine Störung der weißen Substanz bei frühgeborenen Kindern. Einer verzögerten neurologischen Entwicklung ehemals Frühgeborener liegt häufig diese Schädigung der weißen Substanz zugrunde, die mit einer Zerebralparese und kognitiver Beeinträchtigungen einhergehen kann. Um einen Einfluss von Hyperoxie auf die Myelinisierung des Gehirns zu untersuchen, stehen auch Oligodendrozyten im Interesse der Hyperoxie-Forschung. So konnten Gerstner et al. (2006) eine Hyperoxie-vermittelte Apoptose der OLN-93 Zelllinie *in vitro* nachweisen. Diese Schädigung unterlag einer zeitabhängigen Progredienz innerhalb der Inkubationszeiträume von 24 bis 96 h. Auch *in vivo* zeigte sich eine signifikante Induktion des programmierten Zelltods durch Hyperoxie in den unreifen Gehirnen von Rattenjungen. Dabei ist die Sensibilität der Oligodendrozyten gegenüber Hyperoxie-vermittelten Schädigungsmechanismen von der Reife der Zellen abhängig. Während bei Prä-Oligodendrozyten nach 24 h Hyperoxie kaum vitale Zellen nachweisbar waren, ist bei reifen Oligodendrozyten keine Vulnerabilität gegenüber hohen Sauerstoffkonzentrationen zu verzeichnen. [41] [42] [81]. Wie vorangehend angedeutet, könnten auch diese Ergebnisse ein Hinweis sein, dass besonders unreife Zellen des Zerebrums eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber hohen Sauerstoffkonzentrationen aufweisen. Möglicherweise spielen ähnliche Mechanismen eine Rolle im unreifen Gehirn des Frühgeborenen. Ein weiteres Indiz für die Fragilität unreifer zerebraler Zellen ist im Ergebnis von Back et al. (1998) dargestellt. Unreife primäre Prä-Oligodendrozyten der Ratte gehen nach

Unterdrückung von Cystin als eine Form des künstlich generierten oxidativen Stress signifikant häufiger in den Zelltod als reife Oligodendrozyten [82].

4.2.2 Neuronen

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass hohe Sauerstoffkonzentrationen (80 % O₂) in den untersuchten Zeiträumen von 24 - 72 h zu einem signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen in der C8-D1A Astrozytenzellkultur führte. Studien betrachten die Auswirkungen von Hyperoxie auch an Neuronen als eine wichtige Zellspezies des Zerebrums. Die Exposition neonataler Ratten in 80 % O₂ löste ausgedehnte Apoptose der Neuronen und einen Anstieg der Caspase-1 aus. Das Enzym Caspase-1 ist sowohl in der Aktivierung inflammatorischer als auch apoptotischer Prozesse involviert. In dieser Studie (Felderhoff-Müser et al. 2005) ergaben sich Hinweise, dass IL-18 und IL-1 β im Prozess des Hyperoxie-induzierten Zelltods beteiligt sind. Denn IRAK-4 (Interleukin-1 Receptor Associated Kinase 4) Knockout Mäuse zeigten nach 24 h Inkubation in 80 % O₂ eine signifikante Reduktion apoptotischer Prozesse im Vergleich zum Wildtyp [43]. Weitere Forschungsergebnisse zeigen, dass hohe Sauerstoffkonzentrationen über die Induktion von Zelltod hinaus zelluläre Modifikationen induzieren. Die kortikalen Neurone neugeborener Ferkel reagierten auf eine einstündige inspiratorische Inhalation von FiO₂ \geq 95 % mit Modifikationen der Zellmembran, was in einem erhöhten Influx von Calcium in die Zelle resultierte. Durch den intrazellulären Calcium-Anstieg fand wiederum eine Aktivierung der Calcium-Calmodulin Proteinkinase statt, die die Expression proapoptotischer Proteine (cAMP response element binding protein CREB) förderte [83]. Aber auch die Unreife des Organismus und das unreife oxidative System begünstigen wahrscheinlich zerebral-degenerative Mechanismen. Ratan et al. (1998) fanden eine signifikante Zunahme der Apoptose (in der Fluoreszenz Mikroskopie und LDH-Freisetzung) von fetalen Neuronen der Ratte nach extrazellulärer Erhöhung des Glutamat-Spiegels und damit einhergehender Reduktion von Gluthation. Schutz vor diesem Prozess boten die Antioxidantien Idebenone und butylierte Hydroxyanisole [84].

Über die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinaus gibt es viele weitere Erklärungsansätze für Schädigungsmechanismen zerebraler Zellen. Neben Hyperoxie-induzierter Effekte, die hier eingehend betrachtet werden, spielt zum Beispiel auch das unreife oxidative Schutzsystem des Frühgeborenen eine Rolle.

4.3 Hyperoxie hemmt die Proliferation von C8-D1A Astrozyten

Die Experimente dieser Arbeit zeigen, dass die 24 - und 48 - stündige Inkubation der C8-D1A Astrozytenzellkultur in 80 % O₂ zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation führte. Hyperoxie-exponierte Zellen proliferierten nach 24 h zu durchschnittlich 25 % während sich in der Normoxie-inkubierten Gruppe sich circa 55 % der Zellen teilten. Dieses Ergebnis konnte mit der quantitativen Bestimmung von Cyclin D2 bestätigt werden. Nach 24 h in 80 % O₂ sank die Expression des Zellzyklusmediators um 20 %. Dieses Resultat spricht für ein Verharren der Astrozyten im Zellzyklus. Auch an primären Astrozytenkulturen der Ratte wurden Auswirkungen der Hyperoxie auf das Zellteilungsverhalten festgestellt. In der elektronenmikroskopischen Auswertung nach Ki67-Markierung zeigte sich nach 48 h Inkubation in 80 % O₂ eine reduzierte Anzahl proliferierender GFAP⁺- und Vimentin⁺-Astrozyten. Dies spricht für eine Hemmung der Proliferation unter hohen Sauerstoffkonzentrationen [73]. Eine Beeinflussung der Proliferation durch Sauerstoff wurde auch bei Typ II-Alveozyten der Ratte in vitro dokumentiert. Da Hyperoxie ein entscheidender Risikofaktor für die Entwicklung der bronchopulmonalen Dysplasie ist, stehen auch Zellen der unreifen Lunge im Interesse der Hyperoxie-Forschung. Die Inkubation von Alveozyten in 95 % O₂ für 24 - 72 h führte in allen Zeitfenstern zur signifikant erniedrigten Expression des Ki-67 Proteins, welches in den aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird. Zusätzlich verharrten die untersuchten Zellen nach 72 h zu großen Teilen in der G1-Phase des Zellzyklus. Die verminderte Proliferationsrate der Typ II Alveozyten in Hyperoxie könnte somit durch einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase begründet sein [85]. Solch eine Hyperoxie-vermittelte Proliferationshemmung durch einen Arrest des Zellzyklus konnte auch nach 48 h in 95 % O₂ für periphere Epithelzellen der Lunge (A549 Zellen) gezeigt werden [86]. Möglicherweise wird durch Hyperoxie auch in der hier untersuchten Astrozytenzellkultur ein Zellzyklusarrest induziert. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde die Bestimmung der Zellzyklusphase mittels Durchflusszytometrie versucht, doch die Zellkultur erwies sich als ungeeignet für dieses Verfahren.

Die proliferationshemmende Wirkung hoher Sauerstoffkonzentrationen ist auch für die Tumorforschung von Bedeutung. In Nacktratten wurde mittels der BT4C-Zelllinie ein Gliom induziert. Die dreimalige Hyperoxie-Behandlung (O₂>97 % à 90 Minuten) zeigte eine leichte, nicht-signifikante Abnahme der Zellteilung des Tumors [87]. Möglicherweise bestehen Übereinstimmungen mit der hier untersuchten C8-D1A Astrozytenzellkultur,

die einem Astrozytom ähnelt und daher vergleichbare Zellteilungseigenschaften zum untersuchten Gliom besitzt.

Andere Forschungsarbeiten offenbaren kontroverse Ergebnisse: Eine erhöhte Proliferationsrate nach Hyperoxie-Exposition zeigte sich hingegen in Experimenten mit Astrozyten neonataler Mäuse *in vivo*. Der Proliferationsmarker Proliferating Cell Nuclear (PCNA) stieg nach 48 h in 95 % O₂ signifikant an. [70].

4.4 Pro und Contra: Protektives Potential von Progesteron

Die Erkenntnis, dass hohe Sauerstoffkonzentrationen zerebrale Zellen schädigen, warf die Frage nach potenten protektiven Agenzien auf. Während der Schwangerschaft ist der Fötus steigenden Konzentrationen von Östrogen und Progesteron ausgesetzt. Das frühgeborene Kind erlebt einen drastischen und in diesem Zeitraum unphysiologischen Abfall dieser Hormone. Auf diesem Wissen basiert die Annahme, dass die Präsenz hoher, während der Gravidität vorherrschender Hormonkonzentrationen, das unreife Gehirn schützen könnten. Arbeitshypothese der vorliegenden Abhandlung ist das Überprüfen einer möglichen protektiven Wirkung von Progesteron gegenüber Hyperoxie-induzierter Zellschädigung. In der C8-D1A Astrozytenzellkultur konnte das Hormon (P 10⁻⁵ M, 10⁻⁷ M und 10⁻⁹ M) keinen Schutz vor apoptotischen Prozessen bieten. Eine mögliche Erklärung für die fehlenden Protektion ist auf molekularbiologischer Ebene zu finden. Hyperoxie (80 % O₂) induzierte bereits nach 24 h eine Herunterregulation der Progesteronrezeptoren auf 20 % (PR-AB) beziehungsweise 35 % (PR-B). Eine Wirkung des Hormons an der Zielzelle konnte somit nur bedingt stattfinden. Weiterhin zeigten die vorliegenden Untersuchungen eine signifikante Abnahme der Zellvitalität unter den Progesteronkonzentrationen 10⁻⁵ M, 10⁻⁷ M und 10⁻⁹ M. Ein programmierter Zelltod beziehungsweise der Zelluntergang durch Nekrose konnte mittels ELISA-Verfahren und Laktatdehydrogenase-Test ausgeschlossen werden. In der CFSE-basierten Durchflusszytometrie deutete sich nach 48 h Progesteroneinwirkung eine reduzierte Proliferation der Astrozyten an. Im MTT-Metabolisierungstest war bereits nach 24 h eine verminderte Vitalität zu verzeichnen.

Es gibt Forschungsergebnisse die den in dieser Arbeit beschriebenen inhibierenden Effekt von Progesteron unterstützen. In einer Studie von Atif et al. (2011) wurde ein Tumor-hemmender Effekt von Progesteron auf eine *in-vitro*-Kultur des Neuroblas-

toms untersucht: Progesteron führte zu einer signifikanten Zunahme der Apoptose in Neuroblastom-Zellen. Außerdem erfolgte eine signifikante Abnahme des Proliferationsmarkers Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) um 41 %. Die Induktion von Apoptose durch hohe Progesteronkonzentrationen konnte auch in vivo an Nacktmäusen mit induziertem Neuroblastom repliziert werden [88]. Ein hemmender Effekt auf die Proliferation zeigte sich auch durch die Zufuhr von Progesteron nach experimentell induzierter zerebraler Ischämie in Striatum, Hippocampus und subventrikulären Arealen adulter Mäuse. Mit Bromodesoxyuridin (BrdU) wurde die Zellteilungsaktivität der Neuronen gemessen. Nach zerebraler Ischämie zeigte sich eine gesteigerte Proliferationsrate in den beschriebenen Hirnarealen gefolgt von massiven Zelluntergängen nach zwei Wochen. Die exogene Zufuhr von 4mg/kg Progesteron führte zu einer signifikanten Inhibition dieser Ischämie-stimulierten Proliferation der Vorläuferzellen [89].

Einhergehend mit den in dieser Arbeit beschriebenen Wirkungen von Progesteron auf die C8-D1A Astrozytenzellkultur in vitro zeigte sich auch in anderen experimentellen Modellen ein adverser Effekt durch die exogene Zufuhr von Progesteron. Die Behandlung ovariectomierter Ratten mit Progesteron nach zweistündiger Ligatur der Arteria cerebri media und anschließender Reperfusion führte zu einem signifikant größeren Infarktareal im Nucleus Caudatus und Putamen. Die Infarktgröße im Cortex unterlag hingegen keiner hormoneller Beeinflussung [90]. Tsuji et al. (2011) untersuchten am unreifen Gehirn der Ratte mögliche protektive Eigenschaften der Neurosteroid Progesteron und dessen Metabolit Allopregnanolon (je 10mg/kg x 3) nach hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung durch Ligatur der Arteria carotis. Die Untersuchung von Cortex, Striatum, Hippocampus und Thalamus zeigte insbesondere in der ersten Lebenswoche eine signifikante Verkleinerung der betroffenen Hirnhemisphäre sowie einen signifikant schlechteren neuropathologischen Score in der Hormon-behandelten Versuchsgruppe. Dieser Effekt war in 14 und 21 Tage alten Ratten weniger ausgeprägt, was wiederum für die besondere Vulnerabilität des Gehirns in der ersten Lebenswoche spricht [91]. Weiterhin offenbarte eine Untersuchung zur zerebrovaskulären Inflammation bei ovariectomierten Ratten einen adversen Effekt von Progesteron und Östrogen. Durch Injektion des bakteriellen Endotoxins Lipopolysaccharid (LPS) wurden die proinflammatorischen Enzyme Cyclooxygenase-2 und Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) aktiviert und somit eine zerebrovaskuläre Entzündung induziert. Ratten, die mit Östrogenen behandelt wurden, zeigten eine reduzierte Inflammation während die

exogene Zufuhr von Progesteron die inflammatorische Antwort auf LPS verstärkte. Die Behandlung mit beiden Hormonen hob die Effekte von Progesteron wiederum auf [92]. Diese konträre Auswirkung der Hormone Progesteron und Östrogen findet sich auch bei Gegenüberstellung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit der Publikation von Huppmann et al. (2008), welche einen protektiven Effekt von 17β -Estradiol auf C8-D1A Astrozyten nach Hyperoxie-vermittelter Schädigung zeigen konnten [39]. Die Auswirkung der exogenen Zufuhr der weiblichen Steroide ist demzufolge differenziert zu betrachten und weitere Forschung notwendig. Möglicherweise besteht ein protektives Potenzial von Progesteron in Anwesenheit von Östrogen. In Betracht gezogen muss auch, dass die gewählten Progesteronkonzentrationen in den Experimenten häufig höher als der physiologische Hormonspiegel lagen.

Der Arbeitshypothese dieser Abhandlung lag die Annahme zugrunde, dass Progesteron ein zerebral-protektives Potential besitzt. Viele Forschungsergebnisse sprechen für diese Eigenschaft. Experimentelle Untersuchungen zur ischämischen Hirnschädigung konnten einen protektiven Nutzen des Hormons zeigen. Die Zufuhr von Progesteron (8mg/kg) nach dem Verschluss der Arteria cerebri media reduzierte das Infarktvolume um 54 % im Vergleich zur kontralateralen Hirnhälfte. Auch die motorischen Fähigkeiten der Ratten waren signifikant besser unter exogener Hormonzufuhr [93] [94]. Dieser positive Einfluss von Hormonen auf das Gehirn nach einem schädigenden Ereignis zeigt sich möglicherweise auch schon auf dem Level endogener Hormonkonzentrationen. Nach ischämischen Hirninfarkt zeigten weibliche Ratten ein kleineres Infarktareal im zerebralen Kortex und einen besseren zerebralen Blutfluss als männliche Versuchstiere [95].

4.4.1 Protektion vor Hyperoxie-bedingten Schädigungen: Was sind mögliche Ansätze?

In der vorliegenden Arbeit konnte die eingangs beschriebene Hypothese nicht bestätigt werden. In der Literatur werden viele Studien beschrieben, die einen protektiven Nutzen von Hormonen auf das unreife Gehirn belegen. Zum Beispiel scheint 17β -Estradiol ein potentes protektives Agens für zerebrale Zellen zu sein [39] [42]. Für die in dieser Arbeit untersuchte C8-D1A Astrozytenzellkultur konnte eine Hormon-vermittelte Protektion der Zellen vor Hyperoxie-bedingten Schädigungen gefunden werden. Nach einer 72-stündigen Präinkubation mit $0.1 \mu\text{M}$ 17β -Estradiol und anschließender Inku-

bation in Hyperoxie für 24 h sank die Caspase-3 um das Doppelte. Somit schützte das der Zellkultur zugeführte Östrogen vor Hyperoxie-induzierter Apoptose, die in nicht behandelten Kontrollzellen beobachtet wurde [39]. 17- β -Estradiol scheint auch positiv auf das unreife Hirn von Rattenjungen zu wirken. Bei Anwesenheit des Hormons wurde die apoptotische Neurodegeneration – hervorgerufen durch die Kombination von Hyperoxie und GABA_A-Rezeptor Blockade – vermindert. Dieser neuroprotektive Effekt konnte durch den Östrogenantagonisten Tamoxifen aufgehoben werden [96]. Möglicherweise kann Progesteron in Anwesenheit von Östrogen protektiv auf Hyperoxie-bedingte Schädigung in zerebralen Zellen wirken. Untersuchungen mit der Kombination von Östrogen und Progesteron könnten Aufschluss über diese potentiellen Mechanismen geben.

Auch nicht-hormonelle Einflüsse und Substanzen können protektiv auf Hyperoxie-bedingte Schädigung zerebraler Zellen wirken. Zum Beispiel zeigte sich eine Reduktion des oxidativen Stresses in zerebralen Zellen neonataler Ratten, wenn diese vor Hyperoxie-Exposition intraperitoneal Erythropoietin (20.000 IU/kg) zugeführt bekamen. Die Behandlung mit rekombinantem Erythropoietin verursachte eine signifikante Abnahme der Hyperoxie-induzierten Hochregulation von oxidiertem Glutathion [97]. Außerdem scheint die Inhibition von Caspasen, die eine zentrale Rolle in der Ausführungsphase der Apoptose spielen, eine mögliche Strategie zur Protektion des unreifen Gehirns zu sein. Der Caspasen-Inhibitor TRP601 (hemmt Caspase 2 und 3) wirkt schützend gegenüber den Schädigungsmechanismen von Hyperoxie. Nach 24-stündiger Inkubation von Rattenjungen in 80 % O₂ stieg die Rate an toten Zellen im unreifen Gehirn drastisch an. Eine signifikante Reduktion des Zelltods war zu verzeichnen, wenn die Tiere intraperitoneal mit TRP 601 (1 mg/kg) behandelt wurden. Weiterhin zeigte sich unter TRP601 eine verminderte Schädigung im Kortex und der weißen Substanz nach arteriellem Gefäßverschluss und nach einem hypoxisch-ischämischen Ereignis [98] [99].

4.4.2 Klinische Studien

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche an der C8-D1A Astrozytenzelllinie stellen ein experimentelles Modell dar, das nur bedingt Rückschlüsse auf das Geschehen im humanen Frühgeborenen zulässt. Es gibt klinische Studien, die die Effekte therapeutischer Hormonzufuhr bei Frühgeborenen untersuchen. Extrem kleinen Frühgeborenen wurden in einer randomisierten, doppelt-verblindeten Studie für sechs

Wochen Östrogen und Progesteron, in Höhe der für die Reife entsprechenden intrauterinen Konzentrationen zunächst intravenös und später transdermal zugeführt. Die Gruppe der hormonbehandelten Neugeborenen zeigte ein reduziertes Vorkommen chronischer Lungenkrankheiten sowie verbesserte Knochenmineralisation [52]. Die Follow-up Studie bei einem Alter von 15 Monaten der ehemaligen extrem kleinen Frühgeborenen konnte einen Trend zur verbesserten psychomotorischen Entwicklung in der Gruppe der hormonbehandelten Kinder zeigen [54]. Eine weitere Folgeuntersuchung wurde bei einem korrigierten Alter von fünf Jahren der ehemals Frühgeborenen durchgeführt. Tendenzen zu einem größeren Kopfumfang in der Hormon-behandelten Gruppe zeichneten sich ab, die jedoch nicht signifikant waren. Die postnatale Zufuhr von Östrogen und Progesteron bewirkte in dieser Studie ein signifikant vermindertes Risiko für die Entwicklung einer infantile Zerebralparese, Ametropie und Spastik. Die kognitiven Fähigkeiten in der Hormonbehandelten-Versuchsgruppe (gemessen über Kaufmann Assessment Battery für Children) lag signifikant über denen der Placebo-behandelten Kinder [100]. Diese klinische Studie zeigt Tendenzen einer verbesserten neurokognitiven Entwicklung Frühgeborener nach postnataler Zufuhr von Progesteron und Östrogen. Darüber hinaus ist wahrscheinlich, dass diese Hormone einen positiven Einfluss auf weitere Morbiditäten des Gehirns haben. Um diese Hypothese zu festigen, sind weitere Studien mit größeren Versuchsgruppen nötig ebenso wie die Erforschung weiterer protektiver Mediatoren.

4.5 Einschränkungen der Studie

Bei Betrachtung der Ergebnisse müssen die Einschränkungen der Studie beachtet werden. Zunächst ist das von den realen Bedingungen im Organismus abweichende Modell des Experiments zu nennen. Die C8-D1A Astrozytenzellkultur ist eine in vitro Zellkultur, die von adulten Mäusen stammt. Es wurde nur eine Zelllinie isoliert untersucht, die nicht mit dem humanen Zentralnervensystem gleichzusetzen ist. Rückschlüsse auf Mechanismen im humanen Organismus oder gar im Frühgeborenen können nur bedingt getroffen werden. Weitergehende Untersuchungen in vivo, welche die Dynamik im Organismus besser darstellen, werden daher angestrebt. Weiterhin ist das Erforschen der Effekte von Hormonen, insbesondere Progesteron, auf andere zerebrale Zellspesies wichtig für eine vollständige Erfassung der Thematik.

Als Grundlage der zu untersuchenden Progesteronkonzentrationen diene die Unter-

suchung von Wong et al. (2009) [63]. Eine konkrete Aussage über die tatsächlichen Konzentrationen von Progesteron im Gehirn des Frühgeborenen und speziell in Astrozyten ist jedoch nicht möglich. Deshalb stehen die Ergebnisse dieser Arbeit für ein experimentell erstelltes Modell, welches artifiziell Charakter unterliegt.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Der vorliegenden wissenschaftlichen Auseinandersetzung liegt die Hypothese zugrunde, dass Progesteron protektiv auf Hyperoxie-induzierte Schädigung von C8-D1A Astrozyten wirkt. Diese Annahme konnte anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigte sich eine reduzierte Zellvitalität der kultivierten Zellen bei 21 % O₂ in Gegenwart von Progesteron. Die weiterführenden Untersuchungen zu Zelltod (Apoptose und Nekrose) konnten keine Antwort auf ursächliche Mechanismen bieten. Die Durchflusszytometrie CFSE-gefärbter Astrozyten zeigte nach 48 h eine angedeutete nicht signifikante Hemmung der Proliferation unter Progesteron 10⁻⁹ M. Die Bestätigung und Analyse dieses Mechanismus könnte Gegenstand weiterer Forschungsarbeit sein. Ein weiterer Schritt ist die Durchführung der Experimente in vivo. Das Einbeziehen weiterer Zellspezies würde ein umfassendes Verständnis der Progesteron-induzierten Mechanismen bieten. Möglicherweise haben hohe Sauerstoffkonzentrationen keinen Einfluss auf die Rezeptorexpression anderer Zellspezies und die Entfaltung protektiver Eigenschaften von Progesteron würde somit ermöglicht. Die kontroversen Publikationen zu Progesteron zeigen, dass das Neurosteroid wahrscheinlich unterschiedliche Effekte auf verschiedene Zellen haben kann. Weitere Untersuchungen könnten besonderen Fokus auf die Auswirkung des Hormons auf unreife zerebrale Zellen legen. Auch das Spezifizieren der Wirkmechanismen von Progesteron, insbesondere über membrangebundene Rezeptoren, bietet Ansatz für weitere Forschungsarbeit. Weitere Versuche mit Progesteron in experimenteller Hyperoxie könnten Inhalt weiterführender Studien sein. Insbesondere die Identifikation zerebral-protektiver Agenzien für das unreife Gehirn sollte in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die Überlebenschancen sehr kleiner Frühgeborener mit dem Fortschritt der neonatologischen Intensivmedizin weiterhin steigt. Die verbesserte Langzeitentwicklung betroffener Kinder ist ein wichtiger Aspekt neonatologischer Therapiekonzepte, der durch intensive Forschungsarbeit weiterhin im Fokus steht.

Literatur

- [1] HOWSON, CP ; KINNEY, MV ; LAWN, JE: Born to soon. The global action report on preterm birth. In: *World Health Organisation* (2012)
- [2] LAWN, J ; WILCZYNSKA-KETENDE, K ; COUSENS, S: Estimating the causes of 4 million neonatal deaths in the year 2000. In: *International Journal of Epidemiology* 35 (2006), S. 706–718
- [3] INGEMARSSON, I: Gender aspects of preterm birth. In: *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 110 (2003), S. 34–38
- [4] VOIGT, M ; BRIESE, V ; CARSTENSEN, M ; WOLTERDORF, F ; HALLIER, E ; STRAUBE, S: Age-specific preterm birth rates after exclusion of risk factors - an analysis of the german perinatal survey. In: *Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie* 214 (2010), S. 161–166
- [5] BECK, S ; WOJDYLA, D ; SAY, L ; BETRAN, AP ; MERALDI, M ; REQUEJO, JH ; RUBENS, C ; MENON, R ; VAN LOOK, PFA: The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. In: *Bulletin - World Health Organization* 88 (2010), S. 31–38
- [6] TANDBERG, A ; BJORGE, T ; NYGARD, O ; BOHRDAHL, PE ; SKJAERVEN, R: Trends in incidence and mortality for triplets in Norway 1967-2006: the influence of assisted reproductive technologies. In: *BJOG* 117 (2010), S. 667–675
- [7] DELPISHEH, A ; BRABIN, L ; ATTIA, E ; BRABIN, B: Pregnancy late in life: a hospitalbased study of birth outcomes. In: *Journal of Womens Health* 17 (2008), S. 965–970
- [8] JAHROMI, BN ; HUSSEINI, Z: Pregnancy outcome at maternal age 40 and older. In: *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 47 (2008), S. 318–321
- [9] VOIGT, M ; BRIESE, V ; PIETZNER, V ; KIRCHENGAST, S ; SCHNEIDER, K ; STRAUBE, S ; JORCH, G: Evaluierung von mütterlichen Merkmalen als Risikofaktoren für Frühgeburtlichkeit (Einzel- und Kombinationswirkung). In: *Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie* 213 (2009), S. 138–146
- [10] OBLADEN, M: Historical notes on immaturity. Part 2: Surviving against the odds. In: *Journal of Perinatal medicine* 39 (2011), S. 571–577
- [11] LEHTONEN, L ; L, Rautava ; KORVENRANTA, E ; KORVENRANTA, H ; PELTOLA, M ; HINEN, U: PERFECT preterm infant study. In: *Annals of Medicine* 43 (2011), S. 47–53
- [12] STRASSBURG, H ; LEIMER, S ; PLATZ, A ; THOMAS, W: Langzeitprognose sehr kleiner Frühgeborener in Deutschland. In: *Klinische Pädiatrie* 220 (2008), S. 61–65

- [13] MANGHAM, L ; PETROU, S ; DOYLE, L ; DRAPER, E ; MARLOW, N: The cost of preterm birth throughout childhood in England and Wales. In: *Pediatrics* 123 (2009), S. 312–327
- [14] HOEHN, T ; FELDERHOFF-MUESER, U ; MASCHIEWSKIS, K ; STADELMANN, C ; SIFRINGER, M ; P, Bittigau ; KOEHNE, P ; HOPPENZ, M ; OBLADEN, M ; BUEHRER, C: Hyperoxia causes inducible nitric oxide synthase-mediated cellular damage to the immature rat brain. In: *Pediatric Research* 54 (2003), S. 179–174
- [15] DOHLEN, G ; CARLSEN, H ; BLOMHOF, R ; THAULOW, E ; SAUGSTAD, O: Reoxygenation of hypoxic mice with 100 per cent oxygen induces brain nuclear factor kappa B. In: *Pediatric Research* 58 (2005), S. 941–945
- [16] FABIAN, R ; PEREZ-POLO, R ; KENT, T: Perivascular nitric oxide and superoxide in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. In: *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 295 (2008), S. 1.809–1.814
- [17] KATTWINKEL, J ; PERLMAN, JM ; AZIZ, K ; COLBY, C ; FAIRCHILD, K ; GALLAGHER, J ; HAZINSKI, MF ; HALAMEK, LP ; KUMAR, P ; LITTLE, G ; MCGOWAN, JE ; NIGHTENGALE, B ; RAMIREZ, MM ; RINGER, S ; SIMON, WM ; WEINER, GM ; WYCKOFF, M ; ZAICHKIN, J: Part 15: neonatal resuscitation: 2010 American Heart Association guidelines for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care. In: *Circulation* 122 (2010), S. 909–19
- [18] SOLAS, AB ; KUTZSCHE, S ; VINJE, M ; SAUGSTAD, O: Cerebral hypoxemia-ischemia and reoxygenation with 21 % or 100 % oxygen in newborn piglets: Effects on extracellular levels of excitatory amino acids and microcirculation. In: *Pediatric critical care medicine* 2 (2001), S. 340–345
- [19] VENTO, M ; SASTRE, J ; ASENSI, MA ; VINA, J: Room-air resuscitation causes less damage to heart and kidney than 100 per cent oxygen. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 172 (2005), S. 1.393–1.398
- [20] WOOD, NS ; MARLOW, N ; COSTELOE, K ; GIBSON, AT ; WILKINSON, AR: Neurologic and developmental disability after extremely preterm birth. EPICure Study Group. In: *The New England Journal of Medicine* 343 (2000), S. 429–430
- [21] HACK, M ; FLANNERY, DJ ; SCHLUCHTER, M ; CARTAR, L ; BORAWSKI, E ; KLEIN, N: Outcomes in young adulthood for very-low-birth-weight infants. In: *The New England Journal of Medicine* 346 (2002), S. 149–157
- [22] LARSSON, H ; EATON, W ; MELDGAARD, K ; VESTERGAARD, M ; VINGGAARD OLESEN, A ; AGERBO, E ; SCHENDEL, D ; THORSEN, P ; MORTENSEN, PB: Risk factors for autism: perinatal factors, parental psychiatric history, and socioeconomic status. In: *American Journal of Epidemiology* 161 (2005), S. 916–925

- [23] JONES, P ; RANTAKALLIO, P ; HARTIKAINEN, AL ; ISOHANNI, M ; SIPILA, P: Schizophrenia as a long-term outcome of pregnancy, delivery, and perinatal complications: A 28-year follow-up of the 1966 north Finland general population birth cohort. In: *The American Journal of Psychiatry* 155 (1998), S. 355–364
- [24] COLLINS, MI ; LORENZ, J ; JETTON, J ; PANETH, N: Hypocapnia and other ventilation-related risk factors for cerebral palsy in low birth weight infants. In: *Pediatric Research* 50 (2001), S. 712–719
- [25] FELDERHOFF-MUESER, U ; BITTIGAU, P ; SIFRINGER, M ; JAROS, B ; KORO-BOWICZ, E ; MAHLER, L ; PIENING, T ; MOYISCH, A ; GRUNE, T ; THOR, F ; HEUMANN, R ; BUEHRER, C ; IKONOMIDOU, C: Oxygen causes cell death in the developing brain. In: *Neurobiology of Disease* 17 (2004), S. 273–282
- [26] NOSARTI, C ; AL-ASADY, M ; FRANGOU, S ; STEWART, AL ; RIFKIN, L ; MURRAY, R: Adolescents who were born preterm have decreased brain volumes. In: *Brain* 125 (2002), S. 1.616–1.623
- [27] MENT, L ; VOHR, B ; ALLAN, W ; KATZ, K ; SCHNEIDER, K ; WESTERVELD, M ; DUNCAN, C ; MAKUCH, R: Change in cognitive function over time in very low-birth-weight infants. In: *JAMA* 289 (2003), S. 705–711
- [28] HUTTENLOCHER, PR: Morphometric study of human cerebral cortex development. In: *Neuropsychologia* 28 (1990), Nr. 6, S. 517–527
- [29] O'DONOVAN, D ; FERNANDES, C: Mitochondrial glutathione and oxidative stress: Implications for pulmonary oxygen toxicity in premature infants. In: *Molecular Genetics and Metabolism* 71 (2000), S. 352–358
- [30] FARSTAD, T ; BRATLID, D ; MEDBO, S ; MARKESTAD, T ; GROUP, The Norwegian Extreme Prematurity S.: Bronchopulmonary dysplasia – prevalence, severity and predictive factors in a national cohort of extremely premature infants. In: *Acta Paediatrica* 100 (2010), S. 53–58
- [31] EBER, E ; ZACH, M S.: Long term sequelae of bronchopulmonary dysplasia (chronic lung disease of infancy). In: *Thorax* 56 (2001), S. 317–323
- [32] COALSON, J: Pathology of bronchopulmonary dysplasia. In: *Seminars in Perinatology* 30 (2006), S. 179–184
- [33] SCHWARTZ, R ; LUBY, A ; SCANLON, J ; KELLOGG, R: Effect of surfactant on morbidity, mortality and resource use in newborn infants weighing 500 to 1500g. In: *The new England Journal of Medicine* 330 (1994), S. 1.476–1.480
- [34] BIRCH, E ; O'CONNOR, A: Preterm birth and visual development. In: *Seminars in Neonatology* 6 (2001), S. 487–497
- [35] SAUNDERS, KJ ; MCCULLOCH, DL ; SHEPHERD, AJ ; WILKINSON, AG: Emmetropisation following preterm birth. In: *Clinical Science* 86 (2002), S. 1035–1040

- [36] MCLEOD, S ; CRONE, S ; LUTTY, G: Vasoproliferation in the neonatal dog model of oxygen-induced retinopathy. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 37 (1996), S. 1.322–1.333
- [37] FLYNN, J ; BANCALARI, E ; SIM SNYDER, E ; GOLDBERG, RN ; FEUER, W ; CASSADY, J ; SCHIFFMAN, J ; FELDMAN, HI ; BACHYNSKI, B ; BUCKLEY, E ; ROBERTS, J ; GILLINGS, D: A cohort study of transcutaneous oxygen tension and the incidence and severity of retinopathy of prematurity. In: *The New England Journal of Medicine* 326 (1992), S. 1078–1080
- [38] TIN, W ; MILLIGAN, D ; PENNEFATHER, P ; HEY, E: Pulse oximetry, severe retinopathy, and outcome at one year in babies of less than 28 weeks gestation. In: *Archives of Disease in Childhood. Fetal and neonatal edition* 84 (2001), S. 106–110
- [39] HUPPMANN, S ; ROEMER, S ; ALTMANN, R ; OBLADEN, M ; BERNIS: 17beta-estradiol attenuates hyperoxia-induced cell death in Mouse C8-D1A cell line. In: *Journal of Neuroscience Research* 86 (2008), S. 3420–3426
- [40] LAVRIK, I ; GOLKS, A ; KRAMMER, P: Caspases: pharmacological manipulation of cell death. In: *The Journal of Clinical Investigation* 115 (2005), S. 2.665–2.672
- [41] GERSTNER, B ; BHRER, C ; RHEINLER, C ; POLLEY, O ; SCHLLER, A ; BERNIS, M ; OBLADEN, M ; FELDERHOFF-MUESER, U: Maturation-Dependent Oligodendrocyte Apoptosis Caused by Hyperoxia. In: *Journal of Neuroscience Research* 84 (2006), S. 306–315
- [42] GERSTNER, B ; SIFRINGER, M ; DZIETKO, M ; SCHUELLER, A ; LEE, J ; SIMONS, S ; OBLADEN, M ; VOLPE, J ; ROSENBERG, P ; FELDERHOFF-MUESER, U: Estradiol attenuates hyperoxia-induced cell death in the developing white matter. In: *Annals of Neurology* 61 (2007), S. 562–573
- [43] FELDERHOFF-MUESER, U. ; SIFRINGER, M. ; POLLEY, O ; DZIETKO, M ; LEI-NEWEBER, B ; MAHLER, L ; BAIER, M ; P, Bittigau ; OBLADEN, M ; IKONOMIDOU, C ; BUEHRER, C: Caspase-1-processed interleukins in hyperoxia-induced cell death in the developing brain. In: *Annals of Neurology* 57 (2005), S. 50–59
- [44] MAHESH, V ; DHANDAPANI, K ; BRANN, D: Role of astrocytes in reproduction and neuroprotection. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 246 (2006), S. 1–9
- [45] ARAQUE, A ; CARMIGNOTO, G ; HAYDON, PG: Dynamic signaling between astrocytes and neurons. In: *Annual Reviews* 63 (2001), S. 795–813
- [46] HATTEN, M: Riding the glial monorail: a common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. In: *Trends in Neuroscience* 13 (1990), S. 179–184

- [47] BAULIEU, E. E. ; ROBEL, P ; SCHUMACHER, M: Neurosteroids. A new regulatory function in the nervous system. In: *Humana Press, Totowa* (1999), S. 1–378
- [48] SCHUMACHER, M ; GUENNON, R ; ROBERT, F ; CARELLI, C ; GAGO, N ; GHOU-MARI, A ; GONZALEZ DENISELLE, MC ; GONZALEZ, SL ; IBANEZ, C ; LABOMBARDA, F ; COIRINI, H ; BAULIEU, E ; DENICOLA, AF: Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. In: *Growth Hormon & IGF Research* 14 (2004), S. 18–33
- [49] TSUTSUI, K ; UKENA, K ; USUI, M ; SAKAMOTO, H ; TAKASE, M: Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. In: *Neuroscience Research* 36 (2000), S. 261–273
- [50] BERNINGER, B ; COSTA, M ; KOCH, U ; SCHROEDER, T ; SUTOR, B ; GROTHE, B ; GOETZ, M: Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia. In: *Journal of Neuroscience* 27 (2007), S. 8.654–8.664
- [51] SHUGHRUE, P ; LANE, M ; MERCHENTHALER, I: Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. In: *The Journal of comparative Neurology* 388 (1997), S. 507–525
- [52] TROTTER, A ; MAIER, L ; GRILL, HJ ; KOHN, T ; HECKMANN, M ; POHLANDT, F: Effects of postnatal estradiol and progesterone replacement in extremely preterm infants. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84 (1999), S. 4.531–4.535
- [53] TROTTER, A ; POHLANDT, F: The replacement of oestradiol and progesterone in very premature infants. In: *Annals of Medicine* 32 (2000), S. 608–614
- [54] TROTTER, A ; BOKELMANN, B ; SORGO, W ; BECHINGER-KORNHUBER, D ; HEINEMANN, H ; SCHMUECKER, G ; OESTERLE, M ; KOEHNTOP, B ; BRISCH, KH ; POHLANDT, F: Follow-up examination at the age of 15 months of extremely preterm infants after postnatal estradiol and progesterone replacement. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86 (2001), S. 601–603
- [55] WANG, JM ; JOHNSTON, PB ; BALL, BG ; DIAZ BRINTON, R: The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. In: *The Journal of Neuroscience* 25 (2005), S. 4706–4718
- [56] DJEBAILI, M ; S, Hoffmann ; STEIN, D: Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat pre-frontal cortex. In: *Neuroscience* 123 (2004), S. 349–359
- [57] GHOU-MARI, A ; IBANEZ, C ; EL-ETR ; LECLERC, P ; EYCHENNE, B ; MALLEY, B ; BAULIEU, E ; SCHUMACHER, M: Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. In: *Journal of Neurochemistry* 86 (2003), S. 848–859

- [58] GHOUMARI, A.M. ; BAULIEU, E. E. ; SCHUMACHER, M.: Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures. In: *Neuroscience* 135 (2005), S. 47–58
- [59] ALLIOT, F ; PESSAC, B: Astrocytic cell clones derived from established cultures of 8-day postnatal mouse cerebella. In: *Brain Research* 306 (1984), S. 283–291
- [60] LACROIX-FRALISH, M ; TAWFIK, V ; NUTILE-MCMENEMY, N ; HARRIS, B ; DELEO, J: Differential regulation of neuregulin 1 expression by progesterone in astrocytes and neurons. In: *Neuron Glia Biology* 2 (2006), S. 227–234
- [61] ECKERT, R ; KATZENELLENBOGEN, B: Effects of estrogens and antiestrogens on estrogen receptor dynamics and the induction of progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells. In: *Cancer Research* 42 (1982), S. 139–144
- [62] MOSMANN, T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *Journal of Immunological Methods* 65 (1983), S. 55–63
- [63] WONG, A ; ROZOVSKY, I ; ARIMOTO, J ; DU, Y ; WEI, M ; MORGAN, T ; FINCH, C: Progesterone influence on neurite outgrowth involves microglia. In: *Endocrinology* 150 (2009), S. 324–332
- [64] SZEKERES, J. ; PACSA, AS ; PEJTSIK, B: Measurement of Lymphocyte Cytotoxicity by Assesing Endogenous Alkaline Phosphatase Activity of the Target Cell. In: *Journal of Immunological Methods* 40 (1981), S. 151–154
- [65] SALGAME, P ; VARADHACHARY, A ; PRIMIANO, L ; FINCKE, JE ; MULLER, S ; MONESTIER, M: An ELISA for detection of apoptosis. In: *Nucleic Acids Research* 25 (1997), S. 680–681
- [66] ROCHE APPLIED SCIENCE (Hrsg.): *Cell Death Detection ELISApplus Manual*. Mannheim: Roche Applied Science, March 2010
- [67] LYONS, B ; PARISH, C: Determination of lymphocyte division by flow cytometry. In: *Journal of Immunological Methods* 171 (1994), S. 131–137
- [68] RODRIGUEZ-DORANTES, M ; CERBON, M ; LARRALDE, C ; MORALES-MONTOR, J: Modified progesterone receptor expression in the hypothalamus of cysticercotic male mice. In: *Acta Tropica* 103 (2007), S. 123–132
- [69] LIVAK, KJ ; SCHMITGEN, TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. In: *Methods* 25 (2001), S. 402–408
- [70] BRUNO, CJ ; GRECO, TM ; ISCHIROPOULOS, H: Nitric oxide counteracts the hyperoxia-induced proliferation and proinflammatory responses of mouse astrocytes. In: *Free Radical Biology and Medicine* 51 (2011), S. 474–479

- [71] DANILOV, C ; FISKUM, G: Hyperoxia promotes astrocyte cell death after oxygen and glucose deprivation. In: *Glia* 56 (2008), S. 801–808
- [72] MORI, H ; OIKAWA, M ; TAMAGAMI, T ; KUMAKI, H ; NAKAUNE, R ; AMANO, J ; AKINAGA, Y ; FUKUI, K ; ABE, K ; URANO, S: Oxidized proteins in astrocytes generated in a hyperbaric atmosphere induce neuronal apoptosis. In: *Journal of Alzheimer's Disease* 11 (2007), S. 165–174
- [73] SCHMITZ, T ; RITTER, J ; MUELLER, S ; FELDERHOFF-MUESER, U ; CHEW, LJ ; GALLO, V: Cellular changes underlying hyperoxia-induced delay of white matter development. In: *The Journal of Neuroscience* 31 (2011), S. 4.327–4.344
- [74] YIS, U ; KURUL, SH ; KUMRAL, A ; CILAKER, S ; TUGYAN, K ; GENC, S ; YILMAZ, O: Hyperoxic exposure leads to cell death in the developing brain. In: *Brain & Development* 30 (2008), S. 556–562
- [75] BITTIGAU, P ; SIFRINGER, M ; GENZ, K ; REITH, E ; POSPISCHIL, D ; GOVINDARAJALU, S ; DZIETKO, M ; PESDITSCHKEK, S ; MAI, I ; DIKRANIAN, K ; OLNEY, JW ; IKONOMIDOU, C: Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2002), S. 15.089–15.094
- [76] TAGLIALATELA, G ; PEREZ-POLO, JR ; RASSIN, D: Induction of apoptosis in the CNS during development by combination of hypoxia and inhibition of glutathione synthesis. In: *Free Radical Biology & Medicine* 25 (1998), S. 936–942
- [77] DALEN, M ; LIU, X ; ELSTAD, M ; LOBERG, E ; SAUGSTAD, O ; ROOTWELT, T ; THORESEN, M: Resuscitation with 100 % oxygen increases brain injury and counteracts the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia in the neonatal rat. In: *Pediatric Research* 71 (2012), S. 247–252
- [78] KOCH, JD ; MILES, DK ; J, Gilley ; C, Yang ; SG, Kernie: Brief exposure to hyperoxia depletes the glial progenitor pool and impairs functional recovery after hypoxic-ischemic brain injury. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 28 (2008), S. 1.294–1.306
- [79] MUNKEBY, B ; WENCHE, B ; BJORNLAND, K ; SIKKELAND, L ; BERGE, G ; HALVORSEN, B ; SAUGSTAD, O: Resuscitation with 100 % O₂ increases cerebral injury in hypoxemic piglets. In: *Pediatric Research* 56 (2004), S. 783–790
- [80] GRAFE, MR ; WOODWORTH, KN ; NOPPENS, K ; PEREZ-POLO: Long-term histological outcome after post-hypoxic treatment with 100 % or 40 % oxygen in a model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. In: *International Journal of Developmental Neuroscience* 26 (2008), S. 119–124
- [81] GERSTNER, B ; DESILVA, T ; GENZ, K ; ARMSTRONG, A ; BREHMER, F ; NEVE, R et a.: Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter. In: *The Journal of Neuroscience* 28 (2008), S. 1.236–1.245

- [82] BACK, S ; GAN, X ; LI, Y ; ROSENBERG, P ; VOLPE, J: Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. In: *Journal of Neuroscience Research* 18 (1998), S. 6.241–6.253
- [83] CHANG, E ; HORNICK, K ; FRITZ, KI ; MISHRA, OP ; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M: Effect of hyperoxia on cortical neuronal nuclear function and programmed cell death mechanisms. In: *Neurochemical Research* 32 (2007), S. 1.142–1.149
- [84] RATAN, RR ; MURPHY, TH ; BARABAN, JM: Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. In: *Journal of Neurochemistry* 62 (1994), S. 376–379
- [85] LU, HY ; SHAO, GB ; LI, WB ; WANG, H: Effects of hyperoxia on transdifferentiation of primary cultured type II alveolar epithelial cells from premature rats. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 47 (2011), S. 64–72
- [86] MCGRATH-MORROW, S ; STAHL, J: Growth arrest in A549 cells during hyperoxic stress is associated with decreased cyclin B1 and increased p21(Waf1/Cip1/Sdi1) levels. In: *Biochimica et Biophysica Acta*. 1538 (2001), S. 90–97
- [87] STUHR, LEB ; RAA, A ; OYAN, AM ; KALLAND, KH ; SAKARIASSEN, PO ; PETERSEN, K ; BJERKVIG, R ; REED, RK: Hyperoxia retards growth and induces apoptosis, changes in vascular density and gene expression in transplanted gliomas in nude rats. In: *Journal of Neuro-Oncology* 85 (2007), S. 191–202
- [88] ATIF, F ; SAYEED, I ; YOUSUF, S ; TAUHEED, I ; HUA, F ; WANG, J ; BRAT, DJ ; STEIN, DG: Progesterone inhibits the growth of human neuroblastoma: In vitro and in vivo evidence. In: *Molecular Medicine* 17 (2011), S. 1.084–1.094
- [89] ZHANG, Z ; YANG, R ; CAI, W ; BAI, Y ; SOKABE, M ; CHEN, L: Treatment with progesterone after focal cerebral ischemia suppresses proliferation of progenitor cells but enhances survival of newborn neurons in adult male mice. In: *Neuropharmacology* 58 (2010), S. 930–939
- [90] MURPHY, SJ ; TRAYSTMAN, R. ; HURN: Progesterone exacerbates striatal stroke injury in progesterone-deficient female animals. In: *Stroke* 31 (2000), S. 1.173–1.178
- [91] TSUJI, M ; TAGUCHI, A ; OHSHIMA, M ; KASAHARA, Y ; IKEDA, T: Progesterone and allopregnanolone exacerbate hypoxic-ischemic brain injury in immature rats. In: *Experimental Neurology* 233 (2012), S. 214–220
- [92] SUNDAY, L ; TRAN, MM ; KRAUSE, DN ; DUCKLES, SP: Estrogen and progestagens differentially modulate vascular proinflammatory factors. In: *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 291 (2006), S. 261–267

- [93] ISHRAT, T ; SAYEED, I ; ATIF, F ; STEIN, G: Effects of progesterone administration on infarct volume and functional deficits following permanent focal cerebral ischemia in rats. In: *Brain Research* 1257 (2008), S. 94–101
- [94] GIBSON, CL ; MURPHY, SP: Progesteron enhances functional recovery after middle cerebral artery occlusion in male ice. In: *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 7 (2004), S. 805–13
- [95] ALKAYED, NJ ; HARUKUNI, I ; KIMES, AS ; LONDON, ED ; TRAYSTMAN, RJ ; HURN, PD: Gender-linked brain injury in experimental stroke. In: *Stroke* 29 (1998), S. 159–166
- [96] ASIMIADOU, S ; BITTIGAU, P ; FELDERHOFF-MUESER, U ; MANTHEY, D ; SIFRINGER, M ; PESDITSCHKEK, S ; DZIETKO, M ; KAINDL, AM ; PYTEL, M ; STUDNIARCZYK, D ; MOZRZYMAS, JW ; IKONOMIDOU, C: Protection with estradiol in developmental models of apoptotic neurodegeneration. In: *Annals of Neurology* 58 (2005), S. 266–276
- [97] SIFRINGER, M ; BRAIT, D ; WEICHELT, U et. a.: Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain. In: *Brain, Behavior, and Immunity* 24 (2010), S. 792–799
- [98] CHAUVIER, D ; RENOLLEAU, S ; HOLIFANJANIAINA, S ; BEZAULT, M ; SCHWENDIMANN, L ; ROUSSET, C ; CASIMIR, R ; HOEBEKE, J ; SMIRNOVA, M ; DEBRET, G ; TRICHET, AP ; CARLSSON, Y ; WANG, X ; BERNARD, E ; HEBERT, M ; RAUZIER, JM ; MATECKI, S ; LACAMPAGNE, A ; RUSTIN, P ; MARIANI, J ; HAGBERG, H ; GRESSENS, P ; C, Charriaut-Marlangue ; JACOTOT, E: Targeting neonatal ischemic brain injury with a pentapeptide-based irreversible caspase inhibitor. In: *Cell Death and Disease* 2 (2011), S. 1–11
- [99] SIFRINGER, M ; BENDIX, I ; BORNER, C ; ENDESFELDER, S ; HAEFEN, C von ; KALB, A ; HOLIFANJANIAINA, S ; PRAGER, S ; SCHLAGER, GW ; KELLER, M ; JACOTOT, E ; FELDERHOFF-MUESER, U: Prevention of neonatal oxygen-induced brain damage by reduction of intrinsic apoptosis. In: *Cell Death and Disease* 3 (2012), S. 1–8
- [100] TROTTER, A ; SEINMACHER, J ; KRON, M ; POHLAND, F: Neurodevelopmental Follow-Up at Five Years Corrected Age of Extremely Low Birth Weight Infants after Postnatal Replacement of 17-beta Estradiol and Progesterone. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97 (2012), S. 1.041–1.047

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Friederike Sophie Weber, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Effekte von Progesteron auf Hyperoxie-bedingte Schädigungsmechanismen in der C8-D1A Astrozytenzellkultur“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

10.12.2013

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht in der elektronischen Version der Arbeit veröffentlicht.

Publikationsliste

15. September 2012: Vortrag auf der 38. Jahrestagung des GNPI in Hamburg
„Untersuchung der Toxizität von Hyperoxie auf C8-D1A
Astrozyten und Protektionsmechanismen durch Progesteron und den Antagonisten RU-486“

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Christoph Bühler für die Anregung und Überlassung des Themas. Er hat mich bei der Verfassung der Arbeit auf bestmögliche Weise betreut und sehr wohlwollend gefördert. Ganz besonders danken möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. Monika Berns für ihre ausgezeichnete Anleitung und technischen Ratschläge. Ihre stetige Motivation und menschliche Unterstützung hat entscheidend zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern des Labors der Klinik für Neonatologie für ihre Unterstützung danken.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie und meinen Freunden für das große Verständnis, die aufmunternden Worte und die vielen wertvollen Anregung.