

Aus dem Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Center for Cardiovascular Research
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

**Katabole Veränderungen und deren Auswirkung auf
die Skelett- und Herzmuskulatur nach akutem
ischämischem Schlaganfall im Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Susanne Schust

Tierärztin aus Berlin

Berlin 2016

Journal-Nr.: 3828

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dr. Wolfram Döhner
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thöne-Reineke

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice; animal models; ischemia; stroke; catabolism; skeletal muscle; muscle weight; adipose tissue; body lean mass; water intake; food intake; activity; heart rate; cardiac output

Tag der Promotion: 19.12.2016

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-801-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2016

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2017

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Schlaganfall	3
2.1.1 Definition	3
2.1.2 Ätiologie und Pathogenese	3
2.1.3 Epidemiologie	4
2.2 Gewichtsverlust nach Schlaganfall	5
2.2.1 Prävalenz	5
2.2.2 Ursachen	5
2.2.2.1 Inaktivitätsatrophie	5
2.2.2.2 Infektionen	6
2.2.2.3 Inflammation	6
2.2.2.4 Kachexie, Anorexie und Mangelernährung	7
2.2.2.5 Verlust von Muskelmasse	9
2.2.2.5.1 Proteolyse	10
2.2.2.5.2 Apoptose	11
2.3 Herzfunktion nach Schlaganfall	13
3 Material und Methoden	14
3.1 Hypothesen und Ziele der vorliegenden Untersuchung	14
3.2 Material und Geräte	15
3.3 Tiere und Tierhaltung	15
3.4 Versuchsablauf	17
3.4.1 Behandlungsplan und Gruppeneinteilung	17
3.4.2 Tiermodell des Schlaganfalls: <i>middle cerebral artery occlusion</i> (MCAO)	18
3.4.3 Medikamentenapplikation	20
3.4.4 Tägliche Routinekontrollen	20
3.4.5 <i>Nuclear magnetic resonance spectroscopy</i> (NMR-Scan)	21
3.4.6 Messung von Futteraufnahme, Wasseraufnahme und spontaner Aktivität	21
3.4.7 Echokardiografie	22
3.4.8 Tötung und Organentnahme	24

3.4.9 Bestimmung der Infarktgröße.....	25
3.4.10 Bestimmung von Caspase- und Proteasomenaktivitäten	26
3.4.10.1 Messung der Proteasomenaktivität	26
3.4.10.2 Messung der Caspase-3-Aktivität	28
3.5 Statistische Auswertung	29
4 Ergebnisse	31
4.1 Allgemeine Anmerkungen.....	31
4.2 Ausschluss von Tieren.....	31
4.3 Infarktgrößen	31
4.4 Neurologischer Status.....	32
4.5 Körpergewicht	34
4.5.1 Gewichtsverlauf: Überblick	34
4.5.2 Gewichtsverlauf: gruppeninterne Entwicklung.....	34
4.5.3 Gewichtsverlauf: Vergleich zwischen den Gruppen	36
4.6 Zusammensetzung der Körpermasse	39
4.6.1 Körperfett.....	39
4.6.1.1 Gruppeninterne Entwicklung der Fettmasse	40
4.6.1.2 Entwicklung der Fettmasse: Vergleich zwischen den Gruppen	41
4.6.2 Fettfreie Masse.....	43
4.6.2.1 Gruppeninterne Entwicklung der fettfreien Masse	43
4.6.2.2 Entwicklung der fettfreien Masse: Vergleich zwischen den Gruppen.....	45
4.6.3 Körperflüssigkeit (Gesamtwassergehalt des Körpers).....	46
4.6.3.1 Gruppeninterne Entwicklung der Körperflüssigkeit.....	46
4.6.3.2 Entwicklung der Körperflüssigkeit: Vergleich zwischen den Gruppen.....	49
4.7 Parameter der Lebensqualität.....	50
4.7.1 Futterraufnahme	50
4.7.1.1 Gruppeninterne Entwicklung der Futterraufnahme	50
4.7.1.2 Entwicklung der Futterraufnahme: Vergleich zwischen den Gruppen	52
4.7.2 Wasseraufnahme.....	53
4.7.2.1 Gruppeninterne Entwicklung der Wasseraufnahme	53
4.7.2.2 Entwicklung der Wasseraufnahme: Vergleich zwischen den Gruppen	55
4.7.3 Aktivität.....	56
4.7.3.1 Gruppeninterne Entwicklung der spontanen Aktivität	56
4.7.3.2 Entwicklung der Aktivität: Vergleich zwischen den Gruppen	57

4.8 Organgewichte	59
4.9 Fett- und Muskelgewebe	61
4.9.1 Fettgewebe	61
4.9.2 Muskelgewebe.....	62
4.10 Caspaseaktivität	64
4.11 Proteasomenaktivität	67
4.11.1 „Caspaselike“-Aktivität	67
4.11.2 „Chemotrypsinlike“-Aktivität	69
4.11.3 „Trypsinlike“-Aktivität.....	71
4.12 Echokardiografie	73
5 Diskussion	75
5.1 Infarktgrößen und neurologischer Status	75
5.2 Körpergewicht	75
5.3 Zusammensetzung der Körpermasse	80
5.3.1 Körperfett.....	80
5.3.2 Fettfreie Masse	86
5.3.3 Körperflüssigkeit	89
5.3.4 Zusammenfassung zu den Veränderungen der Körpermasse	91
5.4. Parameter der Lebensqualität	92
5.4.1 Futteraufnahme	92
5.4.2 Wasseraufnahme.....	94
5.4.3 Aktivität	96
5.5 Organgewichte	97
5.6 Skelettmuskulatur	98
5.7 Caspase-3-Aktivität	100
5.8 Proteasomenaktivität	102
5.8.1 „Caspaselike“-Aktivität	102
5.8.2 „Chemotrypsinlike“-Aktivität	103
5.8.3 „Trypsinlike“-Aktivität	104
5.9 Zusammenfassung zum Muskelabbau	104
5.10 Echokardiografie	105
Zusammenfassung	107

Summary.....	109
Literaturverzeichnis	111
Abbildungsverzeichnis	118
Tabellenverzeichnis	119
Vorveröffentlichungen und Überschneidungen mit anderen Arbeiten.....	120
Anhang	121
Danksagung.....	126
Selbstständigkeitserklärung.....	127

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arteria</i> (lat.)
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AMC	Amidomethylcoumarin
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (engl.)
Apaf	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i> (engl.)
B-Mode	<i>brightness</i> (engl.)-Modus
<i>bpm</i>	<i>beats per minute</i> (engl.)
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i> (engl.)
CCR	Center for Cardiovascular Research
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
C-L	„ <i>Caspaselike</i> “ (engl.)
CRP	C-reaktives Protein
CT-L	„ <i>Chemotrypsinlike</i> “ (engl.)
DED	Todeseffektordomäne
diast.	diastolisch
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamin-tetra-acetylsäure
EF	<i>ejection fraction</i> (engl.)
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i> (engl.)
FFMI	<i>fat-free mass index</i> (engl.)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IGEPAL Ca-630	Octylphenoxypropylpolyethoxyethanol
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i> (engl.)
IL	Interleukin
INF	Interferon
IVC	<i>individually ventilated cage</i> (engl.)
IVS	interventrikuläres Septum
IκB	Inhibitor-Protein kappa B
KGW	Körpergewicht

LV	linksventrikulär
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
LVESD	linksventrikulärer endsystolischer Diameter
LVPW	linksventrikuläre posteriore Wand
<i>M. / Mm.</i>	<i>Musculus / Musculi</i> (lat.)
MAFbx	<i>muscle atrophy F-box</i> (engl.)
MCAO	<i>middle cerebral artery occlusion</i> (engl.)
M-Mode	<i>time-motion</i> (engl.)-Modus
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MuRF	<i>muscle ring finger</i> (engl.)
n	Anzahl
NFκB	nukleärer Faktor kappa B
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (engl.)
NO	Stickstoffoxid
OP	Operation
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (engl.)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (engl.)
SEP	Septum
SPF	spezifisch pathogenfrei
syst.	systolisch
TIA	transiente ischämische Attacke
T-L	<i>„Trypsinlike“</i> (engl.)
TNF	Tumornekrosefaktor
TOAST	<i>Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment</i> (engl.)
TPP	Tripeptidyl-Peptidase
TRADD	<i>tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein</i> (engl.)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USP	United States Pharmacopeia
vs.	versus
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

Folge eines Schlaganfalls ist neben der körperlichen Behinderung häufig auch ein akuter Gewichtsverlust, ein Phänomen, das zwar in der Praxis bekannt ist, jedoch bisher in wenigen Studien systematisch untersucht wurde [1]. Tierexperimentelle Untersuchungen in Schlaganfall-Modellen von Ratte und Maus zeigen ebenfalls diesen akuten Gewichtsverlust, der abhängig von der Dauer des Gefäßverschlusses und der daraus resultierenden Läsionsgröße auftritt [2-5]. Dass sich hierbei ein Verlust von Muskelmasse zeigt, welcher nicht ausschließlich auf die paretischen Gliedmaßen beschränkt ist, konnte ebenfalls im Tiermodell bewiesen werden [6]. Der Gewichtsverlust stellt für die betroffenen Patienten einen Risikofaktor dar, da die Mortalität nach einem Schlaganfall negativ mit dem Körpergewicht korreliert [7]. Zudem weisen unterernährte Schlaganfallpatienten eine erhöhte Sterblichkeitsrate [8], ein erhöhtes Infektionsrisiko [9] sowie schlechtere klinische Ergebnisse bezüglich der Spätfolgen der Erkrankung auf [8, 9]. Der Erhalt der Körpermasse ist somit für die Betroffenen notwendig, um zusätzlicher Morbidität nach einem Schlaganfall vorzubeugen [10]. Bisher sind weder die Ursachen für die Gewichtsreduktion noch mögliche diesbezügliche Behandlungsstrategien hinreichend untersucht worden. Voraussetzung für die Etablierung spezifischer Interventionstherapien sind jedoch präzise Kenntnisse der ursächlichen katabolen Prozesse für den besagten Gewichtsverlust. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher ausgewählte Parameter der metabolischen Veränderungen nach einem Schlaganfall im Mausmodell untersucht. Insbesondere wurden der Verlust von Muskelmasse und einige der diesem zu Grunde liegenden katabolen Prozesse analysiert. Zu diesem Zweck wurde an Mäusen ein experimenteller ischämischer Schlaganfall ausgelöst. Nachfolgend wurden die Körperzusammensetzung, das Gewicht, die Aktivität, der neurologische Status sowie die Futter- und Wasseraufnahme der Tiere über einen Zeitraum von sieben Tagen dokumentiert. Danach wurden die Versuchstiere schmerzfrei getötet. Nach der Organ- und Blutentnahme wurde der Katabolismus (Proteasomenaktivität, Caspaseaktivität) im Skelettmuskel der Versuchstiere ermittelt. Als Vergleichsgruppen dienten hierbei eine unbehandelte Kontroll-Gruppe, eine Gruppe mit Kontroll-Operation sowie eine Gruppe mit antibiotischer Behandlung, um den Effekt von postoperativen bakteriellen Infektionen auf die Ergebnisse beurteilen zu können.

Des Weiteren wurde überprüft, ob die Veränderungen der Muskelmasse nach dem Schlaganfall neben der Skelettmuskulatur auch den Herzmuskel betreffen. Im Tierexperiment konnte bereits ein Zusammenhang zwischen ischämischem Schlaganfall und dem Absterben kardialer Myozyten nachgewiesen werden [11]. Ob sich die Funktion des Herzmuskels hierdurch verändert, wurde bisher nicht untersucht. Es ist bekannt, dass Myokard-Infarkte, Arrhythmien und Herzinsuffizienzen zu den häufigsten Ursachen für die stationäre Wiederaufnahme von Patienten mit ischämischem Schlaganfall in einem Zeitraum von einem Monat nach der Entlassung zählen [12]. Dennoch existieren keine Studien zur systematischen Un-

tersuchung der Herzfunktion oder -morphologie nach einem Schlaganfall. Entsprechende Kenntnisse sind jedoch nötig, um die kardialen Risiken nach einem solchen Insult einschätzen und gegebenenfalls reduzieren zu können. Zur Analyse der Herzfunktion wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit am dritten Tag nach Schlaganfall-Induktion eine Echokardiografie durchgeführt, um Parameter wie die Auswurffraktion, den linksventrikulären Durchmesser und die Septumstärke zu bestimmen. Da diese Untersuchungen unter Isofluran-Narkose erfolgten, war eine separate Versuchsgruppe notwendig, um mögliche Narkoseeinflüsse auf den Versuchsverlauf nach dem Schlaganfall zu kontrollieren. Eine Tiergruppe mit Kontroll-Operation ohne Induktion einer zerebralen Ischämie diente als Vergleich.

2 Literaturübersicht

2.1 Schlaganfall

2.1.1 Definition

Laut Standarddefinition der Weltgesundheitsorganisation WHO stellt der Schlaganfall ein klinisches Syndrom dar, welches durch plötzlich einsetzende, fokale neurologische Ausfallerscheinungen mit vaskulärem Ursprung gekennzeichnet ist, die mehr als 24 Stunden anhalten oder zum Tode führen [13]. Die gleiche Symptomatik wird bei einer sogenannten transitorisch ischämischen Attacke (TIA) beobachtet, wobei die neurologischen Ausfälle deutlich kürzer anhalten. Die WHO grenzt die TIA mit einer Symptomatik von unter 24 Stunden Dauer vom länger dauernden Schlaganfall ab. In aktuellen Veröffentlichungen finden sich jedoch davon abweichende Definitionsansätze, wonach schon bei Perfusionsstörungen von mehreren Minuten und spätestens nach ein bis zwei Stunden von einem Schlaganfall auszugehen ist, auch wenn die Symptomatik innerhalb von 24 Stunden vollständig abklingt [14-16].

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Symptome eines Schlaganfalls entstehen durch eine lokale Unterbrechung der Perfusion des Gehirns, woraus eine energetische Minderversorgung der Neuronen resultiert. Infolge des Sauerstoff- und Glukosemangels kommt es zu einer Gewebsschädigung mit nachfolgendem Funktionsausfall der Nervenzellen. Bezüglich der Ursache wird zwischen der Ischämie und der Hämorrhagie unterschieden.

Der ischämische Schlaganfall

Im Falle der Ischämie liegt eine verminderte oder fehlende Durchblutung des betroffenen Hirnareals durch Verlegung einer Hirnarterie vor, in deren Folge ein Hirninfarkt entsteht. Ätiologisch wird basierend auf den international anerkannten TOAST-Kriterien zwischen Atherosklerose, Kardioembolie, Mikroangiopathie und anderen Ursachen unterschieden, während bei unklarer Ätiologie oder mehreren konkurrierenden Ursachen vom undefinierten Schlaganfall-Typ gesprochen wird [17].

Der hämorrhagische Schlaganfall

Bei einer Hämorrhagie erfolgt ein Blutaustritt aus einem Gefäß in das umliegende Gewebe. Dies führt einerseits zur Drucknekrose der Zellen im Bereich des Blutaustritts und andererseits zur Minderdurchblutung des nachgeschalteten Versorgungsgebietes des entsprechenden Blutgefäßes bei fehlender Kollateralversorgung. Die Schlaganfall-Definition der WHO

sieht eine Einteilung in intrazerebrale und subarachnoidale Hämorrhagie vor, während die epidurale und subdurale Hämorrhagie ausdrücklich nicht in die Standarddefinition eingeschlossen werden [13]. Ursächlich kommen unter anderem hämorrhagische Diathesen, Gefäßmalformationen, Aneurysmen, Stauungsblutungen infolge venöser Thrombosen (hämorrhagische Infarzierung) und hypertensive Erkrankungen in Betracht [15].

Symptome des Schlaganfalls

Das plötzlich einsetzende neurologische Krankheitsbild kann sich in einer vielfältigen Kombination von motorischen, sensiblen, visuellen oder okulomotorischen Symptomen sowie neurophysiologischen Syndromen äußern. Abhängig von der betroffenen Hemisphäre und Hirnregion können ein- oder beidseitige motorische, sensorische und/oder Koordinationsstörungen, Aphasie oder Dysphasie, Hemianopie, konjugierte Deviation, Apraxie, Neglect oder Anosognosie auftreten.

2.1.3 Epidemiologie

Laut einer Untersuchung der WHO stellte der Schlaganfall im Jahre 2002 die dritthäufigste Todesursache in industrialisierten Ländern dar [18]. In einer globalen Studie wurde der Schlaganfall im Jahre 1990 als zweithäufigste Todesursache weltweit identifiziert [19].

Inzidenz und Letalität

Basierend auf epidemiologischen Daten aus dem Erlanger Schlaganfallregister wurde für Deutschland in den Jahren 1994 bis 1996 eine Inzidenz von 182 Schlaganfällen pro 100 000 Einwohner errechnet [20]. Hierbei wurde auch die starke Altersabhängigkeit des Schlaganfalls verdeutlicht, da mehr als 50 % der erfassten Insulte bei Personen im Alter von über 75 Jahren auftraten [20]. Weltweit wird in Verbindung mit dem steigenden Durchschnittsalter der Bevölkerung in den kommenden Jahren mit einer deutlichen Zunahme der Schlaganfallzahlen gerechnet [21]. In Deutschland stellt der Hirninfarkt als Folge zerebraler Ischämie mit ca. 80 % die häufigste Form des Schlaganfalls dar, was einer Inzidenz von 137 pro 100 000 Einwohnern entspricht [20]. Die Letalität nach zwölf Monaten ist jedoch bei beiden Formen der Hämorrhagie mit 58,3 % höher als beim ischämischen Schlaganfall mit 29,9 % [20].

Tabelle 1: Erstmalige Schlaganfälle: Inzidenz pro 100 000 Einwohner und Letalität nach zwölf Monaten [20]

Schlaganfalltyp	Inzidenz	Letalität nach 12 Monaten (%)
Hirnfarkt	137	29,9
Intrazerebrale Blutung	24	58,3
Subarachnoidalblutung	6	58,3
nicht klassifizierter Schlaganfall- typ	8	87,5

2.2 Gewichtsverlust nach Schlaganfall

2.2.1 Prävalenz

Wie anfangs erwähnt, ist der Gewichtsverlust nach einem Schlaganfall ein bekanntes klinisches Bild. In Studien wird im Zusammenhang mit der Bestimmung des Ernährungszustandes von Schlaganfallpatienten regelmäßig die Abnahme des Körpergewichtes [22-24] sowie der Fett- und Körperzellmasse [23, 25] dokumentiert. In einer populationsbasierten Studie aus dem Lund Stroke Register lag die Prävalenz für einen Gewichtsverlust von mehr als 3 kg vier Monate nach Schlaganfall bei 24 %, nach einem Jahr bei 26 % [1].

2.2.2 Ursachen

Die Ursachen und Mechanismen des Gewichtsverlustes nach einem Schlaganfall sind bisher nicht hinreichend untersucht worden, daher kann nur angenommen werden, dass ihm ein multifaktoriell bedingtes Geschehen zugrunde liegt. Es ist davon auszugehen, dass ein Schlaganfall komplexe pathophysiologische Folgen hat, welche zu einer Veränderung der Körperzusammensetzung führen. Als Ursachen sind Inaktivitätsatrophie, Infektionen, Mangelernährung, Kachexie, Hypermetabolismus sowie neuroendokrine Veränderungen denkbar. Mit der vorliegenden Arbeit sollte zunächst geklärt werden, inwiefern Aktivität, Nahrungszufuhr und die Entwicklung einer Kachexie Einfluss auf die Gewichtsreduktion haben, während die metabolischen und neuroendokrinen Signalwege sowie das Vorliegen von Infektionen in weiterführenden Studien der Arbeitsgruppe untersucht werden sollten.

2.2.2.1 Inaktivitätsatrophie

In Abhängigkeit des betroffenen Hirnareals kann sich die Symptomatik eines Schlaganfalls in Lähmungen der kontralateralen Gliedmaßen (primärmotorischer Kortex) sowie Gang- und Standunsicherheiten (Frontalkortex) äußern. Die Folge ist häufig eine stark eingeschränkte motorische Aktivität der Patienten, die zu einer Inaktivitätsatrophie der betroffenen Muskula-

tur führen kann. Eine Atrophie kann durch die Abnahme der Zellzahl des betroffenen Gewebes (numerische Atrophie) oder die Größenminderung der Zellen erfolgen (einfache Atrophie). Der dominante Prozess im Falle der Inaktivitätsatrophie ist der Proteinabbau innerhalb der Sarkomere und somit eine Reduktion der Zellgröße [26]. In einer Untersuchung von *English et. al.* wurde bei Schlaganfallpatienten noch mindestens sechs Monate nach dem Insult eine stark verringerte Muskelmasse in den gelähmten Extremitäten im Vergleich zu den funktionsfähigen Gliedmaßen gefunden [27]. Eine Beteiligung der lähmungsbedingten Atrophie am Gesamtgewichtsverlust ist daher anzunehmen. Die Reduktion der körperlichen Aktivität verändert jedoch in weiterer Hinsicht die Körperzusammensetzung [28]. So kommt es im Fall der Inaktivitätsatrophie parallel zur Abnahme der Muskelmasse zu einer Zunahme der Fettmasse [29]. Da bei der Abnahme der Körpermasse nach einem Schlaganfall jedoch vielmehr eine Verringerung der Fettmasse stattfindet [23], kommt die motorische Inaktivität nicht als alleinige Ursache für den Gewichtsverlust nach einem Schlaganfall in Betracht.

2.2.2.2 Infektionen

Infektionen stellen eine der bedeutendsten Todesursachen nach einem Schlaganfall dar und sind mit einer Prävalenz von 23 % bis 65 % die häufigste Form der Komplikation in der Rehabilitationsphase [30]. Aktuelle Studien geben Hinweise darauf, dass eine Schlaganfall-induzierte Immundepression die Manifestation von Infekten begünstigt. So konnte im Tierexperiment nachgewiesen werden, dass als Folge einer zerebralen Ischämie eine systemische Immunsuppression ausgelöst wird, welche durch Lymphopenie, lymphozytäre Dysfunktion sowie Monozytendeaktivierung gekennzeichnet ist [30]. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch bei Humanpatienten dokumentiert [31, 32]. Eine frühzeitige Behandlung von Schlaganfallpatienten mit Moxifloxacin führte in einer Humanstudie zu einer deutlich reduzierten Infektionsrate, was jedoch nicht in einer Verbesserung des neurologischen *Outcome* oder der Überlebensrate resultierte [33].

2.2.2.3 Inflammation

Nach einem Schlaganfall kommt es im Parenchym des betroffenen Hirnareals zu einer Entzündungsreaktion, welche durch Bildung von Sauerstoffradikalen, Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen sowie Aktivierung und Infiltration von Entzündungszellen gekennzeichnet ist [34]. Speziell die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen, Stickstoffoxid, Matrix-Metalloproteasen und Zytokinen kann zu einer Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke führen [34].

In verschiedenen Tierversuchen wurden Veränderungen des peripheren Immunsystems innerhalb der ersten 24 Stunden nach Schlaganfall nachgewiesen [35, 36]. Hierbei wurden unterschiedliche Ausprägungen der Veränderungen in Abhängigkeit von der Größe des

Schlaganfalls [36] und des untersuchten Organs festgestellt [35]. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die inflammatorischen Prozesse, die nach einem Schlaganfall im Gehirn ablaufen, von den peripheren, immunologisch aktiven Organen reflektiert werden [35].

Auch in Humanstudien wurden innerhalb eines Zeitraums von zwölf Stunden sowie auch fünf bis sieben Tage nach einem Schlaganfall erhöhte Plasmakonzentrationen inflammatorischer Parameter wie C-reaktivem Protein (CRP), weißen Blutkörperchen und Interleukin-6 (IL-6) nachgewiesen [37, 38]. Mit Ausnahme von IL-6 traten die erhöhten Werte unabhängig vom Vorliegen einer Infektion auf [37]. Das Ausmaß der Entzündungsreaktion stand dabei in Zusammenhang mit der Größe des Schlaganfalls und dem klinischen Ausgang [38]. Ein Ungleichgewicht zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen soll bei der Entstehung einer Kachexie mitwirken [39]. Es ist bekannt, dass die proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-1, IL-6 und Interferon- γ (IFN- γ) im Tierexperiment Kachexie-Symptome wie Gewichtsverlust, verstärkten Proteinabbau, Anorexie, Akute-Phase-Reaktionen sowie Anämie auslösen [40-44]. So verstärken TNF- α , INF- γ und IL-1 die Genexpression von Ubiquitin [45], einem wichtigen Element der Proteolyse-Kaskade (s. auch Ubiquitin-Proteasomen-System). IL-1 β hemmt die Expression des gastralen Peptides Ghrelin, welches indirekt die Nahrungsaufnahme steigert sowie den Energieumsatz verringert [46]. Die Serumkonzentration von Leptin, einem Peptid, das ebenfalls eine Negativregulation von Ghrelin bewirkt, wird durch TNF- α erhöht [47]. TNF- α und IL-1 können zudem eine Reduktion der Proteinsynthese verursachen [44, 48].

2.2.2.4 Kachexie, Anorexie und Mangelernährung

Unterschiede und Zusammenhänge

Sowohl Anorexie als auch Mangelernährung begründen sich durch die mangelhafte Verfügbarkeit von Nährstoffen, während für die Entstehung einer Kachexie die ursächliche Grunderkrankung und die damit verbundenen metabolischen Veränderungen ausschlaggebend sind. So unterscheiden sich auch die Folgen der Kachexie deutlich von denen der Anorexie, welche sich hauptsächlich im Abbau von Fettgewebe äußert und durch ausgleichende Zufuhr von Nährstoffen reversibel ist [49].

Mangelernährung

Mangelernährung ist definiert als ein Ernährungszustand, bei dem ein Mangel oder Überschuss an Energie, Protein und anderen Nährstoffen einen nachweisbaren negativen Effekt auf Gewebe, Körperform und -funktion sowie den klinischen Ausgang einer Erkrankung hat [39]. Es ist davon auszugehen, dass eine inadäquate Nahrungsaufnahme nach einem Schlaganfall für den Verlust von Körpermasse mitverantwortlich ist.

Bei Schlaganfallpatienten ist Mangelernährung ein häufig auftretendes Symptom [50], dessen Prävalenz sich jedoch im Verlauf der Rehabilitationsphase verringert [51]. Das Vorliegen einer Dysphagie erhöht die Chancen auf Mangelernährung nach einem Schlaganfall [52]. Bei 29 % bis 64 % [53-55] der akuten Hirninfarkte manifestiert sich die Symptomatik in Form einer Dysphagie, ebenfalls mit im Zeitverlauf abnehmender Prävalenz [51].

Überdies können weitere Faktoren wie Müdigkeit, motorische Beeinträchtigung, Depression, Wahrnehmungsstörungen oder kognitive Defizite zu einer Mangelernährung beitragen [52]. Jönsson *et al.* identifizierten Schwierigkeiten bei der Nahrungsaufnahme nach einem Schlaganfall als Indikator für einen Gewichtsverlust von über 3 kg [1]. Vier respektive zwölf Monate nach Schlaganfall gaben 66 % bzw. 46 % der Patienten mit einem Gewichtsrückgang von über 3 kg an, dass sie ihre Nahrungszufuhr innerhalb der letzten drei Monate reduziert hatten. Ätiologisch wurde hierbei nicht zwischen Dysphagie, Appetitsverlust (Anorexie) und digestiven Problemen differenziert [1]. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass 34 % resp. 54 % der Patienten mit einem Gewichtsverlust von mehr als 3 kg ihre Nahrungsaufnahme nicht bewusst reduziert hatten. Foley *et al.* registrierten die Energie- und Proteinzufuhr von hospitalisierten Schlaganfallpatienten zu verschiedenen Zeitpunkten bis zu drei Wochen nach Einlieferung [56]. Die Betroffenen nahmen durchschnittlich 80 % bis 91 % ihres benötigten Kalorien- und Proteinbedarfs zu sich, wobei Patienten mit Ernährungssonde eine höhere Energiezufuhr aufwiesen als solche, die selbstständig aßen [56].

Die erwähnten Studien (in Kombination mit der Abnahme der Prävalenz für Mangelernährung und Dysphagie in der Rehabilitationsphase) weisen darauf hin, dass der Gewichtsverlust nach einem Schlaganfall nicht ausschließlich auf mangelnde Nährstoffzufuhr zurückgeführt werden kann.

Kachexie

Dem ursprünglichen, griechischen Wortlaut nach („*kakos*“ = schlecht, „*hexis*“ = Befinden) beschreibt der Begriff Kachexie einen schlechten körperlichen Zustand. Die Frage einer einheitlichen medizinischen Definition des Begriffs wurde in den vergangenen Jahren diskutiert [57]. Im Jahr 2006 wurde im Rahmen der Cachexia Consensus Conference von Wissenschaftlern und Klinikern ein Vorschlag für eine solche Definition erarbeitet [57], welcher bei Sachverständigen auf Zustimmung stößt [39]. Demnach beschreibt der Begriff Kachexie ein komplexes metabolisches Syndrom, welches mit einer ursächlichen chronischen Grunderkrankung einhergeht und durch den Verlust von Muskelmasse gekennzeichnet ist, wobei parallel ein Rückgang der Fettmasse auftreten kann [58]. Als diagnostisches Kriterium für Kachexie bei erwachsenen Patienten gilt ein Gewichtsverlust von mindestens 5 % innerhalb von maximal zwölf Monaten, begleitet von mindestens drei der folgenden Charakteristika:

- verminderte Muskelstärke
- Müdigkeit
- Anorexie
- geringer Fettfreier-Masse-Index (FFMI)
- biochemisch nachgewiesene Parameter für Inflammation, Anämie oder geringes Serumalbumin [58].

Die Kachexie-auslösenden Mechanismen sind bislang nicht vollständig geklärt [59]. Anorexie und metabolische Veränderungen wie erhöhter Entzündungsstatus, verstärkter Muskelabbau oder beeinträchtigter Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel können zur Manifestation einer Kachexie beitragen [39].

Anorexie

Anorexie ist definiert als Verminderung oder Verlust des Appetits. Im Rahmen verschiedener Erkrankungen [60] tritt häufig, so zum Beispiel bei 15 % [61] bis 50 % [62] von humanen Tumorpatienten, die sogenannte sekundäre Anorexie mit einer komplexen multifaktoriellen Pathogenese auf, die vermutlich auf entzündungsbedingter hypothalamischer Resistenz gegenüber orektischen und anorektischen Signalen beruht [39]. Folge der Anorexie ist eine verminderte Nahrungsaufnahme, in deren Folge eine Reduktion des Körperfettanteils eintritt [49].

Als solitäre Ursache kachektischer Zustände kommt Anorexie nicht in Betracht, da die Manifestation einer Kachexie nicht zwangsweise mit verminderter Nahrungsaufnahme assoziiert wird [59]. So konnte an Tumorpatienten nachgewiesen werden, dass eine adäquate Zufuhr von Nährstoffen zwar dem Verlust von Fettmasse, jedoch nicht der Reduktion der Muskelmasse entgegenwirkte [63]. Wie bereits erwähnt, ist auch bei Schlaganfallpatienten häufig ein von der Nahrungszufuhr unabhängiger Gewichtsverlust zu beobachten, was die Vermutung nahelegt, dass weitere Kachexie-auslösende Faktoren an der Reduktion der Körpermasse nach Schlaganfall beteiligt sind.

2.2.2.5 Verlust von Muskelmasse

Ein Ungleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Vorgängen im Muskel ist für den beschleunigten Muskelabbau bei einer Kachexie verantwortlich, wobei erhöhter Proteinabbau die vordergründige Rolle spielt [64]. Diese Annahme begründet sich auf der Tatsache, dass eine Supplementierung mit Aminosäuren keinen signifikanten Effekt auf die Abnahme der Muskelmasse in kachektischen Patienten hat, weshalb sich die meisten Studien mit den katabolen Prozessen des Muskelschwundes beschäftigen [59].

2.2.2.5.1 Proteolyse

Bisher existieren keine konkreten Untersuchungen zum Abbau von Proteinen in der Skelettmuskulatur nach einem Schlaganfall. Wie bereits im Abschnitt „Inaktivitätsatrophie“ beschrieben, ist jedoch bekannt, dass die Nichtbenutzung von Skelettmuskeln zu einem Proteinabbau führt. Gleiches gilt für die Denervierung von Muskeln [26]. Es existieren drei verschiedene Protein-Abbauwege, die an der Proteolyse von Muskeleiweiß beteiligt sind: das lysosomale System, die zytosolständigen Proteasen und das ATP-abhängige Ubiquitin-Proteasomensystem [65].

Lysosomales System

Lysosomen sind Zellorganellen, welche mehrere Proteasen enthalten. Extrazelluläre Proteine werden durch Endozytose in die Zelle eingeschleust und innerhalb der Lysosomen abgebaut [66]. Da das lysosomale System somit hauptsächlich in die Spaltung von Membranoberflächenproteinen und endozytierten extrazellulären Proteinen involviert ist [67], spielen Lysosomen unter normalen Bedingungen eine untergeordnete Rolle in den grundlegenden Proteinabbau-Vorgängen im Muskel [68]. Bei verringerter Nährstoffzufuhr oder Insulinmangel verstärkt sich jedoch der lysosomale Abbauprozess innerhalb der Muskelzelle [68], wobei lediglich ein Teil der gesamten Proteolyse über diesen Weg erfolgt, während die Spaltung myofibrillärer Proteine nicht innerhalb von Lysosomen stattfindet [69].

Kalziumabhängige Proteasen

Die sogenannten Calpaine sind neutrale Cystein-Endopeptidasen, welche ATP-unabhängig durch Ca^{2+} aktiviert werden. Diese Proteasen spielen scheinbar bei Gewebsschädigung, Nekrose und Autolyse eine Rolle, da sie in beschädigten Zellen mit steigendem Ca^{2+} -Spiegel aktiviert werden [66]. Ihre Beteiligung an der Proteinumwandlung unter physiologischen Bedingungen ist jedoch ungeklärt [68]. Tierexperimentelle Untersuchungen an Tumortragenden Ratten geben Hinweise darauf, dass der Proteinabbau durch Calpaine in einem frühen Stadium der Kachexie stattfindet [70].

Ubiquitin-Proteasomen-System

Im Rahmen pathophysiologischer Zustände (Tumorkachexie, Sepsis, Traumata, Hungerzustände, Atrophie durch Denervierung, Immobilisation) wird das Ubiquitin-Proteasom-System stimuliert und führt zu einem forcierten Abbau myofibrillärer Proteine [66]. Untersuchungen zur Aktivierung dieses Abbauweges in Skelettmuskelzellen in Zusammenhang mit einem ischämischen Schlaganfall existieren bisher nicht.

Substrate, welche diesen Abbaupfad durchlaufen, werden zunächst an eine Kette von Ubiquitin-Molekülen gebunden und anschließend durch den sogenannten 26S-Proteasom-

Komplex in kleinere Peptide gespalten [71]. Hierbei handelt es sich um einen zylinderförmigen Enzymkomplex, bestehend aus zwei endständigen 19S-Proteasomen und einem 20S-Proteasom im Kern. Die anfängliche Bindung der abzubauenen Proteine an Ubiquitin-Ketten ist ein ATP-abhängiger, dreistufiger Prozess, der durch verschiedene Enzyme (E1: *ubiquitin activating enzyme*, E2: *ubiquitin conjugating enzyme*, E3: *ubiquitin protein ligase*) katalysiert wird [59]. Nach Markierung durch Ubiquitin wird das Protein vom 19S-Proteasom erkannt, entfaltet und von der Ubiquitin-Kette getrennt, woraufhin es im 20S-Proteasom in kurze Oligopeptide gespalten wird [59]. Dieser Prozess wird durch verschiedene Untereinheiten (β 1, β 2 und β 5) im 20S-Proteasom vermittelt, die das Protein als Endopeptidasen nach unterschiedlichen Aminosäuren spalten. Man unterscheidet hierbei die „*Chomotrypsinlike*“ (CT-L)-Aktivität, die „*Caspaselike*“ (CL)-Aktivität und die „*Trypsinlike*“ (T-L)-Aktivität [72]. Als initialer und zugleich limitierender Schritt gilt hierbei die CT-L-Aktivität, durch die das Protein in Teilstücke gespalten wird, die von den anderen Untereinheiten weiter degradiert werden können [72]. Dabei sind die verschiedenen Untereinheiten in der Lage, sich gegenseitig allosterisch zu regulieren [73].

Die aus der Spaltung resultierenden Oligopeptide werden nach Freisetzung aus dem Proteasomen-Komplex durch die Tripeptidyl-Peptidase-II (TPPII) und weitere Aminopeptidasen zu Aminosäuren abgebaut [59]. Die für die anfängliche Polyubiquitinierung notwendigen Proteinligasen werden durch die Gene MuRF-1 (*Muscle Ring Finger 1*) und MAFbx (*Muscle Atrophy F-box*) kodiert. In verschiedenen Tiermodellen zur Muskelatrophie konnte nachgewiesen werden, dass diese Gene nach Denervierung und Immobilisation verstärkt exprimiert werden [74]. Tiere, denen die entsprechenden Gene fehlten, waren gegen Muskelatrophie resistent [74]. Ursächlich für die verstärkte Expression von MuRF-1 scheint eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B zu sein, welche durch dessen Abspaltung vom Inhibitor I κ B vermittelt wird [75]. So konnte in einem Tierexperiment zur Denervierungs- bzw. Tumor-induzierten Muskelatrophie eine deutliche Reduktion des Muskelabbaus festgestellt werden, nachdem der entsprechende Signalweg inhibiert wurde [75].

2.2.2.5.2 Apoptose

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes, welcher unter physiologischen Bedingungen in die körperliche Entwicklung und die Aufrechterhaltung der Homöostase involviert ist. Durch ihre potentielle Rolle in der Entwicklung pathophysiologischer Krankheitsbilder gewinnt die Apoptose in der wissenschaftlichen Forschung zunehmend an Bedeutung. So wird eine inadäquate Apoptose mit diversen Humanerkrankungen wie neurodegenerativen Leiden, ischämischen Gewebeschädigungen, Autoimmunkrankheiten und Tumorgeschehen in Verbindung gebracht [76]. Untersuchungen der Apoptose-Rate in Skelettmuskelzellen nach einem Schlaganfall existieren bisher jedoch nicht. In einer Studie wurden Hinweise für eine verstärkte Apoptose-Induktion in der Skelettmuskulatur von hirntoten humanen Patienten

nachgewiesen [77], wobei 49 % der untersuchten Patienten einen Schlaganfall erlitten hatten, welcher in 38 von 42 Fällen hämorrhagisch war.

Die Apoptose geht mit verschiedenen morphologischen Veränderungen der Zelle einher. Dazu gehören der Verlust der Adhäsion im Zellverband sowie die Abrundung und Schrumpfung der Zelle, Kondensation und Fragmentierung des Chromatins, Verkleinerung der Zellorganellen, Ausweitung des endoplasmatischen Retikulums sowie Veränderungen der Zellmembran [76]. Die durch den programmierten Zelltod ausgelösten biochemischen Veränderungen umfassen die Reduktion des mitochondrialen Transmembranpotentials, Ansäuerung des pH-Wertes, Produktion von Sauerstoffradikalen, Ausschleusung von Phosphatidylserin-Resten, selektive Proteolyse von zellulären Proteinen und den Abbau der DNA in Fragmente [78]. Diese Veränderungen begründen sich auf der Aktivierung eines intrinsischen Apoptose-Apparates, in dessen Zentrum die sogenannten Caspasen als universelle Effektoren stehen [78].

Caspasen sind zytosolische Cystein-Proteasen, welche Proteine nach Aspartat-Resten spalten. Sie übernehmen eine wichtige Rolle bei der Ausführung der Apoptose in Eukaryonten [66, 79]. Für Säugetiere sind derzeit 14 verschiedene Caspasen bekannt [80], nur bei einigen (Caspase-2,-3,-6,-7,-8 und -10) ist die Beteiligung am programmierten Zelltod bisher nachgewiesen [76]. Als inaktive Vorstufen synthetisiert, führen sie nach Aktivierung durch verschiedene toxische Signale zur Apoptose [66], wobei dies durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt wird. Caspasen bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne mit variabler Größe, einer kleinen sowie einer großen Untereinheit [76, 79]. In manchen Fällen existiert zusätzlich eine Verbindungsregion zwischen Letzteren [76]. Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung zwischen den Domänen mit anschließender Anordnung der Untereinheiten zu einem aktiven Enzymkomplex, wobei sich die Heterodimere zweier Caspasen zu einem Tetramer mit zwei katalytischen Seiten verbinden [79].

Caspasen agieren hierarchisch in Form einer proteolytischen Kaskade, anhand deren Verlauf die Enzyme in Initiator (Caspase-8 und -10)- und Effektor (Caspase-3, -6, -7)-Caspasen eingeteilt werden [79]. Diese Kaskade kann zum einen durch die Bindung externer Faktoren an Rezeptoren auf der Zelloberfläche und nachfolgende Aktivierung der Initiator-Caspasen ausgelöst werden [81]. Dieser extrinsische Weg setzt das Vorhandensein extrazellulärer Signale voraus, beispielsweise das Fehlen von Wachstumsfaktoren. Dies führt zur Bindung eines Liganden wie TNF- α an einen membranständigen Todesrezeptor, welcher daraufhin trimerisiert und die Umstrukturierung der zytoplasmatischen Todesdomäne des Rezeptors auslöst. Daran binden dann verschiedene Moleküle (Adaptermoleküle, TRADD, FADD), wovon FADD eine eigene Todeseffektordomäne (DED) trägt [79]. Pro-Caspase-8 bindet an dessen Domäne und wird daraufhin durch autokatalytische Spaltung zur Caspase-8 aktiviert. Schließlich löst sie als Initiator-Caspase die weitere Caspase-Kaskade aus.

Zum anderen kann eine interne Auslösung der Caspase-Kaskade durch die Freisetzung mitochondrialer Proteine wie Cytochrom C als Reaktion auf zellulären Stress erfolgen, was zur direkten Aktivierung der Effektor-Caspasen führt [81]. Die Freisetzung von Cytochrom C wird reguliert durch Mitglieder der proapoptotischen Bcl-2 Familie im Zusammenspiel mit Veränderungen der Morphologie und Struktur des Mitochondriums [82]. Die Bindung von Cytochrom C an den apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) setzt dessen Proteinbindedomäne (CARD) frei. Dort kann daraufhin die Pro-Caspase-9 binden, die nach autokatalytischer Aktivierung zur Caspase-9 weitere Caspasen aktiviert [80].

Die Aktivierung der Kaskade resultiert in einer Spaltung von zellulären Substraten wie ADP-Ribose-Polymerase und Laminen, wodurch die morphologischen Veränderungen der Apoptose ausgelöst werden [76].

Caspase-3

Die Caspase-3 ist an der Spaltung vieler verschiedener Schlüsselproteine im Rahmen der Apoptose verantwortlich und nimmt somit eine entscheidende Position im apoptotischen Prozess ein [76]. Anhand eines Genmodells an Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass dieses Enzym am morphogenetischen Zelltod in Gehirnen von Säugetieren maßgeblich beteiligt ist [83]. Belizário *et al.* lieferten darüber hinaus den Beweis für eine Beteiligung der Caspase-3 am Verlust von Muskelmasse in einem Tumor-Kachexie-Modell an Mäusen [80], wobei erhöhte Enzymaktivitäten erst bei einem starken Gewichtsverlust von 15-25 % der Körpermasse auftraten [80].

2.3 Herzfunktion nach Schlaganfall

Es ist bekannt, dass Tumor-assoziierte Kachexie zum Abbau der Herzmuskulatur führen kann [84]. Myokard-Infarkte, Arrhythmien und Herzinsuffizienzen gehören zu den häufigsten Ursachen für die stationäre Wiederaufnahme von Patienten mit ischämischem Schlaganfall in einem Zeitraum von einem Monat nach der Entlassung [12]. In einer jüngst veröffentlichten Studie wurde anhand eines Rattenmodells und in-vitro-Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen dem ischämischen Schlaganfall und dem Absterben kardialer Myozyten nachgewiesen [11]. Die Auswirkungen auf die Herzfunktion wurden hierbei nicht weitergehend analysiert.

3 Material und Methoden

3.1 Hypothesen und Ziele der vorliegenden Untersuchung

Anhand der bestehenden Erkenntnisse ist davon auszugehen, dass sich die Körpermasse nach dem experimentell ausgelösten Schlaganfall unter Veränderung der Körperzusammensetzung verringert. Zur Prüfung dieser Hypothese wurde im Mausmodell ein Schlaganfall chirurgisch induziert. Im Anschluss wurde nach drei sowie nach sieben Tagen eine Messung des Körpergewichtes und der Körperzusammensetzung der Tiere durchgeführt. Die Ergebnisse der Schlaganfall-Gruppe wurden mit denen einer OP-Kontroll-Gruppe verglichen, um die Folgen des chirurgischen Eingriffs von denen des Schlaganfalls abgrenzen zu können. Anhand eines Vergleichs der OP-Kontroll-Gruppe mit einer weiteren unbehandelten Kontroll-Gruppe sollte der Einfluss von umweltbedingten Stressoren auf die Ergebnisse geprüft werden.

Es gilt zu klären, ob Veränderungen der Nahrungsaufnahme, des Trinkwasserkonsums oder der körperlichen Aktivität als Ursache für die erwartete Reduktion des Körpergewichtes bzw. die vermutete Änderung der Körperzusammensetzung in Frage kommen. Daher wurden drei und sieben Tage nach Versuchsbeginn die Nahrungsaufnahme, der Trinkwasserkonsum und die spontane Aktivität der Tiere gemessen und die Ergebnisse der oben genannten Gruppen miteinander verglichen.

Wenn die Effekte des Schlaganfalls auf das Körpergewicht und die Körperzusammensetzung bakteriell-infektiös bedingt sind, sollten sie sich durch antibiotische Therapie positiv beeinflussen lassen. Zur Prüfung dieser Annahme wurden einige Tiere nach Induktion des Schlaganfalls für die gesamte Versuchsdauer einer antibiotischen Behandlung unterzogen. Die Antibiotika-Gruppe wurde mit der unbehandelten Schlaganfall-Gruppe verglichen

Die Veränderungen der Körperzusammensetzung werden sich vermutlich unter anderem durch eine Reduktion der Muskelmasse auf beiden Körperseiten bemerkbar machen. Um dies zu prüfen, wurden die Tiere am Ende des Versuchs schmerzfrei getötet und deren Organe inklusive der Skelettmuskulatur der Hintergliedmaßen präpariert und gewogen.

Die erwartete Verringerung der Muskelmasse wird wahrscheinlich unter anderem durch verstärkte proteolytische und apoptotische Aktivität in der Skelettmuskulatur ausgelöst. Diese Hypothese wurde getestet, indem die Proteasomenaktivität als Maß für die proteolytische Aktivität sowie die Caspase-Aktivität als Maß für die Apoptose-Rate in der zuvor präparierten Skelettmuskulatur biochemisch gemessen wurden.

Die erwartete Verringerung der Muskelmasse wird sich vermutlich ebenfalls auf den Herzmuskel auswirken. Es ist daher auch eine Verschlechterung der Herzfunktion zu erwarten. Neben der Bestimmung des Herzgewichtes wurde zur Prüfung dieser Annahme an einer separaten Sonografie-Schlaganfall-Gruppe drei Tage nach Induktion des Schlaganfalls eine Echokardiografie durchgeführt. Darüber hinaus erfolgten alle oben genannten Untersuchungen bis zum dritten Versuchstag auch in dieser Gruppe. Aufgrund der zusätzlichen Narkose im Versuchsverlauf erschien ein Vergleich zu den oben genannten Versuchsgruppen nicht sinnvoll. Mittels einer separaten Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe sollten die Folgen des Schlaganfalls von denen des chirurgischen Eingriffs unterschieden werden.

3.2 Material und Geräte

Die umfangreiche tabellarische Auflistung aller verwendeten Materialien und Geräte sowie deren Typ, Hersteller und Zusammensetzung findet sich im Anhang der vorliegenden Arbeit (Tabellen A 1 bis A 9).

3.3 Tiere und Tierhaltung

Tiere

Die Untersuchungen wurden an männlichen Mäusen des Stammes C57BL6/N Wildtyp im Alter von neun Wochen mit einem Anfangsgewicht von 20-25 Gramm durchgeführt. Die Mäuse wurden von der Firma Charles River Deutschland aus Sulzfeld bezogen.

Tierhaltung

Die Unterbringung der Tiere erfolgte in einem SPF (spezifiziert pathogenfrei) -Stall am Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité Universitätsmedizin Berlin-Mitte. Es wurden Makrolon-IVC (*individually ventilated cages*) -Käfige Typ 3 verwendet, die mit Einstreu in Form von sterilen Sägespänen (Tabelle A 1) sowie einem roten Plastikhaus und Papier als Nistmaterial zur Käfiganreicherung versehen waren. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug je zwölf Stunden (6-18 Uhr), die Temperatur wurde zwischen 20 und 24 °C eingestellt und die Luftfeuchtigkeit lag zwischen 50 und 60 Prozent. Die Trinkwasserversorgung erfolgte *ad libitum* mittels Makrolon-Flaschen, die mit einer Tränkkappe mit Trinkröhrchen versehen waren. Die Futtermittelsversorgung *ad libitum* wurde durch eine Futterraufe mit Haltungsfutter der Marke "ssniff R/M-H V1534-3" (Tabelle A 1) gewährleistet. Das gleiche Futter wurde den Tieren zur optimalen Erreichbarkeit in einer bodenebenen Schale *ad libitum* angeboten. Dies war nötig, um im Hinblick auf eventuelle schlaganfallbedingte motorische Beeinträchtigungen im Versuchsverlauf die Nahrungsaufnahme zu vereinfachen. Die Futter- und Wasservorräte

sowie die Einstreu und das Nistmaterial wurden täglich erneuert. Die Überprüfung des Gesundheitszustandes der Tiere erfolgte zweimal täglich durch einen Tierarzt.

Die Experimente wurden nach Genehmigung durch das Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales gemäß den Tierschutzrichtlinien durchgeführt. In Anlehnung an die Orientierungshilfen des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter zur Einstufung der Belastungsgrade für genehmigungspflichtige Tierversuche wurden die Tiere vorzeitig euthanasiert, wenn sie Anzeichen von erheblichem Leiden zeigten.

Folgender Handlungsplan wurde formuliert:

Tabelle 2: Abbruchkriterien

Symptome	Arbeitsanweisung
bei täglicher Kontrolle	
struppiges Fell	Beobachtung und Dokumentation
verstärkte Atmung	Herz-Kreislauf-Untersuchung durch Tierarzt, Dokumentation
aufgetriebener Leib	Beobachtung und Dokumentation
Krämpfe, Torkeln, Apathie	einmalig: allgemeine Untersuchung durch Tierarzt, wiederholt: Euthanasie
Schmerz (gekrümmter Rücken, Laufen auf Zehenspitzen, abstehendes Fell)	Untersuchung durch Tierarzt, Behandlung mit Buprenorphin
Blässe	Beobachtung, bei zusätzlicher Hypothermie: Untersuchung durch Tierarzt
Blut an Körperöffnungen	Euthanasie
dunkle Verfärbungen der Körperoberfläche	Euthanasie
neurologischer Status = 3	Euthanasie
bei Behandlung oder Umsetzen	
Verletzungen	Untersuchung durch Tierarzt, ggf. Behandlung und 2-3 x täglich Kontrolle
dauerhaftes Vermeiden von Bewegungen	Beobachtung, 2 x täglich Kontrolle, Dokumentation, anhaltend: Euthanasie
Teilnahmslosigkeit	Untersuchung durch Tierarzt, tägliche Kontrolle, anhaltend: Euthanasie
Schmerz (Lautgabe bei Berührung, Körperhaltung)	Untersuchung durch Tierarzt, Behandlung mit Buprenorphin
Schwellungen	Untersuchung durch Tierarzt, tägliche Kontrolle, Dokumentation

Symptome	Arbeitsanweisung
bei Behandlung oder Umsetzen	
angespanntes Abdomen	Untersuchung durch Tierarzt, tägliche Kontrolle, Dokumentation
beim Wiegen	
ungewöhnliche Zunahme	Beobachtung und Dokumentation
akute Abnahme von mehr als 10 %	Beobachtung und Dokumentation
akute Abnahme von mehr als 20 %	Euthanasie nach 48 Stunden bei ausbleibender Gewichtszunahme

Tabelle 2, Fortsetzung: Abbruchkriterien

3.4 Versuchsablauf

3.4.1 Behandlungsplan und Gruppeneinteilung

Der Versuch wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Tabelle 3: Schematischer Versuchsablauf, ermittelte Parameter und durchgeführte Behandlungen für die Kontroll-, OP-Kontroll-, Schlaganfall- und Antibiose-Gruppe

Tag	Ermittelte Parameter / Behandlung
Tag -1	Aktivität, Futteraufnahme, Wasseraufnahme, Stoffwechselfparameter
Tag 0	Körperzusammensetzung, Gewicht, Operation , neurologischer Status
Tag 1	Gewicht, neurologischer Status
Tag 2	Gewicht, neurologischer Status
Tag 3	Gewicht, neurologischer Status, Körperzusammensetzung, Aktivität, Futteraufnahme, Wasseraufnahme, Stoffwechselfparameter
Tag 4	Gewicht, neurologischer Status
Tag 5	Gewicht, neurologischer Status
Tag 6	Gewicht, neurologischer Status
Tag 7	Gewicht, neurologischer Status, Körperzusammensetzung, Aktivität, Futteraufnahme, Wasseraufnahme, Stoffwechselfparameter, Tötung, Organ- und Blutentnahme

Die Versuche zur Untersuchung der Herzfunktion wurden abweichend vom oben aufgeführten Schema folgendermaßen durchgeführt:

Tabelle 4: Schematischer Versuchsablauf, ermittelte Parameter und durchgeführte Behandlungen für die Sonografie-Schlaganfall und Sonografie-OP-Kontrollgruppe

Tag	Ermittelte Parameter / Behandlung
Tag -1	Echokardiografie, Aktivität, Futteraufnahme, Wasseraufnahme
Tag 0	Körperzusammensetzung, Gewicht, Operation , neurologischer Status
Tag 1	Gewicht, neurologischer Status
Tag 2	Gewicht, neurologischer Status
Tag 3	Echokardiografie, Gewicht, neurologischer Status, Körperzusammensetzung, Aktivität, Futteraufnahme, Wasseraufnahme, Tötung, Organ- und Blutentnahme

Die Gruppen wurden wie folgt eingeteilt:

Tabelle 5: Gruppeneinteilung und Tierzahlen

Gruppenbezeichnung	Behandlung	Tierzahl
Kontrolle	Kontroll-Gruppe ohne Operation	6
OP-Kontrolle	Operation ohne Provokation eines Schlaganfalls	10
Schlaganfall	Schlaganfall durch „ <i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i> “	12
Antibiose	Schlaganfall durch „ <i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i> “ mit Verabreichung von Enrofloxacin	6
Sonografie-OP-Kontrolle	Operation ohne Provokation eines Schlaganfalls + Echokardiografie	10
Sonografie-Schlaganfall	Schlaganfall durch „ <i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i> “ + Echokardiografie	10

3.4.2 Tiermodell des Schlaganfalls: *middle cerebral artery occlusion* (MCAO)

Für die vorliegende Untersuchung wurde das Filament-Modell der sogenannten *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) bei Mäusen angewendet. Hierbei handelt es sich um ein häufig verwendetes Tiermodell mit gut reproduzierbaren Ergebnissen [85], bei welchem ein Verschluss der *Arteria cerebri media* durch intraluminale Verlegung mit Hilfe eines mit Silikon beschichteten Fadens erfolgt. Daraus resultiert eine Reduktion des Blutflusses im Versorgungsgebiet der *A. cerebri media* [85], was der Entstehung eines ischämischen Schlaganfalls nahekommt. Bei humanen Patienten gehört eine Verlegung dieser Arterie zu den häufigsten Ursachen der zerebralen Ischämie [85]. Das Modell der MCAO ermöglicht mittels mikroinvasiver Chirurgie einen zeitlich flexiblen, vorübergehenden oder auch permanenten

Verschluss des Blutgefäßes, gefolgt von einer Minderdurchblutung des Kortex und des Stratum [85].

Operationsbedingungen

Der gesamte chirurgische Eingriff wurde von Frau Monika Dopatka (Charité Berlin, Department of Experimental Neurology) in den Räumlichkeiten des SPF-Tierstalles des CCR vorgenommen. Soweit nicht anders beschrieben, wurde als Nahtmaterial ein unsteriler, nicht resorbierbarer Seidenfaden verwendet (s. Tabelle A 8). Zu Narkosezwecken wurde Isofluran genutzt (s. Tabelle A 2). Bei der Herstellung des Narkosegasgemisches kam ein Dräger-Vapor2000 Isofluran-Verdampfer (s. Tabelle A 7) mit angeschlossenem Linde & Dräger-Gasversorgungssystem (s. Tabelle A 7) zur Anwendung. Die gesamte Operation wurde unter einem Mikroskop der Firma ZEISS (s. Tabelle A 7) durchgeführt.

Narkose

Zunächst wurden die Tiere in einer Narkosekammer mit einem Gasgemisch aus einem Drittel Sauerstoff und zwei Drittel Distickstoffoxid, versetzt mit 3,5 % Isofluran, narkotisiert. Nach Eintritt des Toleranzstadiums erfolgte die Fixation der Versuchstiere in Rückenlage auf einem beheizbaren Operationstisch (s. Tabelle A 7), der auf 40 °Celsius temperiert war. Dort wurden die Tiere durch eine Atemmaske mit dem oben genannten Narkosegas beatmet und der Isoflurangehalt wurde auf 1,5 % reduziert, um das Toleranzstadium der Narkose aufrecht zu erhalten.

Operationsablauf

Mit einer Metzenbaumschere wurde die Haut am Hals der Tiere durch einen ca. 1 cm langen Median-Schnitt *cranial* des Sternums und *caudal* des Unterkieferwinkels eröffnet. Das darunterliegende Weichteilgewebe wurde stumpf präpariert, um die linke *A.carotis externa* freizulegen. Diese wurde zunächst durch vorsichtige Präparation von den umliegenden Nerven getrennt und daraufhin jeweils *cranial* und *caudal* des Abzweigs der linken *A.carotis interna* mittels eines Fadens der Stärke USP 7/0 ligiert. Daraufhin erfolgte die Freilegung der linken internen *A.carotis interna*, bis der Abzweig der mittleren Zerebralarterie und der linken *A.pterygopalatina* sichtbar war. Mit einem Faden der Stärke USP 6/0 wurde eine Ligatur der linken *A.carotis interna* vorbereitet, jedoch noch nicht festgezogen, die Arterie wurde vorerst mittels eines Clips verschlossen. Es folgte eine Inzision der linken *A.carotis externa*, durch die ein mit Silikon beschichteter Faden der Stärke USP 8/0 in die linke *A.carotis interna* vorgeschoben wurde. Der dort befindliche Clip wurde entfernt und der Faden bis in den Abzweig der mittleren Zerebralarterie weiter vorgeschoben und mit der vorbereiteten Ligatur fixiert.

Abschließend wurde der gesamte Wundbereich mit einer erbsengroßen Menge Xylocain-Gel bedeckt.

Die Okklusion der mittleren Zerebralarterie und der *A.carotis interna* wurde für 60 Minuten aufrechterhalten, wobei die Tiere sich während dieser Zeit ohne Narkose in einem mit Papier ausgelegten Haltungskäfig befanden. Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur der Mäuse wurde der Boden des Käfigs mit einer Wärmeplatte (s. Tabelle A 7) auf 39 °C temperiert. Nach 60 Minuten wurden die Tiere nach oben genanntem Verfahren erneut in Narkose versetzt und auf dem Operationstisch fixiert. Die Ligatur der *A.carotis interna* wurde kurzzeitig gelöst, der Silikonfaden entfernt und die Ligatur erneut festgezogen. Die freien Enden aller verbleibenden Ligaturen wurden bis auf 0,5 mm gekürzt. Abschließend wurden die Wundränder durch chirurgische Einzelhefte mit einem Faden der Stärke USP 5/0 adaptiert. Die folgende Aufwachphase verbrachten die Tiere wiederum in dem oben beschriebenen temperierten Käfig.

Bei den OP-Kontroll-Tieren entfiel der 60-minütige Okklusionszeitraum, hier wurde lediglich der Silikonfaden in die *A.carotis interna* und die mediale Zerebralarterie vorgeschoben und sogleich wieder entfernt. Die Induktion des Schlaganfalls blieb in diesem Falle aus. Alle übrigen Teilschritte der Operation wurden nach demselben Schema wie bei den Tieren der Schlaganfall-Gruppe durchgeführt.

3.4.3 Medikamentenapplikation

Enrofloxacin

Um den Einfluss postoperativer bakterieller Infektionen auf den Versuchsverlauf zu minimieren, erhielt eine Versuchsgruppe 10 mg/kg Enrofloxacin jeweils zwischen 8 Uhr und 9 Uhr morgens. Zu diesem Zweck wurden 0,01 ml Baytril 2,5 % ® (s. Tabelle A 2) mit 0,19 ml Wasser verdünnt und die daraus resultierende Gesamtmenge von 0,2 ml Flüssigkeit oral appliziert.

3.4.4 Tägliche Routinekontrollen

Alle Tiere wurden über den gesamten Versuchszeitraum morgens und abends durch einen Tierarzt kontrolliert, morgens erfolgte darüber hinaus eine Erfassung des neurologischen Status nach Bederson und die Bestimmung des Körpergewichtes.

Die Einteilung des neurologischen Status wurde dabei wie folgt vorgenommen (s. Tabelle 6):

Tabelle 6: Einteilung des neurologischen Status nach MCAO, neurologischer Score nach Bederson

neurologischer Status	Symptomatik
0	keine Symptome
1	Vorderhandschwäche und Drehung des Torsos zur ipsilateralen Körperseite bei Fixation und Hochhalten am Schwanz
2	spontane Drehbewegung zur ipsilateralen Körperseite
3	keine spontane motorische Aktivität

3.4.5 Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR-Scan)

Am Tag 0 wurden die Tiere kurz vor Beginn der Operation einem NMR-Scan unterzogen, welcher an den Versuchstagen 3 und 7 wiederholt wurde. Zweck dieser Untersuchung war die Bestimmung der Körperzusammensetzung, um zwischen Verlust von Fett- und Muskelmasse differenzieren zu können.

Das Prinzip der Kernspinresonanz-Spektroskopie ist die Bestimmung des Protonengehalts eines Gewebes. Die Spins der Atomkerne im Gewebe werden durch ein von außen erzeugtes Magnetfeld angeregt. Nach Wegfall des Magnetfeldes begeben sie sich wieder in ihren Ausgangszustand und senden dabei messbare elektromagnetische Wellen aus. Diese sind je nach Protonengehalt des Gewebes unterschiedlich stark und lassen so Rückschlüsse auf die Art des vorliegenden Gewebes zu.

Zum Zweck der Messung wurden die Tiere einzeln in einer transparenten Plastikröhre platziert. Um die Messwerte nicht durch die Eigenbewegung der Tiere zu verfälschen, erfolgte eine Fixation der Mäuse mittels eines Stopfens in der Röhre. So präpariert wurde die Messröhre in das NMR-Gerät eingeführt und die Messung wurde gestartet. Nach 90 Sekunden war der Messvorgang abgeschlossen und es erfolgte die Ausgabe der Ergebnisse als absolute Masse in Gramm, wobei zwischen Fett, fettfreier Masse und Gesamtwassergehalt unterschieden wurde. Die Komponente Fett beinhaltet hierbei sowohl braunes als auch weißes Fettgewebe. Die fettfreie Masse setzt sich aus Muskelmasse, fettfreier Organmasse und intravasaler sowie intra- und extrazellulärer Flüssigkeit zusammen. Der Gesamtwassergehalt beinhaltet zusätzlich dazu die freie Flüssigkeit.

3.4.6 Messung von Futteraufnahme, Wasseraufnahme und spontaner Aktivität

Am Tag vor der Operation sowie am Tag 3 und bei entsprechender Versuchsdauer am Tag 7 nach dem Eingriff erfolgte die Messung von Futter- und Wasseraufnahme sowie spontaner

Aktivität jedes Tieres über 24 Stunden. Hierzu wurden die Tiere in Makrolon-Käfigen Typ 2 einzeln gehalten. Diese wurden mit je zwei Papiertüchern ausgelegt und jedes Tier bekam eine Menge von 20 g Haltungsfutter, welches zur optimalen Erreichbarkeit auf dem Boden des Käfigs ausgelegt wurde. Das Trinkwasser wurde auf eine Menge von 200 g abgewogen und in den üblichen Flaschen *ad libitum* angeboten. Die Tiere wurden in den derart ausgestatteten Käfigen für 24 Stunden in ein "Supermex"-Lokomotor-System gesetzt.

Die Funktionsweise des Gerätes basiert auf einem Infrarotsensor, welcher über jedem Käfig angebracht war. Die durch die Wärmeabgabe des sich bewegenden Tieres verursachten Temperaturänderungen wurden durch den Sensor registriert. Die Aktivität der Tiere wurde durch das System in Form von „Counts“, vergleichbar mit der Anzahl der Temperaturänderungen pro Minute, ausgegeben. Nach Ablauf der 24 Stunden erfolgte die Ermittlung der verbliebenen Futter- und Wassermenge. Aus der Differenz zum Ausgangswert konnte die Futter- und Wasseraufnahme jedes Tieres berechnet werden.

3.4.7 Echokardiografie

Die echokardiografische Untersuchung mit dem „Vevo 770 High-Resolution Imaging System“ erfolgte in einer separaten Versuchsgruppe, da für die Untersuchung eine Isofluran-Narkose notwendig war und narkosebedingte Einflüsse auf den Versuchsverlauf in den übrigen Versuchsgruppen vermieden werden sollten. Zunächst wurde eine Echokardiografie am Tag 0 durchgeführt. Da am dritten Tag nach Schlaganfall der stärkste Gewichtsverlust und somit eine intensive metabolische Stresseinwirkung auf das Herz zu erwarten war, erfolgte zu diesem Zeitpunkt die zweite Untersuchung.

Die Messung beruht auf dem Prinzip der unterschiedlichen Reflexion von Schallwellen durch verschiedene Gewebe. Die im Inneren eines Schallkopfes gelegenen piezoelektrischen Kristalle werden durch Anlegen einer Spannung deformiert. Im Rahmen dieser Verformung werden Ultraschallwellen generiert, die von Strukturen in unmittelbarer Umgebung des Schallkopfes unterschiedlich reflektiert werden.

Durch Registrierung der Reflexionen und deren Umwandlung in elektrische Spannung wird ein Bild des beschallten Areals erstellt, in welchem die verschiedenen Gewebe differenzierbar sind.

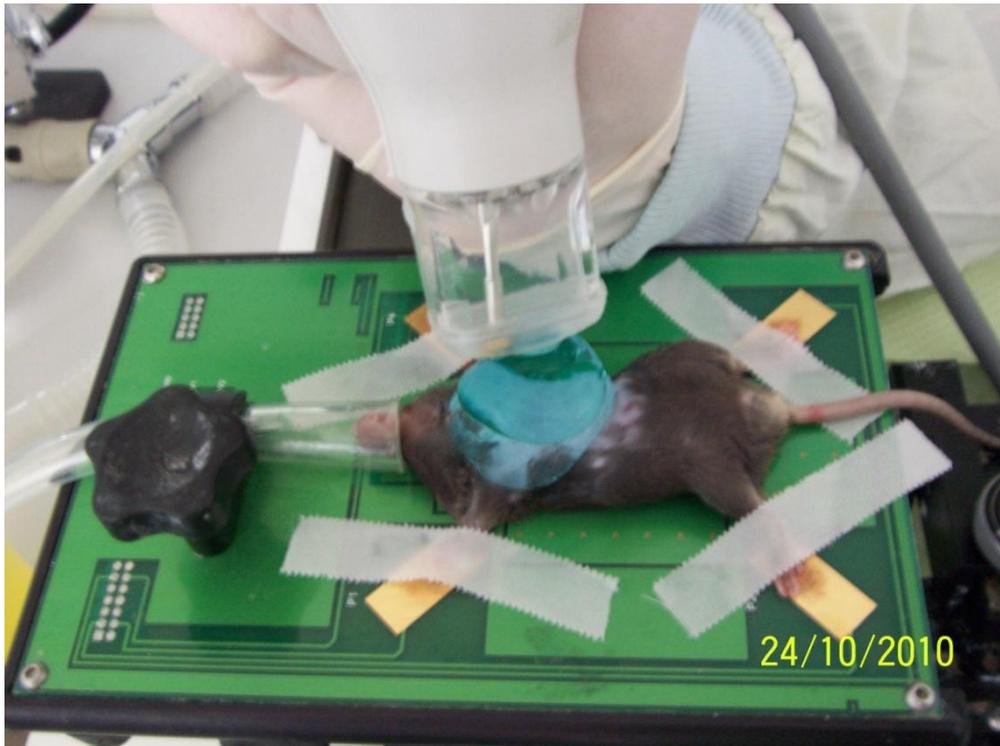


Abbildung 1: Lagerung für die echokardiografische Untersuchung

Die Versuchstiere wurden zunächst mit dem gleichen Gasgemisch aus Isofluran, Sauerstoff und Distickstoffoxid, welches auch für die MCAO verwendet wurde, narkotisiert. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 3,5 % Isofluran in einer Narkosekammer. Nach Eintritt des Toleranzstadiums wurden die Tiere in Rückenlage auf einem Untersuchungstisch fixiert, welcher auf 39 °C temperiert war. Die Narkose wurde mittels Beatmung durch eine Maske mit 1,5 % Isofluran aufrechterhalten. Die Tiere wurden in Rückenlage auf den Untersuchungstisch verbracht und die ausgestreckten Gliedmaßen wurden darauf mittels Pflasterstreifen fixiert (s. Abbildung 1). Anschließend wurde die Brust der jeweiligen Maus mit „Veet“-Enthaarungscreme behandelt und mit Leitungswasser gereinigt. Auf die haarfreie Haut wurde nachfolgend Ultraschallgel aufgetragen. Die Untersuchung erfolgte mit einem 25 MHz-Schallkopf.

Durch einen Zweikammerblick der linken Herzseite, welcher mit parasternaler Ausrichtung des Schallkopfes sichtbar wurde, konnten Aufnahmen des linken Ventrikels im B- und M-Mode erstellt werden. Im B-Mode erfolgten die Bestimmung der systolischen und diastolischen Innenfläche des Ventrikels sowie die Ermittlung von dessen Längsachse.

Für die Erfassung der Herzfrequenz und der Wandstärke des linken Ventrikels (LVPW-linksventrikuläre posteriore Wand) und des Septums (IVS-intraventrikuläres Septum) in der Systole und Diastole wurde der M-Mode verwendet. Der end-systolische (LVESD) und end-diastolische (LVEDD) Durchmesser des linken Ventrikels konnte ebenfalls mit dem M-Mode

bestimmt werden. Um die Auswurfsfraktion, das Herzminutenvolumen, die Verkürzung der linken Herzkammer während der Herzaktion sowie die Masse des linken Ventrikels zu ermitteln, wurden die Resultate der Echokardiografie mit Hilfe der „Vevo 770“-Software, Version 2.3.0 analysiert.

3.4.8 Tötung und Organentnahme

Die Versuchstiere wurden am Tag 7 bzw. Tag 3 nach der Operation getötet, sofern sie nicht vorher aufgrund von Anzeichen erheblichen Leidens euthanasiert werden mussten. Vor der Tötung erfolgte eine letzte Messung der Körperzusammensetzung durch NMR-Scan.

Zunächst wurden die Tiere mittels einer intraperitoneal applizierten Kombination aus 100 mg/kg Ketamin und 20 mg/kg Xylazin tief narkotisiert. Bei Beginn des Asphyxiestadiums, direkt nach dem Aussetzen der Spontanatmung, erfolgte die Eröffnung der Brusthöhle mit einer Schere. Daraufhin wurde mit einer zuvor mit EDTA gespülten Spritze Blut aus der rechten Herzkammer entnommen, bis der Herzstillstand eintrat. Hierzu wurden BD Plastipak™-Spritzen mit 23 Gx1"- Kanülen verwendet. 0,6 ml des Blutes wurden in ein mit 0,05 ml EDTA gefülltes Eppendorfgefäß gegeben, kurz geschwenkt und auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte die Präparation der Organe (s. Tabelle 16). Deren Gewicht wurde sofort nach der Entnahme auf einer Präzisionswaage ermittelt. Die entnommenen Organe wurden anschließend zeitweilig in einem Eppendorfgefäß in Flüssigstickstoff gelagert. Nach Abschluss aller Präparationsarbeiten wurden die Organe bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C in einem Tiefkühlschrank gelagert.

Tabelle 7: Präparierte Organe

Brusthöhle	Herz
Bauchhöhle	Milz Leber rechte Niere linke Niere
Fettgewebe	epididymales Fettgewebe braunes Fettgewebe
Muskeln (jeweils rechte und linke Hintergliedmaße)	<i>Musculus gastrocnemius</i>
Gehirn	<i>in toto</i> , inkl. Riechhirn, Großhirn, Mittelhirn, Hinterhirn sowie Kleinhirn

Die Entnahme des Gehirns erfolgte abweichend von der oben beschriebenen Methode ohne Gewichtsbestimmung. Das Hirn wurde im Anschluss seiner Präparation direkt in ein mit Methylbutan gefülltes Becherglas gegeben, welches zuvor durch Lagerung auf Trockeneis auf ca. $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiert worden war. Nachdem das Gewebe auf diese Art schonend durchgefroren wurde, konnte es in Plastik-Röhrchen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Anfertigung der Gefrierschnitte gelagert werden.

Plasmagewinnung

Die Blutproben wurden mit einer Eppendorf-Zentrifuge bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $3000 \times g$ für zehn Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma als Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.4.9 Bestimmung der Infarktgröße

Die Bestimmung der Schlaganfallvolumina erfolgte anhand gefärbter Gefrierschnitte, die von Frau Monika Dopatka (Charité Berlin, Department of Experimental Neurology) angefertigt und ausgewertet wurden.

Schnitt

Sämtliche folgenden Arbeitsschritte wurden in der auf $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperierten Kühlkammer des Kryotoms Leica CM1959 durchgeführt. Initial erfolgte die Fixierung der tiefgefrorenen Gehirne mittels *Tissue freezing medium* auf einem Objekteller, wobei die Okzipitalfläche als Auflagebereich diente. Nachfolgend wurden die Präparate von der rostralen Hirnseite ausgehend mit Hilfe des Kryotoms in $20\text{ }\mu\text{m}$ dicke Scheiben geschnitten. Während des Schneideprozesses erfolgte nach makroskopischen Anhaltspunkten eine Selektion von fünf Schnittebenen, welche definierte Abstände zur Interaurallinie aufweisen sollten ($6,6\text{mm}$; $5,43\text{mm}$; $3,94\text{mm}$; $1,86\text{mm}$; $-0,08\text{mm}$). Diese Schnittebenen wurden zur anschließenden Färbung auf einen Objektträger verbracht.

Hämatoxylin-Färbung

Die Objektträger mit den Präparaten wurden für je zehn Sekunden durch eine absteigende Ethanol-Reihe (100 %, 96 %, 80 %) geführt und danach zehn Mal in eine Küvette mit destilliertem Wasser (*Aqua dest.*) getaucht.

Daraufhin erfolgte eine dreiminütige Einbettung in eine Hämatoxylin-Lösung (modifiziert nach Gill II), die durch zweimaliges kurzes Eintauchen in ein Gemisch aus 1 ml konzentrierter Salzsäure und 99 ml Ethanol (96 %) beendet wurde, woraufhin ein weiterer Spülvorgang durch zehnmaliges Eintauchen in destilliertes Wasser folgte. Anschließend wurden die Objektträger für fünf Minuten in einprozentiger Natriumhydrogencarbonat-Lösung eingebettet,

um nach einem erneuten Spülvorgang mit *Aqua dest.* jeweils zehn Sekunden durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe (80 %, 96 %, 100 %) geführt zu werden. Nun schloss sich ein kurzes Eintauchen in Xylol und die abschließende Versiegelung der Präparate mittels Vitro-Clud® und Deckgläsern an.

Auswertung

Die Objektträger mit den Schnittpräparaten wurden in einem Epson Perfection 4990 Photo-Scanner eingescannt. Die Auswertung der Bilder erfolgte mittels Sigma Scan® Pro-Software. Hierbei wurde die blau gefärbte gesunde graue Substanz vom ungefärbten Infarktbereich abgegrenzt und die jeweilige Flächengröße ermittelt. Diese wurde nach Ödemkorrektur verglichen mit der Fläche grauer Substanz der gesunden Hirnhemisphäre. Mit dieser Methode wird der Anteil an beschädigter grauer Substanz ohne Verfälschung durch ödematös verändertes Gewebe bestimmt. [86] Die Umrechnung der Werte in absolute und relative Infarktgrößen erfolgte anschließend mit Microsoft® Excel 2007.

3.4.10 Bestimmung von Caspase- und Proteasomenaktivitäten

3.4.10.1 Messung der Proteasomenaktivität

Es wurden drei unterschiedliche Proteasomenaktivitäten, die „*Chemotrypsinlike*“(CT-L)-Aktivität, die „*Caspaselike*“(C-L)-Aktivität und die „*Trypsinlike*“(T-L)-Aktivität, gemessen. Hierzu wurden drei entsprechende fluorogene Substrate (s. u.) verwendet, die mit fluoreszierendem Amidomethylcoumarin (AMC) versehen waren. Durch die Spaltung der Substrate wurde das AMC freigesetzt, woraufhin dessen Menge fluorometrisch bestimmt werden konnte, was wiederum Rückschlüsse auf die Enzymaktivität zuließ.

Aufarbeitung des Gewebes

Die Messung erfolgte an Gewebeproben der zuvor präparierten und tiefgefrorenen *Mm. gastrocnemii* beider Hintergliedmaßen. Das tiefgefrorene Gewebe wurde vor der Messung einer speziellen Aufarbeitung unterzogen, um die Proteasomen aus ihrer Lokalisation in Zytosol und Zellkern zu extrahieren. Zunächst wurde das Gewebe durch Zerschlagen bei -80 °C in einer eigens hierfür entwickelten Apparatur pulverisiert. Anschließend wurde eine Menge von ca. 20 mg des pulverisierten Muskels in ein Eppendorf-Gefäß verbracht und mit 300 µl Proteasomen-Lysispuffer (s. Tabelle 5) versetzt. Die weitere Verarbeitung erfolgte bei maximal 4 °C, was durch die durchgehende Lagerung der Proben auf Eis gewährleistet wurde. Das mit Puffer versetzte Gewebe wurde eine Minute lang homogenisiert. Um eine vollständige Lyse der Zellmembranstrukturen zu gewährleisten, wurden die Proben anschließend 20 Sekunden lang mit neun Zyklen pro Sekunde bei 80-prozentiger Intensität sonifiziert. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation der Proben in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 4 °C und

13000 x g für 15 Minuten. Daraus resultierte die Trennung des Homogenats in zytoplasmatischen Überstand und Zellpellet. Zur weiteren Verarbeitung wurde der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Die verbleibende Probe wurde erneut nach obigem Schema sonifiziert und zentrifugiert, um eventuell verbliebene Vesikel und Zellmembranstrukturen zu zerstören und zu entfernen. 20 µl des Überstandes dienten zur späteren Messung der Proteinkonzentration mittels Bradford. Die restliche Probe wurde bis zur Messung der Enzymaktivität bei -80 °C eingefroren.

Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der Gewebeproben erfolgte nach der Bradford-Methode. Als Standard-Konzentrationsreihe diente eine BSA-Verdünnungsreihe. Zunächst wurden verschiedene Verdünnungsstufen des BSA hergestellt (0 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,6 mg/ml und 0,8 mg/ml).

Diese wurden als Doppelansatz mit aufsteigender Konzentration in eine 96-Well-Platte pipettiert (5 µl/well). Außerdem wurden zwei Verdünnungsstufen der Gewebeproben (1:5 und 1:10) erzeugt, die ebenfalls als Doppelansatz auf derselben Platte aufgetragen wurden (5 µl/well). Anschließend erfolgte die Zugabe von 250 µl Bradford Dye Reagenz in jedes Well. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten wurde die Messung der optischen Dichte bei 595 nm am „Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer“ vorgenommen. Das Prinzip der Messung beruht auf der Bindung des Bradford Reagenz an die Proteine und einer damit einhergehenden Zunahme der optischen Dichte proportional zum Proteingehalt der Probe. Die Auswertung wurde mit Hilfe von Microsoft Excel 2007 durchgeführt. Hierzu wurde aus den Ergebnissen der Standardreihe eine Eichkurve erstellt, mit Hilfe derer die unbekanntes Proteinkonzentrationen der Gewebeproben berechnet werden konnten.

„Chemotrypsinlike“(CT-L)-Aktivität

Zunächst wurden die tiefgefrorenen Proben im Kühlschrank bei 4 °C aufgetaut. Auf eine 96-well-Platte wurden 10 µl jeder Probe im Doppelansatz aufgetragen (entsprechend ca. 100-150 µg Gesamtprotein). Dazu wurden 140 µl des Mastermixes dazugegeben, der 40 µM des fluorogenen Substrates LLVY-AMC und 1 x Tris-EDTA enthielt. Die Kinetik-Messungen erfolgten ohne und mit Inhibitor (40 µM MG132) im Twinkle-Fluorometer bei 37 °C, wobei die Exzitation 355 nm und die Emission 460 nm betrug. Die Fluoreszenzintensitätsmessung wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten mit einem Messintervall von 180 Sekunden durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel 2007 anhand einer AMC-Eichkurve, mit welcher die Messwerte der Proben unter Berücksichtigung des zuvor ermittelten Gesamtproteingehaltes in Enzymaktivität (nmol/mg/min) umgerechnet werden konnten.

„Trypsinlike“(T-L)-Aktivität

Die Bestimmung der T-L-Aktivität erfolgte nach demselben Schema wie die der CT-L-Aktivität. Das fluorogene Substrat im Mastermix wurde dem Ziel der Messung angepasst, wobei in diesem Fall ZLLE-AMC zum Einsatz kam.

„Caspaselike“(CL)-Aktivität

Als fluorogenes Substrat wurde hier Bz-Val-G-A-AMC verwendet. Da bei dieser Messung eine geringere Enzymaktivität zu erwarten war, wurde die Probenmenge pro Well auf 200 µg erhöht, um messbare Ergebnisse zu erhalten. Alle übrigen Schritte wurden nach dem Schema der CT-L-Aktivitätsmessung durchgeführt.

3.4.10.2 Messung der Caspase-3-Aktivität

Aufarbeitung des Gewebes

Die Messung wurde an Gewebeproben des *M. gastrocnemius* durchgeführt. Die Pulverisierung und Aufteilung der Muskeln erfolgte wie im Abschnitt 3.3.10.1 beschrieben. Das Gewebepulver wurde anschließend mit 300 µl Caspase-Lysispuffer (s. Tabelle 5) versetzt und nach dem bereits erläuterten Verfahren homogenisiert. Zur Auflösung der Zellstrukturen diente hierbei das dreimalige Schockgefrieren in Flüssigstickstoff mit direkt anschließendem Auftauvorgang im Thermomixer bei 37 °C für 90 Sekunden. Daraufhin wurden die Homogenate für eine Dauer von 30 Minuten bei 4 °C und 20000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und nochmals bei gleichen Bedingungen für 20 Minuten zentrifugiert. Von dem so gewonnenen zytoplasmatischen Überstand wurden 20 µl für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration abgeteilt. Der verbleibende Überstand wurde bis zur Messung bei -80 °C aufbewahrt, während die Pellets verworfen wurden.

Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Messung des Gesamtproteingehaltes der Proben erfolgte nach dem im Abschnitt 3.4.10.1 erläuterten Schema.

Caspase-3-Aktivität

Zunächst wurden die Proben bei 4 °C im Kühlschrank aufgetaut. Anschließend wurden jeweils 30 µl Probe (entsprechend ca. 100 µg Gesamtprotein) im Doppelansatz auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Der Mastermix, der 1 x Caspase Assay Puffer, 2 % DMSO, 10 mM DTT und 50 µM fluorogenes Substrat (DEVD-AMC) enthielt, wurde zu den Proben dazugegeben. Zusätzlich erfolgte auch die Messung der Caspaseaktivität mit spezifischem Inhibitor (DEVD-CHO), um unspezifische Hintergrundaktivitäten ausschließen zu können. Die Enzymaktivitätsmessung erfolgte im Twinkle-Fluorometer bei 37 °C, einer Exzitationswellenlänge von

360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm über einen Zeitraum von 60 Minuten mit einem Messintervall von 360 Sekunden.

Die Auswertung der Messwerte erfolgte wie im Abschnitt „Messung der Proteasomenaktivität“ bereits erläutert.

3.5 Statistische Auswertung

Alle ermittelten Daten wurden zunächst im Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2007 nach Versuchsgruppen geordnet zusammengefasst. Die statistische Auswertung erfolgte mittels IBM® SPSS Statistics. Die graphische Umsetzung wurde mit Hilfe des Programms „GraphPad Prism 5.0 for Windows“ vorgenommen.

Verlaufsdaten mit gruppeninternen Vergleichen

Für das Körpergewicht, für die Fettmasse, die fettfreie Masse, die Körperflüssigkeit, die Futter- und Wasseraufnahme (jeweils als Absolutwerte und in Relation zum Körpergewicht) und für die Aktivität wurden Verlaufsdaten erhoben. Diese wurden zunächst mittels Mauchly-Test auf Sphärizität überprüft. Danach erfolgte ein gruppeninterner Vergleich der Werte der unterschiedlichen Messzeitpunkte mit Hilfe der *Repeated Measures* ANOVA. Liegt keine Sphärizität vor, d. h. ist der Mauchly-Test signifikant ($p \leq 0,05$), wird üblicherweise eine Korrektur des F-Wertes nach Greenhouse-Geisser empfohlen, andernfalls kann der unkorrigierte Wert verwendet werden. Da der Mauchly-Test allerdings nur bei hinreichend großen Stichproben aussagekräftig ist, wurde in dieser Arbeit trotzdem in allen Fällen der konservativere Test angewandt, d. h. es wurden stets die nach Greenhouse-Geisser korrigierten Werte angegeben. Bei Vorliegen signifikanter Unterschiede erfolgte anschließend ein paarweiser Vergleich der verschiedenen Messzeitpunkte mittels t-Test für gepaarte Stichproben mit Bonferroni-Anpassung.

Für die Echokardiografie-Gruppen lagen nur Daten für zwei Messzeitpunkte vor. Somit war ein gruppeninterner Test der Mittelwertunterschiede mit dem t-Test für abhängige Messungen ausreichend.

Datenvergleich zwischen den Gruppen

Für die Kontroll-, OP-Kontroll-, Schlaganfall- und Antibiose-Gruppe wurden Mehrfachvergleiche durchgeführt, welche sich stets auf jene Gruppen bezogen, die sich jeweils nur in einem Merkmal unterschieden. So erfolgte ein Vergleich der Kontroll-Tiere mit den OP-Kontroll-Tieren, um den Einfluss der reinen chirurgischen Intervention auf die Ergebnisse beurteilen zu können. Die Werte der OP-Kontroll-Gruppe wiederum wurden in Relation zu denen der Schlaganfall-Gruppe gesetzt, da hiermit die Analyse des Effektes der zerebralen Ischämie

möglich war. Zusätzlich wurden die Schlaganfall-Tiere mit den Antibiose-Tieren verglichen, um den Einfluss von postoperativen bakteriellen Infektionen auf den Versuchsverlauf nach Schlaganfall auswerten zu können.

Zunächst wurden alle Daten mittels Levene-Test auf Varianzhomogenität überprüft. Lag diese vor, erfolgte die Auswertung mittels *One-Way* ANOVA (unabhängige Variable: Gruppe) und im Falle eines relevanten Ergebnisses der paarweise Vergleich der Gruppen mittels t-Test mit Bonferroni-Anpassung. Konnte keine Varianzhomogenität angenommen werden, wurden die Vergleiche mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt, als Post-Hoc-Analyse diente in diesem Fall der Tamhane-Test.

Die Echokardiografie-Gruppen wurden im Laufe der Versuchsreihe insgesamt drei Isofluran-Narkosen unterzogen. Da ein Einfluss dieser wiederholten Narkosen auf die Messwerte nicht ausgeschlossen werden kann, erfolgte für die Echokardiografie-Gruppen ausschließlich der Direktvergleich untereinander. Auch hierbei erfolgte zunächst die Überprüfung auf Varianzhomogenität mit anschließendem t-Test bzw. Mann-Whitney-Test bei inhomogener Varianzverteilung.

Das Signifikanzniveau wurde durchgehend wie folgt bewertet und gekennzeichnet:

$p > 0,05$ = keine Signifikanz

$p \leq 0,05$ = signifikant = *

$p \leq 0,01$ = deutlich signifikant = **

$p \leq 0,001$ = hoch signifikant = ***

$p \leq 0,0001$ = höchst signifikant = ****

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeine Anmerkungen

„Kontrolle“ bezeichnet die unbehandelte Kontroll-Gruppe. „OP-Kontrolle“ steht für die Versuchsgruppe mit reiner Operation ohne Schlaganfall. „Schlaganfall“ kennzeichnet die Gruppe mit chirurgisch induziertem Schlaganfall ohne antibiotische Behandlung, während die Tiere mit Schlaganfall und gleichzeitiger Behandlung mit Enrofloxacin unter der Bezeichnung „Antibiose“ zusammengefasst sind. Die Gruppen, welche einer echokardiografischen Untersuchung unterzogen wurden, sind mit „Sonografie-OP-Kontrolle“ (Tiere mit Kontroll-Operation) und „Sonografie-Schlaganfall“ (Tiere mit induziertem Schlaganfall) gekennzeichnet. „Tag 0“ ist der Tag des Versuchsbeginns und gleichzeitig Zeitpunkt der Ausgangsmessungen. „Tag 7“ kennzeichnet das Versuchsende, hiervon ausgenommen sind die Echokardiografie-Gruppen, für die „Tag 3“ das Ende des Versuchs darstellte. Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte mit Standardfehlern.

4.2 Ausschluss von Tieren

Zwei Tiere der Schlaganfall-Gruppe wurden aufgrund nicht erfolgter Infarktbildung ausgeschlossen. Darüber hinaus musste ein Tier der Schlaganfall-Gruppe wegen eines Protokollfehlers im Versuchsverlauf ausgeschlossen werden. In der OP-Kontroll-Gruppe erfolgte ein Ausschluss zweier Tiere wegen der unbeabsichtigten Induktion eines Schlaganfalls. In der Sonografie-Schlaganfall-Gruppe wurde eine Maus aufgrund eines neurologischen Status von 3 vorzeitig euthanasiert und nicht in die Auswertung mit einbezogen.

4.3 Infarktgrößen

Im Gefrierschnitt der Gehirne aller in die Auswertung einbezogenen Tiere der Kontroll-, OP-Kontroll- und Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe fanden sich keine ischämischen Areale. Die Infarktgrößen der übrigen Gruppen sind in Abbildung 2 dargestellt.

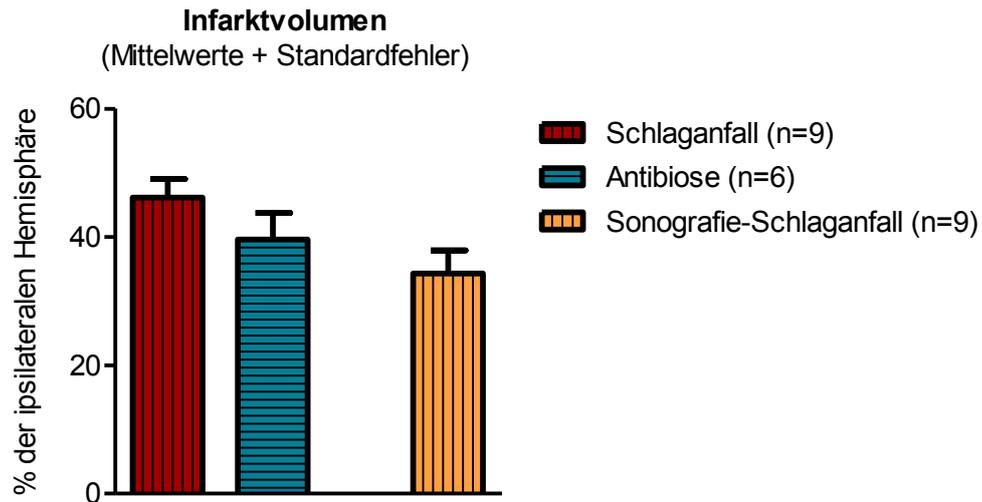


Abbildung 2: Infarktgrößen in % der ipsilateralen Gehirnhälfte, keine signifikanten Unterschiede am Tag 7 zwischen unbehandelter Schlaganfall-Gruppe und antibiotisch behandelten Tieren, Sonografie-Schlaganfall-Gruppe nicht vergleichbar

Bezüglich der Infarktvolumina ließen sich keine Unterschiede zwischen den antibiotisch behandelten Tieren und den unbehandelten Mäusen nachweisen (Antibiose vs. Schlaganfall: $p = 0,2$; t-Test). Die Sonografie-Schlaganfall-Gruppe wurde aufgrund der Abweichungen bezüglich Vorbehandlung und Entnahmezeitpunkt des Gewebes nicht mit den übrigen Gruppen verglichen.

4.4 Neurologischer Status

Die Mäuse starteten gruppenübergreifend mit einer neurologischen Wertung von 0 am Tag 0 in die Versuche. Alle Tiere der Kontroll-, OP-Kontroll- und Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe wiesen im gesamten Versuchszeitraum eine neurologische Wertung von 0 auf. Die Ergebnisse der Bestimmung des neurologischen Status der Tiere mit nachgewiesener zerebraler Ischämie sind in nachfolgender Grafik aufgeführt.

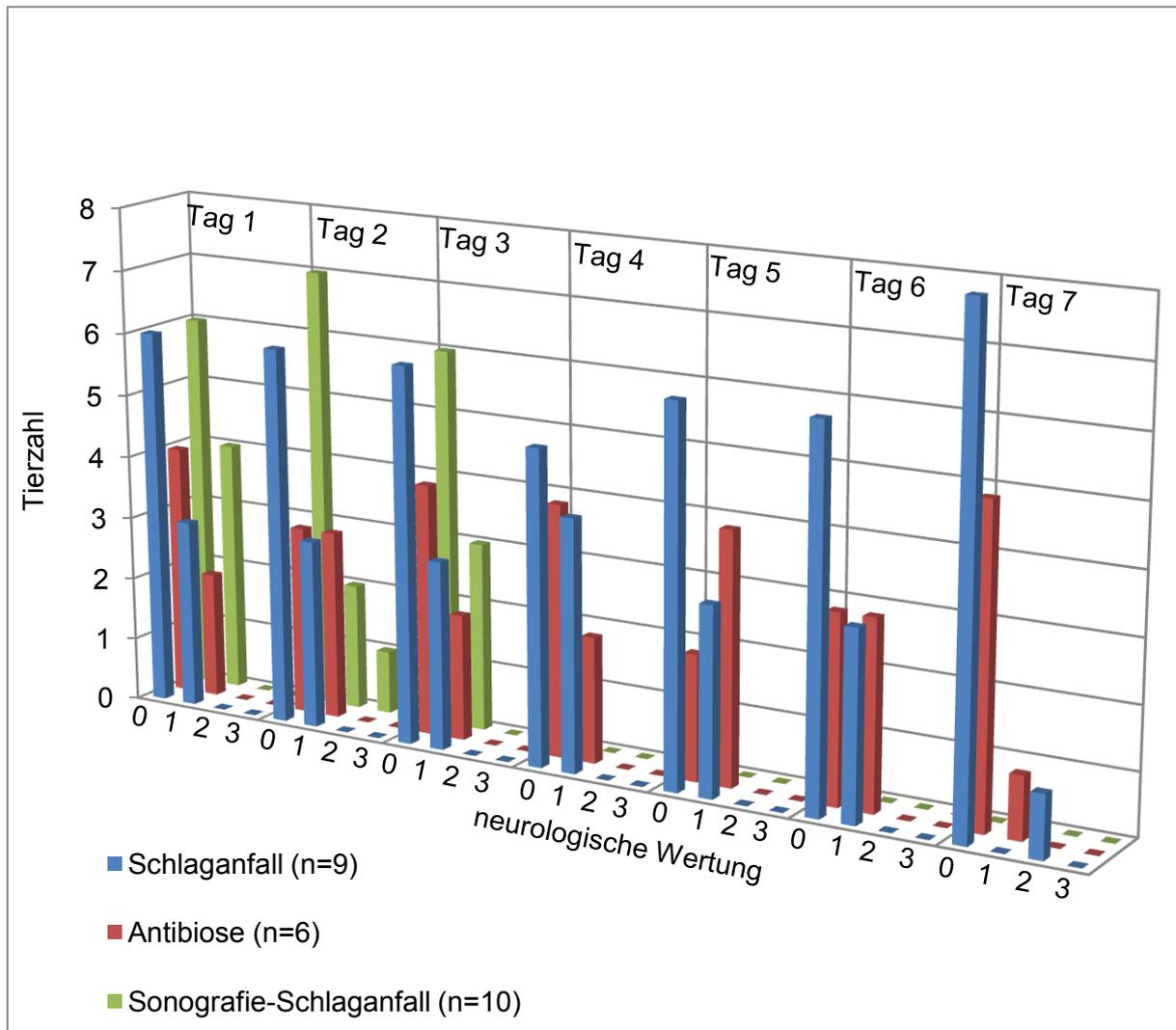


Abbildung 3: Anzahl der Tiere pro Gruppe mit der jeweiligen neurologischen Wertung von 0 bis 3 an den Tagen 0 bis 7

4.5 Körpergewicht

4.5.1 Gewichtsverlauf: Überblick

Die Entwicklung des Körpergewichtes der Versuchstiere ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Signifikanz der Veränderungen des Körpergewichtes innerhalb der Gruppen wird im Abschnitt „Gruppeninterner Gewichtsverlauf“ behandelt, gruppenübergreifende Vergleiche finden sich im Abschnitt „Unterschiede im Gewichtsverlauf zwischen den Gruppen“.

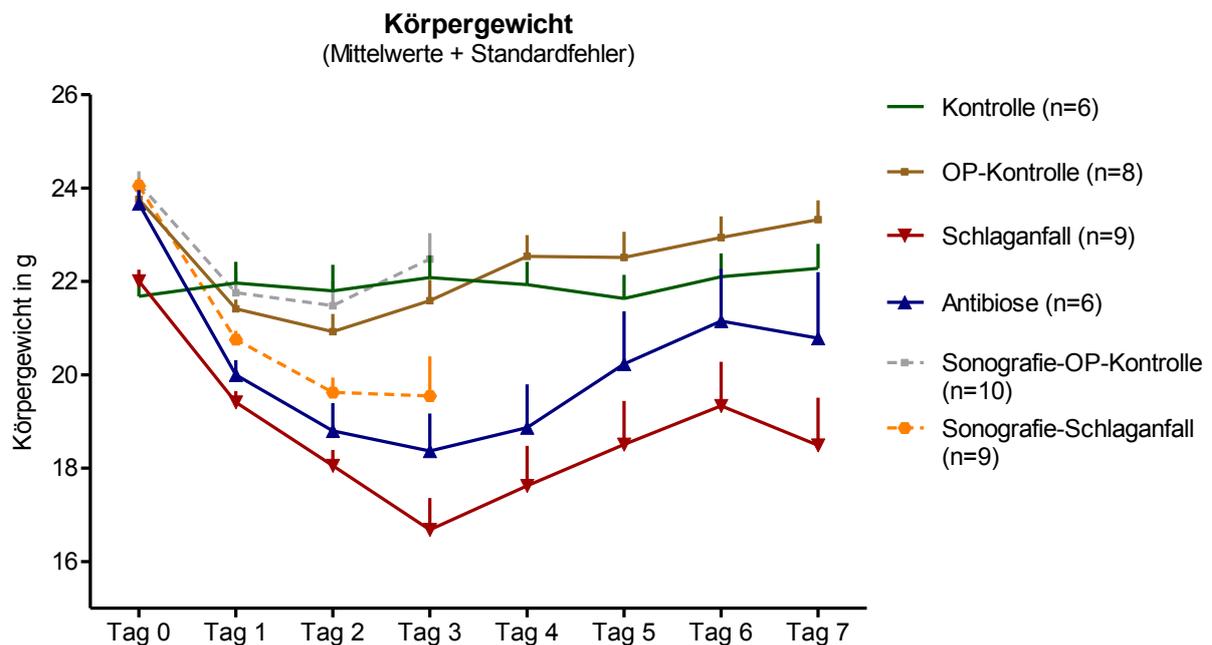


Abbildung 4: Entwicklung des Körpergewichtes im Versuchsverlauf, zwischen den gekennzeichneten Messzeitpunkten zur verständlicheren Darstellung interpoliert: Anfänglich reduzierte sich das Körpergewicht in allen Gruppen mit chirurgischem Eingriff. Der Gewichtsverlust bei den Tieren mit Schlaganfall scheint hierbei stärker auszufallen als bei den Mäusen mit Kontroll-Operation. Aufgrund signifikant unterschiedlicher Ausgangsgewichte erfolgte kein statistischer Vergleich.

4.5.2 Gewichtsverlauf: gruppeninterne Entwicklung

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Verlaufsdaten mittels *Repeated Measures* ANOVA korrigiert nach Greenhouse-Geisser und anschließendem Bonferroni-Test analysiert. Mit Ausnahme der Kontroll-Gruppe wiesen alle Gruppen im Versuchsverlauf signifikan-

te Veränderungen des Körpergewichtes auf (OP-Kontrolle: $p = 0,001$; Schlaganfall: $p = 0,004$; Antibiose: $p = 0,012$; Sonografie-OP-Kontrolle: $p \leq 0,0001$, Sonografie-Schlaganfall: $p \leq 0,0001$). Im Folgenden werden die Detailergebnisse, speziell die Post-hoc-Tests, beschrieben.

Kontroll-Gruppe

Die Tiere dieser Gruppe wiesen keine signifikanten Änderungen des Körpergewichtes über den Versuchszeitraum auf ($p = 0,064$).

OP-Kontroll-Gruppe

Die OP-Kontroll-Tiere wiesen am Folgetag des chirurgischen Eingriffs einen signifikanten Gewichtsverlust auf ($p \leq 0,0001$). Im direkten Vergleich der übrigen direkt aufeinanderfolgenden Versuchstage ergab sich keine weitere relevante Differenz. Der Verlust an Körpermasse von Tag 0 auf Tag 3 war signifikant ($p = 0,021$). Gleiches galt für die anschließende Massezunahme von Tag 3 auf Tag 7 ($p = 0,027$). Zwischen dem Endgewicht der Tiere und deren Ausgangsgewicht war kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen (Tag 0 vs. Tag 7: $p = 1,0$).

Schlaganfall-Gruppe

Die Tiere dieser Gruppe verloren bis zum dritten Tag nach der Operation kontinuierlich an Gewicht, wobei der Verlust von Tag 0 zu Tag 1 ($p \leq 0,0001$) und von Tag 1 zu Tag 2 ($p = 0,01$) signifikant war. Im Vergleich zur Ausgangsmessung war das Körpergewicht am Tag 3 verringert ($p = 0,001$). Ab dem vierten Versuchstag erhöhte sich das Gewicht der Tiere wieder, diese Änderung war jedoch nur bedingt statistisch relevant (Tag 5 zu Tag 6: $p = 0,001$). Am siebten Versuchstag war noch eine geringere Körpermasse als zu Versuchsbeginn zu verzeichnen, was jedoch statistisch nicht mehr als signifikant gewertet wurde ($p = 0,28$).

Antibiose-Gruppe

Die Tiere der Antibiose-Gruppe zeigten im direkten Vergleich der aufeinanderfolgenden Versuchstage eine signifikante Gewichtsreduktion von Tag 0 auf Tag 1 ($p = 0,004$). Der Vergleich der übrigen Versuchstage mit dem jeweils folgenden Tag ergab keine weiteren relevanten Differenzen. Im Vergleich zum Versuchsbeginn war das Körpergewicht am Tag 3 reduziert, der p-Wert lag jedoch mit $p = 0,060$ knapp über dem relevanten Signifikanzniveau. Am Tag 7 bestand trotz des deutlich verringerten Gewichts keine statistisch relevante Differenz mehr zur Ausgangsmessung ($p = 1,0$).

Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe

Bei den Tieren der Sonografie-Kontroll-Gruppe trat innerhalb von 24 Stunden nach Versuchsbeginn ein signifikanter Gewichtsverlust auf ($p \leq 0,0001$), während vom Tag 1 zu Tag 2 keine signifikante Änderung der Körpermasse stattfand ($p = 0,422$). Vom zweiten bis zum dritten Versuchstag war wiederum eine signifikante Gewichtszunahme ($p = 0,003$) zu verzeichnen. Dennoch blieb das Körpergewicht zum Zeitpunkt des Versuchsendes signifikant unter dem Ausgangswert ($p = 0,013$).

Sonografie-Schlaganfall-Gruppe

In dieser Gruppe war der Verlust des Körpergewichtes innerhalb der ersten 24 Stunden nach Versuchsbeginn statistisch relevant ($p \leq 0,0001$). Eine weitere signifikante Gewichtsabnahme folgte vom Tag 1 zum Tag 2 ($p = 0,011$). Die im Verlauf des folgenden Untersuchungstages zu verzeichnende Gewichtsänderung war nicht signifikant (Tag 2 vs. Tag 3: $p = 1,0$). Am Ende des Versuchs wiesen die Tiere ein signifikant geringeres Gewicht auf als zu Beginn ($p = 0,005$).

4.5.3 Gewichtsverlauf: Vergleich zwischen den Gruppen

Ausgangsgewicht

Zu Versuchsbeginn waren bereits signifikante Unterschiede des Ausgangsgewichtes zwischen den Gruppen nachweisbar ($p \leq 0,0001$; *One-Way ANOVA*). So war das Gewicht der Kontroll-Gruppe mit durchschnittlich $21,7 \pm 0,5$ g wesentlich geringer als das der OP-Kontroll-Gruppe mit $23,8 \pm 0,2$ g ($p \leq 0,0001$). Das Gewicht der Schlaganfall-Gruppe war wiederum mit $22,0 \pm 0,2$ g signifikant geringer als das der OP-Kontroll-Tiere ($p = 0,001$) sowie der Antibiose-Gruppe ($23,7 \pm 0,3$ g; $p = 0,002$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni). Mit einem Gewicht von durchschnittlich $24,10 \pm 0,26$ g wiesen einzig die Sonografie-OP-Kontroll-Tiere zu Beginn des Versuchs keine relevante Differenz zur Sonografie-Schlaganfall-Gruppe auf ($24,04 \pm 0,17$ g; $p = 0,84$; t-Test).

Gewichtsänderungen im Versuchsverlauf

Aufgrund des signifikant unterschiedlichen Ausgangsgewichtes einiger Versuchsgruppen wurde zum objektiven Vergleich der Gruppen untereinander die Gewichtsänderung im Versuchsverlauf in Relation zum initial gemessenen Körpergewicht in Prozent beurteilt. Die relative Gewichtsänderung am Tag 3 war zwischen den Gruppen signifikant unterschiedlich ausgeprägt ($p \leq 0,0001$; *One-Way ANOVA*). Am Tag 7 zeigten sich ebenfalls relevante Unterschiede ($p = 0,0011$; Kruskal-Wallis).

Die nachstehenden Graphen zeigen eine Übersicht des durchschnittlichen relativen Gewichtsverlustes am dritten und siebten Versuchstag.

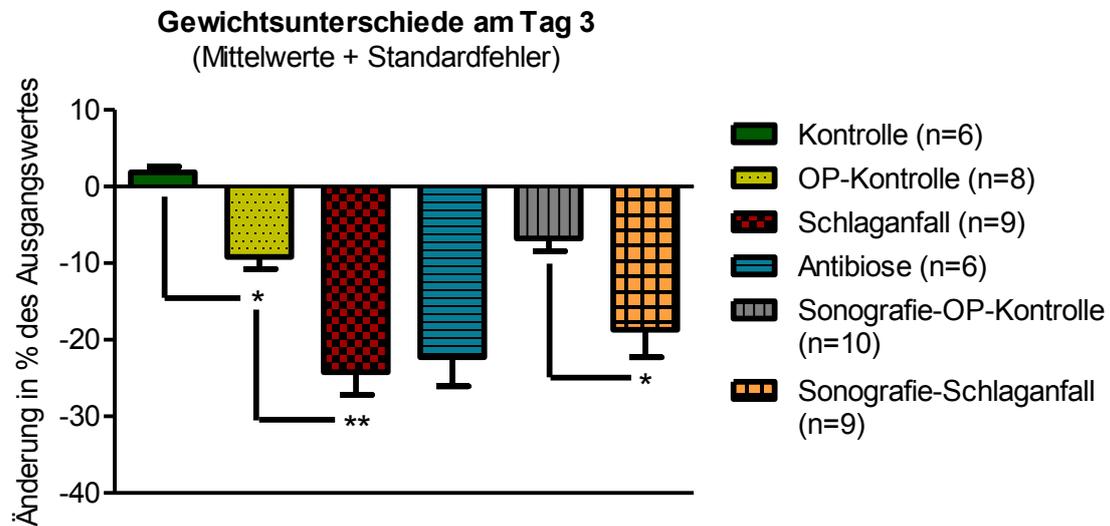


Abbildung 5: Unterschiede im Körpergewicht am Tag 3 im Vergleich zum Ausgangsgewicht: Die Tiere mit Schlaganfall verloren signifikant mehr Körpermasse als die Mäuse mit Kontroll-Operation.

Die OP-Kontroll-Gruppe hatte am Tag 3 durchschnittlich $9,2 \pm 1,6$ % Gewicht verloren, was einen deutlichen Unterschied zur Kontroll-Gruppe darstellte ($p = 0,04$), welche im selben Zeitraum $1,8 \pm 0,8$ % zunahm. Die Schlaganfall-Gruppe zeigte am dritten Versuchstag mit $24,2 \pm 3,0$ % einen signifikant höheren Gewichtsverlust als die OP-Kontroll-Gruppe ($p = 0,001$). Zwischen der Antibiose-Gruppe und der Schlaganfall-Gruppe hingegen waren am Tag 3 keine relevanten Unterschiede in der Ausprägung der Gewichtsänderung nachweisbar (Antibiose-Gruppe: $-22,3 \pm 3,8$ %; $p = 1,0$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni). Die Sonografie-Schlaganfall-Gruppe wies am Tag 3 mit durchschnittlich $18,7 \pm 3,6$ % einen signifikant höheren Gewichtsverlust auf als die Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe mit $6,8 \pm 1,6$ % ($p = 0,02$; t-Test).

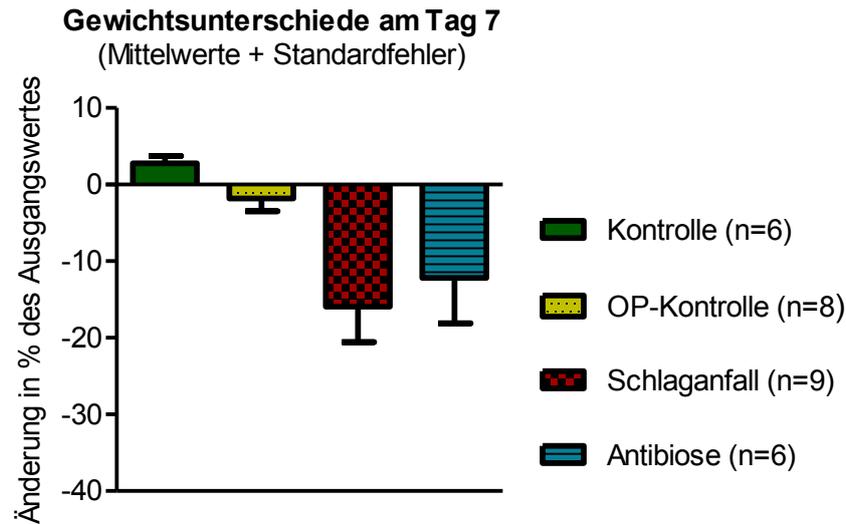


Abbildung 6: Unterschiede im Körpergewicht am Tag 7 im Vergleich zum Ausgangsgewicht: keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen trotz augenscheinlicher Abweichungen zwischen OP-Kontrolle und Schlaganfall-Gruppe

Am Tag 7 zeigte die OP-Kontroll-Gruppe mit $-1,8 \pm 1,7$ % keinen relevanten Unterschied zur Gewichtsänderung der Kontroll-Gruppe, welche zu diesem Zeitpunkt $2,8 \pm 1,0$ % zugenommen hatte ($p = 0,2$). Die Schlaganfall-Gruppe wies mit $-15,9 \pm 4,6$ % zwar noch einen deutlich höheren Gewichtsverlust auf als die OP-Kontroll-Gruppe, dies war jedoch innerhalb des 95%-Konfidenz-Intervalls nicht mehr signifikant ($p = 0,096$), ein Umstand, welcher auf die geringe Gruppengröße zurückzuführen sein könnte. Die antibiotisch behandelten Tiere zeigten auch zu diesem Zeitpunkt keine Differenz zur Schlaganfall-Gruppe (Antibiose-Gruppe: $-12,2 \pm 5,9$ %; $p = 1,0$; alle Einzelvergleiche: Tamhane).

4.6 Zusammensetzung der Körpermasse

4.6.1 Körperfett

Die Ergebnisse des NMR-Scans für das Fettgewebe sind in der nachfolgenden Tabelle und in Abbildung 7 dargestellt.

Tabelle 8: Körperfettmasse in Gramm an den Tagen 0, 3 und 7; Mittelwerte \pm Standardfehler

Gruppe	Fettmasse in g, Tag 0 (vor Operation)	Fettmasse in g, Tag 3	Fettmasse in g, Tag 7
Kontrolle	2,4 \pm 0,2	2,6 \pm 0,3	2,1 \pm 0,3
OP-Kontrolle	2,8 \pm 0,1	2,0 \pm 0,2	2,5 \pm 0,2
Schlaganfall	2,2 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	1,5 \pm 0,2
Antibiose	2,8 \pm 0,1	1,2 \pm 0,3	2,3 \pm 0,4
Sonografie-OP-Kontrolle	2,6 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	nicht erfolgt
Sonografie-Schlaganfall	3,1 \pm 0,1	1,4 \pm 0,2	nicht erfolgt

4.6.1.1 Gruppeninterne Entwicklung der Fettmasse

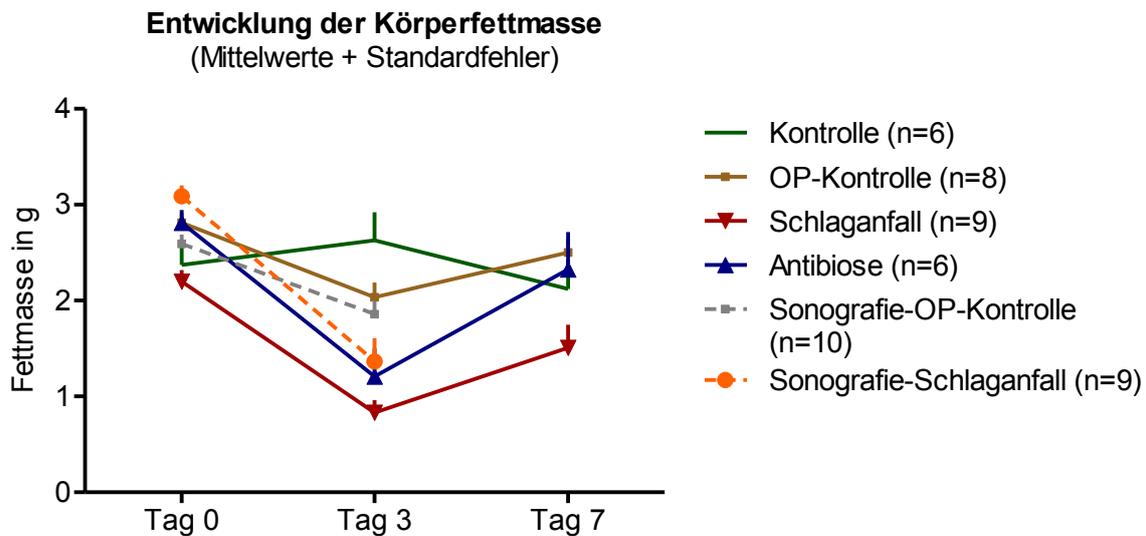


Abbildung 7: Entwicklung der absoluten Körperfettmasse, zwischen den gekennzeichneten Messzeitpunkten zur verständlicheren Darstellung interpoliert: Mit Ausnahme der Kontroll-Gruppe war gruppenübergreifend eine Reduktion bis zum Tag 3 zu beobachten, anschließend eine Zunahme bis zum Versuchsende bei entsprechender Versuchsdauer. Die Kontroll-Gruppe wies eine inverse Entwicklung auf.

Kontroll-Gruppe

Im zeitlichen Verlauf fanden sich signifikante Unterschiede ($p = 0,02$; *Repeated Measures ANOVA*). Die Fettmasse der Kontroll-Tiere war am dritten Versuchstag gegenüber der Ausgangsmessung geringfügig erhöht ($p = 0,3$), während sie sich von Tag 3 auf Tag 7 signifikant verringerte ($p = 0,02$). Zwischen Versuchsbeginn und -ende konnten bezüglich der Körperfettmasse jedoch keine signifikanten Differenzen festgestellt werden ($p = 0,6$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

OP-Kontroll-Gruppe

Bei dieser Gruppe waren im Versuchsverlauf ebenfalls signifikante Differenzen der absoluten Fettmasse nachweisbar ($p = 0,01$; *Repeated Measures ANOVA*).

Während sich die Werte von Tag 0 auf Tag 3 signifikant verringerten ($p = 0,004$), war die nachfolgende Zunahme vom dritten auf den siebten Versuchstag nicht signifikant ($p = 0,2$).

Auch in dieser Gruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der absoluten Fettmasse zwischen Versuchsbeginn und -ende. ($p = 0,7$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

Schlaganfall-Gruppe

Auch hier zeigten sich im zeitlichen Verlauf signifikante Abweichungen der Fettmasse ($p = 0,002$; *Repeated Measures ANOVA*).

Zunächst verringerte sich die Fettmasse vom ersten auf den dritten Versuchstag ($p = 0,001$), anschließend erfolgte eine Erhöhung des Körperfetts bis zum Ende des Versuchs ($p = 0,008$). Beide Änderungen waren signifikant. Zu Versuchsende war gegenüber der Ausgangsmessung kein signifikanter Unterschied mehr nachweisbar ($p = 0,2$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

Antibiose-Gruppe

Bei den antibiotisch behandelten Tieren waren im Versuchsverlauf signifikante Unterschiede der absoluten Fettmasse nachweisbar ($p = 0,005$; *Repeated Measures ANOVA*).

Die Tiere dieser Gruppe zeigten eine signifikante Reduktion der Körperfettmasse am Tag 3 ($p = 0,02$). Die Zunahme von Tag 3 zu Tag 7 lag knapp außerhalb des Signifikanzbereiches ($p = 0,051$). Es bestand kein signifikanter Unterschied der Fettmasse zwischen Versuchsbeginn und Versuchsende ($p = 0,9$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe

In dieser Gruppe reduzierte sich die Fettmasse von Tag 0 auf Tag 3 signifikant ($p \leq 0,0001$; gepaarter t-Test).

Sonografie-Schlaganfall-Gruppe

In dieser Gruppe fand sich ebenfalls eine signifikante Reduktion der Fettmasse von Tag 0 auf Tag 3 ($p \leq 0,0001$; gepaarter t-Test).

4.6.1.2 Entwicklung der Fettmasse: Vergleich zwischen den Gruppen

Der Vergleich der Gruppen untereinander wurde anhand der relativen Differenz zur Ausgangsmessung durchgeführt. Eine graphische Übersicht der relativen Differenzen der Fettmasse am Tag 3 zu den jeweiligen Ausgangswerten findet sich in Abbildung 8.

Am dritten Versuchstag bestanden statistisch relevante Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Änderung der Fettmasse ($p \leq 0,0001$, *One-Way ANOVA*). So hatte die OP-

Kontroll-Gruppe mit $27,5 \pm 4,9$ % im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ($+10,3 \pm 4,7$ %) signifikant mehr Fettmasse verloren ($p = 0,02$). Die Schlaganfall-Gruppe wies wiederum mit einem Verlust von $59,3 \pm 8,0$ % gegenüber der OP-Kontroll-Gruppe einen signifikanten Unterschied auf ($p = 0,04$). Zwischen den antibiotisch behandelten Tieren und den unbehandelten Mäusen mit zerebraler Ischämie bestand keine relevante Differenz am Tag 3 (Schlaganfall vs. Antibiose: $p = 1,0$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

Die Tiere der Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe verloren mit durchschnittlich $28,9 \pm 3,6$ % signifikant weniger Fettmasse als die der Sonografie-Schlaganfall-Gruppe mit $54,8 \pm 8,7$ % ($p = 0,02$; Mann-Whitney).

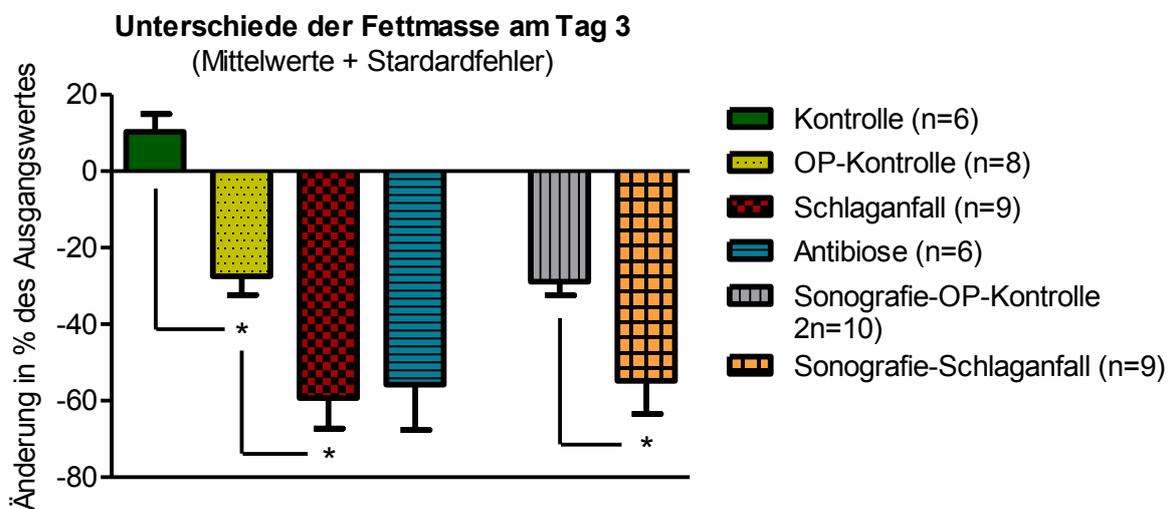


Abbildung 8: Unterschiede der Körperfettmasse am Tag 3 in Bezug zum Ausgangswert: Reduktion bei allen operierten Tieren, bei Vorliegen eines Schlaganfalls signifikant größerer Verlust als bei Kontroll-Operation

Am Tag 7 des Versuchs waren keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Änderung der Fettmasse zwischen den Gruppen mehr nachweisbar ($p = 0,7$; One-Way ANOVA; Kontrolle: $-11,4 \pm 6,9$ %; OP-Kontrolle: $-9,3 \pm 8,1$ %; Schlaganfall: $-26,9 \pm 13,7$ %; Antibiose: $-16,2 \pm 14,6$ %).

4.6.2 Fettfreie Masse

4.6.2.1 Gruppeninterne Entwicklung der fettfreien Masse

In Tabelle 9 und Abbildung 9 sind die Ergebnisse des NMR-Scans für die fettfreie Masse aller drei Messzeitpunkte dargestellt.

Tabelle 9: Fettfreie Körpermasse in Gramm an den Tagen 0, 3 und 7, Mittelwerte \pm Standardfehler

Gruppe	fettfreie Masse in g, Tag 0 (vor Operation)	fettfreie Masse in g, Tag 3	fettfreie Masse in g, Tag 7
Kontrolle	17,2 \pm 0,5	17,3 \pm 0,5	17,0 \pm 0,6
OP-Kontrolle	18,6 \pm 0,2	17,2 \pm 0,4	18,2 \pm 0,3
Schlaganfall	17,4 \pm 0,3	13,8 \pm 0,6	14,9 \pm 0,9
Antibiose	18,7 \pm 0,3	14,8 \pm 0,5	16,3 \pm 1,0
Sonografie-OP-Kontrolle	19,0 \pm 0,2	18,1 \pm 0,5	nicht erfolgt
Sonografie-Schlaganfall	19,0 \pm 0,2	15,7 \pm 0,5	nicht erfolgt

Kontroll-Gruppe

Die Kontroll-Tiere zeigten keine signifikanten Änderungen der fettfreien Masse über den Versuchszeitraum ($p = 0,44$; *Repeated Measures ANOVA*).

OP-Kontroll-Gruppe

Die absolute fettfreie Masse zeigte signifikante Änderungen im Versuchsverlauf ($p \leq 0,0001$; *Repeated Measures ANOVA*). Hierbei waren sowohl der Verlust fettfreier Masse am Tag 3 ($p = 0,003$) als auch die Zunahme von Tag 3 zu Tag 7 ($p = 0,008$) signifikant. Im direkten Vergleich zwischen Versuchsbeginn und -ende waren keine statistisch relevanten Unterschiede feststellbar ($p = 0,35$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

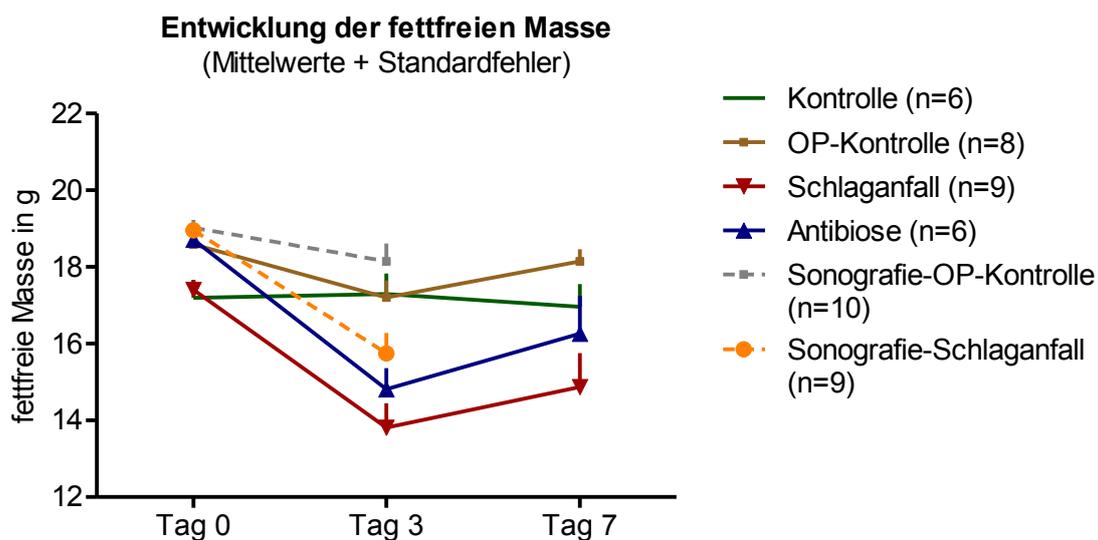


Abbildung 9: Entwicklung der absoluten fettfreien Masse, zwischen den gekennzeichneten Messzeitpunkten zur verständlicheren Darstellung interpoliert: anfänglicher Verlust bei allen operierten Gruppen am Tag 3, anschließende Zunahme bis zum Tag 7

Schlaganfall-Gruppe

Auch in dieser Gruppe waren im zeitlichen Verlauf signifikante Veränderungen der fettfreien Masse zu verzeichnen ($p \leq 0,0001$; *Repeated Measures ANOVA*). Im Vergleich zur Ausgangsmessung war das fettfreie Gewebe am Tag 3 ($p \leq 0,0001$) und am Tag 7 ($p = 0,021$) verringert. Keine signifikanten Unterschiede bestanden hingegen zwischen dem dritten und dem siebten Versuchstag ($p = 0,127$; alle Einzelvergleiche Bonferroni).

Antibiose-Gruppe

Die Tiere mit antibiotischer Behandlung wiesen im zeitlichen Verlauf signifikante Unterschiede in der absoluten fettfreien Masse auf ($p \leq 0,016$; *Repeated Measures ANOVA*). Von Tag 0 zu Tag 3 verringerte sich die fettfreie Masse signifikant ($p = 0,004$). Weitere statistisch relevante Differenzen konnten nicht nachgewiesen werden (Tag 3 vs. Tag 7: $p = 0,326$; Tag 0 vs. Tag 7: $p = 0,267$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe

In dieser Gruppe erfolgte eine signifikante Reduktion der fettfreien Masse von Tag 0 auf Tag 3 ($p = 0,039$; gepaarter t-Test).

Sonografie-Schlaganfall-Gruppe

Die fettfreie Masse reduzierte sich von Versuchsbeginn zu Tag 3 signifikant ($p \leq 0,0001$; gepaarter t-Test).

4.6.2.2 Entwicklung der fettfreien Masse: Vergleich zwischen den Gruppen

Zum Vergleich der Gruppen untereinander wurden die Messwerte von Tag 3 und Tag 7 in Relation zum Ausgangswert gesetzt. Die Abbildung 10 zeigt den durchschnittlichen relativen Verlust fettfreier Masse am dritten Versuchstag.

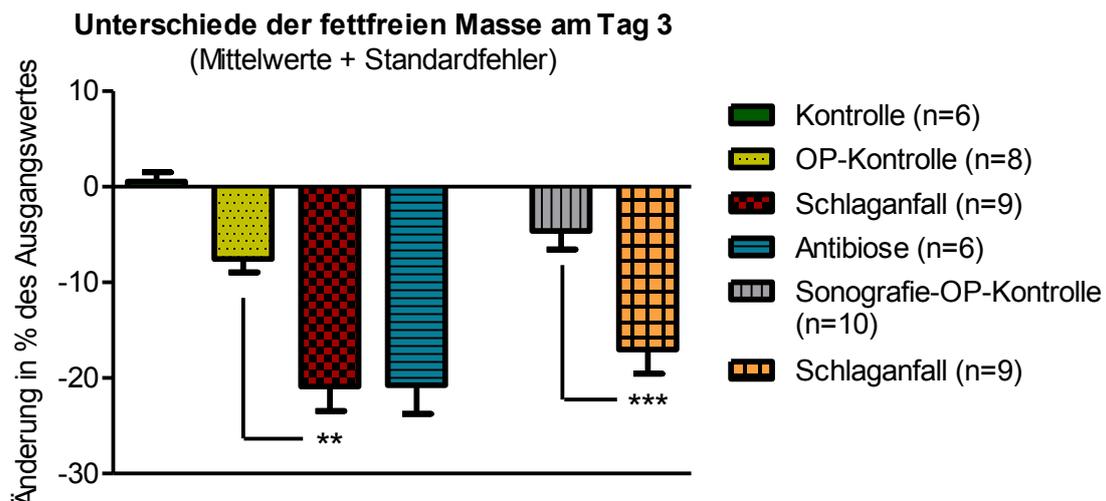


Abbildung 10: Unterschiede der fettfreien Masse am Tag 3: Verlust bei Tieren mit Schlaganfall signifikant stärker ausgeprägt als bei OP-Kontroll-Gruppen

Für die Differenz der fettfreien Masse ließen sich am dritten Versuchstag signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisen ($p \leq 0,0001$; *One-Way ANOVA*).

So reduzierte die Schlaganfall-Gruppe ihre fettfreie Masse deutlich stärker als die Tiere mit Kontroll-OP, dieser Unterschied war signifikant ($p = 0,001$). Dagegen zeigten sich keine signifikanten Differenzen beim Ausmaß des Verlustes an fettfreier Masse zwischen der Kontroll- und der OP-Kontroll-Gruppe ($p = 0,1$) sowie der Schlaganfall- und der Antibiose-Gruppe ($p = 1,0$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

Die Sonografie-Schlaganfall-Gruppe hatte am Tag 3 mehr fettfreie Masse abgebaut als die Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe, der Unterschied zwischen beiden Gruppen war wiederum signifikant ($p = 0,0009$; t-Test).

Am siebten Versuchstag hatte die Kontroll-Gruppe im Vergleich zur Ausgangsmessung durchschnittlich $1,4 \pm 2,2$ % fettfreie Masse verloren, die OP-Kontroll-Gruppe wies einen Verlust von $2,4 \pm 1,3$ % auf. Mit $-14,8 \pm 4,1$ % (Schlaganfall-Gruppe) und $-12,8 \pm 5,9$ % (Antibiose-Gruppe) fiel die Reduktion der fettfreien Körpermasse in den Gruppen mit Schlaganfall zum selben Zeitpunkt noch deutlich höher aus. Die Differenzen des siebten Versuchstages wurden aufgrund inhomogener Varianzen ($p = 0,045$; Levene-Statistik) mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließend dem Tamhane-Test analysiert. Obwohl im Kruskal-Wallis-Test noch eine signifikante Differenz zwischen den Gruppen nachweisbar war ($p = 0,03$), fanden sich im Post-Hoc-Test zwischen den vergleichbaren Gruppen keine signifikanten Unterschiede (Kontrolle vs. OP-Kontroll: $p = 1,0$; OP-Kontroll vs. Schlaganfall: $p = 0,09$; Schlaganfall vs. Antibiose: $p = 1,0$).

4.6.3 Körperflüssigkeit (Gesamtwassergehalt des Körpers)

4.6.3.1 Gruppeninterne Entwicklung der Körperflüssigkeit

In Tabelle 10 und Abbildung 11 sind die Ergebnisse des NMR-Scans für die Körperflüssigkeit (Gesamtwassergehalt) aller drei Messzeitpunkte dargestellt.

Tabelle 10: Wassergehalt des Körpers in Gramm an den Tagen 0, 3 und 7, Mittelwerte \pm Standardfehler

Gruppe	Wassergehalt in g, Tag 0 (vor Operation)	Wassergehalt in g, Tag 3	Wassergehalt in g, Tag 7
Kontrolle	13,8 \pm 0,2	14,4 \pm 0,6	14,3 \pm 0,3
OP-Kontrolle	14,8 \pm 0,2	14,5 \pm 0,5	15,1 \pm 0,2
Sonografie-OP-Kontrolle	15,7 \pm 0,2	14,8 \pm 0,4	nicht erfolgt
Schlaganfall	14,0 \pm 0,2	11,3 \pm 0,5	12,4 \pm 0,7
Sonografie-Schlaganfall	15,2 \pm 0,1	12,8 \pm 0,5	nicht erfolgt
Antibiose	15,2 \pm 0,3	12,2 \pm 0,6	14,1 \pm 0,7

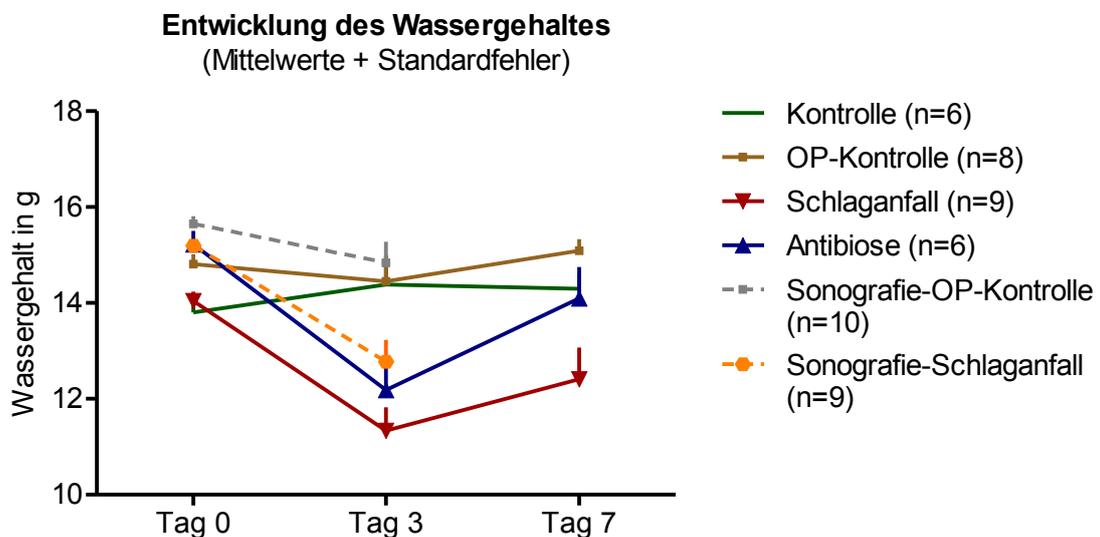


Abbildung 11: Entwicklung des Gesamtwassergehaltes in Gramm im Versuchsverlauf, zwischen den gekennzeichneten Messzeitpunkten zur verständlicheren Darstellung interpoliert: Verlust bei allen operierten Tieren bis zum Tag 3, anschließend Zunahme bis zum Tag 7

Kontroll-Gruppe

Die Kontroll-Gruppe zeigte innerhalb des Versuchszeitraumes keine signifikanten Veränderungen des absoluten Gesamtwassergehaltes ($p = 0,40$; *Repeated Measures ANOVA*).

OP-Kontroll-Gruppe

Die Differenzen der Mittelwerte dieser Gruppe erwiesen sich als statistisch nicht signifikant. ($p = 0,21$; *Repeated Measures ANOVA*).

Schlaganfall-Gruppe

Für die Schlaganfall-Gruppe ließen sich signifikante Veränderungen des absoluten Gesamtwassergehaltes nachweisen ($p = 0,001$; *Repeated Measures ANOVA*). So zeigten die Tiere am Tag 3 einen signifikant reduzierten Gesamtwassergehalt im Vergleich zur Ausgangsmessung ($p \leq 0,0001$). Im weiteren Versuchsverlauf wurden keine signifikanten Veränderungen des Wassergehaltes mehr gefunden (Tag 3 zu Tag 7: $p = 0,054$; Tag 0 zu Tag 7: $p = 0,08$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

Antibiose-Gruppe

Analog zur Schlaganfall-Gruppe war auch für die antibiotisch behandelten Tiere eine Änderung des absoluten Wassergehaltes im Versuchsverlauf nachweisbar ($p = 0,005$; *Repeated Measures ANOVA*). Der Post-Hoc-Test ergab eine signifikante Reduktion des Körperwassers am Tag 3 ($p = 0,009$) sowie eine darauf folgende Erhöhung der Messwerte von Tag 3 zu Tag 7 ($p = 0,01$). Die Differenz zwischen Tag 0 und Tag 7 wurde hingegen nicht mehr als signifikant eingestuft ($p = 0,52$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe

In dieser Gruppe waren für den absoluten Wassergehalt keine signifikanten Veränderungen im Versuchszeitraum festzustellen ($p = 0,09$; gepaarter t-Test).

Sonografie-Schlaganfall-Gruppe

Hier war die Reduktion des absoluten Wassergehaltes von Tag 0 auf Tag 3 signifikant ($p \leq 0,0001$; gepaarter t-Test).

4.6.3.2 Entwicklung der Körperflüssigkeit: Vergleich zwischen den Gruppen

Der Vergleich der Gruppen untereinander erfolgte anhand der relativen Änderungen des Gesamtwassergehaltes gegenüber dem Ausgangswert. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

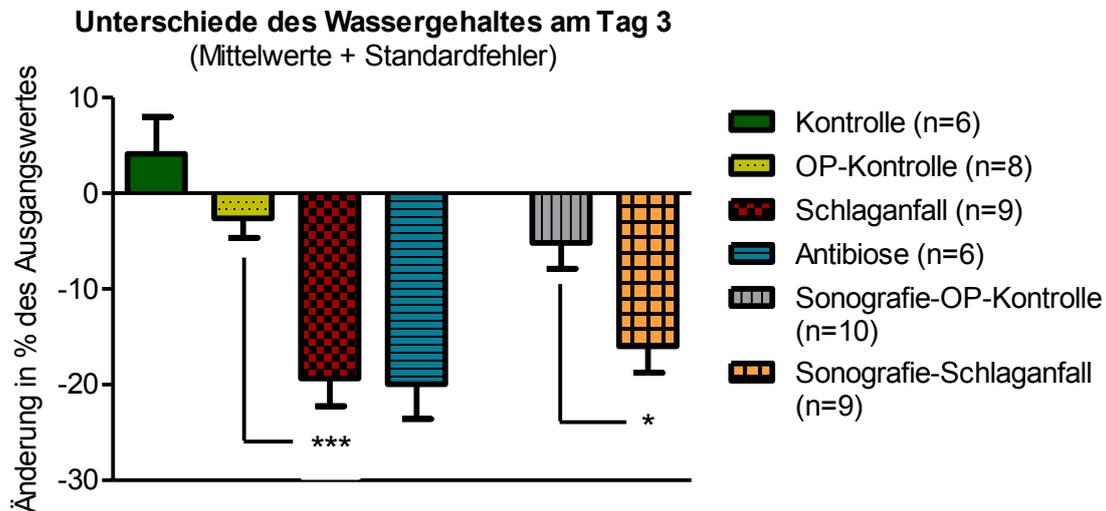


Abbildung 12: Unterschiede des Wassergehaltes am Tag 3: Verlust bei Tieren mit Schlaganfall signifikant stärker ausgeprägt als bei OP-Kontroll-Gruppen

Der Gesamtwassergehalt des Körpers änderte sich in den Versuchsgruppen in signifikant unterschiedlichem Maße ($p \leq 0,0001$; *One-Way ANOVA*). So zeigte die Schlaganfall-Gruppe einen signifikant höheren Wasserverlust als die OP-Kontroll-Gruppe ($p = 0,002$). Zwischen den übrigen vergleichbaren Gruppen fanden sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Änderung des Wassergehaltes (Kontrolle vs. OP-Kontroll: $p = 0,8$; Schlaganfall vs. Antibiose: $p = 1,0$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

Die Reduktion des Gesamtwassergehaltes fiel bei den Tieren der Sonografie-Schlaganfall-Gruppe signifikant höher aus als bei denen der Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe ($p = 0,013$; t-Test).

Die Differenzen in der Veränderung des Wassergehaltes am siebten Versuchstag wurden aufgrund inhomogener Varianzen ($p = 0,027$; Levene-Statistik) mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließend Tamhane-Test analysiert. Die zunächst im Kruskal-Wallis-Test nachgewiesene Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen ($p = 0,03$) fand sich zwischen den vergleichbaren Gruppen im Post-Hoc-Test nicht wieder (Kontrolle vs. OP-Kontrolle: $p = 1,0$; OP-Kontrolle vs. Schlaganfall: $p = 0,08$; Schlaganfall vs. Antibiose: $p = 1,0$).

4.7 Parameter der Lebensqualität

4.7.1 Futtermaufnahme

4.7.1.1 Gruppeninterne Entwicklung der Futtermaufnahme

Um einen objektiven Vergleich zu ermöglichen, wurden die gemessenen absoluten Werte für die Futtermaufnahme am Tag 0, 3 und 7 auf das individuelle Körpergewicht der Tiere zum jeweiligen Messzeitpunkt bezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 und Abbildung 13 dargestellt.

Tabelle 11: Futtermaufnahme absolut und in Bezug auf die Körpermasse an den Tagen 0, 3 und 7; Mittelwerte \pm Standardfehler

Gruppe	Futtermaufnahme, Tag 0 (vor Operation)		Futtermaufnahme, Tag 3		Futtermaufnahme, Tag 7	
	g	g/kg KGW	g	g/kg KGW	g	g/kg KGW
Kontrolle	6,5 \pm 0,4	299,5 \pm 13,7	4,8 \pm 0,4	249,5 \pm 9,3	5,7 \pm 0,5	281,0 \pm 31,7
OP-Kontrolle	5,4 \pm 0,1	232,7 \pm 6,7	6,1 \pm 0,4	281,7 \pm 14,5	5,7 \pm 0,2	246,3 \pm 9,8
Schlaganfall	5,0 \pm 0,3	228,2 \pm 13,7	2,8 \pm 0,4	168,7 \pm 24,8	4,8 \pm 0,5	259,4 \pm 24,8
Antibiose	5,2 \pm 0,2	220,4 \pm 8,1	2,7 \pm 0,6	204,6 \pm 12,7	4,3 \pm 0,8	282,8 \pm 25,5
Sonografie-OP-Kontrolle	5,4 \pm 0,1	225,9 \pm 5,8	4,6 \pm 0,1	202,9 \pm 3,3	nicht erfolgt	
Sonografie-Schlaganfall	5,2 \pm 0,1	217,7 \pm 3,0	3,5 \pm 0,6	172,2 \pm 24,0	nicht erfolgt	

KGW= Körpergewicht

Kontroll-Gruppe

Die Kontroll-Tiere zeigten keine signifikanten Veränderungen der Futteraufnahme über den Versuchszeitraum ($p = 0,113$; *Repeated Measures ANOVA*).

OP-Kontroll-Gruppe

Für die OP-Kontroll-Gruppe ließ sich hingegen eine signifikante Veränderung der Futteraufnahme über den Versuchszeitraum nachweisen ($p = 0,038$; *Repeated Measures ANOVA*). Im Post-Hoc-Test konnte diese Signifikanz jedoch nicht bestätigt werden (Tag 0 vs. Tag 3: $p = 0,061$; Tag 3 vs. Tag 7: $p = 0,325$; Tag 0 vs. Tag 7: $p = 0,539$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

Schlaganfall-Gruppe

Die Versuchstiere mit zerebraler Ischämie veränderten ihre Futteraufnahme im Versuchsverlauf signifikant ($p = 0,031$; *Repeated Measures ANOVA*). Vom ersten zum dritten Versuchstag war hierbei keine statistisch relevante Differenz nachweisbar ($p = 0,337$). Am Tag 7 hatte sich die aufgenommene Futtermenge im Vergleich zu Tag 3 jedoch signifikant erhöht ($p = 0,004$). Im Direktvergleich von Tag 7 zu Tag 0 war keine signifikante Veränderung nachweisbar ($p = 1,0$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

Antibiose-Gruppe

Die antibiotisch behandelten Tiere zeigten ebenfalls signifikante Veränderungen der aufgenommenen Futtermenge ($p = 0,048$; *Repeated Measures ANOVA*). Die Post-Hoc-Analyse bestätigte jedoch keine statistisch relevanten Veränderungen zwischen den Versuchstagen (Tag 0 vs. Tag 3: $p = 1,0$; Tag 3 vs. Tag 7: $p = 0,167$; Tag 0 vs. Tag 7: $p = 0,189$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe

Die Tiere dieser Gruppe reduzierten ihre Futteraufnahme von Tag 0 zu Tag 3 signifikant ($p = 0,002$; gepaarter t-Test).

Sonografie-Schlaganfall-Gruppe

In dieser Gruppe war keine signifikante Veränderung der Futteraufnahme über den Versuchszeitraum nachzuweisen ($p = 0,111$; gepaarter t-Test).

4.7.1.2 Entwicklung der Futteraufnahme: Vergleich zwischen den Gruppen

Ein Vergleich der Futteraufnahme zwischen den Gruppen erfolgte anhand der Änderung der relativen Messwerte in g/kg von Tag 3 und 7 in Relation zur Ausgangsmessung. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 14 und 15 dargestellt.

Die Ermittlung der statistischen Relevanz der Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte aufgrund von Varianz-Inhomogenität (Tag 3: $p = 0,048$; Tag 7: $p = 0,014$; Levene-Statistik) mittels Kruskal-Wallis- und bei gegebener Signifikanz mit anschließendem Tamhane-Test.

Am dritten Versuchstag bestanden relevante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p = 0,009$). Signifikant war hierbei der Unterschied zwischen der Kontroll- und der OP-Kontroll-Gruppe ($p = 0,006$). Die Differenzen zwischen den übrigen vergleichbaren Gruppen waren statistisch nicht relevant (OP-Kontrolle vs. Schlaganfall: $p = 0,058$; Schlaganfall vs. Antibiose: $p = 0,878$).

Der Vergleich zwischen Sonografie-OP-Kontroll- und Sonografie-Schlaganfall-Gruppe erfolgte aufgrund inhomogener Varianzen (Tag 3: $p = 0,003$; Levene-Statistik) mittels Mann-Whitney-Test. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen ($p = 0,514$).

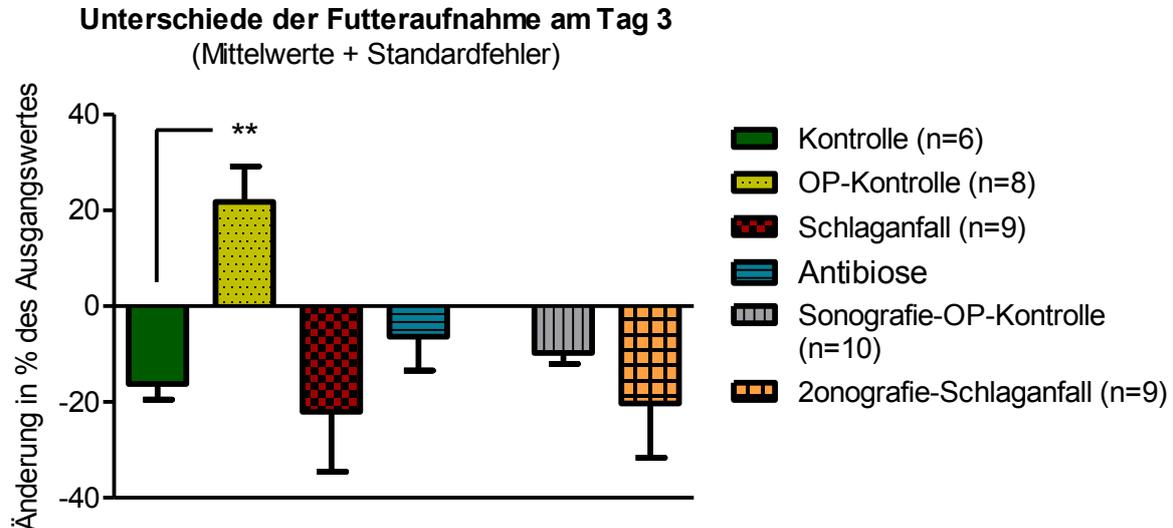


Abbildung 13: Unterschiede der Futteraufnahme am Tag 3: mit Ausnahme der OP-Kontroll-Tiere reduzierte Nahrungsaufnahme in allen Gruppen, trotz augenscheinlicher Differenzen zwischen OP-Kontrolle und Schlaganfall-Gruppe sowie Schlaganfall- und Antibiose-Gruppe ist nur der Unterschied zwischen Kontroll- und OP-Kontroll-Gruppe signifikant

Unterschiede der Futtermittelaufnahme am Tag 7 (Mittelwerte + Standardfehler)

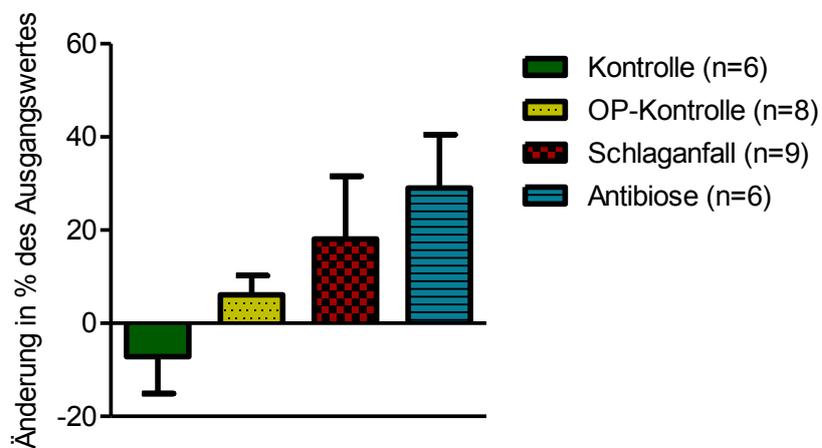


Abbildung 14: Unterschiede der Futtermittelaufnahme am Tag 7: mit Ausnahme der Kontrollgruppe erhöhte Nahrungsaufnahme in allen Gruppen, keine signifikanten Differenzen trotz erkennbarer Unterschiede zwischen allen Gruppen

Am Tag 7 waren keine signifikanten Abweichungen zwischen den Gruppen mehr feststellbar (Kruskal-Wallis: $p = 0,203$).

4.7.2 Wasseraufnahme

4.7.2.1 Gruppeninterne Entwicklung der Wasseraufnahme

Die statistischen Berechnungen der Wasseraufnahme erfolgten analog zu denen der Futtermittelaufnahme bezogen auf das jeweilige Ausgangsgewicht der Tiere.

Die durchschnittliche Wasseraufnahme der Tiere über 24 Stunden ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Wasseraufnahme absolut und in Bezug auf die Körpermasse an den Tagen 0, 3 und 7; Mittelwerte \pm Standardfehler

Gruppe	Wasseraufnahme, Tag 0 (vor Operation)		Wasseraufnahme, Tag 3		Wasseraufnahme, Tag 7	
	g	g/kg KGW	g	g/kg KGW	g	g/kg KGW
Kontrolle	5,1 \pm 0,1	235,0 \pm 8,3	4,7 \pm 0,2	214,3 \pm 6,7	4,7 \pm 0,1	216,1 \pm 11,0
OP-Kontrolle	6,5 \pm 0,1	274,5 \pm 4,3	4,7 \pm 0,3	202,0 \pm 14,7	4,9 \pm 0,3	208,6 \pm 9,8
Sonografie- OP-Kontrolle	7,8 \pm 2,0	243,4 \pm 21,9	5,0 \pm 0,5	219,7 \pm 23,2	nicht erfolgt	
Schlaganfall	5,7 \pm 0,3	256,9 \pm 12,9	1,9 \pm 0,6	106,7 \pm 30,2	4,1 \pm 1,0	221,9 \pm 60,7
Sonografie- Schlaganfall	7,5 \pm 1,0	310,6 \pm 41,6	4,2 \pm 1,6	197,8 \pm 74,3	nicht erfolgt	
Antibiose	5,9 \pm 0,5	248,3 \pm 29,2	2,9 \pm 0,7	170,7 \pm 27,5	5,2 \pm 1,2	282,2 \pm 32,7

KGW = Körpergewicht

Kontroll-Gruppe

Die Kontroll-Tiere veränderten ihre Wasseraufnahme über den Versuchszeitraum nicht signifikant ($p = 0,083$; *Repeated Measures ANOVA*).

OP-Kontroll-Gruppe

Die Tiere mit Kontroll-Operation veränderten ihre Wasseraufnahme im Versuchsverlauf signifikant ($p = 0,001$; *Repeated Measures ANOVA*). Vom Versuchsbeginn zum dritten Versuchstag fand eine signifikante Reduktion der Wasseraufnahme statt ($p = 0,001$). Vom Tag 3 bis zum Versuchsende war keine relevante Änderung nachweisbar ($p = 1,0$), während der Trinkwasserkonsum am Tag 7 im Vergleich zur Ausgangsmessung signifikant reduziert war ($p = 0,001$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

Schlaganfall-Gruppe

Die Tiere dieser Gruppe zeigten keine signifikanten Veränderungen der Wasseraufnahme über den Versuchszeitraum ($p = 0,056$; *Repeated Measures ANOVA*).

Antibiose-Gruppe

Bei den antibiotisch behandelten Tieren war ebenfalls keine signifikante Änderung des Trinkwasserkonsums im Versuchsverlauf nachweisbar ($p = 0,182$; *Repeated Measures ANOVA*).

Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe

Hier ließ sich ebenfalls keine signifikante Veränderung der Wasseraufnahme nachweisen ($p = 0,248$; gepaarter t-Test).

Sonografie-Schlaganfall-Gruppe

Auch in dieser Gruppe zeigte sich keine signifikante Veränderung der Trinkwasseraufnahme im Versuchsverlauf ($p = 0,116$; gepaarter t-Test).

4.7.2.2 Entwicklung der Wasseraufnahme: Vergleich zwischen den Gruppen

Um die Wasseraufnahme der Gruppen untereinander zu vergleichen, wurde die relative Differenz der Messwerte in g/kg an den Tagen 3 und 7 zum Ausgangswert bestimmt. Die Resultate für Tag 3 sind in Abbildung 16 dargestellt.

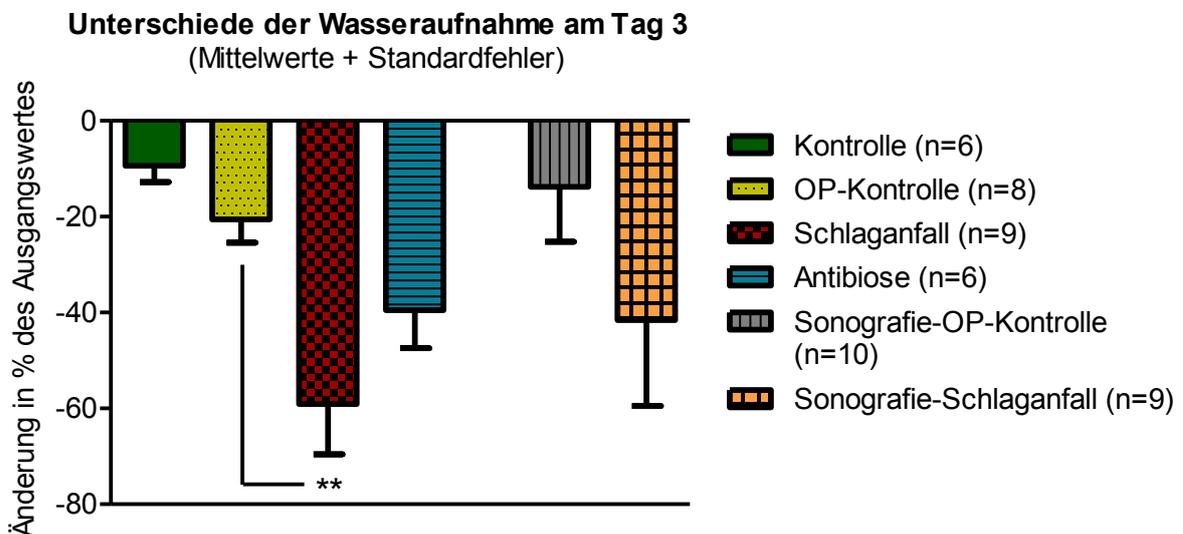


Abbildung 15: Unterschiede der Wasseraufnahme am Tag 3: in allen Gruppen reduzierte Wasseraufnahme, stärkste Reduktion bei Tieren mit Schlaganfall

Die Ermittlung der statistischen Relevanz der Unterschiede des dritten Versuchstages erfolgte mittels *One-Way ANOVA* und anschließendem Bonferroni-Test. Hierbei zeigten sich statistisch relevante Differenzen zwischen den Gruppen ($p = 0,001$). So reduzierte die Schlag-

anfall-Gruppe ihren Trinkwasserkonsum signifikant stärker als die OP-Kontroll-Gruppe ($p = 0,006$). Zwischen den übrigen vergleichbaren Gruppen waren zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede der Änderung der Wasseraufnahme nachweisbar (Kontrolle vs. OP-Kontroll: $p = 1,0$; Schlaganfall vs. Antibiose: $p = 0,57$).

Auch die Sonografie-OP-Kontroll- und Sonografie-Schlaganfall-Gruppe veränderten ihre Wasseraufnahme nicht in signifikant unterschiedlichem Ausmaß ($p = 0,20$; t-Test).

Der Vergleich der Gruppen am siebten Versuchstag erfolgte aufgrund inhomogener Varianzen ($p = 0,041$; Levene-Statistik) mittel Kruskal-Wallis-Test. Zu diesem Zeitpunkt bestanden keine signifikanten Differenzen zwischen den Versuchsgruppen ($p = 0,201$).

4.7.3 Aktivität

4.7.3.1 Gruppeninterne Entwicklung der spontanen Aktivität

Im Versuchsverlauf änderte sich die spontane Aktivität der Tiere gruppenübergreifend. In allen Gruppen war eine Reduktion der Aktivität am Tag 3 gegenüber der Ausgangsmessung erkennbar, diese war jedoch nicht in jedem Fall signifikant. Die Messwerte für die spontane Aktivität sind in nachfolgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 13: Aktivität in „Counts“ an Tag 0, 3 und 7 (Mittelwerte \pm Standardfehler): Reduktion der Aktivität am Tag 3 in allen Gruppen

Gruppe	Aktivität in „Counts“, Tag 0 (vor Operation)	Aktivität in „Counts“, Tag 3	Aktivität in „Counts“, Tag 7
Kontrolle	106591 \pm 6232	86002 \pm 3355	97365 \pm 5171
OP-Kontrolle	138785 \pm 8596	65499 \pm 5248	101026 \pm 13332
Schlaganfall	106483 \pm 9412	72134 \pm 9956	67991 \pm 6533
Antibiose	131735 \pm 27931	105081 \pm 26598	80813 \pm 12504
Sonografie-OP-Kontrolle	127684 \pm 7780	57498 \pm 6670	nicht erfolgt
Sonografie-Schlaganfall	116881 \pm 6178	105679 \pm 19282	nicht erfolgt

Kontroll-Gruppe

Die Kontroll-Tiere veränderten ihre spontane Aktivität über den Versuchszeitraum nicht signifikant ($p = 0,07$; *Repeated Measures ANOVA*).

OP-Kontroll-Gruppe

Die zunächst nachgewiesene signifikante Veränderung der Aktivität über den Versuchszeitraum ($p \leq 0,0001$; *Repeated Measures ANOVA*) ließ sich auf die Verringerung der Bewegung von Tag 0 zu Tag 3 eingrenzen ($p = 0,001$), während der Vergleich der übrigen Messzeitpunkte keine signifikanten Unterschiede mehr ergab (Tag 3 zu Tag 7: $p = 0,07$; Tag 7 zu Tag 0: $p = 0,065$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

Schlaganfall-Gruppe

Die *Repeated Measures ANOVA* wies eine signifikante Differenz zwischen den drei Messzeitpunkten nach ($p = 0,02$). Im direkten Vergleich der Versuchstage mittels Bonferroni-Test konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen der Aktivität festgestellt werden (Tag 0 vs. Tag 3: $p = 0,14$; Tag 3 vs. Tag 7: $p = 1,0$; Tag 0 vs. Tag 7: $p = 0,07$).

Antibiose-Gruppe

Die Antibiose-Gruppe veränderte ihre Aktivität über den Versuchszeitraum nicht signifikant ($p = 0,17$; *Repeated Measures ANOVA*).

Sonografie-OP-Kontrolle

Die Tiere dieser Gruppe veränderten ihre Aktivität von Tag 0 zu Tag 3 signifikant ($p \leq 0,0001$; gepaarter t-Test).

Sonografie-Schlaganfall

In dieser Gruppe war keine signifikante Veränderung der Bewegungsaktivität zu verzeichnen ($p = 0,578$; gepaarter t-Test).

4.7.3.2 Entwicklung der Aktivität: Vergleich zwischen den Gruppen

Der Vergleich der Gruppen untereinander erfolgte anhand der relativen Änderung der Aktivität an Tag 3 und 7 im Verhältnis zur Ausgangsmessung am Tag 0. Die Auswertung der Differenzen am Tag 3 wurde, soweit nicht abweichend vermerkt, mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Tamhane-Test vorgenommen, da die Messwerte inhomogene Varianzen aufwiesen ($p = 0,002$; Levene-Statistik). Aufgrund der Tatsache, dass die Werte des siebten

Versuchstages varianzhomogen waren, konnte hier bei der Auswertung die *One-Way* ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Test angewandt werden.

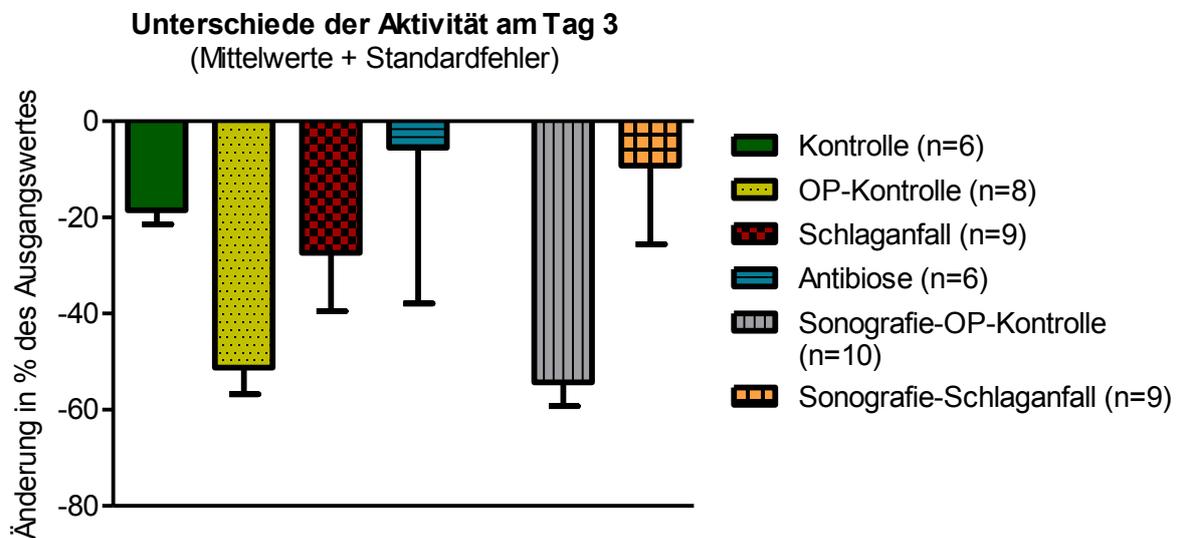


Abbildung 16: Unterschiede der Spontanaktivität am Tag 3: Reduktion in allen Gruppen, am OP-Kontroll-Gruppen mit deutlichster Reduktion um ca. 50 %, dennoch keine signifikanten Unterschiede

Die Kontroll-Tiere reduzierten ihre Aktivität am Tag 3 des Versuchs gegenüber der Ausgangsmessung um durchschnittlich $18,5 \pm 2,9$ %. Die OP-Kontroll-Gruppe schränkte ihre spontane Bewegung noch stärker ein ($-51,3 \pm 5,5$ %). Im Gegensatz dazu zeigten die Gruppen mit Schlaganfall am Tag 3 eine deutlich geringere Abnahme der Aktivität (Schlaganfall: $-27,3 \pm 12,2$ %; Antibiose: $-5,5 \pm 32,4$ %). Die Differenz zwischen den Gruppen war jedoch nicht signifikant ($p = 0,11$).

Die Sonografie-OP-Kontroll-Tiere reduzierten am Tag 3 ihre Aktivität um $-54,3 \pm 4,9$ %, während die Sonografie-Schlaganfall-Tiere ihre Spontanbewegung nur um $-9,2 \pm 16,4$ % einschränkten. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war hierbei ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,13$; t-Test).

Am siebten Versuchstag wiesen die Kontroll-Tiere eine um $6,7 \pm 8,2$ % verringerte Aktivität auf, die OP-Kontroll-Tiere bewegten sich mit $26,9 \pm 9,7$ % noch weniger als zu Versuchsbeginn. Auch die Gruppen mit zerebraler Ischämie zeigten noch reduzierte Spontanaktivitäten (Schlaganfall: $-29,6 \pm 12,5$ %; Antibiose: $-30,7 \pm 13,1$ %). Doch auch zu diesem Zeitpunkt waren keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar ($p = 0,5$; One-Way ANOVA).

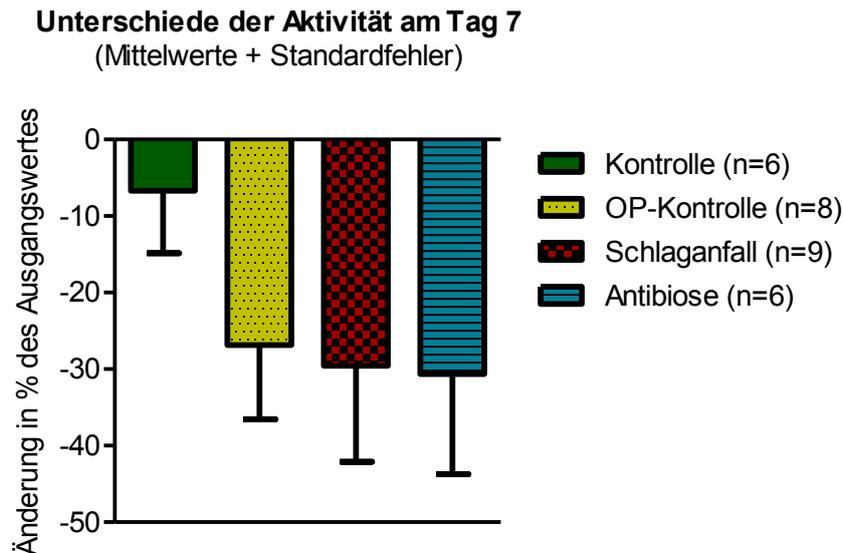


Abbildung 17: Unterschiede der Spontanaktivität am Tag 7: deutliche Reduktion in allen operierten Gruppen ohne signifikante Differenzen

4.8 Organgewichte

Da bereits im Ausgangsgewicht der Tiere signifikante Unterschiede bestanden, muss angenommen werden, dass auch die jeweiligen Organgewichte zu Beginn des Versuchs Differenzen aufwiesen. Da die detaillierten Organgewichte vor der Tötung der Tiere nicht bestimmbar waren, konnte dieser Umstand jedoch nicht überprüft werden. Um den Effekt dieser potenziellen Gewichtsunterschiede zu minimieren, wurden die Endgewichte der Organe in Relation zum jeweiligen Ausgangsgewicht der Versuchstiere gesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Organgewichte in % des Körpergewichtes (Mittelwerte \pm Standardfehler) zu Versuchsende, Testmethoden und Ergebnisse der statistischen Vergleiche: signifikante Unterschiede am Tag 7 nur beim Herzgewicht, am Tag 3 bei allen Organen

Gruppen Tag 7	Milz	Leber	Niere rechts	Niere links	Herz
Kontrolle	0,27 \pm 0,02	4,32 \pm 0,21	0,68 \pm 0,03	0,64 \pm 0,02	0,48 \pm 0,01
OP-Kontrolle	0,29 \pm 0,03	4,80 \pm 0,20	0,67 \pm 0,03	0,66 \pm 0,04	0,50 \pm 0,03
Schlaganfall	0,22 \pm 0,03	4,24 \pm 0,37	0,59 \pm 0,02	0,56 \pm 0,03	0,42 \pm 0,02
Antibiose	0,23 \pm 0,04	4,22 \pm 0,43	0,59 \pm 0,04	0,50 \pm 0,09	0,43 \pm 0,02
Varianzhomogenität	ja				nein
Testmethode	One-Way ANOVA				Kruskal-Wallis
p-Wert	0,28	0,53	0,07	0,11	0,04
Gruppen Tag 3	Milz	Leber	Niere rechts	Niere links	Herz
Sonografie-OP-Kontrolle	0,28 \pm 0,02	4,41 \pm 0,22	0,66 \pm 0,02	0,62 \pm 0,01	0,45 \pm 0,01
Sonografie-Schlaganfall	0,18 \pm 0,02	3,60 \pm 0,30	0,57 \pm 0,02	0,54 \pm 0,02	0,41 \pm 0,01
Varianzhomogenität	ja				
Testmethode	t-Test				
p-Wert	0,003	0,04	0,002	0,001	0,01

Zwischen der Kontroll-, OP-Kontroll-, Schlaganfall- und Antibiose-Gruppe ließ sich lediglich für das Herzgewicht ein signifikanter Unterschied nachweisen (p-Wert s. Tabelle 23). Dieser fand sich jedoch im Post-Hoc-Test nicht zwischen den vergleichbaren Gruppen (Kontrolle vs. OP-Kontrolle: $p = 1,0$; OP-Kontrolle vs. Schlaganfall: $p = 0,3$; Schlaganfall vs. Antibiose: $p = 1,0$; alle Einzelvergleiche: Tamhane-Test).

Bei den am Tag 3 präparierten Organen der Sonografie-OP-Kontroll- und Sonografie-Schlaganfall-Gruppe waren für alle Organe signifikante Unterschiede zu verzeichnen. Alle entnommenen Präparate der Tiere mit Schlaganfall wiesen ein signifikant geringeres Gewicht auf als die jeweiligen Organe der Mäuse mit Kontroll-Operation (p-Werte s. Tabelle 23).

4.9 Fett- und Muskelgewebe

Wie bei den Organgewichten muss auch im Fall des Muskel- und Fettgewebes ein Einfluss durch die signifikanten Unterschiede des anfänglichen Körpergewichtes der Tiere angenommen werden. Daher wurden hier ebenso die ermittelten absoluten Gewichte für Muskeln und Fett auf das Ausgangsgewicht der Tiere bezogen, um den Effekt des unterschiedlichen Körpergewichtes zu berücksichtigen.

4.9.1 Fettgewebe

Die Ergebnisse für die Gewichte der unterschiedlichen Fettgewebe finden sich in Tabelle 15 und 16.

Tabelle 15: Fettgewebe in % des Ausgangsgewichtes (Mittelwerte \pm Standardfehler) zu Versuchsende, Testmethoden und Ergebnisse der statistischen Vergleiche: signifikante Differenzen beim Gewicht des epididymalen Fettgewebes am Tag 7

Gruppen Tag 7	braunes Fettgewebe	epididymales Fettgewebe
Kontrolle	0,53 \pm 0,05	1,29 \pm 0,16
OP-Kontrolle	0,47 \pm 0,04	1,00 \pm 0,09
Schlaganfall	0,39 \pm 0,05	0,40 \pm 0,11
Antibiose	0,51 \pm 0,09	0,67 \pm 0,18
Varianzhomogenität	ja	
Test-Methode	One-Way ANOVA	
p-Wert	0,3	0,0001

Tabelle 16: Fettgewebe in % des Ausgangsgewichtes (Mittelwerte \pm Standardfehler) zu Versuchsende, Testmethoden und Ergebnisse der statistischen Vergleiche: signifikante Differenzen beim Gewicht des epididymalen Fettgewebes am Tag 3

Gruppen Tag 3	braunes Fettgewebe	epididymales Fettgewebe
Sonografie-OP-Kontrolle	0,27 \pm 0,01	0,77 \pm 0,07
Sonografie-Schlaganfall	0,24 \pm 0,04	0,47 \pm 0,11
Varianzhomogenität	nein	ja
Test-Methode	Mann-Whitney	t-Test
p-Wert	0,84	0,02

Die Anteile des braunen Fettgewebes der Kontroll-, OP-Kontroll-, Schlaganfall- und Antibiose-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant, während die Differenz zwischen den Vergleichsgruppen beim epididymalen Fettgewebe als signifikant gewertet wurde (p-Wert s. Tabelle 15). Die Post-Hoc-Analyse ergab diesbezüglich keine relevanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der OP-Kontroll-Gruppe ($p = 0,7$), während die Schlaganfall-Tiere signifikant weniger epididymales Fettgewebe aufwiesen als die OP-Kontroll-Tiere ($p = 0,012$). Die Werte der Antibiose-Gruppe unterschieden sich nicht von denen der unbehandelten Schlaganfall-Gruppe ($p = 1,0$; alle Einzelvergleiche: Bonferroni).

Auch zwischen der Sonografie-Schlaganfall- und Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe ließen sich keine signifikanten Differenzen für den Anteil des braunen Fettgewebes nachweisen. Der Gehalt an weißem Fettgewebe war bei der Sonografie-Schlaganfall-Gruppe signifikant geringer als bei der Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe (p-Wert s. Tabelle 16).

4.9.2 Muskelgewebe

Keine der Gruppen zeigte Abweichungen zwischen den Gewichten des rechten und linken *M. gastrocnemius* (Kontrolle: $p = 0,54$; OP-Kontrolle: $p = 0,44$; Schlaganfall: $p = 0,86$; Antibiose: $p = 0,81$; Sonografie-OP-Kontrolle: $p = 0,48$; Sonografie-Schlaganfall: $p = 0,67$; Einzelvergleiche: t-Test; für Schlaganfall und Antibiose: Mann-Whitney).

Der Vergleich der Gewichte der *Mm. gastrocnemii* unter den Gruppen ergab sowohl rechts- als auch linksseitig signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: Muskelgewichte in % des Körpergewichtes (Mittelwerte \pm Standardfehler), Testmethoden und Ergebnisse der statistischen Vergleiche: signifikante Differenzen am Tag 3 und Tag 7 rechts- und linksseitig

Gruppen Tag 7	Rechte Hintergliedmaße	Linke Hintergliedmaße
Kontrolle	0,56 \pm 0,01	0,57 \pm 0,01
OP-Kontrolle	0,52 \pm 0,01	0,53 \pm 0,01
Schlaganfall	0,45 \pm 0,03	0,46 \pm 0,03
Antibiose	0,46 \pm 0,03	0,45 \pm 0,03
Varianz-Homogenität	Nein	Nein
Testmethode	Kruskal-Wallis	Kruskal-Wallis
p-Wert	0,006	0,007
Gruppen Tag 3	Rechte Hintergliedmaße	Linke Hintergliedmaße
Sonografie-OP-Kontrolle	0,51 0,01	0,52 0,01
Sonografie-Schlaganfall	0,45 0,02	0,47 0,01
Varianz-Homogenität	Nein	Nein
Testmethode	Mann-Whitney	Mann-Whitney
p-Wert	0,002	0,006

Kontroll-, OP-Kontroll-, Schlaganfall- und Antibiose-Gruppe

M. gastrocnemius rechts

Die im Kruskal-Wallis-Test errechnete Signifikanz (p-Wert s. Tabelle 17) fand sich in der Post-Hoc-Analyse nicht zwischen den vergleichbaren Gruppen (Kontrolle vs. OP-Kontrolle: $p = 0,1$; OP-Kontrolle vs. Schlaganfall: $p = 0,2$; Schlaganfall vs. Antibiose: $p = 1,0$; alle Einzelvergleiche: Tamhane).

M. gastrocnemius links

Auch hier wurde im Post-Hoc-Test keine Signifikanz zwischen den vergleichbaren Gruppen gefunden (Kontrolle vs. OP-Kontrolle: $p = 0,3$; OP-Kontrolle vs. Schlaganfall: $p = 0,3$; Schlaganfall vs. Antibiose: $p = 1,0$; alle Einzelvergleiche: Tamhane).

Sonografie-OP-Kontroll- und Sonografie-Schlaganfall-Gruppe*M. gastrocnemius* rechts

Hier war für die Tiere mit Schlaganfall ein signifikant geringeres Muskelgewicht nachweisbar als bei den Tieren mit Kontroll-Operation (p -Wert s. Tabelle 17).

M. gastrocnemius links

Analog zur rechten Hintergliedmaße zeigte sich auch linksseitig ein signifikant geringeres Gewicht des *M. gastrocnemius* bei den Sonografie-Schlaganfall-Tieren im Vergleich zur Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe (p -Wert s. Tabelle 17).

4.10 Caspaseaktivität

Die Caspase-Aktivität als Maß der Apoptose-Rate wurde jeweils für den rechten und linken *M. gastrocnemius* bestimmt. Die Ergebnisse sind in nachfolgenden Tabellen aufgeführt:

Tabelle 18: Caspase-3-Aktivität (Mittelwerte \pm Standardfehler in U/l), Testmethoden und Ergebnisse der statistischen Vergleiche: signifikante Differenzen am Tag 7

Gruppen Tag 7	Caspase-3 rechts	Caspase-3 links
Kontrolle	5,1 \pm 3,3	1,2 \pm 1,0
OP-Kontrolle	13,7 \pm 5,4	20,7 \pm 3,4
Schlaganfall	45,7 \pm 8,1	50,4 \pm 10,5
Antibiose	41,0 \pm 7,3	34,2 \pm 15,3
Varianz-Homogenität	Ja	Nein
Testmethode	One-Way ANOVA	Kruskal-Wallis
p-Wert	0,0004	0,003

Tabelle 19: Caspase-3-Aktivität (Mittelwerte \pm Standardfehler in U/l), Testmethoden und Ergebnisse der statistischen Vergleiche: keine signifikanten Differenzen am Tag 3

Gruppen Tag 3	Caspase-3 rechts	Caspase-3 links
Sonografie-OP-Kontrolle	48,2 \pm 9,8	57,6 \pm 7,6
Sonografie-Schlaganfall	49,4 \pm 6,6	49,0 \pm 4,0
Varianz-Homogenität	Ja	Ja
Testmethode	t-Test	t-Test
p-Wert	0,9	0,3

Für die Caspase-3-Aktivität bestand in keiner Gruppe eine relevante Abweichung zwischen der rechten und der linken Gliedmaße (Kontrolle: $p = 0,8$; OP-Kontrolle: $p = 0,3$; Schlaganfall: $p = 0,7$; Antibiose $p = 0,5$; Sonografie-OP-Kontrolle: $p = 0,5$; Sonografie-Schlaganfall: $p = 1,0$; Einzelvergleiche: t-Test; für Kontrolle und Antibiose: Mann-Whitney). Am Tag 7 konnten beidseits relevante Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden (p -Werte s. Tabelle 19).

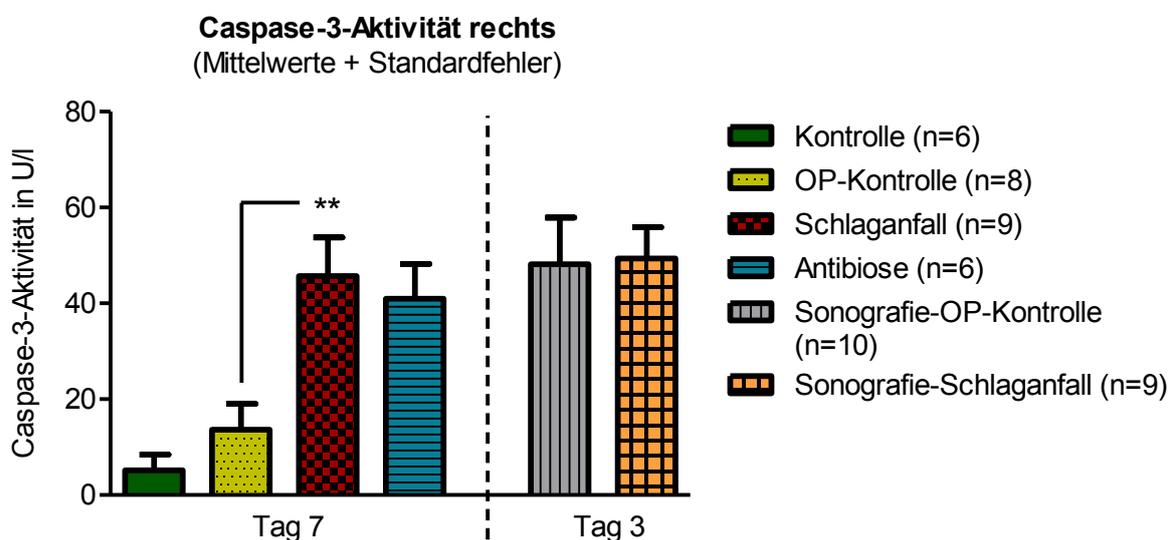


Abbildung 18: Caspase-3-Aktivität im rechten *M. gastrocnemius*: bei den Tieren mit Schlaganfall signifikant höher als bei der OP-Kontroll-Gruppe

Die Differenzen der Enzymaktivität der rechten Gliedmaße wurden mittels Bonferroni-Test analysiert. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Abweichungen zwischen der Kontroll- und der OP-Kontroll-Gruppe ($p = 1,0$), während die Schlaganfall-Tiere eine signifikant höhere Caspase-3-Aktivität aufwiesen als die OP-Kontroll-Tiere ($p = 0,007$). Dagegen waren keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen der Schlaganfall- und der Antibiose-Gruppe ($p = 1,0$) nachweisbar. Gleiches gilt für die Sonografie-OP-Kontroll- und die Sonografie-Schlaganfall-Gruppe ($p = 0,9$; t-Test).

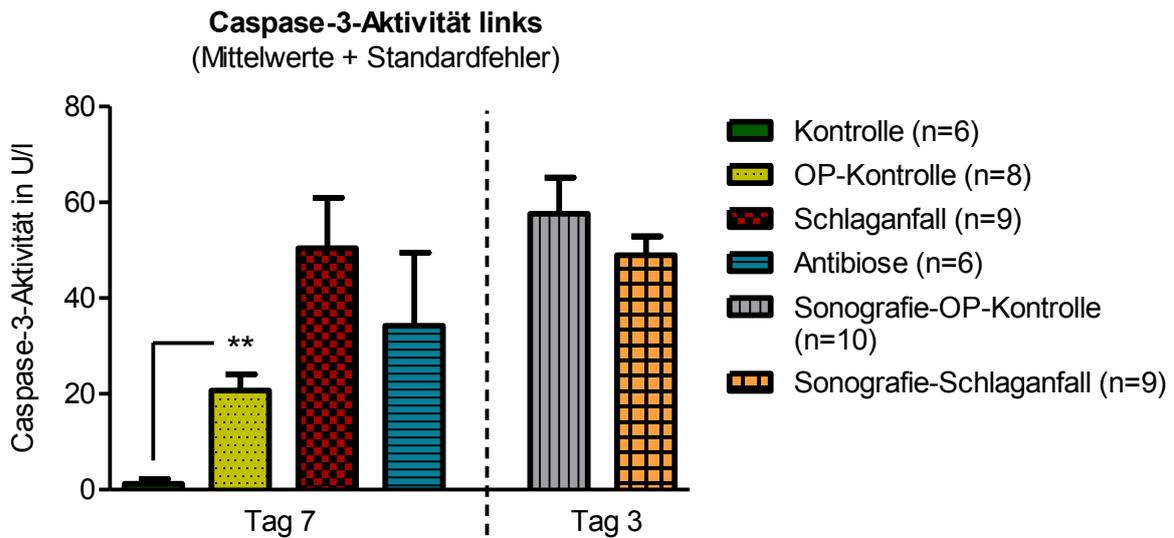


Abbildung 19: Caspase-3-Aktivität im linken *M. gastrocnemius*: in OP-Kontroll-Gruppe deutlich höher als bei Kontroll-Tieren, tendenziell erhöhte Aktivität bei der Schlaganfall-Gruppe ohne Signifikanznachweis

Die Signifikanz der linksseitigen Differenzen der Caspase-3-Aktivität wurde aufgrund inhomogener Varianzverteilung mittels Tamhane-Test berechnet. Die Enzymaktivität der OP-Kontroll-Gruppe war signifikant höher als die der Kontroll-Gruppe ($p = 0,003$). Die Differenzen zwischen der OP-Kontroll- und der Schlaganfall-Gruppe ($p = 0,1$) sowie zwischen der Schlaganfall- und Antibiose-Gruppe ($p = 1,0$) waren hingegen im linken *M. gastrocnemius* nicht signifikant. Ebenso wichen die Werte der Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe nicht signifikant von denen der Sonografie-Schlaganfall-Gruppe ab ($p = 0,3$; t-Test).

4.11 Proteasomenaktivität

4.11.1 „Caspaselike“-Aktivität

Die Ergebnisse der Messung der „Caspaselike“(C-L)-Aktivität sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt und in den Abbildungen 21 und 22 graphisch dargestellt.

Tabelle 20: „Caspaselike“(C-L)-Aktivität (Mittelwerte \pm Standardfehler in U/l), Testmethoden und Ergebnisse der statistischen Vergleiche

Gruppen Tag 7	C-L-Aktivität rechts	C-L-Aktivität links
Kontrolle	210,8 \pm 48,1	171,4 \pm 40,3
OP-Kontrolle	227,3 \pm 40,5	210,0 \pm 22,0
Schlaganfall	329,5 \pm 54,2	337,8 \pm 69,6
Antibiose	273,1 \pm 22,0	167,7 \pm 60,8
Varianz-Homogenität	Ja	Nein
Testmethode	One-Way ANOVA	Kruskal-Wallis
p-Wert	0,3	0,2
Gruppen Tag 3	C-L-Aktivität rechts	C-L-Aktivität links
Sonografie-OP-Kontrolle	338,0 \pm 27,0	370,4 \pm 48,5
Sonografie-Schlaganfall	106,8 \pm 15,7	88,2 \pm 15,3
Varianz-Homogenität	Ja	Nein
Testmethode	t-Test	Mann-Whitney
p-Wert	\leq 0,0001	\leq 0,0001

Keine der Gruppen wies signifikante Differenzen der Enzymaktivität zwischen der rechten und der linken Gliedmaße auf (Kontrolle: $p = 0,6$; OP-Kontrolle: $p = 1,0$; Schlaganfall: $p = 0,9$; Antibiose $p = 0,09$; Sonografie-OP-Kontrolle: $p = 0,6$; Sonografie-Schlaganfall: $p = 0,1$; Einzelvergleiche: Mann-Whitney; für Schlaganfall und Sonografie-Schlaganfall: t-Test). Die Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe wies sowohl im linken ($p \leq 0,0001$) als auch im rechten

($p \leq 0,0001$) *M. gastrocnemius* eine höhere C-L-Aktivität auf als die Sonografie-Schlaganfall-Gruppe. Weitere signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden nicht gefunden (p -Werte s. Tabelle 20).

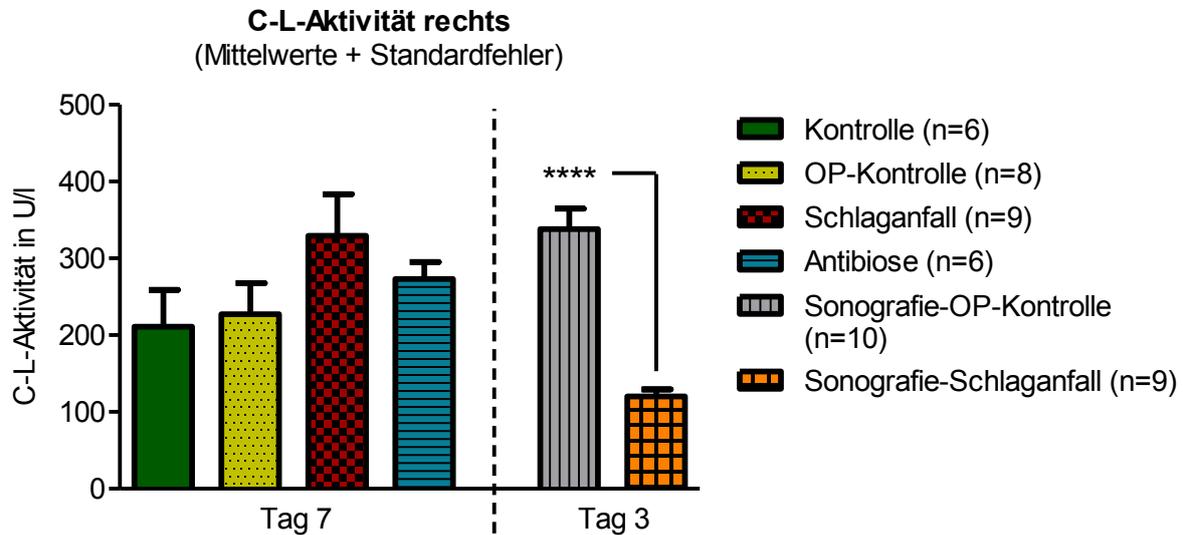


Abbildung 20: „Caspaselike“(C-L)-Aktivität im rechten *M. gastrocnemius*: signifikante Unterschiede nur am Tag 3 zwischen den Sonografie-Gruppen, Tiere mit Schlaganfall weisen eine geringere Aktivität auf als OP-Kontroll-Tiere

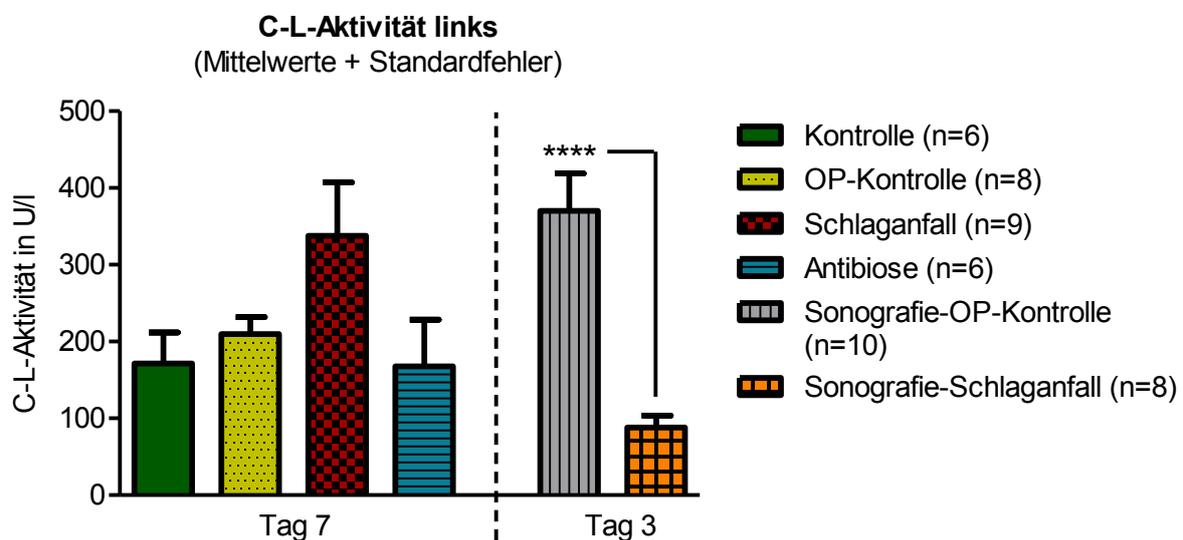


Abbildung 21: „Caspaselike“(C-L)-Aktivität im linken *M. gastrocnemius*: signifikante Unterschiede nur am Tag 3 zwischen den Sonografie-Gruppen, Tiere mit Schlaganfall weisen eine geringere Aktivität auf als OP-Kontroll-Tiere

4.11.2 „Chemotrypsinlike“-Aktivität

Die Ergebnisse für die „Chemotrypsinlike“(CT-L)-Aktivität der Proteasomen finden sich in Tabelle 21.

Tabelle 21: „Chemotrypsinlike“(CT-L)-Aktivität (Mittelwerte \pm Standardfehler in U/l), Testmethoden und Ergebnisse der statistischen Vergleiche

Gruppen Tag 7	CT-L-Aktivität rechts	CT-L-Aktivität links
Kontrolle	942,4 \pm 211,0	753,4 \pm 147,1
OP-Kontrolle	1360,6 \pm 256,4	1186,4 \pm 130,5
Schlaganfall	1204,7 \pm 208,5	1148,5 \pm 231,3
Antibiose	1186,2 \pm 268,7	633,3 \pm 193,7
Varianz-Homogenität	Ja	Ja
Testmethode	One-Way ANOVA	One-Way ANOVA
p-Wert	0,7	0,1
Gruppen Tag 3	CT-L-Aktivität rechts	CT-L-Aktivität links
Sonografie-OP-Kontrolle	984,1 \pm 139,4	1283,9 \pm 120,7
Sonografie-Schlaganfall	660,0 \pm 60,0	638,6 \pm 120,3
Varianz-Homogenität	Nein	Ja
Testmethode	Mann-Whitney	t-Test
p-Wert	0,09	0,0015

Für keine Versuchsgruppe ließen sich signifikante Unterschiede in der Enzymaktivität zwischen der rechten und der linken Gliedmaße nachweisen (Kontrolle: $p = 0,7$; OP-Kontrolle: $p = 0,6$; Schlaganfall: $p = 0,9$; Antibiose $p = 0,1$; Sonografie-OP-Kontrolle: $p = 0,1$; Sonografie-Schlaganfall: $p = 0,9$; Einzelvergleiche: t-Test; für Kontrolle und Antibiose: Mann-Whitney).

Die linksseitige CT-L-Aktivität der Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe lag deutlich höher als die der Sonografie-Schlaganfall-Tiere ($p = 0,0015$).

Darüber hinaus fanden sich keine signifikanten Differenzen zwischen den Versuchsgruppen (p-Werte s. Tabelle 21).

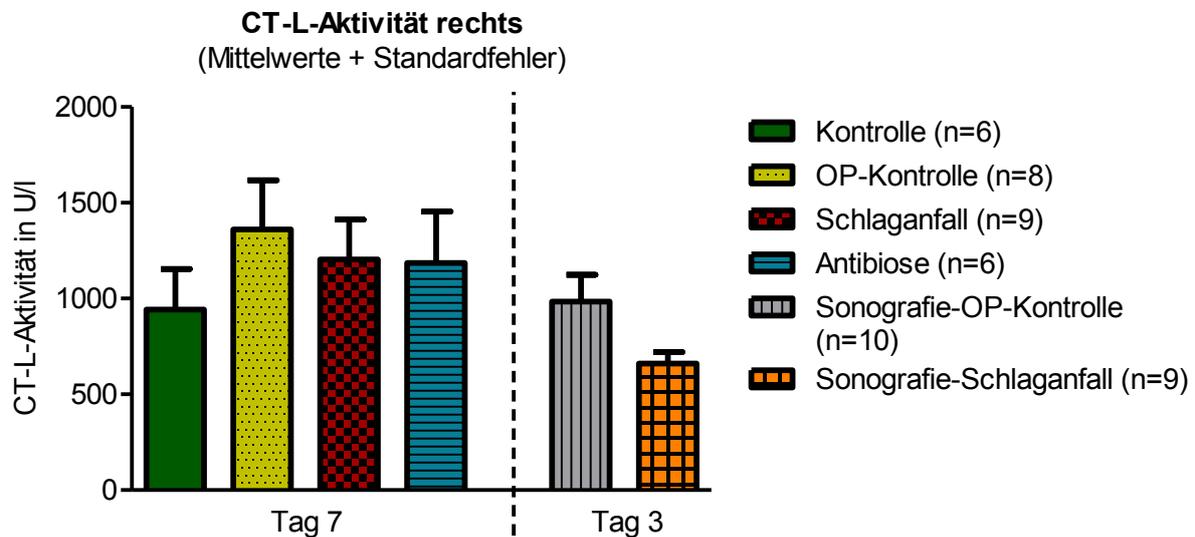


Abbildung 22: „Chemotrypsinlike“(CT-L)-Aktivität im rechten *M. gastrocnemius*: keine signifikanten Unterschiede an den Tagen 3 und 7

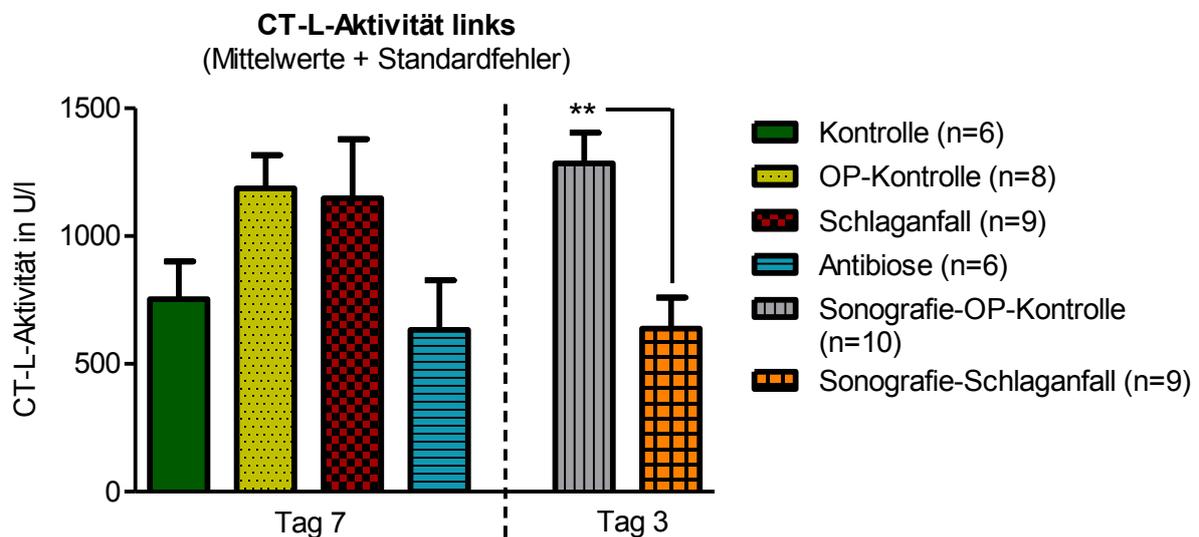


Abbildung 23: „Chemotrypsinlike“(CT-L)-Aktivität im linken *M. gastrocnemius*: signifikante Unterschiede nur am Tag 3 zwischen den Sonografie-Gruppen, Tiere mit Schlaganfall weisen eine geringere Aktivität auf als OP-Kontroll-Tiere

4.11.3 „Trypsinlike“-Aktivität

Tabelle 22 gibt eine Übersicht der Resultate der Messung der „Trypsinlike“(T-L)-Aktivität.

Tabelle 22: „Trypsinlike“(T-L)-Aktivität (Mittelwerte \pm Standardfehler in U/l), Testmethoden und Ergebnisse der statistischen Vergleiche

Gruppen Tag 7	T-L-Aktivität rechts	T-L-Aktivität links
Kontrolle	309,8 \pm 90,2	286,7 \pm 48,0
OP-Kontrolle	612,1 \pm 108,0	602,2 \pm 65,3
Schlaganfall	506,0 \pm 95,1	573,5 \pm 81,0
Antibiose	564,4 \pm 139,9	330,8 \pm 57,1
Varianz-Homogenität	Ja	Ja
Testmethode	One-Way ANOVA	One-Way ANOVA
p-Wert	0,3	0,09
Gruppen Tag 3	T-L-Aktivität rechts	T-L-Aktivität links
Sonografie-OP-Kontrolle	405,1 \pm 52,3	579,1 \pm 66,3
Sonografie-Schlaganfall	324,5 \pm 63,3	250,0 \pm 53,8
Varianz-Homogenität	Ja	Ja
Testmethode	t-Test	t-Test
p-Wert	0,3	0,0014

Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den rechts- und linksseitigen Enzymaktivitäten innerhalb der Gruppen nachweisbar (Kontrolle: $p = 0,7$; OP-Kontrolle: $p = 0,9$; Schlaganfall: $p = 0,9$; Antibiose $p = 0,2$; Sonografie-OP-Kontrolle: $p = 0,54$; Sonografie-Schlaganfall: $p = 0,4$; Einzelvergleiche: t-Test; für Kontrolle, Antibiose und Sonografie-Schlaganfall: Mann-Whitney).

Die T-L-Aktivität des linken *M. gastrocnemius* lag bei der Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe deutlich höher als bei der Sonografie-Schlaganfall-Gruppe ($p = 0,014$). Weitere signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen fanden sich nicht (p -Werte s. Tabelle 22).

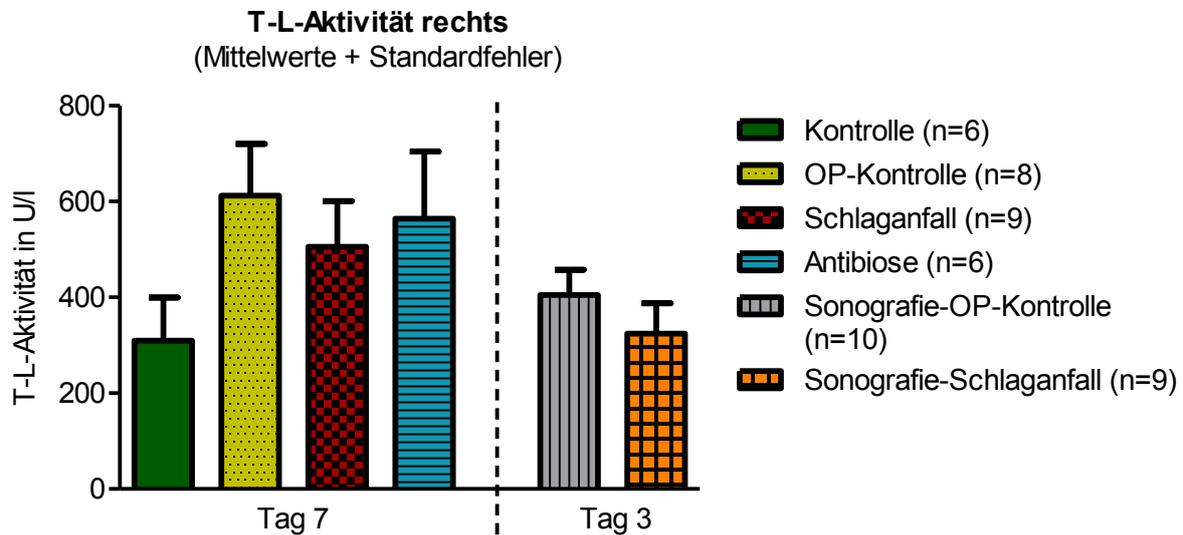


Abbildung 24: „Trypsinlike“(T-L)-Aktivität im rechten *M. gastrocnemius*: keine signifikanten Unterschiede an den Tagen 3 und 7

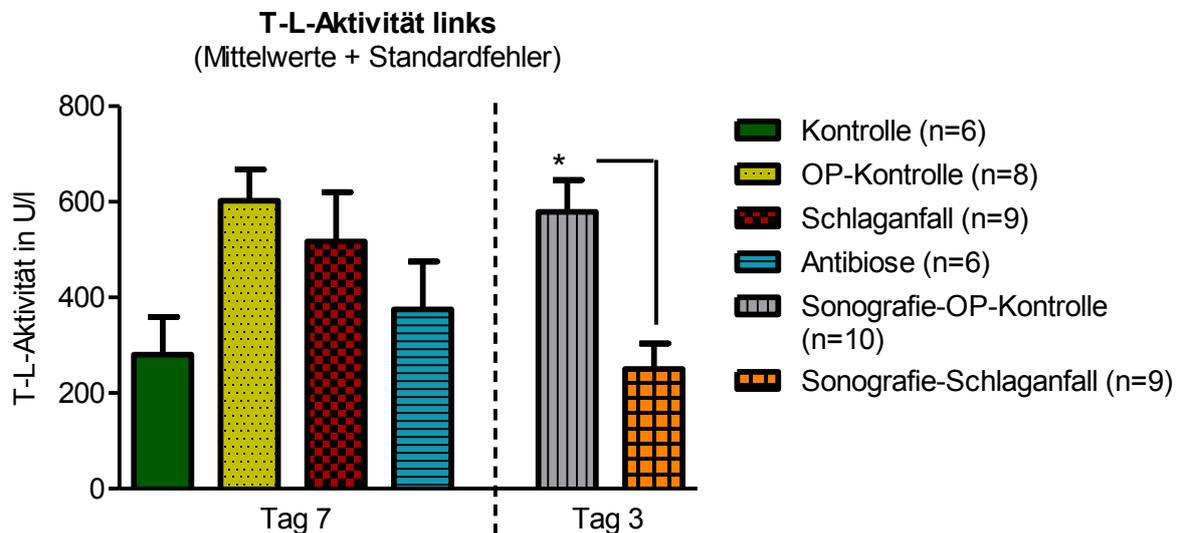


Abbildung 25: „Trypsinlike“(T-L)-Aktivität im linken *M. gastrocnemius*: signifikante Unterschiede nur am Tag 3 zwischen den Sonografie-Gruppen, Tiere mit Schlaganfall weisen eine geringere Aktivität auf als die OP-Kontroll-Tiere

4.12 Echokardiografie

Die Tiere mit Schlaganfall wiesen signifikant niedrigere Werte für die Innenfläche sowie die Längsachse des linken Ventrikels auf als die Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe. Diese Differenzen waren sowohl in der Diastole als auch in der Systole vorhanden. Darüber hinaus war der enddiastolische Durchmesser des linken Ventrikels verringert. Weitere relevante Unterschiede waren beim Herzminutenvolumen feststellbar. Hier lag die Sonografie-Schlaganfall-Gruppe erneut unter dem Niveau der Sonografie-OP-Kontroll-Tiere. Gleiches galt für die Herzfrequenz. Darüber hinaus ließen sich keine Differenzen zwischen beiden Gruppen nachweisen. Alle p-Werte und ausführliche Ergebnisse finden sich in Tabelle 23.

Tabelle 23: Echokardiografische Untersuchung der Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe und der Sonografie-Schlaganfall-Gruppe am Tag 3: Ergebnisse, Vergleichsmethoden und daraus resultierende p-Werte

Parameter	Einheit	Sonografie-OP-Kontrolle	Sonografie-Schlaganfall	Testmethode	p-Wert
Innenfläche LV diast.	mm ²	20,4 ± 0,4	18,4 ± 0,5	t-Test	0,003
Innenfläche LV syst.	mm ²	10,5 ± 0,2	9,2 ± 0,2	t-Test	0,0004
Längsachse LV diast.	mm	7,4 ± 0,2	6,8 ± 0,2	t-Test	0,03
Längsachse LV syst.	mm	5,8 ± 0,1	5,2 ± 0,2	t-Test	0,009
Wandstärke LV diast.	mm	0,64 ± 0,02	0,75 ± 0,09	Mann-Whitney	0,6
Wandstärke LV syst.	mm	0,96 ± 0,03	0,99 ± 0,08	Mann-Whitney	0,9
Wandstärke SEP diast.	mm	0,61 ± 0,03	0,68 ± 0,03	t-Test	0,14
Wandstärke SEP syst.	mm	1,04 ± 0,04	1,0 ± 0,05	t-Test	0,5

Parameter	Einheit	Sonografie- OP-Kontrolle	Sonografie- Schlaganfall	Testmethode	p- Wert
LVEDD	mm	4,2 ± 0,06	3,9 ± 0,13	Mann- Whitney	0,09
LVESD	mm	2,8 ± 0,07	2,6 ± 0,08	t-Test	0,04 9
Herzfrequenz	bpm	415,5 ± 14,1	328,0 ± 13,2	t-Test	0,00 03
EF	%	61,2 ± 1,4	62,6 ± 0,9	t-Test	0,4
Herzminutenvolumen	ml/min	12,8 ± 0,6	9,8 ± 0,8	t-Test	0,00 8
Fractional Shortening	%	32,6 ± 1,0	33,3 ± 0,7	t-Test	0,6
LV Masse	mg	74,2 ± 3,7	77,1 ± 4,6	t-Test	0,6

Tabelle 23, Fortsetzung: Echokardiografische Untersuchung der Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe und der Sonografie-Schlaganfall-Gruppe am Tag 3: Ergebnisse, Vergleichsmethoden und daraus resultierende p-Werte

Abkürzungen Tabelle 23: *bpm* = *beats per minute* (engl.), *diast.* = diastolisch, *EF* = *ejection fraction*, *LV* = linksventrikulär, *LVEDD* = linksventrikulärer enddiastolischer Diameter, *LVESD* = linksventrikulärer endsystolischer Diameter, *SEP* = Septum, *sys.* = systolisch

5 Diskussion

5.1 Infarktgrößen und neurologischer Status

Kontroll- und OP-Kontroll-Gruppe

Erwartungsgemäß fanden sich in den Gefrierschnitten der Kontroll- und OP-Kontroll-Gruppe keine ischämischen Areale. Entsprechend waren auch keine neurologischen Ausfälle zu verzeichnen. Alle Tiere der beiden Gruppen wiesen über sieben Tage hinweg einen neurologischen Status von 0 auf. In Bezug auf die Hirndurchblutung sowie die neurologische Entwicklung der Tiere im Versuchsverlauf sind folglich keine Störeinflüsse durch das allgemeine Versuchsprozedere oder die Kontroll-Operation feststellbar.

Schlaganfall- und Antibiose-Gruppe

Die Infarktgrößen zwischen den antibiotisch behandelten Tieren und der unbehandelten Schlaganfall-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant, ein positiver Einfluss der Enrofloxacin-Behandlung auf die Infarktgröße ist nicht nachweisbar.

5.2 Körpergewicht

Im Verlauf des Versuchs zeigten alle Gruppen mit Ausnahme der Kontroll-Gruppe signifikante Veränderungen des Körpergewichtes. Im folgenden Kapitel werden die Änderungen des Körpergewichtes innerhalb der Gruppen sowie die Unterschiede der Gewichtsveränderungen zwischen den Gruppen diskutiert.

Kontroll-Gruppe

Der Gewichtsverlauf der Kontroll-Tiere wird als Vergleichsgrundlage für die OP-Kontroll-Gruppe herangezogen. Einziger Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen ist die am Tag 0 in der OP-Kontroll-Gruppe durchgeführte Operation ohne Verschluss der mittleren Zerebralarterie.

OP-Kontroll-Gruppe

Obwohl das Körpergewicht beider Gruppen zu Versuchsende auf dem Niveau des jeweiligen Ausgangsgewichtes lag, unterschied sich die Entwicklung der Körpermasse im Versuchsverlauf zwischen den Gruppen nachweisbar. So verloren die Tiere, die der Kontroll-Operation unterzogen wurden, innerhalb von 24 Stunden nach Versuchsbeginn signifikant an Gewicht ($p \leq 0,0001$), während die Kontroll-Tiere ohne chirurgischen Eingriff im selben Zeitraum kei-

ne entsprechende Veränderung zeigten. Im weiteren Versuchsverlauf waren in beiden Gruppen keine signifikanten Gewichtsunterschiede an den direkt aufeinanderfolgenden Versuchstagen nachzuweisen. Beim Vergleich des Körpergewichtes der Ausgangsmessung mit den Werten von Tag 3 ergab sich jedoch für die OP-Kontroll-Gruppe ein statistisch relevanter Masseverlust. Offensichtlich wurde der Gewichtsverlust vom Tag 1 bis zum dritten Versuchstag nicht kompensiert. Der Direktvergleich der Entwicklung des Körpergewichtes zwischen Kontroll- und OP-Kontroll-Gruppe am Tag 3 ergab einen signifikanten Unterschied: Während die Kontrolltiere im Durchschnitt 1,8 % Körpermasse zugenommen hatten, war bei der OP-Kontroll-Gruppe ein mittlerer Gewichtsverlust von 9,2 % zu verzeichnen ($p = 0,04$).

Im Anschluss erfolgte bei den OP-Kontroll-Tieren eine signifikante Massezunahme vom dritten zum siebten Versuchstag ($p = 0,027$), sodass am Tag 7 keine relevanten Gewichtsunterschiede zum Versuchsbeginn nachweisbar waren. Zu Versuchsende war für die OP-Kontroll-Tiere somit eine vollständige Regeneration der Körpermasse zu verzeichnen. An dieser Stelle des Versuchs bestand auch kein signifikanter Unterschied der Gewichtsveränderungen zwischen der Kontroll- und der OP-Kontroll-Gruppe mehr – im Hinblick auf die unveränderte Masse der Kontroll-Tiere und die Regeneration des Gewichtes der OP-Kontroll-Gruppe eine logische Konsequenz.

Die Differenzen in der Entwicklung des Körpergewichtes zwischen beiden Gruppen müssen als Folge des operativen Eingriffs interpretiert werden, da die Tiere bis auf die Operation eine völlig gleiche Behandlung erfuhren. Folglich bewirkte der chirurgische Eingriff ohne Verschluss der mittleren Zerebralarterie einen kurzfristigen Gewichtsverlust zu Beginn des Versuchs, innerhalb von sieben Tagen erreichten die Tiere jedoch wieder ihr Ausgangsgewicht. Ähnliche Beobachtungen wurden in einer MCAO-Studie an Ratten dokumentiert [87]. Hierbei zeigten die OP-Kontroll-Tiere einen Gewichtsverlust innerhalb eines Tages nach der Operation, erreichten jedoch noch vor dem achten Tag nach der OP wieder ihr Ausgangsgewicht.

Die detaillierte Betrachtung der Körperzusammensetzung mittels NMR-Scan erlaubte die Analyse der am Gewichtsverlust beteiligten Körperbestandteile. Die Diskussion dieser Ergebnisse erfolgt im Abschnitt „Körperzusammensetzung“.

Die Entwicklung des Körpergewichtes der OP-Kontroll-Gruppe bildet die Vergleichsgrundlage für die entsprechenden Werte der Schlaganfall-Gruppe, die einem 60-minütigen Verschluss der mittleren Zerebralarterie unterzogen wurde und eine ansonsten identische Behandlung erfuhr.

Schlaganfall-Gruppe

Auch in dieser Gruppe zeigte sich wie bei den OP-Kontroll-Tieren ein signifikanter Gewichtsverlust am ersten Tag nach dem chirurgischen Eingriff, darüber hinaus erfolgte eine signifi-

kante Abnahme des Körpergewichtes von Tag 1 zu Tag 2. Auch von Tag 2 zu Tag 3 war tendenziell noch ein Gewichtsverlust darstellbar, der jedoch nicht statistisch signifikant war. Am Tag 3 war ein im Vergleich zum Ausgangswert signifikant reduziertes Körpergewicht nachweisbar. Zwar war dieser Umstand auch bei der OP-Kontroll-Gruppe zu beobachten (s. o.), ein Vergleich des Gewichts beider Gruppen am Tag 3 im Vergleich zur Ausgangsmessung wies jedoch signifikante Differenzen nach. So reduzierten die Tiere der Schlaganfall-Gruppe ihr Körpergewicht bis zum dritten Versuchstag mit -24,2 % deutlich stärker als die OP-Kontroll-Gruppe mit -9,2 % ($p = 0,001$). Die Schlaganfall-Gruppe wies im weiteren Versuchsverlauf vom fünften auf den sechsten Versuchstag eine signifikante Erhöhung des Gewichtes auf, sonst zeigten sich keine Differenzen zwischen den aufeinanderfolgenden Versuchstagen. Auch ein Vergleich zwischen dem ersten (Tag 0) und dem letzten (Tag 7) Versuchstag ergab keine statistisch relevante Differenz mehr, wobei das Niveau des Endgewichtes in der Schlaganfall-Gruppe deutlich unter dem Ausgangsgewicht lag. Zum Versuchsende zeigte sich tendenziell noch ein Unterschied im Ausmaß des Gewichtsverlustes zwischen der OP-Kontroll- (-1,8 %) und Schlaganfall-Gruppe (-15,9 %), der jedoch im 95%-Konfidenz-Intervall nicht mehr statistisch relevant war ($p = 0,096$).

Zusammenfassend wies die Schlaganfall-Gruppe im Vergleich zur OP-Kontroll-Gruppe nach der Operation eine verlängerte Phase des Gewichtsverlustes auf. Das Ausmaß der Gewichtsreduktion war zudem stärker als bei der OP-Kontroll-Gruppe. Anschließend erfolgte ein Gewichtszuwachs in beiden Gruppen, jedoch erreichten die OP-Kontroll-Tiere im Unterschied zur Schlaganfall-Gruppe wieder das Gewichtsniveau des Versuchsbeginns. Im Gewichtsverlauf der Schlaganfall-Tiere zeigte sich hingegen eine deutlichere Differenz zwischen Ausgangs- und Endgewicht, obgleich der Signifikanznachweis hier ausblieb.

Eine stärkere Gruppengröße und eine längere Versuchsdauer könnten womöglich genaueren Aufschluss über den Verlauf der Regenerationsphase und die Unterschiede zwischen beiden Gruppen liefern. In der vorliegenden Arbeit konnte ein deutlicher Gewichtsverlust in den ersten drei Tagen nach dem Auslösen des Schlaganfalls sowie eine Tendenz zur unvollständigen Regeneration der Körpermasse sieben Tage nach dem Insult nachgewiesen werden.

Royl *et al.* fanden vergleichbare Ergebnisse in einer MCAO-Studie an Mäusen, wo sich ein höherer Gewichtsverlust der Tiere mit Schlaganfall im Vergleich zur OP-Kontroll-Gruppe bis zum fünften Tag nach der Operation bemerkbar machte [88]. Das Ausgangsgewicht wurde erst am Tag 14 nach der Induktion des ischämischen Schlaganfalls wiedererlangt.

Welche Körperbestandteile am in der vorliegenden Arbeit festgestellten Gewichtsverlust beteiligt waren, wird im Abschnitt „Körperzusammensetzung“ diskutiert.

Die Entwicklung des Gewichts der Schlaganfall-Gruppe diene als Vergleichsgrundlage für die Antibiosegruppe.

Antibiose-Gruppe

Die Tiere dieser Gruppe zeigten wie alle übrigen operierten Mäuse einen signifikanten Gewichtsverlust am Tag 1 nach der Operation. Im weiteren Versuchsverlauf wurden keine signifikanten Änderungen des Körpergewichtes mehr nachgewiesen, tendenziell setzte sich der Verlust von Körpermasse jedoch bis zum Tag 3 nach der Operation fort. Erst am vierten Versuchstag konnte wieder eine tendenzielle Zunahme des Körpergewichtes festgestellt werden. Im Vergleich zur Ausgangsmessung war für die Antibiose-Tiere zwar eine deutliche Gewichtsreduktion am Tag 3 bzw. Tag 7 feststellbar, jedoch lag die Differenz mit einem p-Wert von 0,06 knapp über dem Signifikanzniveau. Das Endgewicht der Tiere unterschied sich nicht signifikant von der Ausgangsmessung, wobei hier ähnlich wie bei der Schlaganfall-Gruppe tendenziell ein deutlich geringeres Durchschnittsgewicht zu Versuchsende vorlag. Der Gewichtsverlauf der Antibiose-Gruppe wies folglich geringe Abweichungen von dem der Schlaganfall-Gruppe auf, bei der die Reduktion des Körpergewichtes am Tag 3 nach der Induktion des Schlaganfalls signifikant war. Beide Gruppen zeigten dennoch ein vergleichbares Ausmaß des Gewichtsverlustes an Tag 3 und Tag 7 in Relation zum Ausgangswert: Der durchschnittliche Gewichtsverlust lag mit $-24,2 \pm 3,0$ % (Schlaganfall) und $-22,3 \pm 3,8$ % (Antibiose) am Tag 3 und mit $-15,9 \pm 4,6$ % (Schlaganfall) und $-12,2 \pm 5,9$ % (Antibiose) am Tag 7 jeweils auf einem vergleichbaren Niveau. So waren zu beiden Zeitpunkten auch keine signifikanten Abweichungen zwischen Schlaganfall- und Antibiose-Tieren nachweisbar.

Die antibiotische Behandlung hatte demnach keinen deutlichen Einfluss auf den Gewichtsverlauf nach Schlaganfall, womit bakteriell bedingte Infektionen mit Enrofloxacinempfindlichen Erregern als Ursache für den Verlust von Körpermasse nach Induktion des Schlaganfalls unwahrscheinlich sind.

Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu Ergebnissen einer Studie von Meisel *et al.*, die eine deutliche Verringerung des Gewichtsverlustes nach antibiotischer Behandlung mit Moxifloxacin beobachteten [3].

Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit wurde das Antibiotikum im Rahmen der Untersuchungen von Meisel *et al.* jedoch entweder sofort oder mit einer Zeitverzögerung von zwölf Stunden nach der Operation im Zwei-Stunden-Takt verabreicht [3]. So könnten die Unterschiede in den Ergebnissen der beiden Arbeiten in der abweichenden Applikations-Frequenz und -Dauer liegen. Zudem unterschieden sich die verwendeten Antibiotika trotz Zugehörigkeit zur gleichen Wirkstoffgruppe der Fluorchinolone in wesentlichen Strukturmerkmalen, welche das Wirksamkeitsspektrum und die Bioverfügbarkeit sowie die Halbwertszeit beeinflussen. In der Studie von Meisel *et al.* wurden vor allem die potentiell pathogenen Darmkei-

me *Escherichia coli* und *Enterococcus faecalis* in den Blut- und Lungenproben der un-
behandelten Mäuse gefunden [3]. Entsprechend eines Vorschlags für die Klassifikation der
Fluorchinolone in vier Gruppen unter Mitwirkung des Paul-Ehrlich-Instituts gehört Enrofloxacin
zur II. Generation der Gyrasehemmer, während Moxifloxacin einen Vertreter der IV. Ge-
neration darstellt [4]. Letztere Gruppe zeichnet sich dadurch aus, „daß im Gegensatz zur
Gruppe II die intrinsische Aktivität gegen grampositive Erreger, wie Staphylokokken, Strepto-
kokken, Pneumokokken und Enterokokken höher ist bei vergleichbarer Aktivität gegen
gramnegative Erreger. Dazu kommt die verbesserte Aktivität gegen sogenannte atypische
Erreger, z.B. Chlamydien, Mykoplasmen und auch eine verbesserte Aktivität gegen Anaerobier.
Diese Substanzen haben im Allgemeinen eine hohe Bioverfügbarkeit und längere
Halbwertszeiten als die meisten Substanzen der Gruppen I und II“ [4]. So könnten die ver-
besserte Wirksamkeit von Moxifloxacin gegen Enterokokken oder die bessere Bioverfügbar-
keit und längere Halbwertszeit ebenfalls einen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen
Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der Studie von Meisel *et al.* bieten.

Zwar wurden in der vorliegenden Arbeit keine klinischen Anzeichen für Infektionen bei den
Versuchstieren beobachtet, jedoch könnten Hinweise auf ein infektionsbedingtes reduziertes
Allgemeinbefinden wie geringere Futteraufnahme oder reduzierte Spontanbewegung auch
als Symptome des Schlaganfalls fehlgedeutet worden sein. Weiterführende Untersuchungen
des Gesundheitszustandes der Tiere, wie zum Beispiel Messung der Körpertemperatur,
Blutuntersuchungen oder bronchioalveoläre Lavage zur Überprüfung auf subklinische Infek-
tionen wurden nicht durchgeführt. Es erfolgten auch keine Blutuntersuchungen oder post-
mortale Organuntersuchungen auf Infektionsanzeichen. Somit können nicht bakteriell be-
dingte Infektionen z.B. mit Viren oder Parasiten sowie auch Infektionen mit Enrofloxacin-
resistenten Bakterien im Versuchsverlauf nicht ausgeschlossen werden. Andererseits kann
eine Infektion sowohl der behandelten als auch der unbehandelten Mäuse mit Schlaganfall
auch nicht sicher angenommen werden. Anhand der vorliegenden Daten lässt sich demnach
nicht ermitteln, ob der Gewichtsverlust nach Schlaganfall durch anderweitige Infektionen,
z.B. mit Viren, Parasiten oder Enrofloxacin-resistenten Erregern beeinflusst wurde oder ohne
einen derartigen Einfluss erfolgte.

Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe

Die Tiere dieser Gruppe reduzierten ihr Gewicht von Tag 0 zu Tag 1. Am Folgetag blieb die
Körpermasse stabil. Obwohl sich das Gewicht der Mäuse von Tag 2 zu Tag 3 wieder erhöhte,
konnte das Ausgangsgewicht zu Versuchsende nicht wieder erreicht werden (Tag 0 vs.
Tag 3: $p = 0,013$). Diese Gewichtsentwicklung dient als Grundlage für den Vergleich mit der
Sonografie-Schlaganfall-Gruppe.

Sonografie-Schlaganfall-Gruppe

Hier war ebenfalls eine signifikante Gewichtsreduktion nachweisbar, diese setzte sich jedoch im Unterschied zur Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe von Versuchsbeginn über Versuchstag 1 zu Tag 2 fort. Am Folgetag war keine Gewichtszunahme zu verzeichnen, was die Beobachtung aus den bisherigen Gruppenvergleichen unterstützt: Der Schlaganfall führt offensichtlich zu einer verlängerten Phase der Gewichtsreduktion. Auch die Ausprägung des Verlustes an Körpermasse war bei den Tieren mit Schlaganfall größer als bei der Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe ($p = 0,02$), was sich mit den oben diskutierten Ergebnissen deckt und die Schlussfolgerung untermauert, dass sich ein Schlaganfall nicht nur auf die Dauer, sondern auch die Stärke des Gewichtsverlustes negativ auswirkt.

5.3 Zusammensetzung der Körpermasse

5.3.1 Körperfett

Kontroll-Gruppe

Das Körperfett der Kontroll-Tiere verringerte sich zwar von Tag 3 zu Tag 7, wobei jedoch am Ende des Versuchs kein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert bestand. Dies lässt sich durch zwei Faktoren erklären: einerseits zeigten die Messwerte verhältnismäßig hohe Standardfehler, sodass womöglich Unterschiede bestanden, die Signifikanz bei der geringen Gruppengröße von sechs Tieren jedoch nicht nachweisbar war. Andererseits kann eine Zunahme des Fettgewebes zu einem anderen Zeitpunkt stattgefunden haben, die entweder in den messtechnisch nicht erfassten Zeiträumen stattfand oder zwar am Tag 3 gemessen, aber aufgrund oben genannter statistischer Unsicherheiten nicht als signifikant gewertet wurde. Bei Betrachtung der Messwerte scheint eine Kombination aus beiden Erklärungsansätzen plausibel. Hier könnte eine Untersuchung mit stärkerer Gruppengröße und ggf. engeren Messintervallen Aufschluss geben. Fraglich ist auch, wodurch die Schwankungen der Fettmasse der Kontroll-Tiere im Versuchsverlauf verursacht werden. Denkbar wären zum einen stressbedingte Veränderungen der Futteraufnahme und daraus resultierender Ansatz bzw. Abbau von Fettgewebe. Eine Alteration der aufgenommenen Futtermenge war für die Kontroll-Gruppe jedoch in diesem Versuch nicht nachweisbar. Ein anderer Erklärungsversuch besteht in ebenfalls stressbedingter Veränderung des Energieumsatzes. In dieser Arbeit wurde die Spontanbewegung untersucht, welche einen Einfluss auf den Energieverbrauch haben kann. Jedoch waren auch hier keine Differenzen im Versuchsverlauf nachweisbar. Eine genauere Analyse des Energieumsatzes könnte Erklärungen für die Schwankungen der Fettmasse der Kontroll-Tiere liefern, dies ist jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit und für die weiteren Untersuchungen unerheblich.

OP-Kontroll-Gruppe

Die OP-Kontroll-Tiere verloren im Unterschied zur Kontroll-Gruppe bis zum dritten Versuchstag signifikant an Fettmasse, am Tag 7 des Versuchs bestanden hingegen keine relevanten Differenzen zum Tag 3 und zur Ausgangsmessung. Zwar war die Zunahme der Werte von Tag 3 zu Tag 7 nicht signifikant, reichte aber offensichtlich aus, um den Endwert soweit in den Bereich des Ausgangswertes zu verschieben, dass in Kombination mit einer kleinen Gruppengröße und hohen Standardfehlern keinerlei signifikante Resultate in beide Richtungen entstanden. Verglichen mit der Kontroll-Gruppe verloren die OP-Kontroll-Tiere bis zum Tag 3 signifikant an Fettgewebe, was einen negativen Einfluss des chirurgischen Eingriffs auf das Körperfett beweist. Am Tag 7 konnte zwischen beiden Gruppen keine signifikante Differenz festgestellt werden, sodass hier kein Effekt der Operation mehr angenommen werden kann.

Neben der Ermittlung der Körperfettmasse im NMR-Scan wurden zu Versuchsende auch repräsentative Anteile des Fettgewebes an den Nebenhoden und den Schulterblättern präpariert und gewogen. Auch hier zeigten sich nach Präparation und Gewichtsermittlung am Tag 7 weder für das epididymale weiße Fettgewebe noch für das braune Fettgewebe signifikante Unterschiede zwischen der OP-Kontroll- und der Kontroll-Gruppe. Mit den vorliegenden Daten kann jedoch nicht ermittelt werden, ob beide oder nur eine der beiden Fettgewebsarten an der Reduktion des Gesamtfettgewebes am Tag 3 maßgeblich beteiligt waren, da zum fraglichen Zeitpunkt keine Gewebeentnahme stattfand.

Die genauen Mechanismen, welche zur Abnahme der Fettmasse führten, wurden in diesem Versuch nicht weitergehend untersucht. Ursächlich kommen hierfür verschiedene Faktoren in Betracht. So kann durch mangelnde Nährstoffzufuhr eine katabole Stoffwechsellage entstehen, in deren Rahmen ein verstärkter Abbau der Körperfettreserven zur Energiegewinnung herbeigeführt wird. Dieser Effekt wird durch die Freisetzung des Peptidhormons Glucagon vermittelt, welches bei Hypoglykämie verstärkt sezerniert wird. Im Fall der OP-Kontroll-Gruppe fanden sich jedoch keine Hinweise auf eine Verringerung der Nahrungszufuhr, die eine Hypoglykämie zur Folge gehabt hätte. So hatten die OP-Kontroll-Tiere ihre Futtermittelaufnahme am Tag 3 gegenüber der Ausgangsmessung nicht relevant verändert. Eine verstärkte Lipolyse durch Hypoglykämie scheint an dieser Stelle somit unwahrscheinlich. Als weitere Ursache für eine katabole Stoffwechsellage kommt ein erhöhter Energieumsatz in Betracht, der nicht durch entsprechend erhöhte Kalorienaufnahme kompensiert wird. Zur Auswertung dieser These können Forschungsergebnisse aus einer weiterführenden Untersuchung der Arbeitsgruppe herangezogen werden [89]. Bei gleichem Versuchsaufbau wie in der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere am Tag 0, 3 und 7 in speziell ausgerüsteten Käfigen gehalten, die über indirekte Kalorimetrie unter anderem eine Messung des Grundumsatzes der Mäuse ermöglichten [89]. Dabei ließ sich kein erhöhter Grundumsatz bei den OP-

Kontroll-Tieren feststellen, womit dieser Aspekt als Ursache für den Verlust der Fettmasse unwahrscheinlich ist. Darüber hinaus kommt jedoch auch eine stressinduzierte Verstärkung der Lipolyse als Ursache für die Reduktion des Fettgewebes in Frage. Es ist bekannt, dass Adrenalin, Noradrenalin und adrenocorticotropes Hormon (ACTH) die Lipolyse aktivieren. Bei Tieren, die einem chirurgischen Eingriff unterzogen werden, ist mit einer gesteigerten Ausschüttung der Stresshormone zu rechnen. So beobachteten Weidenfeld *et al.* im Tierversuch an Ratten vier- bis fünffach erhöhte Werte für ACTH und Corticosteron nach einer permanenten Okklusion der mittleren Zerebralarterie [90]. Dieser Effekt zeigte sich sowohl bei den Tieren mit Kontroll-Operation als auch bei den Tieren mit zerebraler Ischämie, womit nachgewiesen werden konnte, dass die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse durch den operationsbedingten Stress induziert wird [90]. Im genannten Versuch von Weidenfeld *et al.* hatten sich die Messwerte der Stressmarker nach 24 Stunden wieder normalisiert [90]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass auch im vorliegenden Versuch die Kontroll-Operation zu einer kurzzeitigen verstärkten Freisetzung von Stresshormonen mit nachfolgender verstärkter Lipolyse führte. Sollten die Stresshormone nach einer ähnlichen Zeitspanne wie im Versuch von Weidenfeld *et al.* wieder auf einem normalen Niveau angekommen sein, wäre dies eine Erklärung dafür, warum sich das Fettgewebe der OP-Kontroll-Tiere bis zum siebten Versuchstag wieder regenerieren konnte.

Zusammenfassend wird der Verlust von Fettgewebe nach dem chirurgischen Eingriff vermutlich durch postoperativen Stress induziert und nicht durch eine mangelhafte Kalorienzufuhr ausgelöst (siehe auch Diskussion zur Futteraufnahme).

Schlaganfall-Gruppe

Die Schlaganfall-Tiere zeigten am dritten Versuchstag eine statistisch relevante Reduktion der Fettmasse. Zum selben Zeitpunkt war auch ein deutlich verringertes Körpergewicht zu verzeichnen, was die Schlussfolgerung zulässt, dass der Verlust von Körperfett maßgeblich am Gesamtgewichtsverlust beteiligt war. Diese Entwicklung entspricht im Wesentlichen der der OP-Kontroll-Tiere, jedoch wies die Schlaganfall-Gruppe sowohl einen stärkeren Gewichtsverlust (s. Abschnitt „Körpergewicht“) als auch einen höheren Verlust der Fettmasse auf. Die zerebrale Ischämie scheint somit innerhalb der ersten drei Tage nach Insult zusätzlich zu dem durch die Operation ausgelösten Verlust von Fettgewebe eine weitere Reduktion der Fettmasse zu bewirken. Im weiteren Versuchsverlauf führte die signifikante Zunahme des Körperfetts der Schlaganfall-Tiere von Tag 3 bis Tag 7 dazu, dass zu Versuchsende keine relevante Differenz mehr zu den Ausgangswerten bestand. Auch wich die Differenz zur Ausgangsmessung am Ende des Versuchs nicht signifikant von der OP-Kontroll-Gruppe ab. Das Fettgewebe der Schlaganfall-Gruppe scheint sich somit im Laufe des Versuchs regeneriert zu haben.

Bei Betrachtung der Gewichte des präparierten Fettgewebes am Tag 7 fällt jedoch auf, dass bei der Schlaganfall-Gruppe erheblich weniger epididymales Fett im Verhältnis zur anfänglichen Körpermasse vorhanden war als bei den OP-Kontroll-Tieren. Dies steht im Widerspruch zu den oben diskutierten Ergebnissen des NMR-Scans, die auf eine Regeneration der Fettreserven am Tag 7 nach dem Schlaganfall hinweisen. Möglicherweise haben die Tiere der Schlaganfall-Gruppe an anderen Körperteilen Fettgewebe regeneriert, während das epididymale Fettgewebe sich noch nicht vollständig erholt hatte. Ein weiterer Erklärungsansatz findet sich bei genauerer Betrachtung der oben genannten scheinbaren Regeneration der Fettmasse zu Versuchsende. Die Schlaganfall-Gruppe wies hier eine im Vergleich zum Versuchsbeginn um $26,9 \pm 13,7$ % verringerte Fettmasse auf, die OP-Kontroll-Gruppe eine um $9,3 \pm 8,1$ % reduzierte Fettmasse. Interessanterweise war das mittels NMR-Scan gemessene Körperfett im Verhältnis zur Gesamtkörpermasse am Tag 7 zwischen beiden Gruppen nicht signifikant verschieden, wobei hier die Veränderung zum Ausgangswert verglichen wurde. Hohe Standardfehler bei geringer Gruppengröße führen hierbei evtl. zum Ausbleiben eines signifikanten Unterschieds. Betrachtet man die Datensätze der NMR-Messung und der präparierten Fettgewebepartien im Zusammenhang, kann davon ausgegangen werden, dass keine vollständige Regeneration der Fettmasse bis zum Versuchsende erfolgte. Somit führte der Schlaganfall offensichtlich zu einem intensiveren und länger andauernden Fettgewebserückgang als die Kontroll-Operation.

Auch hier müssen mangelnde Nährstoffzufuhr mit daraus resultierender Glucagon-Ausschüttung, ein erhöhter metabolischer Grundumsatz sowie Stress als Ursachen für eine gesteigerte Lipolyse in Betracht gezogen werden.

Wie bereits erwähnt, fanden im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen bezüglich der Stressparameter statt, weshalb zu einer Stresshormon-induzierten Lipolyse keine Aussagen getroffen werden können. Weidenfeld *et al.* stellten in ihrer Untersuchung keine Unterschiede in der ACTH- und Corticosteron-Freisetzung zwischen OP-Kontroll-Tieren und Ratten mit zerebraler Ischämie fest [90]. Es ist nicht auszuschließen, dass in der vorliegenden Studie durch den Schlaganfall eine verstärkte Ausschüttung von Lipolyse-fördernden Stresshormonen verursacht wurde, die über den Effekt der Kontroll-Operation hinausgeht. Nach den Ergebnissen von Weidenfeld *et al.* scheint dies jedoch unwahrscheinlich.

Auch ein erhöhter metabolischer Grundumsatz scheint als Ursache für die gesteigerte Lipolyse nach dem Schlaganfall nicht sehr wahrscheinlich. So wurde in der weiterführenden Studie von Springer *et al.* ein reduzierter Grundumsatz an den Versuchstagen 3 und 7 nach Induktion des Schlaganfalls festgestellt [89].

Eine hypoglykämische Stoffwechsellage mit gesteigerter Glucagon-Sezernierung würde eine plausible Erklärung für den starken Fettverlust nach dem Schlaganfall darstellen, die vorlie-

genden Daten liefern aber hierzu keine eindeutigen Resultate. So hatten Tiere der Schlaganfall-Gruppe ihre Futtermittelaufnahme am dritten Versuchstag im Verhältnis zum Versuchsbeginn nicht signifikant verringert. Der Vergleich zur OP-Kontroll-Gruppe ergab ebenfalls keine signifikant stärkere Reduktion der Nahrungsaufnahme. Allerdings waren Tendenzen zu beobachten, wonach die Tiere der OP-Kontroll-Gruppe ihre Futtermittelaufnahme erhöht hatten, während die Schlaganfall-Gruppe eine Verringerung der Nahrungszufuhr am Tag 3 nach der Operation aufwies. Das Signifikanzniveau beim Vergleich zwischen beiden Gruppen wurde hier mit einem p-Wert von 0,058 nur knapp überschritten. Eine Tendenz hingehend zur Reduktion der Futtermittelaufnahme nach Schlaganfall scheint also vorhanden, eventuell führte der hohe Standardfehler insbesondere im Fall der Schlaganfall-Gruppe jedoch zu keiner nachweisbaren Signifikanz. Ein Versuch mit stärkerer Gruppengröße könnte hierzu präzisere Ergebnisse liefern. In dem bereits erwähnten weitergehenden Versuch der Arbeitsgruppe Springer konnte eine signifikant reduzierte Nahrungsaufnahme der Schlaganfall-Gruppe am Tag 3 festgestellt werden [89]. Dies ist somit der wahrscheinlichste Erklärungsansatz für die reduzierte Fettmasse nach dem Schlaganfall.

Antibiose-Gruppe

Die Messung der Körperzusammensetzung ergab eine Reduktion des Fettgewebes am dritten Versuchstag, was dem Verlauf der Schlaganfall-Gruppe entsprach. Auch das Ausmaß des Verlustes zu diesem Zeitpunkt war mit dem der Schlaganfall-Tiere vergleichbar. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der anfängliche Gewichtsverlust in der Antibiose-Gruppe analog zur Schlaganfall-Gruppe durch eine Reduktion der Fettmasse mit verursacht wird. Die Veränderung der Fettmasse von Tag 3 zu Tag 7 lag knapp außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls ($p = 0,051$) und konnte somit nicht als signifikant gewertet werden, wobei hierbei geringe Gruppengröße und hoher Standardfehler limitierende Faktoren für eine zuverlässige Aussage darstellen. Differenzen zur Ausgangsmessung bestanden am Tag 7 nicht, daher kann auch hier eine zumindest teilweise Wiederherstellung der Fettmasse angenommen werden. Zur Verifizierung dieser Annahme wäre eine stärkere Gruppengröße hilfreich, um die Effekte des Standardfehlers auszugleichen.

Nimmt man den Verlauf der Werte der Antibiose-Gruppe von anfänglichem Fettverlust bis zum Tag 3 und anschließender Fettzunahme bis zum Versuchsende an, so ist diese Entwicklung identisch mit der der unbehandelten Schlaganfall-Tiere. Beim Vergleich der Differenzen der Messwerte von Tag 3 und Tag 7 zur Ausgangsmessung bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, was diese Hypothese unterstützt. Somit liegt nahe, dass die Behandlung mit Enrofloxacin keine Auswirkungen auf die Entwicklung des Fettgewebes nach dem Schlaganfall hatte. Die Masse des am Tag 7 präparierten weißen und braunen Fettgewebes der Antibiose-Gruppe wies keine relevanten Differenzen zu

den entsprechenden Werten der Schlaganfall-Tiere auf. Daher ist auch hier ein Einfluss der Enrofloxacin-Behandlung nach Schlaganfall auf das Fettgewebe nicht nachweisbar. Es ist somit unwahrscheinlich, dass bei der Reduktion des Fettgewebes nach Schlaganfall Infektionen mit Enrofloxacin-empfindlichen Erregern ursächlich eine Rolle spielen. Infektionen anderer Genese können jedoch ursächlich nicht ausgeschlossen werden.

Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe

Die Tiere dieser Gruppe wiesen eine Reduktion des Fettgewebes vom Versuchsbeginn bis zum Tag 3 der Versuchsreihe auf. Diese Beobachtung dient als Grundlage für den Vergleich mit der Sonografie-Schlaganfall-Gruppe.

Sonografie-Schlaganfall-Gruppe

Auch hier zeigte sich eine deutliche Verringerung des Fettgewebes von Tag 0 zu Tag 3, was der Entwicklung der Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe gleichkam. Jedoch war das Ausmaß des Fettverlustes bei den Tieren mit zerebraler Ischämie signifikant stärker ausgeprägt. Diese Beobachtung entspricht dem Vergleich der OP-Kontroll- und Schlaganfall-Gruppe ohne zusätzliche Isofluran-Narkose. Dies unterstützt die Annahme, dass die zerebrale Ischämie zu einem verstärkten Verlust von Fettgewebe nach dem Insult führt. Während bei den Versuchsgruppen ohne zusätzliche Isofluran-Narkose jedoch eine hypoglykämische Stoffwechsellage zumindest als potentielle Ursache des Fettverlustes diskutiert wurde, kann diese Argumentation bei den Sonografie-Gruppen nicht geltend gemacht werden, da sich hier mit einem p-Wert von 0,5 keine Tendenz zu Unterschieden in der Futteraufnahme nachweisen ließ. Die Möglichkeit unterschiedlicher Stresshormon-Ausschüttung besteht, kann jedoch mit den Daten des vorliegenden Versuchs nicht ermittelt werden. In anderen Arbeiten [90] zeigte sich, wie bereits diskutiert, jedoch kein Unterschied zwischen OP-Kontroll- und Schlaganfall-Gruppe. Ein erhöhter metabolischer Gesamtumsatz kommt als Ursache für den Verlust von Fettgewebe in Frage, wurde jedoch für die Echokardiografie-Gruppen in den weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe nicht gemessen.

Zusammenfassend erfolgte bei allen operierten Gruppen bis zum dritten Versuchstag eine Reduktion der Gesamtfettmasse, wobei die Gruppen mit zerebraler Ischämie stärkere Verluste aufwiesen als die OP-Kontroll-Tiere. Der Schlaganfall führte folglich zu einer Intensivierung der Lipolyse. Über die genauen Ursachen hierfür lässt sich anhand der vorliegenden Daten keine Aussage treffen. Zur weitergehenden Analyse wären molekularbiologische und histologische Untersuchungen sinnvoll, um die genauen Ursachen für den verstärkten Fettabbau nach Schlaganfall zu klären.

5.3.2 Fettfreie Masse

Kontroll-Gruppe

Die Kontroll-Tiere zeigten keine signifikanten Änderungen der fettfreien Masse über den Versuchszeitraum, womit ein Einfluss äußerer Störfaktoren ausgeschlossen werden kann.

OP-Kontroll-Gruppe

Die OP-Kontroll-Tiere wiesen am Tag 3 des Versuchs eine Reduktion der fettfreien Masse auf. Durch die nachfolgende Zunahme des fettfreien Gewebes bis zum siebten Versuchstag erreichten die Messwerte zu Versuchsende wieder das Ausgangsniveau. Es bestand jedoch weder am dritten noch am siebten Versuchstag ein signifikanter Unterschied zu den Werten der Kontroll-Tiere. Das Ausmaß des Verlustes an fettfreier Masse ist folglich als gering zu bewerten. Die Unterschiede in der Entwicklung der fettfreien Masse zwischen den beiden Gruppen belegen dennoch einen Einfluss der Operation auf diese Komponente. Die chirurgische Intervention verursachte offenbar eine Reduktion der fettfreien Masse innerhalb der ersten drei Tage nach dem Insult, wobei sich die Auswirkungen nach weiteren vier Tagen wieder revidierten.

Verschiedene Ursachen kommen für die anfängliche Reduktion in Betracht. Neben dem Rückgang des Muskelgewebes ist eine Verringerung der fettfreien Organmasse denkbar. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen konzentrieren sich auf die Veränderungen des Muskelgewebes. Zusätzlich wurden jedoch die Organgewichte ermittelt, um den Einfluss dieser Komponente auf die Veränderungen der Körpermasse charakterisieren zu können. Problematisch für die Beurteilung ist jedoch der Fakt, dass die Messungen der Muskel- und Organgewichte in der OP-Kontroll-Gruppe erst am siebten Versuchstag durchgeführt wurden – zu einem Zeitpunkt, als sich die fettfreie Masse bereits wieder regeneriert hatte. Alle ermittelten Differenzen können daher lediglich Anhaltspunkte bezüglich der Ursache des Verlustes an fettfreier Masse liefern, sie spiegeln jedoch nicht die Verhältnisse zum Zeitpunkt der stärksten Reduktion dieser Komponente wider. Die Organgewichte der OP-Kontroll-Tiere wichen nicht signifikant von denen der Kontroll-Tiere ab. Somit ist anzunehmen, dass kein Verlust von Organmasse vorlag oder dass sich die Organgewichte bis zum siebten Versuchstag vollständig regeneriert hatten. Auch in Bezug auf die Masse der präparierten Muskeln zu Versuchsende waren keine Unterschiede zwischen der Kontroll- und der OP-Kontroll-Gruppe nachweisbar, was im Hinblick auf die Regeneration der fettfreien Masse zum Entnahmezeitpunkt der Muskeln logisch erscheint. Eine Beurteilung der Verhältnisse zum Zeitpunkt der signifikanten Verringerung des fettfreien Gewebes an Tag 3 kann jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht vorgenommen werden.

Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass ein großer Teil der fettfreien Masse aus Flüssigkeit besteht, daher kann eine Reduktion des Wasseranteils im Gewebe ebenfalls für den Rückgang der fettfreien Masse verantwortlich sein. Die OP-Kontroll-Tiere wiesen jedoch keine Veränderung des Gesamtwassers über den Versuchsverlauf auf und es konnten auch keine Differenzen zur Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden. Somit ist davon auszugehen, dass die Verringerung der fettfreien Masse in diesem Fall nicht auf eine Reduktion der Körperflüssigkeit zurückzuführen ist.

Schlaganfall-Gruppe

Die Tiere mit Schlaganfall wiesen drei Tage nach der Operation eine signifikante Reduktion der fettfreien Masse auf, die im Vergleich zur OP-Kontroll-Gruppe deutlich stärker ausfiel. Die zerebrale Ischämie verursachte offenbar in den ersten drei Tagen nach ihrer Induktion zusätzlich zur Reduktion durch den chirurgischen Eingriff eine weitere Verminderung der fettfreien Körpermasse. Im Unterschied zur OP-Kontroll-Gruppe zeigten die Tiere mit Schlaganfall am siebten Versuchstag in Relation zu Tag 3 auch keine relevante Zunahme der fettfreien Masse, daher waren zu Versuchsende noch signifikant reduzierte Werte gegenüber der Ausgangsmessung zu verzeichnen. Die zerebrale Ischämie scheint somit auch zu einer verzögerten Regeneration der fettfreien Masse zu führen. Der Unterschied zur OP-Kontroll-Gruppe ($-2,4 \pm 1,3 \%$) war zu diesem Zeitpunkt mit $-14,8 \pm 4,1 \%$ zwar noch deutlich, jedoch mit einem p-Wert von 0,09 nicht signifikant. Eine Untersuchung mit stärkerer Gruppengröße zum Ausgleich des hohen Standardfehlers könnte hierzu eindeutigere Daten liefern.

Hinweise auf die Ursache für die Reduktion der fettfreien Masse können die Organ- und Muskelgewichte der Schlaganfall-Tiere liefern. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Entnahme der Gewebe nicht zum Zeitpunkt der deutlichen Veränderung an Tag 3, sondern erst am Tag 7 erfolgte, als die Differenzen des fettfreien Gewebes zum Ausgangswert sich zwischen beiden Gruppen nicht mehr signifikant unterschieden. Bezüglich der Organmasse und Muskelmasse konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden. Eine Tendenz zu geringeren Organ- und Muskelgewichten seitens der Schlaganfall-Gruppe war jedoch zu verzeichnen. Zur genaueren Abklärung ist eine Untersuchung mit einheitlichen Ausgangsgewichten nötig, idealerweise mit einer Entnahme der Muskeln und Organe am Tag 3 zum Zeitpunkt der größten Reduktion der fettfreien Masse.

Bei der Schlaganfall-Gruppe ging die Reduktion der fettfreien Masse am Tag 3 im Unterschied zu den OP-Kontroll-Tieren mit einer Verringerung des Gesamtwassers einher. Es ist daher wahrscheinlich, dass die verstärkte Abnahme der fettfreien Masse zu diesem Zeitpunkt zumindest teilweise durch eine Verringerung der Körperflüssigkeit bedingt war.

Antibiose-Gruppe

Die antibiotisch behandelten Tiere wiesen am dritten Versuchstag eine signifikante Verringerung der fettfreien Masse auf. Das Ausmaß dieses Verlustes war mit dem der Schlaganfall-Gruppe vergleichbar, da sich die Differenz zum Ausgangswert zwischen beiden Gruppen nicht signifikant unterschied. Die Antibiose scheint somit die Reduktion der fettfreien Masse innerhalb der ersten drei Tage nach der Operation nicht zu beeinflussen. Die anschließende Zunahme des fettfreien Gewebes war nicht signifikant, was der Entwicklung der unbehandelten Schlaganfall-Gruppe entspricht. Die Differenz der absoluten Messwerte zwischen Versuchsbeginn und Versuchsende war im Gegensatz zur Schlaganfall-Gruppe statistisch nicht relevant, jedoch war der prozentuale Verlust an fettfreier Masse von $-12,8 \pm 5,9 \%$ am Tag 7 mit dem der unbehandelten Schlaganfall-Tiere ($14,8 \pm 4,1 \%$) vergleichbar. Die rechnerischen Diskrepanzen sind hierbei vermutlich auf die geringe Tierzahl zurückzuführen, was in Verbindung mit einem hohen Standardfehler eine Interpretation der Ergebnisse schwierig gestaltet.

Bei Betrachtung der Organ- und Muskelgewichte zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Antibiose-Gruppe und den unbehandelten Schlaganfall-Tieren, was die Beobachtung unterstützt, dass die fettfreie Masse beider Gruppen sich im Versuchsverlauf ähnlich entwickelte. Analog zur Schlaganfall-Gruppe ging die Reduktion der fettfreien Masse auch bei den antibiotisch behandelten Tieren mit einer Verringerung des Gesamtwassers einher, sodass ein Einfluss dieser Komponente auf die Veränderung des fettfreien Gewebes angenommen werden muss. Eine klare Beeinflussung der fettfreien Masse durch die antibiotische Behandlung ist nicht erkennbar, kann jedoch durch die vorliegenden Ergebnisse auch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Hierzu wäre eine Studie mit größeren Tierzahlen notwendig, um die Beeinflussung der Ergebnisse durch Ausreißer und Extremwerte zu reduzieren.

Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe

Diese Tiere wiesen einen signifikanten Verlust fettfreier Körpermasse am Tag 3 auf, jedoch ohne eine gleichzeitige Veränderung des Gesamtwassers.

Sonografie-Schlaganfall-Gruppe

Auch hier war eine Reduktion der fettfreien Masse am dritten Versuchstag nachweisbar, die im Vergleich zur Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe signifikant höher ausfiel. Wie auch bei den Tieren der Schlaganfall-Gruppe zeigte sich in diesem Fall gleichzeitig eine Verringerung der Wassermasse des Körpers.

Die am Versuchstag 3 präparierten Bauch- und Brusthöhlenorgane und Muskeln der Sonografie-Schlaganfall-Gruppe wiesen ein signifikant geringeres Gewicht auf als die der Sonografie-OP-Kontrolle. Die fettfreie Masse reduzierte sich folglich sowohl im Bereich der Organe als auch der Skelettmuskulatur.

Bei Betrachtung aller Resultate ist feststellbar, dass bereits durch die Kontroll-Operation ein Verlust fettfreier Masse ausgelöst wird. Dieser verstärkt sich jedoch im Falle einer zerebralen Ischämie – ob alleinig durch einen höheren Verlust von extra- und intrazellulärer und intravasaler Flüssigkeit oder zusätzlich durch eine Verringerung der Gesamtzellzahl oder fester Zellbestandteile, bleibt hierbei unklar. Zur näheren Untersuchung dieser Fragestellung scheinen histologische Untersuchungen von Skelettmuskel- und Organzellen sinnvoll.

5.3.3 Körperflüssigkeit

Kontroll-Gruppe, OP-Kontroll-Gruppe

Die Kontroll-Tiere zeigten keine signifikante Veränderung des Gesamtwassergehaltes über den Versuchszeitraum. Ein Einfluss äußerer Störfaktoren auf die Körperflüssigkeit kann folglich ausgeschlossen werden.

Auch die Gruppe mit Kontroll-Operation wies im Laufe des Versuches keine Veränderungen des Gesamtwassergehaltes auf. Da sich in Bezug auf die Differenz zur Ausgangsmessung an Tag 3 und Tag 7 ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisen ließen, kann geschlussfolgert werden, dass die Kontroll-Operation keinen messbaren Einfluss auf den Wasserhaushalt der Tiere hatte.

Schlaganfall-Gruppe

Die Tiere mit zerebraler Ischämie zeigten im Gegensatz zur OP-Kontroll-Gruppe eine signifikante Reduktion des Gesamtwassergehaltes am Tag 3. Die Differenz zum Ausgangswert war zu diesem Zeitpunkt signifikant höher als bei der OP-Kontroll-Gruppe, die - wie bereits festgestellt - keinen Wasserverlust zeigte. Der Schlaganfall scheint somit eine Dehydratation in den ersten drei Tagen nach dem Insult auszulösen. Am Tag 7 hatte sich die Körperflüssigkeit der Tiere im Vergleich zu Tag 3 wieder erhöht, die Messwerte lagen hierbei zwar mit $p = 0,054$ knapp außerhalb des Signifikanzniveaus, jedoch bestand zu Versuchsende keine signifikante Differenz mehr zur Ausgangsmessung ($p = 0,08$), sodass zumindest von einer teilweisen Rehydratation ausgegangen werden kann. Fundiert wird diese Annahme durch den Vergleich der Differenzen des Körperwassers mit der OP-Kontroll-Gruppe ohne Dehydratation zu Versuchsende, wobei keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen mehr feststellbar waren.

Die vorliegenden Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass die zerebrale Ischämie zu einer kurzfristigen Dehydratation führt, welche innerhalb einer Woche nach Insult reversibel ist.

Die Ursache für die Reduktion des Gesamtwassers kann in einer veränderten Trinkwasseraufnahme, einem gesteigerten Verlust von Körperflüssigkeit oder in einer Kombination beider Faktoren bestehen. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich die Wasseraufnahme analysiert, daher kann über den Flüssigkeitsverlust keine Aussage getroffen werden.

Verglichen mit der OP-Kontroll-Gruppe nahmen die Schlaganfall-Tiere am Tag 3 des Versuchs signifikant weniger Wasser zu sich. Die Dehydratation der Schlaganfall-Gruppe am Tag 3 wird folglich unter anderem durch reduzierten Trinkwasserkonsum ausgelöst. Zwar wurden die Veränderungen der Wasseraufnahme der Tiere mit zerebraler Ischämie über den gesamten Versuchszeitraum mit einem p-Wert von 0,056 knapp als nicht signifikant eingestuft, jedoch könnte für diesen Umstand ein hoher Standard-Fehler ausschlaggebend sein, der mit 30,2g/kg am Tag 3 und mit 60,7g/kg am Tag 7 rund ein Drittel des jeweiligen Messwertes betrug. Zu Versuchsende, dem Zeitpunkt der Normalisierung des Gesamtwassers im Gewebe der Schlaganfall-Tiere, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede mehr im Vergleich zu OP-Kontroll-Gruppe. Die Normalisierung des Trinkwasserkonsums zu Versuchsende scheint somit an der körperlichen Rehydratation beteiligt zu sein.

Antibiose-Gruppe

Der Gesamtwassergehalt der antibiotisch behandelten Tiere war am dritten Versuchstag im Vergleich zur Ausgangsmessung signifikant geringer. Die anschließende Zunahme der Körperflüssigkeit führte dazu, dass zu Versuchsende keine signifikante Differenz mehr zum Ausgangswert bestand. Die Entwicklung des Wasserhaushalts der Tiere über den Versuchsverlauf glich somit der der Schlaganfall-Gruppe. Auch die relativen Differenzen des Gesamtwassergehaltes an Tag 3 und Tag 7 wichen nicht signifikant von den bei der Schlaganfall-Gruppe beobachteten Werten ab.

Bezüglich der Ursachen für den Verlust von Flüssigkeit wurde auch in dieser Gruppe die Trinkwasseraufnahme analysiert. Sowohl der Verlauf als auch das Ausmaß der Reduktion der Wasseraufnahme war mit den Werten der Schlaganfall-Gruppe vergleichbar (s. Kapitel „Wasseraufnahme“), wobei auch hier hohe Standardfehler die Interpretation der Ergebnisse schwierig gestalten. Ein Einfluss der Enrofloxacin-Behandlung auf den Wasserhaushalt der Versuchstiere ist anhand der vorliegenden Daten nicht nachzuweisen.

Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe

Diese Gruppe zeigte keine Veränderungen des Gesamtkörperwassers über den Versuchszeitraum. Entsprechend der Beobachtung bei der OP-Kontroll-Gruppe lässt dies die Schluss-

folgerung zu, dass der chirurgische Eingriff selbst keinen Einfluss auf die Menge der Körperflüssigkeit hatte.

Sonografie-Schlaganfall-Gruppe

Im Gegensatz zur Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe verringerte sich das Gesamtwasser im Körper dieser Tiere am Tag 3 signifikant. Der Direktvergleich beider Gruppen fundiert die bereits oben postulierte Annahme, dass die zerebrale Ischämie zu einer Dehydratation am dritten Tag nach dem Insult führte. Eine ursächliche Beteiligung der Trinkwasseraufnahme an diesem Effekt lässt sich jedoch für die Sonografie-Schlaganfall-Gruppe nicht nachweisen, da bei beiden Sonografie-Gruppen keine signifikante Reduktion des Wasserkonsums im fraglichen Zeitraum stattfand. Die Messergebnisse lassen folglich vermuten, dass auch ohne signifikante Einschränkung der Trinkwasseraufnahme eine Dehydratation nach Schlaganfall stattfindet. Dies widerspricht den Beobachtungen bei den operierten Gruppen ohne zusätzliche Isofluran-Narkose, die jedoch aufgrund der unterschiedlichen Narkosebelastung nicht mit den Sonografie-Gruppen vergleichbar sind. Da für alle Gruppen bezüglich der Wasseraufnahme hohe Standardfehler zu verzeichnen waren, wäre eine Untersuchung mit stärkerer Gruppengröße unter Umständen hilfreich, um den Einfluss von Extremwerten zu verringern. Ebenso könnte der Vergleich von Tieren mit Wasserzugang *ad libitum* und einer weiteren Gruppe mit kontrollierter Wasserversorgung durch eine Ernährungssonde weitere Aufschlüsse zum Thema des Einflusses der Wasseraufnahme auf die Dehydratation nach Schlaganfall liefern.

5.3.4 Zusammenfassung zu den Veränderungen der Körpermasse

Zusammenfassend verursachte der Schlaganfall einen deutlichen Gewichtsverlust mit einer nachfolgend unregelmäßig verlaufenden Gewichtsregeneration. Verursacht wurden die Veränderungen des Körpergewichtes hauptsächlich durch eine Abnahme der Fettmasse, der fettfreien Masse sowie im Unterschied zur OP-Kontroll-Gruppe auch durch eine Verringerung der Körperflüssigkeit. Die anschließende Gewichtsregeneration beruhte im Wesentlichen auf einer Erhöhung der Fettmasse, während die fettfreie Masse hieran nicht beteiligt war und die Rolle der Körperflüssigkeit nicht eindeutig geklärt werden konnte.

5.4. Parameter der Lebensqualität

5.4.1 Futteraufnahme

Kontroll-Gruppe

Die Kontroll-Tiere zeigten keine signifikanten Veränderungen der Futteraufnahme über den Versuchszeitraum, somit können Störeinflüsse durch das allgemeine Versuchsprozedere auf die Nahrungsaufnahme ausgeschlossen werden.

OP-Kontroll-Gruppe

Auch hier waren gruppenintern keine signifikanten Unterschiede der aufgenommenen Nahrungsmenge im Versuchsverlauf zu beobachten. Im Widerspruch hierzu steht die Beobachtung, dass die OP-Kontroll-Gruppe am Tag 3 des Versuchs eine im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant erhöhte Nahrungsaufnahme zeigte. Diese Werte beziehen sich auf die Änderung der Futteraufnahme im Vergleich zum Ausgangswert in g/kg. Ein Vergleich der Absolutwerte in g ist in dieser Arbeit nicht möglich, da das unterschiedliche Ausgangsgewicht der Tiere bei der Futteraufnahme berücksichtigt werden muss. Weitere Untersuchungen mit einheitlicher initialer Körpermasse wären zur Abklärung sinnvoll.

Schlaganfall-Gruppe

In der Schlaganfall-Gruppe ließ sich eine signifikante Erhöhung der Nahrungsaufnahme am Tag 7 in Vergleich zu Tag 3 nachweisen. Verglichen mit der Nahrungsaufnahme vor dem Schlaganfall war nach der Operation weder nach drei noch nach sieben Tagen eine Abweichung zu verzeichnen. So ergab der Direktvergleich der Schlaganfall- mit der OP-Kontroll-Gruppe bezüglich der Änderung der aufgenommenen Futtermenge ebenfalls keine signifikanten Unterschiede an Tag 3 und Tag 7. Da die Berechnung der Werte in g/kg bezogen auf den Ausgangswert erfolgte und die Tiere im Versuchsverlauf ihr Gewicht veränderten, wäre auch hier wie bei der oben diskutierten Diskrepanz zwischen Kontroll- und OP-Kontroll-Gruppe eine Untersuchung der Futteraufnahme an Tieren mit einheitlichem Ausgangsgewicht anhand absoluter Werte aussagekräftiger. Es war jedoch eine Tendenz zu reduzierter Futteraufnahme am Tag 3 nach dem Schlaganfall im Vergleich zu den OP-Kontroll-Tieren zu beobachten. In einer weiterführenden Studie der Arbeitsgruppe mit höheren Tierzahlen konnte diese Tendenz als signifikant verifiziert werden [89]. Eine reduzierte Nahrungszufuhr käme demnach als Ursache für den Verlust von Körpermasse nach dem Schlaganfall in Betracht. Jedoch wurde im selben Rahmen auch der Einfluss einer hochkalorischen Sondenernährung untersucht. Diese konnte den Verlust von Körpergewicht, Fettmasse und Muskelmasse nicht kompensieren [89]. Die verringerte Nahrungsaufnahme ist daher als ursächlicher Faktor für

die Reduktion dieser Parameter nicht wahrscheinlich. Allerdings könnte sie als Zeichen eines reduzierten Allgemeinbefindens nach dem Schlaganfall gewertet werden.

Antibiose-Gruppe

Die Tiere der Antibiose-Gruppe zeigten im Versuchsverlauf keine signifikante Veränderung der Futteraufnahme. Der bei den unbehandelten Tieren beobachtete Anstieg der Nahrungsaufnahme von Tag 3 zu Tag 7 ließ sich bei den antibiotisch versorgten Mäusen nicht beobachten. Der Einfluss der antibiotischen Behandlung auf die Nahrungsaufnahme im Gesamtversuchsverlauf kann jedoch als gering bewertet werden, da zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zur Schlaganfall-Gruppe bezüglich der Änderung der aufgenommenen Futtermenge im Vergleich zum Versuchsbeginn nachweisbar war.

Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe

Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der aufgenommenen Futtermenge von Tag 0 zu Tag 3. Dies steht im Gegensatz zu den bei der OP-Kontroll-Gruppe beobachteten Ergebnissen, wonach sich die Futteraufnahme nach dem chirurgischen Eingriff nicht veränderte bzw. eher positive Abweichungen zeigte. Eine erhöhte Stressbelastung mit einhergehender Reduktion der Nahrungsaufnahme durch die zusätzliche Narkose der Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe kommt als Ursache für diese Unterschiede in Betracht. Aus diesem Grund können beide Gruppen nicht direkt miteinander verglichen werden.

Sonografie-Schlaganfall-Gruppe

Diese Gruppe wiederum zeigte keine Veränderung der Futteraufnahme im Versuchsverlauf. Obwohl die Sonografie-OP-Kontroll-Tiere ihre Nahrungsaufnahme von Tag 0 zu Tag 3 nachweislich reduzierten, fanden sich beim Vergleich der Futteraufnahme in Relation zur Ausgangsmessung zwischen beiden Gruppen keine Unterschiede. Eine ausführliche Betrachtung der Absolutwerte liefert für diese Beobachtung eine mögliche Erklärung: Die Tiere mit Schlaganfall wiesen zwar eine stärkere Reduktion der aufgenommenen Futtermenge auf (von 217,7 g/kg auf 172,2 g/kg, entsprechend -20,9 %) als die Mäuse mit Kontroll-Operation (von 225,9 g/kg auf 202,9 g/kg, entsprechend -10,2 %), jedoch auch einen verhältnismäßig hohen Standardfehler am Tag 3 (24,0 g/kg). Daher lässt sich für die tendenziell reduzierte Futteraufnahme der Sonografie-Schlaganfall-Gruppe keine Signifikanz nachweisen. Eine Untersuchung mit stärkerer Gruppengröße wäre im Hinblick auf die Präzision der Berechnung von Vorteil. Da in dieser Arbeit keine Differenzen zwischen den Tieren mit und ohne Schlaganfall beider Ultraschall-Gruppen nachgewiesen werden konnten, scheint sich auch hier die Schlussfolgerung zu bestätigen, dass die Futteraufnahme eine untergeordnete Relevanz für den nach Schlaganfall beobachteten Gewichtsverlust hat.

5.4.2 Wasseraufnahme

Kontroll-Gruppe

Die Kontroll-Tiere veränderten ihre Wasseraufnahme über den Versuchszeitraum nicht signifikant. Der Einfluss äußerer Störfaktoren auf die Wasserzufuhr kann somit ausgeschlossen werden.

OP-Kontroll-Gruppe

Die Tiere mit Kontroll-Operation zeigten am dritten Versuchstag eine signifikant reduzierte Wasseraufnahme. Da die OP-Kontroll-Gruppe ihre Wasseraufnahme im weiteren Versuchsverlauf nicht signifikant steigerte, war zu Versuchsende eine deutlich geringere Wasseraufnahme zu verzeichnen als bei der Ausgangsmessung. Es bestand jedoch zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zur Kontroll-Gruppe beim Vergleich der Werte in Relation zur Ausgangsmessung. Die Kontroll-Operation löste offenbar eine dauerhafte Verringerung der Wasseraufnahme aus, die jedoch vom Ausmaß her so gering war, dass sie sich nicht von den Werten der Kontroll-Gruppe unterschied.

Schlaganfall-Gruppe

Rechnerisch veränderten die Tiere mit zerebraler Ischämie ihren Trinkwasserkonsum über den Versuchszeitraum nicht signifikant. Da der p-Wert jedoch mit 0,056 nah am Signifikanzniveau liegt, ist eine genauere Betrachtung der absoluten Zahlen sinnvoll. So reduzierte die Schlaganfall-Gruppe ihre Trinkwasseraufnahme von Tag 0 auf Tag 3 von 257 g/kg auf 107 g/kg, während sich am Tag 7 eine Erhöhung auf 222 g/kg einstellte. Da mit 30 g/kg am Tag 3 und 61 g/kg am Tag 7 jedoch der Standardfehler jeweils bei rund 28 % des Durchschnittswertes lag, ist eine Signifikanz rechnerisch schwer nachzuweisen. Tendenziell kann jedoch analog zur Entwicklung der OP-Kontroll-Gruppe eine Reduktion des Trinkwasserkonsums vermutet werden. Beim Direktvergleich der beiden Gruppen am Tag 3 zeigte sich, dass die Tiere mit Schlaganfall ihren Trinkwasserkonsum signifikant stärker einschränkten als die Mäuse mit reiner Kontroll-Operation. Der Schlaganfall hat somit offenbar eine reduzierte Trinkwasseraufnahme zur Folge, die über den geringfügigen Effekt der Kontroll-Operation hinausgeht.

Am Tag 7 waren hingegen keine Unterschiede zur OP-Kontroll-Gruppe mehr nachweisbar.

Offenbar war die reduzierte Wasseraufnahme nach Schlaganfall innerhalb des Versuchszeitraums reversibel. Die Messung der Körperzusammensetzung ergab analog zur Trinkwasseraufnahme einen reduzierten Wassergehalt der Schlaganfall-Gruppe am Tag 3 im Vergleich zur OP-Kontroll-Gruppe. Am Tag 7 war der Körperwassergehalt der Schlaganfall-Gruppe

wieder mit dem der OP-Kontroll-Tiere vergleichbar, was sich ebenfalls mit den Ergebnissen der Wasseraufnahme deckt. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Trinkwasseraufnahme und dem Wassergehalt im Körper der Versuchstiere scheint somit wahrscheinlich.

Antibiose-Gruppe

Für diese Gruppe ließ sich keine signifikante Veränderung der aufgenommenen Wassermenge im Versuchszeitraum nachweisen ($p = 0,18$). Diese Entwicklung unterscheidet sich von der der Schlaganfall-Gruppe. Im Direktvergleich bestanden jedoch zu keinem Zeitpunkt Differenzen im Ausmaß der Veränderung des Trinkwasserkonsums zwischen beiden Gruppen, wobei hier sehr hohe Standardfehler von mehr als 50 % der Messwerte am Tag 7 eine Rolle gespielt haben dürften. Der Einfluss der Antibiose auf den Trinkwasserkonsum nach Schlaganfall ist mit den vorliegenden Daten nicht eindeutig einschätzbar. Eine Untersuchung mit stärkerer Gruppengröße wäre hierzu notwendig, um die Auswirkungen von Extremwerten zu minimieren.

Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe und Sonografie-Schlaganfall-Gruppe

Beide Gruppen zeigten keine signifikanten Veränderungen der Trinkwasseraufnahme von Tag 0 auf Tag 3. Jedoch muss auch in diesem Fall das Vorliegen eines hohen Standardfehlers am Tag 3 von rund 37 % des Durchschnittswertes im Fall der Sonografie-Schlaganfall-Gruppe berücksichtigt werden. Es ließen sich darüber hinaus auch keine Differenzen zwischen beiden Gruppen nachweisen.

Zusammenfassend sind die Daten der Trinkwasseraufnahme durch hohe Standardfehler bei einem Großteil der untersuchten Gruppen nur sehr eingeschränkt auswertbar. Neben der geringen Tierzahl liegt eine mögliche Ursache hierfür in der Messmethodik. Da für die Datengewinnung Nippelflaschen mit Unterdruckventil verwendet wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Trinkwasser durch bloße Berührung der Nippelröhrchen mit den Pfoten, anderen Körperteilen oder Käfiginventar bzw. durch Tropfen entweichen konnte, ohne tatsächlich von den Tieren als Trinkwasser genutzt worden zu sein. Neben der Erhöhung der Tierzahl sollten daher zur genaueren Untersuchung Trinkflaschen mit Hebelventil oder vergleichbarer Einrichtung verwendet werden, um das Entweichen ungenutzten Wassers aus den Flaschen als Fehlerquelle zu verringern.

5.4.3 Aktivität

Kontroll-Gruppe

Die spontane Aktivität der Tiere ohne Operation veränderte sich über den Versuchszeitraum nicht signifikant. Äußere Störfaktoren mit Einfluss auf die Spontanaktivität können somit ausgeschlossen werden.

OP-Kontroll-Gruppe

Im Gegensatz zur Kontroll-Gruppe reduzierten die Tiere mit Kontroll-Operation ihre Aktivität am dritten Versuchstag im Vergleich zum Versuchsbeginn nachweislich ($p = 0,001$). Die nachfolgende Steigerung der Spontanbewegung von Tag 3 zu Tag 7 sowie der Vergleich zwischen Versuchsbeginn und -ende lagen knapp oberhalb des Signifikanzniveaus (p -Wert jeweils 0,07). Da die relative Differenz zum Ausgangswert zwischen der Kontroll- und der OP-Kontroll-Gruppe nicht signifikant variierte, scheint die Kontroll-Operation nur einen geringen negativen Einfluss auf die Aktivität der Tiere zu haben. Welche Ursachen diesem Effekt zu Grunde liegen, ist jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit. Denkbar wären hier beispielsweise postoperative Stress-, Schmerz- und Angstzustände.

Schlaganfall-Gruppe

Die Tiere mit zerebraler Ischämie wiesen keine signifikanten Veränderungen der Aktivität über den Versuchszeitraum auf. Der negative Effekt der Operation auf die Spontanaktivität scheint folglich durch die zerebrale Ischämie aufgehoben zu werden. Der Vergleich der relativen Werte zwischen der Schlaganfall- und der OP-Kontroll-Gruppe an Tag 3 und 7 war nicht signifikant, obgleich die OP-Kontroll-Gruppe ihre Aktivität deutlich stärker reduzierte ($-51,3 \pm 5,5 \%$; im Gegensatz zur Schlaganfall-Gruppe mit $-27,3 \pm 12,2 \%$). Der hohe Standardfehler der Messwerte der Schlaganfall-Tiere führte hierbei evtl. zum Ausbleiben des Signifikanznachweises. In einer weiterführenden Studie der Arbeitsgruppe wurden nicht nur die Durchschnittswerte der Aktivität, sondern auch zeitliche Bewegungsmuster analysiert [89]. Die Werte der Mäuse mit Schlaganfall lagen dabei am Tag 3 fast kontinuierlich über dem Niveau der OP-Kontroll-Gruppe [89]. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch in einer Untersuchung von Winter *et al.* beobachtet [91]. Hier wurden Mäuse mit Kontroll-Operation und MCAO-Operation acht bis zehn Wochen nach dem Eingriff auf Aktivität und Angstverhalten hin untersucht, wobei sich herausstellte, dass die Tiere mit Schlaganfall deutlich aktiver und ängstlicher waren als die Mäuse ohne zerebrale Ischämie [91]. Im vorliegenden Versuch zeigten die Schlaganfall-Tiere nach sieben Tagen mit $-29,6 \pm 12,5 \%$ eine vergleichbare Entwicklung der Aktivität wie die OP-Kontroll-Gruppe ($-26,9 \pm 9,7 \%$). Der Schlaganfall führte also hier scheinbar nur kurzfristig zu einer relativen Stimulation der spontanen Bewegung.

Über die Ursachen hierfür können mit den vorliegenden Daten jedoch keine Aussagen getroffen werden.

Antibiose-Gruppe

Auch in dieser Gruppe war keine Änderung der spontanen Aktivität über den Versuchszeitraum nachweisbar. Ein Unterschied zur Schlaganfall-Gruppe bezüglich der Veränderung der Aktivität im Vergleich zur Ausgangsmessung bestand zu keinem Zeitpunkt.

Die Enrofloxacin-Behandlung scheint somit keinen Einfluss auf die Aktivität nach dem Schlaganfall zu haben. Eine bakterielle Infektion mit Enrofloxacin-empfindlichen Erregern ist als Ursache für die Stimulation der Spontanbewegung nach dem Schlaganfall als unwahrscheinlich anzusehen. Infektionen anderer Genese können jedoch ursächlich nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe

Diese Gruppe wies eine deutlich reduzierte spontane Aktivität am dritten Versuchstag auf, was sich mit den bei der OP-Kontroll-Gruppe beobachteten Ergebnissen deckt und den negativen Einfluss der Kontroll-Operation auf die Bewegungsaktivität der Tiere untermauert.

Sonografie-Schlaganfall-Gruppe

Hier zeigte sich keine Veränderung der Aktivität. Es bestehen analog zu den oben diskutierten Gruppen keine signifikanten Differenzen beim Vergleich der relativen Veränderung über den Versuchszeitraum zwischen der Sonografie-OP-Kontroll- und der Sonografie-Schlaganfall-Gruppe. Tendenziell war jedoch die Aktivität der Tiere mit Kontroll-Operation mit $-54,3 \% \pm 4,9 \%$ deutlich stärker reduziert als die der Tiere mit Schlaganfall ($-9,2 \% \pm 16,4 \%$). Auch diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Tiergruppen ohne echokardiografische Untersuchung.

5.5 Organgewichte

Kontroll-, OP-Kontroll-, Schlaganfall- und Antibiose-Gruppe

Bei den am Tag 7 entnommenen Proben ließen sich keine Differenzen zwischen den Organgewichten der verschiedenen Gruppen feststellen – im Hinblick auf die relativ homogenen Ergebnisse der Messung der Körpermasse zu diesem Zeitpunkt eine logische Konsequenz. Da die Tiere zu Versuchsende gruppenübergreifend eine Annäherung an ihr Ausgangsgewicht aufwiesen und auch keine Unterschiede im Vergleich der Änderung des Körpergewichtes zwischen den Gruppen bestanden, waren Differenzen einzelner Organgewichte hier nicht

zu erwarten. Zu bemerken ist jedoch, dass trotz ausbleibendem Signifikanznachweis für die Gewichte aller Organe der Gruppen mit Schlaganfall (Schlaganfall und Antibiose) geringere Messwerte zu verzeichnen waren als bei den Tieren ohne zerebrale Ischämie (Kontrolle und OP-Kontrolle). Da für die Tiere mit Schlaganfall im Versuchsverlauf ebenfalls der höchste Gewichtsverlust nachgewiesen wurde, deutet dies auf eine Organbeteiligung bei der Reduktion der Körpermasse hin. Eine Entnahme der Organe zum Zeitpunkt des stärksten Gewichtsverlustes am Tag 3 kann diesbezüglich eindeutige Ergebnisse liefern. Eine solche Untersuchung erfolgte bei den Sonografie-Gruppen (s. u.).

Sonografie-Schlaganfall- und Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe

Die am Tag 3 entnommenen Organe der Tiere mit Schlaganfall wiesen durchgehend ein signifikant geringeres Gewicht auf als die jeweiligen Körperteile der Tiere mit Kontroll-Operation. Zu diesem Zeitpunkt zeigte die Sonografie-Schlaganfall-Gruppe auch einen signifikant höheren Gewichtsverlust als die Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe. Hierbei war offensichtlich eine Reduktion der Masse von Milz, Leber, Nieren und Herz beteiligt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Gewichtsverlust nach einem Schlaganfall neben Speicherfettgewebe und Skelettmuskulatur auch die inneren Organe betrifft. Welche Zellarten hierbei insbesondere betroffen sind, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht ausführlicher untersucht. Histologische Analysen der einzelnen Organe könnten insbesondere darüber Aufschluss geben, ob bestimmte Zellarten besonders stark von dem Masseverlust betroffen sind. Mittels chemischer Verfahren müsste überdies geklärt werden, ob eine Verringerung des intra- und extrazellulären Flüssigkeitsgehaltes an der Reduktion der Organmasse beteiligt war, da im vorliegenden Versuch eine Abnahme der Körperflüssigkeit bei den Tieren mit Schlaganfall nachgewiesen wurde.

5.6 Skelettmuskulatur

Kontroll-, OP-Kontroll-, Schlaganfall- und Antibiose-Gruppe

Am Tag 7 unterschieden sich die Gewichte des *M. gastrocnemius* auf beiden Körperseiten zwischen den Gruppen nicht signifikant. Tendenziell war zwar beidseitig ein verringertes Muskelgewicht seitens der OP-Kontroll-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe zu verzeichnen. Auch die Schlaganfall-Tiere wiesen eine Tendenz zu einem geringeren Muskelgewicht in Relation zur OP-Kontroll-Gruppe auf, jedoch konnte für diese Daten keine Signifikanz nachgewiesen werden.

Diese Beobachtung deckt sich jedoch mit den Ergebnissen der Erhebung der fettfreien Masse am Tag 7. Als Bestandteil der fettfreien Körpermasse, die am Tag 7 keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen mehr aufwies, unterscheiden sich auch die Gewichte der

Mm. gastrocnemii zu diesem Zeitpunkt nicht. Die Entwicklung der Muskelgewichte im Versuchsverlauf *in vivo* kann mit dem vorliegenden Versuchsaufbau nicht abschließend geklärt werden. Plausibel scheint jedoch eine mit dem Verlust an fettfreier Masse korrelierende Reduktion der Muskelmasse bei den OP-Kontroll-Tieren und eine darüber hinausgehende Verringerung bei den Mäusen mit Schlaganfall (Schlaganfall und Antibiose), was sich in den oben genannten Tendenzen bei den Muskelendgewichten widerspiegelt. Eindeutigere Ergebnisse zum Muskelabbau fanden sich in einer weiterführenden Untersuchung der Arbeitsgruppe unter Einbeziehung weiterer Tiergruppen in die Berechnungen. Hier konnte ein signifikant reduziertes Muskelgewicht der rechten und linken Hintergliedmaße der Schlaganfall-Gruppe gegenüber der OP-Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden [89]. Ein Unterschied zwischen dem Gewicht der *Mm. gastrocnemii* der ipsi- und kontralateralen Seite des Schlaganfalls fand sich weder in der vorliegenden Arbeit noch in den Ergebnissen der Untersuchung von Springer *et al.* [88]. Dies deutet auf eine Muskelreduktion unabhängig von der schlaganfallbedingten Lähmung hin. Bezüglich der Verhältnisse der Muskelmassen am Tag 3, also zum Zeitpunkt des stärksten Verlustes fettfreier Masse, bieten die Daten der Sonografie-Gruppen Aufschluss.

Sonografie-OP-Kontrolle vs. Sonografie-Schlaganfall

Die Tiere mit Schlaganfall wiesen beidseits ein geringeres Muskelgewicht auf als die Tiere mit Kontroll-OP. Dies lässt vermuten, dass am dritten Tag nach dem Insult zum Zeitpunkt der stärksten Gewichtsreduktion eine Abnahme der Muskelmasse unabhängig von der schlaganfallbedingten Lähmung der kontralateralen Körperseite erfolgte. Anhand der Ergebnisse der Infarktgrößenbestimmung und des neurologischen Status ist von einer Lähmung der kontralateralen Körperseite zu diesem Zeitpunkt auszugehen. Die Minder- oder Nichtbenutzung einer Muskelpartie kann zu einer Inaktivitätsatrophie führen. Diese würde als Ursache für den rechtsseitigen Muskelschwund der Tiere in Frage kommen. Jedoch wiesen auch die Muskeln der ungelähmten Körperseite einen Masseverlust auf, wobei keine signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen dem rechten- und linken *M. gastrocnemius* bestanden. Ähnliche Ergebnisse fanden auch Choe *et al.* in einem Tierversuch mit Ratten. Dabei wurden sieben Tage nach einem ischämischen Schlaganfall reduzierte Muskelmassen in beiden Hintergliedmaßen der Versuchstiere festgestellt, wobei Muskelfasern vom Typ I stärker betroffen waren als Fasern vom Typ II [92]. Da in dieser Arbeit keine histologischen Untersuchungen der Muskeln vorgenommen wurden, kann nicht spezifiziert werden, in welchem Ausmaß die verschiedenen Zellen und Zellbestandteile am Verlust der Muskelmasse beteiligt waren. Wie auch bei den Organen muss hierbei eine Reduktion des Flüssigkeitsgehaltes im Muskel als Ursache in Betracht gezogen werden, da der Gehalt an Körperflüssigkeit zum Entnahmezeitpunkt der Muskeln reduziert war. Eine verstärkte Apoptose-Rate und eine ge-

steigerte Proteolyse kommen ebenfalls als Ursachen für die Reduktion der Muskelmasse in Frage und werden im nachfolgenden Abschnitt diskutiert.

5.7 Caspase-3-Aktivität

Kontrolle vs. OP-Kontroll-Gruppe

Linksseitig war für die OP-Kontroll-Gruppe eine erhöhte Caspase-3-Aktivität verglichen mit der Kontroll-Gruppe nachweisbar. Die rechte Hintergliedmaße zeigte keine analoge Signifikanz. Da sich hingegen keine Differenzen zwischen der rechten und linken Hintergliedmaße bezüglich der Caspase-3-Aktivität nachweisen ließen, kann mit den vorliegenden Daten nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die erhöhte Enzymaktivität ausschließlich einseitig besteht. So liegt bei der OP-Kontroll-Gruppe mit einem Wert von 14 ± 5 U/l im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (5 ± 3 U/l) auch auf der kontralateralen Seite der zerebralen Ischämie ein fast dreifach erhöhter Wert für die Caspase-Aktivität, jedoch ohne Signifikanznachweis, vor. Untersuchungen mit stärkerer Gruppengröße könnten einen genaueren Aufschluss über die ipsi- und kontralaterale Caspase-3-Aktivität nach der Kontroll-Operation geben. Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass bereits durch den bloßen chirurgischen Eingriff ohne Induktion einer zerebralen Ischämie eine verstärkte Apoptose der Skelettmuskulatur ausgelöst wird.

OP-Kontrolle vs. Schlaganfall

Die Caspase-3-Aktivität war bei der Schlaganfall-Gruppe im Vergleich zur OP-Kontroll-Gruppe im rechten *M. gastrocnemius* signifikant erhöht. Da Caspase-3 einen entscheidenden Faktor der Apoptose-Kaskade darstellt, ist dieser Umstand beweisend für einen forcierten programmierten Zelltod in der Skelettmuskulatur der kontralateralen Körperseite infolge zerebraler Ischämie. Auch linksseitig waren die Werte der Caspase-3-Aktivität bei den Tieren mit Schlaganfall mehr als doppelt so hoch wie bei der OP-Kontroll-Gruppe, jedoch war hier keine Signifikanz nachweisbar ($p = 0,1$). Ursächlich dafür könnte unter anderem ein verhältnismäßig hoher Standardfehler der Schlaganfall-Gruppe sein, welcher rund 21 % der Durchschnittsaktivität ausmachte. Darüber hinaus wurde aufgrund inhomogener Varianzverteilung zur Berechnung der linksseitigen Enzymwerte der Kruskal-Wallis- mit anschließendem Tamhane-Test verwendet, eine konservativere Testmethode als der für die rechte Körperseite benutzte Kombination aus *One-Way* ANOVA und Bonferroni. Weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe unter Einbeziehung größerer Tierzahlen ergaben auch linksseitig eine signifikant erhöhte Caspase-3-Aktivität nach dem Schlaganfall [89]. Diese Resultate weisen auf eine verstärkte Apoptose-Rate als Ursache für den Muskelschwund der kontra- und ipsilateralen Körperseite nach dem Schlaganfall hin. Springer *et al.* konnten überdies ei-

ne Korrelation zwischen der Infarktgröße und der Caspase-3-Aktivität im kontralateralen, jedoch nicht im ipsilateralen *M. gastrocnemius* nachweisen [89]. Diese Ergebnisse suggerieren einen direkten Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der zerebralen Ischämie und der Apoptose-Rate in der Skelettmuskulatur der gelähmten Körperseite.

Antibiose vs. Schlaganfall

Es ließen sich weder rechts- noch linksseitig signifikante Unterschiede bezüglich der Caspase-3-Aktivität zwischen beiden Gruppen nachweisen, was darauf hinweist, dass der forcierte programmierte Zelltod in der Skelettmuskulatur nach Schlaganfall unabhängig von bakteriellen Infektionen mit Enrofloxacin-empfindlichen Erregern stattfindet. Versuchsbedingt können jedoch infektiöse Ursachen anderer Genese nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Sonografie-OP-Kontrolle vs. Sonografie-Schlaganfall

Die Caspase-3-Aktivität der *Mm. gastrocnemii* beider Gruppen wies sowohl rechts- als auch linksseitig vergleichbar hohe Werte auf, signifikante Unterschiede fanden sich weder zwischen den Gruppen noch beim Vergleich der beiden Gliedmaßen derselben Gruppe.

Während die oben diskutierten Gewebeprobe vom Tag 7 nach dem Insult deutlich niedrigere Enzymaktivitäten für die OP-Kontroll-Gruppen aufwiesen ($13,7 \pm 5,4$ U/l rechts; $20,7 \pm 3,4$ U/l links), lagen die Werte der am dritten Versuchstag untersuchten OP-Kontroll-Proben auf dem Niveau der Schlaganfall-Gruppen ($48,2 \pm 9,8$ U/l rechts; $57,6 \pm 7,6$ U/l links). Obwohl zum Zeitpunkt der Organentnahme signifikant verringertes Muskelgewicht an beiden Hintergliedmaßen der Sonografie-Schlaganfall-Gruppe gefunden wurde, zeigten die entsprechenden Muskeln keine Unterschiede in Bezug auf die Apoptose-Aktivierung. Folglich müssen andere Prozesse dem Muskelschwund zugrundeliegen. Ein reduzierter Flüssigkeitsgehalt der Muskeln als Folge der nachgewiesenen Dehydratation zum fraglichen Zeitpunkt muss hierbei in Betracht gezogen werden. Entsprechende Untersuchungen hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Auch ein verstärkter proteolytischer Abbau von Muskelmasse kommt als Ursache in Frage. Die diesbezüglichen Resultate im Abschnitt „Proteasomenaktivität“ sprechen jedoch nicht dafür.

Die oben genannten Differenzen der Ergebnisse der Caspase-3-Aktivität beider OP-Kontroll-Gruppen suggerieren überdies einen temporären Anstieg nach der Kontroll-OP in der Skelettmuskulatur beider Hintergliedmaßen unabhängig vom Vorliegen einer zerebralen Ischämie. Da die am Tag 3 getöteten Tiere aufgrund der zusätzlichen Isofluran-Narkose nicht direkt mit den übrigen untersuchten Gruppen verglichen werden können, ist diese Beobachtung nicht beweisend, könnte jedoch Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen darstellen, die den zeitlichen Verlauf der Caspase-3-Aktivität nach Schlaganfall detaillierter dokumentie-

ren. Dabei könnte die Hypothese überprüft werden, dass die im Skelettmuskel nachgewiesene Apoptose nicht ausschließlich auf die zerebrale Ischämie zurückzuführen ist, sondern von anderen inflammatorischen oder stressbedingten Stoffwechselprozessen ausgelöst und durch den Schlaganfall verstärkt bzw. verlängert wird. Ein Einfluss der Futtermittelaufnahme auf die Apoptose-Rate muss in Betracht gezogen werden. So fanden Springer *et al.* im Fall der Kontroll-Tiere tatsächlich eine Korrelation zwischen der Futtermittelaufnahme und dem *Insulin-like-growth-factor-1* (IGF-1), dessen Reduktion über eine Signalkaskade zur Aktivierung von Caspase-3 führen könnte [89]. Für alle übrigen Versuchsgruppen konnte ein derartiger Zusammenhang jedoch nicht gefunden werden. Der direkte Einfluss von IGF-1 auf die Caspase-Aktivierung wurde daher als unwahrscheinlich eingestuft [89].

5.8 Proteasomenaktivität

5.8.1 „Caspaselike“-Aktivität

Für keine der untersuchten Gruppen ließen sich Unterschiede bezüglich der Enzymaktivität zwischen der ipsi- und kontralateralen Körperseite feststellen.

Kontrolle, OP-Kontrolle, Schlaganfall und Antibiose

Beim Vergleich der am siebten Versuchstag entnommenen Gewebeproben der verschiedenen Gruppen waren keine signifikanten Differenzen nachweisbar, wobei die Werte der Tiere mit zerebraler Ischämie tendenziell höher ausfielen als die der Kontroll-Tiere und der OP-Kontroll-Gruppe. Eindeutigere Resultate fanden sich bei weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe Springer *et al.* [88] mit stärkeren Gruppengrößen. Hier wurde eine signifikant höhere Aktivität für das entsprechende Enzym in den Muskeln beider Hintergliedmaßen sieben Tage nach dem Schlaganfall nachgewiesen [88].

Diese Daten geben Hinweis auf eine verstärkte proteolytische Aktivität als Ursache für die Reduktion der Skelettmuskelmasse der ipsi- und kontralateralen Körperseite in Folge zerebraler Ischämie am Tag 7 nach dem Insult.

Interessanterweise korrelierte die „Caspaselike“-Aktivität in der oben genannten Untersuchung von Springer *et al.* vor allem kontralateral negativ mit der Infarktgröße [88]. Die Ursachen dieses Phänomens blieben ungeklärt. Die Ergebnisse sprechen jedoch für eine Herabregulierung der Proteasomenaktivität durch zerebrale Ischämie auf der gelähmten Körperseite.

Sonografie-OP-Kontrolle vs. Sonografie-Schlaganfall

Bei den am dritten Versuchstag entnommenen Proben war beidseits eine signifikant verringerte „*Caspaselike*“-Aktivität bei den Tieren mit Schlaganfall im Vergleich zur Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe nachweisbar.

Eventuell liegt dieser Beobachtung analog zu denen der Caspase-3-Aktivität eine zeitliche Einflusskomponente zu Grunde. Da bei den Sonografie-Gruppen der zusätzliche Narkose-Faktor berücksichtigt werden muss, kann anhand der ermittelten Daten jedoch keine zuverlässige Auswertung durch Vergleich der Resultate von Tag 3 und Tag 7 erfolgen. Auch hier wäre eine eingehende Untersuchung der temporären Abhängigkeit an Gruppen mit gleichen Behandlungsvoraussetzungen notwendig. Dem Verlust von Muskelmasse am Tag 3 nach dem Schlaganfall scheint jedoch keine erhöhte „*Caspaselike*“-Aktivität des Ubiquitin-Proteasomensystems zu Grunde zu liegen.

5.8.2 „*Chemotrypsinlike*“-Aktivität

Es ließen sich für keine Gruppe signifikante Unterschiede zwischen der Enzymaktivität im rechten und linken *M. gastrocnemius* finden.

Kontroll-, OP-Kontroll-, Schlaganfall- und Antibiose-Gruppe

Die Enzymaktivitäten der am Tag 7 entnommenen Muskelproben unterschieden sich weder rechts- noch linksseitig signifikant voneinander. Tendenziell zeigte die OP-Kontroll-Gruppe beidseits höhere Werte als die Kontroll-Gruppe, die in ihrem Ausmaß mit der Schlaganfall-Gruppe vergleichbar waren. Da die CT-L-Aktivität als initialer und auch limitierender Faktor für die Aktivierung des Ubiquitin-Proteasomensystems gilt, liefern die Ergebnisse tendenziell Hinweise auf eine solche Aktivierung am Tag 7 bei allen operierten Tieren, unabhängig von der Induktion eines Schlaganfalls. Der Effekt könnte hierbei durch den operativen Eingriff selbst ausgelöst werden. Für die genaue Klärung des Sachverhaltes ist eine Untersuchung mit stärkeren Gruppengrößen notwendig, um die Tendenzen präziser eruieren zu können. Auch in weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe fanden sich erhöhte CT-L-Aktivitäten beidseits nur gegenüber der Kontroll-Gruppe, hingegen nicht im Vergleich zu den Tieren der OP-Kontroll-Gruppe [88]. Mit einer zusätzlichen OP-Kontroll-Gruppe mit gleichzeitiger antibiotischer Behandlung könnte der Einfluss bakteriell bedingter Infektionen auf die Erhöhung der CT-L-Aktivität nach dem chirurgischen Eingriff untersucht werden.

Sonografie-OP-Kontrolle vs. Sonografie-Schlaganfall

Hier ließ sich für die linke Körperseite eine signifikant reduzierte Enzymaktivität bei den Tieren mit Schlaganfall nachweisen. Rechtsseitig war zwar eine vergleichbare Tendenz erkennbar, der Signifikanznachweis blieb jedoch aus. Da die Werte hier im Unterschied zur linken

Körperseite keine Varianzhomogenität aufwiesen, wurde eine konservativere Testmethode angewandt. Jedoch war die CT-L-Aktivität der Sonografie-OP-Kontroll-Gruppe linksseitig tendenziell auch höher als rechtsseitig, was bei den annähernd gleich hohen CT-L-Aktivitäten der Sonografie-Schlaganfall-Gruppe beidseitig zum Ausbleiben der Signifikanz rechtsseitig beigetragen haben kann. Offensichtlich war in Folge des Schlaganfalls die CT-L-Aktivität zumindest ipsilateral und tendenziell kontralateral am Tag 3 verringert, was den Beobachtungen der C-L-Aktivität mit vermuteter Herabregulierung der Proteasomenaktivität nach Schlaganfall entspricht, die Frage nach der Ursache des Verlustes an Muskelmasse zum selben Zeitpunkt jedoch weiterhin offen lässt.

5.8.3 „Trypsinlike“-Aktivität

Auch hier ließen sich für keine Gruppe signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Werten der rechten und linken *Mm. gastrocnemii* nachweisen.

Kontroll-, OP-Kontroll-, Schlaganfall- und Antibiose-Gruppe

Entsprechend den Resultaten der CT-L-Aktivität unterschieden sich die Trypsin-like-Aktivitäten der am Tag 7 entnommenen Muskelproben rechts- und linksseitig nicht signifikant voneinander. Auch die weitergehende Untersuchung der Arbeitsgruppe Springer *et al.* konnte lediglich linksseitig gegenüber der Kontroll-Gruppe erhöhte T-L-Aktivitäten für die OP-Kontroll-Tiere und die Schlaganfall-Gruppe nachweisen.

Sonografie-OP-Kontrolle vs. Sonografie-Schlaganfall

Die T-L-Aktivität der Schlaganfall-Gruppe war im linken *M. gastrocnemius* signifikant geringer als die der OP-Kontroll-Gruppe. Für den rechten Muskel konnte kein vergleichbares Resultat beobachtet werden. Dies entspricht den Beobachtungen, die im Abschnitt CT-L-Aktivität diskutiert wurden.

5.9 Zusammenfassung zum Muskelabbau

Ein beidseitiger schlaganfallbedingter Verlust von Muskelmasse konnte am Tag 3 nach dem Insult festgestellt werden. Für diesen Rückgang der Muskulatur konnten proteolytische Abbauprozesse durch das Ubiquitin-Proteasomensystem nicht als Ursache verifiziert werden. Vielmehr zeigten sich Hinweise auf eine verringerte Aktivität dieses Proteolyse-Weges.

Auch eine Steigerung der Apoptose-Rate durch Caspase-Aktivierung konnte für die betroffenen Muskeln zu diesem Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden.

Nach Auswertung aller Resultate bleibt die Frage nach der Ursache für den Muskelschwund am Tag 3 offen. Eine Beteiligung des Phagozyten-Lysosomensystems wurde nicht untersucht, sollte aber als Ursache für den kurzfristigen Verlust von Muskelmasse in Betracht gezogen werden. Einen weiteren Erklärungsansatz bietet die Dehydratation der Tiere am Tag 3, die einhergehend mit einer Reduktion von intra- und extrazellulärer Flüssigkeit ohne den Abbau von Muskelprotein oder ganzer Zellen durch Apoptose zu einer Verringerung der Muskelmasse geführt haben kann. Zur Spezifizierung der Ursachen des Muskelschwundes sind weiterführende Datenerhebungen mit histologischen, biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen der fraglichen Muskelpartien angezeigt.

Tendenzen für eine Schlaganfallbedingte beidseitige Reduktion der Skelettmuskulatur fanden sich auch am Tag 7 nach der Operation. Diese konnten durch Untersuchungen mit stärkerer Gruppengröße derselben Arbeitsgruppe verifiziert werden.

Eine Dehydratation als mögliche Ursache für den Muskelschwund war am Tag 7 im Gegensatz zu den am Tag 3 untersuchten Proben nicht zu verzeichnen. Hingegen fanden sich zu diesem Zeitpunkt eindeutige Beweise für eine ursächlich verstärkte Apoptose-Rate und auch eine teilweise Aktivierung von proteolytischen Prozessen im Rahmen des Ubiquitin-Proteasomensystems.

Die Ergebnisse des proteolytischen Abbauweges sind hierbei jedoch teilweise widersprüchlich. Es bedarf weiterer Untersuchungen mit stärkerer Gruppengröße und ausführlicheren histologischen und molekularbiologischen Analysen, um den Einfluss des Phagozyten-Lysosomensystems und den Mechanismus der vermuteten Herabregulierung des Ubiquitin-Proteasomensystems zu überprüfen.

5.10 Echokardiografie

Die Tiere der Sonografie-Schlaganfall-Gruppe wiesen ein signifikant geringeres Herzgewicht auf als die Sonografie-OP-Kontroll-Tiere. Der Schlaganfall hat folglich negative Auswirkungen auf das Gewicht der Herzmuskulatur. Da diese Muskelpartie keiner biochemischen Analyse unterzogen wurde, kann über die genaue Ursache für den Verlust von Herzmuskelmasse nur spekuliert werden. Denkbar wäre analog zum Skelettmuskel eine Austrocknung des Gewebes. Auch apoptotische oder proteolytische Prozesse müssen in Betracht gezogen werden. Ishikawa *et al.* fanden heraus, dass der ischämische Schlaganfall vom Absterben kardialer Myozyten begleitet wird [11], was als Ursache für einen Masseverlust des Herzmuskels plausibel erscheint. Zur genaueren Abklärung sind jedoch weiterführende Untersuchungen entsprechend den bereits im Abschnitt „Skelettmuskulatur“ diskutierten Verfahren notwendig.

Die Resultate der Echokardiografie der vorliegenden Studie suggerieren weitere negative Auswirkungen des Schlaganfalls auf die Herzfunktion: Bei den Tieren mit zerebraler Ischämie waren sowohl systolisch als auch diastolisch die Innenfläche und die Längsachse des linken Ventrikels verringert. Auch der enddiastolische Durchmesser der linken Herzkammer war geringer als bei den Tieren mit Kontroll-Operation. Diese Veränderungen sprechen für eine Reduktion des Ventrikelvolumens. Im Zusammenhang mit einer signifikant verringerten Herzfrequenz ($p = 0,0003$) ergab sich nach Schlaganfall am Tag 3 ein signifikant herabgesetztes Herzminutenvolumen. Die Wandstärke des Septums und des linken Ventrikels, die Gesamtmasse des linken Ventrikels, die Auswurfraction sowie die fraktionelle Verkürzung waren hingegen nach dem Schlaganfall nicht verändert. Somit wirkt sich die zerebrale Ischämie offensichtlich vorwiegend negativ auf die Ausdehnung des linken Ventrikels sowie die Herzfrequenz und infolgedessen das Herzminutenvolumen aus. Ursächlich für die verringerte Ausdehnung des Ventrikels kann ein generell reduziertes Blutvolumen im Körper sein, was durch die nachgewiesene Dehydratation der Tiere am Tag 3 wahrscheinlich ist. Genaue Messungen des Blutvolumens erfolgten in dieser Studie nicht. Die genauen ursächlichen Mechanismen für die reduzierte Herzfrequenz wurden nicht untersucht und bleiben in dieser Arbeit ungeklärt. Es kommen beispielsweise eine Störung der Funktion des Sinusknotens, eine sinuatriale Blockade oder ein atrioventrikulärer Block in Frage. Eine Untersuchung mittels EKG könnte Aufschluss über Störungen der elektrischen Erregungsüberleitung geben.

Zusammenfassung

Hintergrund

Der Schlaganfall ist das häufigste neurologische Erkrankungsbild und die zweithäufigste Todesursache weltweit, wobei die zerebrale Ischämie mit etwa 80 % die häufigste Form dieser Krankheit darstellt. Zu den Folgen bei überlebenden Patienten zählt neben körperlicher Behinderung durch Lähmungserscheinungen oftmals ein Gewichtsverlust mit Abnahme der Muskelmasse. Dieser Muskelschwund ist nicht auf die gelähmte Körperseite beschränkt und trägt zusätzlich zur Verminderung der Lebensqualität der Betroffenen bei. Obgleich sowohl in human- als auch in tiermedizinischen Studien der Gewichtsverlust als negativer Faktor für den Outcome des Schlaganfalls identifiziert wurde, existieren keine Untersuchungen über die grundlegenden Ursachen oder potentielle Therapieansätze.

Ziel

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung von ausgewählten Aspekten der Veränderungen der Körperzusammensetzung und der zu Grunde liegenden Mechanismen nach einem ischämischen Schlaganfall im Mausmodell. Im Speziellen sollte die Entwicklung der Skelettmuskulatur hinsichtlich kataboler Prozesse untersucht werden.

Methodik

Für die Studie wurde an Mäusen auf chirurgischem Wege durch Verschluss der mittleren Zerebralarterie (MCAO) ein Schlaganfall induziert. In den nachfolgenden sieben Tagen wurden die Körperzusammensetzung, das Gewicht, die Aktivität, der neurologische Status sowie die Futter- und Wasseraufnahme der Tiere ermittelt. Als Vergleich dienten unbehandelte Mäuse sowie eine Gruppe von Tieren mit chirurgischem Eingriff ohne Induktion eines Schlaganfalls und eine Gruppe mit Schlaganfall, die antibiotisch behandelt wurde. Somit konnten die Folgen des Schlaganfalls von denen des operativen Eingriffs und postoperativer bakterieller Infektionen mit Enrofloxacin-empfindlichen Erregern abgegrenzt werden. Anschließend wurden die Versuchstiere schmerzfrei getötet, die Organe sowie Muskelproben beider Hintergliedmaßen entnommen und deren Gewicht ermittelt. Als Maß für den Katabolismus im Skelettmuskel wurden die Proteasomen (Proteolyse)- und Caspase (Apoptose)-Aktivitäten ermittelt. Zusätzlich wurde der Einfluss des Gewichtsverlustes nach Schlaganfall auf die Herzfunktion untersucht. Hierzu wurde an einer separaten Tiergruppe am dritten Tag nach der Induktion des Schlaganfalls eine Echokardiografie durchgeführt, um kardiale Parameter wie die Auswurfraction, den Ventrikel-durchmesser und die Wandstärke zu bestimmen. Auch hier diente eine operierte Gruppe ohne Schlaganfall als Vergleich.

Ergebnisse

Am dritten Versuchstag zeigten die Tiere mit Schlaganfall einen deutlichen Gewichtsverlust. Das Fett- und fettfreie Gewebe sowie die Körperflüssigkeit waren im selben Zeitraum reduziert. Die Futterraufnahme der Schlaganfall-Gruppe war am Tag 3 nicht eindeutig verringert, die Wasseraufnahme hingegen war deutlich niedriger als bei der Vergleichsgruppe. Eine Änderung der spontanen Aktivität war nicht nachweisbar. Nach sieben Tagen hatte sich das Körpergewicht tendenziell noch nicht vollständig regeneriert. Die Gewichte der Bauchhöhlenorgane, des Herzmuskels und der Muskeln beider Hintergliedmaßen war am Tag 3 nach dem Schlaganfall deutlich reduziert. Zum selben Zeitpunkt waren die Herzfrequenz und das Herzminutenvolumen verringert. Am Tag 7 war noch eine Tendenz zu geringeren Organ- und Muskelgewichten im Vergleich zu den Tieren ohne zerebrale Ischämie zu erkennen. Am Tag 7 wurde eine erhöhte Caspase-3-Aktivität in der Muskulatur der Hintergliedmaße der kontralateralen Seite der zerebralen Ischämie gefunden. Auf der ipsilateralen Körperseite zeigte sich eine ähnliche Tendenz. Die antibiotisch behandelte Gruppe zeigte keine Abweichungen von der Schlaganfall-Gruppe.

Schlussfolgerung

Der Schlaganfall führte in den ersten 3 Tagen nach seiner Induktion zu einem Gewichtsverlust, von dem sowohl das Fettgewebe, die fettfreie Masse als auch die Körperflüssigkeit betroffen waren. Die Muskelmasse als Teil des fettfreien Gewebes war hierbei nicht ausschließlich auf der gelähmten Körperseite reduziert. Eine verringerte Futterraufnahme sowie veränderte körperliche Aktivität konnten als alleinige Ursachen für diese Veränderungen ausgeschlossen werden. Die Wasseraufnahme hingegen schien einen Einfluss auf die Entwicklung der Körperflüssigkeit zu haben. Es fanden sich Hinweise für eine beidseitige erhöhte Apoptose-Rate im Skelettmuskel, die für die Reduktion der Muskelmasse ursächlich sein könnte. Der Einfluss von proteolytischen Prozessen und Dehydratation auf die Entwicklung der Muskelmasse blieb ungeklärt. Die antibiotische Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Ergebnisse, somit können Infektionen mit Enrofloxacin-empfindlichen Bakterien als Ursache für die Veränderungen der Körperzusammensetzung ausgeschlossen werden. Infektionen anderer Genese sind aufgrund der Ergebnisse der klinischen Untersuchung der Tiere zwar als unwahrscheinlich anzusehen, jedoch kann ein Einfluss auf die Körperzusammensetzung in dieser Studie nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Der Schlaganfall hatte einen negativen Einfluss auf die Herzmuskelmasse und die Herzfunktion. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass ein ischämischer Schlaganfall unabhängig von der Nahrungsaufnahme und Bewegungsintensität nach dem Insult zur Abnahme der Fett- und Muskelmasse führt und sich darüber hinaus negativ auf die Herzfunktion auswirkt. Weiterführende Studien sind erforderlich, um die genauen Mechanismen zu klären, die zu diesen Effekten führen.

Summary

Catabolic alterations and their effects on skeletal and heart muscles after acute ischemic stroke in mice

Susanne Schust

Background

Stroke is the most frequent neurological disorder and the second most common cause of death worldwide. With approximately eighty percent, cerebral ischemia represents the most abundant type of this disease. Apart from physical disability, surviving patients often suffer from weight loss accompanied by a reduction of muscular mass. This wastage is not limited to the affected side of the body and furthermore contributes to a decreased life quality among the patients concerned. There is a lack of research on the specific causes or potential therapeutic approaches for weight loss after stroke, although both human and veterinary clinical studies identified loss in weight as a negative factor for stroke outcome.

Purpose

The aim of the present study was the investigation of selected aspects of pathophysiological changes in body composition and its underlying causes after stroke in a mouse model. In particular, the development of muscular mass with regard to the potential incurrence of cachexia was meant to be examined.

Methods

For the study, a stroke was surgically induced through occlusion of the middle cerebral artery (MCAO model) in mice. During the subsequent seven days, body composition, weight, activity, neurological status as well as feed and water intake among the animals were measured. For comparison, untreated mice, a group of surgically treated animals without stroke induction and another group with stroke and antibiotic treatment were taken. Hence, consequences of the stroke could be separated from those deriving from surgical procedure and postoperative bacterial infection. Subsequently, the study animals were put to death painlessly, organs as well as muscle samples from both hind limbs were extracted, and the respective weight was determined. As marker for the catabolism in the skeletal muscle, proteasome (proteolysis) and caspase (apoptosis) activity were measured. In addition, the impact of post-stroke weight loss on cardiac function was examined. For this purpose, on the third day after stroke induction, an echocardiography was performed on a separate animal group in order to determine cardiac parameters including the ejection fraction, the diameter of the left ventri-

cle, and the wall thickness. Again, an operated group without stroke served as a comparison. Furthermore, in these groups all measurements were conducted according to the seven day experiment.

Findings

On the third day, the stroke group exhibited a pronounced loss in weight. Fat and nonfat tissue as well as body fluid were likewise reduced. On day three, feed intake of the stroke group was not decidedly reduced. Water absorption, however, was considerably lower than in the control surgery group. An alteration in spontaneous activity was not verifiable. After seven days, body weight showed a tendency to incomplete recovery. On day three after stroke, weight of the abdominal organs, the cardiac muscle, and the muscles of both hind limbs was distinctly reduced. At the same time, heart rate and cardiac output were reduced as well. On day seven, a tendency still towards lower organ and muscle weight in comparison to the animals without cerebral ischemia became apparent. Simultaneously, an elevated caspase-3 activity in the skeletal muscle contralateral to stroke side was found. On the ipsilateral side of the body, a similar tendency became evident. The group treated with antibiotics revealed no differences from the stroke group.

Conclusion

During the first three days after its induction, stroke caused a loss of weight, which affected the fat and lean tissue as well as the body fluid. The muscular mass as part of the lean tissue was not solely reduced on the paralyzed side of the body. A reduced feed intake and altered physical activity could be excluded as the sole causes for these changes. Water absorption, however, seemed to have an impact on the development of the body fluid. There was evidence of an increased rate of apoptosis in the skeletal muscles on both sides of the body. This could have been causative for the changes in muscle mass. The influence of proteolytic processes and dehydration on alterations in muscle mass remained unclear. Antibiotic treatment had no impact on the results, therefore infections with Enrofloxacin-sensitive bacteria can be excluded as one cause for alterations in body composition. According to the results of the clinical examination of the animals, infections of other origin can be regarded unlikely, but an influence on body composition can not be excluded in this study. The stroke had a negative effect on the heart muscle and heart function. The present results suggest that an ischemic stroke regardless of food intake and motion intensity after the insult leads to the development of fat and muscle wasting and furthermore has a negative effect on cardiac function. Further studies are necessary in to clarify the exact mechanisms leading to these effects.

Literaturverzeichnis

1. Jönsson AC, Lindgren I, Norrving B, Lindgren A *Weight loss after stroke: A population-based study from the Lund stroke register*. Stroke, 2008. **39**(3): p. 918-923.
2. Kazuhide Furuya, Nobutaka Kawahara, Kensuke Kawai, Tomikatsu Toyoda, Keiichiro Maeda, Takaaki Kirino *Proximal occlusion of the middle cerebral artery in C57Black6 mice: relationship of patency of the posterior communicating artery, infarct evolution, and animal survival*. J Neurosurg., 2004. **100**(1): p. 97-105.
3. Meisel C et al. *Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke*. Stroke, 2004. **35**(1): p. 2-6.
4. Salom JB, Pérez-Asensio FJ, Burguete MC, Marín N, Pitarch C, Torregrosa G, Romero FJ, Alborch E *Single-dose ebselen does not afford sustained neuroprotection to rats subjected to severe focal cerebral ischemia*. Eur J Pharmacol., 2004. **495**(1): p. 55-62.
5. Esneault E, Castagne V, Moser P, Bonny C, Bernaudin M *D-JNKi, a peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase, promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in rats*. Neuroscience, 2008. **152**(2): p. 308-320.
6. Choe MA, An GJ, Lee YK, Im JH, Choi-Kwon S, Heitkemper M *Effect of early low-intensity exercise on rat hind-limb muscles following acute ischemic stroke*. Biol Res Nurs., 2006. **7**(3): p. 163-74.
7. Olsen TS, Dehlendorff C, Petersen HG, Andersen KK *Body mass index and poststroke mortality*. Neuroepidemiology, 2008. **30**: p. 93-100.
8. Davalos A et al. *Effect of malnutrition after acute stroke on clinical outcome*. Stroke, 1996. **27**: p. 1028-1032.
9. Gariballa SE et al. *Influence of nutritional status on clinical outcome after acute stroke*. Am J Clin Nutr., 1998.: p. 275-281.
10. Volkert D, Berner YN, Berry E et al. *ESPEN guidelines on enteral nutrition: geriatrics*. Clin Nutr., 2006. **25**(2): p. 330-360.
11. Ishikawa H, Tajiri N, Vasconcellos J, Kaneko Y, Mimura O, Dezawa M, Borlongan CV *Ischemic stroke brain sends indirect cell death signals to the heart*. Stroke, 2013. **44**(11): p. 3175-82.
12. Suri MF, Qureshi A *Readmission within 1 month of discharge among patients with acute ischemic stroke: results of the University Health System Consortium Stroke Benchmarking study*. J Vasc Interv Neurol., 2013. **6**(2): p. 47-51.
13. World Health Organization, *WHO STEPS stroke manual: The WHO STEPwise approach to stroke surveillance.*, Geneva, World Health Organization, 2006.

14. Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson LJ, Smith WS, Johnston SC, Easton JD: Zerebrovaskuläre Erkrankungen. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M: *Harrisons Innere Medizin, Band 2*, 16. Aufl., 2553, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin, 2005.
15. Ringelstein EB, Nabavi DG: Klassifikation von Schlaganfallsyndromen. In: Brandt Th, Hohlfeld R, Noth J, Reichmann H: *Klinische Neurologie, der ischämische Schlaganfall*, 1. Aufl., W.Kohlhammer GmbH, Stuttgart, 2007.
16. Albers GW, Caplan LR, Easton JD, Fayad PB, Mohr JP, Saver JL, Sherman DG; TIA Working Group *Transient ischemic attack - proposal for a new definition*. N Engl J Med., 2002. **347**(21): p. 1713-6.
17. Adams HP Jr. et al. *Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*. Stroke, 1993. **24**(1): p. 35-41.
18. World Health Organization *The atlas of heart disease and stroke*. Geneva, World Health Organization, 2004.
19. Murray CJ, Lopez AD *Mortality by cause for eight regions of the world: Global burden of disease study*. Lancet, 1997. **349**(9061): p. 1269-76.
20. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU *Incidence, etiology and long-term prognosis of stroke*. Fortschr Neurol Psys., 2002. **70**: p. 657-62.
21. Murray CJ, Lopez AD *Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020. Global burden of disease study*. Lancet, 1997. **349**(9064): p. 1498-504.
22. Brynningsen PK, Damsgaard EM, Husted SE *Improved nutritional status in elderly patients 6 months after stroke*. J Nutr Health Aging., 2007. **11**(1): p. 75-9.
23. Ha L, Hauge T, Iversen PO *Body composition in older acute stroke patients after treatment with individualized, nutritional supplementation while in hospital*. BMC Geriatr., 2010. **10**: p. 75.
24. Ha L, Hauge T, Spenning AB, Iversen PO *Individual, nutritional support prevents undernutrition, increases muscle strength and improves QoL among elderly at nutritional risk hospitalized for acute stroke: a randomized, controlled trial*. Clin Nutr., 2010. **29**(5): p. 567-73.
25. Unosson M, Ek AC, Bjurulf P, von Schenck H, Larsson J *Feeding dependence and nutritional status after acute stroke*. Stroke., 1994. **25**(2): p. 366-71.
26. Sandri, M. *Signaling in muscle atrophy and hypertrophy*. Physiology, 2008. **23**: p. 160-70.
27. English C, McLennan H, Thoirs K, Coates A, Bernhardt J *Loss of skeletal muscle mass after stroke: a systematic review*. Int J Stroke, 2010. **5**(5): p. 395-402.
28. Evans, W *Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity*. Am J Clin Nutr., 2010. **91**(4): p. 1123-1127.

29. Kuh D, Bassey EJ, Butterworth S, Hardy R, Wadsworth ME, Musculoskeletal study team *grip strength, postural control, and functional leg power in a representative cohort of British men and women: associations with physical activity, health status, and socioeconomic conditions*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci., 2005. **60**(2): p. 224-31.
30. Dirnagl U, Klehmet J, Braun JS, Harms H, Meisel C, Ziemssen T, Prass K, Meisel A *Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance*. Stroke, 2007. **38**(2 Suppl): p. 770-3.
31. Haeusler KG, Schmidt WU, Föhring F, Meisel C, Helms T, Jungehulsing GJ, Nolte CH, Schmolke K, Wegner B, Meisel A, Dirnagl U, Villringer A, Volk HD *Cellular immunodepression preceding infectious complications after acute ischemic stroke in humans*. Cerebrovasc Dis., 2008. **25**(1-2): p. 50-8.
32. Klehmet J, Harms H, Richter M, Prass K, Volk HD, Dirnagl U, Meisel A, Meisel C *Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial*. Neuroscience, 2009. **158**(3): p. 1184-93.
33. Harms H, Prass K, Meisel C, Klehmet J, Rogge W, Drenckhahn C, Göhler J, Bereswill S, Göbel U, Wernecke KD, Wolf T, Arnold G, Halle E, Volk HD, Dirnagl U, Meisel A *Preventive antibacterial therapy in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial*. PLoS One., 2008. **3**(5): p. 2158.
34. Wang Q, Tang XN, Yenari MA *The inflammatory response in stroke*. J Neuroimmunol., 2007. **184**(1-2): p. 53-68.
35. Offner H, Supramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Vandenbark AA, Hurn PD *Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system*. J Cereb Blood Flow Metab., 2006. **26**(5): p. 654-65.
36. Liesz A, Hagmann S, Zschoche C, Adamek J, Zhou W, Sun L, Hug A, Zorn M, Dalpke A, Nawroth P, Veltkamp R *The spectrum of systemic immune alterations after murine focal ischemia: immunodepression versus immunomodulation*. Stroke, 2009. **40**(8): p. 2849-58.
37. Emsley HC, Smith CJ, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, Hallenbeck JM, del Zoppo GJ, Rothwell NJ, Tyrrell PJ, Hopkins SJ *An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis*. J Neuroimmunol., 2003. **139**(1-2): p. 93-101.
38. Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, del Zoppo GJ, Hallenbeck JM, Rothwell NJ, Hopkins SJ, Tyrrell PJ *Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome*. BMC Neurol., 2004. **4**: p. 2.
39. Muscaritoli M, Anker SD, Argilés J, Aversa Z, Bauer JM, Biolo G, Boirie Y, Bosaeus I, Cederholm T, Costelli P, Fearon KC, Laviano A, Maggio M, Rossi Fanelli F, Schnei-

- der SM, Schols A, Sieber CC *Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) "cachexia-anorexia in chronic wasting diseases" and "nutrition in geriatrics"*. *Clin Nutr.*, 2010.: p. 154-9.
40. Hellerstein MK, Meydani SN, Meydani M, Wu K, Dinarello CA *Interleukin-1-induced anorexia in the rat. Influence of prostaglandins*. *J Clin Invest.*, 1989. **84**(1): p. 228-35.
41. Moldawer LL, Andersson C, Gelin J, Lundholm KG *Regulation of food intake and hepatic protein synthesis by recombinant-derived cytokines*. *Am J Physiol.*, 1988. **254**(3 Pt 1): p. G450-6.
42. Morrone G, Ciliberto G, Oliviero S, Arcone R, Dente L, Content J, Cortese R *Recombinant interleukin 6 regulates the transcriptional activation of a set of human acute phase genes*. *J Biol Chem.*, 1988. **263**(25): p. 12554-8.
43. Stouthard JM, Goey H, de Vries EG, de Mulder PH, Groenewegen A, Pronk L, Stoter G, Sauerwein HP, Bakker PJ, Veenhof CH *Recombinant human interleukin 6 in metastatic renal cell cancer: a phase II trial*. *Br J Cancer.*, 1996. **73**(6): p. 789-93.
44. García-Martínez C, López-Soriano FJ, Argilés JM *Acute treatment with tumour necrosis factor-alpha induces changes in protein metabolism in rat skeletal muscle*. *Mol Cell Biochem.*, 1993. **125**(1): p. 11-8.
45. Llovera M, Carbó N, López-Soriano J, García-Martínez C, Busquets S, Alvarez B, Agell N, Costelli P, López-Soriano FJ, Celada A, Argilés JM *Different cytokines modulate ubiquitin gene expression in rat skeletal muscle*. *Cancer Lett.*, 1998. **133**(1): p. 83-7.
46. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Nijima A, Fujino MA, Kasuga M *Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin*. *Gastroenterology*, 2001. **120**(2): p. 337-45.
47. Zumbach MS, Boehme MW, Wahl P, Stremmel W, Ziegler R, Nawroth PP *Tumor necrosis factor increases serum leptin levels in humans*. *J Clin Endocrinol Metab.*, 1997. **82**(12): p. 4080-2.
48. Ballmer PE, McNurlan MA, Southorn BG, Grant I, Garlick PJ *Effects of human recombinant interleukin-1 beta on protein synthesis in rat tissues compared with a classical acute-phase reaction induced by turpentine. Rapid response of muscle to interleukin-1 beta*. *Biochem J.*, 1991. **279**(Pt 3): p. 683-8.
49. Gordon JN, Green SR, Goggin PM *Cancer cachexia*. *QJM*, 2005. **98**(11): p. 779-788.
50. Shen HC, Chen HF, Peng LN, Lin MH, Chen LK, Liang CK, Lo YK, Hwang SJ *Impact of nutritional status on long-term functional outcomes of post-acute stroke patients in Taiwan*. *Arch Gerontol Geriatr.*, 2010. **53**(2): p. 149-52.

51. Finestone HM, Greene-Finestone LS, Wilson ES, Teasell RW *Malnutrition in stroke patients on the rehabilitation service and at follow-up: prevalence and predictors*. Arch Phys Med Rehabil., 1995. **76**(4): p. 310-6.
52. Foley NC, Martin RE, Salter KL, Teasell RW *A review of the relationship between dysphagia and malnutrition following stroke*. J Rehabil Med., 2009. **41**(9): p. 707-13.
53. Gordon C, Hewer RL, Wade DT *Dysphagia in acute stroke*. BMJ, 1987. **295**: p. 411-4.
54. Barer D *The natural history and functional consequences of dysphagia after hemispheric stroke*. J Neurol Neurosurg PS., 1989. **52**: p. 236-46.
55. Mann G, Hankey GJ, Cameron D *Swallowing function after stroke: progress and prognostic factors at 6 months*. Stroke, 1999. **30**: p. 744-8.
56. Foley N, Finestone H, Woodbury MG, Teasell R, Greene Finestone L *Energy and protein intakes of acute stroke patients*. J Nutr Health Aging., 2006. **10**(3): p. 171-5.
57. von Haehling S, Lainscak M, Springer J, Anker SD *Cardiac cachexia: a systematic overview*. Pharmacol Ther., 2009. **121**(3): p. 227-52.
58. Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, Jatoi A, Kalantar-Zadeh K, Lochs H, Mantovani G, Marks D, Mitch WE, Muscaritoli M, Najand A, Ponikowski P, Rossi Fanelli F, Schambelan M, Schols A, Schuster M, Thomas D, Wolfe R, Anker SD *Cachexia: a new definition*. Clin Nutr., 2008. **27**(6): p. 793-9.
59. Delano MJ, Moldawa LL *The origins of cachexia in acute and chronic inflammatory diseases*. Nutr Clin Pract., 2006. **21**(1): p. 68-81.
60. Laviano A, Megiud MM, Inui A, Muscaritoli M, Rossi-Fanelli F *Therapy insight: Cancer anorexia-cachexia syndrome - when all you can eat is yourself*. Nat Clin Pract Oncol., 2005. **2**(3): p. 158-65.
61. DeWys WD *Anorexia as a general effect of cancer*. Cancer, 1979. **43**(5): p. 2013-9.
62. Davis MP, Dreicer R, Walsh D, Lagman R, LeGrand SB *Appetite and cancer-associated anorexia: a review*. J Clin Oncol, 2004. **22**(8): p. 1510-7.
63. Evans WK, Makuch R, Clamon GH, Feld R, Weiner RS, Moran E, Blum R, Shepherd FA, Jeejeebhoy KN, DeWys WD *Limited impact of total parenteral nutrition on nutritional status during treatment for small cell lung cancer*. Cancer Res., 1985. **45**(7): p. 3347-53.
64. Costelli P, Baccino FM *Mechanisms of skeletal muscle depletion in wasting syndromes: role of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care., 2003. **6**(4): p. 407-12.
65. Melstrom LG, Melstrom KA Jr., Ding XZ, Adrian TE *Mechanisms of skeletal muscle degradation and its therapy in cancer cachexia*. Histol Histopathol., 2007. **22**(7): p. 805-14.

66. Lecker SH et al. *Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states*. J Nutr., 1999. **129**(1): p. 227S-237S.
67. Baracos V *Cancer-associated cachexia and underlying biological mechanisms*. Ann Rev Nutr., 2006. **26**: p. 435-61.
68. Furuno K, Goldberg AL *The activation of protein degradation in muscle by Ca²⁺ or muscle injury does not involve a lysosomal mechanism*. Biochem J., 1986. **237**(3): p. 859-64.
69. Lowell BB, Ruderman NB, Goodman MN *Evidence that lysosomes are not involved in the degradation of myofibrillar proteins in rat skeletal muscle*. Biochem J., 1986. **234**(1): p. 237-40.
70. Costelli P, De Tullio R, Baccino FM, Melloni E *Activation of Ca(2+)-dependent proteolysis in skeletal muscle and heart in cancer cachexia*. Br J Cancer., 2001. **84**(7): p. 946-50.
71. Kisselev AF, Akopian TN, Goldberg AL *Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes*. J Biol Chem., 1998. **273**(4): p. 1982-9.
72. Hasselgren PO, Fischer JE *Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation*. Ann Surg., 2001. **233**(1): p. 9-17.
73. Kisselev AF, Akopian TN, Castillo V, Goldberg AL *Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown*. Mol Cell., 1999. **4**(3): p. 395-402.
74. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ *Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1704-8.
75. Cai D, Frantz JD, Tawa NE Jr, Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, Shoelson SE *IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice*. Cell, 2004. **119**(2): p. 285-98.
76. Cohen G *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem J., 1997. **326**(Pt 1): p. 1-16.
77. Adrie C, Monchi N, Fulgencio JP, Cottias P, Haouache H, Alvarez-Gonzalvez A, Guerrini P, Cavaillon JM, Adib-Conquy M *Immune status and apoptosis activation during brain death*. Shock, 2010. **33**(4): p. 353-62.
78. Cryns V, Yuan J *Proteases to die for*. Genes Dev., 1998. **12**(11): p. 1551-70.
79. Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N *Caspases: the proteases of the apoptotic pathway*. Oncogene, 1998. **17**(25): p. 3237-45.

80. Belizário JE, Lorite MJ, Tisdale MJ *Cleavage of caspases-1, -3, -6, -8 and -9 substrates by proteases in skeletal muscles from mice undergoing cancer cachexia*. Br J Cancer., 2001. **84**(8): p. 1135-40.
81. Salvesen GS., Dixit VM *Caspases: intracellular signaling by proteolysis*. Cell., 1997. **91**(4): p. 443-6.
82. Soriano ME, Scorrano L *The interplay between BCL-2 family proteins and mitochondrial morphology in the regulation of apoptosis*. Adv Exp Med Biol., 2010. **687**: p. 97-114.
83. Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA *Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice*. Nature, 1996. **384**(6607): p. 368-72.
84. van Royen M, Carbó N, Busquets S, Alvarez B, Quinn LS, López-Soriano FJ, Argilés JM *DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: A link with cancer cachexia?* Biochem Biophys Res Commun., 2000. **270**(2): p. 533-7.
85. Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V *Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model*. J Vis Exp., 2011. **6**(47): p. 2423.
86. Swanson RA, M.M., Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR *A semiautomated method for measuring brain infarct volume*. J Cerebr Blood F Met., 1990 **10**(2): p. 290-3.
87. Dittmar M, Spruss T, Schuierer G, Horn M *External carotid artery territory ischemia impairs outcome in the endovascular filament model of middle cerebral artery occlusion in rats*. Stroke, 2003. **34**(9): p. 2252-7.
88. Royl G, Balkaya M, Lehmann S, Lehnardt S, Stohlmann K, Lindauer U, Endres M, Dirnagl U, Meisel A *Effects of the PDE5-inhibitor vardenafil in a mouse stroke model*. Brain Res., 2009. **1265**: p. 148-57.
89. Springer J, Schust S, Peske K, Tschirner A, Rex A, Engel O, Scherbakov N, Meisel A, von Haehling S, Boschmann M, Anker SD1, Dirnagl U, Doehner W *Catabolic signaling and muscle wasting after acute ischemic stroke in mice: indication for a stroke-specific sarcopenia*. Stroke, 2014. **45**(12): p. 3675-83.
90. Weidenfeld J, Leker RR, Gai N, Teichner A, Bener D, Ovadia H *The function of the adrenocortical axis in permanent middle cerebral artery occlusion: effect of glucocorticoids on the neurological outcome*. Brain Res., 2011. **1407**: p. 90-6.
91. Winter B, Juckel G, Viktorov I, Katchanov J, Gietz A, Sohr R, Balkaya M, Hörtnagl H, Endres M *Anxious and hyperactive phenotype following brief ischemic episodes in mice*. Biol Psychiatry., 2005. **57**(10): p. 1166-75.
92. Choe MA, An GJ, Lee YK, Im JH, Choi-Kwon S, Heitkemper M *Effect of inactivity and undernutrition after acute ischemic stroke in a rat hindlimb muscle model*. Nurs Res., 2004. **53**(5): p. 283-92.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lagerung für die echokardiografische Untersuchung	23
Abbildung 2: Infarktgrößen in % der ipsilateralen Gehirnhälfte	32
Abbildung 3: Anzahl der Tiere pro Gruppe mit neurologischer Wertung	33
Abbildung 4: Entwicklung des Körpergewichtes im Versuchsverlauf.....	34
Abbildung 5: Veränderung des Körpergewichtes am Tag 3.	37
Abbildung 6: Veränderung des Körpergewichtes am Tag 7	38
Abbildung 7: Entwicklung der absoluten Körperfettmasse.	40
Abbildung 8: Veränderungen der Körperfettmasse am Tag 3	42
Abbildung 9: Entwicklung der absoluten fettfreien Masse	44
Abbildung 10: Änderung der fettfreien Masse am Tag 3	45
Abbildung 11: Gesamtwassergehalt in Gramm im Versuchsverlauf.....	47
Abbildung 12: Änderungen des Wassergehaltes am Tag 3	49
Abbildung 13: Veränderung der Futterraufnahme am Tag 3	52
Abbildung 14: Veränderung der Futterraufnahme am Tag 7	53
Abbildung 15: Veränderung der Wasseraufnahme am Tag 3	55
Abbildung 16: Veränderung der Spontanaktivität am Tag 3	58
Abbildung 17: Veränderung der Spontanaktivität am Tag 7	59
Abbildung 18: Caspase-3-Aktivität im rechten <i>M. gastrocnemius</i>	65
Abbildung 19: Caspase-3-Aktivität im linken <i>M. gastrocnemius</i>	66
Abbildung 20: „Caspaselike“-Aktivität im rechten <i>M. gastrocnemius</i>	68
Abbildung 21: „Caspaselike“-Aktivität im linken <i>M. gastrocnemius</i>	68
Abbildung 22: „Chemotrypsinlike“-Aktivität im linken <i>M. gastrocnemius</i>	70
Abbildung 23: „Chemotrypsinlike“-Aktivität im rechten <i>M. gastrocnemius</i>	70
Abbildung 24: „Trypsinlike“-Aktivität im rechten <i>M. gastrocnemius</i>	72
Abbildung 25: „Trypsinlike“-Aktivität im linken <i>M. gastrocnemius</i>	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erstmalige Schlaganfälle: Inzidenz pro 100 000 Einwohner	5
Tabelle 2: Abbruchkriterien.....	16
Tabelle 2: Fortsetzung: Abbruchkriterien	17
Tabelle 3: Schematischer Versuchsablauf für sieben Tage Dauer.....	17
Tabelle 4: Schematischer Versuchsablauf für dreiTage Dauer	18
Tabelle 5: Gruppeneinteilung und Tierzahlen	18
Tabelle 6: Einteilung des neurologischen Status nach MCAO	21
Tabelle 7: Präparierte Organe	24
Tabelle 8: Körperfettmasse in Gramm an den Tagen 0, 3 und 7.....	39
Tabelle 9: Fettfreie Körpermasse in Gramm an den Tagen 0, 3 und 7.....	43
Tabelle 10: Wassergehalt des Körpers in Gramm an den Tagen 0, 3 und 7	47
Tabelle 11: Futterraufnahme	50
Tabelle 12: Wasseraufnahme.....	54
Tabelle 13: Aktivität in „Counts“ an Tag 0, 3 und 7	56
Tabelle 14: Organgewichte in % des Körpergewichtes	60
Tabelle 15: Fettgewebe in % des Ausgangsgewichtes	61
Tabelle 16: Fettgewebe in % des Ausgangsgewichtes	62
Tabelle 17: Muskelgewichte in % des Körpergewichtes.....	63
Tabelle 18: Caspase-3-Aktivität Tag 7.....	64
Tabelle 19: Caspase-3-Aktivität Tag 3.....	65
Tabelle 20: „Caspaselike“-Aktivität	67
Tabelle 21: „Chemotrypsinlike“-Aktivität	69
Tabelle 22: „Trypsinlike“-Aktivität.....	71
Tabelle 23: Echokardiografische Untersuchung	73
Tabelle 23, Fortsetzung: Echokardiografische Untersuchung	74
Tabelle A 1: Futter und Einstreu.....	121
Tabelle A 2: Verwendete Medikamente.....	121
Tabelle A 3: Chemikalien für Laboruntersuchungen.. ..	122
Tabelle A 4: Pufferlösungen.....	123
Tabelle A 5: Fluorogene Substrate.....	123
Tabelle A 6: Inhibitoren.....	123
Tabelle A 7: Verwendete Gerätschaften.....	124
Tabelle A 8: Verbrauchsmaterial.....	125
Tabelle A 9: Software zur Datenauswertung.....	125

Vorveröffentlichungen und Überschneidungen mit anderen Arbeiten

Teile dieser Arbeit wurden für die Erstellung des folgenden Artikels verwendet:

Springer J, Schust S, Peske K, Tschirner A, Rex A, Engel O, Scherbakov N, Meisel A, von Haehling S, Boschmann M, Anker SD, Dirnagl U, Doehner W

Catabolic signaling and muscle wasting after acute ischemic stroke in mice: indication for a stroke-specific sarcopenia.

Stroke, 2014. **45**(12): p. 3675-83.

Die Daten der vorliegenden Dissertation dienten hierbei als Grundlage für weitere Untersuchungen, die im besagten Artikel veröffentlicht wurden. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten der Kontroll-, OP-Kontroll-, Schlaganfall- und Antibiose-Gruppe wurden dabei ergänzt durch Untersuchungen mit weiteren Tieren, die gleichen Behandlungen ausgesetzt waren, aber an den Tagen 0, 3 und 7 in speziellen Käfigen zur Messung spezifischer Stoffwechselformen gehalten wurden. Durch diese weiterführenden Untersuchungen kamen im oben genannten Artikel Gruppengrößen mit höheren Tierzahlen als in der vorliegenden Studie zustande. Die in der vorliegenden Dissertation aufgeführten Ergebnisse für Körper- und Organgewichte, Zusammensetzung der Körpermasse, Futter- und Wasseraufnahme, Proteasomen- und Caspaseaktivitäten sowie Fett- und Muskelmasse finden sich dementsprechend nicht als konkrete Zahlenwerte bzw. als Abbildungen in dem veröffentlichten Artikel wieder, wurden jedoch für dessen Erstellung verwendet.

Des Weiteren wurden die Daten der vorliegenden Arbeit als Vergleichsgrundlage für eine noch ausstehende Dissertation von Frau Katrin Nadine Peske, Tierärztin aus Dessau, benutzt. Sie verglich die OP-Kontroll- und die Schlaganfall-Gruppe mit Tiergruppen, die zusätzlich zu einer ansonsten identischen Behandlung verschiedene Interventionstherapien erhalten hatten.

Anhang

Anhang zu Kapitel 3.2 Material und Geräte

Tabelle A 1: Futter und Einstreu

Marke	Hersteller	Eigenschaften	Zusammensetzung
Haltungsfutter ssniff R/M-H V1534-3	Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest	autoklavierbare Pel- lets, Durchmesser: 1 cm Energiegehalt: 13,0 Mj/kg	19,3 % Rohprotein 3,4 % Rohfett 5,0 % Rohfaser
LIGNOCEL® FS 14 <i>Hygie- nic Animal Bedding</i>	J. Rettenmaier & Söhne GmbH + Co. Kg, Rosenberg, Deutschland	sterile Einstreu	Sägespäne

Tabelle A 2: verwendete Medikamente

Wirkstoff	Handelspräparat	Hersteller	Funktion
Isofluran (1-Chloro-2,2,2- trifluoroethyl- difluoromethylether)	Forene® 100 %	Abbiot GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland	Narkosemit- tel
Ketamin	Ketamin, 10 %	WDT, Garbsen, Deutsch- land	Narkosemit- tel
Xylazin	Rompun®, 2 %	Bayer® AG, Leverkusen	Narkosemit- tel
Enrofloxacin	Baytril, 2,5 %	Bayer® AG, Leverkusen	Antibiotikum
Lidocainhydrochlorid	Xylocain-Gel, 2 %	Astra Zeneca GmbH, We- del, Deutschland	Analgetikum

Tabelle A 3: Chemikalien für Laboruntersuchungen

Substanz	Hersteller
ATP (Approx. 99 %)	Sigma-Aldrich®, München, Deutschland
CHAPS (minimum 98 %)	Sigma-Aldrich®, München, Deutschland
DMSO (99,5 %)	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
DTT	Sigma-Aldrich®, München, Deutschland
EDTA (NaCl-Lösung, 0,5 M)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethanol (100 %) absolut	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Ethanol (70 %)	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (96 %)	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin (> 98 %, wasserfrei)	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylinlösung nach Gill II	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
HEPES BUFFER (1 M)	Sigma-Aldrich®, München, Deutschland
IGEPAL® CA- 630	Sigma-Aldrich®, München, Deutschland
<i>Quick Start</i> ™ Bradford Dye Reagenz, 1x	BIO RAD®, München, Deutschland
<i>Quick Start</i> ™ BSA (2 mg/ml)	BIO RAD®, München, Deutschland
Salzsäure 37 % reinst	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
SDS (10 %)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Sucrose (Minimum, 99,5 %)	Sigma-Aldrich®, München, Deutschland
<i>Tissue freezing medium</i>	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Deutschland
TRIS-PUFFERAN® (>99,9 %, p.a.)	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Vitro-Clud®	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Xylol (Isomere) >98 %	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland

ATP = Adenosintri-phosphat, CHAPS = 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat, DMSO = Dimethylsulfoxid, DTT = DL-Dithiothreitol, EDTA = Ethylenediamine-tetra-acetylsäure, HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, IGEPAL® CA- 630 = Octylphenoxypolyethoxyethanol, BSA = bovines Serumalbumin, SDS = *sodium dodecyl sulfate*, TRIS = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Tabelle A 4: Pufferlösungen

Puffer	Zusammensetzung
Caspase-Assay-Puffer	100 mM HEPES (pH 7,5), 10 % Sucrose, 0,1 % CHAPS, 2 % DMSO, 10 % DTT, 50 µM fluorogenes Substrat, ± 100 µM Caspase-Inhibitor
Caspase-Lysis-Puffer	100 mM HEPES (pH 7,5), 10 % Sucrose, 0,1 % IGEPAL (Ca-630), 10 mM DTT, Protease-Inhibitorcocktail
Proteasom-Assay-Puffer	50 mM Tris (pH 8,0) 0,5 mM EDTA, 40 µM fluorogenes Substrat, ± 40 µM Proteasom-Inhibitor (<i>Complete mini</i>)
Proteasom-Lysis-Puffer	10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA, 2 mM ATP, 20 % Glycerin, 4 mM DTT

ATP = Adenosintriphosphat, CHAPS = 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat, DMSO = Dimethylsulfoxid, DTT = DL-Dithiothreitol, EDTA = Ethylendiamine-tetra-acetylsäure, HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, IGEPAL® CA- 630 = Octylphenoxypolyethoxyethanol

Tabelle A 5: Fluorogene Substrate

Substrat	Hersteller
Bz-Val-G-A-AMC	BIOMOL® GmbH, Hamburg, Deutschland
Z-L-L-E-AMC	BIOMOL® GmbH, Hamburg, Deutschland
Suc-L-L-V-Y-AMC	BIOMOL® GmbH, Hamburg, Deutschland
DEVD-AMC	Enzo® Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland

Tabelle A 6: Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller
Proteasom-Inhibitor MG 132	BIOMOL® GmbH, Hamburg
Caspase-3-Inhibitor DEVD-CHO	Enzo® Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Protease-Inhibitorcocktail (<i>Complete mini</i>), EDTA-free	ROCHE®, Mannheim, Deutschland

Tabelle A 7: Verwendete Gerätschaften

Gerät	Typ	Hersteller
beheizbarer Operationstisch	Spezialanfertigung	CCR Berlin, Deutschland
beheizter Operationstisch	V500 VStat	Peco Services Ltd, Cumbria, England
DrägerVapor2000 Isofluran-Verdampfer		Dräger Medical GmbH, Lübeck, Deutschland
Echo-MRI 500	500	Echo Medical Systems, Houston, Texas, USA
Eppendorf® Zentrifuge	5804 R	Eppendorf® AG, Hamburg, Deutschland
<i>Epson Perfection Photo Scanner</i>	4990	EPSON® Deutschland GmbH, Meerbusch, Deutschland
Leica Ag <i>Protect</i> Kryotom	CM1950	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Deutschland
Linde&Dräger Gasversorgungssystem		Dräger Medical GmbH, Lübeck, Deutschland
Lokomotor-System	“Supermex”	Muromachi Kikai Co.,Ltd., Tokyo, Japan
Mikroskop	S21	Carl Zeiss®, Jena, Deutschland
Präzisionswaage	CP225D	Sartorius® AG, Göttingen
Schüttel-Inkubator	Titramax 100	VWR, Darmstadt, Deutschland
Sonifizierer	HD 2070 MS 72	BANDELIN SONOPLUS®, Berlin, Deutschland
Thermomixer <i>comfort</i>		Eppendorf® AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	SD 220 VAC	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Turrax-Aufsatz	S8N-5G	IKA® -Werke GmbH&Co. KG, Staufen, Deutschland
<i>Twinkle</i> -Fluorometer	LB970	BERTHOLD Technologies®
Ultra-Turrax	T8	IKA® -Werke GmbH&Co. KG, Staufen, Deutschland
Vevo 770 High-Resolution Imaging System		VisualSonics, Toronto, Kanada
Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer		Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Tabelle A 8: Verbrauchsmaterial

BD Plastipak™, 1 ml Spritzen	Becton, Dickinson & Co., Madrid, Spanien
BD Syringe Luer-Lok™ Tip, 3 ml Spritzen	Becton, Dickinson & Co., Madrid, Spanien
BD Microlance™3, 23 G x 1" Kanülen	Becton, Dickinson & Co., Madrid, Spanien
BD Mircolance™3, 30 GA 1/2 Kanülen	Becton, Dickinson & Co., Madrid, Spanien
„Veet“-Enthaarungscreme	Reckitt Benckiser, Hull, Großbritannien
Ultrasound Transmission Gel	Comedical Sas, Mattarello, Italien
unsteriler, unbeschichteter, schwarz geflochtener Seidenfaden, nicht resorbierbar	Feuerstein Suprama GmbH, Berlin, Deutschland

Tabelle A 9: Software zur Datenauswertung

Programm	Verwendung	Vertreiber
EndNote 9.0	Literaturverwaltung	Thomson Reuters, Toronto, Kanada
Graph Pad Prism®5	Erstellung von Grafiken	GraphPad Software, Inc., USA
Microplate Manager, Version 5.2	Messung der optischen Dichte von Proteinproben	Bio-Rad®, München, Deutschland
Microsoft® Excel 2007	Zusammenfassung der gewonnenen Daten	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Microwin 2000	Fluoreszenz-Messung	BERTHOLD Technologies GmbH & Co. KG, Wildbad, Deutschland
Sigma Scan® Pro	Bestimmung von Infarktgrößen	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland
IBM® SPSS Statistics, Version 17	Statistische Auswertung	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland
Vevo 770, Version 2.3.0	Erfassung und Auswertung echokardiografischer Daten	VisualSonics, Toronto, Kanada

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wolfram Döhner für die Überlassung des Themas, die Unterstützung bei allen fachlichen und bürokratischen Fragestellungen und selbstverständlich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten, Geräte und Materialien.

Herrn Prof. Dr. Gruber möchte ich sehr herzlich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit und seine hilfreichen Korrekturvorschläge danken.

Darüber hinaus bin ich Herrn Dr. Jochen Springer zu Dank verpflichtet, da er stets mit unkomplizierter und freundlicher Art Hilfestellung gab und mit konstruktiver Kritik zur Seite stand.

Weiterer Dank gebührt Monika Dopatka für die Durchführung der unglaublich schwierigen Operationen und Auswertung der Schnitte.

Ein großer Dank geht an die „Kaffeetanten der AG Springer“, ihr wisst, wie ich es meine! Ihr werdet mir immer in Erinnerung bleiben, Annika Tschirner durch ihre unglaublich geduldige und selbstlose Unterstützung, Mareike mit ihrer ruhigen und hilfsbereiten Art und Anna, die einfach immer gute Laune verbreitet hat.

Vielen lieben Dank an Alex und Uta für die Unterstützung auf der Zielgeraden!

Alle meine Freunde und speziell meine Uni-Miezen, ihr wart mein ruhiger Rückhalt. Danke, dass ihr immer zum richtigen Zeitpunkt und nie zu oft nachgefragt habt, vor allem Kati, meine Liebe, die du zu mir gehalten hast in Freud und Leid! Chris, ich bin so froh, dass du immer da warst, wenn ich dich am meisten gebraucht habe!

Der größte Dank geht an meine Familie, für das regelmäßige Nachfragen ohne zu drängeln, für die vielen lieben unterstützenden Worte und Gesten. Meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Schwager danke ich ganz besonders, ihr habt an mich geglaubt und mich in allen Belangen unterstützt, ihr hattet immer ein offenes Ohr, auch wenn ich mich zum gefühlten hundertsten Mal beklagt habe. Mama und Bine, ihr seid meine Definition von Frauenpower, meine Vorbilder und meine besten Freundinnen, ihr habt mich hierzu motiviert. Peter, du bist mein Fels in der Brandung. Ohne euch hätte ich es nicht geschafft, speziell Mama, du weißt, warum. Danke für alles!

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen verwendet habe.

Susanne Schust

Berlin, den 16.05.2015