

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Einfluss moderater intranschämischer Hypothermie auf die  
Proliferation und Differenzierung neuronaler Stammzellen  
28 Tage nach inkompletter Vorderhirnischämie und Reperfusion  
der adulten Ratte**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Matthias Nikolaus Lørscher  
aus Trier

Mainz, 2008

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 16. Dezember 2008

*Meiner Familie*

# INHALTSVERZEICHNIS

<i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....	IV
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Allgemeiner Teil</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Spezieller Teil</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 <i>Zentrales Nervensystem</i> .....	4
1.2.1.1 Anatomie des Gehirns .....	4
1.2.1.2 Histologie .....	5
1.2.1.3 Blutversorgung.....	6
1.2.1.4 Hippokampus .....	7
1.2.1.5 Perfusion und Stoffwechsel .....	9
1.2.2 <i>Zerebrale Ischämie</i> .....	10
1.2.2.1 Definition .....	10
1.2.2.2 Formen .....	10
1.2.2.3 Pathophysiologie.....	11
1.2.2.4 Tiermodelle .....	12
1.2.3 <i>Stammzellen</i> .....	14
1.2.3.1 Definition .....	14
1.2.3.2 Embryonale Stammzellen .....	15
1.2.3.3 Adulte Stammzellen.....	15
1.2.3.4 Neuronale Stammzellen .....	16
1.2.4 <i>Neurogenese</i> .....	17
1.2.4.1 Embryonale Neurogenese .....	18
1.2.4.2 Adulte Neurogenese .....	18
1.2.4.3 Einflussfaktoren .....	20
1.2.5 <i>Hypothermie</i> .....	21
1.2.5.1 Definition .....	21
1.2.5.2 Formen .....	22
1.2.5.3 Neuroprotektion .....	22
1.2.5.4 Therapeutische Hypothermie .....	23
<b>2 ZIEL DER UNTERSUCHUNG</b> .....	<b>24</b>
<b>3 MATERIAL</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 Chemikalien</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2 Antikörper</b> .....	<b>27</b>
<b>3.3 Lösungen</b> .....	<b>28</b>
<b>3.4 Geräte</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5 Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>32</b>
<b>4 METHODEN</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1 Versuch</b> .....	<b>33</b>
4.1.1 <i>Ablauf</i> .....	33
4.1.2 <i>Tiere</i> .....	34
4.1.3 <i>Gruppen</i> .....	35

<b>4.2 Operativer Abschnitt.....</b>	<b>36</b>
4.2.1 Narkoseeinleitung .....	36
4.2.2 Chirurgische Präparation.....	37
4.2.3 Parameter der Narkoseüberwachung .....	39
4.2.4 Versuchsprotokoll .....	40
4.2.4.1 Äquilibrierungsphase .....	40
4.2.4.2 Hypothermie .....	40
4.2.4.3 Inkomplette globale Ischämie .....	41
4.2.4.4 Reperfusion .....	42
4.2.4.5 Erholungsphase .....	42
4.2.5 Versuchsende .....	42
<b>4.3 In-vivo-Markierung der Stammzellen .....</b>	<b>43</b>
<b>4.4 Probengewinnung .....</b>	<b>45</b>
4.4.1 Perfusion der Tiere .....	45
4.4.2 Gehirnentnahme.....	45
4.4.3 Anfertigung der Hirnschnitte .....	46
<b>4.5 Histologische Analyse .....</b>	<b>47</b>
4.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	47
4.5.1.1 Färbeprotokoll.....	47
4.5.1.2 Beurteilung am Lichtmikroskop .....	48
4.5.1.3 Auswertung .....	50
4.5.2 Volumenbestimmung des Gyrus dentatus.....	51
4.5.2.1 Flächenmessung .....	51
4.5.2.2 Berechnung des Volumens.....	52
4.5.3 BrdU-Färbung .....	53
4.5.3.1 Färbeprotokoll.....	54
4.5.3.2 Beurteilung am Lichtmikroskop .....	57
4.5.3.3 Auswertung .....	58
4.5.4 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung.....	59
4.5.4.1 Färbeprotokoll.....	59
4.5.4.2 Beurteilung am Fluoreszenzmikroskop.....	61
4.5.4.3 Auswertung .....	63
4.5.5 Erweiterte Immunfluoreszenz-Auswertung .....	64
4.5.5.1 Neuronaler Schaden .....	65
4.5.5.2 BrdU-positive Zellen.....	66
<b>4.6 Statistische Datenauswertung.....</b>	<b>67</b>
<b>5 ERGEBNISSE .....</b>	<b>68</b>
<b>5.1 Physiologische Parameter .....</b>	<b>68</b>
<b>5.2 Histopathologischer Schaden.....</b>	<b>71</b>
5.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	71
5.2.2 Neuronaler Schaden in NeuN-Immunfluoreszenz-Färbung.....	74
<b>5.3 Volumenbestimmung des Gyrus dentatus .....</b>	<b>75</b>

<b>5.4 Neurogenese.....</b>	<b>76</b>
5.4.1 <i>BrdU-Färbung</i> .....	76
5.4.1.1 <i>BrdU-positive Zellen im Gyrus dentatus</i> .....	76
5.4.1.2 <i>BrdU-positive Zellen in der CA 1- und CA 3-Region</i> .....	78
5.4.2 <i>Immunfluoreszenz-Doppelfärbung</i> .....	79
5.4.3 <i>Anzahl neu gebildeter Neurone</i> .....	80
<b>6 DISKUSSION.....</b>	<b>82</b>
<b>6.1 Physiologische Parameter .....</b>	<b>82</b>
6.1.1 <i>Blutglukosekonzentration</i> .....	82
6.1.2 <i>Blutgase</i> .....	83
6.1.3 <i>Mittlerer arterieller Druck</i> .....	83
<b>6.2 Histopathologischer Schaden.....</b>	<b>84</b>
6.2.1 <i>Schädigung nach normothermer Ischämie</i> .....	84
6.2.2 <i>Schädigung nach intraischämischer Hypothermie</i> .....	86
6.2.3 <i>Unterschiede zwischen CA 1- und CA 3-Region</i> .....	88
6.2.4 <i>HE- versus NeuN-Färbung</i> .....	88
<b>6.3 Neurogenese.....</b>	<b>89</b>
6.3.1 <i>Natürliches Ausmaß der Neurogenese</i> .....	89
6.3.2 <i>Neurogenese nach zerebraler Ischämie</i> .....	91
6.3.3 <i>Hypothermie</i> .....	94
6.3.3.1 <i>Beeinflussung der natürlichen Neurogenese</i> .....	94
6.3.3.2 <i>Beeinflussung der Ischämie-induzierten Neurogenese</i> .....	96
6.3.4 <i>BrdU-positive Zellen in der CA 1- und CA 3-Region</i> .....	97
<b>6.4 Methoden.....</b>	<b>98</b>
6.4.1 <i>Tierexperimentelles Ischämiemodell</i> .....	98
6.4.2 <i>BrdU</i> .....	99
6.4.3 <i>NeuN</i> .....	101
<b>7 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>102</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>104</b>
<b>9 TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>118</b>
<b>10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>119</b>
<b>11 ABBILDUNGSNACHWEIS .....</b>	<b>121</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>µmol</b>	Mikromol
<b>2-VO</b>	two-vessel-occlusion
<b>4-VO</b>	four-vessel-occlusion
<b>A</b>	Fläche
<b>A.</b>	Arteria
<b>Aa.</b>	Arteriae
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AK</b>	Antikörper
<b>AMPA</b>	Amino-Hydroxy-Methylisoxazol-Propionsäure
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BACO</b>	beidseitige Okklusion der A. carotis communis
<b>BGA</b>	Blutgasanalyse
<b>BO</b>	Bulbus olfactorius
<b>BrdU</b>	5-Bromo-2'-Deoxyuridine
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>CA</b>	Cornu ammonis, Ammonshorn
<b>Ca</b>	Kalzium
<b>ca.</b>	zirka
<b>Calbindin</b>	calcium-binding-protein
<b>Cl</b>	Chlor
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
<b>DCX</b>	doublecortin
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	doppelt destilliertes Wasser
<b>dl</b>	Deziliter
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DS</b>	Donkey-Serum

<b>EEG</b>	Elektroenzephalogramm
<b>EGF</b>	epidermal growth factor
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>et al.</b>	et alii
<b>evtl.</b>	eventuell
<b>FGF</b>	fibroblast growth factor
<b>FiO<sub>2</sub></b>	inspiratorische Sauerstofffraktion
<b>FITC</b>	Fluorescein
<b>G</b>	Gauge
<b>g</b>	Gramm
<b>GABA</b>	Gamma-Amino-Buttersäure
<b>GD</b>	Gyrus dentatus
<b>GFAP</b>	glial fibrillary acidic protein
<b>ggf.</b>	gegebenenfalls
<b>Gluk.</b>	Blutglukosekonzentration
<b>GM</b>	Gehirnmasse
<b>h</b>	Stunde
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>Hb</b>	Hämoglobinkonzentration
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>HF</b>	Herzfrequenz
<b>Hypo</b>	Hypothermie
<b>i. p.</b>	intraperitoneal
<b>IE</b>	Internationale Einheiten
<b>IV</b>	Injektionsvolumen
<b>K</b>	Kalium
<b>Kap.</b>	Kapitel
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>l</b>	Liter
<b>M</b>	Molar
<b>M.</b>	Musculus
<b>MAP</b>	mittlerer arterieller Blutdruck



<b>MCAO</b>	Okklusion der A. cerebri media
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minute
<b>mind.</b>	mindestens
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>Mm.</b>	Musculi
<b>mmHg</b>	Millimeter Quecksilbersäule
<b>mod.</b>	modifiziert
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>n</b>	Stichprobenumfang
<b>N.</b>	Nervus
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O</b>	Dinatrium-Hydrogenphosphat-Heptahydrat
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O</b>	Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>NeuN</b>	neuronal specific nuclear protein
<b>NiCl<sub>2</sub></b>	Nickel(II)-Chlorid
<b>NMDA</b>	N-Methyl-D-Aspartat
<b>Normo</b>	Normothermie
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>OP</b>	Operation
<b>OT</b>	Objektträger
<b>PaCO<sub>2</sub></b>	Arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
<b>PaO<sub>2</sub></b>	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>Red-X</b>	Rhodamine
<b>RMS</b>	Rostraler Migrationsstrom
<b>s.</b>	siehe
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>sec</b>	Sekunde
<b>SGZ</b>	Subgranuläre Zone
<b>Sham</b>	Scheinversuch
<b>sog.</b>	sogenannt

<b>SSC</b>	solution of sodium citrate
<b>SVZ</b>	Subventrikuläre Zone
<b>T<sub>peri</sub></b>	perikranielle Temperatur
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TBS</b>	trizma base solution
<b>TX</b>	Triton X
<b>u. a.</b>	unter anderem
<b>V.</b>	Vena
<b>v. a.</b>	vor allem
<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>Vol.%</b>	Volumenprozent
<b>vs.</b>	versus
<b>z. B.</b>	zum Beispiel
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Allgemeiner Teil

In der Morbiditäts- und Mortalitätsstatistik der Weltgesundheitsorganisation liegen Störungen des zentralen Nervensystems (ZNS) hinter kardiovaskulären und onkologischen Erkrankungen an dritter Stelle. Die Ursachen der neurologischen Pathologien sind vielfältig und beinhalten neben neurodegenerativen Erkrankungen wie zum Beispiel (z. B.) Morbus Parkinson auch akute zerebrale Läsionen durch Schlaganfälle, Schädel-Hirn-Traumata oder kardiopulmonale Reanimation sowie perioperative Komplikationen im Rahmen einer vorübergehenden Okklusion oder Embolisation hirnversorgender Gefäße.

Der Schlaganfall zählt in der westlichen Welt zu den dringlichsten und häufigsten medizinischen Notfällen unserer Zeit, dessen Bedeutung aufgrund der demographischen Altersstruktur unserer Gesellschaft stetig zunimmt. Die Inzidenz liegt derzeit bei 200 bis 300 pro 100.000 Einwohner und Jahr, weist einen zum Alter exponentiellen Anstieg auf und geht mit einer Ein-Jahres-Letalität von bis zu 40 % einher. Neben zerebralen Blutungen (10 %) und Subarachnoidalblutungen (5 %) liegt mit 85 % die bedeutendste Ätiologie in einer zerebralen Ischämie (DIENER und WELLER 2007).

Folge dieser Erkrankungen ist ein irreversibler Verlust an Nervenzellen (Neuronen), der bei der Mehrzahl der Patienten neurologische Störungen bis hin zur lebenslangen Pflegebedürftigkeit hinterlässt. Da neben der sehr restriktiv einsetzbaren systemischen und lokalen Thrombolyse derzeit kaum kausale Therapiemöglichkeiten der akuten zerebralen Ischämie existieren, ergibt sich die Notwendigkeit, neue Therapieformen für die weiterhin steigende Anzahl betroffener Menschen zu entwickeln.

Das neurowissenschaftliche Interesse konzentriert sich zu diesem Zweck seit zirka (ca.) 15 Jahren auf die Erforschung neuronaler Stammzellen, die in Folge einer zerebralen Schädigung einerseits der Regeneration neuronaler Strukturen und andererseits der funktionellen Genesung dienen könnten. Im Rahmen tierexperimenteller Studien konnte seitdem bewiesen werden, dass neuronale Läsionen wie Schädel-Hirn-Traumata oder zerebrale Ischämien die Bildung neuer Nervenzellen aus körpereigenen adulten neuronalen Stammzellen stimulieren (SHARP *et alii* (*et al.*) 2002, LIU *et al.* 1998).

Noch bis Ende des vergangenen Jahrzehnts hatte das wissenschaftliche Dogma Bestand, im

ausgewachsenen Organismus sei die Zahl an Nervenzellen determiniert und könne im Laufe des Lebens lediglich dezimiert werden. Hierzu schrieb der bedeutende Neuroanatom und Nobelpreisträger Santiago Ramón y Cajal (siehe (s.) Abbildung (Abb.) 1 und 2) Anfang des 20. Jahrhunderts: „...in adult centres the nerve paths are something fixed, ended, immutable. Everything may die, nothing may be regenerated. It is for science of the future to change, if possible, this harsh decree...”

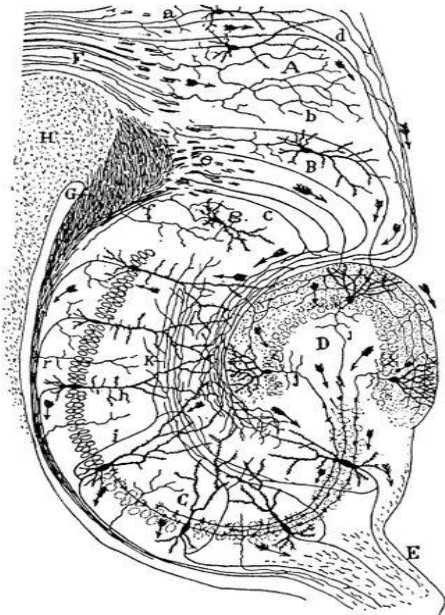


Abb. 1 - Historische Zeichnung eines Nagetier-Hippokampus



Abb. 2 - Der spanische Nobelpreisträger und Neuroanatom Santiago Ramón y Cajal in seinem Labor

Nach damaligem Wissensstand konnte der irreversible Verlust an Nervenzellen lediglich durch die Ausbildung neuer synaptischer Kontakte zwischen überlebenden Neuronen kompensiert werden (CAJAL 1928).

Heute weiß man jedoch, dass im adulten Gehirn mindestens (mind.) zwei Regionen existieren, die nach Abschluss der embryonalen Entwicklung die Möglichkeit zur Genese neuer Neurone beibehalten. Dies ist zum einen die Subventrikuläre Zone (SVZ) des Seitenventrikels und zum anderen die Subgranuläre Zone (SGZ) des *Gyrus dentatus* (GD) der Hippokampusformation. In diesen Regionen konnte neben der postnatalen eine lebenslange Neurogenese aus intrinsischen neuronalen Stammzellen sowie deren funktionelle Integration in bestehende neuronale Netze gezeigt werden (KUHNS *et al.* 1996, LOIS und ALVAREZ-BUYLLA 1994, CAMERON *et al.* 1993). Erste Anzeichen darüber wurden bereits von ALTMAN und DAS (1965) publiziert, der Nachweis im menschlichen Gehirn gelang jedoch erst im Jahr 1998 durch ERIKSSON *et al.* Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse ist die Wissenschaft derzeit intensiv

darum bemüht, die zugrunde liegenden (patho-)physiologischen Mechanismen zu erforschen, um in Zukunft möglicherweise das regenerative Potential körpereigener neuronaler Stammzellen nutzen zu können.

Eine postischämische Kühlung des Gehirns verbessert das neurologische Ergebnis von Patienten nach Herz-Kreislauf-Stillstand deutlich (THE HYPOTHERMIA AFTER CARDIAC ARREST STUDY GROUP 2002). Man geht heute davon aus, dass eine Senkung der Körpertemperatur zur Abnahme des zerebralen Stoffwechsels, zur Reduktion freier Radikale, zu anti-inflammatorischen Effekten sowie zu einem verzögerten Verlust der Ionengradienten führt, welche in ihrer Gesamtheit die Ischämietoleranz der Organe erhöhen. Jedoch ist das Verständnis dieser pathophysiologischen Mechanismen längst noch nicht komplettiert. Es ist daher vorstellbar, dass ein verbessertes neurologisches Ergebnis nach intra- und postischämischer Hypothermie unter anderem auf einer gesteigerten Proliferation neuronaler Stammzellen beruhen könnte. Bisher existieren jedoch lediglich Arbeiten an nicht-ischämischen Tieren, die sich mit dem Einfluss von Hypothermie auf die Neurogenese beschäftigen (KANAGAWA *et al.* 2006, LEE *et al.* 2002).

In der Hoffnung auf neue Strategien zur zukünftigen Therapie neuronaler Schädigungen im Sinne einer regenerativen Medizin beschäftigt sich die vorliegende Arbeit daher mit der Untersuchung des Einflusses intranschämischer Hypothermie auf die Proliferation und Differenzierung neuronaler Stammzellen.

## 1.2 Spezieller Teil

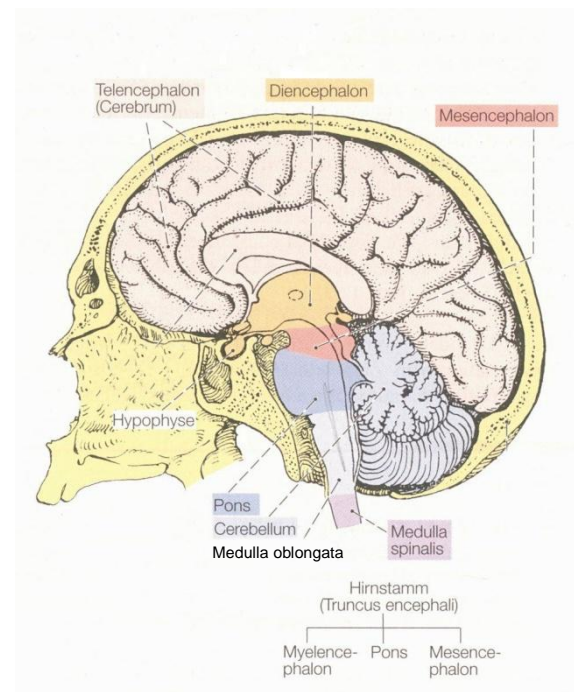
### 1.2.1 Zentrales Nervensystem

Das zentrale Nervensystem gehört zu den kompliziertesten funktionellen Systemen des Menschen. Es dient der koordinierten Reizaufnahme, -leitung, -verarbeitung sowie -beantwortung und wird durch das periphere Nervensystem ergänzt.

Das ZNS gliedert sich in das kraniorostral gelegene Gehirn (*Encephalon*) und das sich kaudal anschließende Rückenmark (*Medulla spinalis*), die anatomisch wie funktionell untrennbar miteinander verbunden sind (TREPEL 1999).

#### 1.2.1.1 Anatomie des Gehirns

Die endgültige Gliederung des menschlichen Gehirns wird Mitte des zweiten Embryonalmonats erreicht (LIPPERT 1999). Sie besteht in einer Unterteilung des Gehirns in Groß- beziehungsweise (bzw.) Endhirn (*Telencephalon*), Kleinhirn (*Cerebellum*), Zwischenhirn (*Diencephalon*) und Hirnstamm (*Truncus encephali*, s. Abb. 3). Letzterer wird nochmals in das verlängerte Rückenmark (*Medulla oblongata*), Brücke (*Pons*) und Mittelhirn (*Mesencephalon*) unterteilt. Geschützt durch eine solide Knochenkapsel (Kalotte) und umgeben von drei Hirnhäuten (*Meningen*) liegt das Gehirn in der Schädelhöhle (*Cavum cranii*). Mit ca. 80 % entfällt der Großteil der menschlichen Hirnmasse auf das Großhirn. Es besteht aus den beiden Großhirnhemisphären, die äußerlich zwar durch die *Fissura longitudinalis cerebri* voneinander getrennt, innerlich aber über den Balken miteinander verbunden sind (TREPEL 1999).



**Abb. 3 - Gliederung des Gehirns**

Modifiziert (Mod.) nach KUGLER (2004)

### 1.2.1.2 Histologie

Histologisch besteht das Hirngewebe aus zwei Hauptkomponenten, den Nervenzellen (Neurone) und den Gliazellen. Entwicklungsgeschichtlich entspringen die Neurone dem embryonalen Neuroektoderm während das umhüllende Bindegewebe (Glia) sowie die sekundär einsprossenden Blutgefäße mesodermalen Ursprungs sind. Auch wenn die Nervenzellen als wesentliche Einheiten des Gehirns angesehen werden, können sie ihre Funktion nicht ohne Unterstützung der 10-mal häufigeren Gliazellen ausüben. Durch deren Produktion von Extrazellulärflüssigkeit, Wachstumsfaktoren und Zytokinen sorgen sie für den Aufbau und die Aufrechterhaltung eines adäquaten Mikromilieus, in dem Neurone ihre Funktion erfüllen können. Darüber hinaus bilden die verschiedenen Arten von Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen, Mikroglia) die extrazelluläre Matrix, in die Axone und Dendriten von Nervenzellen eingebettet sind. Durch die Fähigkeit, myelinhaltige Markscheiden zu synthetisieren, fördern Oligodendrozyten erheblich die Erregungsleitung der Neurone. Mikroglia (auch Hortege-Glia genannt) sind phagozytierende und antigenpräsentierende Zellen, die dem mononukleären Phagozytensystem zuzuordnen sind. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Proliferation und amöboiden Beweglichkeit spielen sie darüber hinaus während der Embryogenese des ZNS eine entscheidende Rolle. Die zumeist Zilien-tragenden Ependymzellen bilden die Auskleidung der inneren Flüssigkeitsräume des ZNS (Ventrikelsystem, Zentralkanal) und bilden somit die Liquor-Hirn-Schranke (SCHILLING 2002).

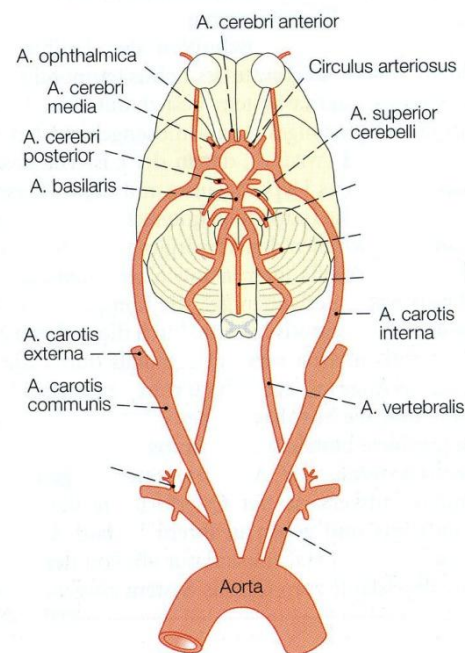
Neben ihrer umfangreichen metabolischen und strukturellen Funktion sind Astrozyten auch im Hinblick auf die Neurogenese von zentraler Bedeutung. Ebenso wie ihre embryonalen Vorläuferzellen, die radiäre Glia, eine wichtige Leitstruktur des sich entwickelnden Nervensystems darstellen, agieren Astrozyten im adulten Gehirn in ähnlicher Weise für neuronale Progenitorzellen. Pathophysiologische Bedeutung erlangen Astrozyten im Zusammenhang mit der Entstehung von Narben, Gliosen und Glioblastomen (DOETSCH 2003, HAYDON 2001).

Die Aufgabe der Neurone besteht in der Aufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung von Reizen und Informationen. Über die Freisetzung verschiedener Neurotransmitter an den Nervenendigungen (Synapsen) erfolgt die Regulation der Aktivität der nachgeschalteten Zelle und somit die Informationsweiterleitung. Mit durchschnittlich mehr als 1000 Verbindungen zu anderen Nervenzellen bilden Neurone ein äußerst dichtes und komplexes System der Informationsverarbeitung und -speicherung (SCHILLING 2002).

### 1.2.1.3 Blutversorgung

Wie in Abb. 4 dargestellt erfolgt die Blutversorgung des Gehirns über intrakranielle Äste der paarigen *Arteriae (Aa.) carotides internae* und *Aa. vertebrales*, die sich um den Hypophysenstiel zu einem ringförmigen Anastomosengebiet (*Circulus arteriosus cerebri*, *Circulus Willisi*) zusammenschließen. Individuell unterschiedlich ausgeprägte Anastomosen zwischen den Versorgungsgebieten der rechten und linken *Arteria (A.) carotis interna* sowie zwischen Carotis- und Vertebralis-Stromgebiet erlauben gegebenenfalls (ggf.) die Kompensation des Verschlusses einer *A. carotis interna* (DRENCKHAHN 2004).

Neben der *A. carotis externa* entsteht die *A. carotis interna* aus der Teilung der *A. carotis communis* und steigt als *Pars cervicalis* fast geradlinig zur Schädelbasis auf. Intrakraniell speisen beide *Aa. carotides internae* zusammen mit der *A. basilaris* die dem *Circulus arteriosus* entspringenden *Aa. cerebri* (Endhirnarterien). Rechte und linke *A. vertebralis* entstammen der jeweiligen *A. subclavia* und vereinigen sich intrakraniell zur *A. basilaris*, die nach ihrer erneuten Aufzweigung Teil des *Circulus Willisi* ist und mit dem Carotis-Stromgebiet über linke und rechte *A. communicans posterior* in Verbindung steht (DRENCKHAHN 2004).



**Abb. 4 - Zerebrale Blutversorgung und Circulus arteriosus Willisi**

Mod. nach DRENCKHAHN (2004)

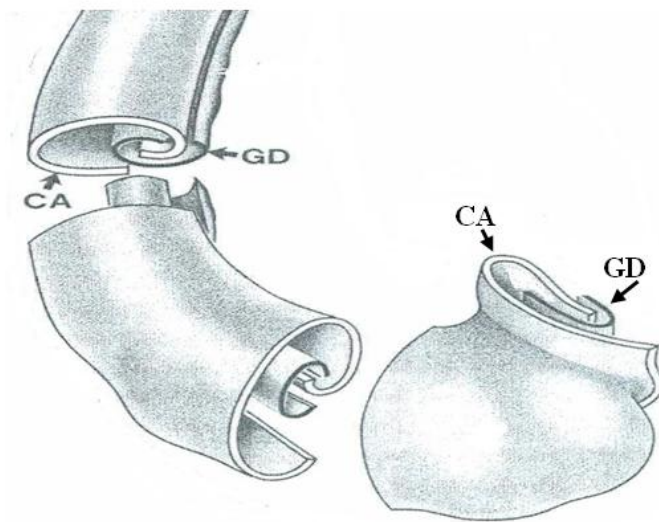
Als Endhirnarterien bezeichnet man die dem Anastomosenring entspringenden drei großen Zerebralarterien, die für die Versorgung des Groß- und Zwischenhirns zuständig sind. Die *Aa. cerebri anteriores* ziehen zum kranialen und medialen Teil der Großhirnhemisphären während die *Aa. cerebri mediales* die Seitenflächen von Frontal-, Temporal- und Parietallappen versorgen. Außerdem umfasst ihr Versorgungsgebiet die Basalganglien mit angrenzendem *Thalamus* sowie die *Capsula interna* mit den absteigenden kortikonukleären und kortikospinalen Bahnen. Die *Aa. cerebri posteriores* ziehen zur medialen Hemisphärenseite und dort zum hinteren Bereich von Groß- und Zwischenhirn. Sie versorgen u. a. den primären und sekundären visuellen Kortex, Teile von Zwischen- und Mittelhirn sowie den basalen Temporallappen mit Hippokampus (TREPPEL 2008).



#### 1.2.1.4 Hippokampus

Der Hippokampus besitzt eine komplexe Struktur und liegt zum größten Teil an der Medialfläche des Seitenventrikelunterhorns im Schläfenlappen (*Lobus temporalis*). Dort bildet er mit seinem rostralen Endstück eine tatzenähnliche Struktur (*Pes hippocampi*) und reicht, entsprechend der embryonalen Rotationsbewegung der Hemisphären, bogenförmig nach hinten oben bis an das kaudale Ende des Balkens (*Corpus callosum*) heran. Unterhalb des Balkens setzt sich der Hippokampus in die Faserstruktur des *Fornix* fort, die letztendlich in den *Corpora mamillaria* endet (TREPPEL 2008).

Zusammen mit *Gyrus parahippocampalis* und *Gyrus dentatus* ist der Hippokampus Teil der sogenannten (sog.) Hippokampusformation und kann anhand eines Frontalschnitts makroskopisch weiter in den *Gyrus dentatus* und das Ammonshorn (*Cornu ammonis*, CA) unterteilt werden. Aufgrund der komplizierten embryonalen Entwicklung bilden CA und *Gyrus dentatus* zwei gebogene und ineinandergreifende U-förmige Blätter (siehe Abb. 5), bei denen sich das Ende des Hippokampus (CA 4-Region) zwischen die Wölbung des *Gyrus dentatus* schiebt (ASAN und NITSCH 2004, DUVERNOY 1998).



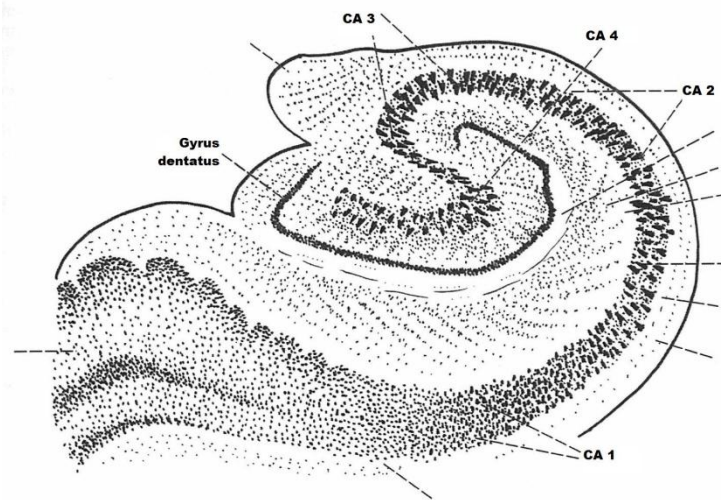
**Abb. 5 - Schematische Darstellung der räumlichen Anordnung von Ammonshorn und Gyrus dentatus**

CA = *Cornu ammonis*, GD = *Gyrus dentatus*  
Mod. nach DUVERNOY (1998)

Der zytoarchitektonische Aufbau der hippocampalen Strukturen ist annähernd identisch und zeigt einen dreischichtigen Aufbau mit einer zellulären mittleren Schicht, umgeben von zwei zellärmeren äußeren Schichten. Im oberen Bereich findet sich sowohl im *Gyrus dentatus* als auch im CA eine molekulare Zellschichtung (*Stratum moleculare*), die vor allem der interneuronalen Verschaltung dient. Das *Stratum granulare* ist im *Gyrus dentatus* der Bereich, in dem körnerzellartige Neurone lokalisiert sind. Diese mittlere Zellschicht besteht im Ammonshorn aus großen Pyramidenzellen (*Stratum pyramidale*). In beiden Regionen ist die unterste Zellschicht das *Stratum multiforme*. Die transversale Einteilung des Ammonshorns in vier Abschnitte (CA 1- bis CA 4-Region) orientiert sich am unterschiedlichen Aufbau der Pyramidenzellschicht (s.

Abb. 6). Sowohl die intrinsische Verschaltung als auch die Projektion afferenter und efferenter hippocampaler Neurone ist äußerst komplex (TREPEL 2008, ASAN und NITSCH 2004, ROHEN 2001).

Als Teil des limbischen Systems wird der Hippokampus mit endokrinen, viszeralen und emotionalen



**Abb. 6 - Mikroskopischer Frontalschnitt durch den Hippokampus**

Mod. nach TREPEL (2008)

Vorgängen in Verbindung gebracht. Darüber hinaus ist er entscheidend an der Überführung von Informationen aus dem Kurz- ins Langzeitgedächtnis beteiligt. Pathologische Bedeutung erhält der Hippokampus in einer Reihe von Erkrankungen, wie zum Beispiel (z. B.) Schizophrenie, Epilepsie, Morbus Alzheimer sowie im Zusammenhang mit Sucht- und Stimmungserkrankungen (TREPEL 2008, EISCH und HARBURG 2006).

Zur experimentellen Erforschung der zerebralen Ischämie ist der Hippokampus besonders geeignet, da Neurone in diesem Bereich des Gehirns, insbesondere in der CA 1-Region, auf eine Minderperfusion äußerst sensibel reagieren (PULSINELLI 1985).

### 1.2.1.5 Perfusion und Stoffwechsel

Obwohl das menschliche Gehirn eines Erwachsenen mit ca. 1,4 Kilogramm nur 2 % des Körpergewichts (KG) beträgt benötigt es mit 50 Milliliter (ml) Sauerstoff (O<sub>2</sub>) pro 100 Gramm (g) Gehirnmasse (GM) 20 % des Gesamtsauerstoffverbrauchs. Hierzu wird das Gehirn mit 750 ml Blut pro Minute (min) bzw. ca. 50 ml pro 100 g Hirngewebe und Minute durchblutet, was etwa 15 % des Herzzeitvolumens entspricht. Der Energiebedarf wird hauptsächlich über die Verstoffwechslung von Kohlenhydraten gedeckt. Da das ZNS jedoch kaum Glykogen speichert, ist eine kontinuierliche Glukosezufuhr für die Funktion des Gehirns essentiell (SCHESCHONKA *et al.* 2006).

Um eine adäquate und konstante Perfusion sicherzustellen sind zerebrale Arterien durch Autoregulation zur Veränderung ihres Durchmessers befähigt (Dilatation und Konstriktion). Die Mechanismen der Autoregulation orientieren sich sowohl an pH - Wert und Blutgasen als auch am systemischen Blutdruck. Gesunde Personen weisen eine konstante Gehirndurchblutung bei einem mittleren arteriellen Druck (MAP) zwischen 60 und 160 Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) auf. Autoregulatorische Vorgänge erlauben darüber hinaus eine unmittelbare Anpassung der regionalen zerebralen Perfusion an sich plötzlich ändernde Anforderungen des Sauerstoff- und Glukosebedarfs, wie sie bereits im Rahmen normaler Gehirnaktivität auftreten (OERTEL 2006).

Der Stoffwechsel des Gehirns kann grundsätzlich in Struktur- und Funktionsstoffwechsel unterteilt werden. Aufgabe des Strukturstoffwechsels ist die Aufrechterhaltung der Membranpotentiale und Ionengradienten, die Proteinbiosynthese sowie die Bereitstellung von Neurotransmittern. Mit 40 % ist sein Anteil am Gesamtstoffwechsel etwas niedriger als der des Funktionsstoffwechsels (60 %), welcher der Erregungsbildung, -weiterleitung und -verarbeitung dient (ADAMS und WERNER 1997).

Unterschreitet die zerebrale Perfusion einen Wert von 20 - 18 ml pro 100 g GM und min kommt der Funktionsstoffwechsel zum Erliegen und es erfolgt ein Sistieren der spontanen neuronalen Entladungen im Elektroenzephalogramm (EEG). Morphologische Veränderungen und Zelluntergänge sind in diesem Stadium noch nicht zu beobachten. Erst bei einer weiteren Reduktion der Hirndurchblutung auf weniger als 12 - 10 ml pro 100 g GM und min kommt es zum Ausfall des Strukturstoffwechsels mit der Folge des irreversiblen Zelluntergangs (SCHAIBLE 2001, KEMPSKI 2000, SIESJÖ 1992).

## 1.2.2 Zerebrale Ischämie

### 1.2.2.1 Definition

Unter zerebraler Ischämie versteht man die zirkulatorisch bedingte Unterversorgung oder völlige Unterbrechung der Gehirndurchblutung. Sie kann sowohl das gesamte Gehirn, einzelne Regionen oder spezifisch vulnerable Zellen betreffen. Die resultierende Dysbalance zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf führt zur Gewebshypoxie und kann in Folge der Akkumulation toxischer Stoffwechselmetabolite zum Zelltod führen (WERNER 2000).

### 1.2.2.2 Formen

Unterschieden wird zwischen fokaler und globaler zerebraler Ischämie. Beide Formen können sowohl temporär mit Reperfusion als auch permanent ohne Reperfusion auftreten und in komplette sowie inkomplette Ischämieformen differenziert werden.

Die fokale zerebrale Ischämie wird durch die Okklusion einer zerebralen Arterie verursacht, so dass die resultierende Minderperfusion nur spezifische Regionen des Gehirns betrifft. Klinische Beispiele für diese Art des Gefäßverschlusses sind der thrombotische oder embolische Schlaganfall. Sinkt die Durchblutung im Kernbereich eines solchen Infarkts unter den kritischen Wert von 25 % der normalen Perfusion, führt dies zu einem irreversiblen neuronalen Schaden und konsekutiv zur Narbenbildung. Dahingegen ist der Randbereich eines Infarkts, die sogenannte *Penumbra*, durch eine zunächst noch reversible Funktionseinschränkung der Neurone gekennzeichnet. Diese Neurone sind, im Gegensatz zu denen des Kerngebietes, bei ausreichender und zeitnaher Reperfusion potentiell überlebensfähig (SCHAIBLE 2001). Charakteristisch für die Zellen der *Penumbra* ist, dass sie aufgrund der reduzierten Durchblutung ihre Funktion zunächst lediglich reversibel und unter Erhalt ihrer Membranpotentiale sowie der zellulären Ionenhomöostase einschränken. Erst mit dem Ausbleiben einer adäquaten Reperfusion kommt es zur Einleitung des programmierten Zelltods (Apoptose; KEMPSKI 2000).

Die globale Ischämie kann abhängig davon, ob eine residuale Durchblutung noch vorhanden ist oder nicht, in eine inkomplette und komplette Form unterteilt werden. Mögliche Ursachen einer inkompletten globalen Ischämie sind Herzrhythmusstörungen, große Blutverluste mit

Blutdruckabfall sowie Perfusionsstörungen, die im Rahmen eines diffusen Hirnödems durch die Steigerung des intrakraniellen Drucks entstehen. In diesen Fällen ist eine Restperfusion erhalten. Zu einer kompletten globalen Ischämie kommt es beispielsweise im Rahmen eines Herz-Kreislauf-Stillstands. Diese beiden Ischämieformen betreffen das gesamte Gehirn und werden zum Teil nur wenige Minuten vom Organismus toleriert. Histologische Untersuchungen haben dabei eine unterschiedliche Vulnerabilität der Neurone verschiedener Hirnareale gezeigt. Zu den Nervenzellgruppen, die im Rahmen einer globalen zerebralen Ischämie als erstes zu Grunde gehen, zählen die Pyramidenzellen der CA 1-Region des Hippokampus und die Zellschichten III und V des *Cortex cerebri* (SQUIRE und ZOLA 1996).

### 1.2.2.3 Pathophysiologie

Die pathophysiologischen Zusammenhänge der zerebralen Ischämie sind komplex und bestehen im Wesentlichen aus Energiemangel, Ödembildung, Entzündungsreaktion, Störung der Blut-Hirn-Schranke, Exzitotoxizität sowie der Bildung freier Radikale. In Ermangelung eines Substratspeichers sind die zerebralen Zellen auf eine kontinuierliche Zufuhr von Glukose und Sauerstoff angewiesen, um ihre Vitalität und Funktion aufrecht zu erhalten. Dies ist die Ursache für die extreme Empfindlichkeit neuronalen Gewebes gegenüber geringen Perfusionsstörungen. Im Rahmen der gestörten Mikrozirkulation ist die Zufuhr energiereicher Substrate und damit die Adenosintriphosphat-(ATP-)Produktion des Gehirns reduziert. Unter aeroben Verhältnissen bilden glykolytische Enzyme der Mitochondrien aus 1 Mol Glukose 36 Mol ATP, unter anaeroben Bedingungen nur 2 Mol. Durch die zwangsläufige Umstellung des Stoffwechsels auf anaerobe Glykolyse kann der Organismus den Energiebedarf der neuronalen Zellen nicht mehr decken, was bei einer Reduktion der zerebralen Durchblutung auf unter 10 - 12 ml / 100 g GM / min zu einem Verbrauch des zerebralen ATP innerhalb von 20 Sekunden (sec) führt (OERTEL 2006, KEMPSKI 2000).

In Folge des ATP-Mangels kommt es zum Zusammenbruch des membranstabilisierenden Ionengradienten und zum Anstieg der extrazellulären Kalium- ( $K^+$ ) sowie der intrazellulären Natrium- ( $Na^+$ ) und Clorid- ( $Cl^-$ ) Konzentration. Es resultiert ein unkontrollierter Wassereinstrom in den Intrazellularraum der Nervenzellen mit Zellhydrops und Ödembildung. Über den verminderten Abtransport toxischer Metabolite führt die anaerobe Stoffwechsellage zu einer Laktatanhäufung und zu einem Abfall des intrazellulären pH-

Wertes auf bis zu 6,2. Die somit entstandene *Azidose* bewirkt eine weitere Beeinträchtigung der Zellpermeabilität (SIESJÖ 1992).

Über eine andauernde Depolarisation führt die Störung der neuronalen Ionengradienten einerseits zur massiven Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat und andererseits durch eine gleichzeitig verminderte Wiederaufnahme zu stark erhöhten extrazellulären Konzentrationen (Exzitotoxizität). Diese bewirkt nun über Stimulation der glutaminergen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)- und Amino-Hydroxy-Methylisoxazol-Propionsäure (AMPA)- Rezeptoren einen verstärkten Kalzium- ( $\text{Ca}^{2+}$ ) Influx in die Zelle. Eine solch massive Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration setzt eine Reihe zytoplasmatischer und nukleärer Prozesse in Gang, welche erheblich zur Gewebsschädigung beitragen (OERTEL 2006). Die hierzu zählende Zerstörung von Proteinen, Lipiden und (Desoxyribonukleinsäure) DNS, die Produktion freier Radikale und der Zusammenbruch der Lipidmembran können schließlich den nekrotischen Zelltod kurze Zeit nach Beginn der zerebralen Ischämie bedingen (KAWAGUCHI *et al.* 2005).

Die Bildung freier Radikale, vor allem (v. a.) Sauerstoff- und Stickstoffmonoxidradikale, führt über den strukturellen Schaden hinaus auch zur Aktivierung inflammatorischer Zellen wie Mikroglia und Leukozyten, die als Mediatoren des sekundären Hirnschadens gelten (GRAHAM und LANTOS 1997).

Nach einer zerebralen Ischämie kann das Absterben von Gehirnzellen durch Nekrose oder Apoptose erfolgen. Der apoptotische Zelltod ist ein energieabhängiger Prozess, der den sukzessiven und kontrollierten Zellabbau über Tage hinweg zur Folge hat. Da der ischämische Schaden in der *Penumbra* geringer ist, erfolgt hier der Zelluntergang meist durch Apoptose. In stärker ischämisch betroffenen Gebieten und in der Frühphase einer zerebralen Perfusionsstörung stellt die Nekrose den dominierenden Mechanismus des Zelltodes dar.

#### 1.2.2.4 Tiermodelle

Um die komplexen Vorgänge und Auswirkungen der zerebralen Ischämie auf das Gehirn zu charakterisieren sind biologische, pathologische und histologische Untersuchungen im Tierversuch notwendig. Aus einer Reihe von Gründen (wie z. B. geringe Kosten, einfache Tierhaltung, breitere gesellschaftliche Akzeptanz) werden heute für Studien der zerebralen Ischämie bevorzugt Laborratten verwendet, es wird jedoch auch an verschiedenen anderen

Tierspezies geforscht (u. a. Schwein, Hund, Katze). Die Vergleichbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse ist dabei nur gewährleistet, wenn reproduzierbare tierexperimentelle Studien unter standardisierten Bedingungen zur Anwendung kommen. Hierzu ist es u. a. von Bedeutung, dass eine Kontrolle der physiologischen Daten erfolgt (GINSBERG und BUSTO 1989).

In den vergangenen Jahrzehnten wurde eine Reihe von Tiermodellen etabliert, die sich entsprechend der in Kapitel (Kap.) 1.2.2.2 dargestellten Ischämieformen einteilen lassen. Die verschiedenen Verfahren zur Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie unterscheiden sich in der Art und Weise des Gefäßverschlusses sowie in der Wahl der zu verschließenden Arterie. Am häufigsten kommt eine Okklusion der *A. cerebri media* (MCAO) zur Anwendung. Da die *A. cerebri media* aufgrund ihres anatomischen Verlaufs als Fortsetzung der *A. carotis interna* im Rahmen eines Schlaganfalls sehr häufig betroffen ist, weist die Forschung hier besondere klinische Relevanz auf.

Modelle der globalen Ischämie unterscheiden sich dahingehend, ob eine inkomplette oder komplette Ischämie mit oder ohne Reperfusion erzeugt wird. Die einfachste Möglichkeit der Induktion globaler Ischämie ohne Reperfusion stellt die Dekapitation dar (LOWRY *et al.* 1964). Durch artifizielle Induktion eines Herz-Kreislauf-Stillstands mit anschließender Reanimation kann eine komplette globale Ischämie mit Reperfusion simuliert werden. Der Zusammenbruch der Kreislauffunktion wird dabei entweder durch eine intrakardiale Injektion von Kaliumchlorid (NAKASHIMA *et al.* 1995) oder durch künstlich erzeugtes Kammerflimmern herbeigeführt (BERKOWITZ *et al.* 1991).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell der inkompletten globalen Ischämie basiert auf der sog. two-vessel-occlusion (2-VO). Dieses Prinzip besteht in der Kombination eines beidseitigen temporären Verschlusses der *A. carotis communis* (**Beidseitige-Arteria-Carotis-Okklusion**, BACO) mit einer durch Pharmaka oder Blutentzug generierten systemischen Hypotension (MAP 30 – 50 mmHg, KAGSTROM *et al.* 1983, EKLÖF und SIESJÖ 1972). In Anlehnung an dieses Verfahren etablierten PULSINELLI und BRIERLEY 1979 die Methode der four-vessel-occlusion (4-VO) im Rattenmodell. Im Rahmen eines operativen Eingriffs erfolgt hier die Okklusion der *Aa. vertebrales* mittels Elektrokauter und das Anbringen von Gefäßligaturen oder -klemmen an den *Aa. carotides communes*, die beliebig verschlossen werden können. Sowohl bei der 2-VO als auch der 4-VO betrifft der ischämische Schaden zunächst selektiv die besonders vulnerable Pyramidenzellschicht der CA 1-Region des Hippokampus (PULSINELLI 1985).

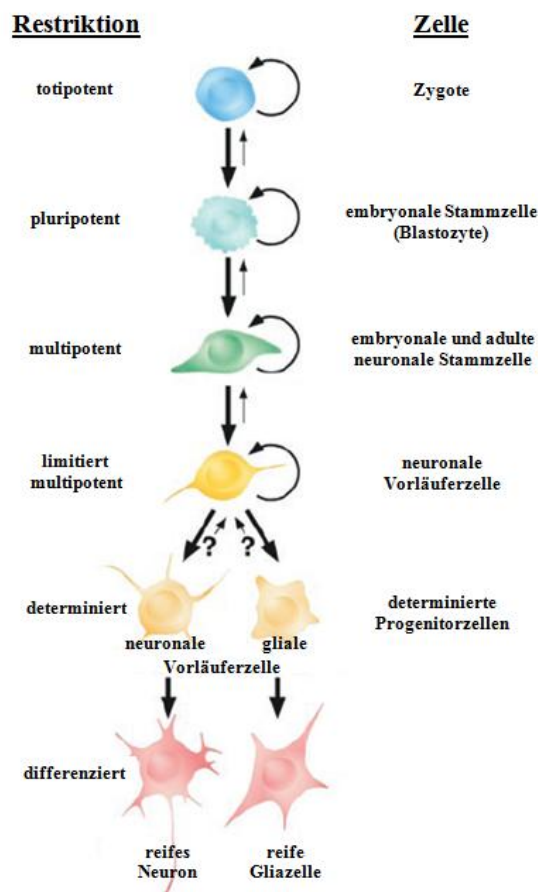
### 1.2.3 Stammzellen

#### 1.2.3.1 Definition

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die durch asymmetrische Teilung gleichzeitig die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Genese von Tochterzellen verschiedener Zelllinien besitzen. Sie sind somit unspezialisierte bzw. unreife Zellen, die sich entweder in einem Ruhestadium befinden oder in ihrer weiteren Entwicklung durch die aktuellen Umgebungsbedingungen beeinflusst werden. Das Differenzierungspotential der Stammzellen bestimmt die Vielfalt an Tochterzelllinien und wird mit jeder Zellteilung restriktiver (s. Abb. 7). Totipotenten Stammzellen obliegt die Genese eines vollständigen Organismus. Mit fortschreitender Differenzierung und Spezialisierung ist es pluripotenten Stammzellen noch

möglich, mit Ausnahme des Trophoblasten alle weiteren Zellen des Organismus zu bilden. Multipotenten Stammzellen obliegt lediglich die Genese jeder Zelle des Organs, von welchem sie selbst abstammen. Mit jeder Zellteilung entstehen Vorläuferzellen (progenitor cells), die in ihrem Entwicklungspotential eingeschränkter sind als die ursprüngliche Stammzelle (GAGE 2000).

Diese Vorläuferzellen entwickeln sich schließlich zu reifen (maturen) Zellen mit der jeweils charakteristischen Form und Funktion des spezialisierten Zelltyps. Ihre physiologische Aufgabe besteht in der Erneuerung geschädigter und abgestorbener Zellen, um so Integrität und Funktion des Gewebes aufrechtzuerhalten (WELSCH 2006).



**Abb. 7 - Differenzierungspotential von Stamm- und Progenitorzellen**

Modifiziert nach GAGE (2000)



### 1.2.3.2 Embryonale Stammzellen

Unter dem Begriff „embryonale Stammzellen“ versteht man insbesondere die pluripotenten Zellen der Blastozyste, die noch ein sehr breites Entwicklungsspektrum besitzen. Sie finden sich ab dem vierten Entwicklungstag in der inneren Zellmasse des Blastozysten und generieren sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Zellen aller drei Keimblätter (Ento-, Meso- und Ektoderm). Die Zellen, die zuvor aus der befruchteten Eizelle (Zygote) hervorgegangen sind, bleiben bis zum Achtzellstadium am dritten Embryonaltag totipotent (WELSCH 2006, HAAS *et al.* 2005). Die Gewinnung humaner embryonaler Stammzellen zu wissenschaftlichen oder therapeutischen Zwecken ist durch ethische, biologische und rechtliche Aspekte limitiert und in Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz verboten (BUNDESMINISTERIUM DER JUSTIZ 2008, HAAS *et al.* 2005).

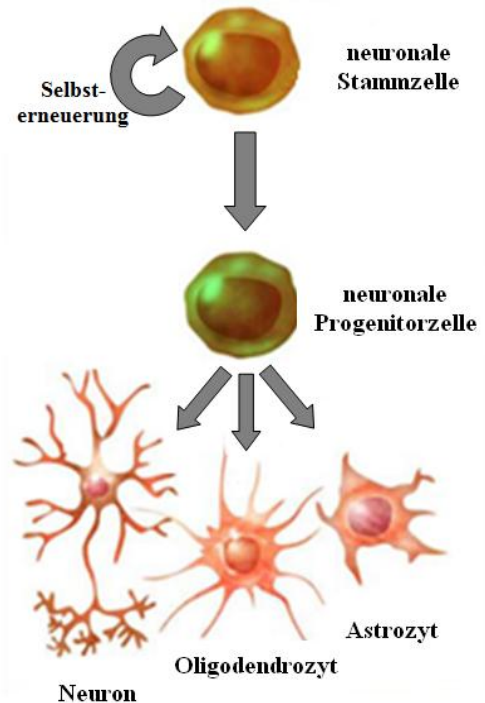
### 1.2.3.3 Adulte Stammzellen

Als adulte Stammzellen bezeichnet man undifferenzierte Zellen in den Organen des erwachsenen Organismus, die sich einerseits selbst erneuern und sich andererseits in die spezialisierten Zelltypen des betreffenden Organs / Gewebes differenzieren können. Der Nachweis solcher adulter Stammzellen wurde bisher u. a. für die Haut, die Muskulatur, den Gastrointestinaltrakt und für das Nervensystem erbracht (WELSCH 2006). Seit der Entdeckung und Kultivierung humaner Stammzellen haben Wissenschaftler damit begonnen, die Möglichkeiten und Faktoren der Einflussnahme auf die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen zu untersuchen. Dahinter steckt die Hoffnung auf neue Therapiemöglichkeiten für eine Vielzahl von Erkrankungen und Verletzungen (z. B. Diabetes mellitus, traumatische und ischämische neuronale Schädigung, kardiovaskuläre und maligne Erkrankungen). Grundlage dafür könnte die Nutzung des regenerativen Potentials sowohl von embryonalen als auch von adulten Stammzellen sein. Bisläng am besten erforscht und seit Jahren im routinemäßigen klinischen Einsatz sind die hämatopoetischen Stammzellen. Durch gezielte *in-vitro*-Stimulation dieser körpereigenen Zellen ist es möglich, die Differenzierung zu stimulieren und dadurch Patienten mit Dysfunktionen des blutbildenden Systems oder des Immunsystems kausal zu therapieren (WELSCH 2006, ALISON *et al.* 2002).

### 1.2.3.4 Neuronale Stammzellen

Multipotente neuronale Stammzellen persistieren über die embryonale Entwicklung hinaus lebenslang im adulten Gehirn und zeichnen sich durch die Nachkommenschaft neuronaler und glialer Progenitorzellen aus. Ausgehend von ihnen findet Neurogenese im erwachsenen Gehirn v. a. in zwei Regionen statt: In der SVZ des Seitenventrikels und in der SGZ des GD (ERIKKSON *et al.* 1998, CAMERON und GOULD 1994).

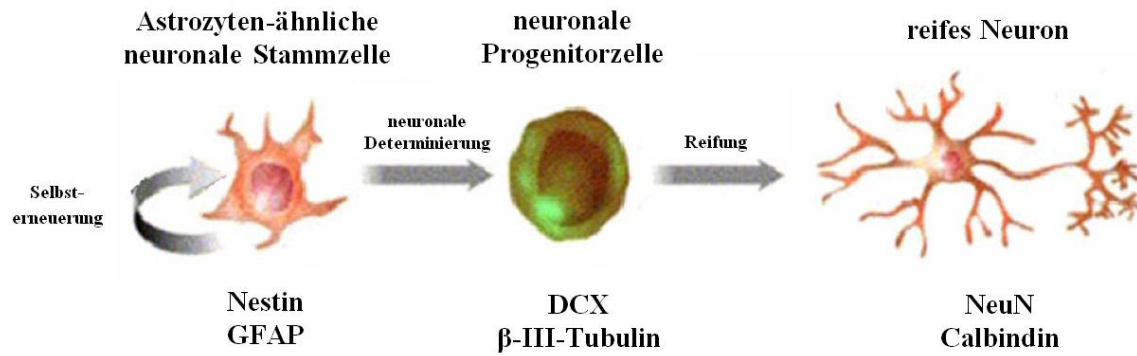
Als Ursprungszellen neu generierter Neurone beschrieben ALVAREZ-BUYLLA *et al.* (2002) Astrozyten-ähnliche Zellen im Gehirn adulter Säuger. Diese sind vermutlich für die Bildung und Erhaltung der Neurone verantwortlich und besitzen die Fähigkeit, sich in die verschiedenen Zelltypen (Neurone und Gliazellen, siehe Abb. 8) des ZNS differenzieren zu können (TAUPIN 2006, DOETSCH 2003). Neuronale Stammzellen konnten des Weiteren im *Striatum*, im Rückenmark, im Neokortex und in der *Substantia nigra* lokalisiert werden. Darüber



**Abb. 8 - Entwicklung von Nerven- und verschiedener Gliazellen im adulten Gehirn**  
Mod. nach TAUPIN (2006)

hinaus wurde ihre Fähigkeit, sich nach Isolierung und Transplantation in die SGZ oder in die SVZ zu Neuronen zu differenzieren, nachgewiesen (LIE *et al.* 2002).

Die Identifizierung spezieller Zellpopulationen erfolgt heute meist unter Verwendung histologischer Färbetechniken am entnommenen Gewebepreparat und unter Einsatz zellspezifischer Marker. Hierbei macht man sich das Wissen um charakteristische, nur in der entsprechenden Zellreihe und zum gewünschten Entwicklungszeitpunkt exprimierte Zellstrukturen und Proteine zunutze, die *in vivo* und *in vitro* mittels spezifischer Antikörper (AK) markiert und nach Gewebsentnahme dargestellt werden können. Es existiert eine Vielzahl an Markern, die zu verschiedenen Zeitpunkten den jeweiligen Entwicklungsschritt von der neuronalen Stammzelle über Progenitorzellen bis hin zum reifen Neuron nachvollziehen lassen (s. Abb. 9). Hierzu gehören u. a. Nestin, *glial-fibrillary-acidic-protein* (GFAP), *Doublecortin* (DCX) und  $\beta$ -III-Tubulin, die entsprechend der Zelldifferenzierung exprimiert werden (SCHEFFLER *et al.* 2005, NACHER *et al.* 2001).



**Abb. 9 - Markersubstanzen neuronaler Stamm- und Progenitorzellen sowie reifer Neurone**

Mod. nach STALLMANN (2008) und TAUPIN (2006)

Mit dem Rückgang der Expression von DCX im Differenzierungsprozess neuronaler Progenitorzellen wird die Expression derjenigen Marker, die reife Neurone charakterisieren, gesteigert. Hierzu zählen insbesondere das *calcium-binding-protein* (Calbindin) und *neuronal-specific-nuclear-protein* (NeuN), ein Kernprotein reifer Neurone. Nach Migration in das *Stratum granulare* des GD weisen 80 % der neu generierten Neurone nach drei Wochen reife und 10 % weiterhin unreife Marker auf (BROWN *et al.* 2003, MULLEN 1992). Während Calbindin mit Ausnahme von Interneuronen alle postmitotischen Neuronentypen im Bereich des GD markiert, erfasst NeuN zusätzlich auch Interneurone (MAGAVI *et al.* 2000).

#### 1.2.4 Neurogenese

Der Begriff Neurogenese bezeichnet die Entstehung und Entwicklung von Nervenzellen. Lange Zeit galt das Dogma, das Nervensystem ausgewachsener Säugetiere sei postmitotisch und somit nicht mehr in der Lage, neue Nervenzellen hervorzubringen. Die Wissenschaft nahm an, alle Nervenzellen würden während der Embryogenese sowie in einer kurzen postnatalen Zeitspanne gebildet und ihre Anzahl unterliege von da an einem stetigen Niedergang ohne regeneratives Potential (SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL 1906 und 1928). Erst vor knapp zehn Jahren gelang es ERIKSSON *et al.* (1998) den Nachweis über Neurogenese im erwachsenen menschlichen Gehirn zu erbringen.

#### 1.2.4.1 Embryonale Neurogenese

Ausgehend von neuroepithelialen Stammzellen im Wandbereich des zerebralen Ventrikels findet im menschlichen Embryo die Neurogenese ungefähr im Zeitraum zwischen fünfter Gestationswoche und fünftem Gestationsmonat statt (MEYER *et al.* 2000). Sowohl Neuro- als auch Gliogenese nehmen ihren Ausgang in den als radiäre Glia bezeichneten ersten abgrenzbaren neuronalen Stammzellen. Diese bipolaren Zellen liegen in der ventrikulären Zone und proliferieren bis zur Geburt. Etwa zeitgleich mit dem Maximum der embryonalen Neurogenese in der Mitte der fetalen Entwicklung entsteht eine zweite germinale Region, die SVZ. Diese persistiert funktionell und histologisch im adulten Organismus, während die ventrikuläre Zone perinatal involuiert (COUILLARD-DESPRES *et al.* 2001, CAMERON *et al.* 1995). Nach erfolgter Differenzierung der embryonalen neuronalen Progenitorzellen (vergleiche (vgl.) Abb. 7) kommt es zur radiären Migration dieser Zellen zu ihrem definitiven Standort. Im komplexen dreidimensionalen Gebilde des menschlichen Gehirns entsteht auf diese Weise letztendlich der *Cortex cerebri*. Die embryonale radiäre Glia wandelt sich gegen Ende der Fetalperiode in Astrozyten des *Cortex*, der SGZ und der SVZ des adulten Gehirns (DOETSCH 2003, COUILLARD-DESPRES *et al.* 2001).

#### 1.2.4.2 Adulte Neurogenese

Das von CAJAL und anderen postulierte Dogma des irreversiblen Nervenzellverlusts im adulten Gehirn stand lange Zeit im Gegensatz zur Fähigkeit vieler anderer Organe, ihre Struktur und Funktion durch lebenslange Zellteilung aufrecht zu erhalten. Erste Hinweise darauf, dass eine Neubildung von Nervenzellen auch über die Embryogenese hinaus möglich sein könnte, stammen von ALLEN, der 1912 über Zellteilungsvorgänge im lateralen Ventrikel adulter Albinoratten berichtete. Über 50 Jahre später konnten mittels autoradiographischer (ALTMAN und DAS 1965) und elektronenmikroskopischer Methoden (KAPLAN und HINDS 1977) weitere Hinweise für postnatale Neurogenese gefunden werden, die ihrer Zeit jedoch wenig Beachtung fanden. Erst durch die Entwicklung immunhistochemischer Alternativmethoden zur bisher verwendeten radioaktiven Markierung proliferierender Zellen konnte das Wissen um die Neurogenese im adulten Säugetierhirn bestätigt und erweitert werden, z. B. durch eine Methode, mit deren Hilfe sich proliferierende Zellen markieren und mittels spezifischer Antikörper darstellen lassen (GRATZNER 1982). Das Thymidin-Analogon

5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) kann in die DNS aller sich in der Synthese-Phase (S-Phase) der Mitose befindlichen Zellen eingebracht werden. Auch die Kennzeichnung von Zellen mittels retroviral induzierter Genexpression (PRICE *et al.* 1987) führte zu einem erheblichen Zuwachs an Erkenntnissen über Migrationsmuster und die Einbindung adult-generierter Nervenzellen in bestehende Neuronenkreise (VAN PRAAG *et al.* 2002, LOIS und ALVAREZ-BUYLLA 1994).

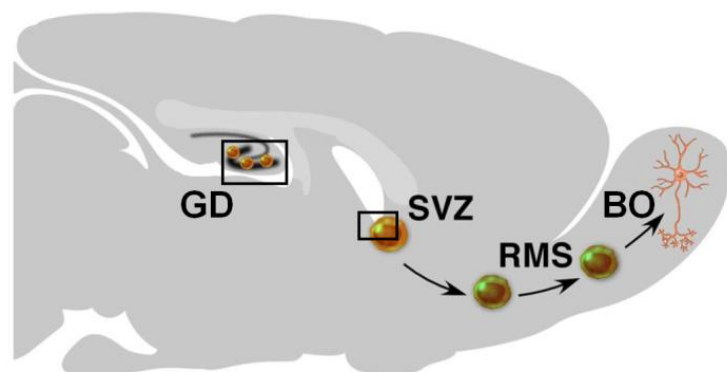
Die Proliferation neuronaler Stammzellen findet hauptsächlich in zwei Bereichen des ausgewachsenen Gehirns statt, nämlich in der SGZ des GD und der SVZ des Seitenventrikels. Ablauf und Differenzierungspotential entsprechen dabei denen der embryonalen Entwicklung. Diese Zellen besitzen sowohl das Potential zur Migration in andere Bereiche des ZNS als auch zur Ausbildung funktioneller synaptischer Verbindungen zu bestehenden neuronalen Netzwerken (MING und SONG 2005, DOETSCH *et al.* 1997). Verglichen mit der Menge existierender Neurone führt die adulte Neurogenese jedoch nur in begrenztem Ausmaß zur Integration neuer Nervenzellen, da ein Großteil neu gebildeter Zellen u. a. durch Apoptose eliminiert wird (BIEBL *et al.* 2000).

Die subventrikuläre Zone stellt ontogenetisch ein Residuum der Wand des Neuralrohrs dar und behält zeitlebens ihr neurogenetisches Potential bei. Neuronale Vorläuferzellen wandern bei Ratten aus der SVZ entlang des Rostralen Migrationsstroms (RMS) in den *Bulbus olfactorius* ein (s. Abb. 10) und differenzieren sich dort zu zwei Arten inhibitorischer

Neurone, den granulären und den periglomerulären Zellen (DOETSCH 2003). Pro Tag wandern bei Nagern ca. 30.000 neuronale Progenitorzellen im RMS und können so innerhalb von wenigen Wochen 70 % der bulbären Nervenzellen ersetzen.

Diese Regenerationsprozesse scheinen große Bedeutung für das olfaktorische Gedächtnis und die Geruchsdiskriminierung dieser Tiere zu besitzen (TEMPLE und

ALVAREZ-BUYLLA 1999). Beim Menschen finden sich in der SVZ ebenfalls neuronale Stamm- und Progenitorzellen mit der Fähigkeit, vor ihrer Ausdifferenzierung in andere



**Abb. 10 - Zonen adulter Neurogenese sowie Migration und Differenzierung im Bulbus olfactorius**

GD = Gyrus dentatus, SVZ = subventrikuläre Zone, RMS = rostraler Migrationsstrom, BO = Bulbus olfactorius

Mod. nach TAUPIN (2006)

Hirnregionen, wie *Striatum* und CA 1-Region des Hippokampus, zu migrieren (ERIKSSON *et al.* 1998, LOIS und ALVAREZ-BUYLLA 1994).

Die zweite germinative Zone findet sich bei Mensch und Tieren im *Gyrus dentatus* der Hippokampusformation. Auch hier geht die adulte Neurogenese von Astrozyten-ähnlichen Vorläufern aus, deren Somata zwischen *Stratum granulare* und dem hippokampalen Hilus in der SGZ liegen. Im Gegensatz zur SVZ migrieren die hier gebildeten Progenitorzellen nur über eine kurze Distanz ins *Stratum granulare* und differenzieren sich dort zu muren exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen (DOETSCH 2003, CAMERON *et al.* 1993). Nach Wachstum von Axonen in die Moosfaserschicht der CA 3-Region und Integration der Dendriten ins *Stratum granulare* kommt es zur Aufnahme synaptischer Aktivität und zur funktionellen Integration in das neuronale Netzwerk (LAPLAGNE *et al.* 2006, VAN PRAAG *et al.* 2002). Es wird vermutet, dass die neu gebildeten Neurone eine Rolle in hippokampus-abhängigen Gedächtnis- und Lernprozessen spielen (SHORS *et al.* 2001).

#### 1.2.4.3 Einflussfaktoren

Ebenso wie viele andere Stoffwechsel- und Zellteilungsvorgänge im lebenden Organismus unterliegt auch die Neurogenese dem Einfluss endogener und exogener Faktoren. Aktuelle Forschungsarbeiten bemühen sich diese Faktoren und Mechanismen zu identifizieren, um im therapeutischen Sinne Einfluss auf die Neurogenese nehmen zu können.

In Studien an Mäusen konnte gezeigt werden, dass die adulte hippokampale Neurogenese durch eine Stimulation von Sinneseindrücken (sog. „enriched environment“) gesteigert werden kann und ihr darüber hinaus eine genetische Prädisposition zu Grunde liegt (KEMPERMANN *et al.* 1997).

Durch den Einsatz spezieller Wachstumsfaktoren ist es außerdem möglich, die Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen zu beeinflussen. In einer Studie an 30 männlichen Ratten zeigten KUHN *et al.* 1997, dass sowohl die interventrikuläre Injektion von EGF (epidermal growth factor) als auch von FGF-2 (fibroblast growth factor 2) eine erhöhte Proliferation der SVZ bewirkt. Dabei führte EGF zu einer gesteigerten Differenzierung der Progenitorzellen zu Gliazellen, FGF-2 jedoch zur verstärkten Ausbildung neuer Neurone.

Die adulte Neurogenese wird zudem durch eine Reihe pathologischer Läsionen des Gehirns gesteigert, wie z. B. durch Schädel-Hirn-Traumata und epileptische Anfälle (PARENT *et al.*

1997). Auch die zerebrale Ischämie führt zur gesteigerten Proliferation und Differenzierung neuronaler Stammzellen wobei diese Prozesse sowohl für fokale wie globale Ischämieformen ähnlich zu sein scheinen. Über Stimulation Gamma-Amino-Buttersäure-(GABA-)erger Interneurone bewirkt die zerebrale Ischämie eine Aktivierung von Progenitorzellen im GD sowie deren Migration und neuronale Differenzierung. Einige Anästhetika, wie z. B. Sevofluran, führen ebenfalls zur gesteigerten Neurogenese, was möglicherweise auf deren Interaktion mit GABA-Rezeptoren zurückzuführen ist (ENGELHARD *et al.* 2007).

Eine bedeutende Rolle kommt auch dem Zelltod zu, der als zentraler Stimulus von Proliferation und Migration neuronaler Vorläuferzellen zum Ort der Schädigung identifiziert werden konnte (KEE *et al.* 2001, LIU *et al.* 1998).

Verglichen mit der Anzahl untergegangener Neurone scheint das Ausmaß der Neurogenese nur sehr begrenzt zu sein. Über 80 % der postischämisch gebildeten Nervenzellen sterben innerhalb der ersten sechs Wochen ab und letztendlich werden nur 0,2 % der zerstörten Neurone ersetzt. Neben der weiteren Identifizierung und Beeinflussung neurogenetischer Faktoren *in vivo* könnte auch die *in-vitro*-Stimulation mit autologer Transplantation neuronaler Stammzellen therapeutische Optionen der neuronalen Regeneration eröffnen (HAAS *et al.* 2005).

Während Faktoren wie steigendes Lebensalter, Stress und Depression zu einer Suppression der Neurogenese bewirken, können verschiedene Neurotransmitter, Hormone und Medikamente in Abhängigkeit von Wirkmechanismus und Dosis stimulierend oder hemmend wirken.

## 1.2.5 Hypothermie

### 1.2.5.1 Definition

Ein Regelkreis mit dem *Hypothalamus* als zentralem Steuerelement (v. a. der *Area hypothalamica posterior*) hält die Körpertemperatur im menschliche Organismus konstant bei Werten zwischen 36,5 und 37,0 °C. Der Begriff „Hypothermie“ ist im medizinischen Sprachgebrauch definiert als ein Absinken oder eine Senkung der Körpertemperatur unter den physiologischen Bereich. (PSCHYREMBEL 2007, SIMON 2000)

### 1.2.5.2 Formen

Im Laufe der Zeit haben sich mehrere Einteilungen und Differenzierungen der Hypothermie etabliert. Unter ätiologischen Gesichtspunkten lassen sich drei Formen unterscheiden:

- 1) Körpertemperatur unterhalb des Normwertes (z. B. im Rahmen einer Hypothyreose oder Kachexie)
- 2) Akzidentelle Hypothermie
- 3) Kontrollierte Hypothermie durch aktive Senkung der Körpertemperatur

Fälle von akzidenteller Hypothermie sind gehäuft im Rahmen von Kälteexposition bei Berg-, Ertrinkungs- und Tauchunfällen zu beobachten, treten aber auch mit einer Inzidenz von bis zu 50 % im Kollektiv aller Traumapatienten auf (HELM *et al.* 1995). Die Einschätzung des Ausmaßes einer Hypothermie orientiert sich zumeist an der gemessenen Körperkerntemperatur. In der internationalen Literatur existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Klassifikationen und Einteilungen, die sich an verschiedenen Temperaturgrenzen und klinischen Symptomen orientieren. Im Rahmen neuroprotektiver Interventionen wird die therapeutische Hypothermie in folgende Temperaturbereiche eingeteilt: Milde (36 - 34 °C), moderate (33 - 29 °C), tiefe (28 - 17 °C) und profunde (16 - 4 °C) Hypothermie (WERNER 1997). Des Weiteren kann man Hypothermie je nach Zeitpunkt in prä-, intra- und postischämische Formen einteilen.

### 1.2.5.3 Neuroprotektion

Bereits seit einigen Jahrzehnten ist bekannt, dass eine Senkung der Körperkerntemperatur bzw. der intrazerebralen Temperatur den histologischen und neurologischen Schaden im Falle einer ischämischen / hypoxischen Hirnschädigung reduziert. Viele der protektiven Effekte sind auf eine Verminderung der pathophysiologischen Ischämiefolgen zurückzuführen, z. B. Abnahme des zerebralen Stoffwechsels, Reduktion der Bildung freier Radikale, anti-inflammatorische Effekte sowie verzögerter Verlust der Ionengradienten. Hierdurch wird einerseits die Ischämietoleranz der Organe erhöht und andererseits die sekundäre Hirnschädigung verringert (FROEHLER und GEOCADIN 2007, BRÜX *et al.* 2005). Wie bereits in Kap. 1.2.2.3 dargestellt, erfolgt die neuronale Gewebsschädigung u. a. durch Exzitotoxizität. Es konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass bei globaler zerebraler Ischämie die Glutamat-Konzentration den Ausgangswert nicht überschreitet wenn die Versuchstiere auf



33 °C gekühlt werden (BUSTO *et al.* 1989). Hypothermie führt außerdem zu einer Reduktion pro-apoptotischer Proteine nach zerebraler Ischämie (EBERSPÄCHER *et al.* 2003). Eine Öffnung der Blut-Hirn-Schranke mit konsekutiver Ausbildung eines intrakraniellen Ödems wird vermutlich ebenfalls durch Hypothermie günstig beeinflusst (KARIBE *et al.* 1994).

#### 1.2.5.4 Therapeutische Hypothermie

Erste Fallbeschreibungen der klinischen Anwendung therapeutischer Hypothermie datieren aus den 1940er-Jahren (FAY 1943). Damit verbunden waren jedoch oft schwerwiegende Nebenwirkungen mit nicht beherrschbaren Komplikationen, so dass die Therapieform in den folgenden Jahrzehnten wieder verlassen wurde. Erst seit der Durchführung moderner herz- und gefäßchirurgischer Eingriffe wird das Prinzip der intraoperativen Hypothermie in der klinischen Routine zur Verlängerung der Ischämietoleranz von Organen eingesetzt (BRÜX *et al.* 2005).

Im Jahre 2002 konnte in Studien gezeigt werden, dass auch eine post-ischämische Kühlung die neurologische Funktion von Patienten mit überlebtem Herz-Kreislauf-Stillstand deutlich verbessern kann (THE HYPOTHERMIA AFTER CARDIAC ARREST STUDY GROUP 2002). Darüber hinaus führt eine post-ischämische Hypothermie auch an Neugeborenen mit hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie zur Senkung des Mortalitätsrisiko und des Grades der Behinderung (GLUCKMAN *et al.* 2005). Somit stellt die kontrollierte Hypothermie eine etablierte Therapieform in der klinischen Intensivmedizin dar und wird seit drei Jahren in den Leitlinien zur Therapie von Patienten nach Herz-Kreislauf-Stillstand ausdrücklich empfohlen (Kühlung auf 32 - 34 °C für 12 - 24 Stunden (h), NOLAN *et al.* 2005). Zu beachten sind jedoch Nebenwirkungen, die im Rahmen einer therapeutischen Hypothermie einer strengen Überwachung und adäquaten Therapie bedürfen. Neben einer allgemeinen Sympathikusaktivierung können Elektrolytstörungen, Gerinnungsstörungen, Hypotonie, unkontrolliertes Muskelzittern sowie kardiale Rhythmusstörungen auftreten (BRÜX *et al.* 2005). Zur Sicherung des Therapieerfolgs ist ferner eine langsame und kontrollierte Wiedererwärmung der Patienten von Bedeutung (0,2 - 0,5 °C/h nach Herz-Kreislauf-Stillstand, noch langsamer nach traumatischer Hirnschädigung). Sowohl in der klinischen Praxis als auch zu Forschungszwecken wird meist eine milde oder moderate Hypothermie angewandt, da eine zu starke Senkung der Temperatur in Tierversuchen zu schlechteren histologischen wie neurologischen Ergebnissen führte (POLDERMAN 2008).

## 2 ZIEL DER UNTERSUCHUNG

Eine Vielzahl experimenteller Studien konnte bisher die Reduktion des neuronalen Schadens und die Verbesserung der neurologischen Funktion nach intraischämischer Hypothermie zeigen. Es ist möglich, dass ein verbessertes neurologisches Ergebnis auch auf einer gesteigerten Neurogenese beruhen könnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Effekte therapeutischer intraischämischer Hypothermie auf Proliferation, Differenzierung und Überleben neuronaler Stammzellen 28 Tage nach Vorderhirnischämie im *Gyrus dentatus* der adulten Ratte. Darüber hinaus sollte evaluiert werden, ob und in welchem Ausmaß Hypothermie den histopathologischen neuronalen Schaden im vorliegenden Ischämiemodell vermindern kann. Durch eine Immunfluoreszenz-Färbung maturer Neurone mit NeuN wurde des Weiteren untersucht, ob die in der Hämatoxylin-Eosin-(HE) Färbung dargestellte hippocampale Schädigung tatsächlich auf einen neuronalen Zelluntergang zurückzuführen ist.

## 3 MATERIAL

### 3.1 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)	Biomol GmbH, Hamburg
5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Aqua B. Braun Ecotainer (doppelt destilliertes Wasser (ddH <sub>2</sub> O))	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Borsäure, zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatrium-Hydrogenphosphat-Heptahydrat Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Donkey-Serum (DS)	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Eisessig 100 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Eosin G-Lösung 0,5 %, wässrig	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 99,8 %, reinst (= Ethanol 100 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylenglycol, zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Formamide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycerin, wasserfrei, reinst	Merck KGaA, Darmstadt
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl), fest	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid-Lösung 0,9 %, isotonisch	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumhypochloridlösung 12 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natronlauge, Natriumhydroxid (NaOH) 10 Molar (M)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Neo-Clear	Merck KGaA, Darmstadt
Neo-Mount	Merck KGaA, Darmstadt
Nickeldichlorid (NiCl <sub>2</sub> ), zur Synthese	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd, reinst	Merck KGaA, Darmstadt
Resin (20-50 dry mesh AG 501-X8)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Roti-Histokit	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Roti-Histol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (HCl) 2 M	Merck KGaA, Darmstadt
Sucrose (= Saccharose)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trinatriumcitrat-Dihydrat, zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Triton X-100	Fluka, Buchs, Schweiz
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trizma Salzsäure, zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Vectastain Elite ABC Kit Standard (= Avidin-Biotin-Peroxidase)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30 %	Merck KGaA, Darmstadt

**Tabelle (Tab.) 1 - Chemikalien**

### 3.2 Antikörper

Färbung	Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
<b>BrdU - Immunhistochemie</b>	1) Monoclonal Mouse-Anti-Bromodeoxyuridine-IgG # 1170376	mouse	Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis (USA)
	2) Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey-Anti-Mouse-IgG # 715-065-151	donkey	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove (USA)
<b>BrdU / NeuN - Immunfluoreszenz</b>	1) Monoclonal Rat-Anti-Bromodeoxyuridine-IgG # OBT0030	rat	Oxford Biotechnology, (UK)
	1) Monoclonal Mouse-Anti-Neuronal-Nuclei(NeuN)-Antibody # MAB377	mouse	Chemicon International, Temecula (USA)
	2) Fluorescein(FITC)-conjugated Donkey-Anti-Rat-IgG # 712-095-153	donkey	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove (USA)
	2) Rhodamine(Red-X)-conjugated Donkey-Anti-Mouse-IgG # 715-295-151	donkey	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove (USA)

**Tab. 2 - Antikörper**

Mit Ausnahme des ersten Antikörpers NeuN (Monoclonal Mouse-Anti-Neuronal-Nuclei-Antibody, Verdünnung 1:250) werden alle AK in einer Konzentration von 1:500 verwendet.

### 3.3 Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, werden alle Lösungen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Lösung	Rezeptur
Borat-Puffer 0,1 M, pH 8,5	400 ml ddH <sub>2</sub> O 100 ml Boratpuffer 0,5 M
Borat-Puffer 0,5 M, pH 8,5	450 ml ddH <sub>2</sub> O 15,45 g Borsäure → pH-Einstellung durch Zugabe von ca. 5 ml NaOH 10 M
Ethanol 70 %	700 ml Ethanol 100 % 300 ml ddH <sub>2</sub> O
Ethanol 80 %	800 ml Ethanol 100 % 200 ml ddH <sub>2</sub> O
Ethanol 96 %	960 ml Ethanol 100 % 40 ml ddH <sub>2</sub> O
Formamide - Lösung (deionisiert)	1 Liter (l) Formamide 4 Esslöffel Resin → Bis zu einem stabilen Farbumschlag werden beide Substanzen verrührt, dann filtriert und die Lösung bei -20 °C gelagert
Kryoprotektionslösung	250 ml Glycerin 250 ml Ethylenglycol 500 ml Phosphat-Puffer 0,1 M → Lagerung bei 4 °C

Natriumcitrat - Lösung (solution of sodium citrate), pH 7,5 (SSC)	350 ml ddH <sub>2</sub> O 86,65 g NaCl 44,1 g Trinatriumcitrat-Dihydrat → pH-Einstellung durch Zugabe von HCl 2 M
Paraformaldehyd - Lösung 4 % (PFA)	75 ml ddH <sub>2</sub> O 75 ml Phosphat-Puffer 0,2 M 6 g Paraformaldehyd 0,15 ml NaOH 10 M → Erhitzen des ddH <sub>2</sub> O auf 70 °C, Lösen des Paraformaldehyds und Zugabe der Natronlauge, Filtrierung der Lösung und Zugabe des Phosphat-Puffers
Phosphat-Puffer (PO <sub>4</sub> ) 0,1 M	100 ml Phosphat-Puffer 1 M 900 ml ddH <sub>2</sub> O
Phosphat-Puffer 0,2 M	200 ml Phosphat-Puffer 1 M 800 ml ddH <sub>2</sub> O
Phosphat-Puffer 1 M	31,75 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 206,75 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O ddH <sub>2</sub> O ad 1 l
Saccharose - Lösung 30 %	400 ml Phosphat-Puffer 0,1 M 150 g Saccharose → Lagerung bei 4 °C
Trizma Base - Lösung (trizma base solution), pH 7,5 (TBS)	855 ml ddH <sub>2</sub> O 132,2 g Trizma Salzsäure 19,4 g Trizma Base 90 g NaCl → pH-Einstellung durch Zugabe HCl 2 M → Lagerung bei 4 °C

Tab. 3 - Lösungen

### 3.4 Geräte

Geräte	Bezeichnung und Bezugsquelle
Beatmungsgerät	Rodent Ventilator Model 683, Harvard Apparatus, Holliston (USA)
Beatmungsmonitor	Capnomac Ultima, GE Healthcare, München
Blutgasanalysator	ABL 500, Radiometer GmbH, Willich
Blutglukose-Schnelltest	Accu-Chek Sensor Comfort Pro, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
EKG-Monitoring	Cardiocap II, Fa. Datex, Helsinki (Finnland)
Fluoreszenz-Mikroskopie	Gesamtsystems der Carl Zeiss AG, Göttingen - Hochleistungsmikroskop Axiovert 200 - Kamera AxioCam MRM - Gittereinschub ApoTome - Computer: Fujitsu Siemens, Intel Xenon CPU, 2,80 GHz, 1 GB RAM - Software Axiovision 4.4
Gaszufuhr	Flowmeter Unit 760, Siemens AG, Erlangen
Hämoglobin-Schnelltest	B-Hämoglobin Photometer, HemoCue AB, Angelholm (Schweden)
Inhalationsnarkosekammer	Sciencelab.com Inc., Houston (USA)
Inkubator	Köttermann, Kühn & Bayer oHG Laboreinrichtungen, Nidderau
Käfige	Typ Makrolon 3, E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel
Lichtmikroskop	Wilozyt BX 300, Fa. Will, Wetzlar
Perfusor	Pump 11 Plus, Harvard Apparatus, Holliston (USA)
Rotationsschüttler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rotamax 120, Heidolph Instruments GmbH &amp; Co. KG, Schwabach</li> <li>• MS 1 Minishaker, IKA Werke GmbH &amp; Co. KG, Staufen</li> </ul>
Schlittenmikrotom	Hn 40, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar



Temperatursteuerung (Kontrollgerät mit Sonde, Wärmeplatte und -lampe)	TCAT-2DF Controller, Physiotemp Instruments Inc., Clifton (USA)
Vapor	Vapor 2000, Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck
Vermessung des Gyrus dentatus	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mikroskop Axioskop 2 plus, Carl Zeiss AG, Göttingen</li> <li>- Kamera CV-950, Jai-Pulnix, Freigericht-Somborn</li> <li>- Computer mit Intel Pentium II CPU, 400 MHz, 64 MB RAM</li> <li>- Software Optimus 6.5, Media Cybernetics Inc., Silver Spring (USA)</li> </ul>
Wärmeplatte	Ikamag Ret-G, Jahnke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen i. Br.

Tab. 4 - Geräte

### 3.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Alleinfuttermittel Altromin 1324	Altromin GmbH, Lage
Cavafix Certo 18 Gauge (G), 5 cm, (Tubus)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Clinitube BGA-Kapillare	Radiometer Copenhagen Medical Aps, Brønshøj (Dänemark)
Deckgläser, 24 x 50 mm	VWR International GmbH, Darmstadt
Freka-Derm farblos (alkoholisches Hautantiseptikum)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Leica Cryocompound (Gefriereinbettmedium)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Liquemin N25000 (25000 IE Heparinlösung)	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen
Mehrfachkulturschale, steril, 6 Wells	Vitaris AG, Baar
Nahtmaterial	Ethicon GmbH, Norderstedt
Netwell Netzeinsatz, steril, Porengröße 74 Mikrometer ( $\mu\text{m}$ )	Vitaris AG, Baar
Panthenol-Augensalbe Jenapharm	Mibe Vertriebsgesellschaft mbH, Jena
Polyethylenkatheter (Außendurchmesser: 0,97 mm, Innendurchmesser: 0,58 mm, Länge: 33,5 mm)	eigene Herstellung
Safe-Lock Tubes 2,0 ml (Eppendorfgefäße)	Eppendorf AG, Hamburg
Sevorane (=Sevofluran)	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Spritzenvorsatzfilter, steril, Porengröße 0,2 $\mu\text{m}$	VWR International GmbH, Darmstadt
Sterican 26 G (sterile Kanülen)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterofundin (Vollelektrolytlösung)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sufenta mite 10 (=Sufentanil)	Janssen-Cilag GmbH, Neuss
SuperFrost Objektträger	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Tro-Venuset Perfusionsbesteck (Butterflykanüle)	Troge Medical GmbH, Hamburg

Tab. 5 - Verbrauchsmaterialien

## 4 METHODEN

### 4.1 Versuch

#### 4.1.1 Ablauf

Der Versuch gliedert sich in drei Abschnitte (siehe Abb. 11):

- I) Im **operativen Abschnitt** werden die Tiere anästhesiert und instrumentiert. Nach Randomisierung erfolgt die Induktion zerebraler Ischämie sowie therapeutischer Hypothermie. Im Anschluss an die Reperusions- und Erholungsphase wird die Narkose beendet.
- II) Die ***in-vivo*-Markierung** der neuronalen Stammzellen erfolgt vom ersten bis siebten postoperativen Tag mittels intraperitonealer (*i. p.*) Injektion von BrdU (5-Bromo-2'-Deoxyuridine, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München). Bis auf regelmäßige Gewichtskontrollen unterbleibt anschließend jegliche Manipulation an den Tieren. Am 28. postoperativen Tag werden die Tiere in tiefer Sevoflurananästhesie getötet, mit PFA perfundiert und das Gehirn wird entnommen.
- III) Die **histologische Untersuchung** und Auswertung der Hirnschnitte erfolgt mit Hilfe von drei Färbungen: Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung zur Beurteilung des neuronalen Schadens, stereologische Quantifikation aller BrdU-markierten Zellen mittels BrdU-Immunhistochemie und prozentuale Bestimmung des Anteils neu gebildeter Neurone durch BrdU/NeuN-Immunfluoreszenz-Doppelfärbung.

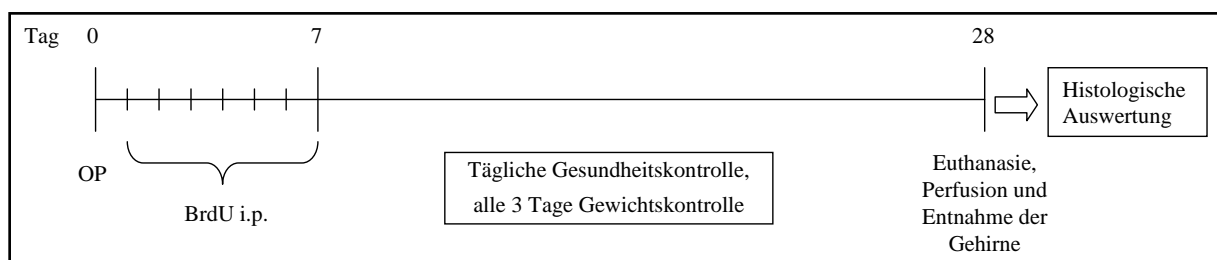


Abb. 11 - Zeitlicher Ablauf des Tierversuchs

#### 4.1.2 Tiere

Zur Durchführung des Tierversuchsvorhabens wurde der Antrag gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes vom 25.05.1998 durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz (Zulassungsnummer 1.5 177-07/051-13) genehmigt.

In den Versuch gehen 65 männliche Sprague-Dawley Ratten ein (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld), die zum Zeitpunkt der Operation (OP) ein durchschnittliches Körpergewicht von  $365 \pm 52$  g aufweisen und unter standardisierten Laborbedingungen gehalten werden. Den gesetzlichen Bestimmungen zur Versuchstierhaltung entsprechend unterliegen die Tiere einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus mit Beleuchtungsintensitäten zwischen 50 und 100 Lux von 6 bis 18 Uhr. Während die Raumtemperatur konstant zwischen 20 und 23 °C gehalten wird beträgt die relative Luftfeuchte 50-60 %. Jeder der Käfige (Typ Makrolon 3, E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel) beinhaltet Einstreu aus Weichholzgranulat sowie Zellstofftücher. Futter (Alleinfuttermittel Altromin 1324, Altromin GmbH, Lage) und Wasser stehen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

Ab dem Vortag des operativen Eingriffs erfolgt die Haltung in Einzelkäfigen. Zur Vermeidung intraoperativer Hyperglykämien wird den Versuchstieren 12 Stunden vor Operationsbeginn das Futter entzogen. Wasser erhalten sie weiterhin *ad libitum*.

### 4.1.3 Gruppen

Die 65 Tiere der vorliegenden Arbeit werden fünf verschiedenen Versuchsgruppen zugeteilt. 50 dieser Tiere durchlaufen den operativen Teil des Versuchs und werden nach erfolgter Präparation randomisiert einer der Versuchsgruppen (Gruppe 1 bis 4) zugeordnet (s. Tab. 6). Die übrigen 15 Tiere der Versuchsgruppe 5 dienen als Referenz für natürliche Neurogenese, durchlaufen nicht den operativen Teil und werden als Nativgruppe bezeichnet.

	<b>Hypothermie</b>	<b>Ischämie</b>	<b>Anzahl (n)</b>
Gruppe 1: <b>Hypo/BACO</b>	ja	ja	10
Gruppe 2: <b>Hypo/Sham</b>	ja	nein	10
Gruppe 3: <b>Normo/BACO</b>	nein	ja	15
Gruppe 4: <b>Normo/Sham</b>	nein	nein	15
Gruppe 5: <b>Nativ</b>	keine Intervention		15

**Tab. 6 - Versuchstiergruppen**

*Versuchstiergruppen mit Zuordnung der durchgeführten Intervention.*

**Hypo** = Hypothermie

**Normo** = Normothermie

**BACO** = **B**eidseitige-**A**rteria-**C**arotis-**O**kkusion = zerebrale Ischämie

**Sham** = Scheinversuch = OP ohne zerebrale Ischämie

## 4.2 Operativer Abschnitt

### 4.2.1 Narkoseeinleitung

Nach Überprüfung sämtlicher verwendeter Geräte auf ihre ordnungsgemäße Funktion werden die Versuchstiere einer orientierenden klinischen Untersuchung unterzogen um zu gewährleisten, dass ausschließlich gesunde Tiere in den Versuch eingehen. Die Tiere werden nach Ermittlung des Körpergewichtes in eine Inhalationsnarkosekammer (Sciencelab.com Inc., Houston, USA) gesetzt, die mit dem Beatmungsgerät (Rodent Ventilator Model 683, Harvard Apparatus, Holliston, USA) verbunden ist. Auf diesem Weg erfolgt die Narkoseeinleitung *per inhalationem* (Sevorane, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden; Vapor 2000, Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck; Flowmeter Unit 760, Siemens AG, Erlangen). Nach Erreichen des Toleranzstadiums werden die Tiere mittels eines zum Endotrachealtubus modifizierten Venenkatheters (Cavafix Certo, 18 G, 5 cm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) orotracheal intubiert und volumenkontrolliert beatmet (Sevofluran 3 - 3,5 Volumenprozent (Vol.%) in einem Sauerstoff-Luft-Gemisch mit einer inspiratorischen Sauerstofffraktion ( $FiO_2$ ) = 0,33). Es folgt die Platzierung einer angefeuchteten Maul-Rachen-Tamponade und die Fixierung des Tubus. Ein Austrocknen der Augen wird durch Dexpanthenol-Creme (Panthenol-Augensalbe Jenapharm, Mibe Vertriebsgesellschaft mbH, Jena).

Zur kontinuierlichen Überwachung der Herzaktivität mittels Elektrokardiogramm (EKG) werden drei Nadelelektroden subkutan parasternal und im linken unteren Abdomen platziert. Die Kontrolle der perikraniellen Temperatur ( $T_{peri}$ ) erfolgt über eine in den rechten *Musculus (M.) temporalis* eingeführte Sonde, die mit einem Temperaturmessgerät (TCAT-2DF Controller, Physiotemp Instruments Inc., Clifton, USA) verbunden ist. Dieses Steuergerät ist an eine Rotlichtlampe und Wärmematte gekoppelt und ermöglicht das Konstanthalten der Temperatur bei 37,0 °C.

#### 4.2.2 Chirurgische Präparation

Als Gefäßzugänge werden Polyethylenkatheter (Außendurchmesser: 0,97 mm, Innendurchmesser: 0,58 mm, Länge: 33,5 mm, eigene Herstellung) verwendet. Tab. 7 zeigt einen Überblick über die präparierten Gefäße.

<i>A. femoralis</i>	→ arterielles Blutdruck-Monitoring → Entnahme von Blutproben
<i>Vena (V.) femoralis</i>	→ Blutentzug während Ischämie
<i>V. jugularis</i>	→ Sufentanil-Gabe
<i>A. carotis communis</i> (beidseits)	Darstellung für Gefäßverschluss

**Tab. 7 - Gefäßzugänge**

Zur Präparation der Gefäße wird die Haut an Hals und medialer Fläche des rechten Oberschenkels rasiert. Es erfolgt eine Hautdesinfektion (Freka-Derm farblos, Fresenius Kabi, Bad Homburg). Unter stumpfer Präparation werden *Arteria*, *Vena* und *Nervus (N.) femoralis* dargestellt. Nach Anbringen einer temporären Ligatur wird die *A. femoralis* inzidiert sowie ein Katheter eingeführt und fixiert. Der arterielle Zugang ermöglicht ein kontinuierliches Blutdruck-Monitoring sowie die Entnahme von Blut zur Blutgasanalyse (BGA) und zur Bestimmung der Glukose- (Gluk.) und Hämoglobin-(Hb-)konzentration. In analoger Weise wird die *V. femoralis* präpariert und mit einem stumpfen Katheter versehen, über den der Blutentzug zur Erzeugung einer hämorrhagischen Hypotension erfolgt.

Zur Präparation der rechten *V. jugularis* wird die Haut paramedian am Hals eröffnet und im *Sulcus jugularis* zwischen *M. brachiocephalicus* und *M. sternooccipitalis* das Gefäß dargestellt. Über den eingeführten Katheter wird das Opioid-Analgetikum Sufentanil (Sufenta mito 10, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) appliziert. Im letzten Schritt werden zur Vorbereitung der Ischämieinduktion ventrolateral der *Trachea* die *Aa. carotides communes* vom *Truncus vagosympathicus* abpräpariert und jeweils mit einem 1 mm dicken Gummizügel lose umschlungen. Abb. 12 zeigt ein anästhesiertes Versuchstier mit angelegten Messsonden und präparierten Gefäßzugängen.

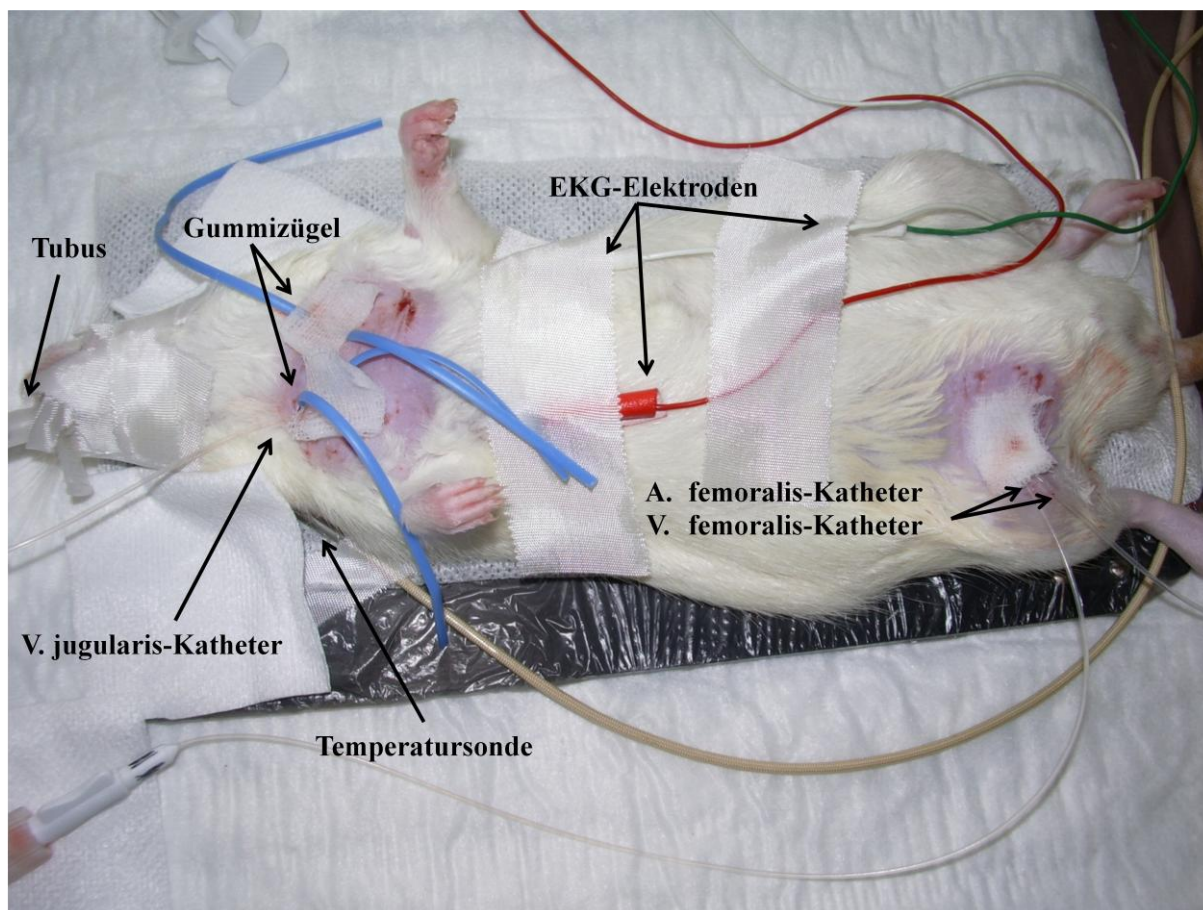


Abb. 12 - Anästhesiertes Versuchstier nach abgeschlossener Präparation

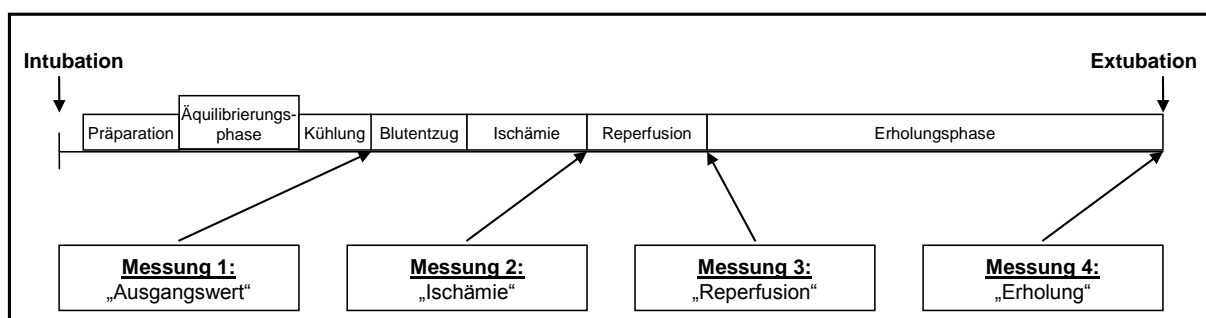


### 4.2.3 Parameter der Narkoseüberwachung

Während der gesamten operativen Phase werden folgende Parameter kontinuierlich per Monitor überwacht:

- perikranielle Temperatur ( $T_{\text{peri}}$  in °C)
- Herzfrequenz (HF in Schläge/min)
- systolischer, diastolischer und mittlerer arterieller Blutdruck (MAP, in mmHg)
- inspiratorische ( $F_{iO_2}$ ) und expiratorische  $O_2$ -Konzentration (in mmHg)
- inspiratorische und expiratorische Kohlenstoffdioxid- ( $CO_2$ ) Konzentration (in mmHg)
- inspiratorische und expiratorische Sevofluran-Konzentration (in Vol.%)

Darüber hinaus werden, wie in Abb. 13 dargestellt, zu vier definierten Zeitpunkten arterielle Blutproben über den in der *A. femoralis* liegenden Katheter entnommen.



**Abb. 13 - Zeitpunkte der Entnahme von Blutproben**

Anhand dieser Blutproben werden folgende Bestimmungen durchgeführt:

- Arterielle Blutgasanalyse (BGA) (Blutgasanalysator ABL 500, Radiometer GmbH, Willich) zur Messung des  $O_2$ -Partialdrucks ( $PaO_2$ ), des  $CO_2$ -Partialdrucks ( $PaCO_2$ ) und des pH-Werts
- Messung der Blutglukosekonzentration (Gluk., in mg/dl) mittels Schnelltest (ACCU-CHEK Sensor Comfort Pro, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Messung der Hämoglobinkonzentration (Hb, in mg/dl) mittels Schnelltest (B-Hemoglobin Photometer, HemoCue AB, Angelholm, Schweden)

#### 4.2.4 Versuchsprotokoll

##### 4.2.4.1 Äquilibrierungsphase

Nach erfolgter Präparation wird die inspiratorische Sevofluran-Konzentration auf 0,9 Vol.% reduziert um die antiexzitotoxische Aktivität des volatilen Anästhetikums so gering wie möglich zu halten. Von diesem Zeitpunkt an erfolgt zusätzlich die Infusion (Pump 11 Plus, Harvard Apparatus, Holliston, USA) von Sufentanil (2,5 Mikrogramm ( $\mu\text{g}$ )/kg KG/h). Während der 30-minütigen Äquilibrierungsphase unterbleibt jegliche Manipulation.

##### 4.2.4.2 Hypothermie

Um bei Tieren der Versuchsgruppen Hypo/BACO und Hypo/Sham eine moderate Hypothermie zu induzieren, werden nun sowohl Wärmelampe als auch Wärmematte ausgeschaltet. Durch Oberflächenkühlung wird die perikranielle Temperatur innerhalb von 15 min auf 33 °C gesenkt. Nach Abschluss der Kühlung erfolgt die erste Blutentnahme zur Dokumentation aller in Kap. 4.2.3 beschriebenen Parameter (Messung 1, „Ausgangswert“). Die Temperatur von 33 °C wird für 45 min aufrechterhalten und anschließend über einen Zeitraum von 40 min kontinuierlich um 0,1 °C/min erhöht, bis die physiologische Temperatur der Tiere von 37,0 °C erreicht ist. Die übrigen 42 min der Erholungsphase verbleibt das Tier ohne jegliche Manipulation.

Als Kontrollgruppen ohne Hypothermie verbleiben Tiere der Gruppen Normo/BACO und Normo/Sham den gesamten Eingriff über bei  $T_{\text{peri}} = 37,0$  °C. Die Bestimmung der physiologischen Ausgangswerte (siehe oben) erfolgt zum entsprechenden Zeitpunkt wie bei gekühlten Tieren.

#### 4.2.4.3 Inkomplette globale Ischämie

Bei Tieren der Gruppen Hypo/BACO und Normo/BACO wird zunächst ein Blutentzug induziert, um während der zerebralen Ischämie eine retrograde Perfusion des Frontalhirns über die Vertebralarterien zu minimieren. Über einen Zeitraum von 8 min wird MAP-kontrolliert die hämorrhagische Hypotension durchgeführt (Zielwert: 40 mmHg, entnommene Blutmenge: 7 - 13 ml). Nun werden die *Aa. carotides communes* durch das Anbringen je eines mikrochirurgischen Gefäßclips temporär verschlossen. Der MAP wird während der 14-minütigen globalen zerebralen Ischämie konstant bei 40 mmHg gehalten. Am Ende der Ischämie erfolgt eine erneute BGA sowie die Dokumentation weiterer Parameter (Messung 2, „Ischämie“). Abb. 14 zeigt exemplarisch das Versuchsprotokoll der Gruppe Hypo/BACO.

Tiere der Gruppen Hypo/Sham und Normo/Sham verbleiben während dieser und der folgenden Phase (Reperfusion) ohne Manipulation in Narkose.

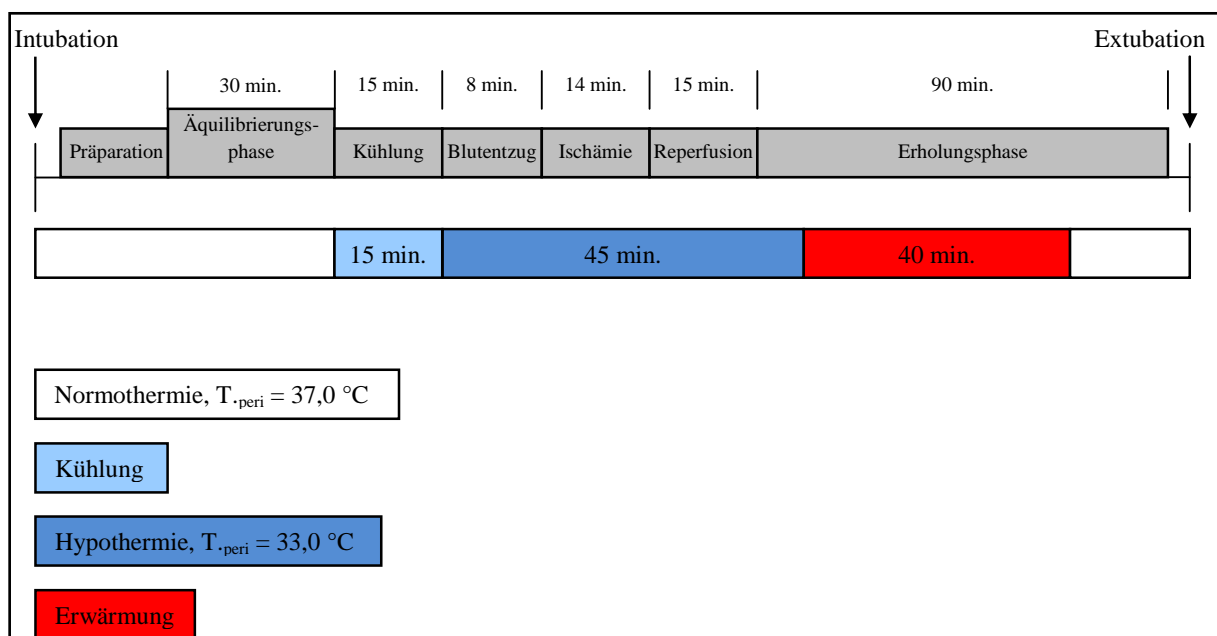


Abb. 14 - Interventionsschema der Versuchsgruppe 1 (Hypo/BACO)

#### 4.2.4.4 Reperfusion

Die Phase der Reperfusion beginnt mit Wiedereröffnung der *Aa. carotides communes*. Anschließend wird dem Tier die gesamte zuvor entzogene Blutmenge über einen Zeitraum von 15 min langsam und kontinuierlich reinfundiert. Um das im entzogenen, venösen Blut angereicherte CO<sub>2</sub> abzuatmen wird die Atemfrequenz kurzzeitig gesteigert. Eine weitere Kontrolle der physiologischen Parameter erfolgt am Ende der Reperfusion (Messung 3, „Reperfusion“).

#### 4.2.4.5 Erholungsphase

Zu Beginn der Erholungsphase befinden sich die Tiere der Versuchsgruppen Hypo/BACO und Hypo/Sham noch im Zustand moderater Hypothermie ( $T_{\text{peri}} = 33 \text{ °C}$ ), der für weitere 8 Minuten aufrechterhalten wird. Anschließend erfolgt die Erwärmung wie in Kap. 4.2.4.2 beschrieben. Danach unterbleiben externe Manipulationen bis am Ende der Erholungsphase eine erneute BGA durchgeführt wird (Messung 4, „Erholung“).

#### 4.2.5 Versuchsende

Im Anschluss an die Erholungsphase werden die Sevofluran- und Sufentanil-Zufuhr beendet, sämtliche Messelektroden und Gefäßkatheter entfernt und die Wunden werden mit nicht-resorbierbaren Fäden (4/0 Prolene, Ethicon GmbH, Norderstedt) verschlossen. Um einem Flüssigkeitsverlust entgegenzuwirken wird 1 ml angewärmter Infusionslösung subkutan injiziert. Bei suffizienter Spontanatmung wird das Tier extubiert. Bis zum Einsetzen motorischer Aktivität wird die Temperatur kontrolliert. Anschließend erfolgt die Überwachung auf postoperative Auffälligkeiten.

### 4.3 In-vivo-Markierung der Stammzellen

Die *in-vivo*-Markierung der Stammzellen erfolgt bei sämtlichen Tieren (Gruppe 1-5) durch intraperitoneale Injektion der Markersubstanz BrdU. Sie wird vom ersten bis zum siebten postoperativen Tag täglich zur gleichen Uhrzeit durchgeführt. BrdU ist ein synthetisch hergestelltes Thymidin-Analogon, das an Stelle der physiologischen Base Thymidin in die DNS mitotisch aktiver Zellen inkorporiert wird und diese somit markiert (s. Abb. 15).

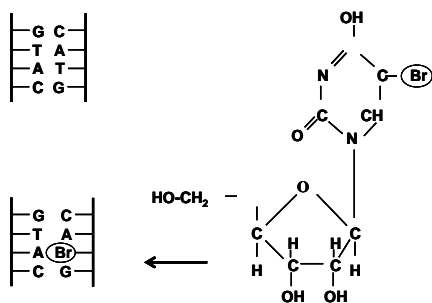


Abb. 15 - Molekülstruktur von BrdU sowie DNA-Veränderung nach Einbau

Die Dosierung beträgt 100 mg BrdU / kg KG bzw. 5 ml / kg KG der angesetzten Lösung (Konzentration: 20 mg / ml). Zur Herstellung dieser täglich frisch angesetzten Lösung wird sterile 0,9 %ige NaCl-Lösung (Isotonische Natriumchloridlösung 0,9 % Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) im Wasserbad auf 37 °C erwärmt, das BrdU-Pulver darin gelöst und anschließend filtriert. Nach Ermittlung des Körpergewichts des Tieres kann das Injektionsvolumen bestimmt werden (s. Tab. 8). Die Applikation der BrdU-Lösung erfolgt unter Aspirationskontrolle paramedian *i. p.*

Nach Abschluss der BrdU-Injektionen (Tag 1-7 *post operationem*) wird in dreitägigen Abständen das Körpergewicht sowie täglich der Gesundheitszustand des Tieres kontrolliert.

KG [g]	IV [ml]	KG [g]	IV [ml]	KG [g]	IV [ml]	KG [g]	IV [ml]
270	1,36	328	1,64	386	1,94	444	2,22
272	1,36	330	1,66	388	1,94	446	2,24
274	1,38	332	1,66	390	1,96	448	2,24
276	1,38	334	1,68	392	1,96	450	2,26
278	1,40	336	1,68	394	1,98	452	2,26
280	1,40	338	1,70	396	1,98	454	2,28
282	1,42	340	1,70	398	2,00	456	2,28
284	1,42	342	1,72	400	2,00	458	2,30
286	1,44	344	1,72	402	2,02	460	2,30
288	1,44	346	1,74	404	2,02	462	2,32
290	1,46	348	1,74	406	2,04	464	2,32
292	1,46	350	1,76	408	2,04	466	2,34
294	1,48	352	1,76	410	2,06	468	2,34
296	1,48	354	1,78	412	2,06	470	2,36
298	1,50	356	1,78	414	2,08	472	2,36
300	1,50	358	1,80	416	2,08	474	2,38
302	1,52	360	1,80	418	2,10	476	2,38
304	1,52	362	1,82	420	2,10	478	2,40
306	1,54	364	1,82	422	2,12	480	2,40
308	1,54	366	1,84	424	2,12	482	2,42
310	1,56	368	1,84	426	2,14	484	2,42
312	1,56	370	1,86	428	2,14	486	2,44
314	1,58	372	1,86	430	2,16	488	2,44
316	1,58	374	1,88	432	2,16	490	2,46
318	1,60	376	1,88	434	2,18	492	2,46
320	1,60	378	1,90	436	2,18	494	2,48
322	1,62	380	1,90	438	2,20	496	2,48
324	1,62	382	1,92	440	2,20	498	2,50
326	1,64	384	1,92	442	2,22	500	2,50

**Tab. 8 - BrdU-Dosierungstabelle***KG = Körpergewicht, IV = Injektionsvolumen*

## 4.4 Probengewinnung

### 4.4.1 Perfusion der Tiere

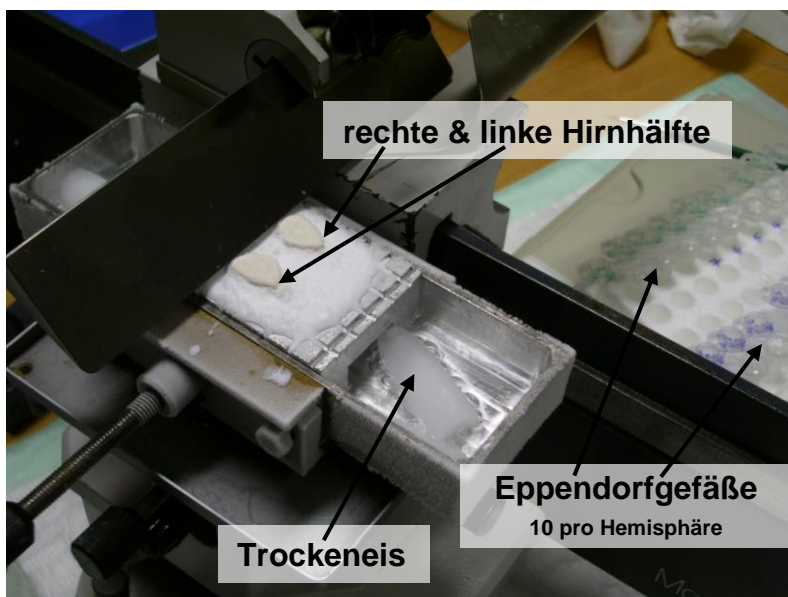
In tiefer Sevofluran-Anästhesie wird das Abdomen des Tieres eröffnet. Das *Diaphragma* wird vom *Mediastinum* abgelöst, die Rippen werden beidseits mit einer Schere durchtrennt und zur großflächigen Freilegung der Thoraxorgane wird das *Sternum* mit ansetzenden Rippen nach kranial umgeschlagen. Nach Punktion des linken Ventrikels mit einer Butterflykanüle (Tro-Venaset Perfusionsbesteck, Troge Medical GmbH, Hamburg) erfolgt die Inzision der Leber. Über einen Zeitraum von zehn Minuten werden 100 ml isotonische NaCl-Lösung injiziert. Nach Eintreten des Herz-Kreislau-Stillstandes werden Narkose und Beatmung abgestellt und der Tubus entfernt. Um eine frühzeitige Konservierung des Gehirns zu erreichen, erfolgt im Anschluss die Perfusion mit 100 ml 4 %iger PFA-Lösung.

### 4.4.2 Gehirnentnahme

Die vollständige und unbeschadete Entnahme des Gehirns erfordert eine sorgfältige Präparation. Hierzu wird zunächst die Kopfhaut rostral eröffnet, die *Musculi (Mm.) temporales* durchtrennt, vom Schädelknochen abgehoben und entfernt. Die Nackenmuskulatur wird ebenfalls mobilisiert und soweit abpräpariert, dass ein ungehinderter Zugang zum Schädelknochen möglich ist. Dieser wird mit Hilfe einer Hohlmeißelzange vom *Os occipitale* her stückweise abgetragen und ermöglicht das anschließende Durchtrennen aller rostral und basal gelegenen Hirnnerven. Das Gehirn wird aus seiner knöchernen Umgebung gelöst und das Kleinhirn mittels Skalpell abgetrennt. Das Großhirn wird in ein mit 4 %iger PFA-Lösung gefülltes Glasgefäß verbracht, 24 Stunden lang im Kühlschrank gelagert und anschließend in ein weiteres Glasgefäß mit 30 %iger Saccharose-Lösung gegeben. Nach zwei Tagen wird das Gehirn unter optimaler Fixierung geschnitten.

#### 4.4.3 Anfertigung der Hirnschnitte

Zur Anfertigung der Schnitte wird ein Schlittenmikrotom (Hn 40, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) verwendet. Die unterhalb der Schnittfläche angebrachte Kammer wird mit Ethanol 96 % sowie Trockeneis befüllt und ermöglicht eine kontinuierliche Gefrierung des Gewebes (siehe Abb. 16). Nach Trennung des Gehirns in beide Hemisphären werden die medialen Flächen mit Hilfe eines Einbettmediums (Leica Cryocompound, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) auf der Unterlage fixiert. Dieses Vorgehen ermöglicht die Anfertigung sagittaler Hirnschnitte von exakt 40 µm Dicke.



**Abb. 16 - Schlittenmikrotom mit eingebetteten Hirnhälften eines Versuchstieres**

Zur Aufbewahrung werden die Schnitte in mit Kryoprotektionslösung (eigene Herstellung) gefüllte Eppendorfgefäße (Safe-Lock Tubes 2,0 ml, Eppendorf AG, Hamburg) überführt und bis zur Färbung bei -20 °C aufbewahrt. Für die Schnitte jeder Hemisphäre stehen zehn beschriftete Gefäße bereit, die nacheinander mit jeweils einem Schnitt befüllt werden. Durch diese gleichmäßige Verteilung wird sichergestellt, dass jedes Eppendorfgefäß repräsentative Schnitte aller Hirnregionen einer Hemisphäre enthält.



## 4.5 Histologische Analyse

Zur Analyse und Auswertung werden drei verschiedene Färbungen durchgeführt. Pro Tier und Gehirnhälfte wird dazu der Inhalt jeweils eines Eppendorf-Gefäßes verwendet, der repräsentativ für eine Hemisphäre ist.

Eine Übersicht aller verwendeter Chemikalien, Materialien sowie die Zusammensetzung der hergestellten Lösungen findet sich in Kap. 3.

### 4.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Färbung der Hirnschnitte mittels Hämatoxylin und Eosin dient der Ermittlung und Klassifizierung des histopathologischen Schadens der Hippokampusformation.

#### 4.5.1.1 Färbeprotokoll

- 15 min waschen in Leitungswasser
- 10 min waschen in doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O)
- Aufziehen der Schnitte auf Objektträger (OT)
- Trocknung für mind. 30 min
- 10 min in Ethanol 100 %
- 1 min in Ethanol 96 %
- 1 min in Ethanol 70 %
- 2x kurz in ddH<sub>2</sub>O
- 1 min in Hämalaun
- 10 min waschen in fließendem Leitungswasser
- 2x kurz in ddH<sub>2</sub>O
- 1:15 min in Eosin + 2 Tropfen Eisessig
- 2x kurz in ddH<sub>2</sub>O
- 5 min in Ethanol 70 %
- 2:30 min in Ethanol 80 %
- 1 min in Ethanol 96 %
- 1 min in Ethanol 100 %
- 2 min Roti-Histol I
- 5 min Roti-Histol II
- Eindeckeln mit Roti-Histokit

Erläuterung:

Pro Tier und Hirnhälfte wird der Inhalt je eines Eppendorfgefäßes 10 min lang bei Raumtemperatur aufgewärmt. Die Schnitte werden dem Gefäß entnommen, in eine mit Leitungswasser gefüllte Petrischale gegeben und anschließend in frischem Leitungswasser 15 min gewaschen. Nach weiteren 10 min der Spülung in doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) werden die Schnitte auf mit Tiernummer und Hemisphäre beschriftete OT aufgezogen. Nachdem die Schnitte mindestens 30 min lang bei Raumtemperatur getrocknet wurden folgt die absteigende Alkoholreihe, bei der die OT zunächst 10 min in Ethanol 100 % und anschließend für jeweils eine Minute in Ethanol 96 % und 70 % eingetaucht werden. Anschließend werden die OT noch zweimal kurz in ddH<sub>2</sub>O getaucht und dann für exakt eine Minute in Hämalaun gegeben. Nach Entnahme aus der Hämalaun-Lösung werden die OT 10 min lang unter kühlem, fließendem Leitungswasser abgewaschen, zweimal kurz in ddH<sub>2</sub>O gespült und 1 min 15 sec lang in Eosin mit zwei Tropfen Eisessig 100 % gegengefärbt. Nach nochmaligem kurzem Eintauchen in ddH<sub>2</sub>O erfolgt nun die aufsteigende Alkoholreihe mit zunächst fünf Minuten in Ethanol 70 %, zweieinhalb Minuten in Ethanol 80 % und jeweils einer Minute in Ethanol 96 % und 100 %. Zur Fixierung der Schnitte werden die OT für zwei Minuten in Roti-Histol gegeben und anschließend für weitere fünf Minuten in einem zweiten Gefäß mit frischer Roti-Histol-Lösung belassen. Unter Verwendung von Roti-Histokit werden die Schnitte mit einem Deckglas versehen und eine Nacht lang bei Raumtemperatur getrocknet.

4.5.1.2 Beurteilung am Lichtmikroskop

Die Bestimmung des histopathologischen Schadens erfolgt mittels Kategorisierung der HE-gefärbten Schnitte in ein 4-Punkte-System. Dabei erfolgt die Auswertung getrennt für jede Hemisphäre und schließt alle Hirnschnitte ein, die einen Anschnitt des *Gyrus dentatus* zeigen. Die Regionen CA 1 und CA 3 werden dabei getrennt voneinander beurteilt wobei die CA 2-Region zur Region CA 1 und die CA 4-Region zur Region CA 3 gezählt werden (vgl. Abb. 17). Jeder einzelne Hirnschnitt wird dabei unter 400-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop betrachtet und sowohl die CA 1- als auch die CA 3-Region in eine von vier Schadenskategorien eingeteilt (vgl. Abb. 18). Diese Kategorien orientieren sich an einem Schema von SANO *et al.* (1992) und werden zur Auswertung als Punktwerte aufgefasst (s. Tab. 9).

Der *Gyrus dentatus* wird ebenfalls pro Schnitt mit einem Wert von 0 oder 1 belegt. Jede erkennbare Schädigung in diesem Bereich führt zur Beurteilung mit dem Wert 1. Ist keinerlei histologische Auffälligkeit vorhanden, erhält der *Gyrus dentatus* den Wert 0.

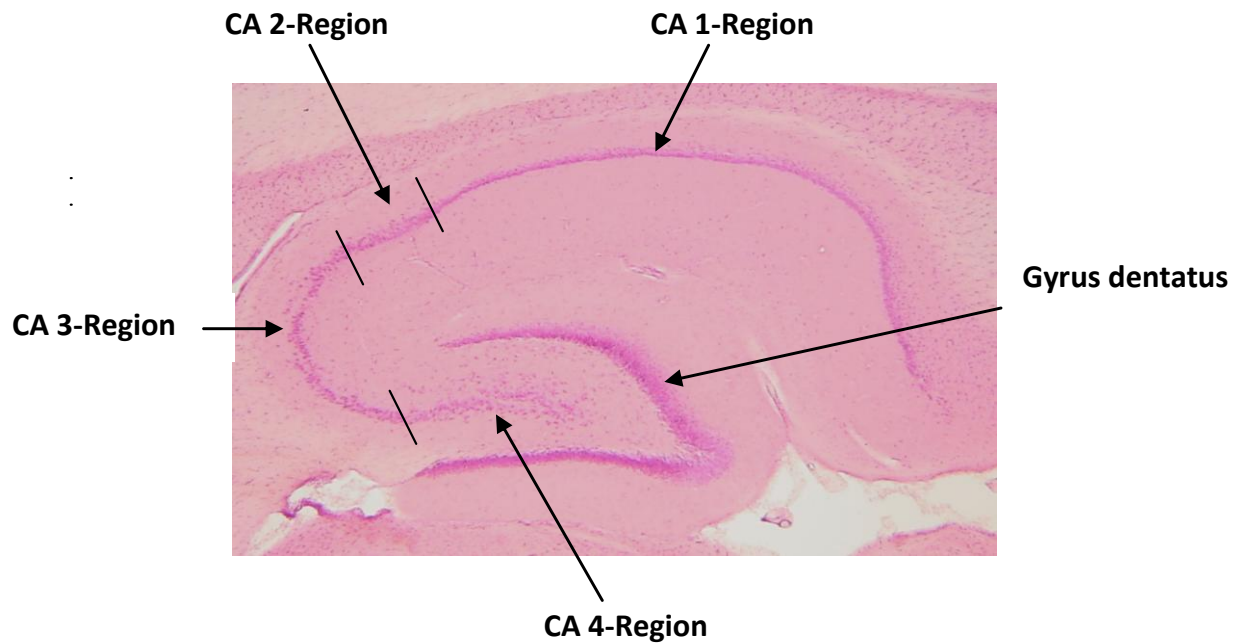


Abb. 17 - HE-Übersichtsaufnahme der CA-Regionen und des Gyrus dentatus

4.5.1.3 Auswertung

Die Werte jeder Region (CA 1, CA 3, *Gyrus dentatus*) werden jeweils addiert und durch die Zahl aller ausgewerteter Schnitte dividiert. Somit werden für jede Hemisphäre eines Tieres Mittelwerte gebildet, die den neuronalen Schaden pro Region angeben und im Folgenden als HE-Index bezeichnet sind.

Kategorie	Beschreibung
0	Zellen intakt, kein histologischer Schaden
1	1 -10 % der Neurone sind geschädigt, Zellband geschlossen
2	11-50 % der Neurone sind geschädigt, Zellband lückenhaft
3	51-100 % der Neurone sind geschädigt, Zellband in Auflösung, Zelltrümmer

Tab. 9 - Klassifikation des ischämischen neuronalen Schadens des Hippokampus

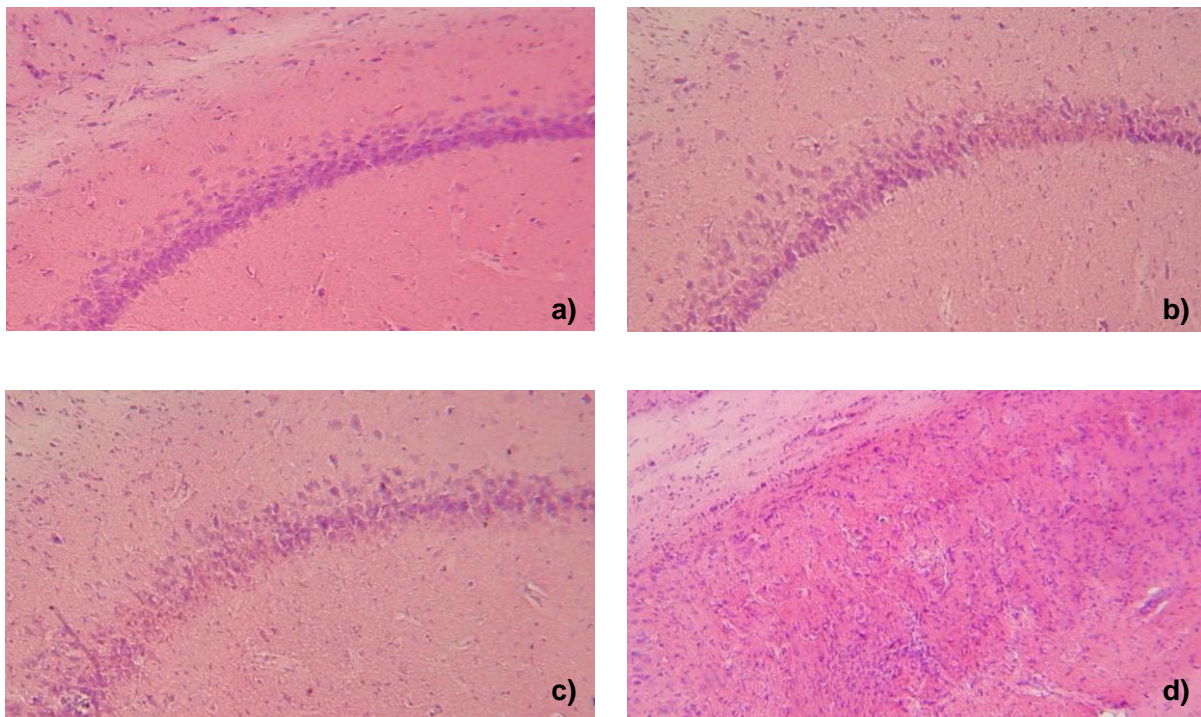


Abb. 18 a-d - Klassifikation des ischämischen neuronalen Schadens des Hippokampus

a) Kategorie 0 b) Kategorie 1 c) Kategorie 2 d) Kategorie 3

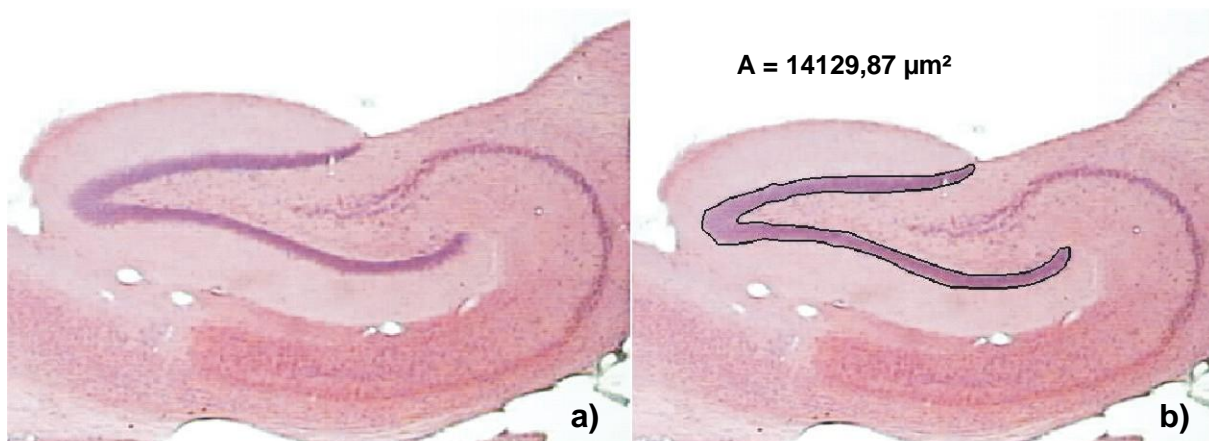
#### 4.5.2 Volumenbestimmung des Gyrus dentatus

Um vergleichende Aussagen über die Anzahl neu gebildeter Neurone zwischen Tieren der unterschiedlichen Versuchsgruppen treffen zu können ist es nötig, das Volumen des *Gyrus dentatus* zu berücksichtigen. Diese Untersuchung erfolgt computergestützt exemplarisch an einigen Tieren jeder Versuchsgruppe, wobei die bereits HE-gefärbten Gehirnschnitte unter Verwendung folgender Ausstattung analysiert werden:

- Mikroskop Axioskop 2 plus, Carl Zeiss AG, Göttingen
- Kamera CV-950, Jai-Pulnix, Freigericht-Somborn
- Computer mit Intel Pentium II CPU, 400 MHz, 64 MB RAM
- Software Optimus 6.5, Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA

##### 4.5.2.1 Flächenmessung

Die Objektträger werden auf das Leuchtfeld aufgelegt, mit homogenem Durchlicht beleuchtet und digital projiziert. Jede Aufnahme wird am Monitor soweit vergrößert, dass ein exaktes Markieren der Grenze des GD möglich ist (s. Abb. 19). Die Bestimmung der markierten Fläche erfolgt automatisch durch die Software.



**Abb. 19 a / b - Flächenmessung des Gyrus dentatus**

*A = ermittelte Fläche in  $\mu\text{m}^2$*

*a) lichtmikroskopische Aufnahme des HE-gefärbten Gyrus dentatus und der CA - Regionen*

*b) computergestützte Umrandung des Gyrus dentatus mit Flächenangabe (A)*

#### 4.5.2.2 Berechnung des Volumens

Um aus den gemessenen Flächenwerten das Volumen des GD ermitteln zu können, werden zunächst alle Werte der Schnitte einer Hemisphäre addiert.

Anschließend erfolgt die Berechnung des Gesamtvolumens eines *Gyrus dentatus* nach der Formel:

$$\text{Volumen (in mm}^3\text{)} = \text{Summe der Flächenwerte (in mm}^2\text{)} \times 0,04 \text{ mm} \times 10$$

Der Faktor 0,04 mm steht dabei für die Dicke der Gewebsschnitte (40 µm), der Faktor 10 für die Anzahl aller Eppendorfgefäße, auf die das gesamte Gehirn einer Hemisphäre gleichmäßig aufgeteilt wurde. Da im Rahmen der HE-Färbung nur jeder zehnte Schnitt analysiert wurde, muss dies in der Formel berücksichtigt werden.

### 4.5.3 BrdU-Färbung

Die BrdU-Färbung dient der Bestimmung der Gesamtzahl aller BrdU-markierten Zellen im *Gyrus dentatus*. Diese Zellen sind während der siebentägigen *in-vivo*-Markierung (siehe Kap. 4.3) entstanden. Durch Verwendung der indirekten Avidin-Biotin-Immunperoxidase-Technik (HSU *et al.* 1981) ermöglichen enzymgekoppelte Antikörper in Kombination mit einer Farbreaktion die präzise Darstellung aller BrdU-markierten Zellkerne am Ort der Antigen-Antikörper-Bindung (siehe Abb. 20). Hierzu bindet zunächst ein primärer AK spezifisch an das nachzuweisende Antigen (BrdU-markierte DNS) und bildet einen Antigen-Antikörper-Komplex. Der sekundäre Antikörper ist gegen die Immunglobulinfraktion derjenigen Spezies gerichtet, aus der der Primärantikörper gewonnen wurde und mit dem Vitamin Biotin gekoppelt. Durch Zugabe einer Lösung aus Avidin und biotinylierter Peroxidase kommt es zur Komplexbildung: Avidin ist ein Glykoprotein mit Bindungsstellen für vier Moleküle Biotin, wobei durch die Zusammensetzung der zugegebenen Lösung drei dieser Bindungsstellen bereits mit biotinylierter Peroxidase besetzt sind – mit der vierten bindet Avidin irreversibel an das Biotin des Sekundärantikörpers. Nun sind pro Antigenloкус jeweils drei Moleküle Peroxidase gebunden und bewirken eine Verstärkung der nachfolgenden Farbreaktion durch enzymatische Umsetzung der zugegebenen Chromogenlösung (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, DAB, und Nickel(II)-Chlorid, HSU und SOBAN 1982). Es kommt zur Bildung eines stabilen Farbkomplexes am Ort der Peroxidase und somit zur Visualisierung des Antigens.

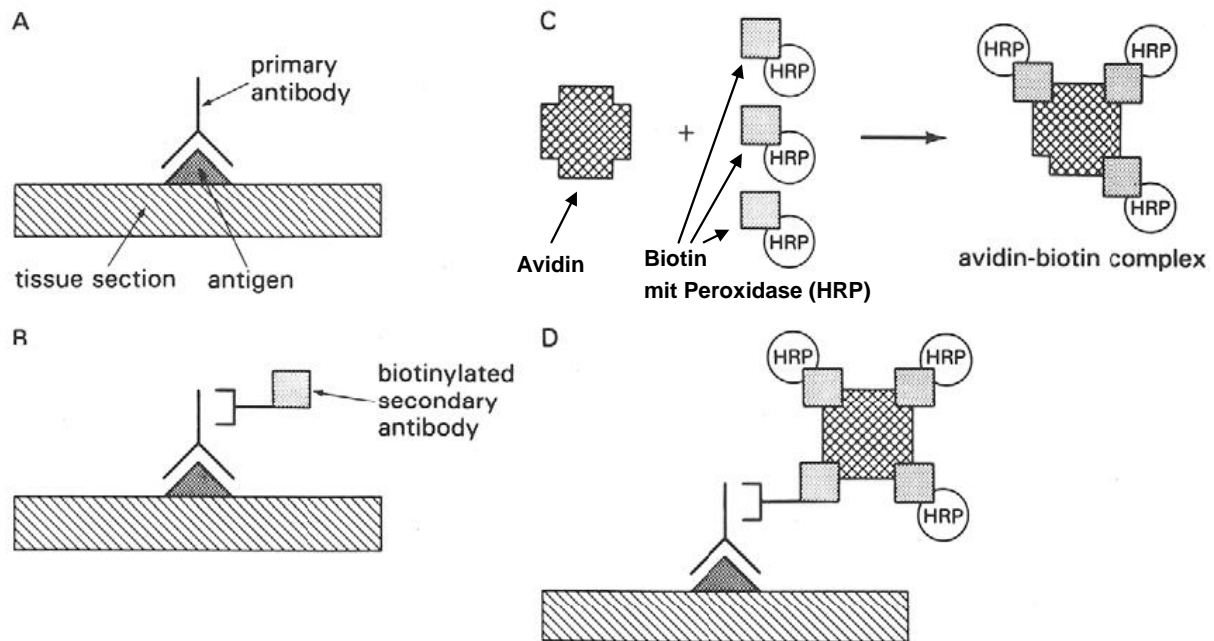


Abb. 20 - Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex zur Darstellung der AK-Bindung

#### 4.5.3.1 Färbeprotokoll

Die Färbung erfolgt an zwei aufeinander folgenden Tagen.

##### Tag 1

- Waschen  
mit Trizma Base Solution (TBS), 3 x 10 min
- Hemmung der endogenen Peroxidase  
mit 0,6 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  in TBS, 30 min
- Waschen  
mit TBS, 3 x 10 min
- Denaturierung der DNS  
mit 50 %iger Formamide-Lösung in 2 M Natriumzitat-Lösung (SSC), 90 min  
bei 65 °C
- Waschen  
mit 2 M SSC, 5 min



- Vorbereitung der Proteine auf Antikörperbindung  
mit 2 M HCl, 30 min bei 38 °C
- Neutralisation des pH - Werts  
mit 0,1 M Boratpuffer pH 8,5, 10 min
- Waschen  
mit TBS, 4 x 5 min
- Blockierung unspezifischer Protein-Bindungsstellen  
mit TBS / 3 % Donkey-Serum (DS) / 0,1 % Triton X (TX), 30 min
- Inkubation mit Mouse-Anti-BrdU-Antikörper  
mit TBS / 3 % DS / 0,1 % TX / 1. AK, über Nacht

## Tag 2

- Waschen  
mit TBS, 8 x 5 min
- Inkubation mit Biotin-konjugiertem Donkey-Anti-Mouse-Antikörper  
mit TBS / 3 % DS / 0,1 % TX / 2. AK, 120 min
- Waschen  
mit TBS, 8 x 5 min
- Enzymmarkierung  
mit TBS / Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, 60 min
- Waschen  
mit TBS, 6 x 5 min
- Anfärbung durch Chromogenzugabe  
mit TBS / 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 8 % NiCl<sub>2</sub> / DAB, 5 min
- Waschen  
mit Leitungswasser, 4 x 1 min
- Waschen  
mit TBS, 4 x 5 min
- Aufziehen der Schnitte auf Objektträger  
in 0,1 M PO<sub>4</sub>-Lösung
- Fixierung in Neo-Clear
- Eindecken mit Neo-Mount und Deckglas

Erläuterung:

Die BrdU-Färbung der Hirnschnitte erfolgt im Free-Floating-Verfahren. Nach Auftauen je eines Eppendorfgefäßes pro Hemisphäre und Tier werden die Schnitte in eine Petrischale mit 0,1 M  $\text{PO}_4$ -Lösung, sowie einem Tropfen TritonX zur Reduzierung der Oberflächenspannung, gegeben. Von dort aus werden jeweils maximal zehn Hirnschnitte in ein Netzweil gegeben, in dem sie den Färbeprozess über verbleiben. Die Wells werden dazu in die jeweiligen Lösungen eingetaucht und auf einen Schüttler gestellt, wodurch die Schnitte frei schwimmend den entsprechenden Lösungen ausgesetzt sind. Zunächst werden die Schnitte für 3 x 10 min in TBS gewaschen, bevor sie, zur Hemmung der endogenen Peroxidase, 30 min lang in einer 0,6 %igen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung verbringen. Ziel dieser Inkubation ist die Neutralisation der gewebeeigenen Peroxidase, damit diese später nicht mit der Chromogensubstanz reagieren und zur Hintergrundfärbung bzw. falsch positiven Farbkomplexen führen kann. Anschließend werden die Schnitte erneut 3 x 10 min lang in TBS gewaschen und danach in eine 50 %ige Formamide-Lösung überführt. Dieser Schritt dient der DNS-Denaturierung und wird bei 65 °C durchgeführt. Es folgt ein fünfminütiger Waschvorgang in 2 M Natriumzitat-Lösung (SSC) und das Umsetzen der Wells in 2 M Salzsäure. Die Inkubation in HCl dauert 30 min, wird bei 38 °C durchgeführt und dient zur Vorbereitung der Antikörperbindung. Nach der anschließenden, zehnmütigen Neutralisation des pH-Werts in 0,1 M Boratpuffer (pH 8,5) werden die Schnitte erneut für 4 x 5 min in TBS gewaschen. Um im nachfolgenden Färbeschritt eine optimale Antikörperbindung am Ort des Antigens (BrdU-markierte DNS) zu erreichen, erfolgt zuvor eine Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen. Hierzu wird eine 3 %ige Lösung aus Donkey-Serum (DS), TBS und 0,1 % TX verwendet, welche die unspezifische Hintergrundfärbung minimiert. Zur Markierung des Antigens wird ein monoklonaler Mouse-Anti-Bromodeoxyuridine-Antikörper verwendet, der in einer Konzentration von 1:500 einer Lösung aus 3 % DS, 0,1 % TX und TBS zugegeben wird. Die Inkubation der Hirnschnitte in dieser primären Antikörpermischung erfolgt über Nacht (16 h) bei 5 °C.

Um zu Beginn des zweiten Tages die restlichen, nicht gebundenen AK aus dem Gewebe zu entfernen, werden die Schnitte für 8 x 5 min in TBS gewaschen. Im Anschluss erfolgt eine zweistündige Inkubation in der sekundären Antikörperlösung, bestehend aus Biotin-konjugiertem Donkey-Anti-Mouse-Antikörper (1:500), 3 % DS, 0,1 % TX sowie TBS. Dieser sekundäre AK bindet dabei mit seinem Antigen-bindenden Fragment an den  $\text{F}_c$ -Teil des primären AK und erlaubt durch das angelagerte Vitamin Biotin die nachfolgende Ausbildung

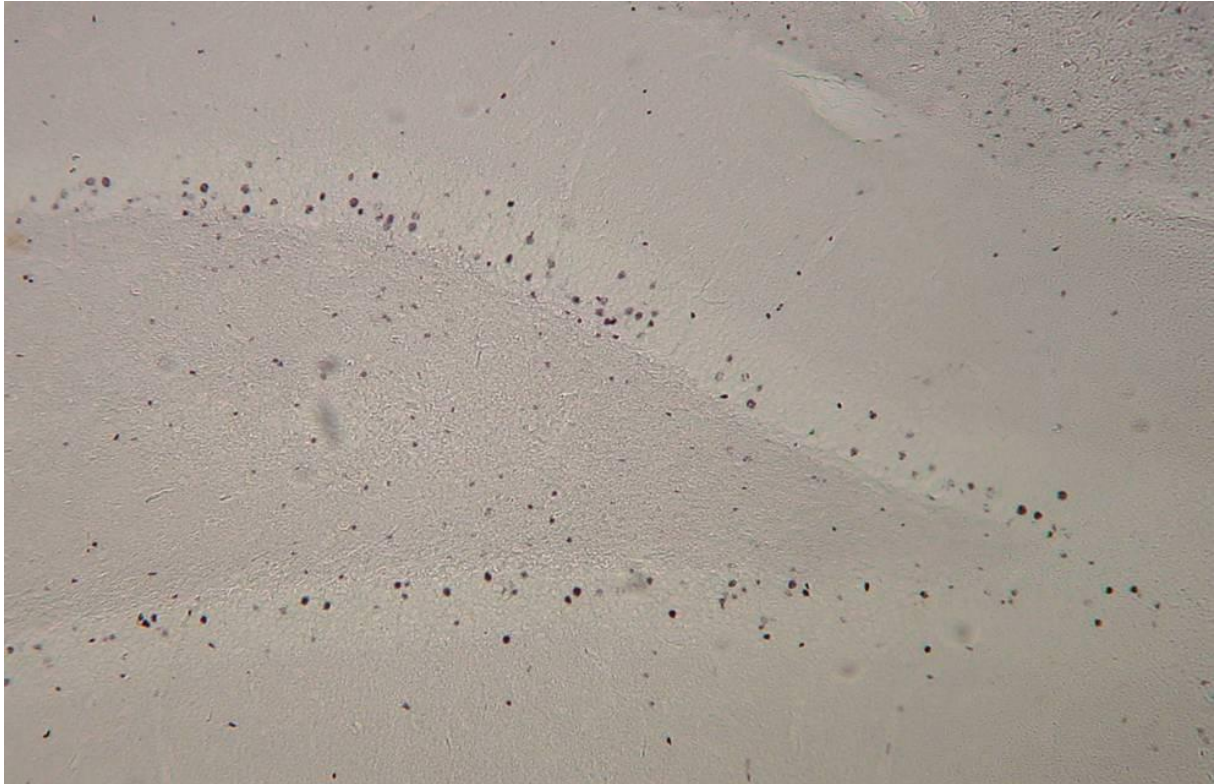
des Antigen-Antikörper-Peroxidase-Komplexes. Dieser entsteht durch Zugabe der Avidin-Biotin-Peroxidase (Vectastain Elite ABC Kit Standard), nachdem der überschüssige sekundäre AK erneut für 8 x 5 min mit TBS ausgewaschen wurde. Die Herstellung der Peroxidase-Lösung erfolgt entsprechend der Herstellerangaben 30 min vor Anwendung, um eine Äquilibration des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes zu ermöglichen. Die Inkubation erfolgt für 60 min mit anschließendem Auswaschen nicht gebundener Komplexe für 6 x 5 min in TBS.

Zugabe von Chromogensubstrat ermöglicht die Anfärbung durch Präzipitation. Hierzu werden die Hirnschnitte für 5 min in eine Lösung aus DAB, 8 % NiCl<sub>2</sub>, 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie TBS gegeben. Um überschüssiges DAB und NiCl<sub>2</sub> aus dem Gewebe zu entfernen werden die Schnitte 4 x 1 min in Leitungswasser geschwenkt und anschließend für 4 x 5 min in TBS gewaschen.

Die Schnitte werden nun in eine Petrischale mit 0,1 M PO<sub>4</sub>-Lösung und einem Tropfen TX gegeben und auf Objektträger aufgezogen. Nachdem sie luftgetrocknet sind, werden die OT mehrmals in Neo-Clear getaucht, mit einigen Tropfen Neo-Mount bestrichen und mit einem Deckglas versehen.

#### 4.5.3.2 Beurteilung am Lichtmikroskop

Für alle Tiere werden die gefärbten Schnitte beider Hemisphären unter dem Lichtmikroskop betrachtet und ausgewertet. Beginnend an einem Ende des GD werden unter 400-facher Vergrößerung alle BrdU-markierten Zellen gezählt (vgl. Abb. 21). Es wird darauf geachtet, dass alle Ebenen des Präparates analysiert werden.



**Abb. 21 - Lichtmikroskopische Aufnahme der mittels NiCl angefärbten BrdU-markierten Zellkerne des Gyrus dentatus**

#### 4.5.3.3 Auswertung

Die stereologische Ermittlung der Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen erfolgt durch Addition der Einzelwerte aller ausgezählten Schnitte eines Eppendorfgefäßes. Da jede Hirnhälfte auf zehn Eppendorfgefäße aufgeteilt ist, multipliziert man anschließend die Summe mit dem Faktor 10 und erhält somit die absolute Anzahl BrdU-markierter Zellen im *Gyrus dentatus* einer Hemisphäre.

#### 4.5.4 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung dient der qualitativen Analyse BrdU-markierter Zellen. Sie bedient sich dabei der Markierung des Antigens mittels eines primären Antikörpers und der Visualisierung des entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexes durch einen fluoreszierenden sekundären Antikörper. Durch die Verwendung von Fluorochromen verschiedener Wellenlängen ist es möglich, eine Zelle auf mehrere Merkmale hin zu untersuchen. Da die vorliegende Studie zum Ziel hat, die Anzahl neu gebildeter Neurone zu bestimmen, werden AK verwendet, die zum einen gegen das Merkmal BrdU (neu gebildete Zelle) und zum anderen gegen NeuN (ein Neuronen-spezifisches Protein) gerichtet sind.

##### 4.5.4.1 Färbeprotokoll

Die Färbung erfolgt an zwei aufeinander folgenden Tagen.

##### Tag 1

- Waschen  
mit TBS, 3 x 10 min
- Denaturierung der DNS  
mit 50 %iger Formamide-Lösung in 2 M SSC, 90 min bei 65 °C
- Waschen  
mit 2 M SSC, 5 min
- Vorbereitung der Proteine auf Antikörperbindung  
mit 2 M HCl, 30 min bei 38 °C
- Neutralisation des pH - Werts  
mit 0,1 M Boratpuffer pH 8,5, 10 min
- Waschen  
mit TBS, 4 x 5 min
- Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen  
mit TBS / 3 % DS / 0,1 % TX, 30 min
- Inkubation mit primären Antikörpern  
mit TBS / 3 % DS / 0,1 % TX / 1. AK NeuN / 1. AK BrdU, über Nacht bei 5 °C

Tag 2

- Waschen  
mit TBS, 3 x 10 min
- Inkubation mit sekundären Antikörpern  
mit TBS / 3 % DS / 0,1 % TX / 2. AK NeuN / 2. AK BrdU, 240 min im Dunkeln
- Waschen  
mit TBS, 5 x 15 min
- Aufziehen der Schnitte auf Objektträger  
in 0,1 M PO<sub>4</sub>-Lösung
- Eindecken mit Mounting medium und Deckglas

Erläuterung:

Wie auch die BrdU-Färbung wird die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung im Free-Floating-Verfahren durchgeführt. Hierzu wird der Inhalt eines der zehn Eppendorfgefäße, auf die jede Hemisphäre eines Tieres aufgeteilt wurde, aufgetaut und die Hirnschnitte werden in eine Petrischale mit 0,1 M PO<sub>4</sub>-Lösung und einem Tropfen TX gegeben. Nach Befüllen der Wells mit jeweils höchstens zehn Schnitten werden die Gewebeproben für 3 x 10 min in TBS gewaschen. Zur Denaturierung der DNS erfolgt im Anschluss eine Inkubation in 50 %iger Formamide-Lösung. Sie erfolgt für 90 Minuten bei 65 °C. Nach einem fünfminütigen Waschvorgang in 2 M SSC werden die Wells in eine Lösung von 2 M HCl überführt und für 30 min bei 38 °C darin belassen. Hierdurch werden die Proteine auf eine AK-Bindung vorbereitet. Anschließend wird der saure pH-Wert neutralisiert, indem die Hirnschnitte für zehn Minuten in 0,1 M Boratpuffer (pH 8,5) gegeben werden. Daran schließt sich ein erneuter Waschvorgang für 4 x 5 min in TBS an. Um eine Hintergrundfärbung zu minimieren werden die Wells 30 min lang in eine Lösung aus TBS, 3 % DS und 0,1 % TX gegeben, was eine Blockierung unspezifischer AK-Bindungsstellen bewirkt. Nun sind die Hirnschnitte zur Inkubation mit den primären AK bereit, die über Nacht bei 5 °C durchgeführt wird. Einer Lösung aus TBS, 3 % DS und 0,1 % TX werden folgende Antikörper zugegeben: Monoclonal Rat-Anti-Bromodeoxyuridine-AK, der an BrdU der markierten Zellkerne bindet, und Monoclonal Mouse-Anti-Neuronal-Nuclei(NeuN)-Antibody.

Der zweite Tag der Färbung beginnt mit dem Herauswaschen der überschüssigen, nicht gebundenen AK und erfolgt für 3 x 10 min in TBS. Anschließend erfolgt die Inkubation der

Schnitte in der sekundären Antikörpermischung. Diese enthält neben TBS, 3 % DS und 0,1 % TX die sekundären Antikörper Fluorescein(FITC)-conjugated AffiniPure Donkey-Anti-Rat-IgG und Rhodamine(Red-X)-conjugated AffiniPure Donkey-Anti-Mouse-IgG. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgen alle weiteren Schritte im abgedunkelten Raum. Die Inkubationszeit in dieser Lösung sekundärer AK beträgt 240 min. Anschließend werden überzählige AK 5 x 15 min lang in TBS ausgewaschen und die Hirnschnitte auf Objektträger aufgezogen. Um ein Austrocknen der gefärbten Hirnschnitte zu vermeiden, werden diese noch im feuchten Zustand mit einigen Tropfen Mounting medium sowie einem Deckglas versehen und deren Ränder mit handelsüblichem Nagellack versiegelt.

#### 4.5.4.2 Beurteilung am Fluoreszenzmikroskop

Um neu gebildete Neurone aus der Gesamtheit aller neu gebildeten, also BrdU-markierten, Zellen identifizieren zu können, werden die gefärbten Hirnschnitte unter Verwendung eines leistungsstarken Gesamtsystems der Carl Zeiss AG, Göttingen, analysiert:

- Hochleistungsmikroskop Axiovert 200
- Kamera AxioCam MRM
- Gittereinschub ApoTome
- Computer Fujitsu Siemens, Intel Xenon CPU, 2,80 GHz, 1 GB RAM
- Software Axiovision 4.4

Die Betrachtung der Hirnschnitte erfolgt im abgedunkelten Raum nach dem Prinzip der inversen Mikroskopie. Dabei werden die Fluorochrome, die auf den Objektträgern aufgezogenen Gewebeproben, von einer Lichtquelle angeregt und das von ihnen emittierte Licht wird detektiert. Die Anregung erfolgt durch Licht einer Quecksilberdampf Lampe das durch Farbfilter zu den Schnitten geleitet werden kann. Die Filter sind in einen Reflektor eingesetzt und jeweils nur für Licht bestimmter Wellenlängen durchlässig, so dass jeder der beiden verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe einzeln angeregt werden kann. Somit können in einer Reflektoreinstellung alle Neurone (NeuN-positiv), in der anderen alle neu gebildeten Zellen (BrdU-positiv) visualisiert werden. Um in den 40 µm dicken Gewebeschnitten einzelne Zellen äußerst präzise darstellen und beurteilen zu können, wird ein spezieller Gittereinschub (ApoTome) in den Auflichtstrahlengang des Mikroskops eingebracht. Das ApoTome arbeitet nach dem Prinzip der „strukturierten Beleuchtung“, auch „Gitterprojektionstechnik“ genannt und ermöglicht die Aufnahme präziser optischer Schnittbilder von ca. 1 µm Dicke. Hierzu

wird, mit Hilfe des Einschubs, eine verschiebbliche Gitterstruktur in den Bereich der fokussierten Objektebene projiziert und durch einen feinjustierten Scanningmechanismus in drei definierte Positionen verschoben. In jeder Rasterstellung des Gitters wird dabei über die Kamera eine Aufnahme des Emissionslichts gemacht und durch die Software werden die drei Rohbilder zu einem Gesamtbild zusammengefügt und auf dem Monitor dargestellt. Da die Gitterstruktur ausschließlich in der Fokusebene der zu beurteilenden Zellen scharf abgebildet ist, erscheinen sämtliche Objekte ober- und unterhalb dieses Tiefenschärfebereichs in den drei Rohaufnahmen verwaschen und unscharf. Durch den verwendeten Algorithmus wird bei Berechnung des Gesamtbildes diese, in den Tiefenschärfebereich einstrahlende, homogene Unschärfe der „out of focus“ Bereiche eliminiert.

Zunächst wird ein Ende des *Gyrus dentatus* aufgesucht und unter 400-facher Vergrößerung im Gesichtsfeld dargestellt. Am Reflektor wird nun der FITC-Farbfilter in den Aufrichtstrahlengang gebracht, wodurch lediglich Licht des Wellenlängenbereichs von 450-490 Nanometer den Schnitt erreicht. Hierdurch wird das Fluorochrom FITC angeregt und sämtliche im Gesichtsfeld liegende BrdU-markierte Zellen leuchten grün auf. Vom Ende des *Gyrus dentatus* ausgehend wird nun die erste grün fluoreszierende Zelle aufgesucht, fokussiert und, unter Verwendung des ApoTome, eine Aufnahme gemacht. Ohne eine Veränderung an Fokusbereich oder Position vorzunehmen wird nun der Rhodamine-Filter in den Strahlengang gebracht. Somit kommen alle mit dem Farbstoff RedX-markierten Zellen (also Neurone) zur Darstellung, deren rötliches Emissionslicht, ebenfalls unter Verwendung des ApoTome, von der Kamera aufgenommen wird. Am Monitor werden automatisch beide aufgenommenen Gesamtbilder übereinander projiziert. Man erkennt die fokussierte(n), grüne(n) BrdU-positive(n) Zelle(n) im Bereich der rötlich fluoreszierenden Neurone des *Gyrus dentatus* (siehe Abb. 22). Um nun zu entscheiden, ob eine einzelne Zelle mit beiden Fluorochromen markiert ist, erlaubt die Software sowohl die Betrachtung beider übereinander projizierter Aufnahmen (s. Abb. 22 c) als auch die getrennte Darstellung jedes einzelnen Gesamtbildes (s. Abb. 22a und b). Hat man so die anfangs fokussierte grüne Zelle daraufhin analysiert, ob sie auch gleichzeitig rot fluoresziert, wird dies dokumentiert. Man wechselt anschließend zurück zum FITC-Farbfilter, sucht und analysiert auf gleiche Weise die nächste grüne Zelle und durchmustert solange den *Gyrus dentatus*, bis 50 doppelt angefärbte Zellen (also neu gebildete Neurone, s. Tab. 10) pro Hemisphäre gefunden sind. Neben der Dokumentation doppelt gefärbter Zellen werden ebenso alle gefundenen, einfach BrdU-positiven Zellen gezählt sowie die Anzahl der Schnitte notiert, die bis zum Auffinden der 50. BrdU- und NeuN-positiven Zelle erforderlich sind.



Fluoreszenz der Zelle	markiertes Antigen	Bedeutung
einfach, grün	BrdU	neu gebildete Zelle (z. B. Gliazelle), aber keine Nervenzelle
einfach, rot	NeuN	Neuron
doppelt, grün <u>und</u> rot	BrdU <u>und</u> NeuN	neu gebildetes Neuron

Tab. 10 - Übersicht über Fluoreszenz und Bedeutung der analysierten Antigene

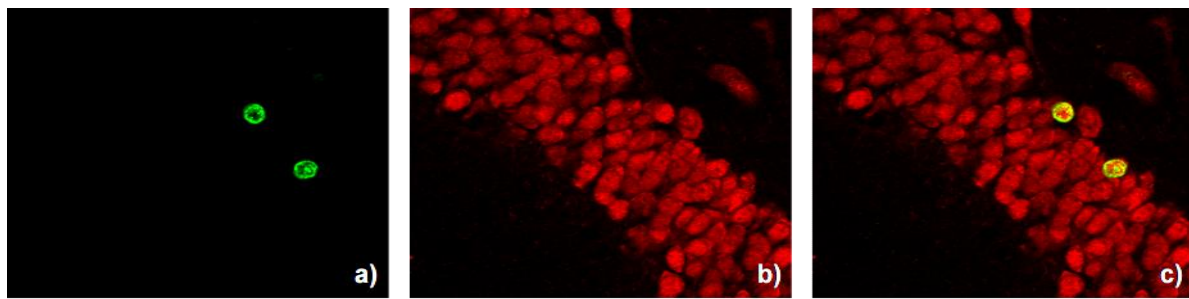


Abb. 22 a-c - Immunfluoreszenz-Aufnahmen BrdU, NeuN, BrdU und NeuN

#### 4.5.4.3 Auswertung

Die Schnitte jeder Gehirnhälfte werden analysiert, bis 50 neu gebildete Neurone gefunden sind. Um den prozentualen Anteil dieser doppelt gefärbten Zellen an der Gesamtzahl aller BrdU-positiven Zellen zu ermitteln, werden die einfach positiven Zellen ins Verhältnis zu den 50 gefundenen neuen Neuronen gesetzt:

$$\text{neugebildete Neurone (in \%)} = \frac{50}{50 + \text{Anzahl einfach BrdU-positiver Zellen}} \times 100$$

#### **4.5.5 Erweiterte Immunfluoreszenz-Auswertung**

Um sicherzustellen, dass der bei Ischämietieren in der HE-Färbung beobachtete Schaden der CA 1- und CA 3-Region tatsächlich auf den Untergang von Nervenzellen zurückzuführen ist, werden die gleichen Bereiche des Hippokampus nochmals anhand der Fluoreszenz-gefärbten Hirnschnitte untersucht. Außerdem wird die Zahl neu gebildeter Zellen (also der BrdU-markierten, grün fluoreszierenden Zellen) in diesen Bereichen abgeschätzt und innerhalb der fünf Versuchstiergruppen verglichen.

Die Beurteilung erfolgt jeweils anhand eines Klassifikationssystems, das hierzu eigens entwickelt wurde. Jede Klassifikation basiert auf fünf Kategorien, denen Punktwerte zugeordnet sind. Die Analysen werden separat für die CA 1- und CA 3-Regionen jedes Schnittes durchgeführt, die Punktwerte in einer Tabelle notiert und zur statistischen Auswertung werden Indizes gebildet.

4.5.5.1 Neuronaler Schaden

Die Beurteilung der CA 1- und CA 3-Region hinsichtlich des neuronalen Schadens erfolgt unter 400-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop und richtet sich nach den in Tab. 11 beschriebenen Kategorien. Die Integrität des Nervenzellbandes (s. Abb. 23) wird dokumentiert und anhand des Punktesystems sowie des Schadensindex analysiert. Ein histopathologischer Schaden liegt definitionsgemäß ab einer Kategorie > 1 vor.

Kategorie	Beschreibung
0	Nervenzellband intakt, keine Lücken, gleiche Anzahl an Zellreihen
1	Nervenzellband intakt, keine Lücken, unterschiedlich viele Zellreihen
2	Nervenzellband leicht aufgelockert, keine Lücken
3	Nervenzellband stark aufgelockert, Lücken
4	Nervenzellband stark aufgelockert, nur noch einzelne Zellen vorhanden, unregelmäßige Anordnung

Tab. 11 - Klassifikation des Nervenzellschadens in der Immunfluoreszenz

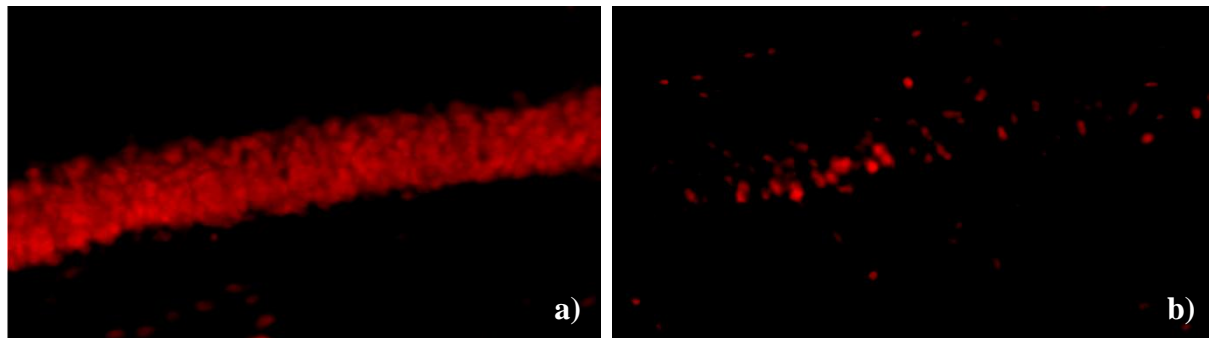


Abb. 23 a / b - Immunfluoreszenzaufnahmen der CA 1-Region des Hippokampus (NeuN-Färbung)

a) Nervenzellband intakt, keine Lücken = Kategorie 0

b) Nervenzellband stark aufgelockert, nur noch einzelne Neurone vorhanden = Kategorie 4

#### 4.5.5.2 BrdU-positive Zellen

In analoger Vorgehensweise wird die Anzahl der in CA 1- und CA 3-Region gefundenen BrdU-positiven Zellen anhand Tab. 12 abgeschätzt und analysiert („BrdU-Index“). Abb. 24 a und b zeigen das unterschiedliche Ausmaß neu gebildeter Zellen in der hippocampalen CA 1-Region.

Kategorie	Beschreibung
0	keine positiven Zellen
1	max. fünf positive Zellen
2	wenige positive Zellen, gleichmäßige Verteilung im Hippokampus und <i>Gyrus dentatus</i>
3	viele positive Zellen, jedoch v. a. im Bereich des geschädigten Nervenzellbandes
4	sehr viele positive Zellen, sowohl im Nervenzellband als auch im umgebenden Gewebe

Tab. 12 - Klassifikation der Anzahl neu gebildeter Zellen

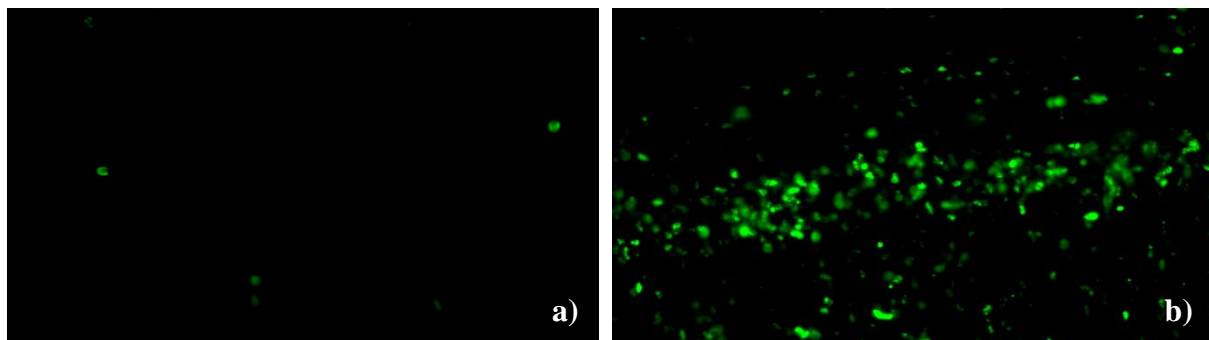


Abb. 24 a / b - Immunfluoreszenzaufnahmen der CA 1-Region des Hippokampus (BrdU-Färbung)

a) maximal fünf positive Zellen im Bereich des Nervenzellbandes = Kategorie 1

b) sehr viele positive Zellen im Bereich des Nervenzellbandes = Kategorie 4

## 4.6 Statistische Datenauswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mittels der Programme „Microsoft Excel 2007“ und „SPSS 16.0 für Windows“. Daten, die nicht einer Normalverteilung unterliegen, werden im Ergebnisteil dieser Arbeit in folgender Weise mit Median und dem jeweils ersten und dritten Quartil dargestellt: Median (1. Quartil ; 3. Quartil). Normalverteilte Daten werden mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) angegeben.

Sowohl die Anzahl neu gebildeter Neurone als primärer Endpunkt der Studie als auch die Anzahl neu gebildeter Zellen, der Neurogenesefaktor und der histopathologische Schaden wurden mittels des Wilcoxon-Tests im Gruppenvergleich auf statistische Signifikanz überprüft. Verglichen und getestet wurden die beiden Versuchsgruppen Normo/BACO und Hypo/BACO jeweils mit der entsprechenden Kontrollgruppe (Sham) und der Nativ-Gruppe, also Normo/BACO *versus* (*vs.*) Normo/Sham, Normo/BACO *vs.* Nativ und Hypo/BACO *vs.* Hypo/Sham, Hypo/BACO *vs.* Nativ. Des Weiteren wurden jeweils die Ergebnisse der Gruppe Hypo/BACO mit denen der Versuchstiergruppe Normo/BACO auf statistische Signifikanz geprüft. Die Bewertung basiert bei allen statistischen Berechnungen auf einer zweiseitigen Testung mit einem Signifikanzniveau von  $\alpha \leq 0,05$ . Es erfolgte keine Adjustierung des Signifikanzniveaus aufgrund multiplen Testens. Alle Ergebnisse sind daher explorativ zu interpretieren.

Die in Kap. 5.1 dargestellten „Physiologischen Parameter“ wurden wegen ihrer im Gruppenvergleich geringen Variabilität, ihrer Lage im physiologischen Bereich und zur Vermeidung einer Inflation des Fehlers 1. Art aufgrund ihrer großen Anzahl lediglich deskriptiv analysiert.

## 5 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse beziehen sich auf histologische Untersuchungen sowie prä-, intra- und postoperative Messungen an insgesamt 65 männlichen Sprague-Dawley Ratten. Die Tiere werden randomisiert fünf Versuchstiergruppen zugeordnet, von denen die beiden Ischämiegruppen (Hypo/BACO und Normo/BACO) und beide Kontrollgruppen (Hypo/Sham und Normo/Sham) den operativen Teil des Versuchs durchlaufen. Tiere der Nativ-Gruppe dienen der Bestimmung natürlicher Referenzwerte für die histologischen Ergebnisse der Studie.

In keiner der histologischen Untersuchungen zeigte die seitengetrennte Beurteilung beider Hirnhälften einen relevanten Unterschied zwischen rechter und linker Hemisphäre. Daher wird in den entsprechenden Kapiteln nur auf die Gesamtwerte eingegangen.

### **5.1 Physiologische Parameter**

Die Werte der physiologischen Parameter werden zu den Zeitpunkten „Ausgangswert“, „Ischämie“, „Reperfusion“ sowie „Erholung“ bestimmt (vgl. Kap. 4.2.3) und sind für jede Versuchsgruppe mit Mittelwert und Standardabweichung in Tab. 13 dargestellt.

Die perikranielle Temperatur der Normothermie-Gruppen liegt mit Werten zwischen 36,6 und 37,1 °C bei einer maximalen Standardabweichung von 0,2 °C im physiologischen Bereich. Der niedrigste Wert wird am Ende der zerebralen Ischämie in der Gruppe Normo/BACO gemessen (36,6 °C).

Für Tiere beider Hypothermie-Gruppen wird eine Temperatur von 33,0 °C angestrebt. Während der ersten drei Messzeitpunkte liegt  $T_{\text{peri}}$  zwischen 31,9 °C und 33,0 °C. Am Ende der Ischämie- und Reperfusionsphase liegen die Werte in der Gruppe Hypo/Sham mit 31,9 °C und 32,0 °C niedriger als in der Gruppe Hypo/BACO mit 32,7 °C und 32,9 °C. Nach

Wiedererwärmung beträgt  $T_{\text{peri}}$  am Ende der Erholungsphase in beiden Hypothermie-Gruppen  $37,0\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$ .

Die Herzfrequenz liegt mit Werten zwischen 298 und 387 Schlägen pro Minute und einer maximalen Standardabweichung von 39 / min bei allen Tieren im physiologischen Bereich.

In den Gruppen Normo/BACO und Hypo/BACO wird der mittlere arterielle Blutdruck durch hämorrhagische Hypotension versuchsbedingt während der Ischämiephase auf  $40\text{ mmHg} \pm 1\text{ mmHg}$  gesenkt. Ansonsten liegt der MAP mit  $119\text{ mmHg}$  bis  $144\text{ mmHg}$  bei einer maximalen Standardabweichung von  $15\text{ mmHg}$  im physiologischen Bereich.

Die Hämoglobin-Konzentration liegt größtenteils im physiologischen Bereich (MW zwischen  $12,5\text{ g/dl}$  und  $14,6\text{ g/dl}$ , maximale Standardabweichung  $1,5\text{ g/dl}$ ). Lediglich in beiden BACO-Gruppen liegt sie zum Zeitpunkt „Ischämie“ durch den Blutentzug mit  $10,4\text{ g/dl}$  bzw.  $10,7\text{ g/dl}$  deutlich niedriger.

Die Blutglukosekonzentration liegt zu Versuchsbeginn in allen Gruppen im niedrig-normalen Bereich. Mit Ausnahme beider Ischämie-Gruppen zu den Zeitpunkten „Ischämie“ und „Reperfusion“ liegt der Mittelwert während des gesamten Versuchs zwischen  $65\text{ mg/dl}$  und  $90\text{ mg/dl}$  bei einer maximalen Standardabweichung von  $25\text{ mg/dl}$ . Im Vergleich zu den Sham-Gruppen (bis  $73\text{ mg/dl}$ ) zeigt sich eine höhere Glukosekonzentration am Ende von Ischämie- und Reperfusionsphase bei Normo/BACO-(bis  $125\text{ mg/dl}$ ) und Hypo/BACO-Tieren (bis  $182\text{ mg/dl}$ ).

Der arterielle  $O_2$ -Partialdruck liegt zwischen  $135\text{ mmHg}$  und  $186\text{ mmHg}$  mit einer maximalen Standardabweichung von  $36\text{ mmHg}$ . Die höchsten Werte werden in beiden BACO-Gruppen am Ende der Ischämie und Reperfusion gemessen.

Die Mittelwerte des arteriellen  $CO_2$ -Partialdrucks liegen zwischen  $34,8\text{ mmHg}$  und  $40,2\text{ mmHg}$  bei einer maximalen Standardabweichung von  $6,2\text{ mmHg}$ .

Alle gemessenen pH-Werte liegen mit  $7,33$  bis  $7,43$  und einer maximalen Standardabweichung von  $0,07$  im physiologischen Bereich.

	Messzeitpunkt	Normo/Sham	Normo/BACO	Hypo/Sham	Hypo/BACO
<b>T<sub>peri</sub></b> [°C]	Ausgangswert	37,1 ± 0,1 <sup>k</sup>	37,1 ± 0,1 <sup>k</sup>	33,0 ± 0,0 <sup>k</sup>	33,0 ± 0,0 <sup>k</sup>
	Ischämie	37,1 ± 0,1 <sup>k</sup>	36,6 ± 0,1 <sup>k</sup>	31,9 ± 3,2 <sup>k</sup>	32,7 ± 0,3 <sup>k</sup>
	Reperfusion	37,1 ± 0,1 <sup>k</sup>	37,0 ± 0,2 <sup>k</sup>	32,0 ± 3,2 <sup>k</sup>	32,9 ± 0,1 <sup>k</sup>
	Erholung	37,1 ± 0,1 <sup>k</sup>	37,0 ± 0,1 <sup>k</sup>	37,0 ± 0,1 <sup>k</sup>	37,0 ± 0,1 <sup>k</sup>
<b>HF</b> [min <sup>-1</sup> ]	Ausgangswert	380 ± 28	371 ± 32	323 ± 21	318 ± 30
	Ischämie	387 ± 17	373 ± 36	321 ± 17	327 ± 39
	Reperfusion	385 ± 27	359 ± 36	324 ± 16	298 ± 33
	Erholung	387 ± 25	369 ± 27	380 ± 27	382 ± 26
<b>MAP</b> [mmHg]	Ausgangswert	125 ± 11	128 ± 13	119 ± 11	121 ± 10
	Ischämie	128 ± 9	40 ± 1 <sup>k</sup>	120 ± 8	40 ± 0 <sup>k</sup>
	Reperfusion	128 ± 13	140 ± 10	124 ± 7	144 ± 7
	Erholung	128 ± 15	121 ± 12	140 ± 7	135 ± 12
<b>Hb</b> [g/dl]	Ausgangswert	13,4 ± 1,4	13,5 ± 1,2	14,2 ± 0,9	13,6 ± 1,3
	Ischämie	13,6 ± 1,0	10,4 ± 0,9	14,0 ± 1,0	10,7 ± 0,8
	Reperfusion	12,9 ± 1,5	12,7 ± 1,2	14,2 ± 1,1	13,0 ± 1,0
	Erholung	12,7 ± 1,1	12,5 ± 0,8	14,6 ± 0,9	13,7 ± 0,9
<b>Gluk.</b> [mg/dl]	Ausgangswert	85 ± 20	76 ± 16	90 ± 24	75 ± 25
	Ischämie	70 ± 15	125 ± 46	73 ± 15	182 ± 70
	Reperfusion	65 ± 14	103 ± 31	67 ± 12	128 ± 36
	Erholung	67 ± 10	74 ± 17	77 ± 15	75 ± 13
<b>PaO<sub>2</sub></b> [mmHg]	Ausgangswert	149 ± 31	146 ± 27	141 ± 27	135 ± 27
	Ischämie	162 ± 28	186 ± 25	148 ± 29	178 ± 31
	Reperfusion	160 ± 25	181 ± 24	152 ± 21	172 ± 36
	Erholung	169 ± 22	164 ± 22	163 ± 15	156 ± 19
<b>PaCO<sub>2</sub></b> [mmHg]	Ausgangswert	39,6 ± 2,2	39,0 ± 3,6	39,0 ± 3,4	38,6 ± 2,9
	Ischämie	40,0 ± 3,0	36,2 ± 5,6	38,6 ± 3,3	34,8 ± 6,2
	Reperfusion	39,9 ± 3,4	40,2 ± 2,2	37,3 ± 1,8	39,2 ± 3,3
	Erholung	37,8 ± 2,2	38,9 ± 3,2	38,5 ± 3,0	38,5 ± 2,4
<b>pH</b>	Ausgangswert	7,41 ± 0,04	7,41 ± 0,04	7,41 ± 0,05	7,40 ± 0,04
	Ischämie	7,41 ± 0,04	7,33 ± 0,07	7,42 ± 0,05	7,37 ± 0,05
	Reperfusion	7,41 ± 0,03	7,37 ± 0,05	7,43 ± 0,06	7,39 ± 0,03
	Erholung	7,41 ± 0,03	7,39 ± 0,04	7,41 ± 0,03	7,41 ± 0,03

Tab. 13 - Physiologische Parameter

MW und SD der physiologischen Parameter der vier Versuchsgruppen zu den definierten intraoperativen Messzeitpunkten

<sup>k</sup> = kontrollierter Parameter



## 5.2 Histopathologischer Schaden

Die Beurteilung des histopathologischen Schadens der Hippokampusformation erfolgt mittels zweier Färbemethoden. Verglichen wird der neuronale Zellschadens beider Ischämiegruppen (Normo/BACO und Hypo/BACO) untereinander und in Bezug zu Tieren ohne Ischämie (Normo/Sham, Hypo/Sham, Nativ).

### 5.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Tiere ohne zerebrale Ischämie (Normo/Sham, Hypo/Sham, Nativ) zeigen keine neuronale Schädigung in der CA 1-Region (HE-Indizes 0,00 (0,00;0,00), s. Tab. 14). Im Vergleich dazu weisen Tiere der Gruppe Normo/BACO einen signifikant erhöhten HE-Index mit einer maximalen Schädigung von 3,00 (3,00;3,00) auf. Tiere der Ischämiegruppe Hypo/BACO zeigen ebenfalls im Vergleich zu Tieren ohne Ischämie einen signifikant erhöhten HE-Index 0,11 (0,11;0,21). Der Schaden ist jedoch signifikant erniedrigt im Vergleich zur Gruppe Normo/BACO (s. Abb. 25).

In der CA 3-Region besteht weder zwischen den beiden Kontrollgruppen (Normo/Sham vs. Hypo/Sham) untereinander noch zwischen einer der beiden Kontrollgruppen und der Nativ-Gruppe ein Unterschied (HE-Index 0,00). Auch die Gruppe Hypo/BACO zeigt keinen Schaden und keinen Unterschied zu ihrer Kontroll- (Hypo/Sham) und Nativ-Gruppe. Tiere der Gruppe Normo/BACO zeigen mit einem Median von 1,13 und den Quartilen (1,00;1,29) einen signifikant höheren HE-Index als allen anderen Versuchstiergruppen (s. Tab. 15). Die Gruppe Hypo/BACO weist signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur Versuchsgruppe Normo/BACO auf (s. Abb. 26).

Die Untersuchung des *Gyrus dentatus* zeigt in keiner Versuchsgruppe eine histopathologische Schädigung (s. Tab. 16).

		Normo/Sham	Normo/BACO	Hypo/Sham	Hypo/BACO	Nativ
<b>CA 1</b>	Links	0,00 (0,00;0,00)	3,00 (3,00;3,00) <sup>*#</sup>	0,00 (0,00;0,00)	0,12 (0,11;0,13) <sup>**§</sup>	0,00 (0,00;0,00)
	Rechts	0,00 (0,00;0,00)	3,00 (3,00;3,00) <sup>*#</sup>	0,00 (0,00;0,00)	0,11 (0,10;0,22) <sup>**§</sup>	0,00 (0,00;0,00)
	<b>Gesamt</b>	<b>0,00 (0,00;0,00)</b>	<b>3,00 (3,00;3,00)<sup>*#</sup></b>	<b>0,00 (0,00;0,00)</b>	<b>0,11 (0,11;0,21)<sup>**§</sup></b>	<b>0,00 (0,00;0,00)</b>

**Tab. 14 - Histologische Schadensklassifikation der CA 1-Region (HE-Färbung)**

Median sowie 1. und 3. Quartil der HE-Indizes (0,1,2,3) der fünf Versuchsgruppen bezogen auf die CA 1-Region des Hippokampus.

Statistische Signifikanz: \* =  $p < 0,05$  vs. Sham der gleichen Gruppe; # =  $p < 0,05$  vs. Nativ;

§ =  $p < 0,05$  vs. Normo/BACO

		Normo/Sham	Normo/BACO	Hypo/Sham	Hypo/BACO	Nativ
<b>CA 3</b>	Links	0,00 (0,00;0,00)	1,13 (1,00;1,22) <sup>*#</sup>	0,00 (0,00;0,00)	0,00 (0,00;0,09) <sup>§</sup>	0,00 (0,00;0,00)
	Rechts	0,00 (0,00;0,00)	1,25 (1,06;1,35) <sup>*#</sup>	0,00 (0,00;0,00)	0,00 (0,00;0,00) <sup>§</sup>	0,00 (0,00;0,00)
	<b>Gesamt</b>	<b>0,00 (0,00;0,00)</b>	<b>1,13 (1,00;1,29)<sup>*#</sup></b>	<b>0,00 (0,00;0,00)</b>	<b>0,00 (0,00;0,00)<sup>§</sup></b>	<b>0,00 (0,00;0,00)</b>

**Tab. 15 - Histologische Schadensklassifikation der CA 3-Region (HE-Färbung)**

Median sowie 1. und 3. Quartil der HE-Indizes (0,1,2,3) der fünf Versuchsgruppen bezogen auf die CA 1-Region des Hippokampus.

Statistische Signifikanz: \* =  $p < 0,05$  vs. Sham der gleichen Gruppe; # =  $p < 0,05$  vs. Nativ;

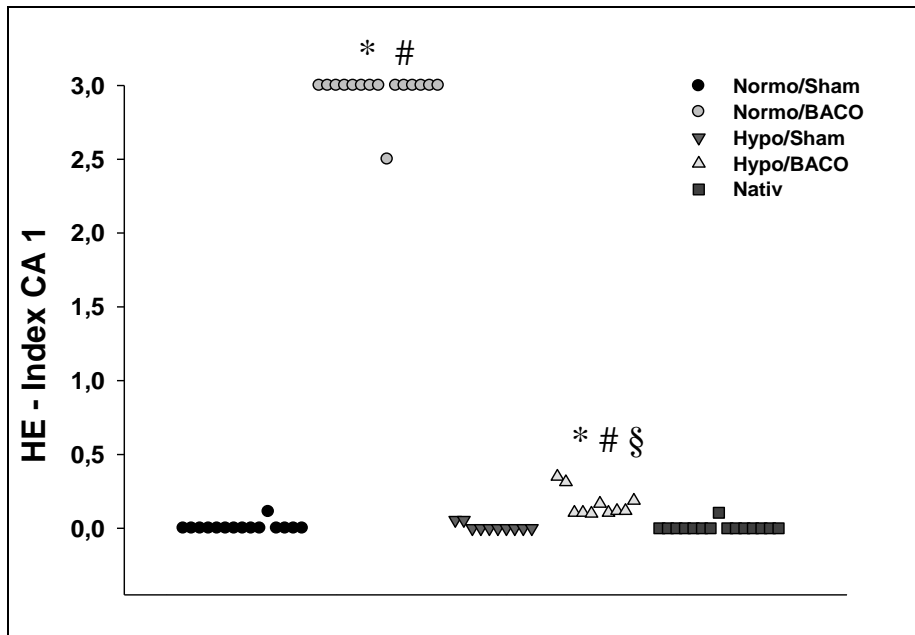
§ =  $p < 0,05$  vs. Normo/BACO

	Normo/Sham	Normo/BACO	Hypo/Sham	Hypo/BACO	Nativ
<b>Gyrus dentatus</b>	0,00 (0,00;0,00)	0,00 (0,00;0,00)	0,00 (0,00;0,00)	0,00 (0,00;0,00)	0,00 (0,00;0,00)

**Tab. 16 - Histologische Schadensklassifikation des Gyrus dentatus (HE-Färbung)**

Median sowie 1. und 3. Quartil der HE-Indizes (0,1) der fünf Versuchsgruppen bezogen auf den Gyrus dentatus.

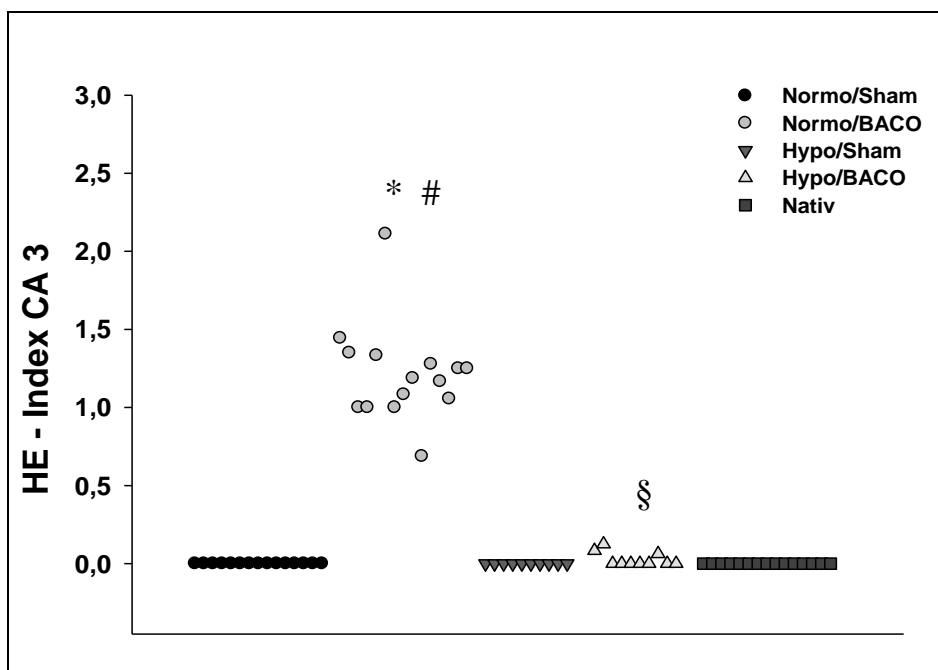
Statistische Signifikanz: keine



**Abb. 25 - Histologische Schadensklassifikation der CA 1-Region (HE-Färbung)**

Einzeldarstellung der HE-Indizes der Tiere aller fünf Versuchstiergruppen in der CA 1-Region des Hippokampus.

Statistische Signifikanz: \* =  $p < 0,05$  vs. Sham der gleichen Gruppe; # =  $p < 0,05$  vs. Nativ; § =  $p < 0,05$  vs. Normo/BACO



**Abb. 26 - Histologische Schadensklassifikation der CA 3-Region (HE-Färbung)**

Einzeldarstellung der HE-Indizes der Tiere aller fünf Versuchstiergruppen in der CA 3-Region des Hippokampus.

Statistische Signifikanz: \* =  $p < 0,05$  vs. Sham der gleichen Gruppe; # =  $p < 0,05$  vs. Nativ; § =  $p < 0,05$  vs. Normo/BACO

### 5.2.2 Neuronaler Schaden in NeuN-Immunfluoreszenz-Färbung

Der neuronale Schaden der CA 1-Region liegt in der Gruppe Normo/BACO mit einem Schadensindex von 4,00 (3,88;4,00) signifikant höher als in allen anderen Versuchsgruppen (s. Tab. 17). Die Indizes der Gruppen Normo/Sham, Hypo/Sham, Hypo/BACO zeigen untereinander und im Vergleich zur Nativgruppe keine signifikanten Unterschiede (Mediane zwischen 0,67 und 0,83).

In der CA 3-Region weist die Gruppe Normo/BACO signifikante Unterschiede zur Nativ- und zur Normo/Sham-Versuchstiergruppe auf (s. Tab. 18).

		Normo/Sham	Normo/BACO	Hypo/Sham	Hypo/BACO	Nativ
<b>CA 1 NeuN</b>	Links	0,58 (0,50;0,79)	4,00 (4,00;4,00) <sup>*#</sup>	0,83 (0,67;0,96)	0,83 (0,83;0,96) <sup>§</sup>	0,67 (0,67;0,83)
	Rechts	0,75 (0,67;0,83)	4,00 (3,83;4,00) <sup>*#</sup>	0,75 (0,67;0,83)	0,75 (0,54;0,96) <sup>§</sup>	0,67 (0,67;0,83)
	<b>Gesamt</b>	<b>0,67 (0,50;0,83)</b>	<b>4,00 (3,88;4,00)<sup>*#</sup></b>	<b>0,83 (0,67;0,88)</b>	<b>0,83 (0,67;1,00)<sup>§</sup></b>	<b>0,67 (0,67;0,83)</b>

**Tab. 17 - Histologische Schadensklassifikation der CA 1-Region (NeuN-Färbung)**

Median sowie 1. und 3. Quartil der Indizes (0,1,2,3,4) der fünf Versuchsgruppen bezogen auf die CA 1-Region des Hippokampus.

Statistische Signifikanz: \* =  $p < 0,05$  vs. Sham der gleichen Gruppe; # =  $p < 0,05$  vs. Nativ;

§ =  $p < 0,05$  vs. Normo/BACO

		Normo/Sham	Normo/BACO	Hypo/Sham	Hypo/BACO	Nativ
<b>CA 3 NeuN</b>	Links	1,58 (1,38;1,96)	2,17 (2,00;2,33) <sup>*#</sup>	1,83 (1,54;2,00)	2,00 (1,71;2,17)	1,83 (1,67;2,17)
	Rechts	1,75 (1,33;2,00)	2,00 (1,67;2,17) <sup>*#</sup>	1,75 (1,50;2,00)	2,08 (1,42;2,29)	1,67 (1,33;1,83)
	<b>Gesamt</b>	<b>1,67 (1,33;2,00)</b>	<b>2,08 (1,71;2,33)<sup>*#</sup></b>	<b>1,75 (1,50;2,00)</b>	<b>2,00 (1,67;2,21)</b>	<b>1,67 (1,38;2,13)</b>

**Tab. 18 - Histologische Schadensklassifikation der CA 3-Region (NeuN-Färbung)**

Median sowie 1. und 3. Quartil der Indizes (0,1,2,3,4) der fünf Versuchsgruppen bezogen auf die CA 3-Region des Hippokampus.

Statistische Signifikanz: \* =  $p < 0,05$  vs. Sham der gleichen Gruppe; # =  $p < 0,05$  vs. Nativ

### 5.3 Volumenbestimmung des Gyrus dentatus

In Bezug auf das Volumen des *Gyrus dentatus* zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchstiergruppen (s. Tab. 19).

		<b>Normo/Sham</b>	<b>Normo/BACO</b>	<b>Hypo/Sham</b>	<b>Hypo/BACO</b>	<b>Nativ</b>
<b>Volumen [mm<sup>3</sup>]</b>	Links	0,88 ± 0,07	0,80 ± 0,10	0,81 ± 0,01	0,83 ± 0,03	0,82 ± 0,01
	Rechts	0,87 ± 0,08	0,87 ± 0,06	0,84 ± 0,01	0,81 ± 0,02	0,85 ± 0,02
	<b>Gesamt</b>	<b>1,75 ± 0,12</b>	<b>1,67 ± 0,15</b>	<b>1,65 ± 0,01</b>	<b>1,64 ± 0,06</b>	<b>1,68 ± 0,02</b>

**Tab. 19 - Volumen des Gyrus dentatus in mm<sup>3</sup>**

*MW und SD des errechneten Volumens des Gyrus dentatus aller fünf Versuchstiergruppen.  
Statistische Signifikanz: keine*

## **5.4 Neurogenese**

### **5.4.1 BrdU-Färbung**

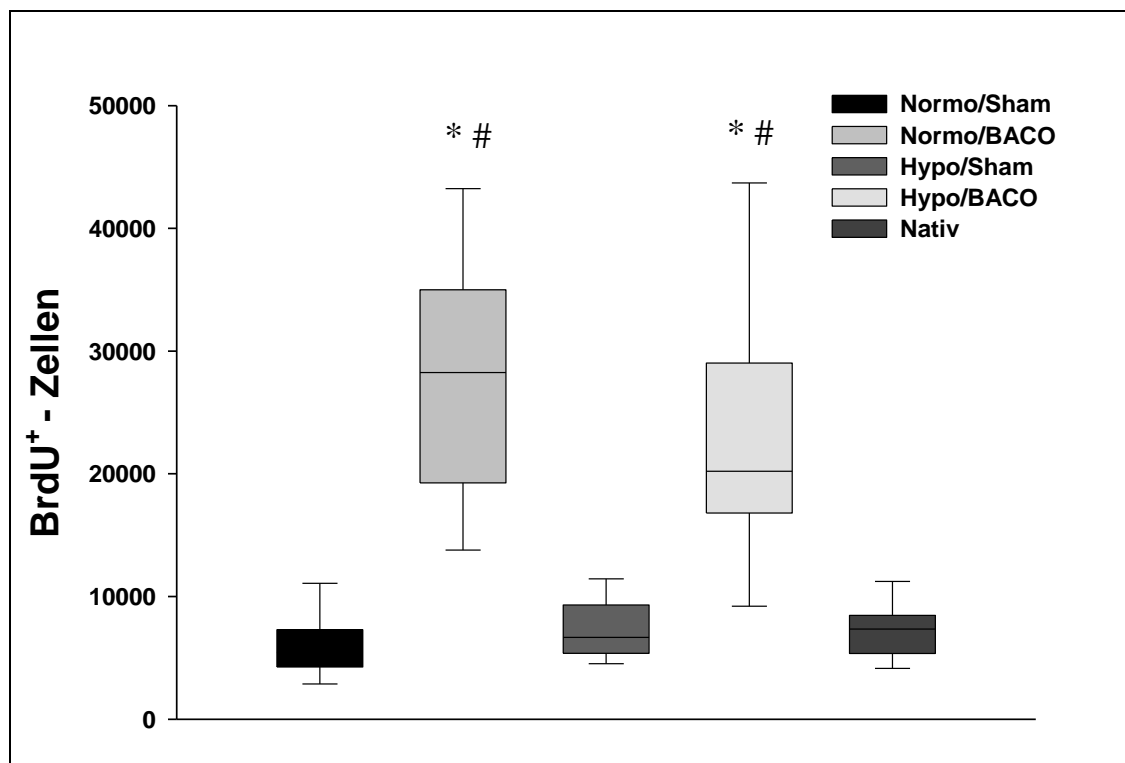
#### **5.4.1.1 BrdU-positive Zellen im Gyrus dentatus**

Die Zahl BrdU-positiver Zellen ist weder zwischen den beiden Kontrollgruppen (Normo/Sham *vs.* Hypo/Sham) untereinander noch verglichen mit der Nativ-Gruppe (Normo/Sham *vs.* Nativ bzw. Hypo/Sham *vs.* Nativ) signifikant unterschiedlich (s. Tab. 20 und Abb. 27). Der Vergleich der Ischämiegruppen mit der jeweiligen Kontrollgruppe (Normo/BACO *vs.* Normo/Sham und Hypo/BACO *vs.* Hypo/Sham) zeigt eine signifikant höhere Anzahl BrdU-positiver Zellen in Ischämietieren. Ebenso liegt die Zahl der Zellen in beiden Ischämiegruppen signifikant über der Zahl BrdU-positiver Zellen in der Nativ-Gruppe.

		Normo/Sham	Normo/BACO	Hypo/Sham	Hypo/BACO	Nativ
<b>BrdU<sup>+</sup> Zellen</b>	Links	2800 (2230;3335)	14170 (10865;17000) <sup>*#</sup>	3285 (2878;4445)	10315 (7845;13520) <sup>*#</sup>	3740 (2700;3885)
	Rechts	2840 (2360;3420)	12270 (9150;18595) <sup>*#</sup>	3200 (2743;4503)	10035 (7453;11805) <sup>*#</sup>	3570 (3085;4445)
	<b>Gesamt</b>	<b>5440 (4475;6635)</b>	<b>28240 (19890;34145)<sup>*#</sup></b>	<b>6670 (5485;8663)</b>	<b>20205 (17675;27560)<sup>*#</sup></b>	<b>7350 (5505;8305)</b>

**Tab. 20 - Absolute Anzahl BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus**

Median sowie 1. und 3. Quartil der absoluten Anzahl BrdU-positiver Zellen aller fünf Versuchstiergruppen.  
 Statistische Signifikanz: \* =  $p < 0,05$  vs. Sham der gleichen Gruppe; # =  $p < 0,05$  vs. Nativ



**Abb. 27 - Zellproliferation im Gyrus dentatus**

Boxplots für die absolute Anzahl BrdU-positiver (BrdU<sup>+</sup>) Zellen aller fünf Versuchstiergruppen.  
 Statistische Signifikanz: \* =  $p < 0,05$  vs. Sham der gleichen Gruppe; # =  $p < 0,05$  vs. Nativ

5.4.1.2 BrdU-positive Zellen in der CA 1- und CA 3-Region

Tiere der Versuchsgruppen ohne Ischämie weisen untereinander keinen signifikanten Unterschied auf. Der BrdU-Index liegt jedoch in beiden Ischämiegruppen sowohl in der CA 1- als auch CA 3-Region signifikant höher als in den Kontrollgruppen (Normo/BACO vs. Normo/Sham, Hypo/BACO vs. Hypo/Sham) und als in der Nativ-Gruppe. Im Vergleich der Ischämiegruppen (Hypo/BACO vs. Normo/BACO) zeigt sich für beide Regionen eine signifikant höhere Anzahl BrdU-positiver Zellen in der Gruppe Normo/BACO (s. Tab. 21 und Tab. 22).

In einer kursorisch durchgeführten Suche finden sich keine doppelt-gefärbten (BrdU- und NeuN-positiven) Zellen im Bereich der CA 1- oder CA 3-Region.

		<b>Normo/Sham</b>	<b>Normo/BACO</b>	<b>Hypo/Sham</b>	<b>Hypo/BACO</b>	<b>Nativ</b>
<b>CA 1 BrdU</b>	Links	0,33 (0,17;0,50)	4,00 (3,50;4,00)*#	0,58 (0,33;0,79)	0,92 (0,54;1,25)*#§	0,33 (0,17;0,50)
	Rechts	0,33 (0,21;0,67)	3,67 (3,33;4,00)*#	0,25 (0,04;0,46)	1,00 (0,71;1,13)*#§	0,33 (0,33;0,50)
	<b>Gesamt</b>	<b>0,33 (0,17;0,67)</b>	<b>3,83 (3,33;4,00)*#</b>	<b>0,33 (0,17;0,67)</b>	<b>1,00 (0,67;1,21)*#§</b>	<b>0,33 (0,21;0,50)</b>

**Tab. 21 - Klassifikation neu gebildeter Zellen der CA 1-Region (BrdU-Färbung)**

Median sowie 1. und 3. Quartil der Indizes (0,1,2,3,4) der fünf Versuchsgruppen bezogen auf die CA 1-Region des Hippokampus.

Statistische Signifikanz: \* =  $p < 0,05$  vs. Sham der gleichen Gruppe; # =  $p < 0,05$  vs. Nativ;

§ =  $p < 0,05$  vs. Normo/BACO

		<b>Normo/Sham</b>	<b>Normo/BACO</b>	<b>Hypo/Sham</b>	<b>Hypo/BACO</b>	<b>Nativ</b>
<b>CA 3 BrdU</b>	Links	0,50 (0,33;0,50)	2,17 (1,83;2,50)*#	0,75 (0,67;0,83)	1,00 (0,88;1,17)*#§	0,50 (0,17;0,67)
	Rechts	0,33 (0,21;0,67)	1,67 (1,33;1,83)*#	0,33 (0,21;0,63)	0,92 (0,71;1,38)*#§	0,67 (0,33;0,83)
	<b>Gesamt</b>	<b>0,42 (0,33;0,67)</b>	<b>1,83 (1,50;2,33)*#</b>	<b>0,67 (0,33;0,83)</b>	<b>1,00 (0,79;1,25)*#§</b>	<b>0,50 (0,33;0,67)</b>

**Tab. 22 - Klassifikation neu gebildeter Zellen der CA 3-Region (BrdU-Färbung)**

Median sowie 1. und 3. Quartil der Indizes (0,1,2,3,4) der fünf Versuchsgruppen bezogen auf die CA 3-Region des Hippokampus.

Statistische Signifikanz: \* =  $p < 0,05$  vs. Sham der gleichen Gruppe; # =  $p < 0,05$  vs. Nativ;

§ =  $p < 0,05$  vs. Normo/BACO



### 5.4.2 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Die Bestimmung des prozentualen Anteils neu gebildeter Neurone an der Gesamtheit BrdU-positiver Zellen (im Folgenden als „Neurogenesefaktor“ bezeichnet) erfolgt mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung (s. Kap. 4.5.4).

		<b>Normo/Sham</b>	<b>Normo/BACO</b>	<b>Hypo/Sham</b>	<b>Hypo/BACO</b>	<b>Nativ</b>
<b>Neuro genese faktor</b>	Links	88 (78;93)	66 (61;70) <sup>*#</sup>	85 (82;89)	78 (71;82) <sup>*§</sup>	78 (76;84)
	Rechts	82 (79;88)	70 (66;77) <sup>*#</sup>	85 (80;86)	76 (73;78) <sup>*§</sup>	79 (79;86)
	<b>Gesamt</b>	<b>85 (79;91)</b>	<b>67 (62;77)<sup>*#</sup></b>	<b>85 (81;88)</b>	<b>76 (71;81)<sup>*§</sup></b>	<b>79 (76;86)</b>

**Tab. 23 - Neurogenesefaktor im Gyrus dentatus in %**

*Median sowie 1. und 3. Quartil des Anteils neu gebildeter Neurone (in %) an allen BrdU-markierten Zellen im GD aller fünf Versuchstiergruppen*

*Statistische Signifikanz: \* =  $p < 0,05$  vs. Sham der gleichen Gruppe; # =  $p < 0,05$  vs. Nativ;*

*§ =  $p < 0,05$  vs. Normo/BACO*

Der Neurogenesefaktor beider Ischämiegruppen (Normo/BACO und Hypo/BACO) liegt signifikant niedriger als der der Kontrollgruppen (Normo/Sham und Hypo/Sham, s. Tab. 23). Tiere der Gruppe Normo/BACO zeigen im Vergleich zur Nativ-Gruppe signifikant niedrigere Neurogenesefaktoren. Der direkte Vergleich beider Ischämiegruppen (Hypo/BACO vs. Normo/BACO) weist für die Gruppe Hypo/BACO einen statistisch signifikant höheren Anteil neu gebildeter Neuronen an der Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen aus.

### 5.4.3 Anzahl neu gebildeter Neurone

Die Anzahl neu gebildeter Neurone liegt in beiden Ischämiegruppen signifikant höher als in den jeweiligen Kontrollgruppen (Normo/BACO vs. Normo/Sham bzw. Hypo/BACO vs. Hypo/Sham) und als in der Nativ-Gruppe (s. Tab. 24 und Abb. 28). In der Normo/BACO-Gruppe werden 18819 (13499;22417), in der Hypo/BACO-Gruppe 15175 (13048;20799) neue Neurone gezählt. Die Anzahl neu gebildeter Neurone der Kontrollgruppen untereinander sowie verglichen mit der Nativ-Gruppe sind nicht signifikant unterschiedlich (Normo/Sham vs. Hypo/Sham, Normo/Sham vs. Nativ bzw. Hypo/Sham vs. Nativ). Die Auswertung der Normo/Sham-Gruppe ergab 4600 (3655;5774) neue Neurone, die der Gruppe Hypo/Sham 5501 (4663;7231) sowie 5974 (4082;7186) neue Neurone in der Nativ-Gruppe.

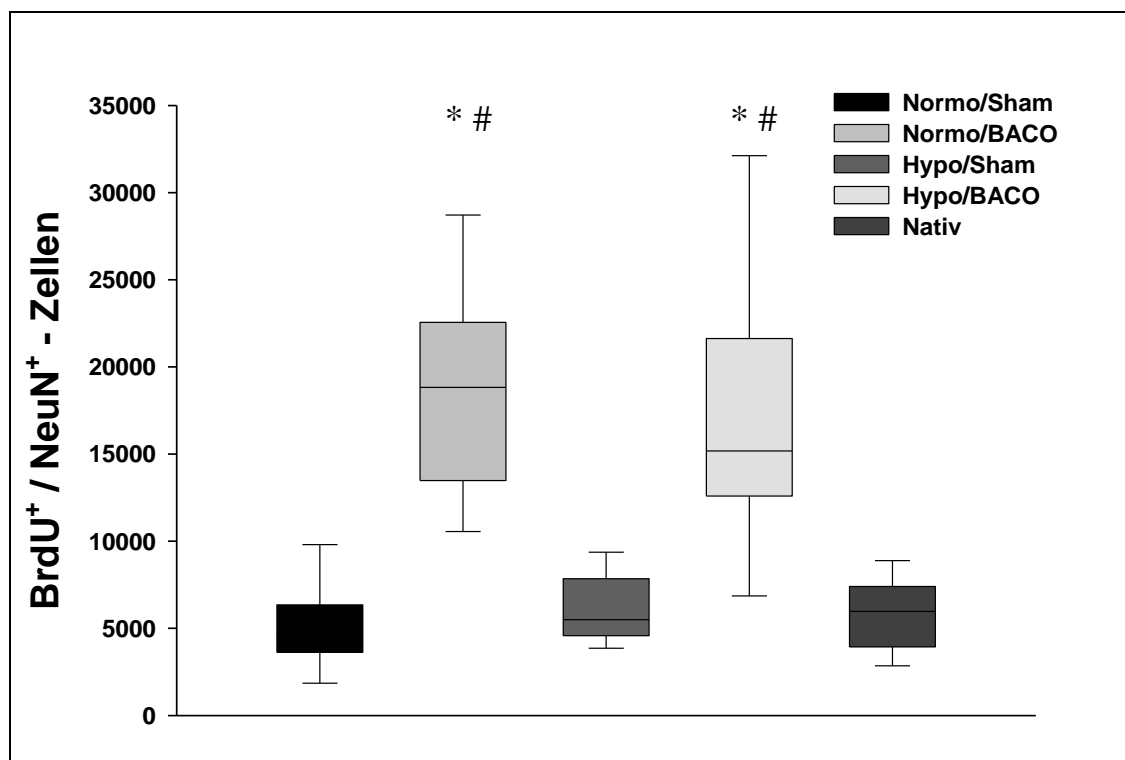
Im Vergleich der beiden Ischämiegruppen mit und ohne intranschämische Hypothermie (Hypo/BACO vs. Normo/BACO) zeigt sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Neurogenese im *Gyrus dentatus*.

		Normo/Sham	Normo/BACO	Hypo/Sham	Hypo/BACO	Nativ
neue Neurone	Links	2351 (1508;3005)	8495 (7233;10794)*#	2826 (2264;3881)	7301 (6526;10800)*#	3000 (1976;3309)
	Rechts	2377 (1782;2941)	8521 (6732;11990)*#	2684 (2242;3712)	7539 (6389;9005)*#	2950 (2221;3828)
	<b>Gesamt</b>	<b>4600 (3655;5774)</b>	<b>18819 (13499;22417)*#</b>	<b>5501 (4663;7231)</b>	<b>15175 (13048;20799)*#</b>	<b>5974 (4082;7186)</b>

**Tab. 24 - Neurogenese im Gyrus dentatus der Ratte**

Median sowie 1. und 3. Quartil der absoluten Anzahl neu entstandener Neurone im Gyrus dentatus der Ratte, 28 Tage nach Versuchsbeginn aller fünf Versuchstiergruppen (Normo/Sham, Normo/BACO und Nativ je  $n = 15$ , Hypo/Sham und Hypo/BACO je  $n = 10$ ).

Statistische Signifikanz: \* =  $p < 0,05$  vs. Sham der gleichen Gruppe; # =  $p < 0,05$  vs. Nativ;



**Abb. 28 - Neurogenese im Gyrus dentatus der Ratte**

Boxplots für die absolute Anzahl neu entstandener Neurone im Gyrus dentatus der Ratte, 28 Tage nach Versuchsbeginn aller fünf Versuchstiergruppen (Normo/Sham, Normo/BACO und Nativ je  $n = 15$ , Hypo/Sham und Hypo/BACO je  $n = 10$ ).

Statistische Signifikanz: \* =  $p < 0,05$  vs. Sham der gleichen Gruppe; # =  $p < 0,05$  vs. Nativ

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Physiologische Parameter

#### 6.1.1 Blutglukosekonzentration

In Versuchen zu ischämischen bzw. hypoxischen zerebralen Zuständen kommt der Höhe des Glukosespiegels eine große Bedeutung zu. Studien haben gezeigt, dass sowohl Hyper- als auch Hypoglykämie das Ausmaß der neuronalen Schädigung beeinflussen können. Abhängig von der zerebralen Sauerstoffzufuhr wird Glukose auf verschiedenen Wegen verstoffwechselt. Unter anaeroben Bedingungen kommt es neben der reduzierten ATP-Gewinnung zur Akkumulation des sauren Stoffwechselmetaboliten Laktat, das einerseits vermehrt gebildet und andererseits aufgrund der gestörten zerebralen Perfusion nur langsam eliminiert wird (SIESJÖ 1992). Bereits 1990 wurde im Tierexperiment gezeigt, dass ein hoher Blutglukosespiegel sowohl zu einer Laktatakkumulation als auch zu einem vergrößerten histologischen Schaden in ischämischen Bezirken führt (HOFFMANN *et al.* 1990). In einer Studie mit kombinierter hämorrhagischer Hypotension und 2-VO zeigte sich außerdem, dass unter erhöhten Blutzuckerwerten der neuronale Zelltod früher und in größerem Ausmaß erfolgt (SMITH *et al.* 1984). Demgegenüber ist eine Reduktion des Zelltods durch eine 48-stündige prä-ischämische Fastenperiode möglich, was auf einen erniedrigten zerebralen Laktatwert zurückgeführt wird (MARIE *et al.* 1990).

In der vorliegenden Studie lagen die gemessenen Werte zu Versuchsbeginn (Ausgangswert) im niedrig-normoglykämischen Bereich ( $81 \pm 21$  mg/dl). Tiere beider Kontrollgruppen (Normo/Sham, Hypo/Sham) zeigten über die Dauer des Eingriffs einen tendenziellen Abfall des Blutzuckerspiegels und lagen zu Versuchsende mit 67 bzw. 77 mg/dl im unteren Normalbereich. In beiden Ischämiegruppen stiegen die Glukosespiegel bis zum Ende der *A. carotis* - Okklusion auf ca. das doppelte an, erreichten aber zum Schluss des operativen Abschnitts wieder Ausgangswerte. Ursache für diese temporäre Erhöhung dürften stressbedingte Anpassungen an die zerebrale Ischämie sein, welche über die Freisetzung von Katecholaminen und Kortisol einen Anstieg der Blutglukosekonzentration bewirken (PILARCZYK *et al.* 1999). In der vorliegenden Arbeit weist die Gruppe Hypo/BACO trotz

erhöhter Blutzuckerwerte (bis 182 mg/dl) einen geringeren Schaden auf als die Gruppe Normo/BACO mit niedrigeren Blutzuckerwerten (bis 125 mg/dl). Dies legt die Vermutung nahe, dass die beobachteten Blutglukosewerte keinen wesentlichen Einfluss auf das Ausmaß des neuronalen Schadens hatten.

### 6.1.2 Blutgase

Die Gehirndurchblutung ist vom Kohlenstoffdioxidpartialdruck abhängig. Endogene Regulationsmechanismen steigern die zerebrale Perfusion als Reaktion auf Hyperkapnie und reduzieren sie bei Hypokapnie. Eine Hyperventilation führt durch Vasokonstriktion bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma zu einer Reduktion des intrakraniellen Drucks. Bei Hypoventilation können über den sog. Steal-Effekt ischämische Areale minderperfundiert werden (STOCCHETTI *et al.* 2005, WERNER 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden die arteriellen Blutgase im physiologischen Bereich gehalten. Lediglich bei Tieren der beiden Ischämiegruppen sind zum Zeitpunkt „Ischämie“ leicht erniedrigte PaCO<sub>2</sub>-Werte zu erkennen (36,2 bzw. 34,8 mmHg). Da diese Werte jedoch innerhalb des Normalbereichs liegen, ist ein Effekt auf den neuronalen Schaden unwahrscheinlich.

### 6.1.3 Mittlerer arterieller Druck

Da durch retrograde Perfusion über den *Circulus arteriosus* ein alleiniger Verschluss der *Aa. carotides communes* die zerebrale Perfusion nicht ausreichend zu vermindern vermag, wurde zusätzlich eine hämorrhagische Hypotension induziert. Im Rahmen der 2-VO beeinflusst die intraischämische Senkung des MAP den zerebralen Blutfluss, die elektrische Hirnaktivität und den histopathologischen Schaden. Über die Kontrolle des MAP können interindividuell einheitliche histomorphologische Schädigungen erreicht werden (GIONET *et al.* 1992, GINSBERG und BUSTO 1989).

In beiden BACO-Gruppen wurde am Ende der Ischämie dem Studienprotokoll entsprechend ein MAP von 40 mmHg gemessen. Ansonsten lag der MAP zu allen Messzeitpunkten und in allen Versuchsgruppen im physiologischen Bereich. Die Kombination aus Senkung des MAP

auf 40 mmHg und BACO bewirkte in der Versuchsgruppe Normo/BACO eine einheitliche Schädigung der CA 1-Region von > 50 %. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten einer Studie, die bei normothermer Ischämie den Einfluss des MAP auf den neuronalen Schaden der CA 1-Region nachwies. Während eine Reduktion des MAP auf 50 mmHg in Kombination mit 10-minütiger BACO 46 % der CA 1-Neurone irreversibel schädigte führte ein intranschämischer MAP von 30 mmHg zu einer 72 %igen Schädigung (GIONET *et al.* 1992).

## **6.2 Histopathologischer Schaden**

Eines der Ziele der vorliegenden Studie war es, den Einfluss moderater intranschämischer Hypothermie auf die histopathologische neuronale Schädigung des Hippokampus nachzuweisen. Darüber hinaus wurde untersucht, ob der in der HE-Färbung beobachtete hippokampale Schaden auf einen tatsächlichen Verlust an Neuronen zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurden der GD sowie die CA 1- und CA 3-Region sowohl in konventioneller HE-Färbung als auch in der NeuN-Immunfluoreszenz untersucht und in verschiedenen Schadensklassen kategorisiert.

### **6.2.1 Schädigung nach normothermer Ischämie**

Die selektive neuronale Vulnerabilität bewirkt im Rahmen einer globalen zerebralen Ischämie eine regional ungleiche neuronale Schädigung. Ursache dafür sind die unterschiedlichen Ischämieschwellenwerte der einzelnen Zellpopulationen, weshalb beispielsweise Neurone des Hippokampus schneller zugrunde gehen als Neurone des Neokortex. Innerhalb der Hippokampusformation zeigt die Empfindlichkeit der Zellen folgende Reihenfolge: CA 1 > CA 3 > GD (DUVERNOY 1998, PULSINELLI 1985).

Tiere der normothermen Ischämiegruppe wiesen im Bereich der CA 1-Region durchweg eine hochgradige Schädigung auf. Dies führte sowohl in der HE-Auswertung als auch in der NeuN-Betrachtung zur Einordnung der mikroskopisch erkennbaren Schädigung in die jeweils höchste Schadensklasse. Daneben zeigten normotherme Ischämietiere auch eine Schädigung

der CA 3-Region, die aber deutlich niedriger als in der CA 1-Region ausfiel. Beide Sham-Gruppen sowie die Nativ-Tiergruppe waren sowohl in der HE- als auch in der NeuN-Färbung frei von einer histopathologisch erkennbaren Schädigung.

Die Ischämie-induzierten Schädigungen betreffen somit v. a. die Neurone der CA 1-Region. Unter anderem ist das Ausmaß der Schädigung abhängig von der Ischämiedauer und führt mit zunehmender Dauer über eine verstärkte Schädigung neuronaler Strukturen zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität der Versuchstiere (GRØGAARD *et al.* 1986), was u. a. wegen der auf 28 Tagen ausgelegten Versuchsdauer nicht erstrebenswert ist. Während in der hier vorliegenden Arbeit eine 14-minütige zerebrale Ischämie zu einer massiven Schädigung der CA 1-Region führte (HE-Index 3,00) wies in einem vergleichbaren Ischämiemodell eine Ischämiedauer von 10 min lediglich einen HE-Index von ca. 0,6 auf. Die in der vorliegenden Arbeit um 4 min längere Ischämiedauer führte darüber hinaus auch zur Schädigung der CA 3-Region (HE-Index 1,13), die im Rahmen einer 10-minütigen Ischämie nicht betroffen war (HE-Index 0,00; ENGELHARD *et al.* 2007). Neben der Ischämiedauer scheinen auch Art und Dosis der Anästhesie Einfluss auf die histopathologische Schädigung zu nehmen. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte am identischen Ischämiemodell gezeigt werden, dass die Verwendung des Injektionsanästhetikums Propofol nach 14-minütiger Ischämie zu einem HE-Index von 2,40 in der CA 1-Region führte (STALLMANN 2008). Unter sonst identischen Versuchsbedingungen liegt das Ausmaß der Schädigung während einer Sevofluran-Anästhesie (HE-Index 3,00) also höher als unter der Gabe von Propofol. Die vorliegenden Ergebnisse der hippocampalen Schädigung sind vergleichbar mit denen einer Studie zum Einfluss des intraischämischen Blutdrucks während normothermer Ischämie. Durch Kombination einer 10-minütigen Vorderhirnischämie mit Hypotension auf einen MAP von 30 bzw. 50 mmHg konnte ein Verlust von 72 bzw. 46 % der CA 1-Neurone beobachtet werden (GIONET *et al.* 1992). In der vorliegenden Studie lag der MAP mit 40 mmHg zwischen diesen Werten. Zwar wurde nicht der exakte Prozentsatz geschädigter Neurone ermittelt, der HE-Index von 3,00 bestätigt jedoch eine konstante Schädigung von mehr als 50 % der CA 1-Region.

## 6.2.2 Schädigung nach intraischämischer Hypothermie

Seit einigen Jahrzehnten ist bekannt, dass eine intraischämische Hypothermie den neuronalen Schaden zu verringern sowie das funktionelle Ergebnis zu verbessern vermag. In der CA 1-Region des Hippokampus kann eine Schädigung durch die Induktion milder bzw. moderater Hypothermie über die Dauer einer zerebralen Ischämie minimiert werden (BUSTO *et al.* 1987, WELSH *et al.* 1990).

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten bestätigen die neuroprotektive Wirkung einer 45-minütigen moderaten intraischämischen Hypothermie, die zur nahezu vollständigen Reduktion des histopathologischen Schadens führte (HE-Index Hypo/BACO 0,11 vs. Normo/BACO 3,00). Die Hypothermie-Behandlung führte in der CA 1-Region also zu einer hochsignifikanten Reduktion des histopathologisch erkennbaren Schadens. In der CA 3-Region lassen die Ergebnisse erkennen, dass eine histologische Schädigung durch die therapeutische Hypothermie ebenfalls minimiert wird.

Die hier gefundenen Resultate decken sich mit den Ergebnissen intraischämischer Hypothermie in der Literatur (WERNER 1997). Eine Reduktion der intrakraniellen Temperatur auf 34 °C führte in einem Ischämiemodell an Ratten (4-VO) ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des neuronalen Schadens in der CA 1-Region (BUSTO *et al.* 1987). Dieses Erkenntnis konnte neben einer Vielzahl anderer Studien auch in einem Modell der globalen zerebralen Ischämie an Gerbils bestätigt werden. Hier führte eine Reduktion der rektal gemessenen Temperatur auf 28 bis 32 °C während einer 5-minütigen Ischämie zu einer nahezu vollständigen Protektion von CA 1-Neuronen ( $94 \pm 6$  % intakte Neurone, CARROLL und BEEK 1992). Mit einer Reduktion der neuronalen Schädigung von 3,00 (Normo/BACO) auf 0,11 (Hypo/BACO) zeigt das in vorliegender Arbeit angewandte Ischämiemodell in Kombination mit intraischämischer Hypothermie einen mit der Literatur vergleichbaren neuroprotektiven Effekt. Es existieren zahlreiche Erklärungsansätze für die therapeutische Wirkung intraischämischer Hypothermie, wobei die neuroprotektiven Mechanismen bisher nicht vollständig verstanden sind. Es konnte gezeigt werden, dass der zelluläre Bedarf an Sauerstoff und Glukose um 5 bis 8 % pro Grad Celsius gesenkt wird und Hypothermie somit über eine Stoffwechselreduktion die Ischämietoleranz erhöht. Milde bis moderate Hypothermie vermag darüber hinaus die Produktion freier Radikale wie Superoxide und Peroxynitrite sowie die daraus resultierende Gewebsschädigung zu reduzieren. Über eine Stabilisierung der Zellmembranen kommt es zu einem verzögerten Verlust der Ionengradienten, einer Stabilisierung der zellulären Homöostase und der Aufrechterhaltung



zellulärer Funktionen. Hypothermie führt weiterhin zur Suppression Apoptose-vermittelnder Kaspasen, pro-inflammatorischer Zytokine und exzitatorischer Neurotransmitter wie Glutamat. Während eine zerebrale Ischämie über die massive Freisetzung von Glutamat zahlreiche zytotoxische und proteolytische Prozesse in Gang setzt (Exzitotoxizität) können diese durch Hypothermie vermindert werden (zur Übersicht: POLDERMAN 2008, FROEHLER und GEOCADIN 2007). Eine Erklärung für die Reduktion des hippokampalen Schadens könnte u. a. die Hypothermie-bedingte verminderte Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat liefern, der im Rahmen einer zerebralen Ischämie verstärkt ausgeschüttet wird und zu neuronaler Schädigung führt (ENGELHARD *et al.* 2003). Intraischämische Hypothermie von 33 °C bewirkte während einer fokalen zerebralen Ischämie die Reduktion der maximalen extrazellulären Glutamatkonzentration von 33,95 µmol/ml (Normothenie) auf 10,69 µmol. Darüber hinaus kam es in der Hypothermie-Gruppe postischämisch zu einer schnelleren Normalisierung des Glutamatspiegels (BAKER *et al.* 1995). In einem Modell der 4-VO konnte gar gezeigt werden, dass durch intraischämische Hypothermie die Freisetzung von Glutamat komplett unterdrückt wird (BUSTO *et al.* 1989). Diese Ergebnisse erlauben die Vermutung, dass der in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte neuroprotektive Effekt zumindest teilweise auf eine Hypothermie-bedingte Reduktion der Glutamatausschüttung zurückzuführen sein könnte. Einen weiteren Erklärungsansatz liefert die Beobachtung, dass zerebrale Ischämie eine Änderung im Verhältnis der Apoptosefaktoren *Bax* / *Bcl-2* bewirkt (PAPE *et al.* 2006). Intrischämische Hypothermie reduziert die Expression des pro-apoptischen Proteins *Bax* (EBERSPÄCHER *et al.* 2003) und führt somit zu einer relativen Steigerung der Expression des anti-apoptischen proteins *Bcl-2*. Es konnte gezeigt werden, dass die Senkung der perikraniellen Temperatur auf 34 °C während einer 30-minütigen einseitigen Okklusion der *A. carotis communis* die Konzentration des Proteins *Bax* um mehr als 50 % reduziert. Eine weitere Studie legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei auch um einen langfristigen Effekt handelt. Die Modulation apoptotischer Vorgänge war auch noch am 28. Tag nach zerebraler Ischämie nachweisbar und konnte durch postischämische Hypothermie günstig beeinflusst werden (EBERSPÄCHER *et al.* 2005).

### **6.2.3 Unterschiede zwischen CA 1- und CA 3-Region**

Die postischämische Schädigung der CA 1-Region ist massiv und beträgt in der HE-Färbung für normotherme Versuchstiere durchweg über 50 %. Eine intraischämische Hypothermie vermag diese Schädigung fast vollständig zu verhindern. Demgegenüber fällt die Beeinträchtigung der weniger vulnerablen CA 3-Region mit ca. 10 % deutlich niedriger aus. Es ist bekannt, dass die CA 1-Region ein besonders vulnerables Gebiet der Hippokampusformation darstellt und globale Ischämie hier zu einem beidseitigen Verlust an Pyramidenzellen führt (SQUIRE und ZOLA 1996). Eine mögliche Erklärung für die divergierende Vulnerabilität liegt in der unterschiedlichen Blutversorgung, da die *A. cerebri media* in ihrem Verlauf zunächst *Striatum* bzw. den lateralen Kortex versorgt und nicht zum Hippokampus führt. Möglich wäre weiterhin, dass in der CA 1-Region vorwiegend pro-apoptotische Proteine (*Bax* und *p53*) exprimiert werden, während in der weniger vulnerablen CA 3-Region vor allem anti-apoptotische Proteine (*Bcl-2* und *Mdm-2*) lokalisiert sind (CHEN *et al.* 1996).

### **6.2.4 HE- versus NeuN-Färbung**

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten histopathologischen Untersuchungen erfolgten 28 Tage nach Versuchsbeginn. Da Veränderungen wie Narbenbildung oder gesteigerte Phagozytose das histologische Bild einer neuronalen Schädigung in der HE-Färbung imitieren können ist bisher ungeklärt, inwieweit die in HE-Färbung zu beobachtende hippokampale Schädigung mit einem Verlust an Neuronen korreliert. Der neuronale Marker NeuN erlaubt für den Bereich des *Cornu ammonis* eine hochspezifische Darstellung ausschließlich der Nervenzellen. Ein Ziel dieser Untersuchung lag daher in der direkten Betrachtung des NeuN-gefärbten Nervenzellbandes der CA 1- und CA 3-Region um die hieran durchgeführte systematische Schadensklassifikation mit derjenigen der HE-Auswertung zu vergleichen.

In Zusammenschau der erhobenen Daten ergibt sich eine weitgehende Übereinstimmung der Aussagen beider Färbetechniken. Dies gilt insbesondere für die CA 1-Region, die für beide Methoden eine maximale und damit gegenüber den Kontrollgruppen hochsignifikante Schädigung für Tiere der Gruppe Normo/BACO ausweist. Es konnte somit bewiesen werden,

dass der in HE-Färbung zu beobachtende Schaden der CA 1-Region tatsächlich auf einem Verlust an Neuronen beruht. Die Ergebnisse der NeuN-Färbung zeigen darüber hinaus, dass intraischämische Hypothermie eine sehr große Anzahl an Nervenzellen vor dem Zelltod bewahrt. Im Gegensatz zur HE-Färbung konnte in NeuN-Technik für die CA 3-Region jedoch keine Hypothermie-bedingte Neuroprotektion mehr festgestellt werden. In Bezug auf die Schädigung fand sich in der NeuN-Färbung hier kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen Normo/BACO und Hypo/BACO.

Während die Aussagekraft der HE-Färbung in Bezug auf die CA 1-Region weitestgehend durch die NeuN-Färbung bestätigt werden konnte zeigen sich also Unterschiede in Blick auf die CA 3-Region. Für diesen Bereich ist eine Unterscheidung zwischen geschädigten und nicht geschädigten Tieren anhand der NeuN-Färbung kaum möglich, da die Ergebnisse der Kontrollgruppen einen neuronalen Schaden vorzutäuschen scheinen. Ursache hierfür dürften methodische Probleme sein, da im Bereich der CA 3-Region eine Unterscheidung der einzelnen Schadenskategorien nur schwer möglich ist.

## **6.3 Neurogenese**

### **6.3.1 Natürliches Ausmaß der Neurogenese**

Die Existenz postnataler Neurogenese konnte bisher in verschiedenen Spezies nachgewiesen werden, wie z. B. Maus, Hase, Meerschweinchen, Affe sowie im menschlichen Gehirn selbst (ERIKKSON *et al.* 1998, ALTMAN und DAS 1965). In ihrer wegweisenden Studie behandelten ERIKKSON *et al.* 1998 fünf Tumorpatienten zu Lebzeiten mit einer BrdU-Infusion, deren Gehirnmaterial 16 bis 781 Tage später *post mortem* gewonnen werden konnte. Mit Hilfe der auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten BrdU/NeuN-Immunfluoreszenz-Doppelfärbung konnte die lebenslange Persistenz von Neurogenese im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die neu generierten Zellen des GD mehr als zwei Jahre lang im menschlichen Gehirn überleben können. Mit steigendem Lebensalter scheint jedoch die Anzahl neu generierter Zellen abzunehmen. Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer Reduktion der hippokampalen Neurogenese um etwa 80 % bei einer einjährigen Ratte

im Vergleich zu einer neugeborenen Ratte kommt. Möglicherweise besteht somit ein Zusammenhang zu der altersabhängigen Einbuße kognitiver Möglichkeiten (MCDONALD und WOJTOWICZ 2005, KUHN *et al.* 1996).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde einerseits das Ausmaß der spontanen Neurogenese in Nativ-Tieren bestimmt, welches bei 5974 (4082;7186) neu gebildeten Neuronen 28 Tage nach Versuchsbeginn lag. Zum anderen zeigten Tiere der Gruppe Normo/Sham mit operativem Eingriff aber ohne Hypothermie und Ischämie 4600 (3655;5774) neue Neurone.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit liegt das im menschlichen Gehirn beschriebene Ausmaß an natürlicher Neurogenese weit niedriger (ERIKKSON *et al.* 1998). Verglichen mit den eigenen Ergebnissen an Ratten zeigt auch der dem Menschen phylogenetisch ähnliche Makak-Affe ein etwa zehnmal niedrigeres Ausmaß an natürlicher Neurogenese (KORNACK und RAKIC 1999). Generell ist es jedoch äußerst schwierig, quantitative Vergleiche zwischen verschiedenen Spezies anzustellen, da viele endogene und exogene Faktoren, wie beispielsweise die Durchgängigkeit der Blut-Hirn-Schranke für BrdU, unbekannt sind. Das maximale Ausmaß an Neurogenese der Ratte wird zwischen dem siebten und zehnten postnatalen Tag erreicht. Bis zur dritten Lebenswoche bildet sich dann das *Stratum granulare* fast vollständig aus (CAMERON und MCKAY 2001). Proliferation und Differenzierung neuronaler Stammzellen zu funktionstüchtigen Neuronen benötigen in der adulten Ratte etwa drei bis vier Wochen und damit länger als die adulte Neurogenese des Neonaten (CAMERON *et al.* 1993). Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass zum Zeitpunkt der histologischen Untersuchung nicht mehr alle initial BrdU-markierten Zellen detektiert werden können. Ursache dafür ist ein natürlicher Verlust neu generierter Zellen im ersten Lebensmonat. Für die granuläre Zone der Ratte konnte gezeigt werden, dass weniger als 50 % der dort gebildeten Zellen die ersten 28 Tage nach BrdU-Applikation überleben (DAYER *et al.* 2003).

Die Einordnung des in der vorliegenden Studie ermittelten Ausmaßes an Neurogenese fällt nicht leicht, da verschiedene Faktoren wie Dosis und Dauer der BrdU-Applikation sowie das Alter der Ratten die Untersuchung beeinflussen. In einer Studie an jungen adulten Ratten fanden CAMERON und MCKAY (2001) ca. 3400 neu gebildete Neurone im GD von Tieren, die vier Wochen zuvor mittels BrdU behandelt wurden. Auch konnte ein massiver Unterschied in der Proliferation neuronaler Stammzellen bei Tieren verschiedener Altersklassen aufgedeckt werden. Es zeigte sich, dass Ratten mittleren Lebensalters vom ersten bis 60. Tag nach BrdU-Applikation durchweg weniger als 10 % BrdU-markierter Zellen im Vergleich zu juvenilen Tieren aufwiesen. Am 28. Tag kamen bei juvenilen Ratten ca. 5000 BrdU-positive Zellen im

GD zur Darstellung (MCDONALD und WOJTOWICZ 2005). Dieses Ergebnis deckt sich in etwa mit der in dieser Studie ermittelten Anzahl BrdU-positiver Zellen in den Versuchstiergruppen, die der Bestimmung der natürlichen Neurogenese dienten (Normo/Sham und Nativ). Im Gegensatz dazu liegt die von CAMERON und MCKAY (2001) ermittelte Anzahl neuer Neurone niedriger als in den in dieser Studie untersuchten Versuchsgruppen, was möglicherweise auf die unterschiedliche BrdU-Applikation zurückzuführen ist. Während in der vorliegenden Arbeit eine Woche lang täglich 100 mg BrdU / kg KG injiziert wurden erfolgte in der Studie von CAMERON und MCKAY (2001) lediglich eine einmalige Gabe von 300 mg BrdU / kg KG. Die niedrigere Gesamtdosis und die Markierung von Zellen nur zu einem Zeitpunkt legen die Vermutung nahe, dass deshalb weniger Zellen im GD zur Darstellung kommen.

### **6.3.2 Neurogenese nach zerebraler Ischämie**

In der Literatur findet sich eine Reihe von Hinweisen auf eine Ischämie-induzierte Steigerung der zerebralen Neurogenese. Die gesteigerte Zellproliferation im GD ist ein transientes Phänomen, das in der Folge unterschiedlichster ischämischer Störungen, wie traumatische Hirnschädigung (RICE *et al.* 2003), fokale (JIN *et al.* 2001) und globale zerebrale Ischämie (ENGELHARD *et al.* 2007, YAGITA *et al.* 2001), zu beobachten ist. In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl an Untersuchungen durchgeführt, die der Charakterisierung endogener und exogener Einflussfaktoren auf die Neurogenese dienten. Es ist bekannt, dass sowohl physiologische (GOULD *et al.* 1999, VAN PRAAG *et al.* 1999, KEMPERMANN *et al.* 1997) als auch pathologische Stimuli (PARENT *et al.* 1997) eine Modulation der natürlichen Neurogenese bewirken. In einer Studie an Gerbils eruierten LIU *et al.* (1998) den zeitlichen Verlauf der postischämisch gesteigerten Proliferationsrate nach 10-minütiger BACO. Ein markanter Anstieg der Zellproliferation war ab dem sechsten Tag an zu beobachten mit einem Maximum zwischen dem neunten und elften Tag. Im Rahmen dessen kam es zu einem etwa 12-fachen Anstieg der Anzahl BrdU-positiver Zellen gegenüber den Kontrolltieren. Anschließend fiel die Proliferationsrate schnell wieder ab um zwischen der dritten und fünften postischämischen Woche erneut die Ausgangswerte zu erreichen. Diese Erkenntnisse konnten mit ähnlichem zeitlichem Verlauf in weiteren Studien u. a. an Ratten bestätigt werden. Problematisch scheint in diesem Zusammenhang jedoch die Tatsache, dass in den meisten

Studien zur Proliferation neuronaler Stammzellen im GD unterschiedliche Narkotika, wie z. B. Isofluran (LIU *et al.* 1998), Propofol (STALLMANN 2008) oder Pentobarbital (YAGITA *et al.* 2001), zum Einsatz kommen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die vorliegenden Studienergebnisse hierdurch beeinflusst wurden. Die verwendeten Narkosemittel könnten dabei entweder direkt oder auch indirekt über eine Reduktion der zerebralen Schädigung das Ausmaß der Zellproliferation modulieren.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine signifikante Erhöhung der Anzahl neu generierter Neurone 28 Tage nach zerebraler Ischämie im Vergleich zu den Kontrollgruppen und der Nativ-Tiergruppe. Bemerkenswerterweise wird beim Vergleich der Neurogenesefaktoren offensichtlich, dass diese nach zerebraler Ischämie gegenüber den Werten ihrer jeweiligen Kontrollgruppe signifikant reduziert sind (Normo/Sham 85 % *vs.* Normo/BACO 67 %) und (Hypo/Sham 85 % *vs.* Hypo/BACO 76 %). Möglicherweise ist diese Reduktion des Verhältnisses von neu gebildeten Neuronen zu allen BrdU-positiven Zellen auf ein vermindertes Überleben der nach zerebraler Ischämie vermehrt gebildeten Neurone zurückzuführen oder im Sinne einer Narbenbildung Ausdruck der gesteigerten Differenzierung in Richtung Gliazellen. Dennoch ist die Gesamtzahl der neu gebildeten Neurone erhöht. Im einzelnen konnten in der normothermen Ischämiegruppe 18819 (13499;22417) und in der Ischämiegruppe mit gleichzeitiger Hypothermie 15175 (13048;20799) neu generierte Nervenzellen im GD ermittelt werden. Unabhängig von einer Hypothermie-Behandlung wird somit eine Steigerung um etwa das dreifache beobachtet. Noch deutlicher erkennbar ist die Steigerung der Zellproliferation an der Gesamtzahl neu gebildeter (also nur BrdU-positiver) Zellen. Hier kam es teilweise zu einer Verfünffachung der Anzahl neuer Zellen in der Ischämiegruppe (Normo/BACO) mit 28240 (19890;34145) gegenüber der Kontrollgruppe (Normo/Sham) mit 5440 (4475;6635) einfach BrdU-positiven Zellen.

Die vorliegenden Ergebnisse beider Ischämiegruppen heben sich sowohl in Bezug auf die Anzahl BrdU-positiver Zellen als auch auf die Anzahl neu gebildeter Neurone deutlich von den entsprechenden Kontrollgruppen sowie der Nativ-Tiergruppe ab und bestätigen damit die Ischämie-induzierte Stimulation der Zellproliferation. Die pathophysiologischen Mechanismen, welche zur Akzeleration der Neurogenese führen, sind jedoch nach wie vor unklar und bedürfen weitergehenden Forschungsprojekten. Mögliche Erklärungen hierfür werden im Zusammenwirken eines ischämischen Verlusts an Pyramidenzellen der CA 1-Region mit der Freisetzung von Stressproteinen und Wachstumsfaktoren gesehen. Darüber hinaus konnte in einer Studie der zerebralen Ischämie während der ersten postischämischen

Woche im GD der Ratte eine 20 %ige Reduktion der NMDA-Rezeptor-Bindung gezeigt werden, die sich im Laufe der zweiten Woche wieder normalisierte. Da diese Veränderungen in engem zeitlichen Bezug zum Maximum an Neurogenese stehen (neunter bis elfter postischämischer Tag bei Gerbils), könnte somit auf einen entsprechenden Zusammenhang geschlossen werden (LIU *et al.* 1998, WESTERBERG *et al.* 1989). Gegen die Notwendigkeit einer massiven histopathologischen Schädigung zur Akzeleration der Neurogenese spricht die Tatsache, dass es auch in Abwesenheit eines solchen Schadens der CA 1-Region nach zerebraler Ischämie zum Anstieg der Neurogenese kommt. Diese bereits von LIU *et al.* 1998 gemachte Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Während die CA 1-Region der normothermen Ischämiegruppe (Normo/BACO) sowohl in der HE- als auch NeuN-Färbung einen massiven Schaden zeigte, wurde dieser durch intraischämische Hypothermie hochsignifikant reduziert (HE-Färbung) bzw. verhindert (NeuN-Färbung). Unabhängig davon wiesen jedoch beide Ischämiegruppen in dieser Arbeit gleichermaßen eine massive Steigerung der Neurogenese auf. Eine mögliche Erklärung könnten Ischämie-induzierte Veränderungen von Wachstumsfaktoren und Stressproteinen darstellen. Die *in-vivo*-Applikation der Wachstumsfaktoren EGF bzw. FGF steigert beispielsweise einen Monat nach zerebraler Ischämie die Anzahl neu gebildeter CA 1-Pyramidenzellen (NAKATOMI *et al.* 2002).

In der hier verwendeten Versuchsanordnung entsprechen die BrdU-positiven Zellen denjenigen, die innerhalb des Zeitraums der BrdU-Applikation neu gebildet wurden, sowie deren Tochterzellen, die bis zum Zeitpunkt der Gewebebegewinnung (28. Tag) überlebt haben. Es ist davon auszugehen, dass einmal markierte Zellen im Rahmen von Mitosevorgängen ihre BrdU-markierte DNS zwischen dem achten und 28. Tag an Tochterzellen übertragen haben. Somit darf also nicht davon ausgegangen werden, dass die hier bestimmten Werte gleichzusetzen sind mit der Anzahl neu generierter Zellen in den ersten sieben Tagen *post operationem*. Daneben ist es durchaus möglich, dass eine Reihe einstmals generierter Zellen im Rahmen von Apoptose- oder Nekrosevorgängen eliminiert wurden und zum hier gewählten Untersuchungszeitpunkt nicht mehr detektiert werden können. Es ist bekannt, dass sich der Bildung neuer Zellen eine kritische Phase von ein bis zwei Wochen anschließt, in der sich das weitere Schicksal der Zellen entscheidet. In dieser Zeit sterben viele der neu generierten Zellen ab, während lediglich ein Teil von ihnen überlebt und sich vollständig ausdifferenzieren kann (GOULD *et al.* 1999, CAMERON *et al.* 1993). Die Überlebensrate scheint dabei von physiologischen Reizen beeinflusst zu werden, was für Hippokampus-abhängige Lernprozesse und für das Leben in einer reizhaltigen Umgebung (sog. „enriched

environment“) gezeigt werden konnte (KEMPERMANN *et al.* 1997, CAMERON *et al.* 1993). In einer weiteren Studie kam es zu einer ca. 50 %igen Reduktion neu generierter Zellen im Zeitraum zwischen der ersten Woche und der Probengewinnung nach vier Wochen (KEE *et al.* 2001). Im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchung können Aussagen zum Langzeitüberleben (28 Tage nach Ischämie) dieser neu gebildeten Neurone getroffen werden, was in Hinblick auf die Zuverlässigkeit und die klinische Relevanz explizit erwünscht war, da ein kurzfristiger Proliferationsanstieg nach ein bis zwei Wochen zwar von Interesse ist, aber nicht relevant wenn diese neu gebildeten Zellen nicht überleben.

### **6.3.3 Hypothermie**

#### **6.3.3.1 Beeinflussung der natürlichen Neurogenese**

In der Literatur finden sich bisher lediglich zwei Studien, die sich mit der Beeinflussung natürlicher Neurogenese von Säugetieren durch Hypothermie beschäftigen. Beide Veröffentlichungen beschreiben einen Rückgang der Neurogenese als Folge einer Hypothermie-Behandlung. Die erste zu diesem Thema durchgeführte Untersuchung wurde an fünf Wochen alten Sprague-Dawley Ratten vorgenommen, die für fünf Minuten in 4 °C kaltes Wasser verbracht, anschließend bei 20 °C Umgebungstemperatur gehalten und mittels BrdU-Injektion behandelt wurden. Eine Stunde nach der BrdU-Gabe erfolgte die Euthanasie der Tiere. Sowohl die histologische Aufarbeitung der Gewebeproben als auch die Detektion BrdU-positiver Zellen im GD geschahen auf ähnliche Weise wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Die Ergebnisse zeigen einen 30 %igen Rückgang in der Anzahl neu generierter Zellen der mit Hypothermie behandelten Tiere im Vergleich zu der Versuchstiergruppe ohne Hypothermie. Ebenso konnte hier gezeigt werden, dass eine Wiedererwärmung der Tiere auf 30 °C vor einer Hypothermie-bedingten Reduktion der Zellproliferation schützt (LEE *et al.* 2002). In der zweiten diesbezüglichen Studie konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine ca. 50 %ige Reduktion der Zahl BrdU-markierter Zellen in der SGZ nach Hypothermie festgestellt werden. Sie wurde an jungen sieben Tage alten Ratten durchgeführt, deren rektale Temperatur über 24 Stunden auf 30 °C gehalten wurde. Die BrdU-Applikation geschah nach 21 Stunden und weitere drei Stunden später erfolgte die Euthanasie der Tiere ohne vorherige



Wiedererwärmung (KANAGAWA *et al.* 2006).

In Bezug auf die natürliche Neurogenese zeigen die vorliegenden Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied zwischen Tieren mit und ohne Hypothermie-Behandlung. Nach einer 45-minütigen Hypothermie bei 33 °C konnten für die Gruppe Hypo/Sham 6670 (5485;8663) neu generierte, einfach BrdU-positive Zellen gefunden werden. Dieses Ausmaß an Zellproliferation unterscheidet sich kaum von dem der Kontrollgruppe (Normo/Sham) mit 5440 (4475;6635) und dem der Nativ-Tiere mit 7350 (5505;8305) Zellen. Der Neurogenesefaktor konnte mit 85 % (Hypo/Sham), 85 % (Normo/Sham) und 79 % (Nativ) bestimmt werden. Daraus resultieren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der absoluten Anzahl neu gebildeter Neurone, die für Hypo/Sham bei 5501 (4663;7231), für Normo/Sham bei 4600 (3655;5774) und für Tiere der Nativ-Gruppe bei 5974 (4082;7186) liegt.

Folglich scheint im hier verwendeten Tiermodell eine alleinige Hypothermie weder das Ausmaß der natürlichen Zellproliferation noch den natürlichen Neurogenesefaktor oder die neuronale Differenzierung von Progenitorzellen zu beeinflussen. Diese Ergebnisse stehen somit im Widerspruch zu den bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen, die von einer Hypothermie-bedingten Reduktion der Zellproliferation ausgehen. Mögliche Ursachen für die Divergenz der Resultate könnten im Entwicklungsstand der verwendeten Ratten, in der Versuchsdurchführung, im Zeitpunkt der Probengewinnung sowie in Ausmaß und Dauer der Hypothermie zu suchen sein. Die von KANAGAWA *et al.* (2006) durchgeführten Untersuchungen erfolgten am siebten postnatalen Tag, also zu einem Zeitpunkt, an dem sich das entwickelnde Gehirn der neonatalen Ratte auf dem Höhepunkt der Synaptogenese befindet (YON *et al.* 2005). Aus diesem Grund dürfte es äußerst vulnerabel auf Störungen der natürlichen Homöostase reagieren und ein Abfall der intrakraniellen Temperatur könnte zum ausgeprägten neuronalen Zelltod führen. Während die Tiere der vorliegenden Arbeit über die Dauer der Hypothermie einer suffizienten Anästhesie und Analgesie unterzogen wurden, blieben sie in beiden o. g. Studien über die gesamte Versuchsdauer wach. Da Neurogenese ein multifaktorieller Prozess ist der u. a. durch die Ausschüttung von Stresshormonen wie Kortikosteroiden supprimiert wird (FUCHS und GOULD 2002), dürfte dies v. a. in der von LEE *et al.* (2002) veröffentlichten Arbeit Einfluss auf die Proliferation neuronaler Zellen gehabt haben. Hier wurden die Tiere bei vollem Bewusstsein für fünf Minuten in Eiswasser gegeben, was ohne eine anschließende Wiedererwärmung zu einer signifikanten Reduktion der Zellproliferation um ca. 30 % führte. Auch durch die in beiden Studien nur einmalig erfolgte BrdU-Applikation sowie aufgrund des Zeitpunkts der Gewebegewinnung eine bzw. drei

Stunden nach der einzigen Injektionen lassen diese Ergebnisse nur schwer eine Vergleichbarkeit mit den vorliegenden Resultaten zu.

### 6.3.3.2 Beeinflussung der Ischämie-induzierten Neurogenese

Intraischämische Hypothermie erhöht die Ischämietoleranz von Organen und vermag die postischämische Gewebeschädigung zu reduzieren. Da das neurologische Ergebnis nach zerebraler Ischämie durch die Anwendung therapeutischer Hypothermie verbessert werden kann (BERNARD *et al.* 2002, CLIFTON *et al.* 2002), ist es vorstellbar, dass dies zum Teil auf endogener Neurogenese beruht. Bisher jedoch sind sowohl das natürliche wie auch das potentielle Ausmaß von Hypothermie auf die Proliferation neuronaler Stammzellen nach zerebraler Ischämie unbekannt. Der primäre Endpunkt der vorliegenden Arbeit lag daher in der Aufdeckung des Einflusses moderater intraischämischer Hypothermie auf die Proliferation neuronaler Stammzellen 28 Tage nach inkompletter Vorderhirnischämie und Reperfusion im *Gyrus dentatus* der adulten Ratte.

Die Ergebnisse unserer Studie weisen diesbezüglich keinen signifikanten Unterschied zwischen Tieren mit und ohne intraischämischer Hypothermie auf. Während in der Gruppe Normo/BACO 28240 (19890;34145) neu generierte Zellen insgesamt und davon 18819 (13499;22417) neue Neurone gefunden werden konnten, lag die Zahl einfach BrdU-positiver Zellen in der Gruppe Hypo/BACO bei 20205 (17675;27560). Auch die Anzahl neu generierter Nervenzellen lag bei gekühlten Tieren mit 15175 (13048;20799) nur unwesentlich niedriger als in der Gruppe Normo/BACO. Interessanterweise ergab sich jedoch im Vergleich beider Gruppen ein signifikanter Unterschied des Neurogenesefaktors. Dieser lag mit 76 % (71%;81%) in intraischämisch hypothermen Tieren (Hypo/BACO) signifikant höher als in Ischämietieren ohne Hypothermiebehandlung (Normo/BACO) mit 67 % (62%;77%).

Im Gegensatz zu der von KANAGAWA *et al.* (2006) und LEE *et al.* (2002) gezeigten Reduktion der Zellproliferation und Neurogenese durch Hypothermie weisen die Resultate der vorliegenden Arbeit keine Suppression der Neurogenese nach einer zerebralen Ischämie auf. Unabhängig von der intrakraniellen Temperatur zeigen beide Ischämiegruppen eine Steigerung der Proliferation neuronaler Stammzellen im Vergleich zur natürlichen Neurogenese. Gleichzeitig reduziert intraischämische Hypothermie signifikant die histologische Gewebsschädigung. Diese Ergebnisse bestätigen eine Studie an Ratten, die

keinen Zusammenhang zwischen dem Grad des histopathologischen Schadens und dem Ausmaß an Neurogenese zeigen konnte (ENGELHARD *et al.* 2007). Interessanterweise zeigt sich zwischen beiden Ischämiegruppen ein signifikanter Unterschied des Neurogenesefaktors, während die Gesamtzahl neu gebildeter Nervenzellen diesen Unterschied nicht aufweist. Der gegenüber normothermen Ischämietieren signifikant erhöhte Neurogenesefaktor der Gruppe Hypo/BACO könnte als Zeichen dafür interpretiert werden, dass eine moderate intraischämische Hypothermie die Überlebenschancen und Ausdifferenzierung neuronaler Progenitorzellen positiv beeinflusst. Andererseits ist es auch vorstellbar, dass eine Ischämie-induzierte Migration von möglicherweise Glia- und / oder Entzündungszellen in den GD durch Hypothermie reduziert wird und sich somit ein höherer Neurogenesefaktor in der Gruppe Hypo/BACO zeigt.

Zusammenfassend ergeben die Resultate dieser Studie keinen Hinweis darauf, dass die Neuroprotektion unter intraischämischer Hypothermie auf einer gesteigerten Neurogenese beruhen könnte.

#### **6.3.4 BrdU-positive Zellen in der CA 1- und CA 3-Region**

Anhand der durchgeführten BrdU-Färbung erfolgte die Auswertung der CA 1- und CA 3-Region unter zwei Gesichtspunkten. Zum einen sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Anzahl neu gebildeter Zellen und ischämisch geschädigten Areale aufgewiesen werden, zum anderen wurde eine kursorische Suche nach neu gebildeten Neuronen als Hinweis auf die Entstehung oder Migration neuer Nervenzellen durchgeführt.

Basierend auf einer eigens erarbeiteten Klassifikation (s. Tab. 12, S. 66) zeigte sich für Tiere mit zerebraler Ischämie in der CA 1-Region jeweils eine signifikante Steigerung des BrdU-Index gegenüber den entsprechenden Kontrollgruppen. Diese Zunahme an neu gebildeten Zellen betrifft dabei sowohl die Gruppe der Normo/BACO als auch die Gruppe Hypo/BACO. Nach intraischämischer Hypothermie ist der BrdU-Index mit 1,00 (0,67;1,21) signifikant niedriger als nach normothermer Ischämie mit 3,83 (3,33;4,00). Ein ähnliches Ergebnis bietet die Auswertung der CA 3-Region mit dem Unterschied, dass Tiere der Gruppe Normo/BACO hier einen um ca. 50 % niedrigeren Index aufweisen. Wie in der CA 1-Region weist die intraischämisch hypotherme Versuchsgruppe auch in der CA 3-Region eine im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöhte Anzahl BrdU-positiver Zellen auf.

Diese Resultate bestätigen, dass eine histologisch nachweisbare Schädigung nach zerebraler Ischämie zu einer Einwanderung oder Proliferation neu generierter, BrdU-positiver Zellen in die betroffene CA 1-Region führt, die nicht für den neuronalen Marker NeuN angefärbt sind (SALAZAR-COLOCHO *et al.* 2008). Bezogen auf die HE-Schadensklassifikation dieser Regionen scheint das Ausmaß der Proliferation neu gebildeter Zellen von der Schadensstärke abhängig zu sein. Neu gebildete Nervenzellen, also gleichzeitig BrdU- und NeuN-positive Zellen, konnten weder in der CA 1- noch in der CA 3-Region gefunden werden. Es ergibt sich somit weder ein Hinweis auf Neurogenese noch auf die Migration neu generierter Neurone in die geschädigten Areale des *Cornu ammonis*. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich bei den einfach BrdU-positiven Zellen der CA 1- und CA 3-Region um Gliazellen handeln könnte, die im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion proliferieren. Diese Vermutung wird durch eine Untersuchung des Phänotyps BrdU-positiver Zellen in der CA 1-Region von Affen gestärkt. 23 Tage nach einer 20-minütigen Okklusion der *Aa. subclaviae* wurde in geschädigten CA 1-Regionen dort ebenfalls eine massive Zunahme BrdU-positiver Zellen beobachtet. 80 % dieser neu generierten Zellen konnten dabei als Mikroglia identifiziert werden (TONCHEV und YAMASHIMA 2006), deren Aufgabe u. a. in der Phagozytose abgestorbener Neurone liegt.

## **6.4 Methoden**

### **6.4.1 Tierexperimentelles Ischämiemodell**

Zur Grundlagenforschung der zerebralen Ischämie werden derzeit am häufigsten Nagetiere, insbesondere Ratten, Mäuse und Gerbils, eingesetzt. In den Bereichen der Ischämie- und Neurogeneseforschung ist es von großer Bedeutung reproduzierbare Ergebnisse zu liefern, um deren Aussagekraft besser beurteilen zu können. Wichtig für die Vergleichbarkeit von Ergebnissen ist die Möglichkeit der Überwachung und Kontrolle verschiedener Parameter vor und während des Tierversuchs.

In der vorliegenden Studie erfolgten die Untersuchungen an Ratten, da sie gut geeignet sind, physiologische Parameter sowie Beatmung kontinuierlich zu überwachen. Diese Maßnahmen

sind nötig, damit das Ausmaß der Ischämie-bedingten zerebralen Schädigung nicht durch andere Faktoren beeinflusst wird. Außerdem besitzen Ratten eine mit höheren Säugetieren vergleichbare Physiologie sowie eine dem Menschen anatomisch ähnliche zerebrovaskuläre Blutversorgung (TRAYSTMAN 2003, YAMORI *et al.* 1976). Für die vorliegende Arbeit wurde ein Modell zur Induktion einer 14-minütigen Vorderhirnischämie gewählt, dessen neuronale Schädigung durch bilateralen Verschluss der *A. carotis communis* bei gleichzeitiger hämorrhagischer Hypotension auf einen MAP von 40 mmHg erzielt wird. Dieses BACO-Modell eignet sich besonders zur Untersuchung der hippokampalen Neurogenese nach zerebraler Ischämie, da die neuronale Schädigung vor allem die CA 1-Region betrifft und der *Gyrus dentatus* als Ort der Neurogenese verschont bleibt. Um über die Versuchsdauer eine exakte Steuerung und Kontrolle der perikraniellen Temperatur zu gewährleisten wurde eine im rechten *M. temporalis* platzierte Messsonde verwendet. Eine rektale Messung wäre hierzu ungeeignet, da perikranielle und rektale Temperatur nicht direkt korrelieren (BUSTO *et al.* 1987).

Die Narkoseführung erfolgte im vorliegenden Tierversuch mittels des Inhalationsanästhetikums Sevofluran. Es ist bekannt, dass während einer zerebralen Ischämie applizierte volatile Anästhetika den ischämischen Hirnschaden mindern können (MIURA *et al.* 1998). Dieser neuroprotektive Effekt scheint sowohl auf einer selektiv antagonistischen Wirkung an NMDA-Rezeptoren als auch auf anti-exzitotoxischen Mechanismen zu beruhen (KUDO *et al.* 2001). Durch eine Reduktion der Sevofluran-Konzentration in beiden Ischämiegruppen (Normo/BACO vs. Hypo/BACO) werden antiexzitotoxische Effekte minimiert. Selbst wenn Sevofluran einen Einfluss auf die zerebrale Schädigung ausüben sollte bleibt die Vergleichbarkeit der Gruppen erhalten, da die verwendete Konzentration in allen Gruppen identisch ist.

#### 6.4.2 BrdU

Als Thymidin-Analogon wird BrdU während der S-Phase des Zellzyklus in die DNS sich teilender Zellen eingebaut. Somit stellt BrdU keinen spezifischen Indikator für Zellproliferation dar sondern ist vielmehr als Marker der DNS-Synthese anzusehen. Nach einer zerebralen Ischämie wird BrdU folglich nicht nur in die DNS proliferierender sondern im Rahmen von Reparaturmechanismen auch in die DNS geschädigter Zellen inkorporiert.

Dies erschwert Aussagen über die Anzahl neu gebildeter Zellen im GD nach einer zerebralen Schädigung.

In einer Studie an Makaken konnte jedoch gezeigt werden, dass BrdU zusammen mit dem Proliferationsmarker Ki-67 quantitativ gleichermaßen nach globaler zerebraler Ischämie zur Darstellung kommt (TONCHEV *et al.* 2003). Darüber hinaus scheint die Menge des im Rahmen von Reparaturvorgängen eingebauten BrdU vernachlässigbar klein zu sein und um mehrere Zehnerpotenzen niedriger zu liegen als die der Neurogenese-bedingten Inkorporation. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die im Rahmen von DNS-Reparaturprozessen inkorporierte Menge an BrdU zu gering ist um Neurone zur Darstellung zu bringen (COOPER-KUHN und KUHN 2002).

Dennoch gibt es einige Einschränkungen im Rahmen der Verwendung von BrdU zum Nachweis von Zellproliferation und Neurogenese. Mit fortschreitender Anzahl an Teilungszyklen kommt es zur Ausdünnung des BrdU-Gehalts der Stammzellen, da diese mit jeder Mitose ca. die Hälfte ihrer markierten DNS an die Tochterzellen verlieren und somit das Signal der BrdU-Detektion abgeschwächt wird (WARD *et al.* 1991). Im Rahmen der BrdU-Färbung wird das zu detektierende Signal jedoch durch den Einsatz des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes in seiner Intensität potenziert, so dass selbst geringe Mengen an BrdU noch nachweisbar sind (HSU *et al.* 1981).

Durch die Größe des Bromatoms kommt es beim Einbau von BrdU in die Zelle zu strukturellen Veränderungen mit Stabilitätseinbußen der DNS. Hierdurch steigt das Risiko für Chromosomenaberrationen. In höheren Dosen zeigten sich die mutagene und kanzerogene Wirkung von BrdU (BANNIGAN und LANGMAN 1979, ANISIMOV und OSIPOVA 1993). Aufgrund dieser Toxizitäts-Limitierung können keine sättigenden BrdU-Dosen injiziert werden, wie sie zur Markierung aller S-Phase-Zellen nötig wären. Unterhalb der toxischen Grenze (einmalige Applikation von mehr als 300 mg/kg KG bzw. Verabreichung von 50 mg BrdU/kg KG über mehr als 12 Tage) sind keine unerwünschten Wirkungen zu erwarten (TAUPIN 2007).

Problematisch ist außerdem die mit zwei Stunden relativ schnelle Eliminationshalbwertszeit des applizierten BrdUs im Gehirn, das bei einer einmaligen Injektion pro Tag nicht alle innerhalb von 24 Stunden gebildeten Zellen markieren kann. Aufgrund der Tatsache, dass die S-Phase in jungen Ratten etwa neuneinhalb Stunden dauert ist es dennoch möglich, eine Abdeckung von BrdU über eine Zeitspanne von 21 h zu gewährleisten (9,5 h vor und nach der Halbwertszeit). Die häufig in Proliferationsstudien verwendete Dosierung von 50 mg/kg KG wurde zur besseren histologischen Darstellung nach eigenen Vorversuchen auf 100 mg/kg KG

erhöht, so dass ca. 60 % der S-Phase-Zellen adulter Ratten im GD erfasst werden (CAMERON und MCKAY 2001).

### 6.4.3 NeuN

Um aus der Gesamtheit aller BrdU-positiven Zellen die Anzahl neu entstandener Neurone bestimmen zu können, wird eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Die Detektion BrdU-markierter DNS wird dabei kombiniert mit dem Nachweis spezifischer Zellmarker, die lediglich in reifen, differenzierten Nervenzellen exprimiert werden. Für die Wahl des neuronenspezifischen Markers ist es dabei wichtig, sowohl den Zeitpunkt der Probenentnahme als auch das nachzuweisende Entwicklungsstadium der neu generierten Zellen zu beachten (s. Kap. 1.2.3.4 und Abb. 9).

Da im Rahmen der vorliegenden Untersuchung die Anzahl neu generierter Nervenzellen verglichen werden sollte, erfolgte die histologische Untersuchung nach einer Überlebenszeit von 28 Tagen (Langzeitüberleben). Diese postischämische Spanne gewährleistet genügend Zeit für die neuronale Differenzierung der proliferierenden Vorläuferzellen zu muren Neuronen (KEE *et al.* 2001, CAMERON *et al.* 1993). Der von uns angewandte Marker NeuN kennzeichnet ausschließlich Neurone, die ihre Differenzierung abgeschlossen haben und zumindest potentiell funktionsfähig sind. Für unsere Untersuchungen stellt NeuN somit einen etablierten Marker dar, der für die Untersuchung einer globalen Ischämie an der Ratte gut geeignet ist (MULLEN *et al.* 1992, SCHMIDT-KASTNER *et al.* 1995).

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

### **Einfluss moderater intraischämischer Hypothermie auf die Proliferation und Differenzierung neuronaler Stammzellen 28 Tage nach inkompletter Vorderhirnischämie und Reperfusion der adulten Ratte**

Hypothermie schützt Neurone vor hypoxischen, ischämischen und traumatischen Schädigungen. Bisher ist jedoch unklar, ob Hypothermie auch endogene Reparaturmechanismen beeinflusst. Die vorliegende Arbeit untersucht daher den Einfluss intraischämischer Hypothermie auf das neuroregenerative Potential des Gehirns nach zerebraler Ischämie.

50 männliche *Sprague-Dawley* Ratten wurden hierzu anästhesiert, intubiert und mit einem Sevofluran- (3-3,5 vol.%) Sauerstoff-Gemisch ( $FiO_2 = 0,33$ ) beatmet. Zur Kontrolle der perikraniellen Temperatur wurde eine Sonde im *M. temporalis* platziert. Katheter zur Überwachung der physiologischen Parameter, zum Blutentzug und zur Medikamentenapplikation wurden in die *A. et V. femoralis dextra* sowie in die *V. jugularis dextra* eingebracht. Nach Umstellung auf eine balancierte Anästhesie (0,9 vol.% Sevofluran, 2,5 µg/kg/h Sufentanil i. v.) wurden die Tiere in folgende Versuchsgruppen randomisiert: Normotherme Ischämie (Normo/BACO, n = 15), intraischämische Hypothermie (Hypo/BACO, n = 10) sowie korrespondierende scheinoperierte Kontrollgruppen (Normo/Sham, n = 15 und Hypo/Sham, n = 10). In den Gruppen Normo/Sham und Normo/BACO wurde die perikranielle Temperatur konstant bei 37 °C gehalten während sie in den Gruppen Hypo/Sham und Hypo/BACO für 85 min auf 33 °C gesenkt wurde. Durch bilaterale Okklusion der *Aa. carotides communes* in Kombination mit hämorrhagischer Hypotension (MAP = 40 mmHg) wurde in BACO-Tieren eine 14-minütige inkomplette globale zerebrale Ischämie induziert. Tiere der Kontroll-Gruppen (Sham) blieben ohne Induktion einer Ischämie in Narkose. 15 weitere Tiere durchliefen nicht den operativen Versuchsteil und bildeten die Nativ-Gruppe, die als Referenz für die natürliche Neurogenese diente.

Zur *in-vivo*-Markierung der Stammzellen wurde vom ersten bis siebten postoperativen Tag allen Tieren (inkl. denen der Nativ-Gruppe) täglich BrdU (ein Marker der DNS-Synthese; 100 mg/kg KG) injiziert. Nach 28 Tagen wurden die Tiere in tiefer Narkose getötet, mit PFA-Lösung perfundiert, die Gehirne wurden entnommen und histologisch aufbereitet. Die



Analyse des histopathologischen Schadens erfolgte anhand HE-gefärbter Hirnschnitte (40 µm), die Quantifikation der absoluten Anzahl neu gebildeter Zellen im *Gyrus dentatus* erfolgte mittels der BrdU-Färbung. Anhand der BrdU/NeuN-Immunfluoreszenz-Doppelfärbung konnte der Anteil neu generierter Neurone bestimmt werden.

Nach zerebraler Ischämie zeigten Tiere mit Normothermie eine Schädigung der CA 1-Region von über 50 % während hypotherme Ischämietiere einen Schaden von weniger als 10 % aufwiesen. Tiere ohne Ischämie (Hypo/Sham, Normo/Sham, Nativ) zeigten keinen histopathologischen Schaden. Die Anzahl neu gebildeter Neurone im *Gyrus dentatus* lag für normotherme Ischämietiere (Normo/BACO) bei 18819 (13499;22417) und für Tiere mit intraischämischer Hypothermie (Hypo/BACO) bei 15175 (13048;20799) neuen Neuronen. In den Kontroll-Gruppen wiesen Tiere der Gruppe Normo/Sham 5501 (4663;7231), Tiere der Gruppe Hypo/Sham 4600 (3655;5774) und Tiere der Nativ-Gruppe 5974 (4082;7186) neu generierte Neurone auf.

Diese Daten bestätigen frühere Studien, die eine Reduktion des neuronalen Schadens durch intraischämische Hypothermie zeigten. Infolge des ischämischen Stimulus kam es im Vergleich zu beiden Kontroll- und der Nativ-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl neuer Neurone in beiden Ischämiegruppen unabhängig von der Temperatur. Somit scheint das Ausmaß der histopathologischen Schädigung keinen Einfluss auf die Anzahl neu gebildeter Neurone zu haben. Darüber hinaus beeinflusste die therapeutische Hypothermie auch nicht die natürliche Neurogeneserate. Die erhobenen Daten lassen vermuten, dass Hypothermie keinen Effekt auf die Anzahl und Differenzierung neuronaler Stammzellen aufweist, unabhängig davon, ob eine zerebrale Schädigung vorliegt.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, H. A., Werner, C.** (1997)  
From the racemate to the eutomer: (S)-ketamine. Renaissance of a substance?  
*Anaesthesist* **46**: 1026 - 1042
- Alison, M. R., Poulson, R., Forbes, S., Wright, N. A.** (2002)  
An introduction to stem cells.  
*Journal of Pathology* **197**: 419 - 423
- Alvarez-Buylla, A., Seri, B., Doetsch, F.** (2002)  
Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain.  
*Brain Research Bulletin* **57**: 751 - 758
- Altman, J., Das, G. D.** (1965)  
Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.  
*Journal of Comparative Neurology* **124**: 319 - 335
- Anisimov, V. N., Osipova, G. Y.** (1993)  
Carcinogenesis induced by combined neonatal exposure to 5-bromo-2'-deoxyuridine and subsequent total-body X-ray irradiation in rats.  
*Cancer Letters* **70**: 81 - 90
- Asan, E., Nitsch, R.** (2004)  
Limbische Areale und Verbindungen (limbisches System). S. 527 - 531  
In: Benninghoff, A., Drenckhahn, D. (Hrsg.). *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Band 2. 16. Auflage. Urban und Fischer Verlag, München und Jena
- Baker, C. J., Fiore, A., Frazzini, V. I., Choudhri, T., Zubay, G., Solomon, R. A.** (1995)  
Intraischemic hypothermia decreases the release of glutamate in the core of permanent focal cerebral infarcts.  
*Neurosurgery* **36**: 994 - 1002
- Bannigan, J., Langman, J.** (1979)  
The cellular effect of 5-bromodeoxyuridine on the mammalian embryo.  
*Journal of Embryology and Experimental Morphology* **50**: 123 - 135
- Berkowitz, I. D., Gervais, H., Schleien, C. L., Koehler, R. C., Dean, J. M., Traystman, R. J.** (1991)  
Epinephrine dosage effects on cerebral and myocardial blood flow in an infant swine model of cardiopulmonary resuscitation.  
*Anesthesiology* **75**: 1041 - 1050

- Bernard, S. A., Gray, T. W., Buist, M. D., Jones, B. M., Silvester, W., Gutteridge, G., Smith, K.** (2002)  
Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia.  
The New England Journal of Medicine **346**: 557 - 563
- Biebl, M., Cooper, C. M., Winkler, J., Kuhn, H. G.** (2000)  
Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain.  
Neuroscience Letters **291**: 17 - 20
- Brown, J. P., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Aigner, L., Kuhn, H. G.** (2003)  
Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis.  
Journal of Comparative Neurology **467**: 1 - 10
- Brüx, A., Girbes, A. R. J., Polderman, K. H.** (2005)  
Kontrollierte milde und moderate Hypothermie.  
Anaesthesist **54**: 225 - 244
- Bundesministerium der Justiz** (2008)  
<http://www.bmj.bund.de/files/-/1148/ESchG.pdf>  
(Stand: 17.07.2008)
- Busto, R., Dietrich, W. D., Globus, M. Y., Valdés, I., Scheinberg, P., Ginsberg, M. D.** (1987)  
Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury.  
Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **7**: 729 - 738
- Busto, R., Globus, M. Y., Dietrich, W. D., Martinez, E., Valdes, I., Ginsberg, M. D.** (1989)  
Effects of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain.  
Stroke **20**: 904 - 910
- Cajal, S. R. Y** (1906)  
The structure and connexions of neurons.  
Nobel Lecture, 12. Dezember 1906, Karolinska Institut, Stockholm, Schweden  
[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1906/cajal-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1906/cajal-lecture.html)  
(Stand: 27.07.2008)
- Cajal, S. R. Y** (1928), übersetzt von **May, R. T.** (1959)  
Degeneration and regeneration of the nervous system. pp. 750  
Haffner Publishing, New York, USA
- Cameron, H. A., Gould, E.** (1994)  
Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus.  
Neuroscience **61**: 203 - 209

- Cameron, H. A., McEwen, B. S., Gould, E.** (1995)  
Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus.  
*Journal of Neuroscience* **15**: 4687 - 4692
- Cameron, H. A., McKay, R. D.** (2001)  
Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus.  
*Journal of Comparative Neurology* **435**: 406 - 417
- Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S., Gould, E.** (1993)  
Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat.  
*Neuroscience* **56**: 337 - 344
- Carroll, M., Beek, O.** (1992)  
Protection against hippocampal CA<sub>1</sub> cell loss by post-ischemic hypothermia is dependent on delay of initiation and duration.  
*Metabolic Brain Disease* **7**: 45 - 50
- Chen, J., Zhu, R. L., Nakayama, M., Kawaguchi, K., Jin, K., Stetler, R. A., Simon, R. P., Graham, S. H.** (1996)  
Expression of the apoptosis-effector gene, Bax, is up-regulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia.  
*Journal of Neurochemistry* **67**: 64 - 71
- Clifton, G. L., Miller, E. R., Choi, S. C., Levin, H. S., McCauley, S., Smith, K. R., Muizelaar, J. P., Marion, D. W., Luerssen, T. G.** (2002)  
Hypothermia on admission in patients with severe brain injury.  
*Journal of Neurotrauma* **19**: 293 - 301
- Cooper-Kuhn, C. M., Kuhn, H. G.** (2002)  
Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain.  
*Developmental Brain Research* **134**: 13 - 21
- Couillard-Despres, S., Winkler, J., Uyanik, G., Aigner, L.** (2001)  
Molecular mechanisms of neuronal migration disorders, quo vadis?  
*Current Molecular Medicine* **1**: 677 - 688
- Dayer, A. G., Ford, A. A., Cleaver, K. M., Yassaee, M., Cameron, H. A.** (2003)  
Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus.  
*The Journal of comparative neurology* **400**: 563 - 572
- Diener, H.-C., Weller, M.** (2007)  
Neurologie (ausgewählte Kapitel). S. 1395 - 1442  
In: Gerok, W., Huber, C., Meinertz, T., Zeidler, H. (Hrsg.). *Die Innere Medizin. Referenzwerk für den Facharzt*. 11. Auflage. Schattauer Verlag, Stuttgart und New York

**Doetsch, F.** (2003)

The glial identity of neural stem cells.  
Nature Neuroscience **6**: 1127 - 1134

**Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A.** (1997)

Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain.  
Journal of Neuroscience **17**: 5046 - 5061

**Drenckhahn, D.** (2004)

Blutgefäße des Zentralnervensystems. S. 621 - 648  
In: Benninghoff, A., Drenckhahn, D. (Hrsg.). Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 2. 16. Auflage. Urban und Fischer Verlag, München und Jena

**Duvernoy, H. M.** (1998)

The human hippocampus. Functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI.  
Second Edition. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

**Eberspächer, E., Werner, C., Engelhard, K., Pape, M., Laacke, L., Winner, D., Hollweck, R., Hutzler, P., Kochs, E.** (2005)

Long-term effects of hypothermia on neuronal cell death and the concentration of apoptotic proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats.  
Acta Anaesthesiologica Scandinavica **49**: 477 - 487

**Eberspächer, E., Werner, C., Engelhard, K., Pape, M., Gelb, A., Hutzler, P., Henke, J., Kochs, E.** (2003)

The effect of hypothermia on the expression of the apoptosis-regulating protein Bax after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats.  
Journal of Neurosurgical Anesthesiology **15**: 200 - 208.

**Eisch, A. J., Harburg, G. C.** (2006)

Opiates, psychostimulants, and hippocampal neurogenesis: Insights for addiction and stem cell biology.  
Hippocampus **16**: 271 - 286

**Eklöf, B., Siesjö, B. K.** (1972)

The effect of bilateral carotid artery ligation upon acid-base parameters and substrate levels in the rat brain.  
Acta Physiologica Scandinavica **86**: 528-538

**Engelhard, K., Werner, C., Hoffman, W. E., Matthes, B., Blobner, M., Kochs, E.** (2003)

The effect of sevoflurane and propofol on cerebral neurotransmitter concentrations during cerebral ischemia in rats.  
Anesthesia & Analgesia **97**: 1155 - 1161

**Engelhard, K., Winkelheide, U., Werner, C., Kluge, J., Eberspächer, E., Hollweck, R., Hutzler, P., Winkler, J., Kochs, E.** (2007)

Sevoflurane affects neurogenesis after forebrain ischemia in rats.  
Anesthesia and Analgesia **104**: 898 - 903

**Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. A., Gage, F. H.** (1998)

Neurogenesis in the adult human hippocampus.  
Nature Medicine **4**: 1313 - 1317

**Fay, T.** (1943)

Observations on generalized refrigeration in cases of severe cerebral trauma.  
Assoc Res Nerv Ment Dis Proc **24**: 611 - 619

**Froehler, M. T., Geocadin, R. G.** (2007)

Hypothermia for neuroprotection after cardiac arrest: Mechanisms, clinical trials and patient care.  
Journal of the Neurological Sciences **261**: 118 - 126

**Fuchs, E., Gould, E.** (2000)

In vivo neurogenesis in the adult brain: Regulation and functional implications.  
European Journal of Neuroscience **12**: 2211 - 2214

**Gage, F. H.** (2000)

Mammalian neural stem cells.  
Science **287**: 1433 - 1438

**Ginsberg, M. D., Busto, R.** (1989)

Rodent models of cerebral ischemia.  
Stroke **20**: 1627 - 1642

**Gionet, T. X., Warner, D. S., Verhaegen, M., Thomas, J. D., Todd, M. M.** (1992)

Effects of intra-ischemic blood pressure on outcome from 2-vessel occlusion forebrain ischemia in rat.  
Brain Research **586**: 188 - 194

**Gluckman, P. D., Wyatt, J. S., Azzopardi, D., Ballard, R., Edwards, A. D., Ferriero, D. M., Polin, R. A., Robertson, C. M., Thoresen, M., Whitelaw, A., Gunn, A. J.** (2005)

Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: Multicentre randomized trial.  
Lancet **365**: 663 - 670

**Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., Shors, T. J.** (1999)

Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation.  
Nature Neuroscience **2**: 260 - 265

**Graham, D. I., Lantos, P. L.** (1997)

Greenfield's Neuropathology. S. 86 - 90  
Sixth Edition. Arnold, London

- Gratzner, H. G.** (1982)  
Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication.  
*Science* **218**: 474 - 475
- Grøgaard, B., Gerdin, B., Arfors, K. E.** (1986)  
Forebrain ischemia in the rat. Relation between duration of ischemia, use of adjunctive ganglionic blockade and long-term recovery.  
*Stroke* **17**: 1011 - 1015
- Haas, S., Weidner, N., Winkler, J.** (2005)  
Adult stem cell therapy in stroke.  
*Current Opinion in Neurology* **18**: 59 - 64
- Haydon, P. G.** (2001)  
Glia: Listening and talking to the synapse.  
*Nature reviews Neuroscience* **2**: 185 - 193
- Helm, M., Lampl, L., Hauke, J., Bock, K. H.** (1995)  
Akzidentelle Hypothermie bei Traumapatienten. Von Relevanz bei der präklinischen Notfallversorgung?  
*Anaesthesist* **44**: 101 - 107
- Hoffman, W. E., Braucher, E., Pelligrino, D. A., Thomas, C., Albrecht, R. F., Miletich, D. J.** (1990)  
Brain lactate and neurologic outcome following incomplete ischemia in fasted, nonfasted, and glucose-loaded rats.  
*Anesthesiology* **72**: 1045 - 1050
- Hsu, S. M., Raine, L., Fanger, H.** (1981)  
Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques.  
*Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **29**: 577 - 580
- Hsu, S. M., Soban, E.** (1982)  
Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry.  
*Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **30**: 1079 - 1082
- Jin, K., Minami, M., Lan, J. Q., Mao, X. O., Batteur, S., Simon, R. P., Greenberg, D. A.** (2001)  
Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* **98**: 4710 - 4715
- Kagstrom, E., Agstrom, E., Smith, M. L., Siesjö, B. K.** (1983)  
Recirculation in the rat brain following incomplete ischemia.  
*Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **3**: 183 - 192

- Kanagawa, T., Fukuda, H., Tsubouchi, H., Komoto, Y., Hayashi, S., Fukui, O., Shimoya, K., Murata, Y.** (2006)  
A decrease of cell proliferation by hypothermia in the hippocampus of the neonatal rat.  
*Brain Research* **1111**: 36 - 40
- Kaplan, M. S., Hinds, J. W.** (1977)  
Neurogenesis in adult rat: Electron microscopic analysis of light radiographs.  
*Science* **197**: 1092 - 1094
- Karibe, H., Zarow, G. J., Graham, S. H., Weinstein, P. R.** (1994)  
Mild intraischemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats.  
*Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **14**: 620 - 627
- Kawaguchi, M., Furuya, H., Patel, P. M.** (2005)  
Neuroprotective effects of anesthetic agents.  
*Journal of Anesthesia* **19**: 150 - 156
- Kee, N. J., Preston, E., Wojtowicz, J. M.** (2001)  
Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat.  
*Experimental Brain Research* **136**: 313 - 320
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., Gage, F. H.** (1997)  
Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **94**: 10409 - 10414
- Kempfski, O.** (2000)  
Pathologische Neurophysiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart und New York
- Kornack, D. R., Rakic, P.** (1999)  
Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* **96**: 5768 - 5773
- Kudo, M., Aono, M., Lee, Y., Massey, G., Pearlstein, R. D.** (2001)  
Effects of volatile anesthetics on N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in primary rat neuronal-glia cultures.  
*Anesthesiology* **95**: 756 - 765
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., Gage, F. H.** (1996)  
Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: Age-related decrease of neuronal progenitor proliferation.  
*Journal of Neuroscience* **16**: 2027 - 2033
- Kuhn, H. G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L. J., Gage, F. H.** (1997)  
Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain.  
*Journal of Neuroscience* **17**: 5820 - 5829



**Laplagne, D. A., Espósito, M. S., Piatti, V. C., Morgenstern, N. A., Zhao, C., van Praag, H., Gage, F. H., Schinder, A. F.** (2006)

Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus.

PLoS Biology Vol. 4, No. 12, e409

**Lee, K. S., Lim, B. V., Jang, M. H., Shin, M. C., Lee, T. H., Kim, Y. P., Shin, H. S., Cho, S. Y., Kim, H., Shin, M. S., Kim, E. H., Kim, C. J.** (2002)

Hypothermia inhibits cell proliferation and nitric oxide synthase expression in rats.

Neuroscience Letters **329**: 53 - 56

**Lie, D. C., Dzieczapolski, G., Willhoite, A. R., Kaspar, B. K., Shults, C. W., Gage, F. H.** (2002)

The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential.

Journal of Neuroscience **22**: 6639 - 6649

**Lippert, H.** (1999)

Kopf (Caput) I. S. 441 - 549

In: Lehrbuch Anatomie. 5. Auflage. Urban und Fischer Verlag, München und Jena

**Liu, J., Solway, K., Messing, R. O., Sharp, F. R.** (1998)

Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils.

Journal of Neuroscience **18**: 7768 - 7778

**Lois, C., Alvarez-Buylla, A.** (1994)

Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain.

Science **264**: 1145 - 1148

**Lowry, O. H., Passonneau, J. V., Hasselberger, F. X., Schultz, D. W.** (1964)

Effekt of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain.

Journal of Biological Chemistry **239**: 18 - 30

**Magavi, S. S., Leavitt, B. R., Macklis, J. D.** (2000)

Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice.

Nature **405**: 951 - 955

**Marie, C., Bralet, A. M., Gueldry, S., Bralet, J.** (1990)

Fasting prior to transient cerebral ischemia reduces delayed neuronal necrosis.

Metabolic Brain Disease **5**: 65 - 75

**McDonald, H. Y., Wojtowicz, J. M.** (2005)

Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats.

Neuroscience Letters **385**: 70 - 75

**Meyer, G., Schaaps, J. P., Moreau, L., Goffinet, A. M.** (2000)

Embryonic and early fetal development of the human neocortex.

Journal of Neuroscience **20**: 1858 - 1868

- Ming, G. L., Song, H.** (2005)  
Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system.  
*Annual Review of Neuroscience* **28**: 223 - 250
- Miura, Y., Grocott, H. P., Bart, R. D., Pearlstein, R. D., Dexter, F., Warner, D. S.** (1998)  
Differential effects of anesthetic agents on outcome from near-complete but not incomplete global ischemia in the rat.  
*Anesthesiology* **89**: 391 - 400
- Mullen, R. J., Buck, C. R., Smith, A. M.** (1992)  
NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates.  
*Development* **116**: 201 - 211
- Nacher, J., Crespo, C., McEwen, B. S.** (2001)  
Doublecortin expression in the adult rat telencephalon.  
*European Journal of Neuroscience* **14**: 629 - 644
- Nakashima, K., Todd, M. M., Warner, D. S.** (1995)  
The relation between cerebral metabolic rate and ischemic depolarization. A comparison of the effects of hypothermia, pentobarbital, and isoflurane.  
*Anesthesiology* **82**: 1199 - 1208
- Nakatomi, H., Kuriu, T., Okabe, S., Yamamoto, S., Hatano, O., Kawahara, N., Tamura, A., Kirino, T., Nakafuku, M.** (2002)  
Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors.  
*Cell* **110**: 429 - 441
- Nolan, J. P., Deakin, C. D., Soar, J., Böttiger, B. W., Smith, G.** (2005)  
European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2005. Section 4. Adult advanced life support.  
*Resuscitation* **67**: 39 - 86
- Oertel, W. H.** (2006)  
Nervensystem. Zerebrale Ischämie. S. 1080 - 1091  
In: Siegenthaler, W., Blum, H. E. (Hrsg.). *Klinische Pathophysiologie*. 9. Auflage.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart und New York
- Pape, M., Engelhard, K., Eberspächer, E., Hollweck, R., Kellermann, K., Zintner, S., Hutzler, P., Werner, C.** (2006)  
The long-term effects of sevoflurane on neuronal cell damage and expression of apoptotic factors after cerebral ischemia and reperfusion in rats.  
*Anesthesia & Analgesia* **103**: 173 - 179
- Parent, J. M., Yu, T. W., Leibowitz, R. T., Geschwind, D. H., Sloviter, R. S., Lowenstein, D. H.** (1997)  
Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus.  
*Journal of Neuroscience* **17**: 3727 - 3738

- Pilarczyk, M., Krasińska-Czerlunczakiewicz, H., Tynecka-Turowska, M., Stelmasiak, Z.** (1999)  
General cerebral and systemic metabolic disturbances occurring in ischemic stroke with special emphasis on glucose and its metabolites.  
Polish Journal of Neurology and Neurosurgery **32**: 105 - 107
- Polderman, K. H.** (2008)  
Induced hypothermia and fever control for prevention and treatment of neurological injuries.  
Lancet **371**: 1955 - 1969
- Price, J., Turner, D., Cepko, C.** (1987)  
Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer.  
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **84**: 156 - 160
- Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch** (2007)  
261. Auflage. Walter de Gruyter, Berlin und New York
- Pulsinelli, W. A.** (1985)  
Selective neuronal vulnerability: Morphological and molecular characteristics.  
Progress in Brain Research **63**: 29 - 37
- Pulsinelli, W. A., Brierley, J. B.** (1979)  
A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat.  
Stroke **10**: 267 - 272
- Rice, A. C., Khaldi, A., Harvey, H. B., Salman, N. J., White, F., Fillmore, H., Bullock, M. R.** (2003)  
Proliferation and neuronal differentiation of mitotically active cells following traumatic brain injury.  
Experimental Neurology **183**: 406 - 417
- Rohen, J. W.** (2001)  
Morphologie der Sinnessysteme. Olfaktorisches und limbisches System. S. 143 - 163  
In: Funktionelle Neuroanatomie. Lehrbuch und Atlas. 6. Auflage. Schattauer Verlag, Stuttgart und New York
- Salazar-Colocho, P., Lanciego, J. L., Del Rio, J., Frenchilla, D.** (2008)  
Ischemia induces cell proliferation and neurogenesis in the gerbil hippocampus in response to neuronal death.  
Neuroscience Research **61**: 27 - 37
- Sano, T., Drummond, J. C., Patel, P. M., Grafe, M. R., Watson, J. C., Cole, D. J.** (1992)  
A comparison of the cerebral protective effects of isoflurane and mild hypothermia in a model of incomplete forebrain ischemia in the rat.  
Anesthesiology **76**: 221 - 228

- Schaible, H.-G.** (2001)  
Pathophysiologische Veränderungen im Nervensystem. Ischämische Störungen im Hirngewebe. S. 501 - 505  
In: Schmidt, R. F., Schaible, H.-G. (Hrsg.). Neuro- und Sinnesphysiologie. 4. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Scheffler, B., Walton, N. M., Lin, D. D., Goetz, A. K., Enikolopov, G., Roper, S. N., Steindler, D. A.** (2005)  
Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis.  
Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. **102**: 9353 - 9358
- Scheschonka, A., Betz, H., Becker, C.-M.** (2006)  
Stoffwechsel des Organismus: Spezifische Gewebe. Nervensystem. S. 1023 – 1051  
In: Löffler, G., Petrides, P. E., Heinrich, P. C. (Hrsg.). Biochemie und Pathobiochemie. 8. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Schilling, K.** (2002)  
Nervengewebe und Nervensystem. S. 107 - 142  
In: Junqueira, L. C., Gratzl, M. (Hrsg.). Histologie. 5. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Schmidt-Kastner, R., Robertson, G. S., Hakim, A.** (1995)  
Monoclonal antibody to NeuN as specific marker for neurons in immunohistochemical evaluation of global ischemic damage in rat.  
Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **15**: 230 - 231
- Sharp, F. R., Liu, J., Bernabeu, R.** (2002)  
Neurogenesis following brain ischemia.  
Developmental Brain Research **134**: 23 - 30
- Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., Gould, E.** (2001)  
Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories.  
Nature **410**: 372 - 376
- Siesjö, B. K.** (1992)  
Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia; Part I: Pathophysiology.  
Journal of Neurosurgery **77**: 169 - 184
- Simon, E.** (2000)  
Wärmehaushalt und Temperaturregelung. S. 649 - 671  
In: Schmidt, R. F., Thews, G., Lang, F. (Hrsg.). Physiologie des Menschen. 28. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Smith, M. L., Bendek, G., Dahlgren, N., Roseni, I., Wieloch, T., Ginsberg, M. D.** (1984)  
Models for studying longterm recovery following forebrain ischemia in the rat. A 2-vessel occlusion model.  
Acta Anaesthesiologica Scandinavica **69**: 385 - 401

- Squire, L. R., Zola, S. M.** (1996)  
Ischemic brain damage and memory impairment: A commentary.  
*Hippocampus* **6**: 546 - 552
- Stallmann, S.** (2008)  
Proliferation und Differenzierung endogener Stammzellen im Gyrus dentatus der adulten Ratte neun Tage nach inkompletter Vorderhirnischämie und Reperfusion und deren Beeinflussung durch Propofol.  
Inauguraldissertation. Fachbereich Medizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Stocchetti, N., Zanier, E. R., Nicolini, R., Faegersten, E., Canavesi, K., Conte, V., Gattinoni, L.** (2005)  
Oxygen and carbon dioxide in the cerebral circulation during progression to brain death.  
*Anesthesiology* **103**: 957 - 961
- Taupin, P.** (2006)  
Neurogenesis in the adult central nervous system.  
*Comptes Rendus Biologies* **329**: 465 - 475
- Taupin, P.** (2007)  
BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation.  
*Brain Research Reviews* **53**: 198 - 214
- Temple, S., Alvarez-Buylla, A.** (1999)  
Stem cells in the adult mammalian central nervous system.  
*Current Opinion in Neurobiology* **9**: 135 - 141
- The Hypothermia After Cardiac Arrest Study Group** (2002)  
Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest.  
*The New England Journal of Medicine* **346**: 549 - 556
- Tonchev, A. B., Yamashima, T.** (2006)  
Differential neurogenic potential of progenitor cells in dentate gyrus and CA1 sector of postischemic adult monkey hippocampus.  
*Experimental Neurology* **198**: 101 - 113
- Tonchev, A. B., Yamashima, T., Zhao, L.** (2003)  
Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys.  
*Neuroscience* **23**: 292 - 301
- Traystman, R. J.** (2003)  
Animal models of focal and global cerebral ischemia.  
*Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) Journal* **44**: 85 - 95

- Trepel, M.** (2008)  
Neuroanatomie. Struktur und Funktion. 4. Auflage. Urban und Fischer Verlag,  
München und Jena
- van Praag, H., Schindler, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., Gage, F. H.**  
(2002)  
Functional neurogenesis in the adult hippocampus.  
Nature **415**: 1030 - 1034
- Ward, J. M., Henneman, J. R., Osipova, G., Anisimov, V. N.** (1991)  
Persistence of 5-bromo-2'-deoxyuridine in tissues of rats after exposure in early life.  
Toxicology **70**: 345 - 352
- Welsch, U.** (2006)  
Die Zelle. S. 15 - 83  
In: Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie. 2.  
Auflage. Urban und Fischer Verlag, München und Jena
- Welsh, F. A., Sims, R. E., Harris, V. A.** (1990)  
Mild hypothermia prevents ischemic injury in gerbil hippocampus.  
Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **10**: 557 - 563
- Werner, C.** (1997)  
Milde und moderate Hypothermie als neues Therapiekonzept in der Behandlung  
der zerebralen Ischämie und des Schädel-Hirn-Traumas. Pathophysiologische  
Grundlagen.  
Anästhesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie **32**: 210 - 218
- Werner, C.** (2000)  
Neuroprotektion. S. 121 - 142  
In: Jantzen, J.-P. A. H., Löffler, W. (Hrsg.). Neuroanästhesie. Georg Thieme Verlag,  
Stuttgart und New York
- Westerberg, E., Monaghan, D. T., Kalimo, H., Cotman, C. W., Wieloch, T. W.** (1989)  
Dynamic changes of excitatory amino acid receptor in the rat hippocampus following  
transient cerebral ischemia.  
Journal of Neuroscience **9**: 798 - 805
- Yagita, Y., Kitagawa, K., Ohtsuki, T., Takasawa, K., Miyata, T., Okano, H., Hori, M.,  
Matsumoto, M.** (2001)  
Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus.  
Stroke **32**: 1890 - 1896
- Yamori, Y., Horie, R., Handa, H., Sato, M., Fukase, M.** (1976)  
Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and  
humans.  
Stroke **7**: 46 - 53

**Yon, J.-H., Daniel-Johnson, J., Carter, L. B., Jevtovic-Todorovic, V. (2005)**

Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways.

Neuroscience **135**: 815 - 827

## 9 TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tab. 1:</b>	Chemikalien.....	25/26
<b>Tab. 2:</b>	Antikörper.....	27
<b>Tab. 3:</b>	Lösungen.....	28/29
<b>Tab. 4:</b>	Geräte.....	30/31
<b>Tab. 5:</b>	Verbrauchsmaterialien.....	32
<b>Tab. 6:</b>	Versuchstiergruppen.....	35
<b>Tab. 7:</b>	Gefäßzugänge.....	37
<b>Tab. 8:</b>	BrdU-Dosierungstabelle.....	44
<b>Tab. 9:</b>	Klassifikation des ischämischen neuronalen Schadens des Hippokampus.....	50
<b>Tab. 10:</b>	Übersicht über Fluoreszenz und Bedeutung der analysierten Antigene.....	63
<b>Tab. 11:</b>	Klassifikation des Nervenzellschadens in der Immunfluoreszenz.....	65
<b>Tab. 12:</b>	Klassifikation der Anzahl neu gebildeter Zellen.....	66
<b>Tab. 13:</b>	Physiologische Parameter.....	70
<b>Tab. 14:</b>	Histologische Schadensklassifikation der CA 1-Region (HE-Färbung).....	72
<b>Tab. 15:</b>	Histologische Schadensklassifikation der CA 3-Region (HE-Färbung).....	72
<b>Tab. 16:</b>	Histologische Schadensklassifikation des Gyrus dentatus (HE-Färbung).....	72
<b>Tab. 17:</b>	Histologische Schadensklassifikation der CA 1-Region (NeuN-Färbung).....	74
<b>Tab. 18:</b>	Histologische Schadensklassifikation der CA 3-Region (NeuN-Färbung).....	74
<b>Tab. 19:</b>	Volumen des Gyrus dentatus.....	75
<b>Tab. 20:</b>	Absolute Anzahl BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus.....	77
<b>Tab. 21:</b>	Klassifikation neu gebildeter Zellen der CA 1-Region (BrdU-Färbung).....	78
<b>Tab. 22:</b>	Klassifikation neu gebildeter Zellen der CA 3-Region (BrdU-Färbung).....	78
<b>Tab. 23:</b>	Neurogenesefaktor im Gyrus dentatus.....	79
<b>Tab. 24:</b>	Neurogenese im Gyrus dentatus der Ratte.....	81



## 10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 1:</b>	Historische Zeichnung eines Nagetier-Hippokampus .....	2
<b>Abb. 2:</b>	Der spanische Nobelpreisträger und Neuroanatom Santiago Ramón y Cajal in seinem Labor .....	2
<b>Abb. 3:</b>	Gliederung des Gehirns .....	4
<b>Abb. 4:</b>	Zerebrale Blutversorgung und Circulus arteriosus Willisii .....	6
<b>Abb. 5:</b>	Schematische Darstellung der räumlichen Anordnung von Ammonshorn und Gyrus dentatus .....	7
<b>Abb. 6:</b>	Mikroskopischer Frontalschnitt durch den Hippokampus.....	8
<b>Abb. 7:</b>	Differenzierungspotential von Stamm- und Progenitorzellen .....	14
<b>Abb. 8:</b>	Entwicklung von Nerven- und verschiedener Gliazellen im adulten Gehirn ...	16
<b>Abb. 9:</b>	Markersubstanzen neuronaler Stamm- und Progenitorzellen sowie reifer Neurone.....	17
<b>Abb. 10:</b>	Zonen adulter Neurogenese sowie Migration und Differenzierung im Bulbus olfactorius.....	19
<b>Abb. 11:</b>	Zeitlicher Ablauf des Tierversuchs.....	33
<b>Abb. 12:</b>	Anästhesiertes Versuchstier nach abgeschlossener Präparation.....	38
<b>Abb. 13:</b>	Zeitpunkte der Entnahme von Blutproben.....	39
<b>Abb. 14:</b>	Interventionsschema der Versuchsgruppe 1 (Hypo/BACO) .....	41
<b>Abb. 15:</b>	Molekülstruktur von BrdU sowie DNA-Veränderung nach Einbau .....	43
<b>Abb. 16:</b>	Schlittenmikrotom mit eingebetteten Hirnhälften eines Versuchstieres .....	46
<b>Abb. 17:</b>	HE-Übersichtsaufnahme der CA-Regionen und des Gyrus dentatus .....	49
<b>Abb. 18 a-d:</b>	Klassifikation des ischämischen neuronalen Schadens des Hippokampus .....	50
<b>Abb. 19 a/b:</b>	Flächenmessung des Gyrus dentatus .....	51
<b>Abb. 20:</b>	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex zur Darstellung der AK-Bindung.....	54

<b>Abb. 21:</b>	Lichtmikroskopische Aufnahme der mittels NiCl angefärbten BrdU-markierten Zellkerne des Gyrus dentatus .....	<b>58</b>
<b>Abb. 22 a-c:</b>	Immunfluoreszenz-Aufnahmen BrdU, NeuN, BrdU und NeuN .....	<b>63</b>
<b>Abb. 23 a/b:</b>	Immunfluoreszenzaufnahmen der CA 1-Region des Hippokampus (NeuN-Färbung) .....	<b>65</b>
<b>Abb. 24 a/b:</b>	Immunfluoreszenzaufnahmen der CA 1-Region des Hippokampus (BrdU-Färbung) .....	<b>66</b>
<b>Abb. 25:</b>	Histologische Schadensklassifikation der CA 1-Region (HE-Färbung) .....	<b>73</b>
<b>Abb. 26:</b>	Histologische Schadensklassifikation der CA 3-Region (HE-Färbung) .....	<b>73</b>
<b>Abb. 27:</b>	Zellproliferation im Gyrus dentatus.....	<b>77</b>
<b>Abb. 28:</b>	Neurogenese im Gyrus dentatus der Ratte.....	<b>81</b>

## 11 ABBILDUNGSNACHWEIS

**Abb. 1: Wikipedia. Die freie Enzyklopädie**

Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebretes.  
Vols. 1 and 2. A. Maloine. Paris. 1911  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Cajal>  
(Stand: 13.08.2008)

**Abb. 2: The Official Web Site of the Nobel Foundation**

**Bentivoglio, M.** (1998)  
Life and Discoveries of Santiago Ramón y Cajal.  
[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/articles/cajal/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/articles/cajal/)  
(Stand: 13.08.2008)

**Abb. 3: modifiziert nach Kugler, P.** (2004)

Nervensystem. Grundzüge und Organisation. S. 232 - 247  
In: Benninghoff, A., Drenckhahn, D. (Hrsg.). Anatomie: Makroskopische Anatomie,  
Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 2. 16. Auflage.  
Urban und Fischer Verlag, München und Jena

**Abb. 4: modifiziert nach Drenckhahn, D.** (2004)

Blutgefäße des Zentralnervensystems. S. 621 – 648  
In: Benninghoff, A., Drenckhahn, D. (Hrsg.). Anatomie: Makroskopische Anatomie,  
Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 2. 16. Auflage.  
Urban und Fischer Verlag, München und Jena

**Abb. 5: modifiziert nach Duvernoy, H. M.** (1998)

The Human Hippokampus. Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections  
with MRI.  
Second Edition. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

**Abb. 6: modifiziert nach Trepel, M.** (2008)

Neuroanatomie. Struktur und Funktion. 4. Auflage. S. 236  
Urban und Fischer Verlag, München und Jena

**Abb. 7: modifiziert nach Gage, F. H.** (2000)

Mammalian neural stem cells.  
Science **287**: 1433 - 1438

**Abb. 8, 9 und 10: modifiziert nach Taupin, P.** (2006)

Neurogenesis in the adult central nervous system.  
Comptes Rendus Biologies **329**: 465 - 475

**Abb. 12, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23 und 24: Aufnahmen unserer Arbeitsgruppe**