

**Funktionelle und morphologische Analyse der Läsionsplastizität  
nach transienter zerebraler Ischämie**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologin Claudia Pforte

geb. am 17.04.1978 in Halle/Saale

Gutachter: Prof. Dr. Klaus G. Reymann;  
Leibniz-Institut für Neurobiologie Magdeburg  
Prof. Dr. Konstantin-A. Hossmann;  
MPI für neurologische Forschung Köln

eingereicht am: 17.03.2008

verteidigt am: 18.11.2008

*Für Fiona und Alexander*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Hirnschämie	1
1.1.1	Ursachen und Folgen einer Ischämie	1
1.1.2	Pathophysiologische Vorgänge während einer Ischämie	2
1.1.3	Therapeutische Maßnahmen nach einer Ischämie	5
1.2	Die hippokampale Formation	6
1.2.1	Anatomie der hippokampalen Formation	6
1.2.2	Afferente und efferente Verbindungswege in der hippokampalen Formation	8
1.3	Physiologie und Pathophysiologie hippokampaler Neurone	9
1.3.1	Langzeitpotenzierung	9
1.3.2	Elektrophysiologische Messungen in vivo nach globaler Ischämie	11
1.3.3	Diskussion des verwendeten Modells	12
1.4	Neurogenese und Gliazellen im adulten Zentralnervensystem und nach zerebraler Ischämie	13
1.4.1	Adulte Neurogenese im Gyrus dentatus und an der Subventrikularzone	13
1.4.2	Regulation adulter Neurogenese	16
1.4.3	Gliazellen im Zentralnervensystem	18
1.4.4	Funktionelle Bedeutung von reaktiven Astrozyten und aktiver Mikroglia nach zerebraler Ischämie	21
1.5	Autometallographischer Nachweis von Thallium	23
1.6	Aufgabenstellung	25
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>26</b>
2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	26
2.2	Globale zerebrale Ischämie an Ratten	26
2.3	Elektrophysiologische Messungen in vivo an der freibeweglichen Ratte nach globaler zerebraler Ischämie	29
2.3.1	Elektrodenimplantation in vivo	29
2.3.2	Reiz- und Messparameter für die Bestimmung der Populationspikeamplituden und der exzitatorischen postsynaptischen Feldpotentiale	31
2.3.3	Stimulationsparameter	33
2.4	Elektrophysiologische Messungen ex vivo nach globaler zerebraler Ischämie	33

2.5	Applikation eines Tracers	35
2.5.1	Applikation einer Thallium(I)acetat/DEDTC-Lösung	35
2.5.2	Nachweis proliferierender Zellen mit BrdU	36
2.6	Gehirnentnahme	37
2.6.1	Dekapitation und Entnahme des Gehirnes	37
2.6.2	Perfusionsfixierung mit Paraformaldehyd	37
2.6.3	Perfusionsfixierung mit Glutaraldehyd für den autometallographischen Nachweis von Thallium	39
2.7	Aufarbeitung der Gehirne	40
2.7.1	Paraffineinbettung und Anfertigung von Paraffinschnitten	40
2.7.2	Anfertigung von Gefrierschnitten	41
2.7.3	Aufarbeitung der Akutschnitte	42
2.8	Histologische und immunhistochemische Färbungen	42
2.8.1	Säurefuchsin/Toluidinblau-Färbung der Paraffinschnitte	42
2.8.2	Toluidinblaufärbung nach Scheinimmunhistochemie von Gefrierschnitten	43
2.8.3	Immunhistochemie nach dem Prinzip der Avidin-Biotin-Methode	45
2.8.4	Immunfluoreszenzmarkierung	46
2.8.5	Aufarbeitung und Färbung der Gefrierschnitte für den autometallographischen Nachweis von Thallium	49
2.9	Histologische Auswertung	51
2.9.1	Bestimmung des Zellschadens in der hippokampalen Formation nach globaler zerebraler Ischämie	51
2.9.2	Lokalisation der Elektroden im Gehirn	52
2.9.3	Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung	53
2.10	Statistische Auswertung	54
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
3.1	Elektrophysiologische Messungen an der freibeweglichen Ratte nach globaler zerebraler Ischämie	55
3.1.1	Histologische Auswertung	55
3.1.2	Messungen der Input/Output-Kurve und Basislinie	58
3.1.2.1	Veränderungen der Populationspikeamplitude	58
3.1.2.2	Veränderungen des fEPSP slope	59
3.1.3	Induktion einer Langzeitpotenzierung	60
3.1.3.1	Langzeitpotenzierung vor der Ischämie und 10 Tage nach der Ischämie	61

3.1.3.2	Langzeitpotenzierung zwei Tage nach Ischämie	64
3.2	Elektrophysiologische Messungen ex vivo nach globaler zerebraler Ischämie	65
3.2.1	Messung der Populationsspikeamplitude 10 und 56 Tage nach der Ischämie	65
3.2.2	Histologische Darstellung der Akutschnitte	67
3.3	Proliferation und Differenzierung nach globaler zerebraler Ischämie	68
3.3.1	Evaluierung des neuronalen Schadens im CA1-Band einen Tag und drei Tage nach Ischämie	68
3.3.2	Basale Proliferation und durch Ischämie induzierte Proliferation im Hippokampus und an der Subventrikularzone des lateralen Ventrikels	70
3.3.3	Analyse der proliferierenden Zellen auf Apoptose	71
3.3.4	Neurogenese einen Tag bzw. drei Tage nach globaler Ischämie	72
3.3.5	Aktivierung und Proliferation von Mikroglia nach globaler Ischämie	76
3.3.6	Aktivierung und Proliferation von Astrozyten nach globaler Ischämie	81
3.3.7	Doppelmarkierung von Nestin und dem Astrozytenmarker GFAP nach globaler Ischämie	83
3.4	Autometallographischer Nachweis von Thallium nach globaler Ischämie	88
3.4.1	Naive Tiere	88
3.4.2	Ischämische Tiere	90
3.4.2.1	14 Tage nach Ischämie mit partiellem CA1-Schaden	90
3.4.2.2	14 Tage nach Ischämie mit totalem CA1-Schaden	92
3.4.2.3	56 Tage nach Ischämie mit totalem CA1-Schaden	94
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>96</b>
4.1	Änderung der elektrophysiologischen Plastizität nach globaler Ischämie	96
4.1.1	Änderung der Basis-Transmission nach globaler Ischämie	96
4.1.2	Mögliche Ursachen für die unveränderte elektrophysiologische Funktion in den ex vivo-Versuchen nach globaler Ischämie	100
4.1.3	Neuronale Plastizität nach globaler Ischämie	100
4.2	Einfluss der globalen Ischämie auf die Glio- und Neurogenese	102
4.2.1	Besonderheit der Markierung mit BrdU	102
4.2.2	Einfluss der Ischämie auf die frühe Neurogenese	102
4.2.3	Zunahme der Anzahl von ruhenden und proliferierenden Mikrogliazellen nach globaler Ischämie	105

4.2.4	Re-Expression von Nestin in reaktiven Astrozyten versus Einwanderung von Nestin-Zellen aus den Blutgefäßen bzw. der Ventrikelwand nach globaler Ischämie	107
4.3	Thallium-Autometallographie zur Untersuchung des zerebralen Kalium-Metabolismus und neuronaler Aktivität nach globaler Ischämie	112
4.3.1	Vertikale streifenförmige Aktivitätsmuster der CA1-Neurone	112
4.3.2	Anfärbung einzelner Neurone im Hilus und ihr Verschwinden nach Ischämie	113
4.3.3	Schadensabhängige Variationen der Intensität der Färbung des Stratum moleculare und der Körnerzellschicht	114
4.3.4	Zunahme des intrazellulären Kalium in aktivierten Gliazellen	116
4.3.5	Fragmentierung der Dendriten im Stratum radiatum 56 Tage nach Ischämie	117
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	118
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	120
6.1	Abkürzungsverzeichnis	120
6.2	Materialien und Geräte	123
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	129
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	151
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	152

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Hirnschämie

Unser Gehirn wiegt nur ca. 1,5 kg (ca. 2 % des Körpergewichtes), die Millionen von Nervenzellen verbrauchen jedoch ein Fünftel des eingeatmeten Sauerstoffes, um ihre Aufgaben wahrzunehmen. Wichtige Funktionen wie die Atmung, Herzrhythmus sowie die mentalen Funktionen werden vom Gehirn gesteuert. Damit alle Funktionen reibungslos ablaufen können, muss das Gehirn kontinuierlich mit Blut versorgt werden. Infolge eines Schlaganfalls (zerebrale Ischämie) oder eines Herzstillstandes kommt es im Gehirn zu einer mangelnden Versorgung und die minderversorgten Hirnareale sterben ab. In den industrialisierten Ländern ist der Schlaganfall, hinter Herz- und Krebserkrankungen, die dritthäufigste Todesursache mit einer Mortalitätsrate von 110/100.000 pro Jahr (Heiss, 1997). Insgesamt erkranken in der Bundesrepublik z.Z. ungefähr 150.000 Einwohner pro Jahr neu an einem Schlaganfall (Poeck und Hacke, 1998). Die ungünstige Prognose und die damit verbundene hohe sozioökonomische Bedeutung des Krankheitsbildes sind nicht nur durch die hohe Mortalität, sondern auch durch bleibende Behinderung bedingt. Etwa 30 % aller Patienten bleiben auf Dauer schwerbehindert und sind auf die Hilfe Dritter angewiesen. Man nimmt an, dass allein in Deutschland rund 800.000 Menschen an den Folgen eines Schlaganfalls leiden.

### 1.1.1 Ursachen und Folgen einer Ischämie

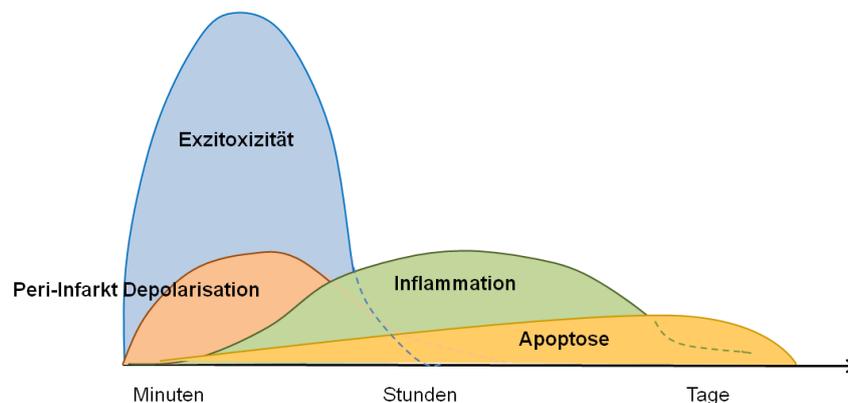
Die häufigste Ursache (ca. 80 %) einer zerebralen Ischämie sind Durchblutungsstörungen, die durch Arterienverkalkungen, Thrombosen, Embolien und zerebrale Mikroangiopathien auftreten können. Bei Patienten mit Bluthochdruck kann ein Hirngefäß platzen, so dass Blutungen in das Hirngewebe auftreten und eine zerebrale Ischämie auslöst (ca. 12 %). Die restlichen Fälle werden durch eine Einblutung in die Hirnhäute verursacht, wodurch der entstehende Druck auf die Hirnoberfläche erhöht wird und Mangelversorgungen des Hirngewebes resultieren.

Diese lokal auftretenden Hirninfarkte werden unter dem Begriff der fokalen bzw. regionalen zerebralen Ischämie zusammengefasst (Dirnagl und Meisel, 2000). Kommt es jedoch zu einer totalen Unterbrechung der Hirndurchblutung, wie z.B. bei einem vorübergehenden Herzstillstand (Infarkt- oder OP-bedingt), wird von einer globalen zerebralen Ischämie

gesprochen. In beiden Fällen wird die Blutversorgung der Nervenzellen gestört. Ausschlaggebend für das Ausmaß bzw. Schwere der Ischämie ist die Dauer der Unterversorgung der Nervenzellen. Erfolgt eine Unterbrechung der Blutzufuhr über einen geringen Zeitraum (Sekunden bis wenige Minuten), besteht die Möglichkeit, dass keine morphologisch sichtbaren Schädigungen der Neurone auftreten. Man geht davon aus, dass eine Reduktion des Blutflusses um 80 % über einen längeren Zeitraum (Minuten-Stunden) zu einem unwiederbringlichen Zelluntergang führt, der bei einem globalen Ereignis erst ca. drei Tage nach der Ischämie im mikroskopischen Bild erkennbar wird (Pulsinelli et al., 1982; Kirino, 1982). Dadurch wird deutlich, dass bei der zerebralen Ischämie langfristige Schädigungskaskaden aktiviert werden, die durch die fehlende oder mangelhafte Durchblutung angestoßen werden. Abhängig von der betroffenen Hirnregion reagieren die Neurone unterschiedlich auf den ischämischen Insult, wobei die Ursachen bislang noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Insbesondere die CA1-Neurone (*Cornus ammonis*) der hippocampalen Formation reagieren sehr empfindlich auf Sauerstoffmangel und sterben nach einer globalen zerebralen Ischämie zeitverzögert ab (Pulsinelli et al., 1982; Kirino, 1982). Zur Untersuchung dieser speziellen Pathophysiologie ist das Modell der globalen zerebralen Ischämie geeignet.

### 1.1.2 Pathophysiologische Vorgänge während einer Ischämie

Nach Eintritt der zerebralen Ischämie kommt es zu pathologischen Abläufen, die wenige Minuten bis mehrere Tage anhalten (Abb. 1). Eingeleitet wird die Schadenssequenz mit der Phase der Exzitotoxizität. Dieser folgen zeitlich überlappend die Phasen der Peri-Infarkt-Depolarisationen, der Inflammation und der Apoptose (Dirnagl et al., 1999; Hossmann, 2005).



**Abb. 1:** Schadenskaskade der pathophysiologischen Vorgänge nach zerebraler Ischämie; adaptiert nach Dirnagl et al., 1999

Durch den Verschluss eines Gefäßes kommt es in dem betroffenen Gebiet zu einer Mangel durchblutung und somit zu einer Unterversorgung der Zellen mit Glukose und Sauerstoff. Innerhalb weniger Minuten bricht die Atmungskette zusammen, die ATP-Reserven werden erschöpft und folglich kommt es zur Einleitung der anaeroben Glykolyse. Aufgrund der vermehrten Laktat- und Pyruvat-Bildung in Kombination mit dem verminderten Abtransport der Stoffwechselprodukte erfolgt eine intra- und extrazelluläre Azidose (Hossmann, 1987; Siesjö, 1992b; Kempinski, 1994). Außerdem erfolgt durch den ATP-Mangel ein Zusammenbruch der Ionenhomöostase, wodurch das Membranpotential nicht mehr aufrecht erhalten werden kann und eine konsekutive Depolarisation der Zelle erfolgt (Katsura et al., 1994). Durch die Depolarisation der Neuronen werden vermehrt exzitatorische Transmitter, insbesondere Glutamat freigesetzt und können aufgrund des ATP-Mangels nicht wieder in Neurone und Gliazellen aufgenommen werden (Siesjö, 1992a; Hamann, 1997; Zivin, 1991). Das Glutamat häuft sich im synaptischen Spalt an und aktiviert die ligandenabhängigen NMDA-Rezeptoren für metabotrope Natrium- und Kalziumkanäle der umliegenden Neurone. Dies führt zu einem intrazellulären Anstieg von Kalzium und Natrium. Durch die Entgleisung der sonst fein regulierten intrazellulären Kalzium-Werte kommt es zu einer unspezifischen Aktivierung verschiedenster Enzymsysteme (Siesjö, 1993; Hamann, 1997), wie beispielsweise der mitochondrialen Dehydrogenasen, Proteinkinasen, Endonucleasen, Lipidperoxidasen, Proteasen und Phospholipasen, die ihrerseits einen Anstieg freier Fettsäuren, Stickstoffmonoxid (NO) und gefährlicher Radikale verursachen. Stickoxid und freie Radikale greifen die Zellmembran und die Mitochondrien an, was zur Akkumulation dieser Schadstoffe in der Zelle führt und spätere Prozesse wie Inflammation und Apoptose triggern. Des Weiteren sind die Neurone aufgrund der hohen Konzentration von Glutamat überaktiviert, was eine erhöhte intrazelluläre Akkumulation von Natrium und Chlorid zur Folge hat. Aufgrund des verringerten Ausstromes von Kalium folgt Wasser passiv nach und es entwickelt sich ein zytotoxisches Ödem und schließlich kommt es zur Lyse der betroffenen Zellen.

Aufgrund des Energiemangels kommt es im nicht mehr durchbluteten Ischämiekern zu anoxischen Depolarisationen ohne Repolarisation, was ein Absterben der geschädigten Neurone zur Folge hat. Im Gegensatz dazu kann in Bereichen, in denen der Energiemetabolismus noch teilweise erhalten ist, speziell in der als Penumbra bezeichneten Randzone, unter zusätzlichem Energieaufwand die Repolarisation erreicht werden. Dieser Zustand ist jedoch aufgrund des bestehenden relativen Energiemangels sehr instabil, so dass weitere Depolarisationen folgen. Diese Peri-Infarkt-Depolarisationen treten oszillierend durch

steigende Kalium- und Glutamat-Konzentrationen im Extrazellularraum auf und können sich noch bis zu acht Stunden nach dem ischämischen Insult wiederholen (Hossmann, 1996). Der hieraus resultierende Energiemehrbedarf führt zu weiterer Schädigung der Zellen; je öfter solche Peri-Infarkt-Depolarisationen erfolgen, um so größer ist der Ischämieschaden des Infarktgebietes (Mies et al., 1993).

Eine weitere wichtige Phase der ischämischen Kaskade ist die Inflammation (Entzündungsreaktion), die durch schädigende Wirkung der Exzitotoxizität, Hypoxie und verschiedener Radikale induziert wird. Sie tritt bereits wenige Minuten nach dem ischämischen Insult ein und hält mehrere Tage an. Während der frühen Initialisierungsphase der Inflammation kommt es zur Aktivierung und Infiltration von Mikroglia, Makrophagen, Astrozyten sowie Leukozyten in das geschädigte Gewebe. Infolge der erhöhten Produktion einer Vielzahl von Substanzen, wie proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen, Sauerstoff-radikalen und Stickstoffoxid, entsteht zeitlich versetzt eine sekundäre Neurodegeneration, wobei Neurone, die den Primärschaden initial überlebt haben, abgetötet werden. Obwohl die aktivierten und infiltrierten Immunzellen auch zur Regeneration des Gewebes beitragen könnten (Streit et al., 1999), kommt es durch einen inflammatorischen Prozess ebenso zu Schädigungen von neuronalem Gewebe (Schwab und Bartholdi, 1996).

Im letzten Abschnitt der Schadenskaskade nach transienter Ischämie erfolgt der genetisch programmierte Zelltod (Apoptose), der von den betroffenen Hirnzellen aktiv ausgeht (Kerr, 1972) und zeitlich verzögert einsetzt. Hierbei erfolgt der programmierte Zelltod vor allem in Hirnregionen, in denen die Nervenzellen noch mit Nährstoffen versorgt werden, so z.B. in der Penumbra, die unmittelbar an den Ischämiekern grenzt. Die morphologischen Merkmale dieses aktiven Prozesses sind Veränderungen der Zellmembran (Abschnüren von Bläschen, sog. „apoptotic bodies“), ein Schrumpfen des Zellkerns, Chromatinkondensation und eine Fragmentierung der DNA. Im letzten Schritt der Apoptose werden die apoptotischen Körperchen von den Makrophagen oder umliegenden Epithelzellen erkannt und phagozytiert.

### 1.1.3 Therapeutische Maßnahmen nach einer Ischämie

Grundlegend für den Therapieansatz, ist die Ursache des Schlaganfalls zu diagnostizieren und frühzeitig die entsprechende Therapie zu starten. Durch die Erforschung der ablaufenden Schadensmechanismen und der Erkenntnis, dass die endgültige Ausdehnung eines Infarktes durch Rettung von Gewebe in der Penumbra (Peruche und Kriegelstein, 1993) wesentlich verkleinert werden kann, ergeben sich verschiedene therapeutische Ansätze, auf die, abgesehen von der Therapie mit neuroprotektiven Substanzen, nicht näher eingegangen wird.

In Experimenten der Grundlagenforschung haben schon viele Substanzen eine neuroprotektive Wirkung gezeigt, indem sie im Tierversuch den neuronalen Schaden nach einer globalen oder fokalen Ischämie verminderten (u.a. Oxyresveratrol, Andrabi et al., 2004; PNQX, Schielke et al., 1999; Lubeluzol, Haseldonckx et al., 1997; NBQX, Mies et al., 1994; Cyclosporin A und FK506, Uchino et al., 2002). Im Gegensatz dazu, konnten Substanzen in den klinischen Studien bisher noch keinen Durchbruch erzielen. Ursachen für die kontroversen Ergebnisse in den Tierversuchen und den klinischen Studien sind sowohl die Tatsache, dass man mit den Tiermodellen nur eine grobe Annäherung an die Verhältnisse im menschlichen Organismus darstellen kann und dass man in den Tierversuchen hauptsächlich junge und gesunde Tiere gleichen Geschlechts verwendet. Tierversuche mit jungen und alten Ratten bestätigen diese These und zeigen gravierende Unterschiede zwischen den Altersgruppen nach einer Ischämie (Popa-Wagner et al., 2007a, b).

In der Klinik jedoch erleiden meist ältere Patienten einen Schlaganfall, die häufig noch an Begleiterkrankungen leiden. So wird meistens eine der folgenden Krankheiten zusätzlich diagnostiziert: arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, koronare Herzkrankheiten, Depressionen oder ein vorheriger Schlaganfall. Eine weitere wichtige Ursache für die Unterschiede zwischen Klinik und Tiermodell ist die Höhe der Medikamentendosis bzw. der Zeitpunkt der Applikation. Während in den tierexperimentellen Versuchen eine relativ hohe Dosis zu einem frühen Zeitpunkt nach Ischämie injiziert wird, ist dies in der Klinik aus verschiedenen Gründen meist nicht möglich. Zum einen kommen die Patienten erst relativ spät nach Einsetzen der Schlaganfallsymptomatik in die Klinik, so dass bis zur Diagnose kostbare Zeit vergeht. Dadurch werden viele im Tierexperiment erfolgreich getestete Medikamente viel zu spät verabreicht, so dass sie dann oft nicht mehr wirksam sind. Zum anderen sind die hohen Medikamentendosierungen aufgrund der auftretenden Nebenwirkungen in der Klinik nicht umsetzbar.

Des Weiteren bestehen grundlegende Unterschiede hinsichtlich der Bestimmung der Neuroprotektion. In der Klinik werden die Patienten nach funktionellen Gesichtspunkten untersucht und anhand dieser Daten das Ausmaß des Schadens diagnostiziert wird. Im Tierversuch hingegen werden oft nur Aussagen über das Ausmaß des Schadens anhand von histologischen Untersuchungen getroffen. Die histologischen Aussagen spiegeln aber nicht unbedingt das reelle Ausmaß des funktionellen Schadens wider, wie in der folgenden Arbeit gezeigt wird, so dass man die neuroprotektiven Befunde aus Tierversuchen auf alleiniger Basis histologischer Auswertungen ohne funktionelle Beweise etwas kritischer betrachten sollte.

Wie in den voran gegangenen Kapiteln ausführlich erklärt, spielen verschiedene Faktoren für das Ausmaß des Schadens eine entscheidende Rolle. In dem von mir angewandten Modell der globalen Ischämie wird gezielt ein Sauerstoffmangel im Gehirn induziert. Dadurch sterben die perlschnurförmig angeordneten CA1-Neurone der hippocampalen Formation zeitverzögert ab. Aufgrund der anatomischen Anordnung der CA1-Neurone ist eine gute Auswertung der Versuche hinsichtlich des Ausmaßes des Schadens bzw. der Protektion möglich. Die hippocampale Formation spielt außerdem eine entscheidende Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen. Aufgrund dessen wurden neben den morphologischen Untersuchungen nach einem Insult auch die elektrophysiologischen Veränderungen untersucht. Da in der vorliegenden Arbeit das Hauptaugenmerk auf die pathophysiologischen und morphologischen Änderungen der hippocampalen Formation nach einer globalen zerebralen Ischämie gelegt wurde, werden weiterführend die grundlegenden Eigenschaften und Funktionen der hippocampalen Formation beschrieben.

## **1.2 Die hippocampale Formation**

### **1.2.1 Anatomie der hippocampalen Formation**

Der Hippokampus ist eine entwicklungsgeschichtlich sehr alte Struktur, die aus funktioneller Sicht eine zentrale Schaltstelle des limbischen Systems darstellt. In Anlehnung an die sich in der Fachliteratur durchsetzende Terminologie steht der Begriff Hippokampus im folgenden Text für die Einheit aus den CA1-3 Regionen, *Gyrus dentatus* und Subikulum.

Das Grundgerüst der CA1-CA3 Regionen bilden die Pyramidenzellen, deren Somata im *Stratum pyramidale* liegen. Die apikalen Dendriten erstrecken sich bis in das *Stratum moleculare*, die basalen Dendriten in das *Stratum oriens*. Das *Stratum oriens* liegt

ventrikelnah und wird vom *Cornus inferior* durch die weiße Substanz des Hippokampus, dem *Alveus*, getrennt. Kaudal an das *Stratum pyramidale* gliedern sich das *Stratum radiatum* und das *Stratum lacunosum-moleculare* mit einer Vielzahl von Interneuronen. Eine Besonderheit stellt die vierschichtige CA3-Region dar, da zwischen *Stratum radiatum* und *Stratum pyramidale* das *Stratum lucidum* liegt, in welcher die Axone der Körnerzellen des *Gyrus dentatus* projizieren (Moosfasern). Im Gegensatz zur CA1-Region, die bei einer Unterbrechung der Blutversorgung rasch mit Zelluntergang reagiert, gilt die CA3-Region eher als widerstandsfähig (Ito et al., 1975; Duvernoy, 1988).

Der *Gyrus dentatus* stellt die Eingangsstation des Hippokampus dar und zeigt einen dreischichtigen Feinaufbau: die Molekularschicht (*Lamina molecularis* = *Stratum moleculare*), die Körnerschicht (*Lamina granularis* = *Stratum granulare*) und die polymorphzellige Schicht (*Lamina plexiformis* = Hilus = CA4). Die Körnerschicht ist zellreich und besteht aus erregende, glutamaterge Körnerzellen (kleine Neuronen), während die zwei anderen Schichten vor allem aus Gliazellen und Dendriten bestehen (Hees und Sinowatz, 2000). Die Körnerzellen sind von GABAergen ( $\gamma$ -Amino Butyric Acid) Interneuronen umgeben. Diese bilden hemmende Synapsen um die Zellkörper der Körnerzellen und treten im Zellverband oder vereinzelt auf und sind mit speziellen kalziumbindenden Proteinen (Parvalbumin, Kalbindin oder Kalretinin) kolokalisiert. Die Dendriten der Körnerzellen reichen in die Molekularschicht (Amaral und Witter, 1995), die eine wichtige Verbindungsstelle für Neurone innerhalb und außerhalb des Hippokampus darstellt. Innerhalb des Bogens der Körnerzellschicht befindet sich der Hilus, auch *Lamina multiformis* genannt. Er enthält v.a. die Axone der Körnerzellen, die sogenannten Moosfasern sowie einige Interneurone (Schalt- und Assoziationszellen). Diese sind ähnlich wie die Korbzellen mit ihren Dendriten in der 1. und 3. Schicht verschaltet, projizieren mit den Axonen jedoch in das *Stratum moleculare* von anderen Abschnitten des *Gyrus dentatus* der gleichen Hirnhemisphäre (assoziativ) oder kontralateral in die gegenüberliegende Hemisphäre (kommissural).

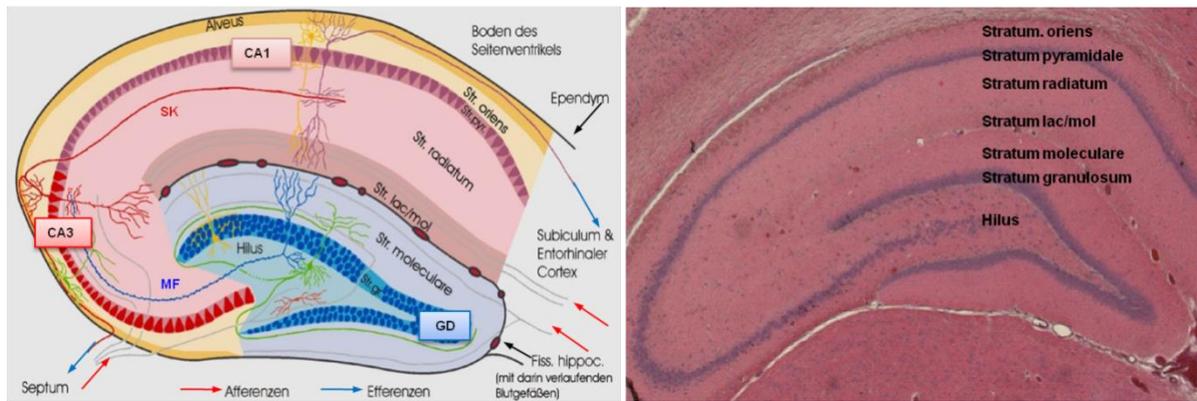
Das Subikulum ist das Übergangsfeld vom dreischichtigen, archikortikalen Hippokampus zum sechsschichtigen Neocortex. Es liegt zwischen der CA1-Region und dem enthorinalen Kortex.

### 1.2.2 Afferente und efferente Verbindungswege in der hippocampalen Formation

Wie auch der Isokortex, besitzt der Hippokampus als Allokortex zahlreiche assoziative, kommissurale sowie efferente und afferente extrinsische Projektionen (Abb. 2). Um seiner Funktionalität gerecht zu werden, müssen die jeweils wichtigsten Verschaltungen allerdings subarealspezifisch betrachtet werden.

So weist der Hippokampus umfangreiche Verbindungen zu Teilen des Neokortex, insbesondere zu den Assoziativkortexen, auf. Afferente Signale der Sinnesorgane erreichen zuerst subkortikale und periphere sensorische Kortexregionen und gelangen von dort über die Assoziationskortexen in den enthorinalen Kortex und weiter über der *Tractus perforans* in den *Gyrus dentatus*. Innerhalb des Hippokampus verläuft der Hauptinformationsfluss unilateral durch einen trisynaptischen Schaltkreis. Die Körnerzellen projizieren ihre Axone über die Moosfasern (MF) in das *Stratum lucidum* der CA3-Region (1.Synapse). Die Axone der CA3-Region (Schaffer-Kollaterale, SK) bilden mit den Pyramidenzellen der CA1-Region Verknüpfungen (2.Synapse), von der die efferenten Signale vom *Stratum oriens* zum Subikulum fließen (3.Synapse). Das Subikulum „schließt“ den Kreis mit Efferenzen zum enthorinalen Kortex und weiter in neokortikale Areale (Amaral, 1993; Freund und Buszáki, 1996). Im Hippokampus existieren noch weitere afferente und efferente Verschaltungen, die aber in dieser Arbeit nicht näher erläutert werden.

Das Besondere an dem tri-synaptischen Schaltkreis ist die ausgeprägte Plastizität der exzitatorischen Synapsen. Sie zeigen die stärkste Übernahmefähigkeit auf adäquate Reize mit einer so genannten Langzeitpotenzierung (engl.: long-term potentiation, LTP) zu reagieren, die als ein zelluläres Korrelat für Lernen und Gedächtnis (siehe als Reviews: Squire et al., 1993; Eichenbaum, 2001) angesehen wird.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der afferenten und efferenten Verbindungswege (links) und eine Säurefuchsin-Toluidinblau-Färbung (rechts) des Hippokampus *Cornus ammonis* Regionen 1-3 (CA1-3), *Gyrus dentatus* (GD), *Fissura hippocampalis* (Fiss.hippoc.), Moosfasern (MF), *Stratum granulosum* (Str. gr.), *Stratum lacunosum moleculare* (Str.lac./mol.), Schaffer-Kollaterale (SK). Schematische Darstellung links modifiziert von <http://www.uni-leipzig.de/~vetana/Hippocampus/hippocampus.html>

### 1.3 Physiologie und Pathophysiologie hippokampaler Neurone

#### 1.3.1 Langzeitpotenzierung

In den 70er Jahren wurde erstmals eine kurze repetitive Stimulation afferenter Fasern des *Tractus perforans* im Hippokampus von Säugetieren durchgeführt, welche zu einer lang anhaltenden Verstärkung der synaptischen Übertragung auf die nachgeschalteten Körnerzellen führte (Bliss und Lømo, 1973). Dieses primäre Modell zur Erklärung der synaptischen Plastizität wurde als LTP bezeichnet. Die LTP stellt ein zelluläres Korrelat für einen Hebb'schen Neuronenverbund dar und wurde zu einem etablierten Modell für die Erforschung der synaptischen Plastizität (Bliss und Collingridge, 1993). Wie von Hebb postuliert, wird LTP durch koinzidente prä- und postsynaptische Aktivität induziert.

Aufgrund klinischer Befunde ging man von einer zentralen Rolle des Hippokampus für die Gedächtniskonsolidierung aus, also die Überführung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis. Im Hippokampus fließen verschiedene sensorische Systeme zusammen, die verarbeitet und von dort zum Kortex zurückgesandt werden.

In Hinblick auf synaptische Plastizität wurde der Hippokampus des Säugergehirns so intensiv wie keine andere Gehirnstruktur untersucht (Bliss und Lynch, 1988; Amaral und Witter, 1989). Prädestiniert für die Erforschung von molekularen Lernprozessen sind die Schaffer-Kollateralen, die Verbindung zwischen der CA3- und CA1-Region, die an der Langzeitpotenzierung beteiligt sind. Die posttetanische Langzeitpotenzierung stellt eine

stabile und relativ langanhaltende postsynaptische Steigerung synaptischen Antwortverhaltens nach tetanischer Stimulation afferenter präsynaptischer Fasern dar. Die Intensität und Dauer der ausgelösten Langzeitpotenzierung hängt dabei sowohl von der Intensität und Dauer der Einzelimpulse des tetanischen Reizes, als auch von seiner Frequenz ab.

Anlehnend an die Publikation von Reymann und Frey (2007) kann man die LTP in vier verschiedene Phasen unterteilen:

1. Eine Proteinkinase C (PKC)-unabhängige,  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin Proteinkinase II (CaMKII)-abhängige Initialphase, die sogenannte Kurzzeit-Potenzierung (STP) mit einer Dauer von ca. 1-2 Stunden, der eine sehr kurzzeitige posttetanische Potenzierung (PTP) mit einer Dauer von wenigen Sekunden bis Minuten vorausgeht;
2. Eine zweite PKC-abhängige Phase, genannt LTP1, mit einer Dauer von bis zu 6 Stunden; Proteinsynthese-unabhängig
3. eine Proteinsynthese-abhängige Phase (LTP2);
4. Regelung der Genexpression, Proteinsynthese-abhängige Phase; LTP3, mit einer Dauer von über 10 Stunden

Die ersten beiden Proteinsynthese-unabhängigen Phasen werden als „early-LTP“ bezeichnet und die beiden nachfolgenden Proteinsynthese-abhängigen Phasen als „late-LTP“.

Die zellulären Vorgänge in den einzelnen Phasen sind bis zum heutigen Tage nicht vollständig aufgeklärt. Erwiesen ist, dass in der Initialisierungsphase, infolge der Stimulation, eine präsynaptisch vermittelte Depolarisierung der postsynaptischen Zelle eintritt. Dabei bindet das vom präsynaptischen Neuron ausgeschüttete Glutamat an postsynaptisch lokalisierte Rezeptoren, wie die NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)- und AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propioninsäure)-Rezeptoren. An der postsynaptischen Membran werden die AMPA-Rezeptoren geöffnet, die NMDA-Rezeptoren bleiben jedoch weitgehend verschlossen. Bei wiederholter synaptischer Aktivierung und somit starker postsynaptischer Depolarisation werden auch NMDA-Kanäle geöffnet, da die Depolarisation die blockierenden  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen aus den NMDA-Kanälen entfernt. Über den NMDA-Rezeptor können vermehrt  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zellen einströmen und die für die Langzeitpotenzierung notwendigen intrazellulären Signalkaskaden aktivieren. Der komplexe NMDA-Rezeptor-Ionenkanal stellt damit einen Koinzidenzdetektor dar, der nur aktiviert ist, wenn zwei Ereignisse in enger zeitlicher und räumlicher Kumulation auftreten, nämlich die Depolarisierung der Membran und die Aktivierung des NMDA-Rezeptors durch Glutamat (Bliss und Collingridge, 1993; Herron et al., 1986). Durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ioneneinstrom wird die Potenzierung des exzitatorischen postsynaptischen Potentials herbeigeführt (Dunwiddie und

Lynch, 1978; Feasey et al., 1986) und ist somit die Grundvoraussetzung für die Induktion der LTP (Lynch et al., 1983; Malenka et al., 1992). So führen die erhöhten Kalzium-Pegel beispielsweise zur Autophosphorylierung und damit konstitutiven Aktivierung der CaMKII, zur Phosphorylierung der Proteinkinase A (PKA) durch cAMP und zur Aktivierung der PKC (Reymann et al., 1988; Malenka et al., 1989; Malinow et al., 1989; Frey et al., 1993; Huang et al., 1994; Abel et al., 1997).

Dies wiederum führt zu einer potenzierten Antwort bei erneuter Transmitterausschüttung. Die Aufrechterhaltung der LTP erfolgt über Stunden bis Wochen und zeichnet sich durch zwei distinkte Charakteristika aus. Erstens benötigt sie die Synthese neuer mRNAs und Proteine, zweitens geht ihre Ausbildung mit der morphologischen Veränderung der aktivierten Synapsen einher (Krug et al., 1984; Goelet et al., 1986; Frey et al., 1988, 1996, Lynch et al., 2007). Es existieren also neben der zeitlichen Komponente grundlegende Parallelen zwischen dem zellulären Modell der LTP und der Ausbildung des Langzeitgedächtnisses, denn das langfristige Speichern von Informationen ist ebenfalls von der Transkription und Translation aktivierter Gene abhängig und zieht Strukturveränderungen nach sich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei der LTP um einen komplizierten, multifaktoriellen Prozess handelt, bei dem zahlreiche prä- und postsynaptische Mechanismen zusammenwirken.

### **1.3.2 Elektrophysiologische Messungen *in vivo* nach globaler Ischämie**

Trotz langjähriger experimenteller Untersuchungen ist die Pathogenese der Hirnschädigung nach globaler Ischämie weitestgehend unverstanden. Insbesondere die unterschiedliche Vulnerabilität einzelner Hirnregionen bedarf einer weiteren experimentellen Klärung (z.B. Dirnagl et al., 1993; Hata et al., 2000; Henrich-Noack et al., 2001; Krieglstein, 2002; Tang et al., 2002). Die Diskrepanz zwischen den experimentellen Ergebnissen und den klinischen Befunden resultieren zum Teil aus dem ausschließlichen Vertrauen auf histologische Daten als Parameter einer Protektion oder Regeneration. In der Klinik ist aber nach einem Ischämie-induzierten Ausfall die funktionelle und nicht die histologische Rückgewinnung von entscheidender Bedeutung. Verschiedene Verhaltensstudien beweisen, dass eine histologische Verbesserung nicht immer mit einer funktionellen Rückgewinnung korrelieren muss (Hunter et al., 1998; DeVries et al., 2001). Deshalb wurden in dieser Studie sowohl die histologischen Veränderungen als auch die elektrophysiologischen Parameter potenziell geschädigter Neurone nach einer zerebralen Ischämie untersucht. Bisher wurden elektrophysiologische

Charakterisierungen des neuronalen Schadens hauptsächlich *in vitro* oder *ex vivo* durchgeführt (Hori und Carpenter, 1994; Jensen et al., 1991; Mittmann und Eysel, 2001; Neumann-Haefelin und Witte, 2000; Opitz et al., 1995; Sabelhaus et al., 2000; Shinno et al., 1997; Urban et al., 1989). Für die Untersuchung der Pathophysiologie der Ischämie sind jedoch *in vivo*-Daten unverzichtbar, da in einigen Fällen die unnatürlichen *in vitro*-Bedingungen einen signifikanten Einfluss auf die pathophysiologischen Vorgänge haben können. So werden z.B. Temperatur und Ionen-Milieu konstant gehalten und andererseits neurotrophe Faktoren aus der Versuchskammer ausgewaschen (Richerson und Messer, 1995; Danzer et al., 2004; Whittingham et al., 1984).

Für die Entwicklung neuer regenerativer Strategien ist es von großem Interesse zu erforschen, ob der *Gyrus dentatus* nach einer Ischämie noch funktionell intakt ist. In den letzten Jahren wurden Beweise gefunden, die belegen, dass der *Gyrus dentatus*, neben der Subventrikularzone des lateralen Ventrikels eine wichtige Rolle in der adulten Neurogenese spielt (Palmer et al., 1997; Sharp et al., 2002). Deshalb haben wir in dieser Arbeit die histologische mit der elektrophysiologischen Charakterisierung von Körnerzellen des *Gyrus dentatus* in einem Modell der globalen Ischämie kombiniert.

### 1.3.3 Diskussion des verwendeten Modells

Das verwendete Ischämiemodell simuliert den Schaden im Gehirn des Menschen nach einem Kreislaufzusammenbruch (z.B. nach einem Herzinfarkt). Dadurch wird der Blutfluss zum Gehirn unterbrochen, die Nervenzellen unterversorgt und die vulnerablen CA1-Zellen des Hippokampus werden schon nach kurzer Zeit irreversibel geschädigt. Aufgrund seiner gut untersuchten, charakteristischen Neuroanatomie ist der Hippokampus ein prädestiniertes Hirnareal zur Untersuchung von Organisation und Funktion neuronaler Verschaltungen mittels elektrophysiologische Messungen, wie sie in dieser Arbeit nach einer globalen zerebralen Ischämie durchgeführt wurden. Für die Durchführung der globalen Ischämie an der Ratte standen zwei Standardmodelle zur Verfügung:

1. 4-Gefäße-Verschluss (Okklusion) mit Elektrokauterisation der vertebrealen Arterien (4VO)
2. 2-Gefäße-Verschluss mit gleichzeitiger Reduktion des Blutdruckes (2VO)

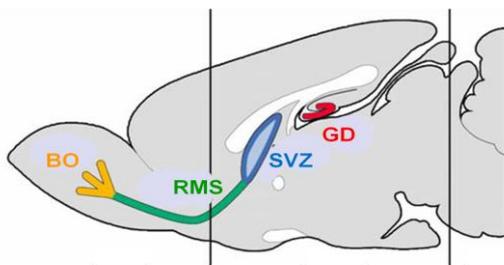
In dem Modell der 4VO werden mittels einer hohen Stromstärke die beiden vertebrealen Arterien elektrokauterisiert. Dabei besteht die Gefahr, dass die Strompulse zu anhaltenden Veränderungen des physiologischen Zustandes der Neurone führen und damit die post-

ischämische Pathophysiologie verändern und zudem die elektrophysiologischen Messergebnisse beeinflussen könnten. Um diese möglichen Veränderungen und unbeabsichtigten Effekte auszuschließen, wurde das Modell der 2VO mit gleichzeitiger Reduktion des Blutdruckes verwendet. Außerdem kann die Narkose der Tiere einen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen und LTP haben (Riedel et al., 1994). Um diese Quelle der Artefaktmessungen auszuschließen, wurden alle elektrophysiologischen Messungen an der frei beweglichen Ratte ohne Narkose durchgeführt.

## 1.4 Neurogenese und Gliazellen im adulten Zentralnervensystem und nach zerebraler Ischämie

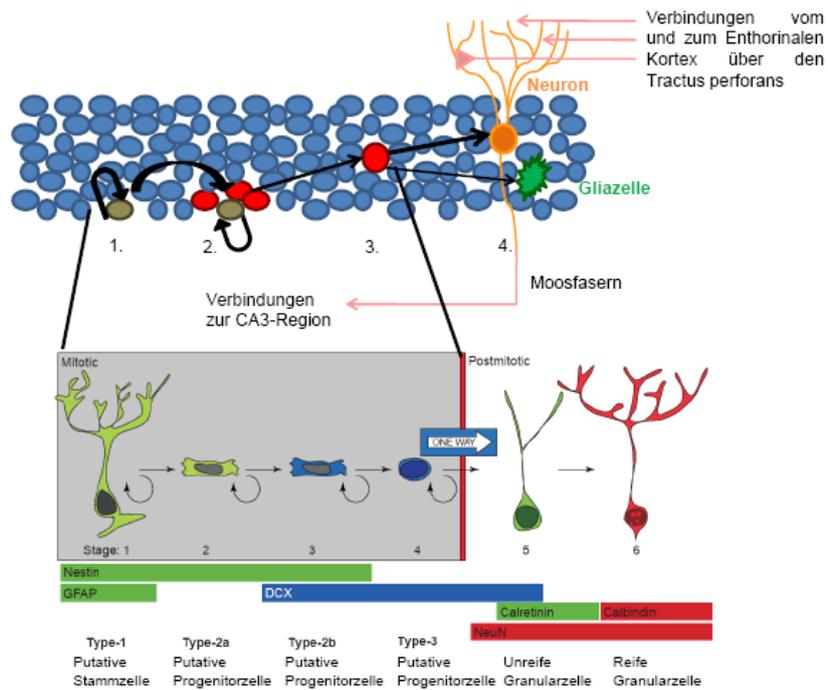
### 1.4.1 Adulte Neurogenese im *Gyrus dentatus* und an der Subventrikularzone

Als Neurogenese wird die Bildung von Nervenzellen aus bestimmten Stamm- oder Vorläuferzellen bezeichnet. In den 60er Jahren wurde mittels der Verwendung von [3H]-Thymidin Autoradiographien gezeigt, dass es Zellneubildungen in unterschiedlichen Regionen des adulten Rattengehirns gibt (Altman, 1962, 1963, 1969; Altman und Das, 1965, 1966). Zum heutigen Zeitpunkt sind nur zwei Regionen im adulten Gehirn von Säugern bekannt, in denen „adulte Neurogenese“, d.h. die Bildung einer größeren Zahl neuer Nervenzellen *in vivo* aus Stammzellen, während der gesamten Lebensspanne stattfindet. Dies sind zum einen der *Gyrus dentatus* des Hippokampus und zum anderen die subventrikuläre Zone (SVZ) des lateralen Seitenventrikels mit dem rostralen migratorischen Strom (RMS) und dem *Bulbus olfactorius* (BO) (Abb. 3).



**Abb. 3.:** Längsschnitt durch ein adultes Rattengehirn. Zonen der Neurogenese sind farblich markiert. *Bulbus olfactorius* (BO), *Gyrus dentatus* (GD), rostraler migratorischer Strom (RMS), subventrikuläre Zone (SVZ) (adaptiert nach Kuhn und Svendsen, 1999)

Über die Neurogenese im Hippokampus existieren verschiedene Modellvorstellungen (Alvarez-Buylla und Lim, 2004; Gage et al., 2000; Kempermann et al., 2004; Encinas et al., 2006). Die Charakterisierung der Zellen und die "Feinabstimmung" im Expressionsmuster der Zellen sind immer noch nicht abgeschlossen und werden ständig erweitert.



**Abb. 4:** Modell der Neurogenese im *Gyrus dentatus* des erwachsenen Hippokampus  
 1. und 2. Proliferation der neuronalen Stammzelle und der Progenitorzellen; 3. Migration;  
 4. Differenzierung und Integration; neurale Stammzelle (braun); Progenitorzelle (rot);  
 adaptiert nach Gage, 2000 und Kempermann et al., 2004.

In Abb. 4 sind zwei einfache Modelle der Neurogenese von Gage (2000) und Kempermann et al. (2004) modifiziert und integriert dargestellt. Übereinstimmend in allen Modellen ist die Tatsache, dass sich Zellen (neurale Stammzellen) in der subgranulären Zone (SGZ) des *Gyrus dentatus* asymmetrisch (Zellteilung, bei der ungleiche Tochterzellen entstehen) teilen, die dann durch den Proliferationsmarker BrdU visualisiert werden können (Schritt 1 und 2 in Abb. 4 oben). Die dabei entstehenden Progenitorzellen teilen sich dann symmetrisch (Zellteilung, bei der gleiche Tochterzellen entstehen) und ca. die Hälfte migriert in den darauf folgenden 4 Wochen in die Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* (Schritt 3 in Abb. 4 oben). Diese differenzieren zu Neuronen, exprimieren die entsprechenden phänotypischen Proteine, senden Zellfortsätze aus, bilden Synapsen und bauen elektrophysiologische Eigenschaften auf. Durch die Verbindungen mit dem enthorinalen Kortex und der CA3-Region (Schritt 4 in Abb. 4 oben) erfolgt letztendlich die Integration als funktionelle Nervenzellen in neuronale Schaltkreise (Schmidt-Hieber et al., 2004; van Praag et al., 2002; Jessberger und Kempermann, 2003).

Im unteren Teil der Abb. 4 werden die einzelnen Neurogenese-Abschnitte (Kempermann et al., 2004) hinsichtlich der Expression von verschiedenen Markern dargestellt, die über den Reifungsgrad der Progenitoren und Neurone Aufschluss geben soll. Hierbei wird im ersten Schritt von einer Nestin- und GFAP- (engl.: glial filament acidic protein) exprimierenden

Radialgliazelle ausgegangen, die als Stammzelle (Typ-1) bezeichnet wird. Diese weist neben morphologischen auch elektrophysiologische Eigenschaften von Astrozyten auf (Filippov et al., 2003; Fukuda et al., 2003). Über die Identität der endogenen neuronalen Stammzelle kursieren derzeit noch Diskussionen, wobei man immer wieder von der Existenz einer heterogenen Population von Vorläuferzellen ausgeht (Doetsch et al., 1997, 1999; Seri et al., 2001; Doetsch, 2003; Filippov et al., 2003; Kempermann et al., 2004).

Die gebildeten Progenitorzellen werden in zwei Subtypen Typ-2a und Typ-2b (Kronenberg et al., 2003) unterteilt, wobei beide Subtypen Nestin-positiv und GFAP-negativ sind, aber nur der Typ-2b den neuronalen Marker Doublecortin (DCX) exprimiert. Diese Zellen haben ein großes rundes oder ovales Soma mit kleinen somatischen Ausläufern, die tangential ausgerichtet sind und zeichnen sich durch eine hohe Teilungsrates aus (Fukuda et al., 2003; Kronenberg et al., 2003). Einige dieser Typ-2 Zellen exprimieren bereits die frühen neuronalen Marker PSA-NCAM und Prox1 und zeigen Na<sup>+</sup>-Ströme, was auf eine frühe neuronale Festlegung (Kempermann et al., 2003) bzw. Differenzierung (Filippov et al., 2003) hinweist.

Die nachfolgenden Typ-3 Zellen scheinen eine morphologische Veränderung in Richtung unreife Neurone zu durchlaufen (Brandt et al., 2003). Sie haben einen runden Nukleolus und sind, obwohl sie noch teilungsfähig sind, Nestin-negativ (Filippov et al., 2003; Kronenberg et al., 2003). Alle Zellen exprimieren die frühen neuronalen Marker DCX und PSA-NCAM, was auf eine Aktivität als Vorläuferzellen in der adulten hippocampalen Neurogenese hindeutet (Seki, 2002).

Im darauffolgenden Abschnitt der Neurogenese erfolgt ein Wechsel vom mitotischen zum postmitotischen Stadium. Die dabei entstehenden unreifen Körnerzellen exprimieren weiterhin DCX, aber auch das Ca<sup>2+</sup>-bindende Protein Calretinin und den neuronalen Marker NeuN. Wahrscheinlich senden die unreifen Körnerzellen zu diesem Zeitpunkt ihre Axone aus, um neue Kontakte zur CA3-Region zu knüpfen und wandern in Richtung SGZ des *Gyrus dentatus* (Hastings und Gould, 1999; Markakis und Gage, 1999), wobei Lernvorgänge und eine reizreiche Umgebung (enriched environment) die Integration stimulieren (Bruehl-Jungerman et al., 2006; Young et al., 1999; Gould et al., 1999b; Kempermann et al., 1997b). Entsteht keine synaptische Verbindung erfolgt eine aktive Eliminierung der unreifen Neurone durch Apoptose (Biebl et al., 2000; Sun et al., 2004).

Zwei bis drei Wochen nach Beginn des postmitotischen Stadiums und der Expression von Calretinin, kommt es zu einer Veränderung der Expression von Calretinin zu Calbindin. Calbindin wird in allen reifen Körnerzellen des *Gyrus dentatus* exprimiert, stellt jedoch

keinen eindeutigen Beweis für die vollständige Reifung der Neurone dar. Ungefähr 4-7 Wochen benötigen die neuen Zellen, um sich nicht mehr von den älteren Körnerzellen unterscheiden zu lassen (Jessberger und Kempermann, 2003; van Praag et al., 2002). Die neuen Neurone nehmen im hippokampalen Kreislauf einen Platz ein und knüpfen Verbindungen zum lokalen Netzwerk der Interneurone.

Die zweite wichtige Hirnregion, in der adulte Neurogenese nachgewiesen wurde, ist die SVZ mit dem RMS und dem BO (Kaplan und Hinds, 1977; Alvarez-Buylla und Nottebohm, 1988; Lois und Alvarez-Buylla, 1993). In diesem System kommt es zur räumlichen Trennung von Proliferation, Migration und Differenzierung der neuen Nervenzellen.

Neben den beiden gut untersuchten neurogenen Zonen, geben einige Arbeiten auch Hinweise auf eine mögliche Neurogenese z.B. im Kortex, Neokortex und Amygdala (Gould et al., 1999a, Gould, 1999; Gu et al., 2000; Magavi et al., 2000; Bernier et al., 2002). Die Beweise für den Ursprung dieser Zellen sind jedoch immer noch umstritten und bedürfen weiterer Forschung.

#### **1.4.2 Regulation adulter Neurogenese**

In den letzten Jahren wurden zahlreiche experimentelle Modelle *in vivo* zur Untersuchung der Regulation adulter Neurogenese durchgeführt. Wichtigen Einfluss auf die Modulation der Neurogenese haben physiologische, pathophysiologische und pharmakologisch induzierte Regulationsprozesse. Die endogenen und exogenen Faktoren können die basale Proliferationsaktivität bzw. Neurogenese steigern oder senken (Kempermann, 1997a, b; 1998; van Praag, 1999a, b; Seki und Arai, 1995; Kuhn et al., 1996; Kempermann und Gage 1999; Cameron und McKay, 1999; Galea und McEwens, 1999). So konnte z.B. eine Steigerung der Neurogenese im Hippokampus sowohl durch eine reizreiche Umgebung (Rosenzweig et al., 1962; Rosenzweig und Bennett, 1996; Rosenzweig, 2003) als auch durch physische Aktivität in Form von Laufradtraining (Brown et al., 2003b) erzielt werden. Dabei ist es sehr verwunderlich, dass der Hippokampus, der vornehmlich kognitive Funktionen ausübt, eine Steigerung der Neurogenese durch motorische Aktivität in Form von Lauftraining erzielen kann. Aber auch intraventrikuläre Infusionen von Wachstumsfaktoren zeigten eine große Wirkung bezüglich des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens (Craig, 1996; Kuhn, 1997). So fördert z.B. der Wachstumsfaktor FGF-2 (engl.: fibroblast growth factor-2) Proliferation, Überleben und neuronale Differenzierung im System SVZ/RMS/BO, jedoch nicht im Hippokampus (Kuhn, 1997). BDNF (brain derived neurotrophic factor) bzw. IGF-1

(engl.: insulin-like growth factor-1) dagegen erhöhen die Anzahl neugebildeter Neuronen im BO bzw. *Gyrus dentatus* (Zigova et al., 1998; Åberg et al., 2000).

Wie auch in dieser Arbeit werden sehr häufig die verschiedensten Untersuchungen zur Klärung der regulierenden Einflüsse der Neurogenese unter pathophysiologischen Bedingungen mit Hilfe von Ischämie-Modellen *in vivo* untersucht (Sharp et al., 2002; Liu et al., 1998; Takagi et al., 1999; Kee et al., 2001; Jin et al., 2001; Yoshimura et al., 2001; Kawai et al., 2004; Schmidt und Reymann, 2002; Kluska et al., 2005). Neben der zerebralen Ischämie können epileptische Anfälle (Parent et al., 1997), mechanische Verletzungen des *Gyrus dentatus* (Gould und Tanapat, 1997) durch Ketamin induzierte Schizophrenie (Keilhoff et al., 2004) oder olfaktorische Bulbektomien (Kirschenbaum et al., 1999) initiiert werden und eine Erhöhung der Zellproliferation und Neurogenese in der SGZ und/oder SVZ erzielen.

Desweiteren wurden in experimentellen Schlaganfallmodellen physiologische und pharmakologische Komponenten integriert. So wurden z.B. die Wachstumsfaktoren EGF/bFGF (engl.: epidermal growth factor; basic fibroblast growth factor) intraventrikulär nach fokaler Ischämie injiziert. Damit erhoffte man sich eine höhere Überlebensrate der neugebildeten Neurone und deren bessere Integration in das Schadensgebiet. Dabei wurde eine Erhöhung der Proliferation und Neurogenese in der ipsilateralen SVZ, aber eine Verringerung im *Gyrus dentatus* erzielt (Baldauf und Reymann, 2005). Im Modell der globalen Ischämie, das hauptsächlich einen Schaden der CA1-Neurone verursacht (Petito et al., 1987; Pulsinelli et al., 1982; Kirino, 1982; Smith et al., 1984), wurden nach intraventrikulärer Injektion derselben Wachstumsfaktoren eine Erhöhung der Proliferation und Neurogenese und vor allem 4 Wochen nach Insult neue Neurone im CA1-Band nachgewiesen (Nakatomi et al., 2002).

Deshalb nimmt man an, dass wahrscheinlich abhängig von der Lokalisation des Insultes die jeweils anatomisch näher gelegene neurogene Zone (*Gyrus dentatus* bzw. SVZ) stärker stimuliert wird und durch die exogenen Wachstumsfaktoren die neuen Neurone länger überleben und die Neurogenese zusätzlich gesteigert wird. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind noch weitaus mehr Faktoren beteiligt, als man bisher kennt.

### 1.4.3 Gliazellen im adulten ZNS

Neben den neuronalen Stammzellen besitzen auch andere Zelltypen des Gehirnes die Möglichkeit der Mitose – Gliazellen. Deren Proliferationspotential übersteigt das der neuronalen Stammzellen um ein Vielfaches und sollte vor allem bei der Untersuchung von Proliferation in einem Läsionsmodell nicht vernachlässigt werden.

Im ZNS des Menschen gibt es etwa 10-50mal mehr Gliazellen als Neurone, die aufgrund ihrer geringeren Größe nur ca. 50 % des gesamten Hirnes beanspruchen. Trotzdem wurden Gliazellen bis vor einigen Jahren in ihrer Funktion unterschätzt und man ging davon aus, dass Gliazellen nicht an der Signalübertragung beteiligt sind und nur Hilfsfunktionen für die Neurone übernehmen (Golgi, 1885; Lugaro, 1907; Ramón y Cajal, 1913a, b). Heute weiß man, dass Gliazellen nicht nur die Aufgabe des Bindegewebes erfüllen. Sie sind an der mechanischen Stabilisierung von Neuronen sowie am Auf- und Abbau neuronal wichtiger Verbindungen beteiligt. Außerdem verfügen Gliazellen nicht nur über ein reichhaltiges Repertoire an Rezeptoren (Bevan, 1990; Barres, 1991; Verkhratsky und Kettenmann, 1996), sondern detektieren auch neuronale Aktivität (Kriegler und Chiu, 1993; Clark und Barbour, 1997). Dadurch wird eine Beteiligung an der synaptischen Erregungsübertragung und dem Stoffaustausch denkbar. Des Weiteren sind sie an der Bildung der Markscheiden und an der elektrischen Isolierung beteiligt. Während der Entwicklung bilden sie vielfach Leitstrukturen für auswachsende Neurone. Zudem sind Gliazellen an Degenerations- und Regenerationsvorgängen von Nervenzellen des ZNS beteiligt (Leonhardt et al., 1985). Zu den Gliazellen des ZNS werden die Makroglia mit den Astrozyten und Oligodendrozyten, die Mikroglia, die Ependymzellen und die Plexusepithelzellen (Epithel der *Plexus choroidei*) gezählt.

Da in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich die Proliferation, morphologische Veränderung und Verteilung der Astrozyten und Mikroglia nach zerebraler Ischämie untersucht wurden, wird in der weiterführenden Einleitung nur auf diese beiden Gliazellarten eingegangen.

## *Astrozyten*

Ontogenetisch stammen Astrozyten vom Neuroektoderm ab. Sie bilden eine Gruppe morphologisch sehr heterogener Zellen zu denen die protoplasmatischen, die fibrillären Astrozyten sowie die radiären Gliazellen gehören. Molekular können sie durch den Nachweis verschiedener Markerproteine wie GFAP, S100 oder Vimentin identifiziert werden. Allerdings treten nicht immer alle drei Marker gleichzeitig auf. So gibt es auch Astrozyten, die kein GFAP exprimieren.

Astrozyten bilden weitverzweigte Ausläufer, die einerseits an Blutgefäße grenzen und andererseits neuronale Strukturen berühren. Durch die Ausläufer werden Neurone mit Nährstoffen aus den Hirnkapillaren versorgt und neuronale Abfallstoffe zu den Kapillaren abtransportiert. Eine weitere wichtige Funktion der Astrozyten ist die Aufnahme und der Abbau überschüssiger Neurotransmitter (Glutamat) aus dem synaptischen Spalt nach dem Ende der neuronalen Erregung. Damit die Astrozyten jedoch Informationen aus ihrer Umgebung wahrnehmen bzw. verarbeiten können und ihre vielfältigen Versorgungsaufgaben ausführen können, benötigen die Zellen zahlreiche Rezeptormoleküle (z.B. Glutamat-, AMPA/Kainat-, NMDA-, GABA-, Rezeptoren) auf ihrer Zelloberfläche. So entsteht ein lokales Netzwerk von Neuronen und Astrozyten.

Während der Entwicklung des ZNS sind nur manche Vorläuferzellen in der Lage, Neurone zu bilden; andere bilden hingegen nur Gliazellen. Hierbei spielen die radialen Gliazellen eine wichtige Rolle: sie exprimieren den Astrozytenmarker GFAP und besitzen lange radiale Fortsätze, die durch die gesamte Wand des Neuralrohrs bis zum Kortex reichen. Neurone nutzen diese Fortsätze, um zu ihrem Bestimmungsort zu gelangen. Mittlerweile werden radiale Gliazellen als multipotente Vorläuferzellen angesehen, die sowohl die Fähigkeit der Neuronen- und Glianeubildung besitzen (Götz und Barde, 2005) und können als primäre Vorläuferzellen der adulten Neurogenese angesehen werden. Literaturdaten zeigen, dass bereits wenige Tage nach der BrdU-Markierung 60-80 % der markierten Zellen als Astrozyten identifiziert werden konnten (Seri et al., 2001, 2004; Palmer et al., 2000). Außerdem konnte in verschiedenen Modellen eine Re-Expression von Nestin in reaktiven Astrozyten nachgewiesen werden (Clarke et al., 1994; Duggal et al., 1997; Li und Chopp, 1999; Abdel-Rahman et al., 2004), wobei Nestin als ein Marker für pluripotente neuronale Stammzellen während der Embryogenese des ZNS fungiert (Lendahl et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit wird die Expression von Nestin in Astrozyten nach einer globalen Ischämie untersucht und Hypothesen über die möglichen Herkunftsorte aufgestellt.

## *Mikroglia*

Mikrogliazellen sind klein; ihr Zellkörper ist schmal und dicht, der Zellkern langgestreckt und dunkel gefärbt – dadurch unterscheidet er sich deutlich von den runden Zellkernen der anderen Gliazellen. Mikrogliazellen nehmen einen Anteil von 10-20 % der gesamten Gliazellpopulation im ZNS ein (Kreutzberg, 1996) und besitzen von allen reifen parenchymatischen Zellen im ZNS das größte mitotische Potential. Dadurch sind zu einer Selbsterneuerung fähig, die im normalen ZNS in einer geringen Rate stattfindet.

Die Mikroglia entwickelt sich aus der monozytären Zelllinie des blutbildenden Systems woraus eine enge funktionelle Ähnlichkeit mit den Monozyten resultiert (z.B. Expression gemeinsamer Oberflächenantigene wie CD11). Anders als Oligodendrozyten und Astrozyten, die mit Neuronen einer gemeinsamen Linie des Neuroektoderms entspringen, stammen Mikrogliazellen aus dem mesenchymalen Keimblatt ab (del Rio Hortega, 1919). Die Mikroglia hat zahlreiche verzweigte, mit Dornen besetzte Fortsätze, die wie ein Sensor die Mikroumgebung nach biochemischen oder bioelektrischen Veränderung abtasten. Sie stellen somit das eigentliche zelluläre Abwehrsystem gegen eindringende Mikroorganismen wie Viren, Bakterien oder anderen dem ZNS fremden Zellen dar (immunkompetente Zellen).

Im adulten ZNS existieren mindestens drei verschiedene Stadien von Mikrogliazellen: 1. ruhende und verzweigte Mikroglia, die im normalen, nicht pathologischen ZNS vorkommen; 2. aktivierte und reaktive Mikroglia, die im pathologischen Zustand vorkommen, aber nicht phagozytieren; 3. phagozytierende Mikroglia, die wie runde Gehirnmakrophagen aussehen (Streit et al., 1988). Nach Erkennung der Eindringlinge kommt es zu einer raschen lokalen Aktivierung und Vermehrung der ruhenden Mikrogliazellen, die sich zu phagozytierende Makrophagen differenzieren und dann die sterbenden Zellen bzw. den Eindringling erkennen und wegräumen können. Um diese Aufgaben so effektiv wie möglich ausführen zu können, besitzen die Mikrogliazellen eine Reihe von Rezeptormolekülen auf ihrer Oberfläche, so z.B. verschiedene Ionen-Kanäle, immunologische Erkennungsmoleküle und Neurotransmitter-Rezeptoren (Hanisch und Kettenmann, 2007). Außerdem produzieren aktivierte Mikrogliazellen eine Vielzahl von potentiell gefährlichen löslichen Faktoren, wie reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Derivate, proteolytische Enzyme, sowie eine Reihe von proinflammatorischen und potentiell zytotoxischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin 1 (IL-1) (Banati et al., 1993; Renno et al., 1995; Chabot et al., 1997), die für den Abbau der sterbenden Zellen oder Eindringlingen durch Mikrogliazellen unentbehrlich sind. Durch ihre schnelle und spezifische Transformation in eine

immunkompetente, zytotoxisch und phagozytotisch aktive Zelle, spielen die Mikrogliazellen eine wichtige Rolle bei pathologischen Prozessen im ZNS.

In den letzten Jahren wurde immer wieder die Frage diskutiert, ob die aktivierten Mikrogliazellen residente Zellen des ZNS oder aus dem Blutstrom stammende Makrophagen sind. In der vorliegenden Arbeit wird u.a. diese Frage aufgegriffen und anhand des Modelles der globalen Ischämie untersucht und diskutiert.

#### **1.4.4 Funktionelle Bedeutung von reaktiven Astrozyten und aktiver Mikroglia nach zerebraler Ischämie**

Einige Stunden nach einer Ischämie kommt es zu einer reaktiven Gliose, d.h. die Astrozyten werden hypertrophisch, die Mikrogliazellen ziehen ihre Fortsätze ein und nehmen eine amöboide Gestalt an, die typisch für aktivierte Mikrogliazellen ist (Kreutzberg, 1996). 24 h nach einer Ischämie werden die ersten eindeutigen Veränderungen immunhistochemisch sichtbar (Morioka et al., 1991, 1993). Es wurde beschrieben, dass aktivierte Mikrogliazellen und reaktive Astrozyten in den Zellzyklus eintreten (Gabryel und Trzeciak, 2001; Kato et al., 2003), um beschädigte Neurone zu eliminieren oder zu schützen bzw. eine Gliaarbe auszubilden. In diesem Abschnitt werden die verschiedenen funktionellen Bedeutungen der Mikroglia und Astrozyten nach einem Insult näher beleuchtet.

Nach einer stärkeren Form der Ischämie (permanente MCAO) kommt es innerhalb von 30-60 Minuten nach dem Insult zu einer starken, signifikanten Verletzung bzw. Absterben der Astrozyten (Fern, 2001), das in einigen Fällen mit einem vorangehenden neuronalen Untergang einhergeht (Garcia et al., 1993). Astrozyten besitzen die Fähigkeit der Eliminierung von extrazellulären  $K^+$  und Glutamat und verbessern aufgrund dieser Funktionen das neuronale Überleben während einer Ischämie. Um die neuroprotektiven Effekte erzeugen zu können, müssen die Astrozyten morphologisch und funktionell intakt sein. Des Weiteren sind sie im ZNS eine wichtige Quelle sog. neurotropher Faktoren, die Überleben und Differenzierung von Neuronen positiv beeinflussen. Sie exprimieren verschiedener Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, IGF, FGF-1, FGF-2, BDNF, NGF), Zytokine (z.B. TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IL-1, IL-6, IL-8) und deren Rezeptoren, wobei deren Expressionsrate im Verlauf von läsonsbedingten Erkrankungen stark zunimmt. Die Expression all dieser Faktoren dient wahrscheinlich der Steuerung derjenigen Prozesse, die an der Wiederherstellung des geschädigten Hirnareals oder bei der Schadensbegrenzung beteiligt sind (Li et al., 2007). Neben all den protektiven Eigenschaften dienen Astrozyten auch als „Kitt“, indem sie

Narbgewebe an Stellen bilden, an denen das Gehirn verletzt ist. Damit verhindert sie allerdings auch, dass voneinander getrennte Nerven wieder zusammenwachsen können. Ein weiterer Punkt, der nicht für eine protektive Funktion der Astrozyten spricht ist die Tatsache, dass durch die Gap junctions der Astrozyten ein „Todessignal“ von sterbenden Zellen an benachbarte, ungeschädigte Zellen übertragen werden kann. Dieser Mechanismus wird als „bystander cell death“ bezeichnet (Lin et al., 1998). Dieser Mechanismus könnte für die sekundäre Ausbreitung der Gehirnschädigung bei einer zerebralen Ischämie verantwortlich sein.

Die zweite wichtige Gliazellart, die nach einer Ischämie aktiv wird, ist die Mikroglia. Eine wichtige Voraussetzung für die Aktivierung und Proliferation der Mikrogliazellen ist die Kommunikation zwischen Astrozyten und Mikrogliazellen. Astrozytäre Kalziumwellen (Schipke et al., 2002) und das von den Astrozyten abstammende S100 $\beta$  (Petrova et al., 2000) sowie kolonienstimulierende Faktoren (engl.: colony stimulating factors, CSF) dienen womöglich als Quellen für die Mikroglia-Aktivierung.

An einem Ischämiemodell konnte Lees (1993) zeigen, dass aktivierte Mikroglia schädlich für die verletzten Neurone nach einer Ischämie sind. Inhibiert man die Mikrogliaaktivität mit Tetracyclin, Doxycyclin und Minocyclin, so kommt es zu einer Reduzierung der Schadensgröße und man erzeugt somit einen neuroprotektiven Effekt (Chechneva et al., 2006; Yrjänheikki et al., 1998). Im Gegensatz zu ihrer neurotoxischen Funktion verfügen Mikrogliazellen auch über neuroprotektive Faktoren und Zytokine, die ein Überleben der Neurone nach einer pathologischen Erkrankung ermöglichen. So konnte z.B. im menschlichen HIV-1 infizierten Striatum (Soontornniyomkij et al., 1998), nach einer Rückenmarksverletzung (Dougherty et al., 2000), nach einer Sauerstoff-Glukose-Deprivation [(engl.: oxygen-glucose deprivation, OGD); Neumann et al., 2006] und nach einer Ischämie (Lalancette-Hébert et al., 2007; Lees et al., 1993) eine Neuroprotektion durch Mikrogliazellen erzeugt werden. Vermutlich tragen intra-arteriell injizierte Mikrogliazellen, die nach einer globalen Ischämie in das geschädigte CA1-Pyramidenzellband migrierten, zu einem möglichen protektiven Effekt bei, (Imai et al., 1997, 1999) indem sie die Neurone vor der Degeneration schützen (Hayashi et al., 2006). Die exogenen Mikrogliazellen verbesserten die durch die Ischämie induzierte synaptischen Defizite und die resultierende Abnahme des BDNF in den CA1-Neuronen, möglicherweise durch unbekannt freigesetzte diffusionsfähige Faktoren. Aufgrund dessen könnte die arterielle Injektion von Mikrogliazellen als mögliche effektive therapeutische Strategie für die Behandlung von akuten Gehirnverletzungen einschließlich der zerebralen Ischämie in Frage kommen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Astrozyten und Mikrogliazellen nach einer Gehirnverletzung sowohl schädlich als auch nützlich sein können und für die Auslösung der jeweiligen Aufgabe unterschiedliche Faktoren eine Rolle spielen. In der vorliegenden Arbeit werden die morphologischen Veränderungen, die erhöhte Gliose und deren mögliche Funktionen und Herkunftsorte nach einer globalen Ischämie untersucht und diskutiert.

### **1.5 Autometallographischer Nachweis von Thallium**

Besonders wegen der einzigartig geschichteten Konfiguration wird die Morphologie der hippocampalen Formation schon seit vielen Jahren im Detail beschrieben (z.B. Ramón y Cajal, 1911) und ist auch heute noch Gegenstand anatomischer Untersuchungen (z.B. Zhao et al., 2003, 2004). Wie bereits schon erwähnt, spielt die hippocampale Formation eine wichtige Rolle beim Lernen und dem Gedächtnis und kann durch eine Ischämie selektiv verletzt werden (Übersicht: Eichenbaum, 2004; Lynch, 2004; Riedel und Reymann, 1996; Rami und Krieglstein, 1993; Hossmann, 1999; Kirino, 2000). Um die post-ischämische Funktion bzw. Fehlfunktion der hippocampalen Neurone zu untersuchen, reichen jedoch die bisher verwendeten Färbemethoden nicht aus. Zwar kann z.B. mit der 2-Deoxyglukose-Methode (2-DG) oder mit der Magnetresonanztomographie (MRT) die neuronale Aktivität nach verschiedenen Läsionen im Gehirn in experimentellen Studien dargestellt werden (Sokoloff et al., 1977, 1996; Nuglisch et al., 1991; Hoehn et al., 2001; Hossmann, 2003), allerdings ist damit keine zelluläre Auflösung der Signale möglich. Dadurch kann es zu Problemen bei der Interpretation der Daten kommen, wie z.B. Rischke und Krieglstein (1991) aufzeigten. In dieser Arbeit wurde zu einem späten Zeitpunkt nach Ischämie ein erhöhtes Deoxyglucose-Signal in der CA1-Region festgestellt, obwohl durch morphologische Untersuchungen ein fast vollständiger Zelltod nachgewiesen wurde. Gegensätzliche Ergebnisse wurden auch in unseren elektrophysiologischen Messungen *in vivo* im *Gyrus dentatus* nach einer globalen zerebralen Ischämie detektiert. Die Neurone im *Gyrus dentatus* zeigen mit der Nissl-Färbung keinerlei Anzeichen einer Verletzung, obwohl die elektrophysiologischen Messungen bereits einen Tag nach Ischämie eine signifikante Abnahme der gemessenen Signale liefern (Henrich-Noack et al., 2005, Kapitel 3.1.2.1).

Durch die Darstellung der Expressionsmuster von unmittelbar frühen Genen (engl.: immediate early genes; z.B. c-Fos) kann man auch die neuronale Aktivität von Neuronen auf zellulärer Ebene darstellen. Doch diese Methode birgt einige Einschränkungen (Chaudhuri und Zangenehpour, 2002). Die Expression dieser Gene ist auf eine Teilmenge der Neurone

beschränkt und wird zusätzlich zur neuronalen elektrischen Aktivität auch durch viele andere Faktoren beeinflusst. Zusätzlich ist die Quantifizierung der Zellen schwierig.

Mit der neu entwickelten Methode des Autometallographischen Nachweises von Thallium, kann man die Aktivität und Morphologie der einzelnen Neurone an einem Lichtmikroskop darstellen (Goldschmidt et al., 2004). Die Methode basiert auf der engen Kopplung der neuronalen Aktivität und der Aufnahme von  $K^+$ . Der Ausstrom von  $K^+$  nimmt in den Neuronen nach der Depolarisation zu. Die Kompensation des  $K^+$ -Verlustes wird zum Großteil durch die  $Na^+/K^+$ -ATPase erzielt, indem der Kaliumstrom oder die Wiederaufnahme erhöht wird. *In vitro* konnte durch den Tracer  $^{42}K^+$  gezeigt werden, dass die Kaliumaufnahme mit zunehmender Aktivität zunimmt (Keynes, 1951; Keynes und Ritchie, 1965). Dadurch kann man  $K^+$ -Isotope oder  $K^+$ -Analoge, wie z.B. Rubidium, Thallium oder Cäsium als Tracer für die Darstellung der neuronalen Aktivität verwenden. In der von uns verwendeten Methode wurde das Schwermetall Thallium ( $Tl^+$ ) als Tracer verwendet (Britten und Blank, 1968; Douglas et al., 1990; Gehring und Hammond, 1967; Landowne, 1975). Durch Modifizierung der standardhistologischen Methode für den Nachweis eines Schwermetalls konnte mit der autometallographischen Methode Thallium spezifisch nachgewiesen werden (Danscher, 1981, 1991). Durch diese Technik war es uns nun möglich, zentralen Fragen über die zelluläre Funktion im intakten und beschädigten Hippokampus nachzugehen.

## 1.6 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit werden die elektrophysiologische Funktionsintegrität, die Plastizität hippokampaler Neurone und pathophysiologische bzw. morphologische Änderung in der hippokampalen Formation nach einer induzierten globalen zerebralen Ischämie in der Ratte charakterisiert. Daten aus der Literatur ließen vermuten, dass es keine vollständige Übereinstimmung zwischen morphologischer und funktioneller Evaluierung gibt und möglicherweise ältere, auf rein histologischen Befunden basierende Ansichten, revidiert werden müssen. Hierfür wurden elektrophysiologische Messungen *in vivo* und *ex vivo* sowie immunhistochemische und histochemische Färbungen durchgeführt. Mit der neu entwickelten und patentierten Färbemethode des Autometallographischen Nachweises von Thallium sollten zusätzlich Aussagen hinsichtlich der neuronalen Aktivität im Hippokampus nach globaler zerebraler Ischämie getroffen werden.

Folgende Fragen wurden in dieser Arbeit untersucht und diskutiert:

1. Existieren im Hippokampus neben der CA1-Region noch weitere morphologisch und funktionell beeinträchtigte Regionen? Ist es möglich nach einer globalen zerebralen Ischämie eine LTP in den Körnerzellen des *Gyrus dentatus* zu erzeugen? Gibt es Unterschiede zwischen den elektrophysiologischen Messungen bei *in vivo*- und *ex vivo*-Experimenten?
2. Inwieweit verändert sich die Neurogenese im *Gyrus dentatus* und an der SVZ zu einem frühen Zeitpunkt nach einer globalen Ischämie und gibt es Unterschiede zwischen den beiden neurogenen Zonen?
3. Erfolgt eine inflammatorische Reaktion (Mikroglia/Makrophagen) im Hippokampus bzw. in anderen Regionen des Vorderhirns nach einer globalen Ischämie und werden diese Zellen aktiviert oder neu gebildet?
4. Welche Aufgabe erfüllen die Astrozyten im Hippokampus und an der SVZ nach einer globalen zerebralen Ischämie? Erfolgt eine Re-Expression von Nestin in den Astrozyten oder erhalten Nestin-Zellen astrozytären Charakter?
5. Welche Aussagen kann man mithilfe des Autometallographischen Nachweises von Thallium hinsichtlich des Kalium-Metabolismus und der neuronalen Aktivität nach einer globalen Ischämie treffen? Gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten nach der globalen Ischämie?

## 2 METHODEN

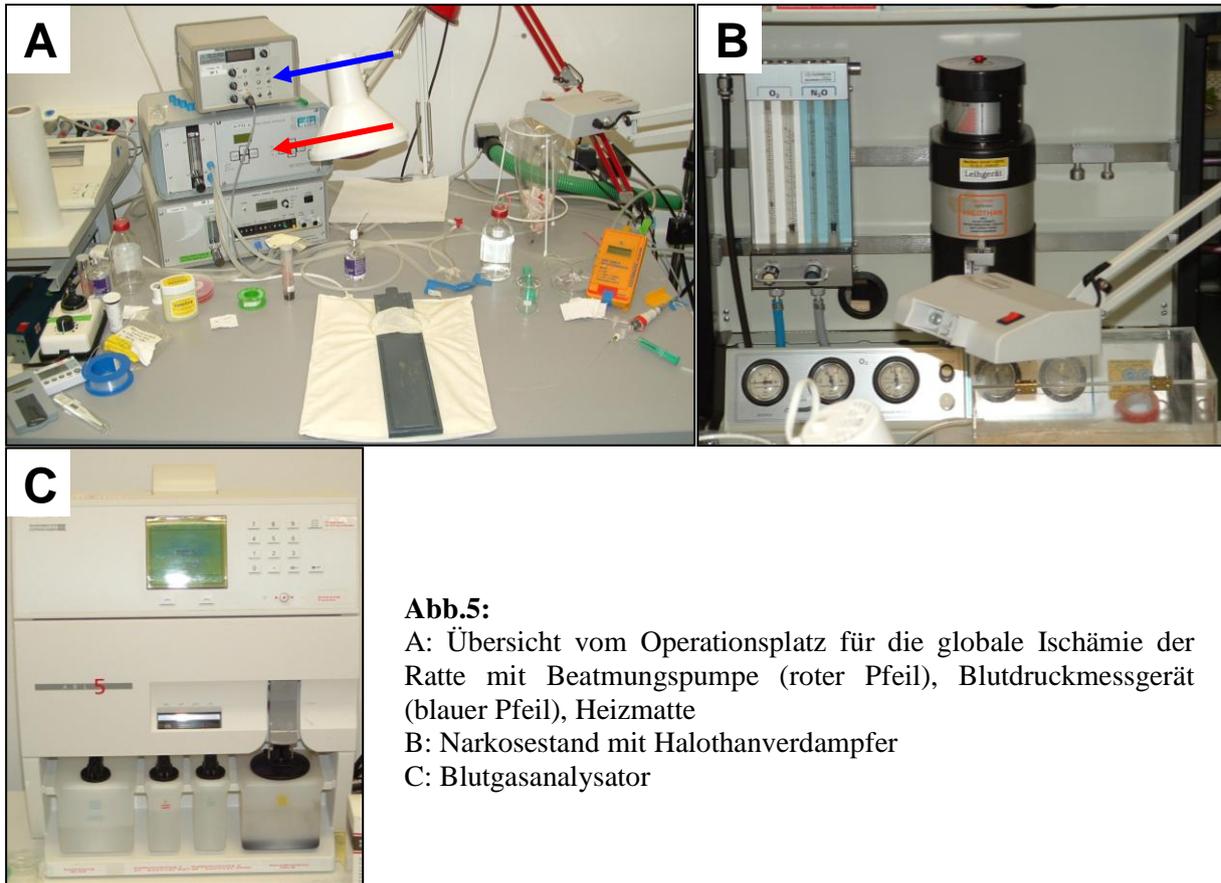
### 2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für diese Versuche wurden männliche Wistar-Unilever Ratten (HsdCpb:WU) mit einer Körpermasse zwischen 250-270 g aus dem Zuchtstamm der Tierzucht Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Die Haltung aller Versuchstiere erfolgte in einem klimatisierten Tierlabor mit einem 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus mit Dämmerungsphasen über je drei Stunden. Die Raumtemperatur betrug  $20 \pm 2$  °C und die relative Luftfeuchte  $55 \pm 10$  %. Futter, in Form von Pellets (HARLAN „global diets“), und Wasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung

### 2.2 Globale zerebrale Ischämie an Ratten

Die globale zerebrale Ischämie wurde in Anlehnung an Dirnagl et al. (1993) an der männlichen Wistar-Ratte durchgeführt. Die Tiere wurden nach einer Adaptationszeit von mindestens fünf Tagen verwendet. Um den Blutzuckerwert der Ratten vergleichbar zu halten, wurde am Tag vor der Operation das Futter entzogen. Die Tiere wurden zu Beginn des Eingriffes in einer Narkosebox und anschließend über eine Maske mit 3-4 Vol% Halothan narkotisiert, welches in einem Gemisch aus Sauerstoff und Distickstoffmonoxid (1:1) zugeführt wurde (Abb. 5B). Nach Freipräparation der Trachea wurden die Tiere intubiert und über eine Kleintierbeatmungspumpe (Abb. 5A) kontrolliert weiter beatmet: Vor Beginn der Operation wurden an der Beatmungspumpe folgende Parameter eingestellt:

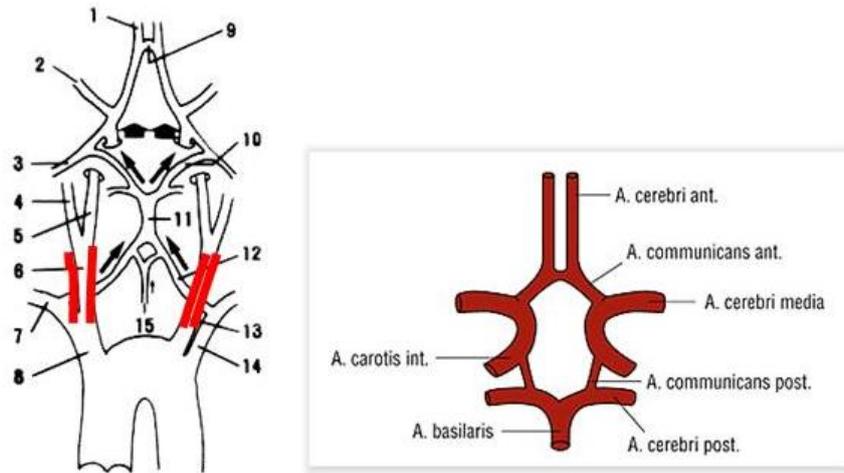
- Atemfrequenz: 50 Atemzüge pro Minute
- Inspiration/Exspiration: 50 %
- Plateau: 0 %
- Endinspiratorischer Druck (EIP): 10-15
- Sauerstoff/Distickstoffmonoxid: 1:1

**Abb.5:**

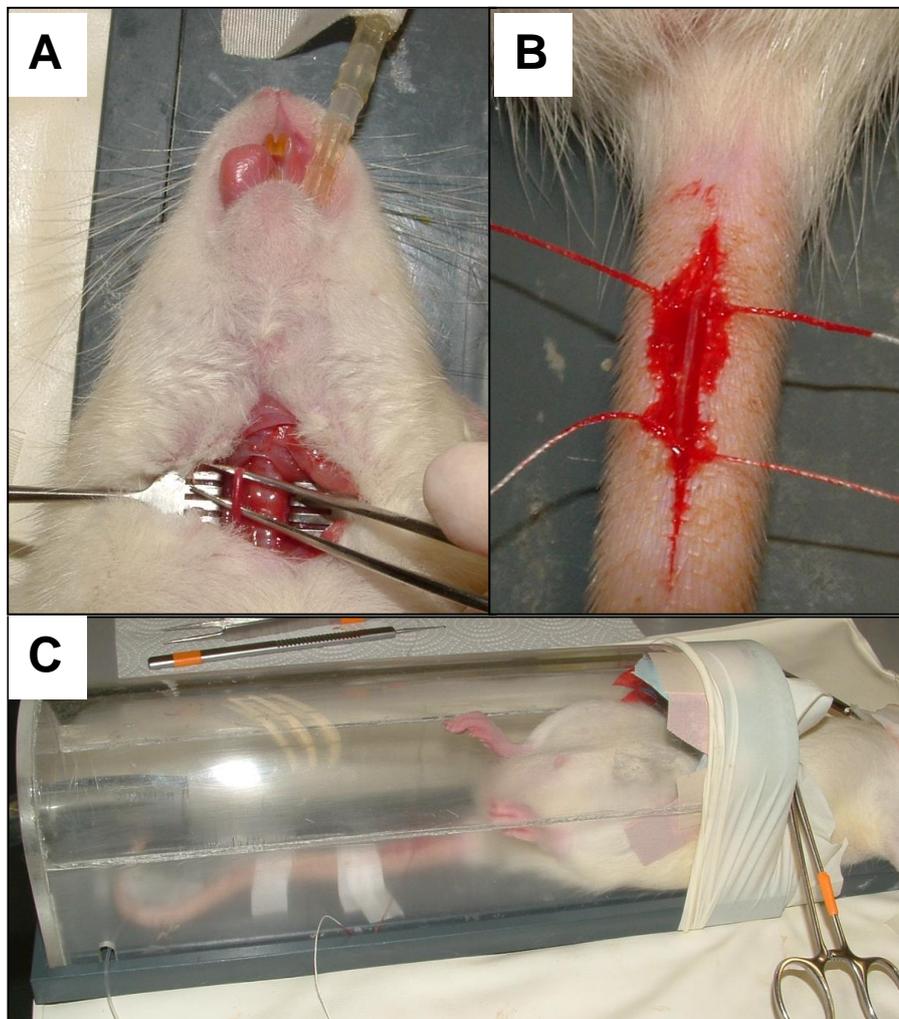
A: Übersicht vom Operationsplatz für die globale Ischämie der Ratte mit Beatmungspumpe (roter Pfeil), Blutdruckmessgerät (blauer Pfeil), Heizmatte  
 B: Narkosestand mit Halothanverdampfer  
 C: Blutgasanalysator

Nachfolgend wurden beide Karotiden (Abb. 6, 7A), ohne den anliegenden *Nervus vagus* zu verletzen, freigelegt und mit einem Faden umschlungen. Die Schwanzwurzelarterie wurde freipräpariert (Abb. 7B), distal abgebunden und mit einem Polyethylenschlauch (0,28 mm x 1,09 mm) katheterisiert (Spüllösung 50 IU Heparin in 0,9 % sterilem NaCl). Über den Katheter wurden Blutproben zur Bestimmung des Blutzuckerwertes, des pH-Wertes sowie des Sauerstoff- ( $pO_2$ ) und Kohlendioxidpartialdruckes ( $pCO_2$ ) entnommen. Für die Messung der Blutgase stand ein Blutgasanalysator (Abb. 5C) zur Verfügung. Den Tieren wurde über den Katheter maximal 0,2 ml Heparinlösung verabreicht, um eine Verstopfung des Katheters durch geronnenes Blut zu verhindern. Der Blutdruck wurde über einen am Katheter angeschlossenen piezoelektrischen Drucktransduktor mit nachfolgendem Messbrücken-Verstärker gemessen. Durch Veränderung der Parameter an der Beatmungspumpe bzw. des Narkosestandes wurden die Blutgase verändert bis folgende Normwerte erreicht wurden:

- pH = 7,4
- $pO_2 > 100$  mmHg
- $pCO_2 = 35-40$  mmHg
- es wurde ein Blutdruck von  $> 80$  mmHg angestrebt



**Abb. 6:** Blutgefäßsystem vom Brustkorb bis Kopfende einer Ratte (links) und Darstellung des Circulus arteriosus Willisii (rechts). In der linken Abbildung sind die beiden Karotisarterien rot dargestellt.



**Abb.7:**  
 A: Freipräparierte Karotisarterie über der Pinzette  
 B: Freipräparierte Schwanzwurzelarterie  
 C: Glocke über den Bereich vom Abdomen abwärts zur Erzeugung eines Unterdruckes während der Ischämie

Nach erfolgreichem Einstellen der Blutgase und des Blutdruckes wurde die Ratte bis unterhalb des Brustkorbs in eine Kammer gelegt. Kurz vor Beginn der Ischämie wurde Halothan auf 1 Vol% geregelt und eine Infrarotlampe über dem Kopf des Tieres positioniert, um die Hirntemperatur auch während der Ischämie konstant zu halten. Die Körpertemperatur wurde mit einem Rektalfühler kontrolliert und bei 37 °C vor und während der Ischämie mittels Wärmekissen konstant gehalten. Der Erhalt der Körpertemperatur der Versuchstiere bei 37 °C verhindert eine durch Temperaturabsenkung erzeugbare Protektion (Nakajima et al., 1997) gegenüber ischämischen Insulten. Beide Karotis-Arterien wurden mit Hilfe von Arterienklemmen transient abgeklemmt. Durch Erzeugung eines an der Kammer (Abb. 7C) angelegten Unterdrucks wurde der Blutdruck auf 37-42 mmHg gesenkt. Nach 10 min wurde dieser Zustand aufgehoben durch Entfernen der Arterienklemmen, Aufhebung des Unterdrucks und Ausschalten der Infrarotlampe. Die Blutwerte wurden erneut gemessen und die Wunden mit Xylocain-Gel versorgt und vernäht. Nach Einsetzen der Spontanatmung wurden die Ratten extubiert und für weitere zwei Stunden auf einer Heizmatte bei 30 °C gewärmt.

Scheinoperierten Tieren wurden die Karotis-Arterien unter Narkose freipräpariert, aber nicht abgeklemmt und es wurde kein Unterdruck angelegt.

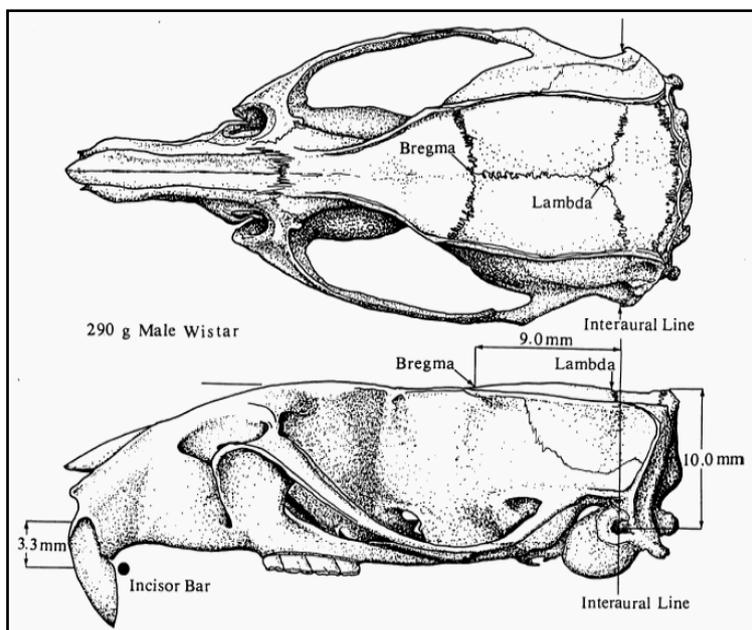
Je nach Versuchsansatz wurden die Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten (ein Tag, drei Tage, 10 Tage, 14 Tage, 56 Tage) perfundiert bzw. dekapitiert.

## **2.3 Elektrophysiologische Messungen *in vivo* an der freibeweglichen Ratte nach globaler zerebraler Ischämie**

### **2.3.1 Elektrodenimplantation *in vivo***

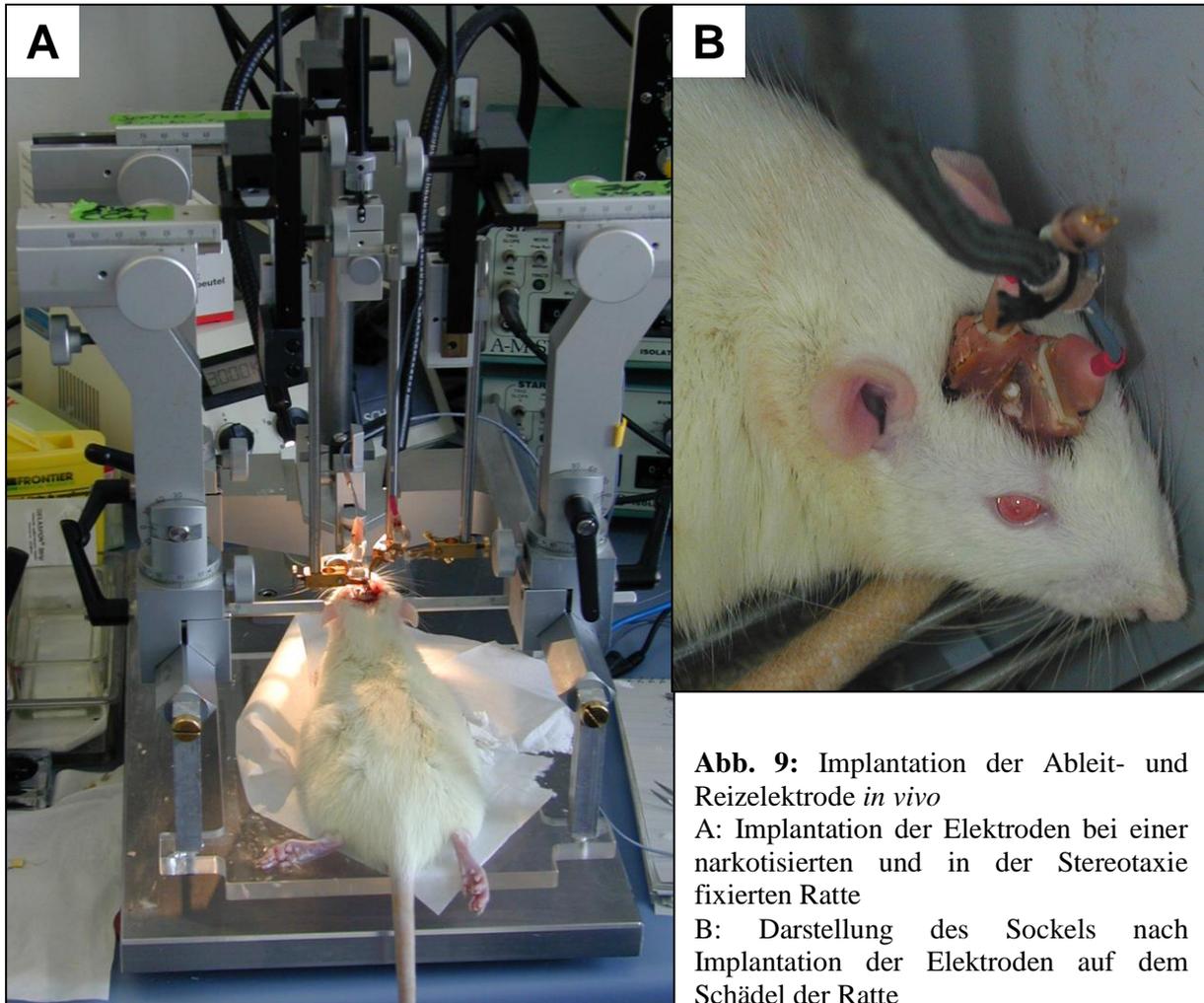
Die Implantation der Elektroden wurde nach Manahan-Vaughan und Reymann (1996) durchgeführt. Die männlichen Wistar-Ratten wurden mit Pentobarbital (40–50 mg/kg) narkotisiert und der Kopf am Oberkiefer und den knöchernen Gehörgängen in einer Stereotaxie fixiert (Abb. 9A). Der Winkel des Nasenhalters wurde auf +1 mm gestellt. Ein 2-3 cm langer Schnitt wurde entlang der Mittellinie von den Augen beginnend bis zum Hinterkopf geführt, die Knochenhaut vom Schädel abgeschabt und die Oberfläche mit 3 % Wasserstoffperoxid gereinigt. Nach Spannen der Kopfhaut mit Gewebeklemmen wurden die Koordinaten von Bregma ausgehend bestimmt und markiert. Für die Bestimmung der stereotaktischen Koordinaten für die Stimulations- und Reizelektroden wurde der Atlas von

Paxinos und Watson (1998) (Abb. 8) verwendet. Die monopolare Ableitelektrode (0,1 mm Durchmesser) wurde in die Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* (stereotaktische Koordinaten: Bregma: -2,8 mm, lateral: 1,8 mm) und die bipolare Reizelektrode (Bregma: -6,9 mm, lateral: 4,1 mm) in den *Tractus perforans* der rechten Hirnhemisphäre implantiert.



**Abb.8:** Dorsale und laterale Ansicht eines Schädels von einer Wistar-Ratte. Die Position von Bregma und Lambda sind auf dem Schädel markiert.

Als Referenzelektrode und elektrische Erde wurden, ohne die *Dura mater* zu verletzen, zwei Edelstahlschrauben (1,5 mm Durchmesser) in die linke Schädelseite, implantiert und über zwei Drähte kurzgeschlossen. Die freien Enden der Ableit- und Reizelektrode und die Drähte der Referenzelektrode und die elektrische Erde wurden mit einem Gummisockel verbunden und an ein Oszilloskop und einen Stimulator angeschlossen. Die Elektrodentiefe wurde justiert, bis ein Maximum der Amplitude des Summenaktionspotentials [engl. population spike amplitude (PSA); in mV, Wert zwischen der ersten positiven und ersten negativen Auslenkung] bei einer Testintensität von 400  $\mu$ A erreicht wurde. Hierbei musste die PSA einen Mindestwert von 5 mV erreichen. Anschließend wurden die Elektroden auf der Schädelkalotte mit Zahnzement (Paladur) fixiert (Abb. 9B).



**Abb. 9:** Implantation der Ableit- und Reizelektrode *in vivo*

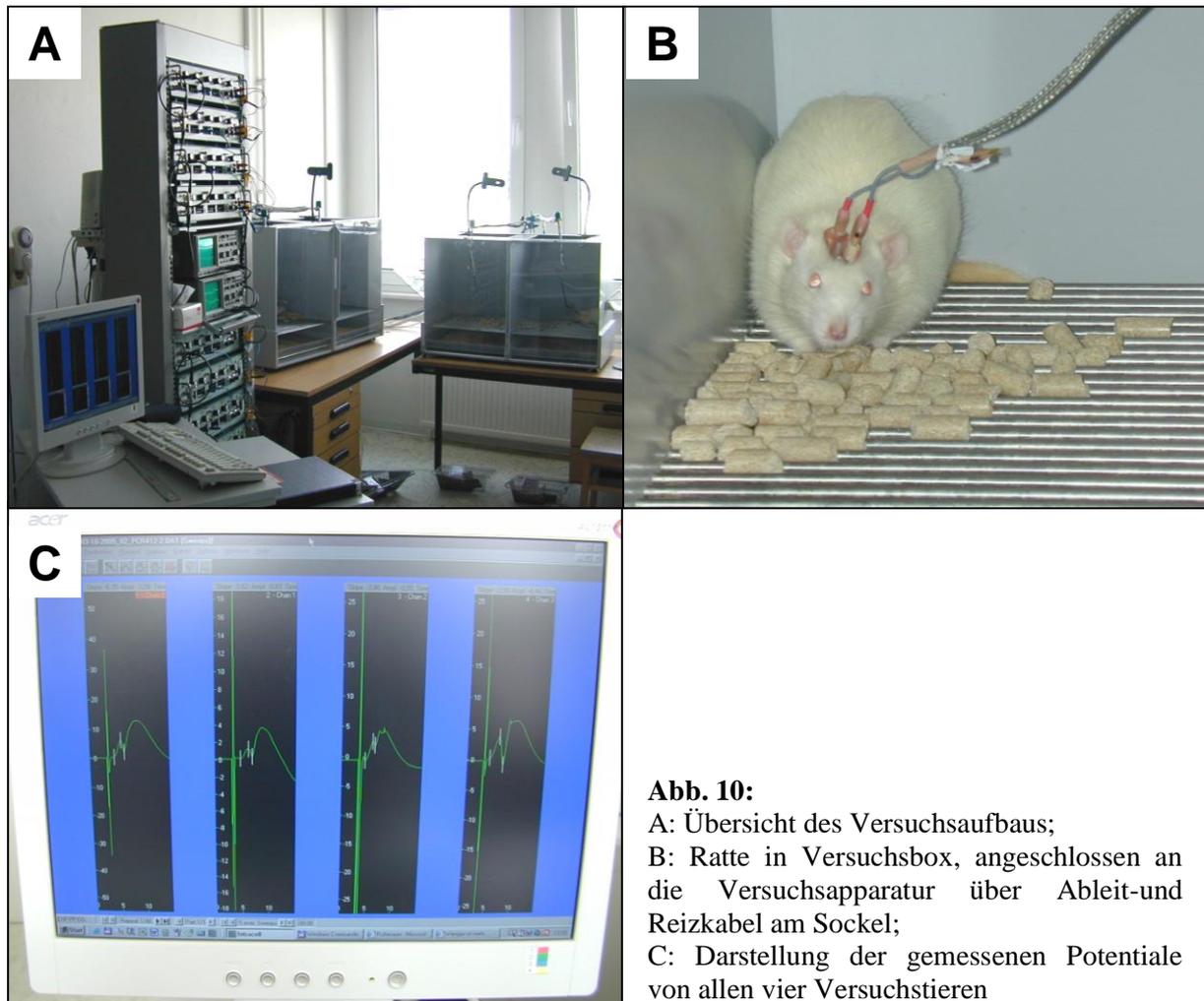
A: Implantation der Elektroden bei einer narkotisierten und in der Stereotaxie fixierten Ratte

B: Darstellung des Sockels nach Implantation der Elektroden auf dem Schädel der Ratte

### 2.3.2 Reiz- und Messparameter für die Bestimmung der Populationsspikeamplituden und der exzitatorischen postsynaptischen Feldpotentiale

Frühestens acht Tage nach dem operativen Eingriff begann die Adaptation der Tiere an die Versuchsbedingungen in den Testboxen (40 x 40 x 40 cm). Die Tiere konnten sich in den Boxen frei bewegen und waren mit einem flexiblen Kabel an die Apparatur angeschlossen (Abb. 10 A, B).

Zur Auswertung wurden in erster Linie die Amplituden der Summenaktionspotentiale und die Anstiegsteilheit des exzitatorischen postsynaptischen Feldpotentials (fEPSP-slope in mV/ms; maximale Anstieg des Potentials beginnend von der ersten positiven Auslenkung des Potentials) herangezogen. Da die PSA die Anzahl der „antwortenden“ Körnerzellen und die Synchronität ihrer Entladung widerspiegelt, erhielt man ein Maß für die Erregbarkeit der abgeleiteten Zellpopulation. Die Stimulation wurde so gewählt, dass die Neurone am nächsten Tag bei der Induktion der Ischämie wieder auf Basisniveau waren, also nicht mehr potenziert.

**Abb. 10:**

A: Übersicht des Versuchsaufbaus;

B: Ratte in Versuchsbox, angeschlossen an die Versuchsapparatur über Ableit- und Reizkabel am Sockel;

C: Darstellung der gemessenen Potentiale von allen vier Versuchstieren

Zu Beginn eines Experiments erfolgte die Aufzeichnung einer Reiz-Antwort-Kurve (I/O-Kurve, engl.: input-output-curve). Hierzu wurde mit einer geringen Reizstärke ( $100 \mu\text{A}$ ) beginnend die PSA bestimmt und die Reizstärke um jeweils  $100 \mu\text{A}$  schrittweise bis auf  $900 \mu\text{A}$  alle 5min gesteigert. Anschließend wurde aus der I/O-Kurve die maximale PSA bestimmt und dann auf eine Reizstärke eingestellt, mit der man in etwa 40 % der maximalen PSA erreicht. Stimuliert wurde mit einer niedrigen Frequenz von  $0,1\text{Hz}$  mit biphasischen Rechteckpulsen von  $0,1 \text{ ms}$  Dauer pro Auslenkung / je Polarität oder Pulsbreite  $0,1 \text{ ms}$  je Polarität.

Nach einstündiger Ruhepause wurde eine Basislinie der PSA aufgezeichnet (Mittelwert aus 5 Messungen aller 5 min, Pulsbreite von  $0,1 \text{ ms}$ ). War die Basislinie stabil, wurde sie über einen Zeitraum von einer Stunde aufgezeichnet. Hierbei wurden fünf der durch bipolare Stimulation des *Tractus perforans* induzierten Summenaktionspotentiale (in 10-Sekunden-Intervallen, Pulsbreite von  $0,1 \text{ ms}$ ) für jeden Messpunkt (alle 15 min) gemittelt. Die Aufzeichnung einer I/O-Kurve und Basislinie erfolgte einen Tag vor der Ischämie bzw. Scheinoperation und zwei,

7 und 10 Tage nach der Ischämie bzw. Scheinoperation. Alle Messwerte, die während der Versuchsreihe entstanden, wurden mit Hilfe einer Software (PWIN), die im Institut für Neurobiologie in Magdeburg für die Ableitung von elektrischen evozierten extrazellulären Signalen entwickelt wurde, auf einem Computer aufgezeichnet (Abb. 10C) und gespeichert.

### 2.3.3 Stimulationsparameter

Einen Tag vor der Ischämie und an Tag 10 nach der Ischämie wurde eine LTP durch Theta-Burst-Stimulation (TBS, 10 Salven (Bursts) a 15 Stimuli bei 200 Hz, Burstintervall 10 s, Pulsbreite = 0,2 ms, gleiche Reizintensität wie bei der Basislinie) induziert. In einem anderen Versuchsansatz wurden die Tiere nur am Tag zwei nach der Ischämie bzw. der Scheinoperation tetanisiert.

Da nach der Ischämie einige Tiere auch mit der höchsten Reizintensität während der Aufzeichnung einer I/O-Kurve keine PSA zeigten, konnte die Reizstärke für die 40 % der maximalen PSA nicht eingestellt werden. Aus diesem Grunde wurden diese Tiere mit einer Reizintensität von 500-600  $\mu$ A tetanisiert. Diese Reizintensität lag im oberen Bereich der verwendeten Reizintensität der Tiere mit einer regulären I/O-Kurve. Nach Induktion der LTP wurde die Aufzeichnung der PSA und fEPSP slope alle 15 min fortgesetzt. Dabei war es nicht möglich, die Potenzierung prozentual anzugeben, da nahezu alle Basislinienwerte 10 Tage nach der Ischämie bei null lagen. Aus diesem Grund wurden die PSA als Absolutwerte in mV  $\pm$  SEM angegeben.

## 2.4 Elektrophysiologische Messungen *ex vivo* nach globaler zerebraler Ischämie

Die *ex vivo* Experimente (Balschun et al., 1999) wurden an Gehirnschnitten von Tieren mit einer transienten globalen Ischämie (siehe Kapitel 3.2.1) am Tag 10 und 56 nach der Läsion durchgeführt. Die Tiere wurden nach einem Genickschlag dekapitiert, der Hippokampus vorsichtig heraus präpariert und sofort in eine 4 °C kalte, hydrogenisierte aCSF (engl.: artificial cerebrospinal fluid, künstlicher Liquor; Tabelle 1) überführt. Anschließend wurde der Hippokampus mit Hilfe eines Gewebe-Choppers in 400  $\mu$ m dicke Schnitte geschnitten, wobei ein Winkel von 70° zur Schnittklinge eingehalten werden musste, um die akzessorischen Fasereingänge optimal zu erhalten. Die Schnitte wurden schnell in die aCSF überführt, in einer Tauchschnittkammer platziert und mittels Decknetz unter der Flüssigkeitsoberfläche befestigt. Folgende Bedingungen lagen in der Schnittkammer vor:

Temperatur 34 °C, Durchflussrate der aCSF-Lösung war 2,5 ml/min, Begasung der aCSF mit Carbogen (gesättigt mit 95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, pH 7,4) mit einem Überdruck von 1,3 bar. Nach einstündiger Equilibrierung (Präinkubation) der Schnitte wurden die Ableitelektrode (Glaselektrode, gefüllt mit aCSF, 1-4 MΩ) in die Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* und die Reizelektrode (Edelstahl-Stimulationselektroden, ummantelt mit Epoxy-Lack) in das *Stratum moleculare* (medialer *Tractus perforans*) platziert. Um zu überprüfen, ob die Reizelektrode exakt platziert wurde, wurde ein Doppelpuls mit einem Interpulsabstand von 50 ms durchgeführt. Liegt der Quotient vom 2. und 1. Puls unter 1, wurde die Reizelektrode korrekt platziert (McNaughton, 1982).

Nach erneutem einstündigen Equilibrieren erfolgte die Aufzeichnung einer I/O-Kurve, wobei in 0,5 V-Schritten stimuliert und abgeleitet wurde. Die PSA wurde aus der Potentialdifferenz zwischen dem Maximum und dem nachfolgenden Minimum bestimmt. Die Reizstärke wurde solange erhöht bis eine maximale PSA erreicht wurde. Die Reizstärke, mit der 40 % des maximalen Wertes des PSA erreicht wurde, wurde bestimmt und eingestellt. Nach erneutem einstündigen Equilibrieren und Testung des Doppelpulses wurde eine Basislinie aufgezeichnet (Mittelwert aus drei Messungen aller 5 min, Pulsbreite von 0,1 ms). Blieb die Basislinie für mindestens 45 min stabil, wurde eine LTP durch Theta-Burst-Stimulation (TBS, 15 Bursts a 8 Stimuli bei 200 Hz, Burstintervall 200 ms, Pulsbreite = 0,2 ms, 3 x im Abstand von 2 min) induziert. Nach Tetanisierung wurde die Aufzeichnung der PSA alle 5 min für zwei Stunden fortgesetzt und das Experiment mit einer erneuten Testung des Doppelpulses abgeschlossen.

Chemikalien	Konzentration [mM]	Menge [g/l]
NaCl	124	7,248
KCl	4,9	0,356
CaCl <sub>2</sub>	2,5	0,3685
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	0,164
NaHCO <sub>3</sub>	25,6	2,152
D-Glukose	10	1,802

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der aCSF

## 2.5 Applikation eines Tracers

### 2.5.1 Applikation einer Thallium(I)acetat/DEDTC-Lösung

Bei der Thallium-Autometallographie wird das Schwermetall Thallium (Tl) zur Visualisierung des Kalium-Metabolismus und neuronaler Aktivität eingesetzt. Die Thallium-Autometallographie wurde von Goldschmidt und Mitarbeitern entwickelt (Goldschmidt et al. 2004). In der ursprünglichen Variante wurde ein wasserlösliches Thalliumsalz intraperitoneal injiziert. Dies hatte jedoch drei Nachteile:

1. Aufgrund der schlechten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für  $K^+$  bzw.  $Tl^+$  (Rios et al., 1989) mussten vergleichsweise hohe Thallium-Dosen appliziert werden, um eine ausreichend hohe Färbeintensität zu erzielen.
2. Aufgrund der relativ hohen  $K^+$ -Leitfähigkeit der choroidalen Plexus kam es zu entsprechend hohen  $Tl^+$ -Konzentrationen in den inneren Liquorräumen. Die  $Tl^+$ -Aufnahme in periventrikulären Arealen war daher um eine Größenordnung höher als in anderen Hirnarealen, was den Vergleich aktivitätsabhängiger Thalliumaufnahmen in verschiedenen Hirnarealen erschwerte.
3. Zusätzlich erschwert war der Vergleich aktivitätsabhängiger Thallium-Aufnahmen durch regionale Unterschiede in der Blut-Hirn-Schranken-Leitfähigkeit für Kalium (Goldschmidt et al., 2004).

Diese Probleme konnten durch die Entwicklung einer neuen Variante der Thallium-Autometallographie gelöst werden. Dabei wird ein lipophiler Thallium-Chelat-Komplex injiziert. Die chelatisierende Komponente, mit der  $Tl^+$ -Ionen einen lipophilen Komplex bilden, ist Natrium Diethyldithiocarbamat (DEDTC). Der Tl-DEDTC-Komplex gelangt sehr schnell ins Gehirn, dissoziiert dort ebenso schnell wieder, entlässt freies  $Tl^+$  und erreicht bereits nach anderthalb Minuten die maximale Thalliumkonzentration im Gehirn (de Bruine et al., 1985). Landowne (1975) konnte in seinen *in vitro* Experimenten zeigen, dass die Thalliumaufnahme in aktiven Neuronen aus dem umgebenden Medium innerhalb der ersten 5 bis 10 min annähernd linear ansteigt. Aufgrund des schnellen Transportes von Thallium ins Gehirn und der geringen Zeit der Thalliumaufnahme in die Zellen wurde der Perfusionszeitpunkt der Tiere auf 15 min nach Injektion des lipophilen Komplexes festgelegt. Dadurch wurde gewährleistet, dass eine maximale Menge von Thallium ins Gehirn gelangt ist und man in dem Zeitbereich ist, in dem die Aufnahme von Thallium in die Zellen, den Ausstrom bei weitem überwiegt. Diese neue Variante ist in einer Vielzahl von Experimenten

validiert worden, u.a. kortikale Mikrostimulation, Applikation von GABA-Agonisten und akustische Stimulation (Goldschmidt et al., in Vorbereitung).

In diesen Untersuchungen wurden sowohl der  $K^+$ -Metabolismus als auch die neuronale und gliale Aktivität naiver und ischämischer (14 bzw. 56 Tage) Tiere untersucht.

#### Detaillierte Durchführung:

Den Ratten wurde 15 min vor Perfusion ein lipophiler Komplex, bestehend aus einer wässrigen Lösung mit Thallium(I)acetat (TlAc) und Natrium Diethyldithiocarbamatrihydrat (NaDEDTC) im Verhältnis 1:1 intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die Injektionslösung bestand für 300 g schwere Ratten aus 600  $\mu$ l 1 % TlAc und 600  $\mu$ l 0,7 % NaDEDTC. Hierbei ist zu beachten, dass zuerst die TlAc-Lösung in die Spritze aufgezogen wurde und anschließend die NaDEDTC-Lösung. NaDEDTC kann über seine zwei SH-Gruppen zweiwertige Kationen chelatisieren und ist gut wasserlöslich. Bei Bildung eines Komplexes mit einem Kation wie gelöstem  $Tl^+$  beginnt dieser weißlich auszufallen und zu verklumpen. Deshalb durfte die Spritze erst kurz vor der Injektion aufgezogen werden. Die DEDTC-Lösung durfte nur einmalig verwendet werden und musste für jede Perfusion neu hergestellt werden, damit die Chelatisierungsfähigkeit nicht beeinträchtigt wird. In der alten DEDTC-Lösung entstehen SH und  $H_2S$ , die entweichen und noch andere Reaktionsprodukte von DEDTC mit sich selbst und mit Wasser bilden. Nach der Applikation wurden keinerlei Verhaltensänderungen oder – auffälligkeiten bei den Ratten beobachtet.

#### **2.5.2 Nachweis proliferierender Zellen mit BrdU**

Für die Untersuchung der Proliferation und Differenzierung neuer Zellen wurde in einem Versuchsansatz 5'-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) eingesetzt. BrdU ist ein synthetisches Thymidinanalog, das dem Thymidinstoffwechsel unterliegt und in der S-Phase des Zellzyklus kompetitiv anstelle von Thymidin in die Zell-DNA eingebaut wird. Zellen, die sich während der BrdU-Expositionszeit in der S-Phase des Zellzyklus befinden, inkorporieren BrdU und ihr Zellkern lässt sich immunhistochemisch anfärben (Nowakowski et al., 1989).

Direkt nach Einsetzen der Spontanatmung nach der Ischämie erhielten die Tiere eine i.p. Injektion von 50 mg/kg BrdU (25 mg/ml Stammlösung) gelöst in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung. An den folgenden zwei Tagen erhielten die Ratten zwei Injektionen pro Tag. Am dritten Tag nach Ischämie wurden die Tiere transkardial perfundiert.

Für eine weitere Serie wurde nach Einsetzen der Spontanatmung und sechs Stunden danach, eine Injektion von 100 mg/kg BrdU (25 mg/ml Stammlösung, gelöst in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung), i.p. injiziert. 24 Stunden nach Ischämie wurden die Tiere perfundiert.

Die Tiere, die für die elektrophysiologischen Messungen *in vivo* und *ex vivo* verwendet wurden, sowie die Tiere für den autometallographischen Nachweis von Thallium, erhielten kein BrdU.

## **2.6 Gehirnentnahme**

### **2.6.1 Dekapitation und Entnahme des Gehirnes**

Die Tiere aus dem Versuch der elektrophysiologischen Messungen *in vivo* wurden 10-11 Tage nach der globalen Ischämie mittels Halothan in einem geschlossenen Glasbehälter narkotisiert und nach Atemstillstand sofort dekapitiert. Anschließend wurde der am Schädel fixierte Sockel mit den Elektroden und der Befestigungsschraube mit Hilfe einer Knochenzange senkrecht nach oben abgehoben. Die Haut wurde bis zu den Augen vom Schädeldach gelöst und die Schädelknochen vorsichtig mit einer kleinen Schere vom Hinterhaupt ausgehend geöffnet und mit einer Pinzette abgehoben. Das nun freiliegende Gehirn wurde von der *Dura mater* befreit, herausgenommen, sofort fixiert und in Paraffin eingebettet (siehe Kapitel 2.7.1).

### **2.6.2 Perfusionsfixierung mit Paraformaldehyd**

Die Fixierung der Gehirne für immunhistochemische Nachweise erfolgte durch Perfusion mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung in 0,1 M PBS Puffer. Dazu wurden die Tiere mit 4%igem Chloralhydrat (0,8 g/kg Körpergewicht Ratte) tief narkotisiert (Abb. 11A). Der Brustraum wurde unterhalb des Brustbeins geöffnet und das Herz frei gelegt. Die linke Herzkammer wurde an ihrer Spitze eingeschnitten, eine Knopfkanüle (1,5 x 70 mm; Luer, Hero) bis in die Aorta vorgeschoben und fixiert (Abb. 11B). Nach Anschneiden der rechten Herzkammer wurde mit Hilfe einer mit der Kanüle verbundenen Schlauchpumpe (Abb. 11C) eine 0,1 M PBS-Lösung durch das Gefäßsystem des Tieres gepumpt. Nachdem das Blut aus den Gefäßen gespült war, wurde mit ca. 300 ml Paraformaldehydlösung fixiert. Nach Dekapitation (Abb. 11D) folgte die Gehirnentnahme wie bereits im Kapitel 2.6.1 beschrieben. Das Gehirn (Abb. 11E) wurde über Nacht in einer 4%igen Paraformaldehydlösung

nachfixiert. Anschließend wurde das Gehirn in eine 30%ige Saccharose-Lösung überführt und verblieb bis zum Absinken in der Lösung. Durch Anlagerung von Zucker an die Proteine im Gehirn wird eine Kryoprotektion erzeugt, wodurch das Gewebe beim Einfrieren des Gehirns mit Methylbutan bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  nicht zerstört wird. Für die weitere Aufarbeitung und immunhistochemische Färbung wurden Gefrierschnitte angefertigt.

Herstellung der Perfusionslösungen:

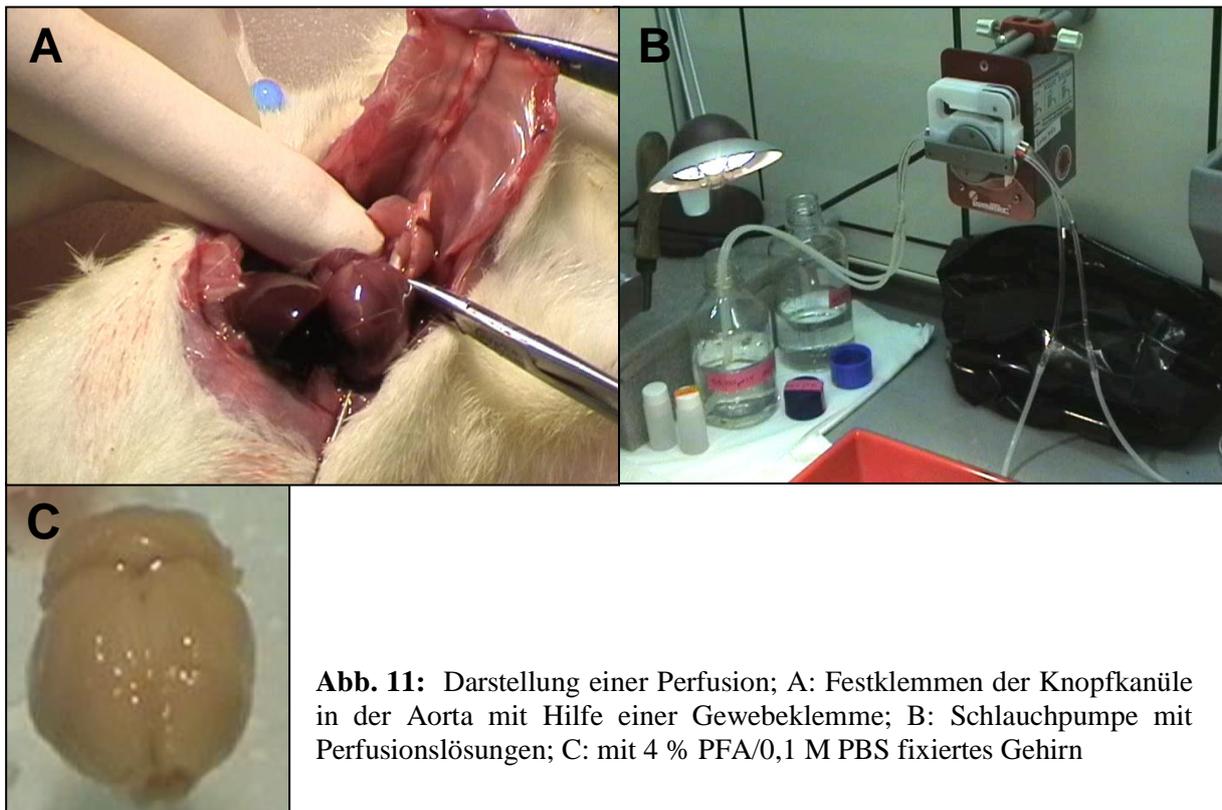
0,1 M PBS: saurer Bestandteil:  $2,73\text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} + 1,82\text{ g NaCl} + 200\text{ ml Aqua dest.}$

basischer Bestandteil:  $14,25\text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 7,26\text{ g NaCl} + 800\text{ ml Aqua dest.}$

Titration mit saurem Bestandteil auf pH 7,4

4 % PFA/0,1 M PBS:  $100\text{ ml } 0,1\text{ M PBS pH } 7,4 + 4\text{ g Paraformaldehyd}$

bei  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Abzug rühren, bis Lösung klar ist, filtrieren



**Abb. 11:** Darstellung einer Perfusion; A: Festklemmen der Knopfkanüle in der Aorta mit Hilfe einer Gewebeklemme; B: Schlauchpumpe mit Perfusionslösungen; C: mit 4 % PFA/0,1 M PBS fixiertes Gehirn

### 2.6.3 Perfusionsfixierung mit Glutaraldehyd für den autometallographischen Nachweis von Thallium

Die Tiere wurden mit 4 % Chloralhydrat i.p. narkotisiert und für die Perfusion präpariert (siehe Kapitel 2.6.2). Perfundiert wurde insgesamt 40 min pro Tier, davon 30-45 Sek. (10-12 ml) mit einer Vorspüllösung, gefolgt von einer Fixierlösung (10 min) und einer anschließenden Spülung des Gefäßsystems mit einer 0,1 M PBS-Lsg. pH 7,4 für 30 min. In den ersten 3 min (inklusive Vorspülung) wurde das Tier mit einer Flussrate von 65 ml/min, in den darauf folgenden Schritten mit einer Flussrate von 35 ml/min (Fixierlösung) perfundiert. Als Beweis für eine korrekte intraperitoneale Injektion des lipophilen Komplexes mit Thallium, konnte man nach Öffnen des Bauchraumes weiße kleine Klumpen zwischen den Organen finden. Anschließend erfolgte die Gehirnentnahme wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben. Nachdem das *Zerebellum* und der *Bulbus olfaktorius* entfernt wurden, wurde das Gehirn in 30 % Saccharose pH 7,4 überführt. Nach 48 Stunden waren die Gehirne abgesunken und wurden mit Methylbutan bei -80 °C eingefroren und gelagert. Für die weitere Aufarbeitung und Färbung wurden Gefrierschnitte angefertigt.

#### Herstellung der Lösungen für die Perfusion

##### *Natriumsulfid-Stammlösung:*

Für zwei Ratten benötigte man ca. 200 ml. Dazu wurden 40 g  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  in 140 ml Aqua dest. gelöst. Nachdem die Kristalle sich vollständig gelöst hatten, wurde die Lösung im Messzylinder auf 200 ml aufgefüllt, nochmals verrührt und im Kühlschrank aufbewahrt. Für die Perfusionen wurden nur Lösungen verwendet, die nicht älter als fünf Tage waren.

##### *Vorspüllösung:*

Als Vorspülung wurde eine Lösung von 0,325 % Natriumsulfid in 100 mM Natriumphosphat, pH 7,4 verwendet. Vor jeder Perfusion wurde die Vorspüllösung frisch hergestellt und die Natriumsulfid-Stammlösung erst kurz vor Perfusionsbeginn zugeben (20-30 min vorher). Pro Ratte wurden 400 ml angesetzt.

5,52 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  in 378 ml Aqua dest. lösen  
+ 20 ml Natriumsulfid-Stammlösung  
pH-Wert mit 10 N NaOH auf 7,4 einstellen

*Fixierungslösung:*

Fixiert wurde mit einer Lösung von 3 % Glutaraldehyd und 0,16 % Natriumsulfid in 100 mM Natriumphosphatpuffer. Vor jeder Perfusion wurde die Fixierlösung frisch hergestellt und die Natriumsulfid-Stammlösung erst kurz vor Perfusionsbeginn zugegeben (20-30 min vorher). Pro Ratte wurden 800 ml angesetzt.

- 11,04 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O in 676 ml Aqua dest. lösen
- + 96 ml der 25%igen Glutaraldehydlösung
- + 20 ml Natriumsulfid-Stammlösung
- pH-Wert mit 10 N NaOH auf 7,4 einstellen

**2.7 Aufarbeitung der Gehirne**

**2.7.1 Paraffineinbettung und Anfertigung von Paraffinschnitten**

Die histologische Aufarbeitung der Gehirne erfolgte in Anlehnung an ein Schema von Victorov und Barskov (1993).

Die Fixierung der Gehirne erfolgte für drei Stunden in einem 7:2:1-Gemisch aus Ethanol (100 %), Formaldehydlösung (37 %) und Eisessig. Aus diesem Gemisch wurden die Gehirne zur Lagerung in 70%iges Ethanol überführt. Die Paraffineinbettung der in Ethanol gelagerten Gehirne wurde wie in Tabelle 2 angegeben durchgeführt.

<b>Lösung</b>	<b>Inkubationszeit</b>
Ethanol 96 %	über Nacht
Ethanol 100 %	eine Stunde
Ethanol 100 %	eine Stunde
Chloroform-Ethanol 1:1	bis zum Absinken des Gehirns
Chloroform-Ethanol 2:1	bis zum Absinken des Gehirns
Chloroform	eine Stunde
Chloroform	eine Stunde
Paraffin (60 °C)	über Nacht

**Tabelle 2 :** Protokoll zur Einbettung der Gehirne in Paraffin

Nach der oben angeführten Prozedur wurden die Gehirne in Metallausgießformen gelegt und mit 60 °C warmem Paraffin luftblasenfrei eingegossen. Von den Gehirnen wurden an einem Schlittenmikrotom 10 µm dicke Schnitte angefertigt, zum Glätten in ein 40 °C warmes Wasserbad gelegt und auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen. Bei den Schnitten handelte es sich um Koronalschnitte zur Erfassung des *Tractus perforans* (-6,7 mm bis -7,3 mm posterior von Bregma) und der hippokampalen Region (-2,8 mm bis -4,3 mm posterior von Bregma). Es wurden jeweils 5 Schnitte auf einen Objektträger gebracht.

Zur Bestimmung der Zellschädigung im CA1-Band und in der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* wurden jeweils drei Objektträger mit Schnitten aus den Ebenen zwischen -3,3 mm und -4,5 mm posterior vom Bregma mit Säurefuchsin/Toluidinblau (Kapitel 2.8.1) angefärbt und ausgewertet. Die verbleibenden Schnitte wurden mit Toluidinblau angefärbt und für die genaue Lokalisation der Elektroden verwendet (Kapitel 2.8.2).

#### Protokoll zum Beschichten der Objektträger mit Gelatine:

- Chromalaun-Gelatine-Lösung: 1 g Gelatine in 200 ml Aqua dest. bei 75 °C lösen, 0,1 g Kaliumdichromat hinzugeben, gut vermischen, abkühlen lassen und filtrieren (Haltbarkeit: zwei Tage)
- Objektträger (geschliffen und geputzt) in Färbegestell für Objektträger einsortieren und 10 mal in Chromalaun-Gelatine-Lösung tauchen
- Objektträger im Wärmeschrank bei 60 °C für eine Stunde trocknen lassen und Vorgang wiederholen
- Nach vollständigem Trocknen der Objektträger bis zur Anwendung im Kühlschrank lagern

#### **2.7.2 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Kryostat) wurden 20 µm dicke Koronalschnitte angefertigt. Es wurden Schnitte vom lateralen Ventrikel aus den Ebenen +1,0 mm bis -0,4 mm von Bregma ausgehend und hippokampale Schnitte aus den Ebenen zwischen -3,14 mm und -4,52 mm von Bregma entfernt liegend verwendet. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C in einer Kryoprotektionslösung, welche aus 25 % Ethylenglycol und 25 % Glycerin in 0,1 M PBS-Puffer zusammengesetzt ist, in 1,5 ml Eppendorfgläsern gelagert.

### **2.7.3 Aufarbeitung der Akutschnitte**

Die 400 µm dicken, hippokampalen Schnitte, die während der *ex vivo*- Experimente (Kapitel 2.4) in der Schnittkammer waren, wurden in 4 % PFA/0,1 M PBS für zwei Stunden fixiert und anschließend in 30 % Saccharose überführt. Nach Absinken der Schnitte wurden am Gefriermikrotom 30 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und mit Toluidinblau (siehe Tabelle 5) angefärbt. Die Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop qualitativ hinsichtlich eines CA1-Schadens untersucht. Die neuronale Dichte wurde jedoch nicht quantifiziert, da der Hippokampus in den *ex vivo* Experimenten in einem Winkel von 70° zur Schnittkante geschnitten wurde und somit nicht mit den sonst üblichen Koronalschnitten verglichen werden konnte.

## **2.8 Histologische und immunhistochemische Färbungen**

### **2.8.1 Säurefuchsin/Toluidinblau-Färbung der Paraffinschnitte**

Die Paraffinschnitte für die Bestimmung des Zellschadens im CA1 Pyramiden-Zellband wurden mit Säurefuchsin und Toluidinblau gefärbt (Tabelle 3). Dazu wurden sie in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100 - 50 %) entparaffiniert, danach in einer Säurefuchsin- und einer Toluidinblaulösung gefärbt und nachfolgend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 - 100 %) sowie Xylol entwässert und fixiert. Die Eindeckelung erfolgte mit Histomount. Bei dieser Färbemethode werden geschädigte Neuronen intensiv rot gefärbt. Ungeschädigte Neuronen erscheinen blau, wobei der Kern gut sichtbar ist.

#### Herstellung der Färbelösungen:

Säurefuchsin: 1 g Fuchsin säure in 100 ml Aqua dest. lösen, ein Tropfen

konzentrierte Essigsäure und ein paar Körner Thymol hinzufügen

Toluidinblau: 1 g Toluidinblau in 100 ml Aqua dest. lösen und über Nacht reifen

lassen; am nächsten Tag 100 ml 96 % Ethanol hinzugeben

(= Stammlösung)

Gebrauchslösung: 2-5 ml der Stammlösung in 100 ml Aqua dest.

verdünnen (in dunkler Flasche bei RT aufbewahren)

<b>Lösung</b>	<b>Inkubationszeit</b>
Xylol I	10 min
Xylol II	10 min
Optal	5 min
Rotisol 100 %	5 min
Rotisol 90 %	5 min
Rotisol 70 %	5 min
Rotisol 50 %	5 min
Aqua dest.	5 min
Säurefuchsin	30 Sek.
Aqua dest.	spülen bis kräftig pink
Toluidinblau	1 min
Aqua dest.	10x schwenken
Rotisol 50 %	10x schwenken
Rotisol 70 %	10x schwenken
Rotisol 90 %	10x schwenken
Rotisol 100 %	10x schwenken
Optal	5 min
Xylol I	5 min
Xylol II	5 min

**Tabelle 3:** Protokoll Säurefuchsin/Toluidinblau-Färbung Paraffinschnitte

### 2.8.2 Toluidinblaufärbung nach Scheinimmunhistochemie von Gefrier-schnitten

Die quantitative Auswertung der Zellschädigung des CA1-Bandes erfolgte durch die Auszählung intakter Neurone auf 500  $\mu\text{m}$  des CA1-Bandes des dorsalen Hippokampus (-3,6 mm bis -4,3 mm von Bregma) nach einer Toluidinblau-Färbung. Die Auszählung der gesunden CA1-Neurone der Gefrierschnitte war schwierig, da die Morphologie nur schlecht erhalten war und keine eindeutige Unterscheidung zwischen toten und gesunden Neuronen möglich war. Eine Säurefuchsin-Toluidinblau-Färbung für die klare Darstellung von geschädigten und gesunden Neuronen ist jedoch an Gefrierschnitten nicht möglich. Aufgrund dessen unterzogen wir die Schnitte einer Vorbehandlung, die an immunhistochemisches Prozedere angelehnt war (so genannte Scheinimmunhistochemie) mit anschließender

Toluidinblau-Färbung. Die Scheinimmunhistochemie ist an das Protokoll der Immunzytochemie nach dem Prinzip der Avidin-Biotin-Methode (siehe Kapitel 3.6.6.) angelehnt und wurde in 24-well-Platten an frei schwimmenden (*free-floating*) Schnitten durchgeführt. Nach Aufbewahrung der Schnitte in der Kryoprotektionslösung (CPS) und Waschen in 0,1 M PBS wurden die endogenen Peroxidasen mit einer Lösung aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Methanol blockiert. Anschließend wurden die Schnitte mit serumhaltigen 0,1 M PBS und Lösungen des ABC-Kits für eine Stunde bei RT behandelt und abschließend mit 3,3-Diaminobenzidin (DAB) inkubiert. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet, mit Toluidinblau angefärbt (siehe Tabelle 4) und mit Histomount eingedeckelt.

Herstellung der Toluidinblaulösung:

1,37 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O + 1,29 g Zitronensäure + 100 ml Toluidinblau + 100 ml Aqua dest.

Lösung	Inkubationszeit
Aqua dest.	5 min
Toluidinblau	10 min
Aqua dest.	5 min
Rotisol 50 %	5 min
Rotisol 70 %	5 min (Sichtkontrolle)
Rotisol 90 %	5 min (Sichtkontrolle)
Rotisol 100 %	5 min (Sichtkontrolle)
Optal	5 min
Xylol I	5 min
Xylol II	5 min

**Tabelle 4:** Protokoll Toluidinblau-Färbung Gefrierschnitte

### 2.8.3 Immunhistochemie nach dem Prinzip der Avidin-Biotin-Methode

Für die Untersuchung der Proliferation nach einer Ischämie wurde vor der Charakterisierung der neugebildeten Zellen eine Übersichtsfärbung aller BrdU-positiven Zellen durchgeführt. Außerdem wurde die Verteilung von Astrozyten (GFAP-positiv) im Hippokampus untersucht. Dies erfolgte mittels der Avidin-Biotin-Methode mit anschließender DAB-Färbung.

Die Gefrierschnitte wurden nach Aufbewahrung in der CPS-Lösung mehrmals in 0,1 M PBS gewaschen. Um die endogene Peroxidaseaktivität zu unterdrücken, wurden die Schnitte für 30 min in einer Lösung aus  $H_2O_2$  und Methanol inkubiert. Damit bei der Anfärbung von BrdU-positiven Zellen anti-BrdU in ausreichendem Maß in den Zellkern und an die DNA gelangen kann, muss der Schnitt permeabilisiert und das Zytoskelett aufgelockert werden. Dies erfolgt durch eine Inkubation der Schnitte in 2 N HCl bei 37 °C.

Bei anderen Anfärbungen, z.B. von Astrozyten (GFAP), wird dieser Schritt übersprungen. Um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu verhindern wurde nach mehrmaligem Waschen eine Lösung von 10 % Normalserum in 0,1 M PBS/0,5 % TritonX für zwei Stunden aufgetragen. Dieses Normalserum lagert sich an die niederaffinen unspezifischen Bindungsstellen. Stellen im Gewebe an und verhindert somit eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers. Als Normalserum wurde Esel-Normalserum (engl. donkey normal serum, DNS) verwendet, da der später verwendete Sekundärantikörper aus dieser Spezies stammt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (in 0,1 M PBS/0,5 % TritonX und 1 % DNS gelöst). Im 2.Schritt wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper (in 0,1 M PBS gelöst) dazu gegeben, der einen Immunkomplex bildet. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und deren Verdünnungen sind in Tabelle 5 aufgeführt. An den Immunkomplex bindet ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Verdünnung 1:400 in PBS, Inkubation für eine Stunde), dessen freien Stellen an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet. Bei der Farbumsetzung wird DAB (10 mg DAB und 4  $\mu$ l  $H_2O_2$  in 20 ml PBS) enzymatisch zu einem schwerlöslichen, gelb/braunen Produkt umgesetzt. Das Ende der Entwicklungszeit wurde unter dem Mikroskop bestimmt und die Reaktion mit Waschen in 0,1 M PBS gestoppt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet, gegebenenfalls mit Toluidinblau angefärbt (siehe Tabelle 4) und mit Histomount eingedeckelt. Bei Kontrollversuchen wurde das Protokoll ohne ersten Antikörper durchgeführt.

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Ratte anti BrdU IgG 2a	1:250
Maus anti GFAP	1:500

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Esel anti Maus Biotin-SP	1:500
Esel anti Ratte Biotin-SP	1:5000

**Tabelle 5:** Übersicht über alle verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen

#### 2.8.4 Immunfluoreszenzmarkierung

Für die Detektion neu gebildeter Zellen (BrdU-positiv) und deren Markierung mit glialen (GFAP), mikroglialen (OX-42) und frühen neuronalen (Nestin, DCX) Markern nach Ischämie bzw. Scheinoperation wurden immunhistochemische Färbemethoden angewendet. Bei einer gleichzeitigen immunhistochemischen Anfärbung des Zellkern mit BrdU und des Zytoplasmas auf zellartspezifische Antigene mit einem anderen Farbton lässt sich auf einem Blick die Zellart und Proliferationsaktivität beurteilen und dokumentieren. Dieses Prinzip wird bei einer Doppel-Immunhistochemie genutzt.

Wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben, wurden die Gefrierschnitte in der Kryoprotektionslösung bei 4 °C gelagert. Die Schnitte wurden aus der Kryoprotektionslösung in 0,1 M PBS überführt und über Nacht gewaschen. Alle immunhistochemischen Färbungen wurden an frei schwimmenden Schnitten in 24-Well-Platten durchgeführt. Die Schnitte wurden für die Darstellung von BrdU-positiven Zellen mit 2 N HCl bei 37 °C für eine Stunde behandelt. Unspezifische Bindungen wurden blockiert, indem sie für zwei Stunden in den entsprechenden serumhaltigen Puffern inkubiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Primärantikörper wurden in 0,1 M PBS/0,5 % TritonX100 und 3 % DNS bzw. 1-10 % Ziegen-Normalserum (engl.: goat normal serum, GNS) verdünnt. Nach erneutem Waschen der Schnitte in 0,1 M PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur in Dunkelheit für 2h. Die Sekundärantikörper wurden in 0,1 M PBS verdünnt. Die Schnitte wurden erneut gewaschen und auf Objektträger aufgezogen. Anschließend erfolgten die Entwässerung in der

aufsteigenden Alkoholreihe und die Eindeckelung mit 1,3-diethyl-8-phenylxanthin (DPX). Die Aufbewahrung der Objektträger erfolgte abgedunkelt und bei 4 °C.

Für die Kombination zweier immunhistochemischer Färbungen wurden zwei Standardprotokolle verwendet: die sequenzielle Färbung (S) und die Färbung im Cocktail (C). Bei der Färbung im Cocktail wurden die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper kombiniert auf die Schnitte gegeben. Dieses Färbeprotokoll konnte aber nicht für alle Mehrfach-Färbungen, insbesondere nicht in Verbindung mit BrdU (z.B. OX-42/BrdU), angewendet werden, da insuffiziente oder falsch positive Färbungen entstanden. Die Ursache sehen wir in der HCl-Behandlung der Schnitte, die für die Färbung von BrdU notwendig ist. Dabei werden wahrscheinlich die Antigene für verschiedene Antikörper auf den Schnitten beschädigt und eine Färbung mit dem zweiten Erstantikörper dadurch nicht möglich. Für den Erhalt einer eindeutigen Färbung wurden die Schnitte sequenziell angefärbt. In diesem Protokoll wurden die Schnitte mit dem Primär- und Sekundärantikörper des ersten Antikörpers (z.B. OX-42) behandelt und anschließend mit 4 % PFA/0,1 M PBS fixiert. Danach wurden die Schnitte mit HCl behandelt und mit den Primär- und Sekundärantikörper für BrdU inkubiert. Die Anwendung der zwei verschiedenen Protokolle mit den entsprechenden Verdünnungen der Antikörper ist in Tabelle 6 zusammengefasst. Parallel zu den immunhistochemischen Färbungen wurden Kontrollfärbungen durchgeführt. Hierbei wurde das Standardprotokoll, mit Ausnahme der Applikation des Primärantikörpers, durchgeführt. In keiner der Kontrollfärbungen konnte eine spezifische Anfärbung festgestellt werden.

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Färbeprotokoll (S oder C)</b>
Kaninchen anti S-100β	1:500 und 1:1000	C
Maus anti βIII-Tubulin	1:750	C
Maus anti GFAP	1:250	C
Maus anti Nestin	1:200	C
Maus anti NeuN	1:750	S
Maus anti OX-42	1:50	S
polyklonal Huhn anti GFAP	1:100	C
polyklonal Kaninchen anti Mensch + Maus Caspase 3 aktiv A	1:1000	S
polyklonal Ziege anti DCX	1:300	S und C
Ratte anti BrdU IgG 2a	1:100	S und C

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Färbeprotokoll (S oder C)</b>
Esel anti Huhn Cy2	1:100	C
Esel anti Ratte Cy2	1:500	S und C
Esel anti Maus Cy3	1:500	S und C
Esel anti Ziege Cy3	1:500	S und C
Ziege anti Kaninchen Cy3	1:500	C
Ziege anti Maus Cy3	1:500	C
Ziege anti Kaninchen Alexa Fluor 568	1:250	S

**Tabelle 6:** Übersicht über alle verwendeten Antikörper, deren Verdünnung und Färbeprotokoll (sequenzielle Färbung, S; Färbung mit Cocktail, C)

## 2.8.5 Aufarbeitung und Färbung der Gefrierschnitte für den autometallographischen Nachweis von Thallium

### Schneiden und Nachfixierung:

An einem Gefriermikrotom (Leica, Microm) wurden von dem Gehirn 25 µm dicke Koronalschnitte (-3,14 mm und -4,52 mm vom Bregma) angefertigt (Kammer und Objekttemperatur -25 °C) und in PBS überführt. Innerhalb von 30 min mussten die Schnitte auf Objektträger aufgezogen werden, da sonst das Thallium aus den Schnitten diffundiert (in 10 mM PBS). Anschließend wurden die Schnitte luftgetrocknet. Für die Bestimmung des Zellschadens im CA1-Band wurde jeder 10. Hippokampuschnitt in der Kryoprotektionslösung bei 4 °C aufbewahrt. Die getrockneten Schnitte wurden für 10 min in einer Glutaraldehydlösung nachfixiert und anschließend 2 x 5 min in 0,01 M PBS rehydriert.

### Kontrolliertes Auswaschen von überschüssigem Thallium mit NaDEDTC:

Die Eigenschaft von Natrium Diethyldithiocarbamat trihydrat (NaDEDTC) Thallium zu chelatisieren wurde ausgenutzt, um langsam und kontrolliert Thalliumsulfid (Tl<sub>2</sub>S) wieder aus den Schnitten auszuwaschen.

DEDTC zersetzt sich in Wasser, wobei Schwefelkohlenstoff freigesetzt wird. Schwefelkohlenstoff reagiert mit dem Gewebe und erzeugt eine unspezifische Hintergrundfärbung bei der Versilberung. Man kann daher mit dieser Lösung nicht zu lange auswaschen (max. 60 min) und muss sie vor Beginn des Auswaschens frisch ansetzen (ca. 15 min vorher, damit sich das DEDTC gut löst). Bevor das Plastikgefäß mit dem DEDTC geöffnet wird, muss es sich auf RT erwärmt haben, damit sich kein Kondenswasser an der Substanz niederschlägt.

Die Objektträger mit den Schnitten wurden für 5 und 10 min in einer frisch angesetzten und vollständig gelösten 0,1 % DEDTC-Lösung (500 ml H<sub>2</sub>O + 0,5 g DEDTC) gestellt. Die verwendeten Zeiten sind Erfahrungswerte und wurden in Vorversuchen ermittelt. Anschließend wurden die Schnitte 20 min in Aqua dest. gewaschen.

### Auswaschen von Zinksulfid:

Das bei er Sulfidperfusion entstehende Zinksulfid kann mit Hilfe von HCl aus den Schnitten entfernt werden (Danscher, 1996; Stoltenberg und Danscher, 2000). Thalliumsulfid löst sich in HCl nicht, sondern bildet Mischkristalle aus Tl<sub>2</sub>S und noch schwerer löslichem Thalliumchlorid (TlCl) (Holleman, 1995). Die auf den Objektträgern befindlichen Schnitte

wurden für 30 min in 0,1 N HCl gestellt, anschließend für 15 min in Aqua dest. gewaschen und vor der folgenden physikalischen Entwicklung luftgetrocknet.

In jeder Färbung wurden Kontrollschnitte mitgeführt. Zum einen wurden Schnitte nicht mit DEDTC behandelt und wurden direkt mit HCl behandelt. Hierbei wurde das überschüssige Thallium nicht herausgewaschen, aber durch die Inkubation in HCl das Zinksulfid. Zum anderen wurden Schnitte weder mit DEDTC noch mit HCl behandelt. Diese Schnitte wurden für 15 min in Aqua dest. gewaschen und dann getrocknet. In diesen Schnitten wurde sowohl kein Thallium als auch kein Zinksulfid ausgewaschen.

#### Physikalische Entwicklung (Färbung):

Die Entwicklung wurde durchgeführt, wie von Danscher (1981) nach einem modifizierten Protokoll von Timm (1958a, b) eingeführt.

Die Gummi arabicum-Lösung wurde so angesetzt, dass zu einer bestimmten Menge Gummi arabicum die doppelte Menge H<sub>2</sub>O gegeben wurde (1 kg Gummi arabicum / 2 l Wasser). Die Lösung durfte zu keinem Zeitpunkt mit Metallen in Kontakt kommen und wurde fünf Tage sehr langsam gerührt. Danach ließ man sie für einige Stunden stehen, damit grobe Partikel absinken konnten. Dann goss man je 240 ml der Lösung in einen Kunststoff-Behälter. Die Lösung konnte gefroren unbegrenzt gelagert werden. Da die Reaktion auch temperaturabhängig war, musste das Gummi arabicum nicht nur aufgetaut sein, sondern auch RT erreicht haben. Der fertige Entwickler enthielt eine kolloidale Lösung (Gummi arabicum) mit Hydrochinon als Reduktionsmittel, Zitratpuffer zum Ansäuern der Lösung und eine Silbernitratlösung als Silberquelle für die Färbung. Die Entwicklerlösung wurde wie folgt hergestellt:

#### *Entwicklerlösung (410 ml für zwei Küvetten):*

1. 250 ml Gummi arabicum-Lösung wurden in einen 1l-Erlmeyerkolben gegeben.
2. 10 g Zitronensäure-Monohydrat wurden in 25 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Nach vollständigem Lösen der Zitronensäure wurden 9,7 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat hinzu gegeben. Wenn sich dieses gelöst hatte, wurde die Lösung im Messzylinder auf 40 ml aufgefüllt und zu der Gummi arabicum-Lösung gegeben.
3. 3,4 g Hydrochinon wurden in 60 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Dann wurde die Lösung zu der Gummi arabicum-Lösung gegeben.
4. 0,42 g Silbernitrat wurden in 60 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Diese Lösung wurde zu der Gummi arabicum/Zitratpuffer/Hydrochinon-Lösung gegeben und das Ganze 5 min verrührt.

Es musste darauf geachtet werden, dass nicht mit zu hoher Geschwindigkeit gerührt wurde, damit sich nicht zu viele Luftblasen in der Lösung ansammelten. Es sollte aber insbesondere nach Zugabe des Silbernitrats auch nicht zu langsam gerührt werden, da eine gleichmäßige Verteilung des Silbernitrats wichtig war. Vor der Zugabe der Silbernitrat-Lösung wurde der Erlmeyer-Kolben mit Alufolie umwickelt, um die Lösung vor Lichteinfall zu schützen. Die fertige, silberhaltige Lösung ist lichtempfindlich, so dass die Entwicklung in lichtundurchlässigen Kunststoff-Küvetten erfolgte. Die Silbernitrat-Lösung wurde erst hinzugegeben, wenn die Objektträger mit den getrockneten Schnitten in den Färbeküvetten standen und somit alle Vorbereitungen für die Färbung getroffen waren. Nach 150 min wurde die physikalische Entwicklung abgebrochen und die Schnitte für 15 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Die Schnitte konnten über Nacht in Aqua dest. aufbewahrt werden. Anschließend wurden die Schnitte entwässert (aufsteigende Alkoholreihe, Xylol) und mit Histomount eingedeckelt. Die Auswertung der Schnitte erfolgte an einem Leica DMR Mikroskop.

Für die Bestimmung des qualitativen Schadens der CA1-Neurone wurden hippokampale Schnitte nach einer Scheinimmunhistochemie mit anschließender Toluidinblaufärbung (siehe Kapitel 3.6.3.2) angefertigt.

## **2.9 Histologische Auswertung**

### **2.9.1 Bestimmung des Zellschadens in der hippokampalen Formation nach globaler zerebraler Ischämie**

Bei der quantitativen Bestimmung morphologisch gesunder Neurone in der CA1-Pyramidenzellschicht der hippokampalen Formation wurden runde, blau gefärbte Neurone mit einem deutlichen Nukleolus an je drei Schnitten des dorsalen Hippokampus (-3,6 mm bis -4,3 mm posterior von Bregma) ausgezählt. Pro Schnitt und pro Hemisphäre wurden 3 x 500 µm der CA1-Region ausgezählt und das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM ermittelt. Für die Auszählung der Neurone wurden die Gefrierschnitte nach einer Scheinimmunhistochemie mit anschließender Toluidinblau-Färbung (siehe Kapitel 3.6.3.2) und die Paraffinschnitte nach der Säurefuchsin/Toluidinblau-Färbung (siehe Kapitel 3.6.3.1) verwendet.

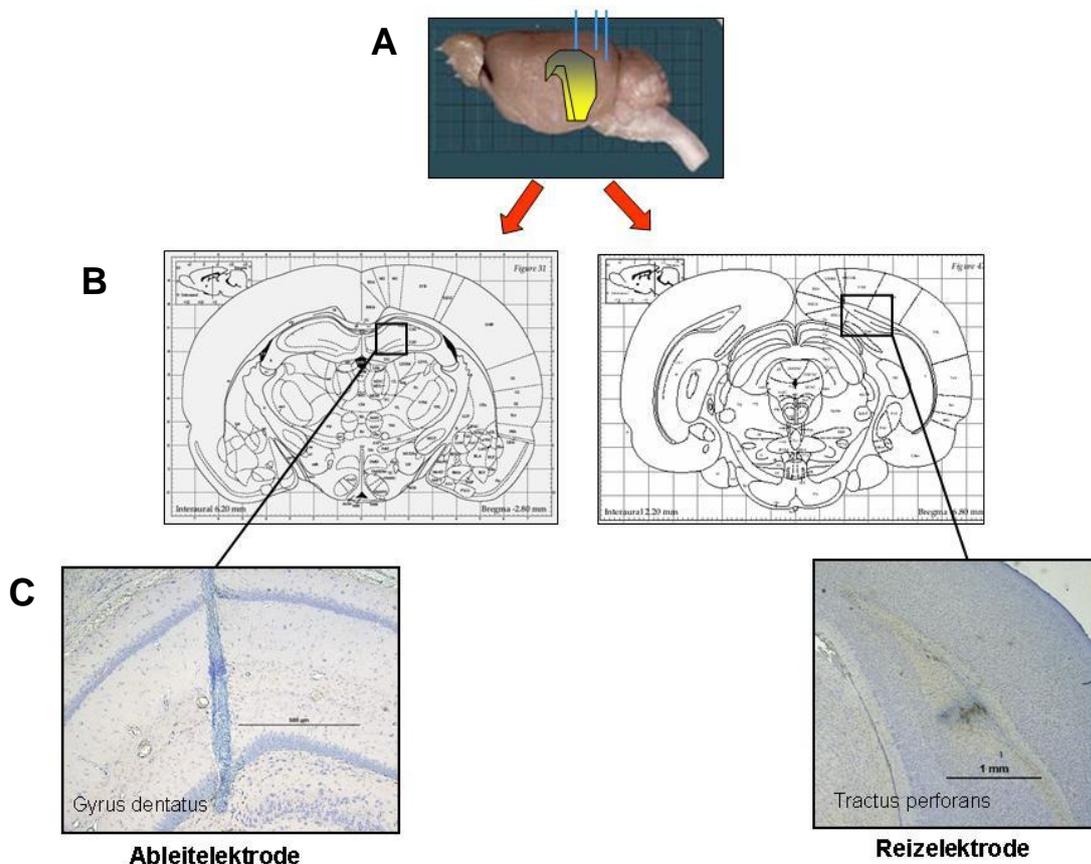
In der Versuchsreihe der elektrophysiologischen Messungen *in vivo* wurden zusätzlich die Anzahl intakter Neurone der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* auf 250 µm bestimmt. Es wurden 4 x 250 µm (2 x oberes Blatt, 2 x unteres Blatt des *Gyrus dentatus*) in jeder

Hemisphäre von zwei Schnitte pro Tier gezählt. Aus der Neuronenanzahl der linken und rechten Hemisphäre wurde das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM gebildet.

Das Auszählen der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops und eines Zählkulares bei einer 20fachen Vergrößerung.

### 2.9.2 Lokalisation der Elektroden im Gehirn

Für die Lokalisation der Elektroden aus der Versuchsreihe der electrophysiologischen Messungen *in vivo* wurden die Paraffinschnitte mit Toluidinblau (siehe Tabelle 3, ohne Säurefuchsin) angefärbt und am Lichtmikroskop hinsichtlich der genauen Lokalisation der Elektroden ausgewertet. Beispiele für die Lokalisation der Reiz- und Ableitelektroden sind in Abb. 12 dargestellt. Bei falscher Position der Elektroden wurde das entsprechende Tier aus der Auswertung herausgenommen.

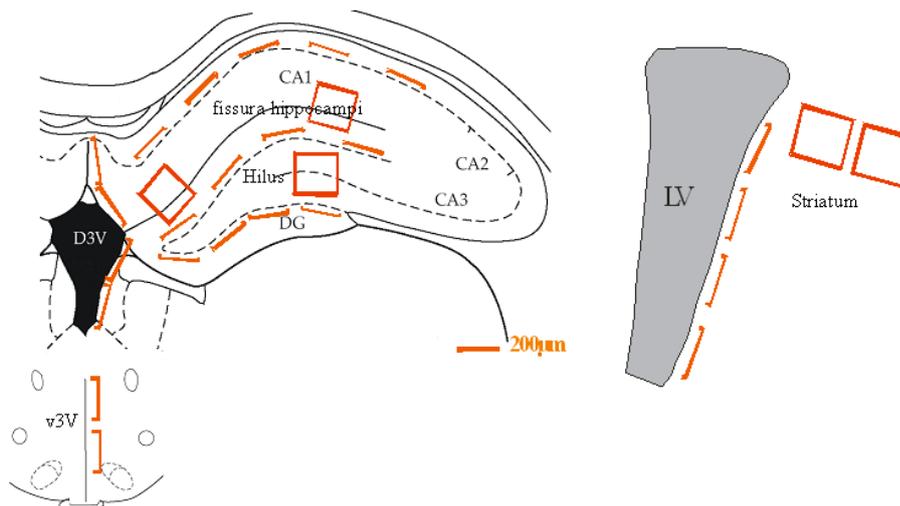


**Abb. 12:** Lokalisation der Reiz- und Ableitelektroden im präparierten Gehirn (A), nach dem Atlas von Paxinos und Watson (B) und im histologischen Bild (C)

### 2.9.3 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung

Für die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen wurden je drei hippocampale (-3,6 mm bis -4,3 mm von Bregma) und striatale Schnitte (+1,0 mm bis +0,2 mm von Bregma) pro Tier verwendet. Dabei wurden in verschiedenen Strukturen des Gehirnes die immunhistochemischen Signale an einem Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop in einer konfokalen Ebene mit einer 40fachen Vergrößerung blind ausgewertet. Das Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskop war mit einem Argon-Laser (Emission: 488 nm) und einem Helium/Neon-Laser (Emission: 543 nm) ausgestattet und Doppelmarkierungen wurden mit Hilfe von Z-Stacks überprüft. Hierzu wurden einzelne Zellen mit einer optischen Dicke von 1 µm gescannt. Die Anzahl der Z-Stack-Schnitte kann zwischen 15 und 17 Ebenen pro Zelle betragen. Die Pinholeöffnung wurde auf die willkürliche Einheit 1 gesetzt und für jeden Kanal so justiert, dass ein optischer Schnitt von 1,9 µm gegeben war. Durch die Verwendung der Paletten-Funktion der Pascal 5 Software konnte die optimale Einstellung der Helligkeit und des Kontrastes jeder Aufnahme gewährleistet werden.

Die verschiedenen Strukturen die ausgewertet wurden sind in Abb. 13 dargestellt. Die Anzahl der markierten Zellen im CA1-Band des dorsalen Hippokampus wurde durch Auszählung von 5 x 200µm in jeder Hemisphäre bestimmt. In der Körnerzellschicht des oberen und unteren Blattes des *Gyrus dentatus* wurden 4 x 200 µm gezählt. Markierte Zellen wurden entlang von 2 x 200 µm Abschnitten an den Ventrikelwänden gezählt, in einem Areal das 60 µm in das striatale Parenchym hineinreichte. In der *Fissura hippocampi*, Hilus und Striatum wurden die markierten Zellen auf einer Fläche von 200 µm x 200 µm bestimmt. Zwischen der rechten und linken Hemisphäre konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, so dass die Daten als arithmetische Mittel und SEM von allen Zählungen, von beiden Hemisphären von allen Tieren einer Gruppe pro Auszählungsgebiet angeben wurden.



**Abb. 13:**  
Auswertschema für die immunhistochemischen Färbungen.  
Abkürzungen der ausgewerteten Regionen:  
d3V-dorsaler 3.Ventrikel, v3V-ventraler 3.Ventrikel;  
DG-Gyrus dentatus,  
LV-lateraler Ventrikel

## 2.10 Statistische Auswertung

Alle Daten sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben (siehe Kapitel 3.6.4). Für die statistische Absicherung der Daten kamen folgende Tests zur Anwendung:

a) ANOVA, beim Vergleich elektrophysiologischen Daten zu den verschiedenen Zeitpunkten (I/O Kurve an den verschiedenen Tagen).

b) Mann-Whitney-*U*-Test, beim Vergleich unabhängiger Stichproben; z.B. verschiedenartiger Gruppen (Ischämie/Scheinoperation) hinsichtlich der Zellschädigung und Daten aus der Immunhistochemie.

Die Irrtumswahrscheinlichkeiten sind folgendermaßen dargestellt:

Irrtumswahrscheinlichkeit p:	< 0,05	< 0,01	<0,001	
Symbol:	*	**	***	zwischen zwei verschiedenen Gruppen
	•	••	•••	innerhalb einer Gruppe, z.B. zwischen oberem und unterem Blatt des <i>Gyrus dentatus</i>

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Elektrophysiologische Messungen an der freibeweglichen Ratte nach globaler zerebraler Ischämie

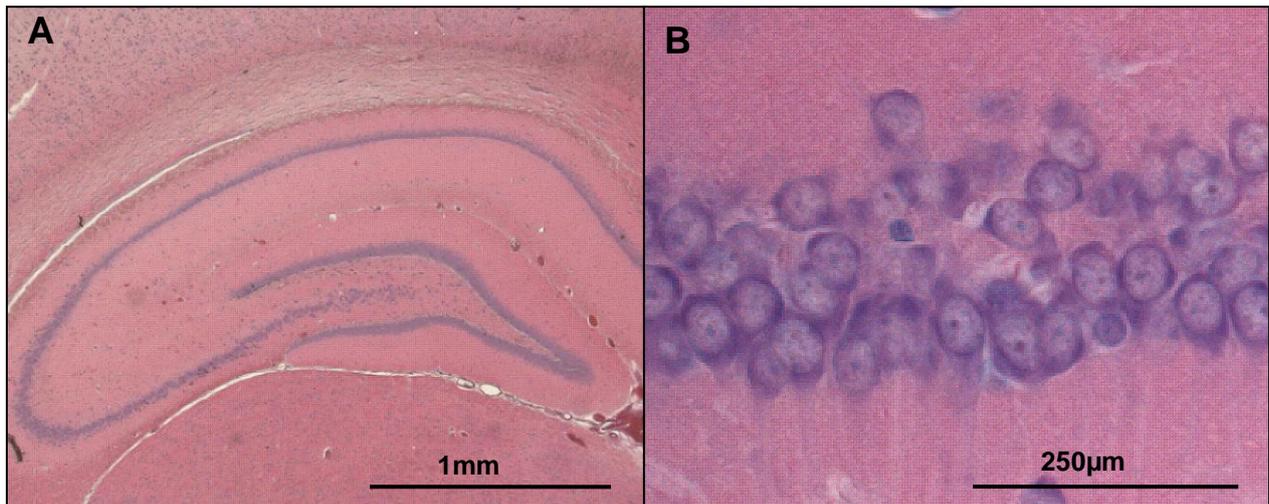
##### 3.1.1 Histologische Auswertung

##### Evaluation des neuronalen Schadens im CA1-Band und im *Gyrus dentatus* der hippocampalen Formation 11 Tage nach globaler Ischämie

Nach den elektrophysiologischen Messungen *in vivo* wurden die Tiere 11 Tage nach Ischämie bzw. Scheinoperation dekapitiert, die Gehirne histologisch aufgearbeitet (Säurefuchsin/Toluidinblau-Färbung) und ausgewertet.

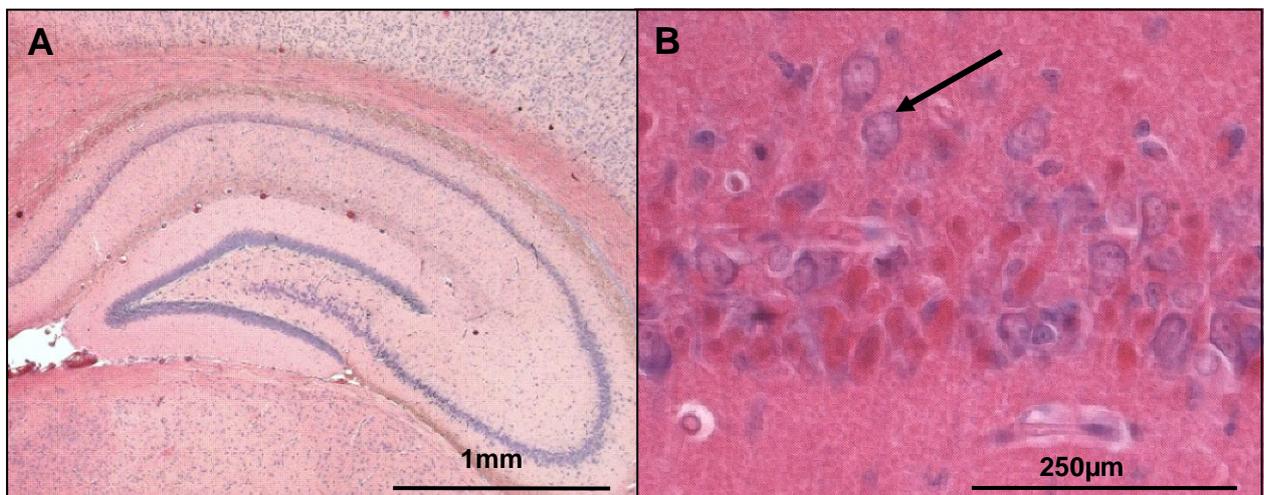
Die Auswertung der Schnittpräparate zeigte, dass nach 10minütigem Abklemmen der beiden Karotisarterien mit gleichzeitiger Reduzierung des Blutdruckes ein massiver Verlust der Pyramidenzellen in der CA1-Region der hippocampalen Formation hervorgerufen wurde. Im histologischen Bild wurden Neurone mit gut sichtbaren, blau gefärbten, runden Nuklei als intakt bewertet (Abb. 14A, B). Im geschädigten Gebiet waren neben einigen überlebenden Pyramidenzellen und Zelltrümmern auch deformierte, geschrumpfte, intensiv rot gefärbte Zellkörper zu finden (Abb. 15A, B).

Die Auswertung histologisch aufgearbeiteter Hippokampusschnitte scheinoperierter Ratten ergab  $116,8 \pm 12,25$  Pyramidenzellen pro  $500 \mu\text{m}$  im CA1-Band ( $n=12$ ). Bei diesen Hippokampusschnitten konnten keine dunkelrot gefärbten Neurone im CA1-Band festgestellt werden, so dass es keine Hinweise auf beschädigte oder abgebaute Pyramidenzellen gab.



**Abb. 14:** Darstellung der hippokampalen Formation (A) und deren Pyramidenzellen in der CA1-Region (B) mit der Säurefuchsin/Toluidinblau-Färbung nach einer Scheinoperation. In (B) sind die gesunden Pyramidenzellen mit gut sichtbaren, blau gefärbten, runden Nuklei erkennbar.

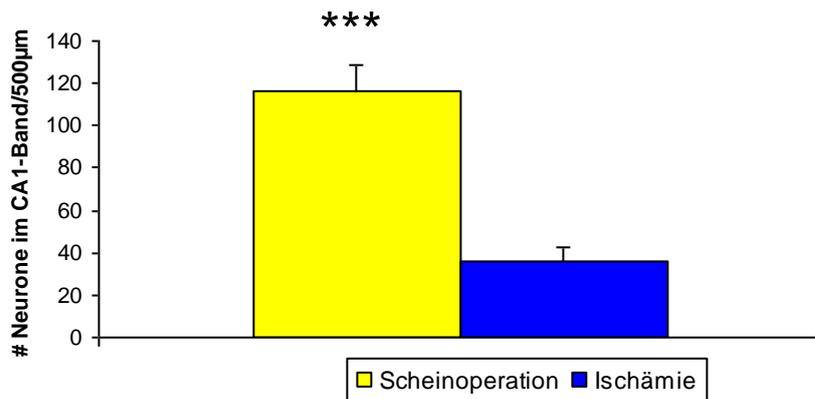
In der Literatur (z.B. Kirino und Sano, 1984) ist nach globaler zerebraler Ischämie ein verzögerter Zelltod im CA1-Band beschrieben. An den ersten Tagen stirbt nur eine geringe Anzahl von Pyramidenzellen ab, nach ca. sieben Tagen kann das Maximum an Degeneration im CA1 Band festgestellt werden. In den Hippokampuschnitten dieser Serie wurden 10 Tage nach globaler Ischämie  $36,3 \pm 5,9$  Pyramidenzellen pro  $500 \mu\text{m}$  im CA1-Band ( $n=20$ ) gezählt. Der Unterschied zwischen Tieren nach Ischämie und Scheinoperation war signifikant ( $p < 0,001$ ; Mann-Whitney-*U*-Test; siehe Abb. 16A).



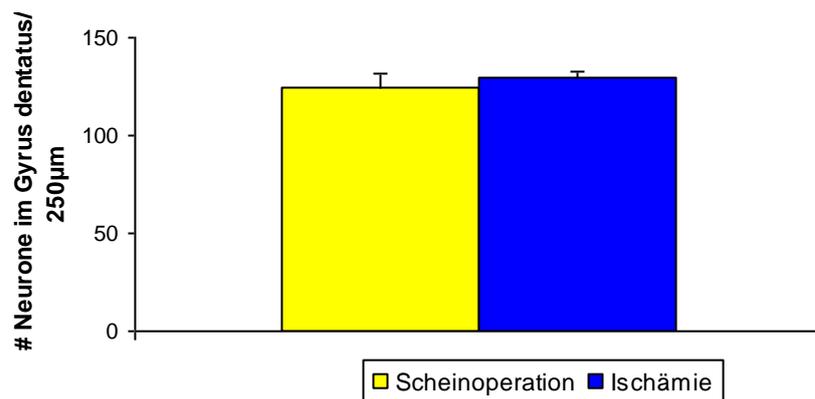
**Abb. 15:** Darstellung der hippokampalen Formation (A) und deren Pyramidenzellen in der CA1-Region (B) mit der Säurefuchsin/Toluidinblau-Färbung 10 Tage nach einer Ischämie. In (B) waren neben einigen überlebenden Pyramidenzellen (Pfeil) und Zelltrümmern auch deformierte, geschrumpfte, intensive rot gefärbte Zellkörper zu finden.

Im *Gyrus dentatus* wurden nach einer Säurefuchsin/Toluidinblau-Färbung keine deformierten oder dunkelrote Neurone in der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* gefunden und kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Neuronen zwischen scheinoperierten und ischämischen Tieren festgestellt (Scheinoperation:  $124,25 \pm 7,23$  Neurone/250  $\mu\text{m}$ ; Ischämie:  $129,34 \pm 3,44$  Neurone/250  $\mu\text{m}$ ;  $n=7-12$ ; Mann-Whitney-*U*-Test; Abb. 16B).

**A** Anzahl der Pyramidenzellen im CA1-Band 10d nach Ischämie und Scheinoperation



**B** Anzahl der Granularzellen im *Gyrus dentatus* 10d nach Ischämie und Scheinoperation



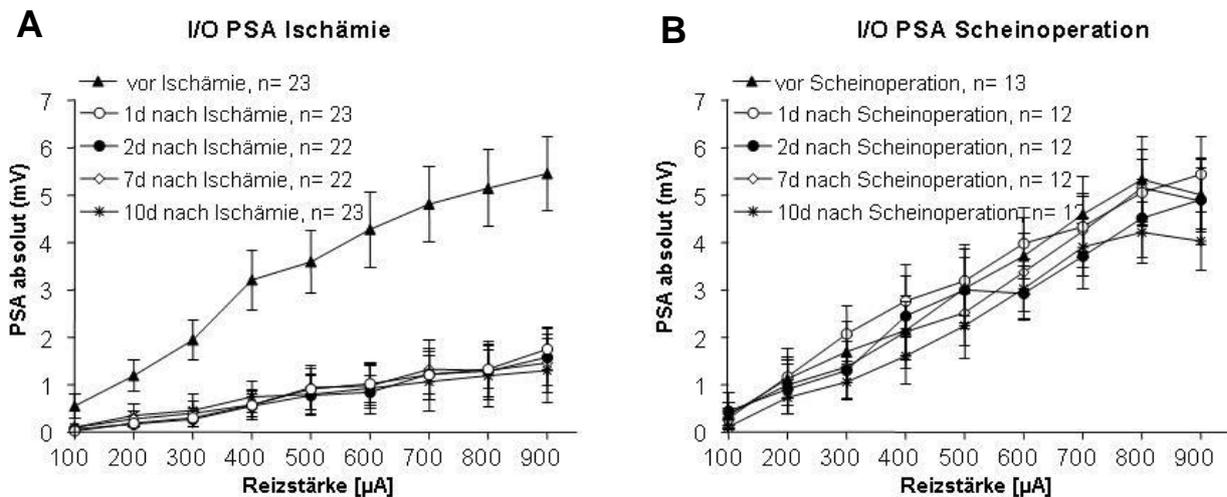
**Abb. 16:** Graphische Darstellung des morphologischen Schadens in der CA1-Region (A) der hippocampalen Formation und im *Gyrus dentatus* (B) 11 Tage nach Ischämie bzw. Scheinoperation. Die Anzahl der überlebenden Neurone im CA1-Band war in der Gruppe der ischämischen Tiere signifikant niedriger als in den scheinoperierten Tieren ( $n=12-20$ ;  $p<0,001$ , Mann-Whitney-*U*-Test). Im *Gyrus dentatus* hingegen war keine signifikante Abnahme der Neurone nach der Ischämie feststellbar.

### 3.1.2 Messungen der Input/Output-Kurve und Basislinie

#### 3.1.2.1 Veränderungen der Populationspikeamplitude

Die elektrophysiologischen Messung *in vivo* an der freibeweglichen Ratte erfolgten durch bipolare Reizung des *Tractus perforans* und Ableitung von fEPSP slope und PSA in der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus*.

Nach globaler Ischämie wurde eine schnelle und sehr stark ausgeprägte Abnahme der PSA in der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* festgestellt (Abb. 17A). Schon am Tag eins nach Abklemmen der Karotisarterien wurde im Vergleich zu dem vor-ischämischen Wert eine signifikante Abnahme der PSA bei der Aufnahme einer Basislinie und I/O-Kurve festgestellt. Die signifikante Abnahme der PSA nach der Ischämie blieb im Vergleich zu der PSA vor Ischämie bei allen Reizstärken während der I/O-Kurve erhalten ( $p < 0,001$ ; ANOVA). Bei der maximalen Stimulation mit 900  $\mu\text{A}$  konnte nach Ischämie nur eine 32 % PSA im Vergleich zu dem Wert vor der Ischämie erreicht werden. Bis zum Tag 10 nach Ischämie konnte keine Erholung der PSA in der I/O-Kurve (Abb. 17A) bzw. in der Basislinie festgestellt werden. Aufgrund des zum Teil totalen Verlustes der PSA nach der Ischämie wurden die Messdaten nicht prozentual angegeben, sondern in absoluten Werten.

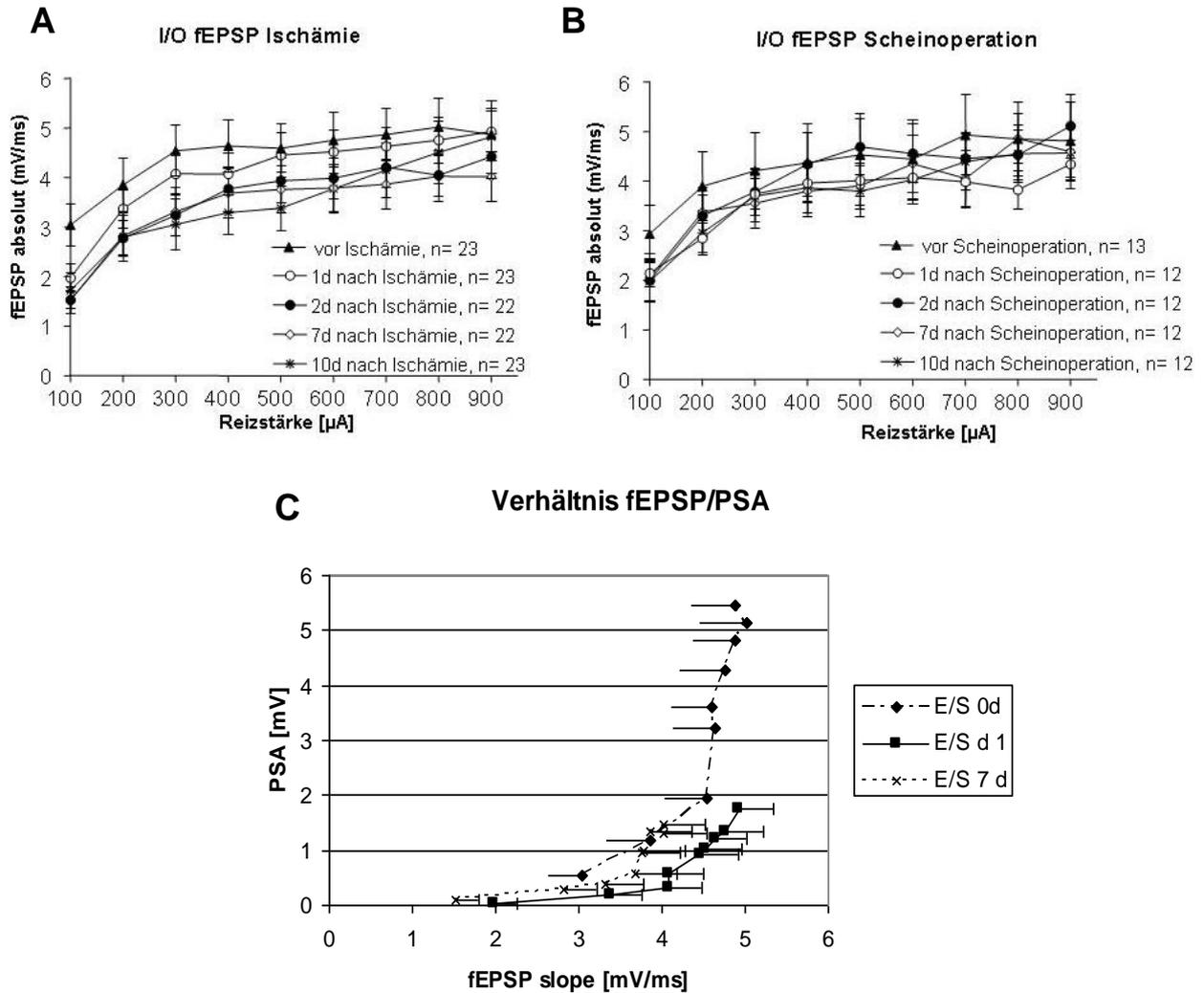


**Abb. 17:** In den Graphen wird die Entwicklung der PSA in der I/O-Kurve vor und bis zu 10 Tage nach Ischämie (A) und Scheinoperation (B) dargestellt. Hierbei sind die dramatische Abnahme der PSA nach Ischämie und die unveränderte PSA nach Scheinoperation sehr deutlich sichtbar.

Bei der Aufnahme einer I/O-Kurve und Basislinie nach einer Scheinoperation wurde kein signifikanter Unterschied der PSA zu den Werten vor der Scheinoperation festgestellt (Abb. 17B). Die PSA der I/O-Kurve der scheinoperierten Tiere war an allen Tagen und bei jeder Reizstärke höher als die PSA der ischämischen Tiere (ab 300  $\mu$ A signifikant, Mann-Whitney-*U*-Test).

### 3.1.2.2 Veränderungen des fEPSP slope

Im Gegensatz zu der signifikanten Abnahme der PSA nach der Ischämie wurde keine signifikante Abnahme des fEPSP slope bei der Aufnahme einer Basislinie oder I/O-Kurve (Abb. 18 A) festgestellt. Die Werte der I/O-Kurve zwischen der ischämischen und scheinoperierten Gruppe waren zu keinem Zeitpunkt (1, 2, 7 und 10 Tage; ANOVA mit wiederholten Messungen, gefolgt vom Turkey's Test) und bei keiner Reizstärke signifikant unterschiedlich. In der ischämischen als auch in der scheinoperierten Gruppe erhielt man bei der schwächsten Reizstärke (100  $\mu$ A) nach der jeweiligen Operation die niedrigeren Antworten als vor der Operation. Da dies in beiden Gruppen der Fall war scheint dieser Effekt nicht allein durch die Ischämie bedingt zu sein (Abb. 18 A, B). Nach Auftragen der PSA gegen die fEPSP slope (E-S-Kurve), wurde eine massive Abnahme des maximalen PS-Wertes und außerdem eine starke Verschiebung der E-S-Kurve nach rechts deutlich (Abb.18 C). Dieser Effekt war transient und am Tag sieben nach der Ischämie zeigte diese Kurve eine partielle Überlappung mit der Kurve, die einen Tag vor Ischämie aufgenommen wurde.



**Abb.18:** In den Graphen wird die Entwicklung der fEPSP slope in der I/O-Kurve vor und bis zu 10 Tage nach Ischämie (A) und Scheinoperation (B) dargestellt. In der ischämischen als auch in der scheinoperierten Gruppe erhielt man bei der schwächsten Reizstärke (100  $\mu\text{A}$ ) nach der jeweiligen Operation niedrigere Antworten als vor dem Eingriff. Dadurch ist die Reduktion der fEPSP slope in der ischämischen Gruppe wahrscheinlich nicht auf den Insult zurückzuführen. In (C) wurden die Werte der PSA gegen die fEPSP slope aufgetragen (E-S-Kurve). Die Verschiebung der Kurve nach rechts am Tag eins deutet auf eine Abnahme der Erregbarkeit hin.

### 3.1.3 Induktion einer Langzeitpotenzierung

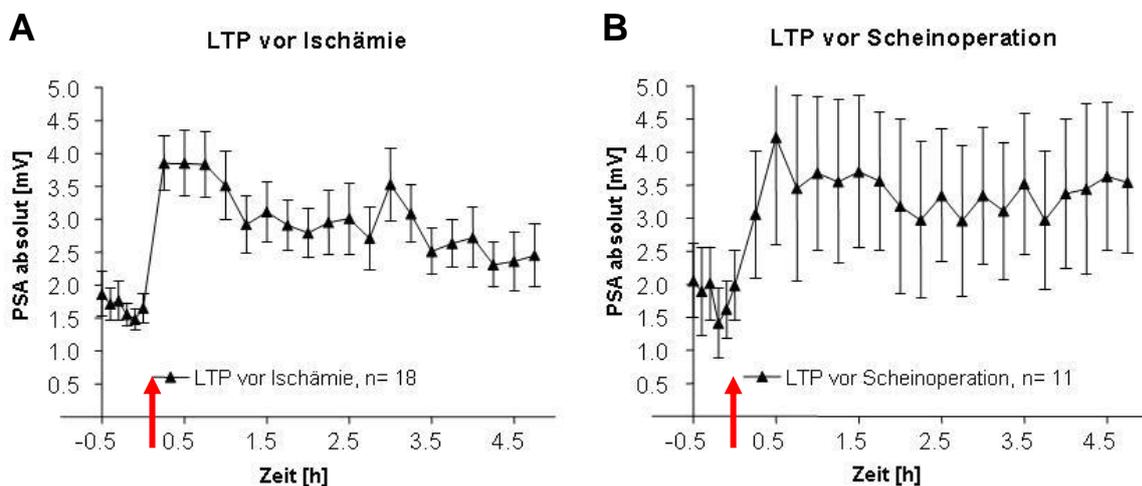
In diesem Teil der elektrophysiologischen Messungen *in vivo* wurde eine hoch frequente Stimulation verwendet, die eine Potenzierung der Neurone der Körnerzellschicht über einen Zeitraum von ca. acht Stunden induzierte (Langzeitpotenzierung, LTP). Es wurde einen Tag vor Ischämie eine LTP induziert, um eine Art „Basislinie-LTP“ zu erzeugen. Damit sollten die Signale nach der Ischämie verglichen werden und außerdem wurden dadurch Tiere, die sich vor den operativen Eingriffen nicht potenzieren ließen aus der Gruppe entfernt. Die

verwendeten Stimulationsparameter für diese Form der LTP wurden aus folgenden Gründen verwendet:

- 1.) Da die Tiere vor und nach Ischämie tetanisiert werden sollten, musste eine schwache LTP erzeugt werden, die nur für ca. acht Stunden und nicht über Tage anhält. Messungen 24 Stunden nach der Stimulation vor der Ischämie zeigten, dass die PSA nach der induzierten Potenzierung wieder die Höhe der Basislinie zurückgegangen war.
- 2.) Da der Einfluss einer Potenzierung auf die Neurodegeneration nicht klar ist, wurde die LTP schwach induziert, damit die Ischämie nicht bei Neuronen im potenzierten Zustand durchgeführt wird.

### 3.1.3.1 Langzeitpotenzierung vor der Ischämie und 10 Tage nach der Ischämie

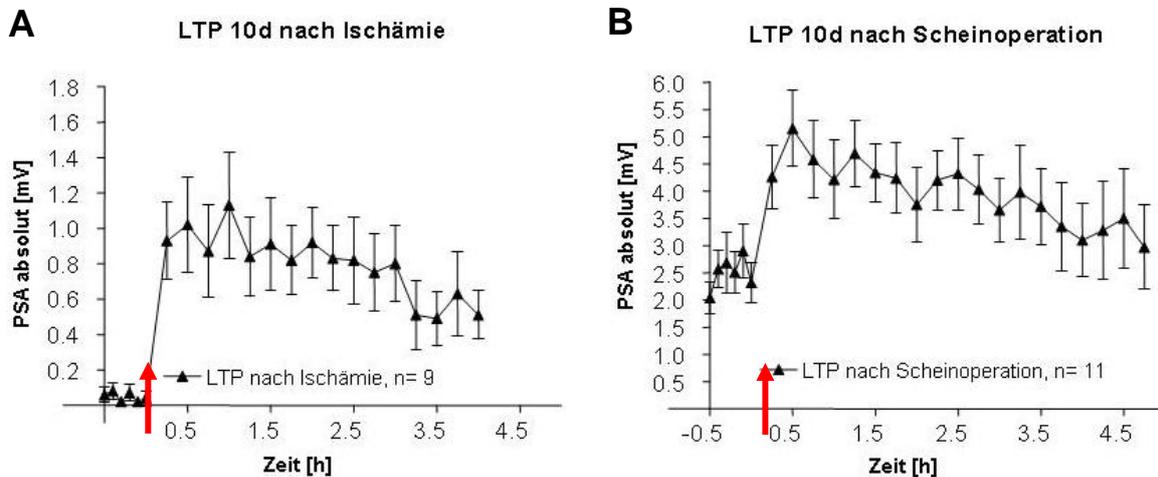
In Abb. 19A, B werden die LTP Werte der Ratten vor Ischämie bzw. Scheinoperation angezeigt. Die beiden Gruppen zeigten einen Potenzierungsverlauf, der nicht signifikant unterschiedlich war. Einen Tag nach Stimulation hatten die PSA wieder die Basislinienwerte zurück erlangt.



**Abb.19:** Die Graphen zeigen die PSA vor und bis zu 5 h nach Stimulation (roter Pfeil) einen Tag vor dem ischämischen Insult (A) oder der Scheinoperation (B). Dabei ist kein Unterschied zwischen den Gruppen sichtbar.

In Abb. 20 werden die LTP Werte der Ratten 10 Tage nach der Ischämie bzw. Scheinoperation angezeigt. Wie in Kapitel 3.1.2.1 beschrieben wurde eine Abnahme bzw. ein Verlust der PSA nach Ischämie in der Basislinie und in der I/O-Kurve festgestellt. Trotz der starken Reduzierung der PSA war es am Tag 10 nach der Ischämie möglich eine LTP zu induzieren (Abb. 20A). Diese LTP konnte auch über mehrere Stunden aufrechterhalten werden. Jedoch war der absolute Wert der PSA signifikant niedriger als in der

scheinoperierten Gruppe (Abb. 20B) und vor dem Abklemmen der beiden Karotisarterien. Der Mittelwert der Werte der Basislinie betrug 10 Tage nach der Ischämie nur  $20,5 \pm 1,7$  % vom vor-ischämischen Wert (vor der Ischämie  $1,67 \pm 0,06$  mV gegenüber  $0,34 \pm 0,02$  mV nach der Ischämie;  $n=6$  Basislinienwerte) und die maximale Potenzierung betrug nur 38 % vom entsprechendem vor ischämischen Wert [vor der Ischämie  $3,85 \pm 0,42$  mV (Abb. 19A) gegenüber  $1,43 \pm 0,36$  mV nach der Ischämie (Abb. 20B);  $n= 18-22$  Tiere].

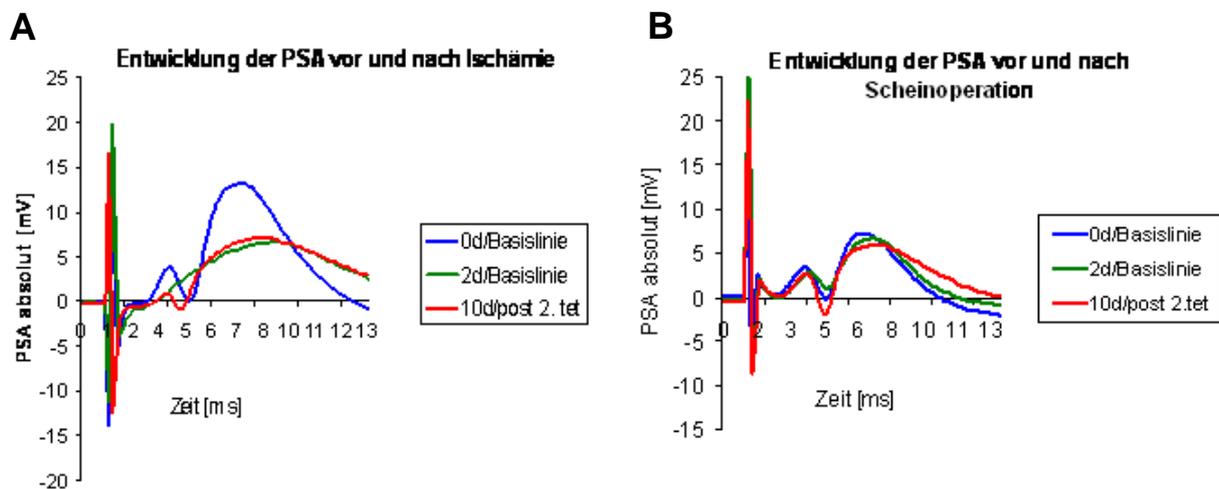


**Abb.20:** Die Graphen zeigen die PSA vor und bis zu 4h nach Stimulation (roter Pfeil) in Tieren, die 10 Tage zuvor einem ischämischen Insult (A) oder Scheinoperation (B) ausgesetzt waren. Vor der Induktion einer LTP zeigten die Tiere 10 Tage nach der Ischämie nahezu keine PSA auf (auch nach starker Reizstärke in I/O-Kurve, siehe Abb. 17A). Nach Stimulation wurde eine signifikante Zunahme der PSA festgestellt, die jedoch nicht die Werte einen Tag vor der Ischämie oder 10 Tage nach einer Scheinoperation erreichten (Mann-Whitney-U-Test). Die Daten der scheinoperierten Tiere zeigten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich ihrer Plastizität im Vergleich zu den Werten vor der Scheinoperation.

Bei Betrachtung der PSA als Prozentzahl der Basislinienwerte nach der Potenzierung nach Ischämie betrug der maximale Wert nach Stimulation 428% des Basislinienwertes (Mittelwert von sechs Messungen der Basislinie:  $0,343 \pm 0,02$  mV; Durchschnitt des maximalen Wertes nach Potenzierung:  $1,47 \pm 0,4$  mV). Vor der Ischämie betrug der relative Wert nur 230 % (Mittelwert von sechs Messungen der Basislinie vor Stimulation:  $1,67 \pm 0,06$  mV; Durchschnitt des maximalen Wertes nach Potenzierung:  $3,85 \pm 0,42$  mV). Dieser Effekt war deutlicher ausgeprägt, wenn Tiere, die keinen ischämischen Standardschaden im CA1-Band aufwiesen, aus der Analyse herausgenommen wurden (Definition der Ausreißer: Tiere, bei denen mindestens 65 % der neuronalen Dichte der scheinoperierten Tiere nachgewiesen wurde). Diese Definition traf auf 4 Tiere zu, die folgende Anzahl an Neuronen pro  $500 \mu\text{m}$  aufwiesen:  $83,3 \pm 2,1$ . In der Gruppe mit einem ausgeprägten Standardschaden in CA1 ( $17,3$

$\pm 1,3$  Neurone pro  $500 \mu\text{m}$ ) wurde eine Potenzierung der PSA von 2000 % verglichen mit der Basislinie festgestellt (Mittelwert von sechs Messungen der Basislinie vor Stimulation:  $0,048 \pm 0,01 \text{ mV}$ ; Durchschnitt des maximalen Wertes nach Potenzierung:  $1,13 \pm 0,03 \text{ mV}$ ). Diese außergewöhnlich hohe Potenzierung ist begründet durch die extrem niedrigen Basislinienwerte, die in diesen Tieren gemessen wurden (Abb. 19A, 20A). Interessanterweise waren in dieser Gruppe einige Tiere, die überhaupt keine PSA in der I/O-Kurve aufwiesen (bis zu der Reizstärke von  $900 \mu\text{A}$ ), aber nach der Potenzierung eine normal geformte, aber kleine PSA hatten (Abb. 21A). In acht ischämischen Tieren wurden 24 Stunden nach der nach-ischämischen Stimulation Messungen der Basislinie durchgeführt. In diesen Tieren wurde dann keine Potenzierung mehr festgestellt.

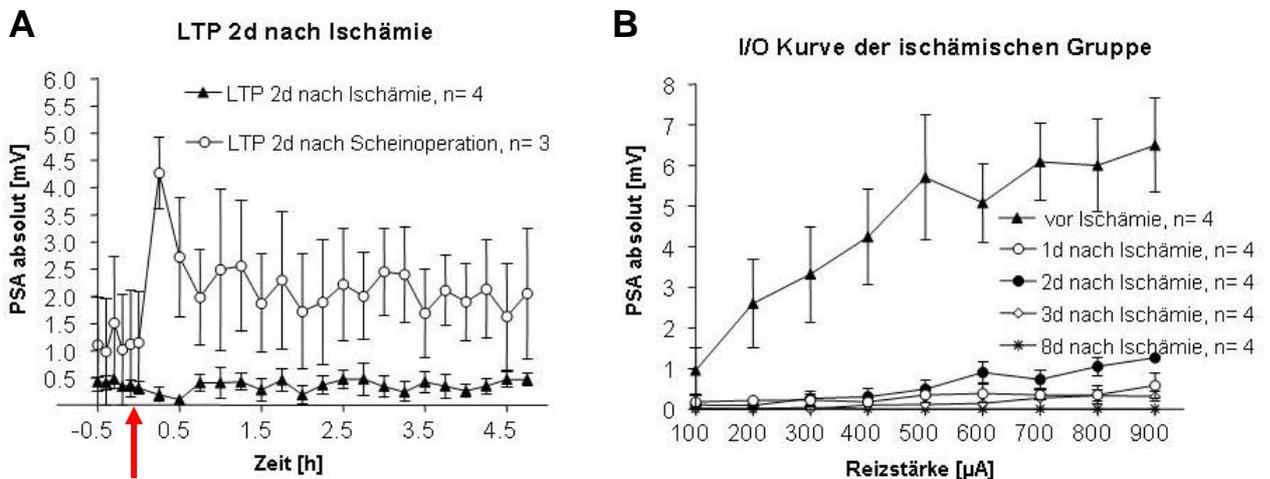
Scheinoperierte Tiere zeigten keinen großen Unterschied in der Höhe der Potenzierung vor und nach der Operation (vor der Operation: 231 % Potenzierung im Vergleich zur Basislinie; nach der Operation: 206 % Potenzierung im Vergleich zur Basislinie; Abb. 19B, 20B, 21B).



**Abb.21:** Die Graphen stellen die Entwicklung der analogen Signale eines ischämischen (A) bzw. scheinoperierten (B) Tieres 0, 2 und 10 Tage nach der Stimulation dar. Bei dem ischämischen Tier kann die drastische Abnahme der PSA nach Ischämie (grüne Linie) und die Zurückgewinnung der PSA am Tag 10 nach Stimulation (rote Linie) feststellen. Bei dem scheinoperierten Tier kann zu jedem Zeitpunkt eine nahezu unveränderte PSA gemessen werden.

### 3.1.3.2 Langzeitpotenzierung zwei Tage nach der Ischämie

Um zu überprüfen, ob die funktionelle Regeneration durch Stimulation auch zu einem frühen Zeitpunkt nach der Ischämie möglich ist, wurden in einem anderen Experiment die Tiere am Tag zwei nach der Ischämie tetanisiert. Zu diesem Zeitpunkt war die PSA in den Messungen der Basislinie stark reduziert, aber im Gegensatz zu 10 Tagen nach der Ischämie konnte zu diesem frühen Zeitpunkt keine LTP mittels hochfrequenter Stimulation induziert werden (Abb. 22A). In der scheinoperierten Gruppe hingegen war es möglich eine Potenzierung der PSA zu induzieren (Abb. 22A). Die Stimulation am Tag zwei hatte auch keinen Einfluss auf die weitere Abnahme der Funktion der granulären Neurone in der ischämischen Gruppe (I/O-Kurve an den Tagen nach dem Tetanus, Abb. 22B).



**Abb 22:** (A) Darstellung der PSA vor und fünf Stunden nach Stimulation (roter Pfeil) in Tieren, die zwei Tage zuvor eine globale Ischämie bzw. Scheinoperation erhielten. Während die scheinoperierten Tiere eine normale Plastizität aufwiesen, konnte in den ischämischen Tieren keine LTP induziert werden. (B) Darstellung der PSA in den I/O-Kurven der ischämischen Gruppe. Hierbei wurde eine dramatische Abnahme der PSA nach Ischämie festgestellt.

### **3.2 Elektrophysiologische Messungen *ex vivo* nach globaler zerebraler Ischämie**

In den elektrophysiologischen Versuchen *ex vivo* wurden Tiere 10 und 56 Tage nach der Ischämie bzw. Scheinoperation verwendet. Dabei wurden die PSA im *Gyrus dentatus* nach unterschiedlich hohen Reizungen im *Tractus perforans* (I/O-Kurve) abgeleitet und eine LTP mittels Tetanisierung ausgelöst. Die Akutschritte wurden anschließend hinsichtlich der Größe des CA1-Schadens mit einer Toluidinblau-Färbung untersucht.

#### **3.2.1. Messung der Populationsspikeamplitude 10 Tage und 56 Tage nach der Ischämie**

Im Gegensatz zu den elektrophysiologischen Messungen *in vivo*, bei denen nach Ischämie nahezu keine PSA gemessen wurde (siehe Kapitel 3.1.2.1), wurde in den *ex vivo*-Versuchen kein signifikanter Unterschied zwischen den I/O-Kurven in den hippokampalen Schnitten der ischämischen und scheinoperierten Tiere nach 10 und 56 Tagen gefunden (Abb. 23B). Nach der Tetanisierung wurde sowohl in den scheinoperierten Tieren, als auch in den Tieren 10 Tage (Abb. 23A) und 56 Tage (Abb. 23C) nach Ischämie eine signifikante Erhöhung der PSA erzeugt, die aber nicht unterschiedlich war (Tabelle 7A).

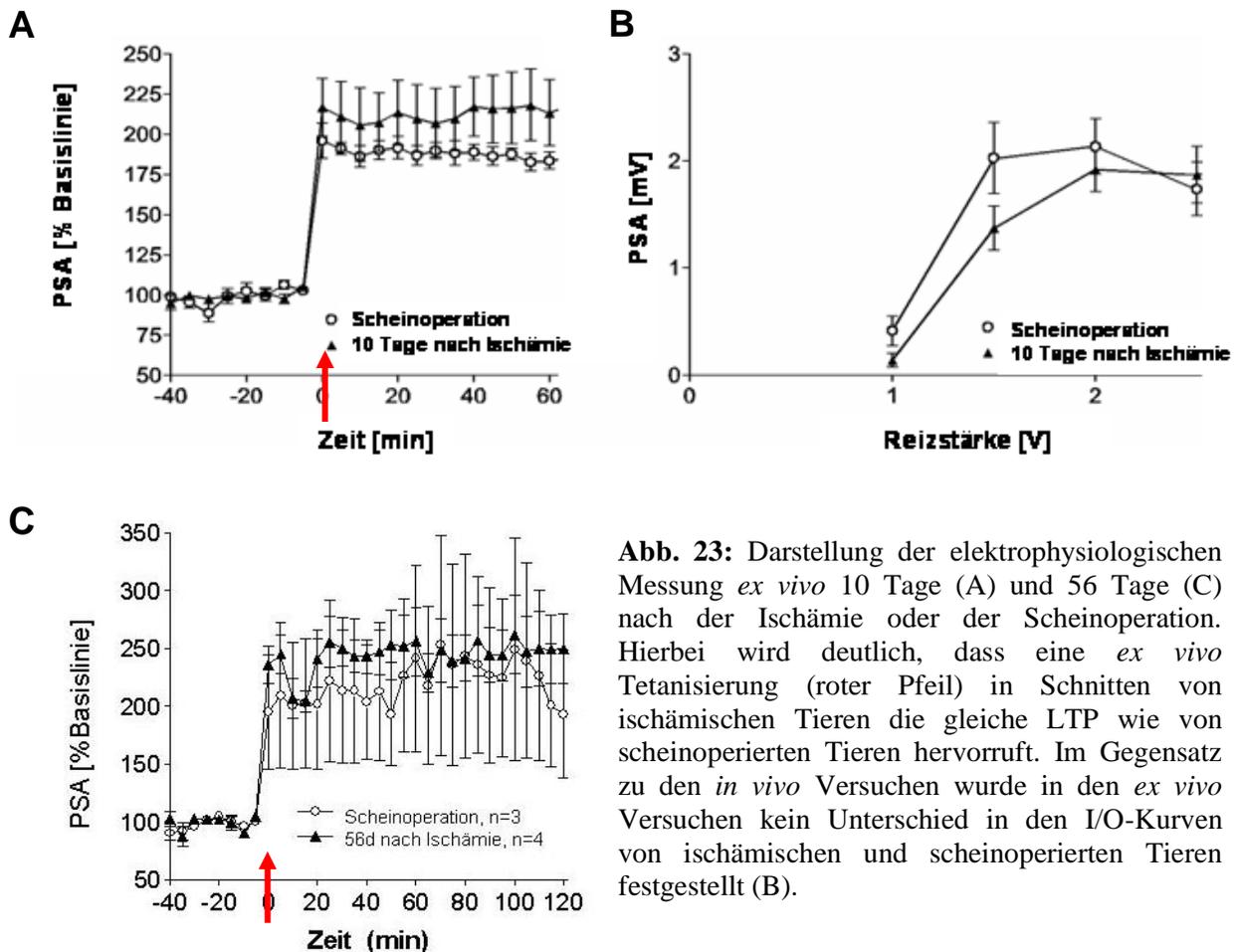
Um zu überprüfen, ob die Ischämie Auswirkungen auf die rekurrente Inhibition im synaptischen Schaltkreis hatte, wurden Doppelpulse-Experimente durchgeführt. Dazu wurde das Verhältnis der zweiten Reizantwort (PSA 2) zur ersten Reizantwort (PSA 1) bestimmt, das Aufschluss über die Qualität der Inhibition gibt. Werte kleiner 1 entsprechen einer Hemmung, Werte größer 1 einer Fazilitierung der 2. Reizantwort.

In den Schnitten der Tiere 10 und 56 Tage nach Scheinoperation und Ischämie wurden vor und zwei Stunden nach der Tetanisierung ähnliche Werte erzielt (PSA2 vs. PSA1; Tabelle 7B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die rekurrente Inhibition auch in den Tieren 10 und 56 Tagen nach Ischämie vorhanden ist.

A	PSA vor Tetanisierung Scheinoperation in [mV]	PSA 60 min nach Tetanisierung Scheinoperation in [mV]	PSA vor Tetanisierung Ischämie in [mV]	PSA 60 min nach Tetanisierung Ischämie in [mV]
10 Tage	-0,96 ± 0,14	-1,71 ± 0,27	-0,93 ± 0,13	-1,86 ± 0,33
56 Tage	-0,94 ± 0,48	-2,43 ± 2,30	-0,74 ± 0,23	-2,07 ± 0,61

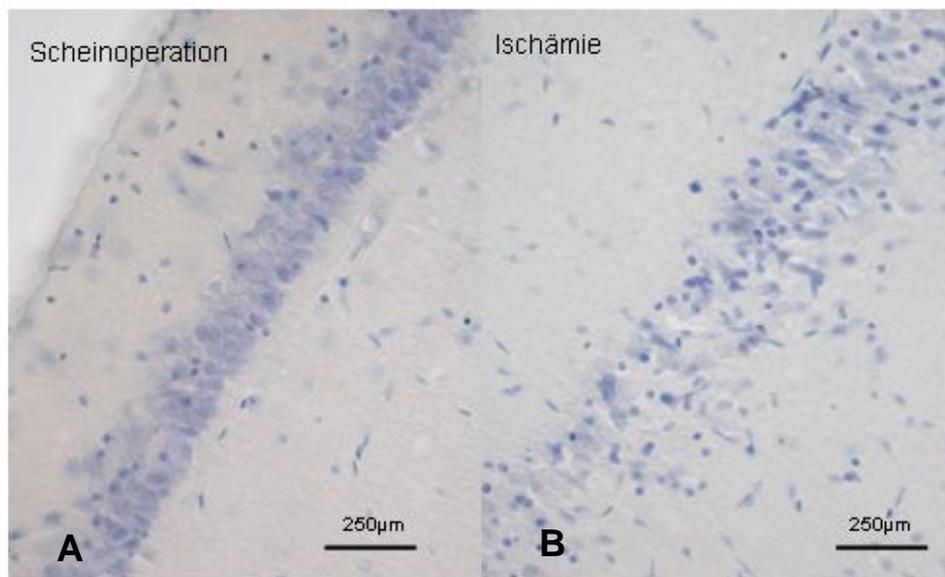
B	PSA2 vs. PSA1 vor Tetanisierung Scheinoperation	PSA2 vs. PSA1 2 h nach Tetanisierung Scheinoperation	PSA2 vs. PSA1 vor Tetanisierung Ischämie	PSA2 vs. PSA1 2 h nach Tetanisierung Ischämie
10 Tage	0,82 ± 0,07	0,89 ± 0,05	0,81 ± 0,07	0,97 ± 0,04
56 Tage	0,76 ± 0,07	0,93 ± 0,08	0,80 ± 0,03	0,88 ± 0,07

**Tabelle 7:** Tabellarische Darstellung der PSA (A) vor und 60 Minuten nach Tetanisierung bzw. die Ergebnisse der Doppelpulse-Depression (B) vor und zwei Stunden nach Tetanisierung 10 und 56 Tage nach Scheinoperation und globale Ischämie *ex vivo*. Mittelwert ± SEM.



### 3.2.2 Histologische Darstellung der Akutschnitte

Die qualitative Überprüfung der Akutschnitte hinsichtlich einer neuronalen Schädigung der CA1 Pyramidenzellen erfolgte nach einer histologischen Färbung mit Toluidinblau. Sowohl 10 Tage als auch 56 Tage nach globaler Ischämie wurden ein massiver Zellverlust und eine große Anzahl von Zelltrümmern im CA1-Band der hippocampalen Formation festgestellt (Abb. 24). Im Gegensatz dazu gab es in den Schnitten 10 und 56 Tage nach Scheinoperation keinen offensichtlichen Verlust von Pyramidenzellen (Abb. 24).



**Abb. 24:** Darstellung der CA1 Region der hippocampalen Region nach Toluidinblaufärbung in *in vitro*-Schnitten von Tieren nach Scheinoperation (A) oder Ischämie (B). Auch hier wurden ein massiver Zellverlust nach der Ischämie und ein nahezu unversehrtes Zellband nach der Scheinoperation festgestellt.

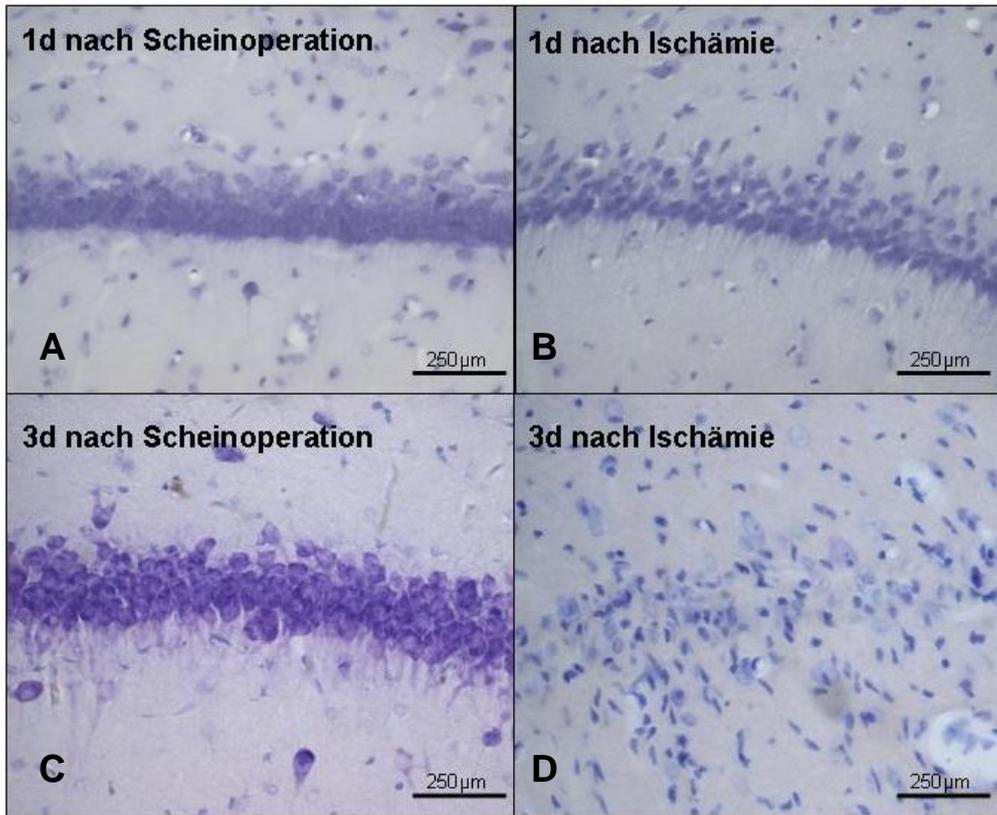
### **3.3 Proliferation und Differenzierung nach globaler zerebraler Ischämie**

Die Proliferation und Differenzierung nach globaler zerebraler Ischämie wurde, im Vergleich zu anderen Literaturdaten, zu sehr frühen Zeitpunkten untersucht. Die Neurogenese und Gliogenese wurden unter Basalbedingungen und einen Tag bzw. drei Tage nach globaler zerebraler Ischämie analysiert.

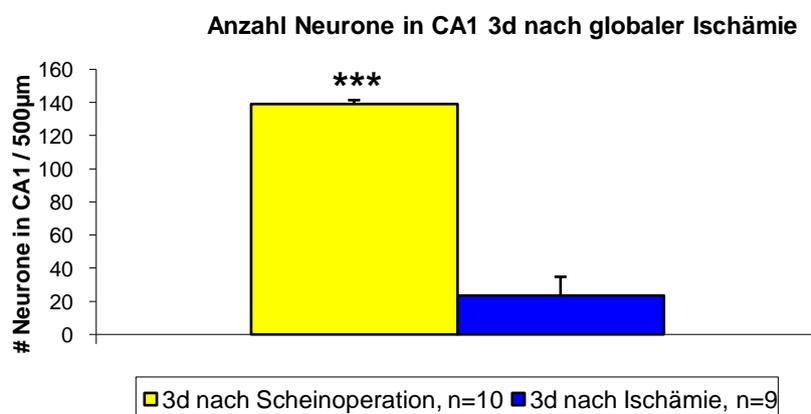
#### **3.3.1 Evaluierung des neuronalen Schadens im CA1-Band einen Tag und drei Tage nach Ischämie**

In Kapitel 3.1.1 wurde bereits erwähnt, dass die globale zerebrale Ischämie einen massiven Verlust an Pyramidenzellen in der CA1-Region des Hippokampus verursacht. Die neuronale Degeneration, die zu einem verzögerten Zelltod führt ist, wird mit einer Nissl-Färbung an Tag zwei bis drei sichtbar und ist nach ca. fünf Tagen vollständig ausgebildet.

Die Tiere wurden am Tag eins bzw. drei Tage nach der Ischämie perfundiert, die Gehirne histologisch aufgearbeitet (Gefrierschnitte, Scheinimmunhistochemie mit Toluidinblau-Färbung) und ausgewertet. In der Versuchsreihe wurden Kontrollgruppen (Scheinoperation) mitgeführt. Im histologischen Bild wurden Neurone mit gut sichtbaren, blau gefärbten, runden Nuklei als intakt bewertet (Abb. 25A, C). Am Tag eins nach der Ischämie wurde nur eine sehr kleine Anzahl abgestorbener Pyramidenzellen gefunden (Abb. 25B), so dass auf eine Quantifizierung des Schadens im CA1-Band verzichtet wurde. Am Tag drei nach der Ischämie wurden im geschädigten Gebiet neben einigen überlebenden Pyramidenzellen und Zelltrümmern auch deformierte und geschrumpfte Neurone gefunden (Abb. 25D), so dass hier die Anzahl überlebender Neurone bestimmt wurde. Die Auswertung histologisch aufgearbeiteter Hippokampusschnitte scheinoperierter Tiere ergab nach 3 Tagen eine Anzahl von  $139,3 \pm 2,3$  Pyramidenzellen pro  $500 \mu\text{m} \pm \text{SEM}$  im CA1-Band ( $n=10$ ). Drei Tage nach Ischämie wurden nur noch eine Zahl von  $23,3 \pm 11,5$  Pyramidenzellen pro  $500 \mu\text{m} \pm \text{SEM}$  im CA1-Band ( $n=9$ ) gezählt (Abb. 26). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war statistisch signifikant ( $p<0,001$ , Mann-Whitney-*U*-Test).



**Abb. 25:** Scheinimmunhistochemie mit anschließender Toluidinblau-Färbung zur morphologischen Darstellung des CA1-Bandes der hippocampalen Formation einen Tag und drei Tage nach Scheinoperation bzw. Ischämie. Sowohl einen als auch drei Tage nach Scheinoperation (A, C) sah das CA1-Band intakt aus. Einen Tag nach der Ischämie (B) wurden nahezu keine apoptotischen Neurone im CA1-Band gesichtet. Im Gegensatz dazu wurde am Tag drei nach der Ischämie (D) ein massiver Zellverlust detektiert.



**Abb. 26:** Graphische Darstellung des morphologischen Schadens in der CA1-Region der hippocampalen Formation drei Tage nach der Ischämie bzw. nach der Scheinoperation. Die Anzahl der überlebenden Neurone im CA1-Band war bei den der ischämischen Tiere signifikant niedriger als bei den scheinierten Tieren ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney-U-Test).

### 3.3.2 Basale Proliferation und durch Ischämie induzierte Proliferation im Hippokampus und an der Subventrikularzone des lateralen Ventrikels

BrdU-positive Zellen wurden sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach globaler zerebraler Ischämie analysiert. Einen Tag nach der Ischämie konnte in den ischämischen Tieren kein signifikanter Unterschied zu den scheinoperierten Tieren in den untersuchten Regionen des Vorderhirns festgestellt werden (Tabelle 8). Abgesehen von den beiden Proliferationszonen (SGZ und SVZ) wurden einen Tag nach der Ischämie bzw. der Scheinoperation nur in geringem Maße proliferierende Zellen gefunden.

Drei Tage nach der Ischämie wurde jedoch eine signifikante Zunahme an BrdU-positiven Zellen in allen hippokampalen Regionen, an allen Ventrikelwänden und im Striatum festgestellt (Tabelle 8). Regionen, die näher am Schadensgebiet lokalisiert waren, wiesen eine höhere Anzahl an BrdU-positiven Zellen auf, als Regionen, die weiter entfernt lagen. Im Striatum, im Hilus, an der Ventrikelwand des dorsalen und ventralen 3.Ventrikels und in der CA1-Pyramidenzellschicht der Kontrollgruppe wurden hingegen kaum BrdU-positive Zellen gefunden. Die BrdU-markierten Kerne der hippokampalen SGZ beider Gruppen waren als ungleichmäßig geformte Ansammlungen (=Cluster) vorzufinden. Die *Fissura hippocampi*, eine Struktur, die zwischen dem CA1-Band und dem *Gyrus dentatus* lokalisiert ist, ist reich an Blutgefäßen. In unmittelbarer Nähe dieser Blutgefäße und des Striatum wurden drei Tage nach globaler Ischämie zahlreiche proliferierende Zellen gefunden, unter Basalbedingungen jedoch nahezu keine BrdU-positiven Zellen. Deweiteren wurde auch eine große Zunahme von proliferierender Zellen an den Ventrikelwänden des ventralen und dorsalen 3.Ventrikels (~10fach) detektiert. Dabei ist es von Bedeutung, dass die Ventrikelwand des dorsalen 3.Ventrikels unmittelbar am geschädigten CA1-Pyramidenzellband lokalisiert ist und somit ein schnelles Einwandern der proliferierenden Zellen in das Schadensgebiet ermöglicht werden konnte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine globale zerebrale Ischämie nach drei Tagen eine massive Zunahme an proliferierenden Zellen in allen Regionen des Vorderhirnes hervorruft

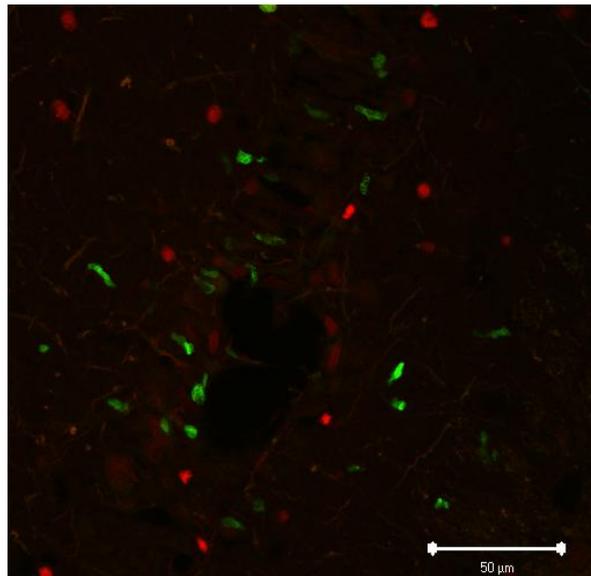
	Region	BrdU		DCX		BrdU/DCX	
		Schein-operation	Ischämie	Schein-operation	Ischämie	Schein-operation	Ischämie
<b>1 Tag</b>	<b>DG total</b>	8,5 ± 1	6,6 ± 0,9	40 ± 3,3	33,7 ± 2,4	5,6 ± 0,8	4 ± 0,5
	<b>DG Oberes Blatt</b>	8 ± 1,5 *	5,8 ± 0,8	36,1 ± 3,4	29 ± 2,5	5,3 ± 1,4	3,3 ± 1,4
	<b>DG Unteres Blatt</b>	9 ± 0,6	7,3 ± 1,2	43,9 ± 3,7	38,5 ± 2,8 •	6 ± 0,9	4,7 ± 0,8
	<b>LV</b>	134,1 ± 8,4	130,3 ± 5,7	72 ± 3,5	74,2 ± 6,4	59 ± 2,6	59 ± 5
<b>3 Tage</b>	<b>DG total</b>	6,0 ± 0,7	26,2 ± 3,1 ***	30,5 ± 1,9 ***	19,7 ± 1,7	4,7 ± 0,7	5,2 ± 0,9
	<b>DG Oberes Blatt</b>	5,5 ± 0,7	28,2 ± 3,9 ***	27,1 ± 1,5 **	15,7 ± 2	4,3 ± 0,6	3,7 ± 0,8
	<b>DG Unteres Blatt</b>	6,6 ± 0,9	24,2 ± 2,3 ***	34 ± 3 *	23,8 ± 1,5 ••	5,2 ± 0,8	6,6 ± 1,2 •
	<b>LV</b>	117,1 ± 4,7	172,9 ± 11,7 **	81,3 ± 5,4	92,9 ± 6	60,4 ± 4,5	66,4 ± 5,9
	<b>Striatum</b>	0,7 ± 0,3	56,8 ± 7,5 ***	5,2 ± 0,6	4,2 ± 1	0,1 ± 0	0,2 ± 0,1

**Tabelle 8:** Anzahl der immunhistochemischer Signale von BrdU-, DCX- und DCX/BrdU-positiven Zellen einen Tag und drei Tage nach der Scheinoperation bzw. der Ischämie. Die Zellen im *Gyrus dentatus* und lateralen Ventrikel wurden entlang des Zellbandes gezählt. „DG total“ gibt die Gesamtanzahl von Zellen des oberen und unteren Blattes des *Gyrus dentatus* an, wohingegen „DG oberes Blatt“ und „DG unteres Blatt“ nur die Anzahl der Zellen des oberen bzw. unteren Blattes des *Gyrus dentatus* darstellen. Striatale Zellen wurden pro 0,08mm<sup>2</sup> wiedergegeben. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Die signifikanten Unterschiede zwischen den scheinoperierten und ischämischen Tiere wurden durch \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 dargestellt. Zwischen dem oberen und unteren Blatt des *Gyrus dentatus* wurden die signifikanten Unterschiede durch • p<0,01, •• p<0,05 dargestellt (Mann-Whitney-U-Test).

### 3.3.3 Analyse der proliferierenden Zellen auf Apoptose

Durch die hohe Anzahl von BrdU-positiven Zellen drei Tage nach der Ischämie in der geschädigten Pyramidenzellschicht stellte sich die Frage, ob alle proliferierenden Zellen überleben und sich differenzieren oder ob einige wieder absterben. Aufgrund dessen wurden die proliferierenden Zellen auf Apoptose überprüft. Hierzu wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Antikörpern gegen die aktivierte Caspase-3 gegen BrdU durchgeführt.

In keinem der untersuchten Schnitte wurde eine Doppelmarkierung mit beiden Antikörpern detektiert (Abb. 27), woraus man schließen kann, dass die proliferierenden Zellen drei Tage nach der Ischämie im Vorderhirn keine Apoptose durchlaufen.



**Abb. 27:** Konfokale Darstellung von aktive Caspase-3 (rot)- und BrdU (grün)- positiven Zellen in der CA1-Region drei Tage nach der Ischämie. Es wurde keine Doppelmarkierung der beiden Antikörper festgestellt.

### 3.3.4 Neurogenese einen bzw. drei Tage nach globaler Ischämie

#### Doppelmarkierung von BrdU mit DCX

Da in den elektrophysiologischen Messungen *in vivo* schon einen Tag nach der Ischämie eine starke Abnahme der PSA aber eine unveränderte fEPSP slope in der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* festgestellt wurde, war es von großem Interesse die Neurogenese zu diesem frühen Zeitpunkt nach der Ischämie zu untersuchen. Hierzu wurden Tiere einen Tag und drei Tage nach der Ischämie bzw. Scheinoperation verwendet. Es wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Antikörpern gegen Doublecortin (DCX) und BrdU durchgeführt und die Anzahl an DCX und DCX/BrdU-positiven Zellen in verschiedenen Regionen des Vorderhirnes mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops gezählt (Abb. 28). DCX ist ein Marker für frühe adulte Neurogenese (Brown et al., 2003a; Couillard-Despres et al., 2005).

Weder in der scheinoperierten noch in der ischämischen Gruppe wurden nach einem Tag bzw. nach drei Tagen DCX-positive Zellen in der CA1-Pyramidenzellschicht, in der *Fissura hippocampi*, im Hilus, am dorsalen und ventralen 3.Ventrikel oder im Striatum gefunden. Im Gegensatz dazu wurden in der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* (Abb. 28) und an der

Ventrikelwand des lateralen Ventrikels eine Vielzahl an DCX und DCX/BrdU-positiven Zellen gefunden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

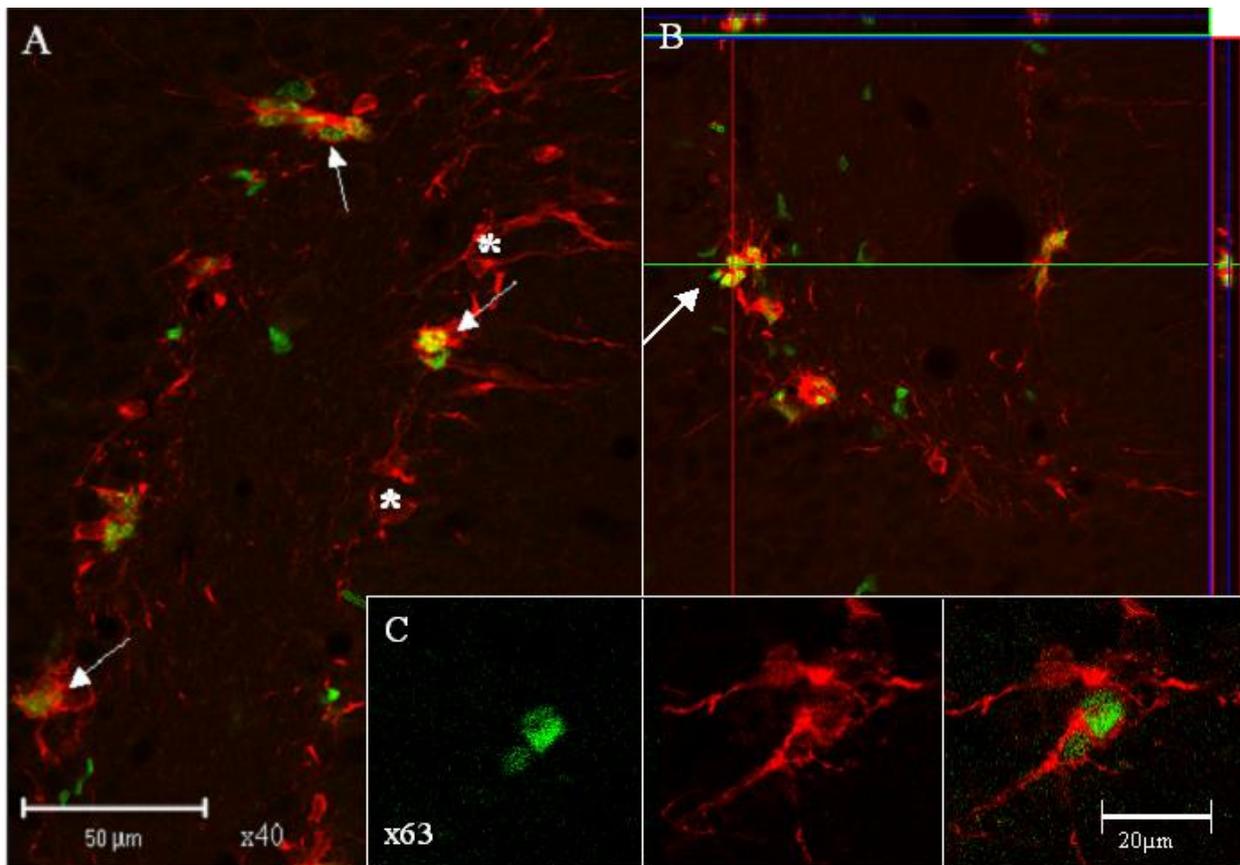
Einen Tag nach der globalen Ischämie wurde in beiden Proliferationszonen (SGZ und SVZ) kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der BrdU, DCX und DCX/BrdU-positiven Zellen beobachtet (Tabelle 8). Die absolute Anzahl DCX-positiver Zellen im *Gyrus dentatus* unterschied sich statistisch nicht von der Kontrollgruppe. Jedoch konnte innerhalb der ischämischen Gruppe eine signifikant höhere Anzahl von DCX-positiven Zellen im unteren Blatt des *Gyrus dentatus* nachgewiesen werden ( $29 \pm 2,5 / 800 \mu\text{m}$  oberes Blatt gegenüber  $38,5 \pm 2,8 / 800 \mu\text{m}$  unteres Blatt;  $p < 0,05$  Mann-Whitney-U-Test).

Drei Tage nach der globalen Ischämie wurde neben der signifikanten Zunahme an BrdU-positiven Zellen eine signifikante Abnahme von DCX-positiven Zellen im *Gyrus dentatus* (Tabelle 8) festgestellt. Die Anzahl von BrdU-positiven Zellen, die mit DCX doppelmarkiert sind, war aber im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich. In den scheinoperierten Tieren waren 78 % aller BrdU-positiven Zellen im *Gyrus dentatus* kolokalisiert mit DCX, aber in der ischämischen Gruppe waren nur 20 % der BrdU-positiven Zellen im *Gyrus dentatus* mit DCX kolokalisiert.

Beim Vergleich des oberen Blattes gegen das untere Blatt des *Gyrus dentatus* hinsichtlich der Anzahl von DCX-positiven Zellen wurde drei Tage nach globaler Ischämie eine signifikant höher Anzahl von DCX-positiven Zellen im unteren Blatt ( $23,8 \pm 1,5 / 800 \mu\text{m}$  gegenüber  $15,7 \pm 2,0 / 800 \mu\text{m}$  des oberen Blattes,  $p < 0,01$  Mann-Whitney-U-Test) des *Gyrus dentatus* festgestellt (Mann-Whitney-U-Test). Bei der Betrachtung der DCX/BrdU-positiven Zellen im oberen und unteren Blatt des *Gyrus dentatus* konnte ebenfalls drei Tage nach Ischämie eine signifikant höhere Anzahl im unteren Blatt des *Gyrus dentatus* detektiert werden. In den scheinoperierten Tieren wurde ein tendenzieller Unterschied hinsichtlich der Anzahl von DCX und DCX/BrdU-positiven Zellen zwischen dem oberen und unteren Blatt des *Gyrus dentatus* nachgewiesen, dieser war jedoch nicht signifikant.

An der SVZ des lateralen Ventrikels wurde drei Tage nach Ischämie eine starke Zunahme von proliferierenden Zellen analysiert, aber kein signifikanter Unterschied der DCX und DCX/BrdU-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

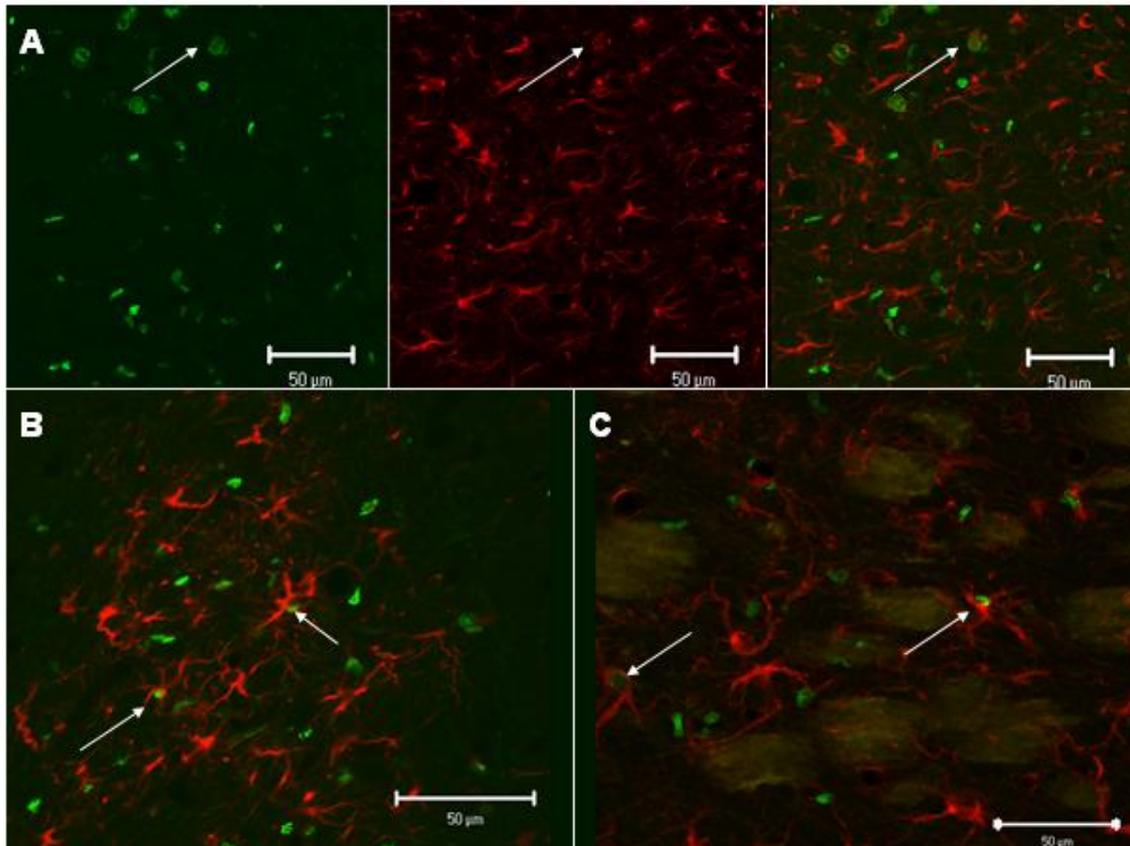
Trotz der hohen Anzahl proliferierender Zellen (BrdU-positiv) in den Proliferationszonen drei Tage nach Ischämie konnte nur ein Bruchteil der neugebildeten Zellen als DCX-positiv charakterisiert werden. Aufgrund dessen wurden die proliferierenden Zellen auf andere Marker hin (Nestin,  $\beta$ III-Tubulin, NeuN, GFAP, OX-42) untersucht.



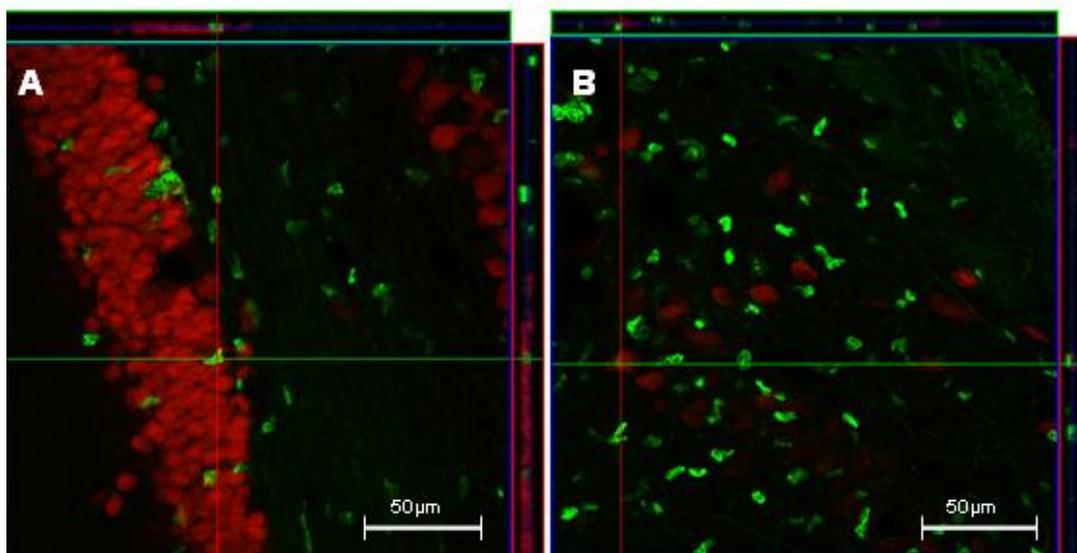
**Abb. 28:** Neu gebildete Neurone im *Gyrus dentatus* drei Tage nach der Ischämie, die mittels DCX/BrdU immunhistochemischer Doppelfärbung angefärbt und an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen wurden. In Bild (A) wird die Verteilung neu gebildeter Neurone (doppelt markiert) nach Ischämie in den beiden Blättern des *Gyrus dentatus* dargestellt (Pfeile). Man beachte, dass all diese Neurone deutlich doppeltmarkiert für BrdU (grün fluoreszierender Nukleus) und Doublecortin (rot fluoreszierendes Zytoplasma der Somata und Dendriten) sind. Beispiele für DCX-positive/BrdU-negative Zellen wurden mit Sternchen markiert. (B) zeigt einen Z-Stack eines neu gebildeten Neurons, welches für beide Antikörper BrdU- und DCX-positiv ist. In (C) werden beide Kanäle einer doppelt markierten Zelle separat für rote und grüne Fluoreszenz sowie das übereinander gelegte Bild präsentiert.

#### Doppelmarkierung von BrdU mit Nestin, $\beta$ III-Tubulin und NeuN

Nachdem der Großteil der proliferierenden Zellen drei Tage nach der Ischämie im Vorderhirn nicht DCX-positiv war, wurden andere neuronale Marker getestet. Mit dem neuronalen filamentösen Marker Nestin (Abb. 29) und den neuronalen Markern  $\beta$ III-Tubulin und NeuN (Abb. 30) wurden nur vereinzelt oder keine Doppelmarkierungen mit BrdU in beiden Gruppen gefunden. Für die weitere Charakterisierung des Großteiles an proliferierenden Zellen drei Tage nach der Ischämie wurden gliale Marker (GFAP, OX-42) hinsichtlich der Doppelmarkierung getestet.



**Abb. 29:** Darstellung der immunhistochemischen Doppelfärbung der Antikörper gegen Nestin (rot) und BrdU (grün) drei Tage nach Ischämie. (A) zeigt die Verteilung von BrdU- und Nestin-positiven Zellen im CA1-Band der hippocampalen Formation. Hier konnten nur vereinzelt eine doppelt markierte Zellen (Pfeil, Bild rechts) detektiert werden. Auch im Hilus (B) und im Striatum (C) konnte nur eine geringe Anzahl von doppelt markierten Zellen festgestellt werden.



**Abb. 30:** Darstellung eines Z-Stack nach einer immunhistochemischen Doppelfärbung gegen NeuN (rot) und BrdU (grün) drei Tage nach der Ischämie. In (A) wird die Verteilung von BrdU- und NeuN-positiven Zellen im *Gyrus dentatus* dargestellt. Hier konnten keine Zellen deutlich als doppelt markiert detektiert werden. Auch im CA1-Band (B) der hippocampalen Formation konnten keine doppelt markierten Zellen festgestellt werden.

### 3.3.5 Aktivierung und Proliferation von Mikroglia nach globaler Ischämie

Für die Untersuchung der Verteilung der Mikroglia/Makrophagen-Aktivierung nach globaler zerebraler Ischämie wurden Tiere 1, 3 und 14 Tage nach der Ischämie bzw. Scheinoperation verwendet und eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Antikörpern gegen Mikroglia/Makrophagen (OX-42) und BrdU durchgeführt. Die quantitativen Auszählungen von OX-42 und OX-42/BrdU-positiven Zellen wurden einen Tag und drei Tage nach der Ischämie in verschiedenen Regionen des Vorderhirns durchgeführt. Die jeweiligen Ergebnisse sind in den Tabellen 8 und 9 dargestellt.

#### Einen Tag nach der Ischämie

In allen hippocampalen Regionen und im Striatum wurden einen Tag nach der Scheinoperation Mikroglia und Makrophagen detektiert (Tabelle 9), die aber nicht nach dem operativen Eingriff gebildet wurden (OX-42-positiv / BrdU-negativ).

	BrdU		OX-42		BrdU/OX-42	
	Schein-operation	Ischämie	Schein-operation	Ischämie	Schein-operation	Ischämie
<b>CA1</b>	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,1 ± 0,7	15,4 ± 4,4 *	0	0
<b>Fissura hippocampi</b>	3,4 ± 0,9	2,6 ± 0,6	13,1 ± 6,3	29,4 ± 6,5	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1
<b>v3V</b>	2,9 ± 1,1	4,0 ± 0,4	44,3 ± 11,5	68,8 ± 6,4	0,4 ± 0,2	0,8 ± 0,3
<b>d3V</b>	3,7 ± 0,7	5 ± 0,9	26,8 ± 8,8	45,5 ± 8,0	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1 *
<b>DG</b>	10,7 ± 1,2	8,3 ± 0,9	11,5 ± 5,2	20 ± 4,7	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1
<b>Hilus</b>	1,3 ± 0,9	0,9 ± 0,2	15,4 ± 8,1	28,8 ± 5,2	0	0
<b>LV</b>	138,6 ± 10,4	146,9 ± 15,3	46,1 ± 14	53 ± 5,4	1,9 ± 0,7	2,3 ± 0,4
<b>Striatum</b>	7,5 ± 2,3	7,7 ± 1,9	16,5 ± 6,1	59,9 ± 3,3 **	0	3 ± 1,4 **

**Tabelle 9:** Anzahl von BrdU-, OX-42- und OX-42/BrdU-positiven Zellen einen Tag nach der Scheinoperation bzw. Ischämie. Die Zellen wurden in 3 Schnitten pro Tier an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop ausgewertet. Die Zellen in CA1, ventraler 3.Ventrikel (v3V), dorsaler 3.Ventrikel (d3V), *Gyrus dentatus* (DG) und lateraler Ventrikel (LV) wurden entlang von 800µm gezählt. In der *Fissura hippocampi*, im Hilus und im Striatum wurden pro 0,08mm<sup>2</sup> wiedergegeben. Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Die signifikanten Unterschiede zwischen den scheinoperierten und ischämischen Tiere werden durch \*p<0,05, \*\*p<0,01 dargestellt (Mann-Whitney-U-Test).

Am Tag eins nach der Ischämie wurde jedoch eine signifikante Erhöhung von Mikroglia und Makrophagen im Schadensgebiet (CA1-Pyramidenzellband) und im Striatum festgestellt. Allerdings wurde nur im Striatum und am dorsalen 3.Ventrikel (d3V) eine signifikante Erhöhung von neugebildeten Mikroglia-Zellen (OX-42/BrdU-positiv) beobachtet.

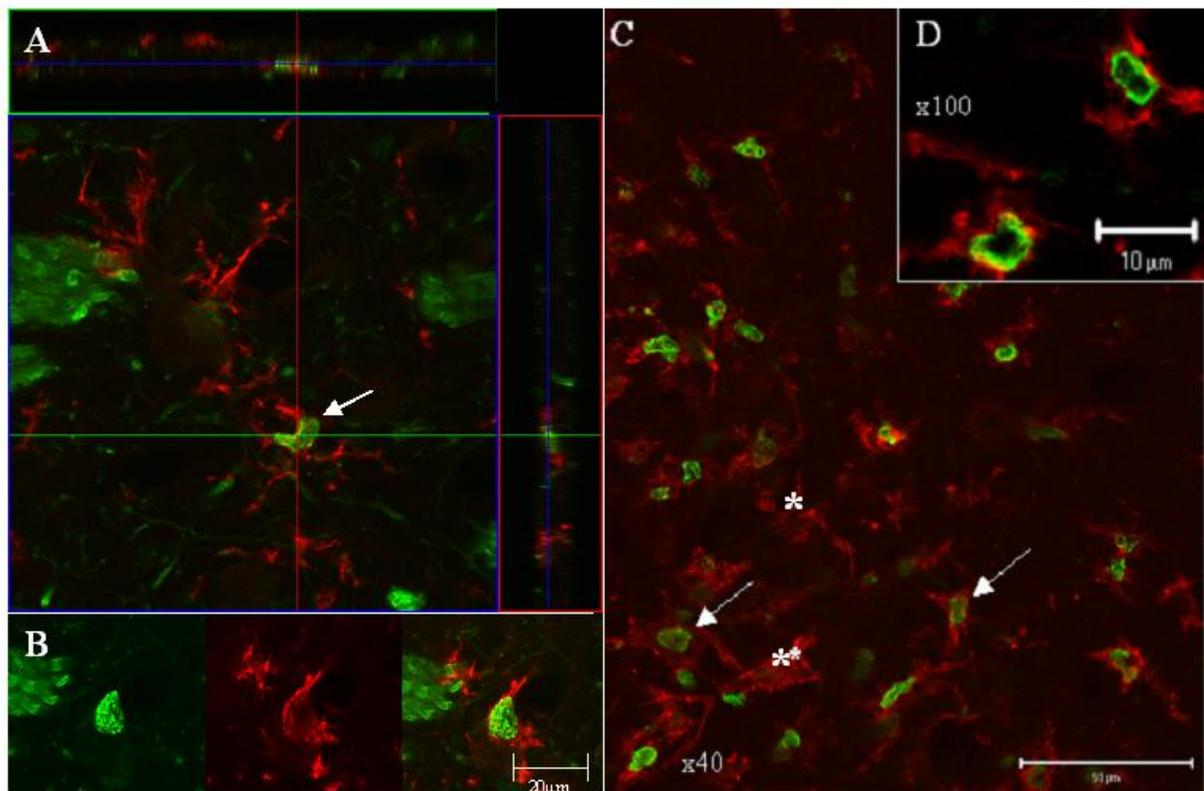
### 3 Tage nach der Ischämie

Drei Tage nach der Scheinoperation wurden Mikroglia und Makrophagen nur an den Ventrikelwänden des ventralen 3.Ventrikel, dorsaler 3.Ventrikel und lateralen Ventrikel gefunden (Tabelle 10). Diese Zellen waren sehr klein und mit kurzen Ausläufern versehen, die für die Morphologie der ruhenden Mikroglia charakteristisch sind. In den übrigen Regionen, in denen am Tag eins nach der Scheinoperation Mikrogliazellen analysiert wurden, zeigten am Tag drei aber keine Färbung mit OX-42.

	BrdU		OX-42		BrdU/OX-42	
	Schein-operation	Ischämie	Schein-operation	Ischämie	Schein-operation	Ischämie
<b>CA1</b>	0,1 ± 0	67,4 ± 7,7 **	0	101,5 ± 5,8 **	0	54,5 ± 7,5 **
<b>Fissura hippocampi</b>	3,4 ± 0,4	65,3 ± 9,5 **	0	86,8 ± 8,4 **	0	55 ± 8,4 **
<b>v3V</b>	2,9 ± 0,7	16,5 ± 3,3 **	14,7 ± 3	52,8 ± 12,1	0,3 ± 0,3	11,3 ± 3,1 **
<b>d3V</b>	3 ± 0,5	30,3 ± 4 **	3,4 ± 1,2	53,4 ± 7,5 **	0,1 ± 0,1	22,3 ± 3,6 **
<b>DG</b>	7,8 ± 1,6	48,5 ± 5,6 **	0	41,7 ± 5,9 **	0	21,9 ± 3,3 **
<b>Hilus</b>	2,7 ± 0,6	89,6 ± 10,2 **	0	99,7 ± 8,8 **	0	68,3 ± 6,8 **
<b>LV</b>	84,5 ± 8,9	153,9 ± 14 *	1,1 ± 1	61,5 ± 8,4 **	0	18,4 ± 0,8 **
<b>Striatum</b>	2,5 ± 0,4	59,4 ± 12,7 **	0	65,7 ± 8,6 **	0	29,8 ± 4 **

**Tabelle 10:** Anzahl der BrdU-, OX-42- und OX-42/BrdU-positiven Zellen drei Tage nach Scheinoperation, bzw. Ischämie. Die Zellen wurden in 3 Schnitten pro Tier an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gezählt. Die Zellen in CA1, ventraler 3.Ventrikel (v3V), dorsaler 3.Ventrikel (d3V), *Gyrus dentatus* (DG) und lateraler Ventrikel (LV) wurden entlang von 800 µm gezählt. In der *Fissura hippocampi*, im Hilus und im Striatum wurden pro 0,08 mm<sup>2</sup> wiedergegeben. Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Die signifikanten Unterschiede zwischen den scheinoperierten und ischämischen Tiere werden durch \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 dargestellt (Mann-Whitney-U-Test).

Im CA1-Band der hippocampalen Formation (Abb. 31D) wurden drei Tage nach der Ischämie  $101,5 \pm 5,8$  Mikroglia/Makrophagen pro  $800 \mu\text{m}$  detektiert, wovon ungefähr 50 % mit BrdU doppelmarkiert waren. Betrachtet man die Doppelmarkierung von der Anzahl der BrdU-Zellen ausgehend, wurden ca. 80 % aller BrdU-Zellen des CA1-Bandes nach der Ischämie als Mikroglia und Makrophagen charakterisiert. Die Morphologie der OX-42-positiven Zellen hatte sich im CA1-Band in eine amöboide Gestalt verwandelt (Abb. 31C, D). Nicht nur im Schadensgebiet (CA1) wurde eine signifikante Zunahme an Mikroglia/Makrophagen nach Ischämie beobachtet, sondern in nahezu jeder Region des Vorderhirnes (Tabelle 10). Regionen, wie der Hilus, *Fissura hippocampi*, *Gyrus dentatus* und Striatum (Abb. 31A, B), die vor dem Insult nahezu keine OX-42-positive Zelle enthielten, zeigten nach einer globalen Ischämie eine massive Zunahme von Mikroglia/Makrophagen. Eine Vielzahl aller Mikroglia/Makrophagen-Typen wurde im Striatum gesichtet, obwohl diese Region des Gehirnes sehr weit vom Schadensgebiet entfernt ist.



**Abb. 31:** Expression von Mikroglia/Makrophagen im Hippokampus drei Tage nach der Ischämie. (A) zeigt einen Z-Stack einer neu gebildeten Zelle, die sowohl BrdU- (grün) als auch OX-42-positiv (rot) ist. In (B) werden die beiden separaten Kanäle und ein zusammengefügtes Bild beider Kanäle zur Darstellung einer neu gebildeten Mikrogliazelle (BrdU/OX-42-positiv) im Striatum gezeigt. (C) stellt die große Anzahl Doppelmarkierungen in der CA1-Region der hippocampalen Formation dar (Pfeile). In Abb. D werden einzelne proliferierende Mikrogliazellen vergrößert dargestellt. BrdU-negative Zellen sind mit Sternchen markiert.

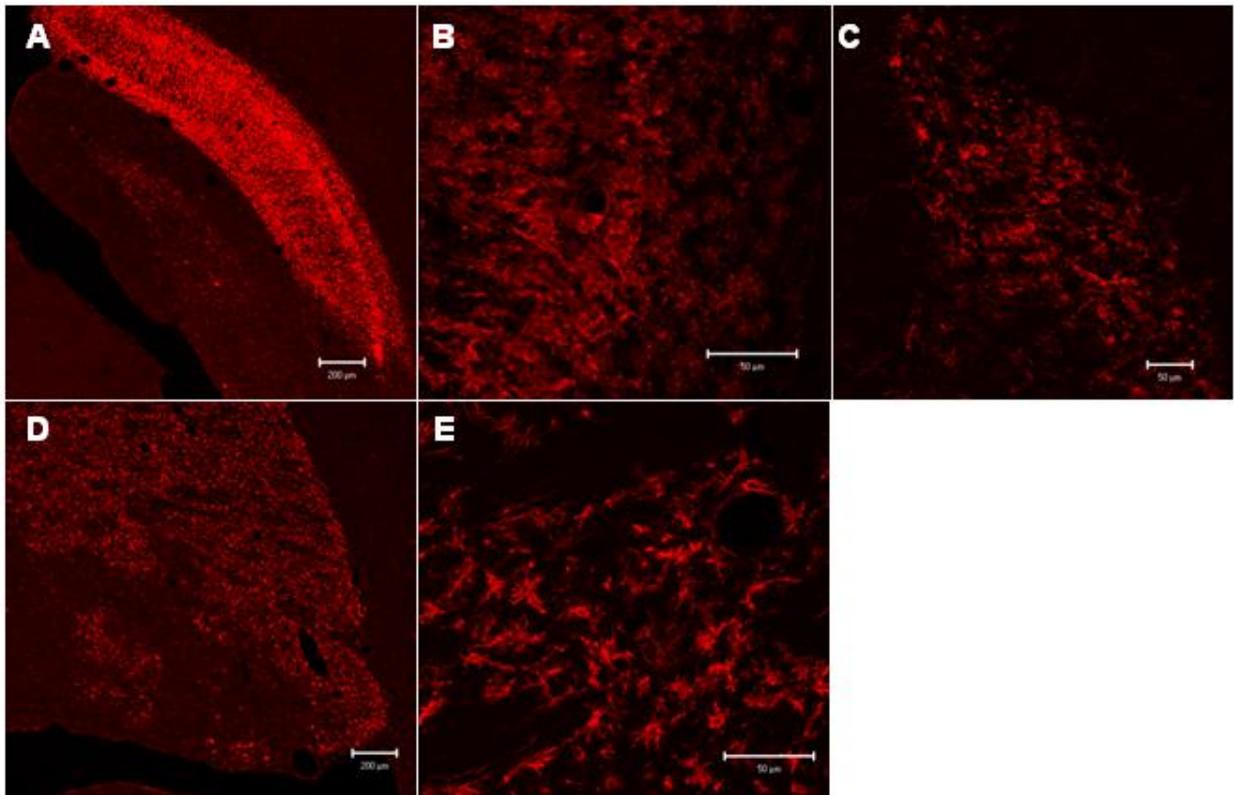
Wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben stieg die Anzahl BrdU-positiver Zellen in jeder untersuchten Region drei Tage nach der globalen Ischämie signifikant an. Mit Ausnahme des *Gyrus dentatus* wurde in nahezu allen hippokampalen Regionen 70-80 % aller BrdU-positiven Zellen als Mikroglia/Makrophagen-Zellen charakterisiert. Im *Gyrus dentatus* wurden nur 45 % aller BrdU-Zellen mit OX-42 doppelmarkiert.

An allen Ventrikelwänden wurde drei Tage nach der Ischämie eine hohe Zunahme von Mikroglia und neugebildeter Mikroglia (OX-42/BrdU-positiv) beobachtet. Die Dichte der Mikroglia-Zellen war an allen Ventrikelwänden nahezu gleich, aber an der Wand des d3V wurde eine signifikant höhere Anzahl von OX-42/BrdU, verglichen mit dem ventralen 3.Ventrikel (v3V) festgestellt (\* $p < 0,05$  Mann-Whitney-*U*-Test). 42 % aller Mikroglia-Zellen am d3V wurden nach der Ischämie neu gebildet, aber nur 21 % am v3V. Trotz der höchsten Anzahl von BrdU-positiven Zellen am LV, wurden nur 11 % aller BrdU-Zellen als Mikroglia charakterisiert.

#### 14 Tage nach der Ischämie

Für die Untersuchung des Vorkommens von Mikroglia und Makrophagen zu einem späteren Zeitpunkt nach der Ischämie wurden Tiere 14 Tage nach der Ischämie verwendet. Diese Tiere erhielten kein BrdU, so dass keine Aussagen hinsichtlich der Proliferation von Mikroglia-Zellen getroffen wurden. Es wurden lediglich qualitative Aussagen über die Verteilung von Mikroglia-Zellen im Hippokampus und Striatum getroffen (Abb. 32).

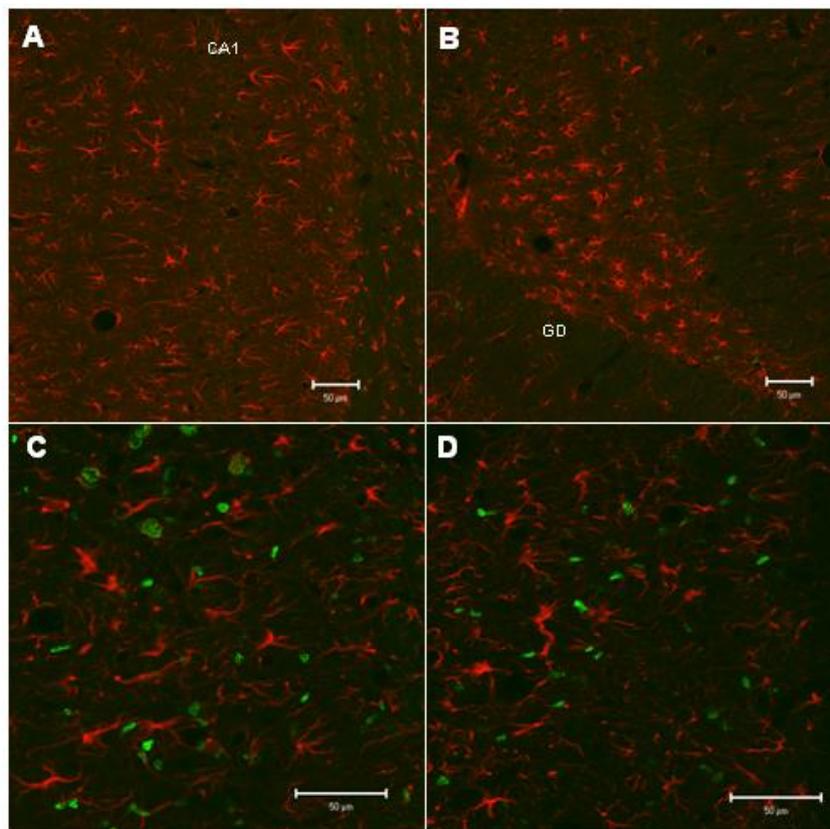
Auch zu diesem späteren Zeitpunkt (14 Tage) nach der Ischämie wurde eine hohe Anzahl von Mikroglia/Makrophagen-Zellen in allen hippokampalen Regionen und im Striatum beobachtet. Eine sehr stark ausgeprägte Färbung wurde im *Stratum moleculare* (Abb. 32A) erzielt. Ob es sich bei den Mikrogliazellen um neugebildete Mikrogliazellen handelt, kann aufgrund der fehlenden Injektion von BrdU (Proliferationsmarker) nicht beantwortet werden.



**Abb. 32:** Darstellung von Mikroglia/Makrophagen-Zellen 14 Tage nach Ischämie. Die Tiere erhielten keine Injektion von BrdU, so dass keine Aussage hinsichtlich der Proliferation von Mikroglia/Makrophagen getroffen werden kann. In Abbildung (A) wird eine Übersicht der Verteilung von OX-42-positiven Zellen im Hippokampus dargestellt. Im CA1-Band (B) und im Hilus (C) der hippocampalen Formation wurde 14 Tage nach der Ischämie die größte Anzahl von OX-42-positiven Zellen detektiert. Im weiter entfernten Striatum (E) und an der SVZ des lateralen Ventrikels (D) wurde eine Vielzahl von Mikroglia/Makrophagen festgestellt.

### 3.3.6 Aktivierung und Proliferation von Astrozyten nach globaler Ischämie

Für die Untersuchung der Proliferation und der Aktivierung von Astrozyten nach globaler Ischämie wurden Tiere drei und 14 Tage nach der Ischämie verwendet. Es wurden Schnitte von Tieren, die drei Tage nach der Ischämie bzw. Scheinoperation perfundiert wurden, hinsichtlich der Aktivierung, Verteilung und Proliferation von GFAP-positiven Astrozyten im Vorderhirn untersucht. Dafür wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung gegen die Antikörper GFAP und BrdU durchgeführt.

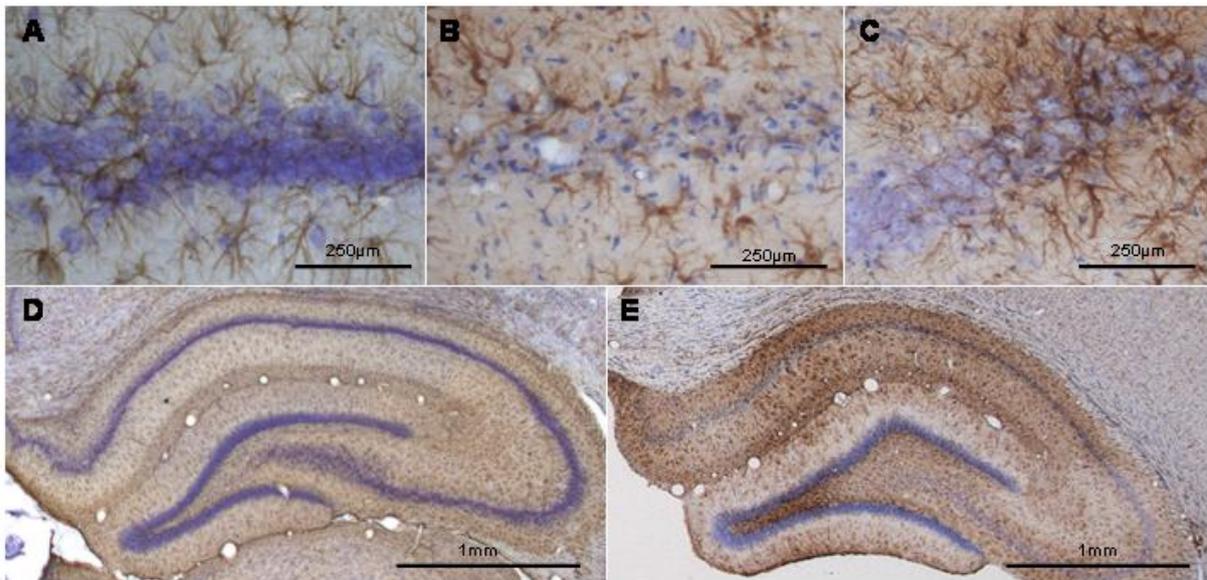


**Abb. 33:** Expression von BrdU (grün) und GFAP (rot) drei Tage nach der Ischämie (C, D). Unter Kontrollbedingungen wurde im CA1-Band (A), im *Gyrus dentatus* und Hilus (B) eine geringe Anzahl proliferierender Zellen und eine gleichmäßige Verteilung von sternförmigen GFAP-positiver Astrozyten festgestellt, die nicht doppelt markiert waren. Drei Tage nach der Ischämie wurde eine Erhöhung der proliferierenden Zellen im CA1-Band (C) und im *Gyrus dentatus*/Hilus (D) gezeigt. Eine Doppelmarkierung wurde hingegen aber nicht detektiert.

In scheinoperierten Tieren (Abb. 33 A, B) wurde nur eine geringe Anzahl von BrdU-positiven Zellen im *Gyrus dentatus* detektiert, die keine Doppelmarkierung mit dem glialen Marker GFAP aufwiesen. Ischämische Tiere zeigten eine größere Anzahl von BrdU-positiven Zellen im gesamten Vorderhirn (siehe Kapitel 3.3.2) und die Astrozyten waren im Vergleich zur Kontrollgruppe vergrößert (hypertrophe Astrozyten) (Abb. 33C, D). Trotz der hohen Anzahl

von BrdU-positiven Zellen drei Tage nach der Ischämie wurden nur vereinzelt Doppelmarkierungen des glialen Markers GFAP und des Proliferationsmarkers BrdU festgestellt.

Da man drei Tage nach Ischämie nur eine Vergrößerung und keine Proliferation der Astrozyten sah, wurde mit den Schnitten von Tag 14 nach Ischämie eine immunhistochemische Färbung nach dem Prinzip der Avidin-Biotin-Methode mit dem Astrozytenmarker GFAP und ohne dem Proliferationsmarker BrdU (Kapitel 2.8.3) (Abb. 34B, C, E) durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Toluidinblaufärbung.



**Abb.34:** Darstellung der hippocampalen Formation 14 Tage nach der Ischämie bzw. Scheinoperation mit Hilfe der immunhistochemischen Avidin-Biotin-Methode und anschließender Toluidinblaufärbung. In Abbildung (A) sind die Neurone kräftig blau angefärbt und die braun gefärbten GFAP-positiven Astrozyten gleichmäßig im CA1-Band und dem gesamten Hippokampus verteilt (D). Im Gegensatz dazu ist ein Großteil der Neurone nach Ischämie (B) abgestorben und nur noch vereinzelt im CA1-Band vorhanden. Die Astrozytenanzahl im CA1-Band und *Stratum moleculare* (E) nimmt nach Ischämie deutlich zu, aber auch die Morphologie ändert sich nach der Ischämie. Die Astrozyten ändern ihre sternförmige Gestalt in angeschwollene Zellen. Der Übergang vom Schadensgebiet der CA1/CA2 zur gesunden CA3-Region (C) wird sowohl durch die runden Neurone (links) als auch durch die abnehmende Anzahl von GFAP-positiven Astrozyten deutlich.

14 Tage nach der Scheinoperation (Abb. 34A, D) wurde eine gleichmäßige Verteilung von GFAP-positiven Astrozyten im Gehirn festgestellt. Die Astrozyten zeigten eine typisch sternförmige Gestalt und es wurde keine Konzentrierung der Astrozyten in einer bestimmten Region im Gehirn beobachtet. Nach Ischämie zeigte sich jedoch ein anderes Bild. Die GFAP-positiven Astrozyten waren 14 Tage nach Ischämie angeschwollen, hatten aber noch ihre sternförmige Gestalt und waren nicht mehr gleichmäßig im Gehirn verteilt (Abb. 34B). In Abb. 34E kann man eine Konzentrierung von Astrozyten im geschädigten CA1-

Pyramidenzellband bis zur *Fissura hippocampi* und im Hilus erkennen. Im CA1-Band (Abb. 34B, C) wurde der neuronale Zelltod bis zum gesunden CA3-Band mit Hilfe der Toluidinblaufärbung eindeutig dargestellt. Der Eindruck des massiven Schadens wurde durch die selektiv angehäuften Ansiedlung der Astrozyten im geschädigten Gebiet unterstützt.

### **3.3.7 Doppelmarkierung von Nestin und dem Astrozytenmarker GFAP nach globaler Ischämie**

Aufgrund der Konzentrierung der Astrozyten im Schadensgebiet und im Hilus und der geringen Proliferation von GFAP-positiven Astrozyten drei Tage nach der Ischämie wurden weitere Untersuchungen 1, 3 und 14 Tagen nach der Ischämie durchgeführt. Hierzu wurden die Astrozyten hinsichtlich einer Re-Expression des Intermediärfilament-Markers Nestin untersucht.

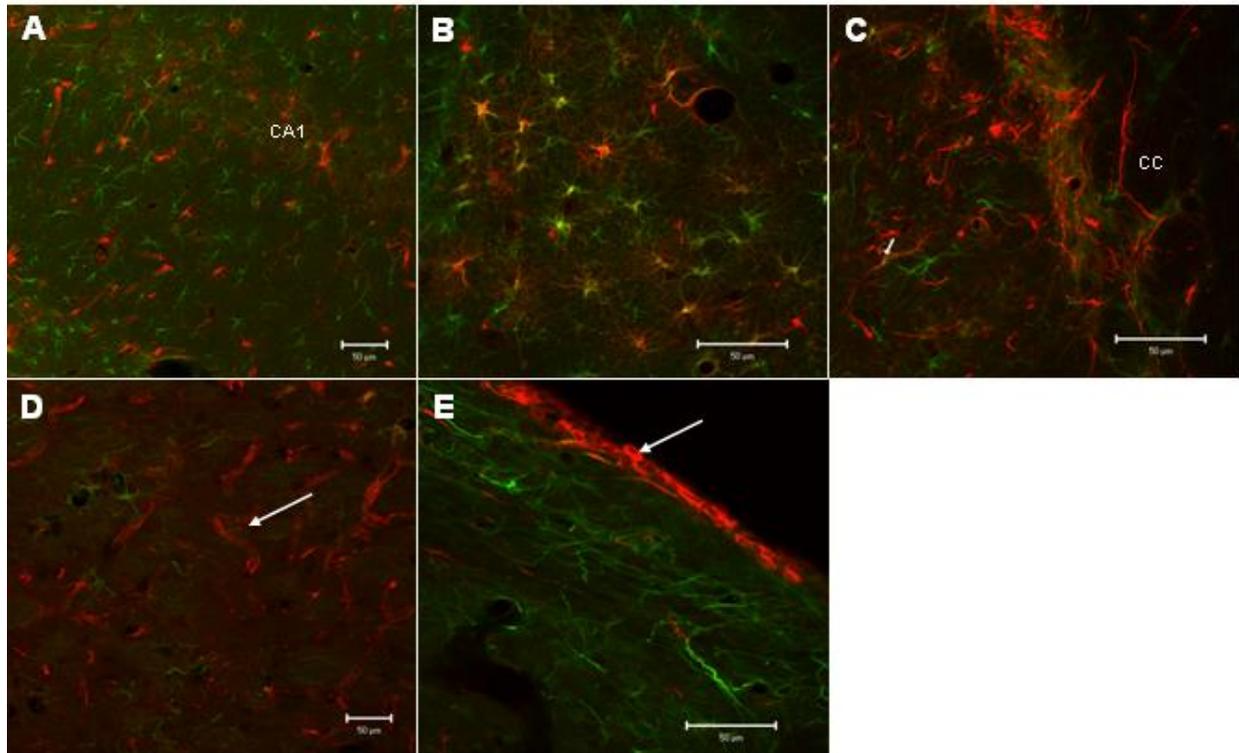
#### 1 Tag nach der Ischämie

Mit den Schnitten der Tiere, die einen Tag nach der Ischämie dekapitiert wurden, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen den glialen Marker GFAP und den Interfilament-Marker Nestin durchgeführt und qualitativ an einem Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop ausgewertet.

In scheinoperierten Tieren wurde eine gleichmäßige Verteilung von sternförmigen GFAP-positiven Zellen im gesamten Gehirn detektiert. An den Proliferationszonen *des Gyrus dentatus* und LV sowie am v3V wurden vereinzelt Nestin- positive Zellen festgestellt, die nicht mit dem glialen Marker GFAP doppelt markiert waren.

In ischämischen Tieren wurde eine Verteilung von GFAP-positiven Zellen im Gehirn beobachtet, die der scheinoperierter Tiere gleich. Allerdings wurden im Hilus (Abb. 35B) angeschwollene (hypertrophe) Astrozyten analysiert, die teilweise mit dem Intermediärfilament-Marker Nestin doppelt markiert waren. Im CA1- Pyramidenzellband, *Fissura hippocampi*, *Gyrus dentatus*, Striatum und an den Ventrikelwänden des d3V, v3V und LV wurde einen Tag nach Ischämie eine signifikante Zunahme verschiedener Formen von Nestin- positiven Zellen lokalisiert, die fast nie mit dem glialen Marker GFAP doppelt markiert waren. Im CA1-Pyramidenzellband (Abb. 35A), *Fissura hippocampi* und im Striatum (am *Corpus callosum*, Abb. 35C) wurden stern- bis fadenförmige Nestin-positive Zellen detektiert. Neben dieser Morphologie wurden im Striatum große röhrenförmige Gebilde (Abb. 35D) detektiert, die Nestin-positiv waren und der Morphologie von

Blutgefäßen glichen. In der Ependymzellschicht an allen Ventrikelwänden (Abb. 35E) wurden kleine, runde und ohne Ausläufer versehene Nestin- positive Zellen festgestellt.



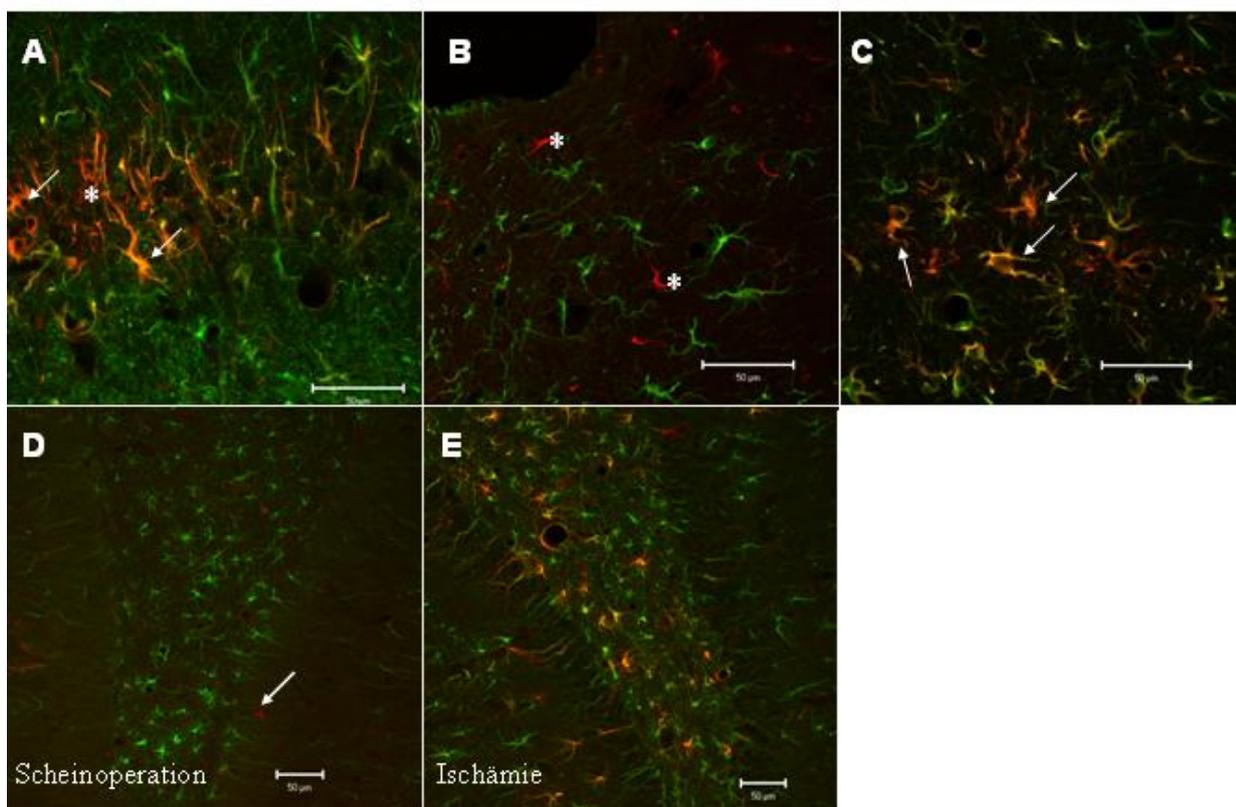
**Abb. 35:** Expression von GFAP (grün)- und Nestin-positiven (rot) Zellen im Vorderhirn der Ratte einen Tag nach der Ischämie. Im CA1-Pyramidenzellband (A), Striatum (C, D) und an der Ventrikelwand des dorsalen 3.Ventrikel (E) wurde in der Ischämiegruppe eine signifikante Zunahme von Nestin-positiven Zellen lokalisiert, die fast nie mit dem glialen Marker GFAP doppelt markiert waren. Im Hilus (B) wurden angeschwollene (hypertrophe) Astrozyten beobachtet, die teilweise mit dem Intermediärfilament-Marker Nestin doppelt markiert waren. Zusätzlich wurden im Striatum (D) große, röhrenförmige Gebilde gesichtet, die Nestin-positiv waren und der Morphologie von Blutgefäßen glichen. In der Ependymzellschicht der Ventrikelwand des d3V (E) wurden kleine, runde und ohne Ausläufer versehene Nestin-positive Zellen festgestellt.

### Drei Tage nach der Ischämie

Alle Ergebnisse der quantitativen Analyse der Expression der Marker GFAP, Nestin und deren Doppelmarkierung drei Tage nach der Ischämie sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Wie bereits im 3.3.6 beschrieben, wurde unter Kontrollbedingungen eine typische Verteilung von Astrozyten (GFAP-positiv) im Gehirn gefunden und drei Tage nach der Ischämie ein Anschwellen der Astrozyten und eine damit verbundene Änderung der Morphologie (hypertrophe Astrozyten) beobachtet. Reaktive Astrozyten wurden im CA1-Pyramidenzellband, im Hilus und im Striatum drei Tage nach der Ischämie festgestellt (Abb. 36A, C, E). Des Weiteren wurde ein signifikanter Anstieg von GFAP-positiver Astrozyten im CA1-Band, im *Gyrus dentatus* und im Striatum detektiert. Ungefähr 90% der Astrozyten im

CA1-Band und Striatum waren mit Nestin doppelt markiert. Nicht nur die Expression von GFAP-positiven Zellen stieg drei Tage nach der Ischämie signifikant an, sondern auch die Expression von Nestin (Tabelle 11). Im CA1-Pyramidenzellband, im Hilus und im Striatum waren 60-90 % aller Nestin-positiven Zellen mit GFAP-positiven Zellen doppelt markiert. In der *Fissura hippocampi* (Abb. 36 B) und im *Gyrus dentatus* (Abb.36 D) wurde ebenfalls eine signifikante Zunahme von Nestin-positiven Zellen nachgewiesen, die zu 35 % und 48 % mit GFAP-positiven Zellen doppelt markiert waren. An allen Ventrikelwänden wurden Nestin- und GFAP-positive Zellen beobachtet, die hauptsächlich nebeneinander lokalisiert waren und nur in geringer Zahl Doppelmarkierungen aufwiesen.



**Abb. 36:** Doppelimmunfluoreszenz-Färbung gegen Nestin (rot) und GFAP (grün) drei Tage nach der Ischämie. Die Gliazellen im CA1-Band (A) und im Striatum (C) waren hauptsächlich GFAP/Nestin-positiv (gelb; Beispiele durch Pfeil markiert). In der *Fissura hippocampi* (B) war eine große Anzahl von Nestin- und GFAP-positiven Zellen sichtbar, die aber fast keine Doppelmarkierung zeigten. Nestin-positive/GFAP-negative Zellen sind durch Sternchen markiert. In den Abbildungen C und D wird die Expression von GFAP und Nestin im *Gyrus dentatus* und Hilus nach Scheinoperation (D) und Ischämie (E) dargestellt. In den scheinoperierten Tieren wurde nur eine geringe Anzahl von Nestin-positiven Zellen im *Gyrus dentatus* festgestellt (Pfeil), die aber nicht mit GFAP doppelt markiert waren. Im Gegensatz dazu wurde eine hohe Expression von Nestin- und GFAP/Nestin-positiver Zellen nach Ischämie festgestellt.

In scheinoperierten Tieren wurden nur einige wenige Nestin-positive Zellen in allen untersuchten Gebieten detektiert. Diese waren hauptsächlich im *Gyrus dentatus* (Abb. 36D)

und an den Ventrikelwänden des v3V und LV zu finden. Die Morphologie war klein, rund, ohne Ausläufer und es wurde nur vereinzelt eine Doppelmarkierung mit GFAP festgestellt.

	GFAP		Nestin		GFAP/Nestin	
	Schein-operation	Ischämie	Schein-operation	Ischämie	Schein-operation	Ischämie
<b>CA1</b>	52,7 ± 2,2	130,9 ± 4,8 **	0,4 ± 0,2	145,5 ± 2,2 **	0	121,5 ± 7,5 **
<b>Fissura hippocampi</b>	88,1 ± 4,9	89,5 ± 3,6	1,6 ± 0,6	73,6 ± 3,3 **	0,1 ± 0,1	35,5 ± 5,6 **
<b>v3V</b>	125,7 ± 4	122,4 ± 5,2	100,5 ± 10	151,5 ± 8,5 *	1,7 ± 0,7	6,3 ± 1,4 *
<b>d3V</b>	121,7 ± 3,2	103,5 ± 8,7	12,5 ± 5,6	64,5 ± 3,1 *	0,2 ± 0,1	21,1 ± 1,4 *
<b>DG</b>	61,1 ± 2,8	74,9 ± 3 **	3 ± 0,7	42,5 ± 4,7 **	0,5 ± 0,1	14,6 ± 2,5 **
<b>Hilus</b>	95,3 ± 4,3	100,2 ± 5,9	0,7 ± 0,6	87,6 ± 3,5 **	0,1 ± 0,1	51,7 ± 3,8 **
<b>LV</b>	112,4 ± 4,3	108,5 ± 3	75,1 ± 6,1	113,3 ± 5,9 **	1 ± 0,2	3,9 ± 1,7
<b>Striatum</b>	67,5 ± 2,3	89,3 ± 2,4 **	0,1 ± 0,1	85,9 ± 4,5 **	0	78,4 ± 5,9 **

**Tabelle 11:** Anzahl von GFAP-, Nestin- und GFAP/Nestin-positiven Zellen drei Tage nach Scheinoperation bzw. nach Ischämie. Die Zellen wurden in drei Schnitten pro Tier an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gezählt. Die Zellen in CA1, ventraler 3.Ventrikel (v3V), dorsaler 3.Ventrikel (d3V), *Gyrus dentatus* (DG) und lateraler Ventrikel (LV) wurden entlang von 800 µm gezählt. In der *Fissura hippocampi*, im Hilus und im Striatum wurden die markierten Zellen pro 0,08 mm<sup>2</sup> wiedergegeben. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Die signifikanten Unterschiede zwischen den scheinoperierten und ischämischen Tiere sind durch \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 dargestellt (Mann-Whitney-U-Test).

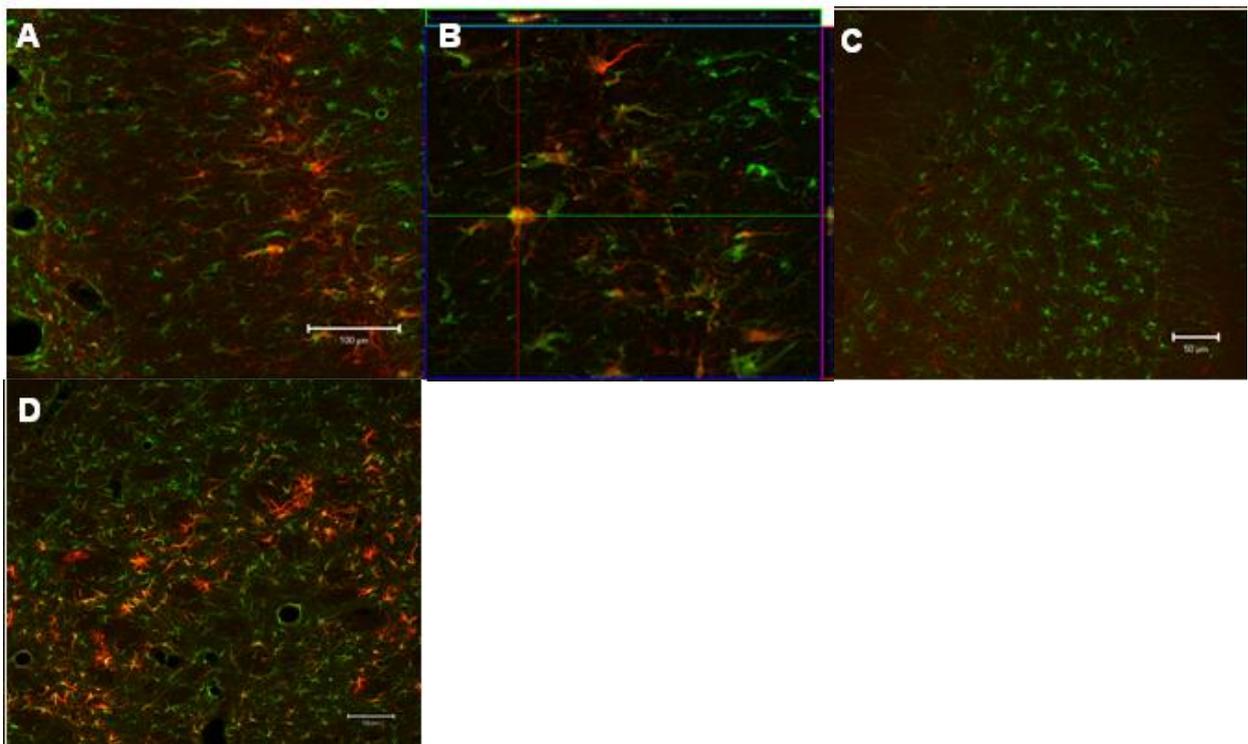
#### 14 Tage nach der Ischämie

Für die Untersuchung des späten Zeitpunktes wurden Tiere 14 Tage nach der Ischämie verwendet, eine Immunfluoreszenzfärbung gegen den glialen Marker GFAP und den Interfilament-Marker Nestin durchgeführt und qualitativ an einem Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop ausgewertet.

In scheinoperierten Tieren wurde eine gleichmäßige Verteilung von sternförmigen GFAP-positiven Zellen im gesamten Gehirn beobachtet. An den Proliferationszonen *des Gyrus*

*dentatus* und LV sowie am v3V wurden vereinzelt Nestin- positive Zellen festgestellt, die nicht mit dem glialen Marker GFAP doppelt markiert waren.

In den ischämischen Tieren wurde wieder eine Vielzahl von Nestin- positiven Zellen im Hippokampus detektiert. Im CA1-Band (Abb. 37A, B) und im Striatum (Abb. 37D) waren die meisten Nestin-positiven Zellen mit dem astrozytären Marker GFAP doppelt markiert. In der *Fissura hippocampi* (Abb. 37A, ganz links) wurde eine große Anzahl von Nestin- und GFAP-positiven Zellen festgestellt, die aber fast keine Doppelmarkierung zeigten. Im *Gyrus dentatus* und im Hilus (Abb. 37C) wurden 14 Tage nach der Ischämie nur eine geringe Anzahl von Nestin-positiven Zellen markiert, die nicht mit GFAP doppelt markiert waren.



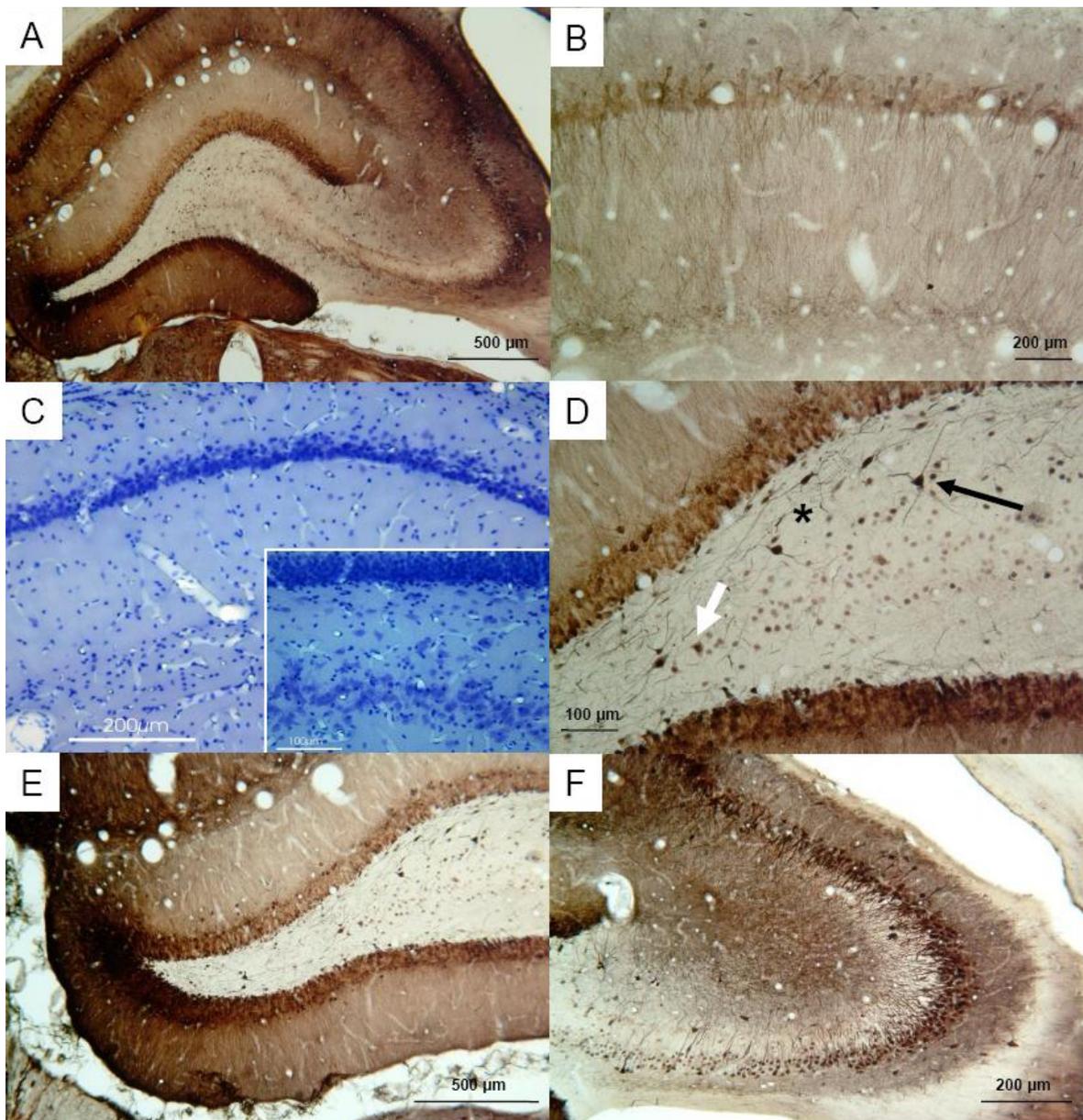
**Abb. 37:** Doppelimmunfluoreszenz-Färbung gegen Nestin (rot) und GFAP (grün) 14 Tage nach der Ischämie. Im CA1-Band (A, B) und im Striatum (D) war ein Großteil der Nestin-positiven Zellen auch für GFAP positiv. In der *Fissura hippocampi* (A, ganz links) war eine große Anzahl von Nestin- und GFAP-positiven Zellen sichtbar, die aber fast keine Doppelmarkierung zeigten. Im *Gyrus dentatus* und im Hilus (C) wurde nur eine geringe Anzahl von Nestin-positiven Zellen festgestellt, die nicht mit GFAP doppelt markiert waren. Im Striatum (D) wurde eine große Anzahl von Nestin positiven Zellen detektiert, die zum Teil mit dem astrozytären Marker GFAP doppelt markiert waren.

### 3.4 Autometallographischer Nachweis von Thallium nach globaler Ischämie

#### 3.4.1 Naive Tiere

Die Visualisierung des  $K^+$ -Metabolismus mit Hilfe der Thallium Autometallographie in Hirnschnitten naiver Tiere ergab in Abhängigkeit von der hippokampalen Subregion ein deutliches Muster unterschiedlicher Färbeintensität. Die absolute Färbeintensität in einem Schnitt war abhängig von der Inkubationszeit der Schnitte in dem lipophilen Metall Chelator DEDTC. Mit dem Inkubationsschritt wurde ein größerer Spielraum in der Darstellung der unterschiedlichen Thalliumkonzentrationen ermöglicht. Dadurch wurde der Unterschied in den verschiedenen Regionen des Hippokampus hinsichtlich einer höheren oder niedrigeren Thalliumaufnahme deutlicher (Abb. 38A, B).

Die CA1-Region der naiven Tiere wurde vollständig und sehr intensiv angefärbt (Abb. 38A), wobei bei einer längeren Inkubationszeit mit DEDTC einzelne Pyramidenzellen mit verschiedenen Färbeintensitäten deutlich hervortraten (Abb. 38B). Auch die Dendriten im *Stratum radiatum* waren sehr deutlich sichtbar. Das *Stratum moleculare* wurde relativ hell und homogen angefärbt (Abb. 38A, E). Der Hilus und die Moosfasern wurden nahezu nicht angefärbt, aber kleine dunkle Zellkörper setzten sich in diesen Gebieten deutlich ab (Abb. 38A, D, E). Die Färbung des neuronalen Bandes in der CA3/CA4-Region der hippokampalen Formation unterschied sich deutlich von der CA1/CA2-Region: anstatt deutlich angefärbter Zellkörper und Neurite wurden nur kleine, dunkle, runde Punkte mit heller Hülle beobachtet (Abb. 38D-F). Diese unterschiedliche Färbung der CA-Regionen der hippokampalen Formation wurde auch in ischämischen Tieren festgestellt. Im Hilus wurden außerdem einzelne vollständig angefärbte Neurone mit vergrößerten Ausläufern (wahrscheinlich Interneurone) beobachtet (Abb. 38D-F). An der Spitze des *Gyrus dentatus*, in der Nähe des *Subiculum*, wurden die Neurone der Körnerzellschicht am intensivsten angefärbt (Abb. 38A, E) und das untere Blatt des *Gyrus dentatus* wurde im Vergleich zum oberen Blatt dunkler angefärbt (Abb. 38A, D, E). Außerdem wurden die Neurone am Rande der Körnerzellschicht ebenfalls dunkler angefärbt als im Inneren (Abb. 38D, E). Die oben beschriebene, spezifisch unterschiedliche Anfärbungen in der hippokampalen Formation wurde in Schnitten, die mit Toluidinblau angefärbt wurden nicht festgestellt (Abb. 38C).



**Abb. 38:** Autometallographischer Nachweis von Thallium der hippocampalen Formation von naiven Tieren. In (A) wird eine Übersicht der hippocampalen Formation dargestellt. In Abb. B wird das CA1-Band (B) in einer höheren Vergrößerung dargestellt. Eine Nissl-Färbung des CA1-Bandes/*Stratum radiatum* zeigt die Abb. C und in der kleinen integrierten Abbildung wird das obere Blatt des *Gyrus dentatus* mit Hilus dargestellt. Die Hilus-Region wird in Abb. D vergrößert dargestellt. Der schwarze Pfeil markiert eine Zelle, die eine exzitatorische Moosfaserzelle darstellt. Das Sternchen markiert eine Hilus-Tractus perforans-assoziiierende Zelle. Der weiße Pfeil zeigt ein Neuron im Hilus an, in dem der  $K^+$ -Tracer im Nukleus, im Soma und in den Neuriten deutlich zu sehen ist. Mit der  $Tl^+$ -Färbung wurden Unterschiede hinsichtlich der Intensität im *Gyrus dentatus* festgestellt. Das untere Blatt und die Spitze des *Gyrus dentatus* wurden stets intensiver angefärbt als das obere Blatt des *Gyrus dentatus*. In Abb. F wird die CA3-Region dargestellt, in der der Übergang der unterschiedlichen sub-zellulären Färbemuster beobachtet werden kann. In der Wölbung der CA3-Region wurden deutlich angefärbte Zellkörper beobachtet, wohingegen im Hilus nur kleine punktförmige Zellen festgestellt werden konnten.

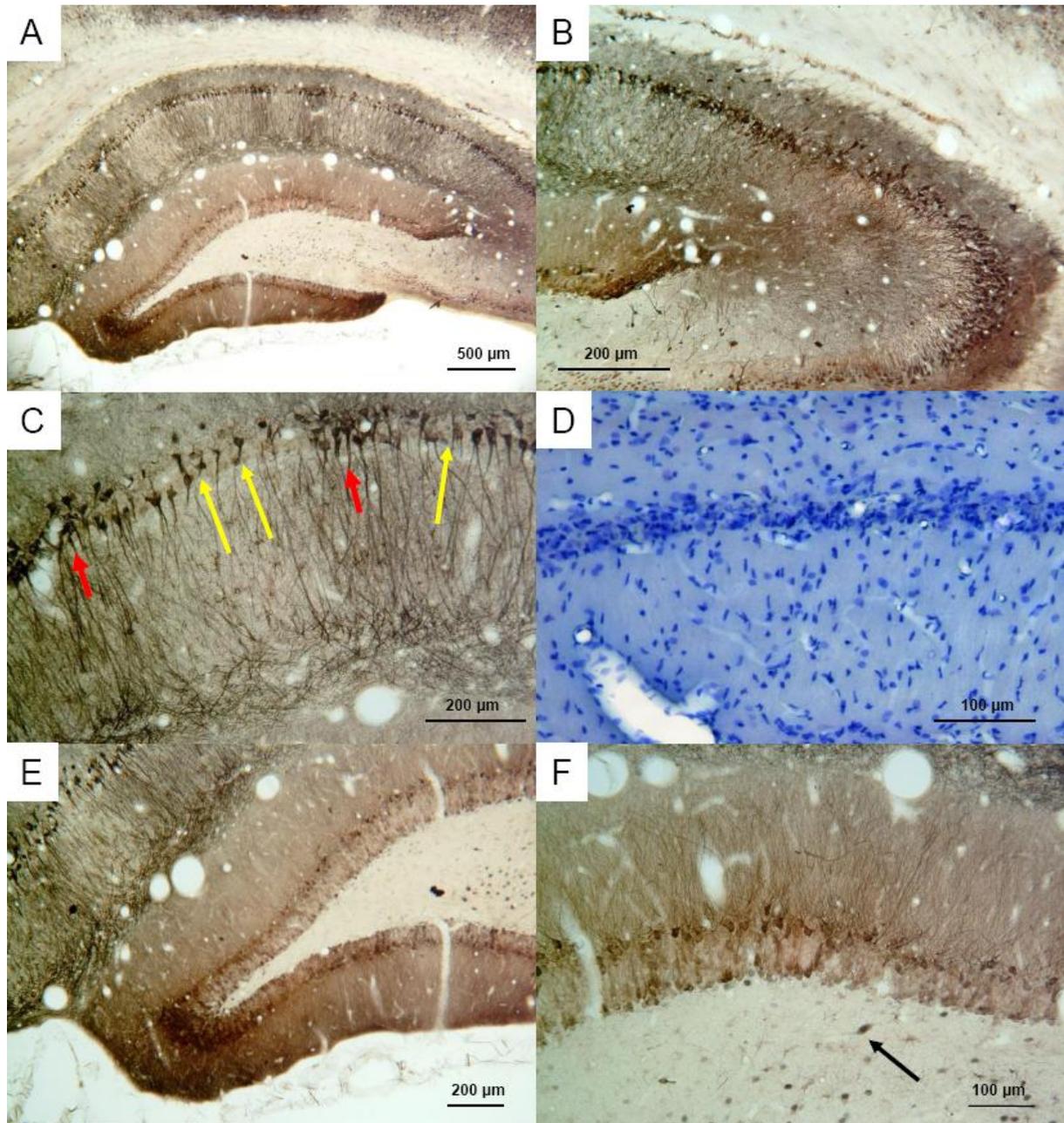
### 3.4.2 Ischämische Tiere

Für die Untersuchung des autometallographischen Nachweises von Thallium nach einem ischämischen Insult wurden Tiere wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben 14 und 56 Tage nach der Ischämie perfundiert und die Gehirne histologisch aufgearbeitet. Bei der Analyse der gefärbten Schnitte der einzelnen Tiere 14 Tage nach der Ischämie wurden Unterschiede hinsichtlich der Färbung in Abhängigkeit von der Stärke des ischämischen Insultes festgestellt. Aufgrund dessen wurde bei der weiteren Betrachtung der Ergebnisse eine Unterscheidung hinsichtlich eines partiellen und eines totalen CA1-Schaden getroffen.

#### 3.4.2.1 14 Tage nach globaler Ischämie mit partiellem CA1-Schaden

Aufgrund der normalen Variabilität des Ischämiemodells, wurden in der ischämischen Gruppe Tiere mit einem partiellen Schaden festgestellt. In den Schnitten dieser Tiere wurden interessanterweise vertikale streifenförmige Färbungen in der CA1-Region und im *Stratum radiatum* beobachtet (Abb. 39A, C). Überlebende Neurone waren nicht gleichmäßig sondern in Anhäufungen (=Cluster) in der CA1-Region verteilt. Sowohl die Somata als auch die Dendriten der gesunden Neurone waren positiv für Thallium angefärbt. Aufgrund der Clusterförmigen Verteilung der gesunden Neurone nach einem partiellen Schaden im CA1-Band wurde die streifenförmige Färbung im Hippokampus hervorgerufen. Dieses Färbemuster wurde in naiven Tieren und nach totalem Schaden nicht festgestellt. Zum Vergleich wurden Hippokampusschnitte von Tieren mit partiellem Schaden mit Toluidinblau angefärbt (Abb. 39D). Hier ist die Clusterförmige Anordnung der gesunden Neurone im CA1-Band nur schwer zu erkennen. Die streifenförmige Färbung der Dendriten im *Stratum radiatum* konnte in den Schnitten nach einer Nissl-Färbung nicht detektiert werden.

Im *Gyrus dentatus* wurde nach Ischämie die nahezu gleiche Färbung wie in naiven Tieren beobachtet: in der Nähe des *Subiculum* wurde die intensivste Färbung festgestellt, das untere Blatt des *Gyrus dentatus* war dunkler angefärbt. Außerdem wurden im Körnerzellband die Neurone am Rand stärker gefärbt als in der Mitte des Bandes (Abb. 39F). Im Hilus mit der CA4/CA3-Region wurde wieder eine ungewöhnliche punktförmige  $Tl^+$ -Färbung festgestellt, die wie eine Kernfärbung aussah.

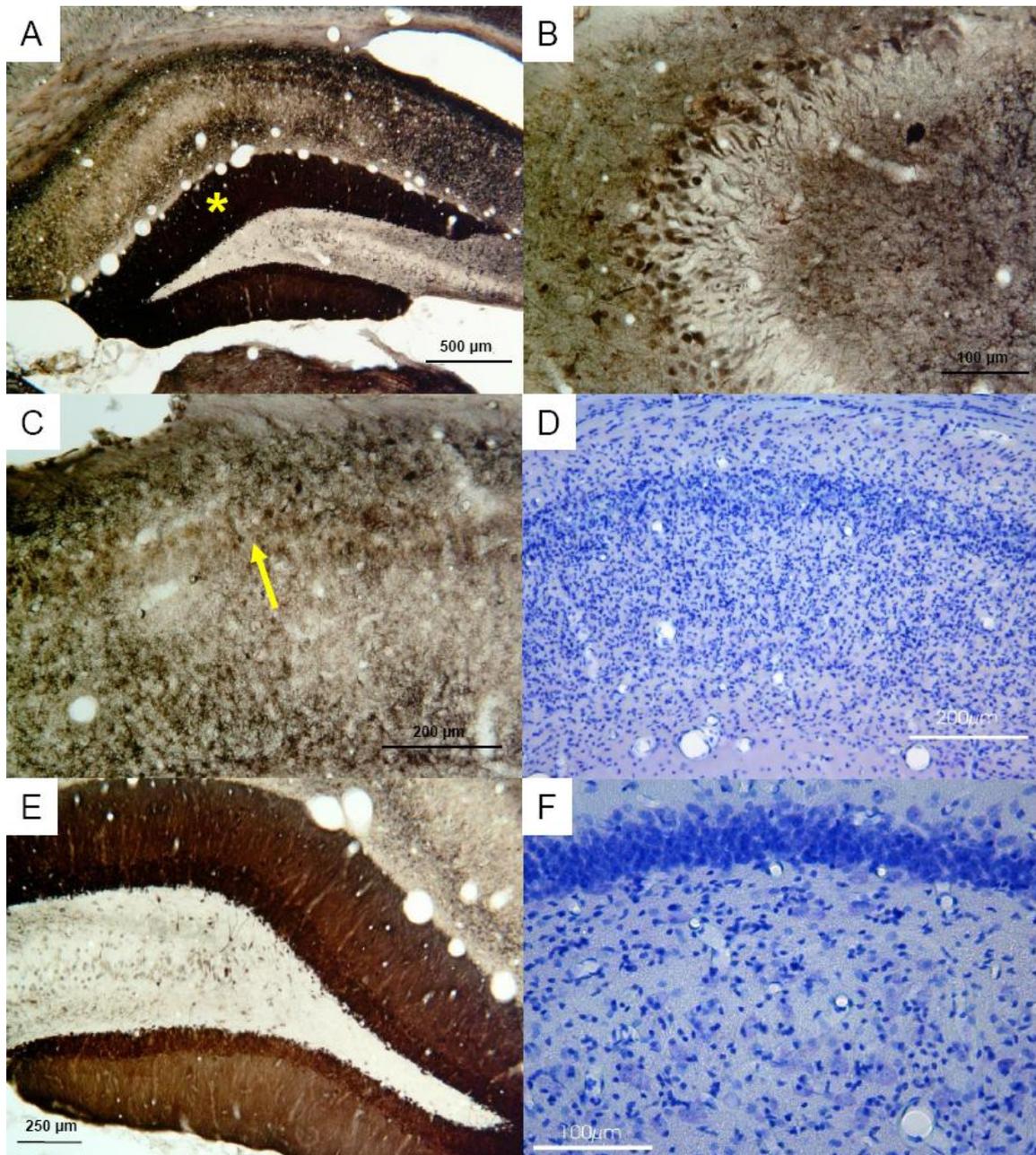


**Abb. 39:** Autometallographischer Nachweis von Thallium der hippocampalen Formation 14 Tage nach der Ischämie mit einem partiellen CA1-Schaden. In Abb. A wird in der Übersichtsdarstellung die streifenförmige Färbung in der CA1/*Stratum radiatum*-Region deutlich. Die CA3-Region (B) wurde vergleichsweise wie in naiven Tieren angefärbt. In Abb. C wird die partiell geschädigte CA1-Region vergrößert dargestellt: sowohl die in Cluster angeordneten überlebenden Neurone (rote Pfeile) und deren Dendriten wurden stark angefärbt. Hingegen wurden die Regionen mit weniger überlebender Neurone und deren Dendriten weniger stark angefärbt (gelbe Pfeile). Dadurch entstand das streifenförmige Färbemuster. Mit der Nissl-Färbung (D) konnte die streifenförmige Markierung nicht beobachtet werden. In Abb. E und F wird die Region des *Gyrus dentatus* mit dem Hilus dargestellt, die wie in naiven Tieren angefärbt wurde. Es sollte aber beachtet werden, dass im Hilus nur noch wenige intensiv angefärbte Interneurone (Pfeil in F) und kein dendritisches Netzwerk vorzufinden waren.

### 3.4.2.2 14 Tage nach globaler Ischämie mit totalem CA1-Schaden

Tiere, die 14 Tage nach der Ischämie einen vollständigen CA1 Schaden zeigten, wiesen mit dem autometallographischen Nachweis von Thallium ein vollkommen anderes Bild auf als die Tiere mit einem partiellen Schaden. Das *Stratum moleculare* und die Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* waren intensiv und vollständig dunkel angefärbt und somit positiv für Thallium (Abb. 40 A, E). Diese Intensität der Färbung wurde weder in naiven Tieren, 14 Tage nach Ischämie mit Teilschaden oder nach 56 Tagen beobachtet. Im Vergleich zu den naiven und den ischämischen Tieren (14 Tage) mit einem Teilschaden konnte 14 Tage nach Ischämie mit einem vollständigen Schaden kein offensichtlicher Unterschied zwischen dem oberen und unteren Blatt des *Gyrus dentatus* festgestellt werden.

In der CA1-Region konnte weder mit der Thallium- noch mit der Nissl-Färbung eine Cluster-Bildung von gesunden Neuronen nachgewiesen werden (Abb. 40A, C, D), jedoch wurde auch hier eine streifenförmige Anfärbung von Gliazellen beobachtet (Abb. 40A.). Interessanterweise konnte mit beiden Färbemethoden eine hohe Anzahl von Glia-ähnlichen Zellen in der CA1-Region/*Stratum radiatum* und in der CA3-Region/*Stratum lucidum* detektiert werden (Abb. 40A, B, C). Im Hilus wurde mit der Nissl-Färbung ebenfalls eine hohe Anzahl von kleinen Zellkernen (Glia-ähnlich) beobachtet, die aber negativ für Thallium waren (Abb. 40E). Dort wurde außerdem nur eine geringe Anzahl von Interneuronen detektiert.



**Abb. 40:** Autometallographischer Nachweis von Thallium der hippocampalen Formation 14 Tage nach der Ischämie mit einem totalen CA1-Schaden.

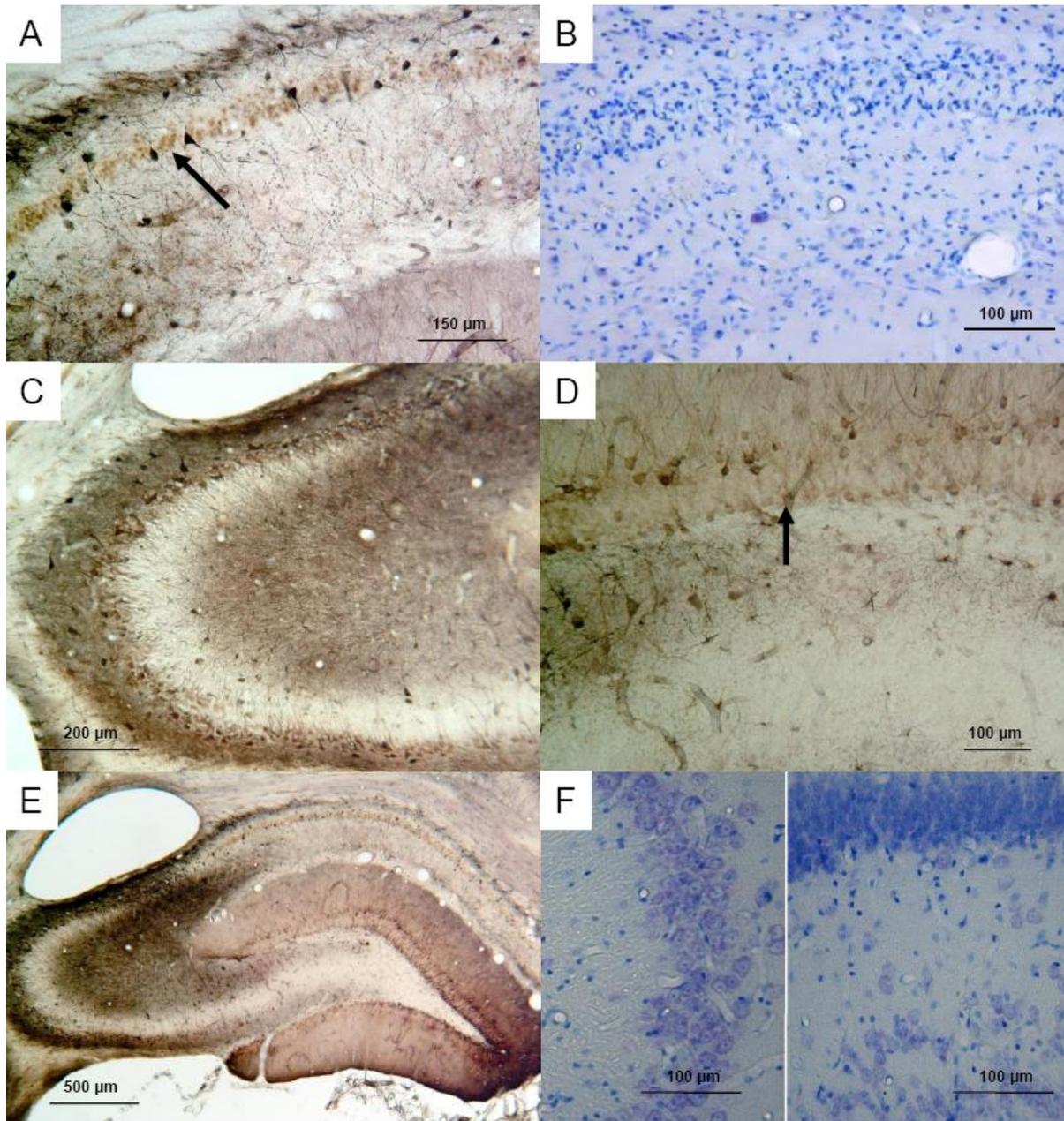
In Abb. A wird eine Übersichtsdarstellung des Hippokampus gezeigt. Die *Stratum moleculare*/Körnerzellregion war die am stärksten angefärbte Region (gelber Stern). Die CA1/*Stratum radiatum*-Region wurde wieder ungleichmäßig angefärbt. Die  $Tl^{+}$ -Färbung in der CA3-Region (B) sah wieder unauffällig aus, jedoch schien das neuronale Band dünner zu sein und die markierten Zellen im *Stratum lucidum* wiesen eine gliale Morphologie auf. Bei der Betrachtung einer höheren Vergrößerung der CA1/*Stratum radiatum*-Region (C) wurde eine ungleichmäßige Verteilung von markierten Gliazellen deutlich. Der gelbe Pfeil deutet auf die CA1-Region. Bei der Nissl-Färbung (D) wurde jedoch keine streifenförmige Färbung sichtbar, aber auch hier wurde die hohe Verteilung der Gliazellen deutlich. In Abb. E wird die  $Tl^{+}$ -Färbung im *Gyrus dentatus* und Hilus dargestellt. Die Körnerzellschicht wurde am stärksten angefärbt und es wurden keine Unterschiede mehr hinsichtlich der Intensität des oberen und unteren Blattes des *Gyrus dentatus* sichtbar. Im Hilus wurden nur wenige Interneurone angefärbt und Glia-ähnliche Zellen waren auch nicht vorhanden. In der Nissl-Färbung des *Gyrus dentatus*/Hilus wurde keine morphologische Auffälligkeit der Körnerzellen beobachtet, jedoch wurde eine hohe Anzahl von Gliazellen im Hilus detektiert

### 3.4.2.3 56 Tage nach globaler Ischämie mit totalem CA1-Schaden

Sechsfundfünfzig Tage nach dem ischämischen Insult wiesen die angefärbten Schnitte mit komplettem CA1-Schadens wieder ein vollkommen neues Bild auf. Das *Stratum moleculare* war nicht mehr so intensiv angefärbt wie nach 14 Tagen. In der CA1-Region konnten nur noch vereinzelt gesunde Neurone (Abb. 41B) festgestellt werden, die ein stark angefärbtes Somata, aber interessanterweise nur fragmentartig angefärbte Dendriten aufwiesen (Abb. 41A).

In der CA1/*Stratum radiatum*-Region wurde 56 Tage nach der Ischämie keine  $TI^+$ -positive Glia mehr festgestellt werden. Im *Stratum lucidum* waren jedoch noch Reste der Gliazellen vorzufinden (Abb. 41A). In der CA3-Region/*Stratum lucidum* wurden dunkle Ausläufer, die wahrscheinlich Dendriten der CA3-Neurone sind, nur noch sehr undeutlich sichtbar und ragten kaum in die angrenzende weiße Zone (Vergleich Abb. 40B mit 41C). Mit der Nissl-Färbung wurde aber keine Abnormalität der CA3-Neurone festgestellt (Abb. 41F links). Obwohl die Spitze des *Gyrus dentatus* stets die am stärksten gefärbte Struktur war, wurde im Vergleich zu den naiven Tieren bei den Tieren 56 Tage nach Ischämie kein offensichtlicher Unterschied zwischen dem oberen und unteren Blatt des *Gyrus dentatus* festgestellt (Abb. 41E). Ansonsten sahen die Neurone der Körnerzellschicht sowohl in der Thallium- als auch in der Nissl-Färbung unauffällig aus (Abb. 41D+F rechts).

Im Allgemeinen reduzierte sich die Intensität und Verteilung der Färbung in der CA3-Region und dem *Stratum lucidum* mit zunehmender Zeit in den Schnitten der Tiere mit einem totalen CA1-Schaden (zum Vergleich siehe Abb. 38F+40B+41C). Auch die Intensität der angefärbten Neurone innerhalb des Hilus reduzierte sich zu den späteren Zeitpunkten nach Ischämie. Desweiteren nahm die Anzahl der Neurone im Hilus (wahrscheinlich Interneurone) mit ihrem diffusen Netzwerk nach Läsion ab (Vergleich Abb. 38D mit Abb. 41E).



**Abb. 41:** Thallium-Färbung der hippocampalen Formation 56 Tage nach der Ischämie, welche einen nahezu kompletten Schaden im CA1-Band verursachte. (A) zeigt eine sehr starke Färbung der wenigen überlebenden Neurone im CA1-Band, mit den dazugehörigen fragmentierten Dendriten (Pfeil). (B) verdeutlicht den morphologischen Schaden in der CA1/*Stratum radiatum*-Region mit einer Toluidinblau-Färbung. In der CA3-Region (C) wurden nur einige wenige Neurone mit  $Tl^+$  angefärbt und die dunklen Ausläufer, die man in den naiven Tieren gesehen hatte, waren kaum noch vorhanden. Die Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* (D) und das *Stratum moleculare* wurden wieder unauffällig angefärbt. Jedoch wurde kein Unterschied mehr in der Intensität zwischen dem oberen und unteren Blatt des *Gyrus dentatus* festgestellt. In der Wölbung der CA3-Region wurden noch verbleibende Gliazellen deutlich. Bei Anfärbung des CA3-Bandes (links) und der Körnerzellschicht/Hilus (rechts) mit Toluidinblau (F) wurde wieder keine morphologische Schädigung bzw. Auffälligkeit detektiert.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Änderung der elektrophysiologischen Plastizität nach globaler Ischämie

#### 4.1.1 Änderung der Basis-Transmission nach globaler Ischämie

Bei der Beurteilung der elektrophysiologischen Funktion des *Gyrus dentatus* wurde herausgefunden, dass die Körnerzellen trotz intakter Morphologie (Nissl-Färbung) schon zu einem frühen Zeitpunkt nach Ischämie (einen Tag) nur noch signifikant reduzierte Summenaktionspotentiale erzeugten (Abb. 17A). Zu diesem Zeitpunkt sind die CA1-Neurone, die über den tri-synaptischen Schaltkreis mit den Neuronen des *Gyrus dentatus* verbunden sind, auch morphologisch noch intakt (Nissl-Färbung). Die elektrophysiologische Aktivität der CA-Region war *in vivo* mindestens noch 11 Tage nach Ischämie eingeschränkt. Dieser Befund deckt sich nicht mit den Ergebnissen von Suyama et al., 1992, in deren Studie die elektrophysiologischen Beeinträchtigungen nach 4VO verzögert einsetzten und weniger ausgeprägt waren. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede ist, dass der Stress, der bei der 4VO durch die Elektrokauterisation erzeugt wurde und/oder die permanente Reduktion des Blutflusses zum Gehirn zu einem präkonditionierenden Effekt führen können und somit Unterschiede im Ablauf der post-ischämischen Neurodegeneration und funktionellen Dysfunktion verursachen können. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass am Tag sieben nach Ischämie von Suyama (1992) die Existenz von pyknotischen Zellen im CA1-Band beschrieben wurde, während in dieser Arbeit zu diesem Zeitpunkt nur Zelltrümmer im CA1-Band vorgefunden wurden. Die Experimente der vorliegenden Dissertation zeigen, dass im Gegensatz zur frühen und massiven Abnahme der PSA die dendritische Eingangs-(input)-Funktion größtenteils nach Ischämie erhalten blieb. Zeichnet man beide Parameter in eine E-S-Kurve (Abb. 18C), so zeigt sich am Tag eins nach Ischämie eine Verschiebung nach rechts, was auf eine Abnahme der neuronalen Erregbarkeit zu diesem frühen Zeitpunkt nach Ischämie deutet. Selbst ein gesättigtes fEPSP bei einer Reizstärke von 900  $\mu$ A konnte nach Ischämie z.T. keine messbare PSA induzieren. Der Grund dafür könnte in einer sehr starken Zellinhibition liegen, die z.B. durch eine ausgeprägte Hyperpolarisation verursacht worden sein könnte. Diese Daten deuten an, dass die Erzeugung einer PSA in der Körnerzellschicht selektiv durch die globale Ischämie beeinträchtigt wurde, wohingegen die glutamaterge synaptische Transmission nicht durch den Insult beeinträchtigt wird.

In einer anderen Arbeit, die sich mit der Frage der post-ischämischen elektrophysiologischen neuronalen Funktion *in vivo* beschäftigte (Aoyagi et al., 1998), wurden hinsichtlich der frühen Beeinträchtigung der PSA ähnliche Ergebnisse wie bei unseren Versuchen erzielt. Jedoch wurde in dieser Publikation auch eine signifikante lang anhaltende Reduktion des fEPSP nach Ischämie gezeigt. Es gibt zwei mögliche Gründe für die Unterschiede zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit:

- 1.) Infolge des permanenten Verschlusses der vertebrealen Arterien bei den Versuchstieren in der Arbeit von Aoyagi et al. (1998) war der Blutfluss sowohl in ischämischen als auch in scheinoperierten Tieren permanent gestört (Ueda und Matsunaga, 1995). Obwohl dadurch kein offensichtlicher morphologischer Schaden entstand, besteht die Möglichkeit, dass die Funktionen der Neurone im *Gyrus dentatus* bereits beeinflusst wurden. Dabei könnte das fEPSP in den ischämischen Tieren durch die Mangeldurchblutung reduziert worden sein oder es könnte in den scheinoperierten Tieren durch die Manipulationen erhöht worden sein.
- 2.) In den Versuchen von Aoyagi et al. (1998) wurde eine Reizstärke von bis zu 3000  $\mu\text{A}$  verwendet, wohingegen in den Versuchen der vorliegenden Arbeit bis zur Erreichung des Maximums einer typischen Sättigungskurve mit einer Reizstärke von max. 900  $\mu\text{A}$  stimuliert wurde. Die Auswirkungen einer Reizung oberhalb von 1000  $\mu\text{A}$  lassen sich nur sehr schwer abschätzen und sind daher nicht mit unseren Ergebnissen direkt vergleichbar.

In den vorliegenden Ergebnissen der Dissertation konnte durch eine Stimulation keine Steigerung der fEPSP induziert werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass zum damaligen Zeitpunkt der Experimente ein methodisches Problem auftrat. Für die Messung der Summenaktionspotentiale im *Gyrus dentatus* wurde die Ableitelektrode außerhalb der Körnerzellschicht im Hilus platziert. Die für die Messung des fEPSP aber notwendigen Dendriten vom medialen *Tractus perforans* befinden sich oberhalb der Körnerzellen des *Gyrus dentatus*, so dass die Messung des korrespondierenden fEPSP nicht möglich war. Seit kurzem kann dieses Problem mittels einer bipolaren Ableitelektrode umgangen werden, wodurch eine simultane Messung der PSA und des dazugehörigen fEPSP möglich ist (Frey, persönliche Mitteilung, 28.02.2008).

Eine weitverbreitete Hypothese zur Erklärung des post-ischämischen Zelltodes ist die Annahme, dass die Zellen im CA1-Band durch Exzitotoxizität geschädigt werden. Die vorliegenden Daten stützen jedoch nicht die Theorie, dass in dem tri-synaptischen Schaltkreislauf eine lang anhaltende Hypererregbarkeit nach globaler Ischämie existiert, die

durch den erhöhten Eingang (input) aus dem *Gyrus dentatus* angetrieben wird (Jorgensen et al., 1987; Diemer et al., 1993). Ausschließen kann man jedoch nicht, dass eine sehr frühe Überempfindlichkeit der CA1-Neurone auftrat, die es ermöglicht, dass die Pyramidenzellen trotz eines normalen oder sogar reduzierten Einganges über den tri-synaptischen Schaltkreislauf hypererregt wurden.

Es gibt verschiedene Hypothesen, die den reduzierten PS im *Gyrus dentatus* erklären können:

(I) *Die inhibitorischen Mechanismen im Gyrus dentatus nehmen nach Ischämie zu*

Die Veröffentlichung von Suyama (1992) zeigte Hinweise auf die Zunahme einer rekurrenten Inhibition. In diesem Zusammenhang war der Tod der Neurone im Hilus in Bezug auf die Inhibition von großem Interesse. Es ist bekannt, dass selektive Schäden im Hilus nach einer Läsion auftreten können (Mody et al., 1995; Borges et al., 2003). Eine Abnahme von Subpopulationen der Mooszellen (Ratzliff et al., 2004) oder eine Zunahme der GABAergen Rezeptoren (Reeves et al., 1997) können eine reduzierte Ausgang- (output) Funktion der Neurone der Körnerzellschicht verursachen. Ergebnisse aus der Traumaforschung zeigten eine selektive Erhöhung der Inhibition in dem *Tractus perforans/Gyrus dentatus*- Signalweg nach einer Verletzung (Borges et al., 2003).

(II) *Zunehmende inhibitorische Einflüsse von Gehirnregionen, die außerhalb des Gyrus dentatus liegen*

Es ist vorstellbar, dass geschädigte/sterbende CA1-Neurone die Aktivität der Körnerzellen reduzierten oder durch ein retrogrades Signal eine Zunahme der Aktivierung von Interneuronen im *Gyrus dentatus* auslösten. Solch ein möglicher retrograder Regulator, ausgehend von den CA1-Neuronen, könnte NO sein (Endoh et al., 1994a), welches in der Lage ist die neuronale Aktivität im Hippokampus nach Stress zu vermindern (Takeya et al., 2003). Es ist aber auch möglich, dass eine NO-induzierte Unterdrückung neuronaler Aktivität durch reaktive Astrozyten vermittelt wurde, die nach Ischämie eine induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) exprimierten (Endoh et al., 1994b). Extra-hippokampale Strukturen, wie z.B. die Raphekerne, die die Interneurone im Hippokampus innervieren (Freund, 1992), können auch für die Zunahme der inhibitorischen Einflüsse verantwortlich sein.

(III) *Mögliche Schädigung der Körnerzellen im Gyrus dentatus nach Ischämie*

Es ist vorstellbar, dass durch einen ischämischen Insult die Körnerzellen im *Gyrus dentatus* geschädigt wurden, ohne dass dies mit der Nissl-Färbung nachgewiesen

werden konnte. Die Neurone könnten wieder regenerieren oder zu einem späteren Zeitpunkt nach einem langsamen Degenerationsprozess sterben. Es gibt Veröffentlichungen, in denen von subtilen Dysfunktionen berichtet wurde. So wurde gezeigt, dass z.B. beschädigte Dendriten zu einer funktionellen Beeinträchtigung beitragen können (Corbett und Nurse, 1998; Geddes et al., 1994). Literaturdaten legten nahe, dass die Körnerzellen des *Gyrus dentatus* zu einem späten Zeitpunkt (nach 4 Wochen) eher regeneriert als degeneriert sein könnten, da eine Erholung der PS-Funktion im *Gyrus dentatus* gezeigt werden konnte (Aoyagi et al., 1998).

(IV) *Veränderung des Mikromilieus im Gyrus dentatus infolge der Neurogenese oder Mikroglia proliferation*

- a. Neurogenese: Es gibt Hinweise aus aktuellen Publikationen, die belegen, dass endogene Vorläuferzellen eine Rolle bei Reparaturmechanismen nach Ischämie spielen können (Liu et al., 1998; Nakatomi et al., 2002). Die Aktivierung in der neurogenen Region des *Gyrus dentatus* könnte in diesem Fall die elektrophysiologischen Eigenschaften der Körnerzellen beeinflussen.

NO könnte auch in diesem Zusammenhang ein Vermittler sein. Zhu et al. (2003) berichtete von einer gesteigerten Neurogenese im *Gyrus dentatus*, die mit einer Aktivierung von iNOS verbunden war. Umgekehrt wurde gezeigt, dass das Fehlen von Aktionspotentialen keine Reduktion der Proliferation im *Gyrus dentatus* zur Folge hatte (Raineteau et al., 2004).

- b. Mikroglia proliferation: Durch das hohe Aufkommen von neugebildeten Mikroglia/Makrophagen im morphologisch intakten Hilus nach einer globalen Ischämie könnte das extrazelluläre Milieu um die Körnerzellen des *Gyrus dentatus* verändert sein, wodurch die Generierung eines Summenaktionspotentials gestört sein könnte.

(V) *Veränderung der Kalium-Leitfähigkeit im Gyrus dentatus nach Ischämie*

Eine weitere mögliche Erklärung für das verringerte PS-Signal im *Gyrus dentatus* nach globaler Ischämie könnte eine Veränderung der Kalium-Leitfähigkeit in den Körnerzellen sein. Durch eine mögliche Verschiebung des Membranpotentials, die z.B. durch eine Hyperpolarisation erzeugt werden kann, könnte die Generierung eines PSA erschwert bzw. verhindert werden.

#### **4.1.2 Mögliche Ursachen für die unveränderte elektrophysiologische Funktion in den *ex vivo*-Versuchen nach globaler Ischämie**

In den *ex vivo*-Experimenten wurden im Gegensatz zu den *in vivo*-Experimenten keine Änderungen der basalen elektrophysiologischen Funktion und der neuronalen Plastizität im *Gyrus dentatus* 10 und 56 Tage nach globaler Ischämie festgestellt (Abb. 23A, C).

Da die Doppelpuls-Inhibition in den Schnitten der ischämischen Tiere intakt war, scheint ein Tod von Neuronen im Hilus mit der daraus folgenden Steigerung der Inhibition nicht der Hauptgrund für den Verlust des PSA-Signals *in vivo* zu sein (Hypothese I). Außerdem wurde in den Schnitten der ischämischen Tiere ein unverändertes Summenaktionspotential in den Körnerzellen des *Gyrus dentatus* gemessen, so dass auch Hypothese III ausgeschlossen werden kann.

Auch wenn subtile morphologische Schäden (z.B. an Dendriten; Hypothese III) existieren würden, sollte auch in den Schnittpräparaten der *ex vivo*-Versuche eine Reduktion des PSA-Signales erfolgen. Da dies nicht der Fall war, rührte die funktionelle Beeinträchtigung *in vivo* eher von a) retrograden Einflüssen von anderen hippocampalen Regionen, b) inhibitorischen Einflüssen von extra-hippocampalen Strukturen (z.B. Raphekerne, Amygdala) und c) Veränderungen des Mikromilieus her (Hypothesen II und IV). Diese Mechanismen wurden in den *ex vivo*-Versuchen nicht wirksam, da die beschriebenen Strukturen bei der *in vitro*-Präparation entfernt wurden oder freigesetzte Substanzen *in vitro* ausgewaschen werden konnten. Daher wurde in diesen Fällen die PSA *ex vivo* auch nicht unterdrückt.

#### **4.1.3 Neuronale Plastizität nach globaler Ischämie**

In unseren Versuchen war es uns mithilfe einer tetanischen Reizung gelungen eine Potenzierung der PSA am Tag 10 nach Ischämie zu erzeugen (Abb. 20A). Die absoluten Werte waren im Vergleich zu den Werten nach der LTP-Induktion vor der Ischämie deutlich kleiner. Die Potenzierung 10 Tage nach Ischämie war in Relation zur Basislinie sehr hoch. Dieses Ergebnis stimmte teilweise mit den Daten anderer Forschungsgruppen (Aoyagi et al., 1998) überein, jedoch zeigten die eigenen Messungen einen neuen Aspekt. Trotz einer maximalen Reizstärke in der I/O-Kurve konnten in ca. 1/3 aller Tiere nach der Ischämie keine PS gemessen werden. Es war aber möglich in diesen Tieren mithilfe einer Stimulation wieder einen PS zu induzieren. Da die PS-Antwort zum Teil nicht nur gesteigert, sondern überhaupt erst induziert wurde, kann man das in den eigenen Versuchen beobachtete Phänomen nicht im

eigentlichen Sinne als LTP bezeichnen. LTP wird als eine lang anhaltende Steigerung der Zellantwort auf weitere Teststimulationen definiert. Da in dieser Arbeit jedoch bei einigen Tieren eine Zellantwort induziert wurde – nicht gesteigert – könnte es sein, dass es wesentliche Unterschiede zwischen den Mechanismen der Potenzierung nach der Läsion und einer normalen LTP gab. Im Allgemeinen wird angenommen, dass das Ausmaß der LTP durch eine Zunahme von sowohl der Menge der Transmitter, die per präsynaptischen Impuls freigesetzt wurden, als auch dem Grad der postsynaptischen Empfindlichkeit auf eine festgelegte Menge an Transmittern, vermittelt wird. Nach Auswertung der eigenen I/O-Kurven deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass die zunehmende Freisetzung des präsynaptischen Transmitters, die durch eine zunehmende Reizstärke bis zu 900  $\mu\text{A}$  entstand, keinen Einfluss auf die Größe des PS-Signals hatte:

Da alle ischämischen Tiere 24 Stunden nach der Stimulation keine erhöhte PS-Antwort zeigten und auf das Niveau der Basislinie zurückkehrten, kann man davon ausgehen, dass der Einfluss des eigenen verwendeten Stimulationsprotokolls nur transient war.

Diese transiente Potenzierung am Tag 10 nach Ischämie steht im Gegensatz zu den Effekten an Tag zwei nach Ischämie, wo keine Erhöhung der PS-Antwort nach Stimulation erzielt wurde (Abb. 22A). Die genauen Gründe dafür sind bisher unklar, aber möglicherweise waren die Neurone während der ersten Tage nach Ischämie noch nicht erregbar und erst nach einer Art „Ruhephase“ in der Lage eine Potenzierung zu induzieren. In der Literatur war während dieser Periode nach der Ischämie eine Steigerung der Neurogenese in der neurogenen Subgranularzellschicht des *Gyrus dentatus* und in der CA1-Region beschrieben worden (Liu et al., 1998; Nakatomi et al., 2002; Schmidt und Reymann, 2002). Wir konnten jedoch am Tag eins und Tag drei nach der Ischämie keine Steigerung der Neurogenese (DCX/BrdU) im *Gyrus dentatus* feststellen (Kapitel 3.3.4, Tabelle 8). Es wurde jedoch eine Steigerung proliferierender Mikrogliazellen gefunden (Kapitel 3.3.5, Tabelle 9, 10). Daher kann es sein, dass Veränderungen des Mikromilieus (Hypothese IV) am Tag zwei ausgeprägter waren als am Tag 10 nach der Ischämie und somit die Induktion einer Potenzierung verhindert wurde.

## **4.2 Einfluss der globalen Ischämie auf die Glio- und Neurogenese**

### **4.2.1 Besonderheit der Markierung mit BrdU**

BrdU wird in der Forschung standardmäßig für die Markierung von proliferierenden Zellen verwendet (del Rio und Soriano, 1989). Es wird jedoch immer wieder diskutiert, ob BrdU auch bei der mitochondrialen DNA-Synthese oder in Zellen, die gerade eine Zellreparatur oder einen programmierten Zelltod (Apoptose) durchlaufen, eingebaut wird.

In den Untersuchungen in dieser Dissertation konnte ein deutliches BrdU-Signal im Nukleus der Zellen mittels konfokaler Mikroskopie (z.B. Abb. 28B, C; 31A, B, D) detektiert werden. Dadurch wurde eine Markierung der mitochondrialen DNA-Synthese ausgeschlossen. In der Literatur wurde in den letzten Jahren diskutiert, dass geschädigte Neurone die G1/S-Phase durchlaufen und die DNA-Synthese fortsetzen und somit BrdU einbauen, bevor sie zugrunde gehen (BrdU/TUNEL-positive Zellen). Diese Hypothese wurde vor allem durch die Veröffentlichung von Kuan et al. (2004) gestützt. Die in dieser Literatur gezeigte hohe Anzahl von BrdU/TUNEL doppelt gefärbten Zellen nach Ischämie/Hypoxie schien jedoch eine Ausnahme zu sein und kann auf Besonderheiten des Modelles zurückgeführt werden.

In den eigenen Untersuchungen wurden weder eine vollständige noch eine selektive BrdU-Markierung des geschädigten CA1-Pyramidenzellbandes nach einer globalen zerebralen Ischämie festgestellt. Auch immunhistochemische Färbungen gegen die aktive Caspase-3 konnten keine Doppelmarkierung mit BrdU im geschädigten CA1-Band der hippocampalen Region nachweisen (Abb. 27). Zusammenfassend kann man sagen, dass die BrdU-positiven Zellen im Vorderhirn nach einer globalen Ischämie bzw. Scheinoperation neu gebildete Zellen waren. Außerdem kann man die Möglichkeit der Markierung von mitochondrialer DNA-Synthese ausschließen.

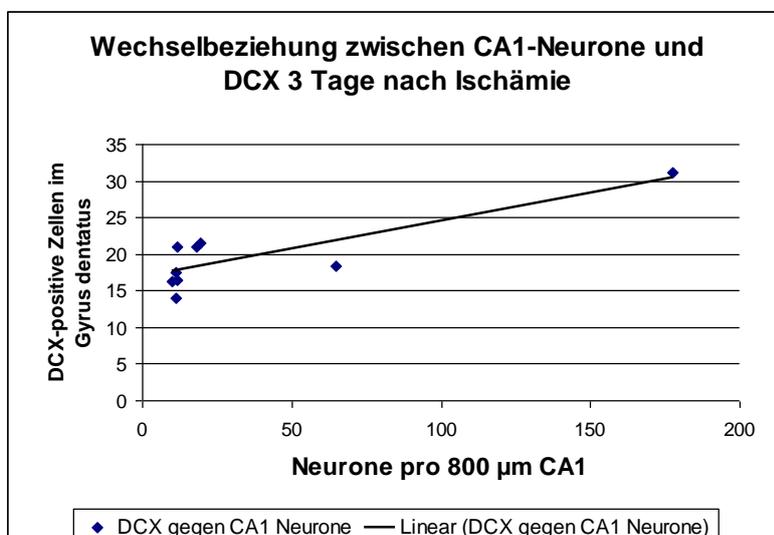
### **4.2.2 Einfluss der Ischämie auf die frühe Neurogenese**

DCX wird in der Literatur als ein Marker für frühe Stadien der adulten Neurogenese beschrieben (Brown et al., 2003a; Couillard-Despres et al., 2005). Die Morphologie der meisten DCX-exprimierenden Neuroblasten lässt sich nicht von den wandernden Neuroblasten unterscheiden. Im Gegensatz zu anderen veröffentlichten Experimenten wurden in dieser Dissertation die Doppelmarkierung von DCX/BrdU und die Einzelfärbung von DCX zu einem frühen Zeitpunkt, nämlich einen und drei Tage nach globaler Ischämie bzw.

Scheinoperation, untersucht. Die Expression des frühen neuronalen Markers war sowohl in scheinoperierten Tieren als auch nach globaler Ischämie auf die Subventrikularzone (SVZ) und den *Gyrus dentatus* beschränkt (Kapitel 3.3.4, Tabelle 8, Abb. 28), in denen die kontinuierliche Bildung von neuen Zellen im adulten Gehirn stattfindet (Nacher et al., 2001).

In scheinoperierten Tieren wurde zu beiden Zeitpunkten eine basale Expression von DCX-, BrdU- und DCX/BrdU-positiven Zellen im *Gyrus dentatus* und in der SVZ des lateralen Ventrikels gefunden (Abb. 42; Tabelle 8). Drei Tage nach Ischämie zeigten 78 % aller BrdU-positiven Zellen eine Kolokalisation von DCX. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen von Kuhn et al. (1997) überein, die ungefähr die gleiche Relation von BrdU- und BrdU/DCX-positiven Zellen im *Gyrus dentatus* in ungeschädigten Tieren fanden.

Durch die globale Ischämie schienen der *Gyrus dentatus* und die SVZ hinsichtlich der Neurogenese unterschiedlich betroffen zu sein. Einen Tag und drei Tage nach Ischämie wurde am *Gyrus dentatus* eine signifikante Abnahme von DCX-positiven Zellen (insbesondere im oberen Blatt) festgestellt, wohingegen an der SVZ keine Änderung der Anzahl der DCX-positiven Zellen zu erkennen war (Abb. 42B). Das obere Blatt des *Gyrus dentatus* ist anatomisch gesehen in unmittelbarer Nähe zur geschädigten CA1-Region der hippocampalen Formation, was die Hypothese II (inhibitorischen Einflüssen auf den *Gyrus dentatus* von anderen hippocampalen Strukturen) bekräftigt. Da ein Zusammenhang zwischen dem Absterben der CA1-Neurone und der Abnahme von DCX-positiven Zellen im *Gyrus dentatus* nach der Ischämie bestehen könnte, wurden beide Parameter hinsichtlich einer Wechselbeziehung untersucht (Abb. 42).



**Abb. 42:** Darstellung der Wechselbeziehung zwischen DCX-positiven Zellen im Gyrus dentatus und der Anzahl von Neurone im CA1-Band 3 Tage nach globaler Ischämie

Es konnte keine Korrelation zwischen beiden Parametern gefunden werden. Der Grund hierfür, könnte in der Tatsache liegen, dass die Variation in der Schadensgröße für die Detektion einer Wechselbeziehung zu klein war.

Mit der signifikanten Abnahme der DCX-positiven Zellen im *Gyrus dentatus* am Tag drei nach Ischämie ging eine deutliche Zunahme von BrdU-positiven Zellen einher (Tabelle 8; Abb. 42A). So waren im Gegensatz zur scheinoperierten Gruppe drei Tage nach Ischämie nur 20 % aller BrdU-positiven Zellen mit DCX kolokalisiert. Für die Erklärung der signifikanten Änderung des Verhältnisses nach Ischämie gibt es zwei Möglichkeiten: Zum einen wurde drei Tage nach Ischämie eine viel höhere Anzahl von BrdU-positiven Zellen festgestellt, die infolge der Induktion der Proliferation von Mikrogliazellen/Makrophagen entstanden war. Zum anderen nahm die Anzahl der einzeln markierten DCX-Zellen im *Gyrus dentatus* drei Tage nach der Ischämie signifikant ab.

Für die Abnahme der DCX-Zellen im *Gyrus dentatus* sind zwei Mechanismen vorstellbar:

- (I) Die Geschwindigkeit der neuronalen Entwicklung ist durch den ischämischen Insult kurzzeitig erhöht und die vor dem Insult vorhandenen DCX- Zellen sind zu Neuronen gereift.
- (II) Die unreifen Neurone sind selektiv verwundbar und diese, bereits vor dem ischämischen Ereignis entstandenen DCX-Zellen nach Ischämie einem schnellen und selektiven Zelltod zum Opfer gefallen. Dieser Effekt wurde von Romanko et al. (2004) für die SVZ beschrieben.

Da in dieser Arbeit weder einen Tag noch drei Tage nach Ischämie ein signifikanter Unterschied der DCX/BrdU-positiven Zellen festgestellt wurde, kann man davon ausgehen, dass die Proliferation von den nach der Ischämie gebildeten neuronalen Progenitoren im *Gyrus dentatus* zu einem frühen post-ischämischen Zeitpunkt nicht beeinflusst wurde. Jedoch wird in der Literatur (Sharp et al., 2002; Nakatomi et al., 2002; Liu et al., 1998) von einer Steigerung der Neurogenese (NeuN/BrdU) zu einem späten Zeitpunkt (26 bzw. 40 Tage) nach einer globalen Ischämie berichtet. Folglich kann die in der Literatur beschriebene Steigerung der Neurogenese aufgrund eines späteren Beginns der Applikation oder einem besseren Überleben der neugebildeten Zellen nach der Ischämie erklärt werden.

In der SVZ des lateralen Ventrikels, der zweiten Proliferationszone, wurde kein signifikanter Unterschied in der Anzahl DCX- und DCX/BrdU-positiver Zellen einen Tag und drei Tage nach der globalen Ischämie festgestellt. Dieses Ergebnis verwunderte nicht, da im Modell der globalen Ischämie ein selektiver Zelltod der CA1-Pyramidenschicht auftritt. Da die SVZ des lateralen Ventrikels vom Hippokampus anatomisch weit entfernt ist, reicht das von den

absterbenden CA1-Neuronen entsendete Signal für eine Änderung der Neurogenese und Wanderung von neuronalen Vorläuferzellen von der Wand des lateralen Ventrikels in den Hippokampus nicht aus. Im Gegensatz dazu wurde im Modell der fokalen Ischämie ein anderes Verteilungsmuster von DCX-positiven Zellen gefunden (Jin et al., 2003; Arvidsson et al., 2002). In diesem Modell befindet sich das Hauptschädigungsgebiet in den kortikalen und striatalen Regionen des Vorderhirnes. Hierbei wird die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen in der SVZ nach Ischämie gesteigert, die dann von der SVZ in die striatale Schadensregion wandern.

#### **4.2.3 Zunahme der Anzahl von ruhenden und proliferierenden Mikrogliazellen nach globaler Ischämie**

In allen untersuchten Regionen wurde drei Tage nach Ischämie eine große Zunahme von BrdU-positiven Zellen gefunden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Veröffentlichungen (Liu et al., 1998; 2001; Iwai et al., 2001) wurde nicht nur in den neurogenen Regionen eine selektive Färbung festgestellt, sondern eine großflächige Verteilung von proliferierenden Zellen in allen Regionen der hippocampalen Region, an allen Ventrikelwänden und im Striatum. Da es aber unwahrscheinlich ist, dass die Stammzellproliferation überall im Gehirn stattfindet, scheint die Mikroglia proliferation für die massive Zunahme der BrdU-positiven Zellen zu dem frühen Zeitpunkt nach Ischämie im Gehirn verantwortlich zu sein. Eine Doppelfärbung gegen BrdU und OX-42 bestätigte diese Annahme.

In der Literatur wurde die Zunahme von Mikroglia in der hippocampalen Region nach Ischämie schon ausführlich beschrieben (Gehrmann et al., 1995; Kato et al., 2003; Hsu et al., 2003), aber eine Quantifizierung der proliferierenden Mikrogliazellen wurde in diesen Untersuchungen nicht vorgenommen. Überdies, wurden das Vorkommen und die morphologische Änderung der Mikroglia nur im Hippokampus, aber nicht im Striatum beschrieben. Die vorliegende Arbeit zeigte die erste direkte Quantifizierung von proliferierenden Mikrogliazellen zu einem frühen Zeitpunkt nach Ischämie. Besonders in den nicht neurogenen Regionen (Hilus, *Fissura hippocampi* und CA1) wurde drei Tage nach Ischämie eine große Anzahl von BrdU-positiven Zellen, die mit dem OX-42 Antikörper doppelt markiert waren, gefunden.

Im Allgemeinen deutet die großflächige und willkürliche Verteilung von OX-42 auf eine Aktivierung der ruhenden Mikrogliazellen hin. Bei einer Schädigung von Neuronen

veränderten sich die ruhenden Mikrogliazellen in phagozytierende Zellen. Es gab aber auch Gehirnregionen mit cluster-artiger Verteilung der OX-42-positiven Zellen: rings um die Blutgefäße in der *Fissura hippocampi* und im Striatum wurde eine große Ansammlung von proliferierenden Mikrogliazellen festgestellt. Das könnte bedeuten, dass die Bluthirnschranke in den der Schadensregion benachbarten Regionen für Immunzellen permeabel wurde und Makrophagen aus dem Blut in gefährdetes bzw. geschädigtes Gewebe einwanderten. Da aber kein eindeutiger Strom von den Gefäßen zu der CA1-Region detektiert werden konnte und überdies eine starke Anfärbung von Mikroglia in den histologisch ungeschädigten Regionen des *Gyrus dentatus* und Hilus gesehen wurden, stützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass die aktivierte Mikrogliazellen/Makrophagen nicht nur für die Beseitigung von Zelltrümmern aus der CA1-Region verantwortlich waren, sondern auch für das Überleben von Zellen in gefährdeten Gebieten wichtig sein könnten, so z.B. für die Körnerzellen des *Gyrus dentatus* (Banati und Graeber, 1994; van Rossum und Hanisch, 2004). Diese Hypothese wurde dadurch unterstrichen, dass in dem morphologisch intakten Hilus die Dichte der OX-42-positiven Zellen ungefähr gleich hoch war, wie in der Region um die *Fissura hippocampi*, in der die Dendriten der geschädigten CA1-Neurone verlaufen. Daraus kann man schlussfolgern, dass die Mikrogliazellen/Makrophagen nicht nur auf die chemischen Lockstoffe (Chemoattraktant) der sterbenden Zellen reagierten (Witting et al., 2000; Lauber et al., 2003), sondern auch Signale von Neuronen empfangen, die vielleicht nur funktionell beeinträchtigt waren. Die eigenen elektrophysiologischen Untersuchungen *in vivo* stützen die Theorie, dass der *Gyrus dentatus* durch die Ischämie beeinträchtigt wurde. Schon ab Tag eins nach Ischämie wurde die PSA im *Gyrus dentatus* signifikant reduziert. Besonders im Hippokampus waren perineuronale mikrogliale Satellitenzellen an der Remodellierung von synaptischen Verbindungen beteiligt (Blinzinger und Kreutzberg, 1968). Aufgrund dessen kann die Aktivierung der Mikrogliazellen nach Ischämie erklärt werden. Dies könnte zu einer Veränderung des Milieus um die Körnerzellen des *Gyrus dentatus* geführt haben (Hypothese IVb) und als möglicher Grund für die Beeinträchtigung der elektrophysiologischen Funktion in Betracht gezogen werden. Desweiteren könnte die Aktivierung von ruhenden Mikrogliazellen zu phagozytierenden Zellen mit der Reduktion der DCX-positiven Zellen einen und drei Tage nach der Ischämie im Zusammenhang stehen.

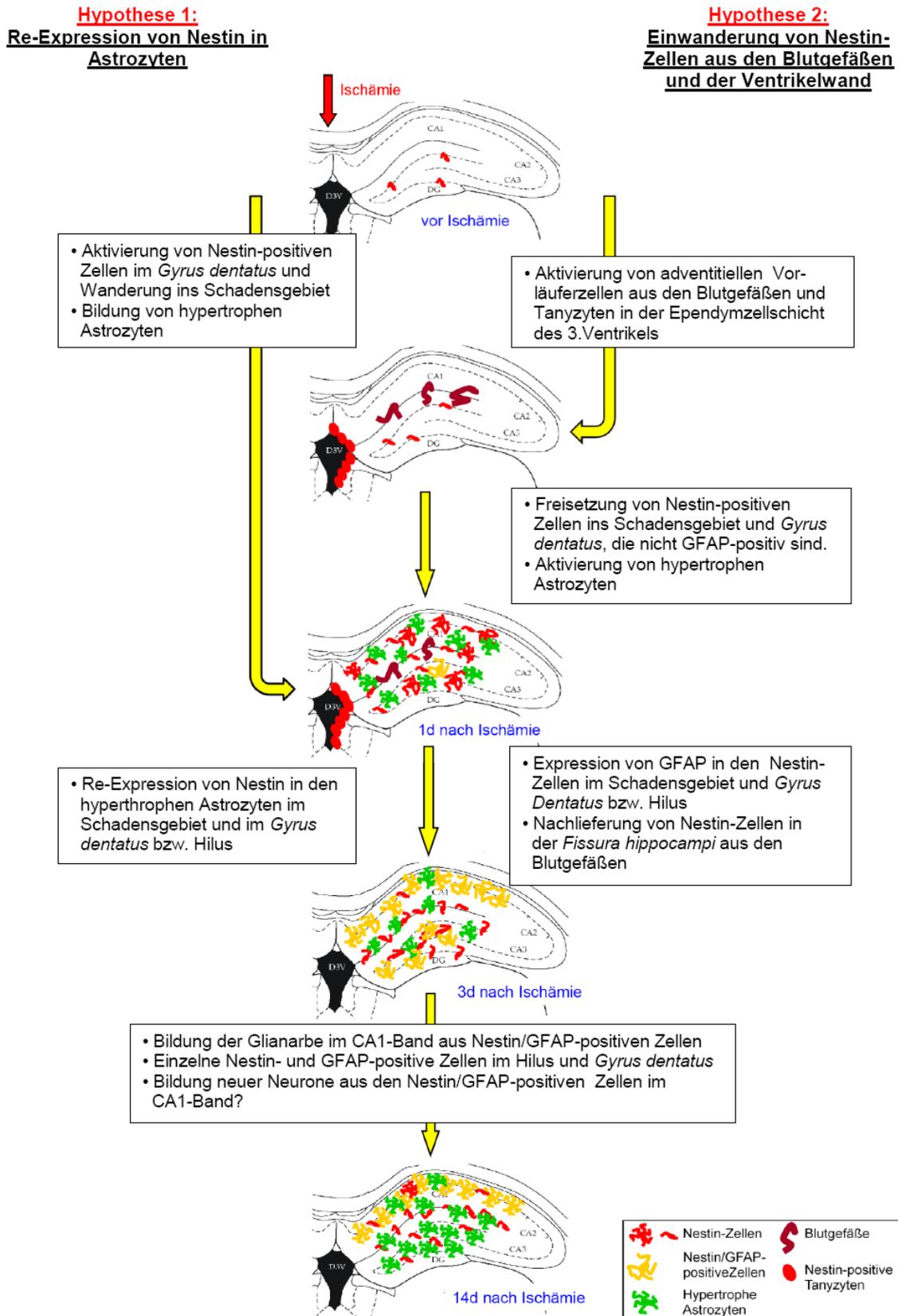
Wie schon in der Einleitung (Kapitel 1.4.4) beschrieben, wird die Rolle der Mikrogliazellen nach einem Insult sehr stark diskutiert. Zum einen gibt es mehrere Hinweise, dass Mikrogliazellen protektiv sein können (Neumann et al., 2006; Lalancette-Hébert et al., 2007; Chechneva et al., 2006; Hayashi et al., 2006), aber zum anderen auch kontroverse Resultate

(Lees et al., 1993). Ob die Mikrogliazellen protektive Eigenschaften ausüben oder nur für die Beseitigung abgestorbene bzw. später sterbende Zellen gebildet wurden, bleibt weiterhin unklar. Möglicherweise treten aber beide Eigenschaften gleichzeitig auf.

Außerdem wurde im Gehirnparenchym nach einem ischämischen Insult noch eine andere spezifische Anordnung von OX-42-positiven Zellen beobachtet. Von der Wand des dorsalen 3. Ventrikels aus führte ein Strom von Mikrogliazellen direkt in die hippocampale Formation hinein. Aufgrund des spezifischen Färbemusters und der Morphologie der Mikrogliazellen (rund mit kurzen Fortsätzen; Hickey et al., 1992) kann man schlussfolgern, dass Makrophagen, die im *Plexus choroideus* gebildet wurden, eine Hauptquelle für die im Hippokampus sichtbaren OX-42-positiven Zellen waren.

#### **4.2.4 Re-Expression von Nestin in reaktiven Astrozyten versus Einwanderung von Nestin-Zellen aus den Blutgefäßen bzw. der Ventrikelwand nach globaler Ischämie**

Die Ko-Expression von Nestin und GFAP wurde in vielen experimentellen Modellen an jungen und alten Tieren beobachtet. Darunter sind Modelle der Verletzung des Rückenmarkes (Kozlova, 2003; Lang et al., 2004), der zerebralen Ischämie (Lin et al., 1995; Duggal et al., 1997; Doyle et al., 2001), der exzitotoxischen Schädigung des Hippokampus (Clarke et al., 1994; Abdel-Rahman et al., 2004) und der traumatischen Gehirnverletzung (Holmin et al., 1997). Dennoch gab es bisher noch keine eindeutige Erklärung dieses Effektes. Aus Literaturdaten geht hervor, dass zu einem späten Zeitpunkt (14 Tage) nach einer globalen Ischämie neue Neurone im CA1-Band detektiert wurden (Nakatomi et al., 2002; Schmidt und Reymann, 2002), aber über die genauen Vorgänge, die zur Entstehung neuer Neurone im Schadensgebiet notwendig sind, kommen mehrere Theorien in Frage. In der vorliegenden Arbeit wurden erste Hinweise hinsichtlich der Herkunft der Nestin-positiven Zellen gefunden, die als mögliche neuronale Vorläuferzellen differenzieren können. Ob es sich um eine Re-Expression von Nestin in Astrozyten handelte oder um Nestin-positive Zellen, die astrozytären Charakter erhielten, wurde anhand von 2 Hypothesen diskutiert (Abb. 43).



**Abb. 43:**  
Schematische Darstellung der eigenen Ergebnisse nach globaler Ischämie und zwei Hypothesen zur Herkunft der Nestin-Zellen  
CA1-CA3 (*Cornu ammonis* Regionen), DG (*Gyrus dentatus*), D3V (dorsaler 3.Ventrikel)

Drei Tage nach Ischämie wurden wie bei Yagita et al. (2002) Nestin-positive Zellen im geschädigten CA1-Band, in vielen anderen Regionen der hippocampalen Region, aber auch an den Ventrikelwänden und im Striatum detektiert. Im CA1-Band, Hilus und Striatum (Abb. 36A, C, E; Tabelle 11) wurde eine 50-93%ige Doppelmarkierung der GFAP-positiven Zellen mit Nestin festgestellt. Diese Ergebnisse deuteten auf eine Re-Expression von Nestin in den Astrozyten und damit auf eine Umkehrung in ein unreifes Stadium hin (Hypothese 1; Abb. 43 links). Dies war in Übereinstimmung mit der Annahme, dass die aktiven Astrozyten eine mögliche Quelle für entstandene Neurone sind (Li und Chopp, 1999; Lin et al., 1995; Duggal et al., 1997). Daher kann man annehmen, dass die Nestin/GFAP-positiven Zellen die Gliazelle im CA1-Band darstellen und vielleicht zusätzlich in neue Neuronen differenzieren. Fraglich bei dieser Theorie der Re-Expression von Nestin in Astrozyten waren jedoch die fehlenden Gründe für die weit verbreitete Streuung von Nestin- und GFAP-positiven Zellen in der *Fissura hippocampi* und im *Gyrus dentatus* drei Tage nach Ischämie, die in diesen Regionen zu 50-80 % nicht doppelt markiert waren (Abb. 36B, E). Unter Kontrollbedingungen (Scheinoperation) wurde im *Gyrus dentatus* nur eine geringe Anzahl von Nestin-positiven Zellen detektiert und drei Tage nach Ischämie waren nur vereinzelte Astrozyten mit dem Proliferationsmarker BrdU doppelt markiert (Abb. 33C, D). Diese Feststellung stimmt, zumindest zu diesem frühen Zeitpunkt nach globaler Ischämie, nicht mit der Annahme überein, dass sich Stammzellen massiv teilen und in GFAP-positive neuronale Vorläuferzellen differenzieren. Die Veröffentlichungen der oben aufgeführten Arbeitsgruppen, die die Re-Expression von Nestin in Astrozyten beschrieben, erklärten solche Phänomene ebenfalls nicht. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass die Nestin/GFAP-positiven Zellen im Schadensgebiet nicht aus der Proliferationszone des *Gyrus dentatus* stammen.

Weitere Daten dieser Untersuchung wiesen auf eine alternative Erklärung der Nestin- und GFAP-Signale nach Ischämie hin. Einen Tag nach Auslösen eines ischämischen Insultes wurden sowohl im Schadensgebiet, in der *Fissura hippocampi* als auch im Hilus bzw. *Gyrus dentatus* Nestin-positive Zellen detektiert, die nicht mit dem Astrozytenmarker GFAP doppelt markiert waren (Abb. 35A, B). Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse und aus Ergebnissen der Literatur wurde eine neue Hypothese hinsichtlich der Herkunft der Nestin-Zellen und der anschließenden Differenzierung in Astrozyten nach globaler Ischämie entwickelt (Hypothese 2, Abb. 43 rechts). In Hypothese 2 wurde die Einwanderung von Nestin-Zellen von adventitiellen Vorläuferzellen aus Blutgefäßen und der Ependymzellschicht der Ventrikelwand ins Schadensgebiet in Betracht gezogen, die anschließend den

Astrozytenmarker GFAP exprimierten. In Bezug auf die *Fissura hippocampi* erschienen vor kurzem neue Erkenntnisse in der Literatur, die einige Hinweise für eine Erklärung der Nestin-positiven, aber GFAP-negativen Zellen liefern. Yamashima et al. (2004) zeigte in ungeschädigten Tieren, dass eine allmähliche Differenzierung von adventitiellen Vorläuferzellen (Progenitoren) zu unreifen Körnerzellen in der SGZ stattfindet. Hypothetisch könnten unter ischämischen Bedingungen Kapillaren/Arteriolen in anderen Gehirnregionen (z.B. *Fissura hippocampi*) als mögliche Ursprungsorte von Nestin-positiven aber GFAP-negativen Vorläufern in Frage kommen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass besonders in der *Fissura hippocampi*, die eine große Dichte an Blutgefäßen aufweist und direkt neben der geschädigten CA1 platziert ist, die Stammzellen aus dem Blut (Palmer et al., 2000) rekrutiert wurden und diese Nestin-positiv aber GFAP-negativ waren. Zusätzlich wurde von Chopp et al. (2007) eine Steigerung der Angiogenese nach Ischämie berichtet, die wahrscheinlich für die Rettung der überlebenden Neurone gebildet werden. Die Erhöhung der Angiogenese wurde auch in dieser Arbeit in der *Fissura hippocampi* und im Striatum beobachtet.

Als zweiter möglicher Herkunftsort der Nestin-positiven Zellen wird in der Hypothese 2 die Ependymzellschicht der Ventrikelwand angesehen. Hierfür gibt es aus der Literatur Hinweise, dass die Tanyzyten in der Ependymzellschicht des 3. Ventrikels Nestin exprimieren und möglicherweise neuronale Vorläufer sind (Xu et al., 2005). Diese Nestin-positiven Zellen könnten dann auch ins Schadensgebiet wandern, GFAP exprimieren und als neuronale Vorläufer fungieren.

Neben dem *Gyrus dentatus*, wurde sowohl *in vivo* (Nakatomi et al., 2002) als auch *in vitro* (Chechneva et al., 2005) eine weitere neurogene Zone in der hippocampalen Formation beschrieben, die als mögliche Quelle der neuen Neurone im CA1-Band in Frage kommt. Diese Zone wurde als posteriorer Periventrikel (engl.: posterior periventricle, pPV) bezeichnet, stellt einen Teil der lateralen Ventrikelwand dar und befindet sich oberhalb der CA1-Pyramidenzellschicht. In den eigenen Untersuchungen wurden sowohl an der Ventrikelwand des lateralen Ventrikels als auch des ventralen und dorsalen 3. Ventrikels eine Vielzahl von GFAP- und Nestin-positiven Zellen markiert, die einzeln angeordnet waren (Abb. 35E). Filippov et al. (2003) beschrieb drei verschiedene Typen von Nestin-positiven Zellen im Gehirn von Nagern, wovon zweien ebenfalls der astrozytäre Charakter fehlt. Diese zwei Zelltypen wurden als schmale Zellen und ohne stark ausgeprägte Fortsätze beschrieben. Sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach globaler Ischämie wurden besonders am ventralen Teil des v3V bipolare Nestin-Zellen mit langen Fortsätzen gefunden, die nicht mit

dem Astrozytenmarker GFAP doppelt markiert waren. Da alle GFAP-positiven Zellen Astrozyten sind, aber nicht alle Astrozyten GFAP exprimieren, besteht zudem noch die Möglichkeit, dass die Nestin-positiven Zellen zu einer anderen Astrozytenart (S100 $\beta$ - oder Vimentin-positiv) gehörten und erst im Schadensgebiet oder im Hilus zu GFAP-positiven Astrozyten differenzierten. Hierfür müssten aber noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Für die Theorie der Einwanderung Nestin-positiver Zellen aus den Blutgefäßen und der Ependymzellschicht der Ventrikelwände spricht die Tatsache, dass innerhalb kürzester Zeit (24 Stunden) eine Vielzahl Nestin-positiver Zellen im Schadensgebiet vorzufinden waren und diese nicht mit dem Proliferationsmarker BrdU markiert waren. Daraus kann man schlussfolgern, dass diese Zellen bereits vor dem ischämischen Insult existiert haben.

Außerhalb der hippocampalen Formation wurden drei Tage nach Ischämie am lateralen Ventrikel und dem Striatum ebenfalls sehr interessante Ergebnisse hinsichtlich der Nestin- und GFAP-Doppelmarkierung gefunden. Diese Region ist vom Schadensgebiet relativ weit entfernt und wurde bisher von den Arbeitsgruppen, die sich mit globaler Ischämie beschäftigen, wenig beachtet und untersucht. An der Wand des lateralen Ventrikels wurden sehr viele Nestin-positive Zellen und Astrozyten detektiert, die aber nur zu einer geringen Anzahl doppelt markiert waren. Direkt neben der Wand des lateralen Ventrikels befindet sich das Striatum. Auch hier wurde einen Tag nach der Ischämie eine Vielzahl von Nestin-Zellen detektiert, die meist nicht mit dem Astrozytenmarker GFAP doppelt markiert waren. Wie in der *Fissura hippocampi* wurden im Striatum röhrenförmige Nestin-positive Gebilde vorgefunden, die wahrscheinlich Blutgefäße waren. Am Tag drei nach Ischämie wurden auch hier eine zunehmende Anzahl von Nestin und GFAP doppelt markierten Zellen festgestellt, die den Nestin re-exprimierenden Astrozyten im CA1-Band und Hilus morphologisch ähnelten. Wie im Hippokampus blieb die genaue Herkunft der Nestin/GFAP doppelt markierten Zellen ungewiss. Auch hier könnten die Hypothesen 1 und 2 angewendet werden. Die Funktion der Astrozyten im Striatum, die Nestin re-exprimieren bzw. die Nestin-Zellen, die GFAP exprimieren ist bisher unbekannt. Es kann spekuliert werden, dass einige Neurone im Striatum nach einer globalen Ischämie zwar morphologisch intakt schienen aber zeitweise funktionell beeinträchtigt waren und wie im geschädigten Hippokampus eine Art „Hilfesignal“ sendeten.

### **4.3 Thallium-Autometallographie zur Untersuchung des zerebralen Kalium-Metabolismus der neuronalen Aktivität nach globaler Ischämie**

Mithilfe des Schwermetalls Thallium (Tl) wird bei der Thallium-Autometallographie der Kalium-Metabolismus und die neuronale Aktivität visualisiert, wobei unabhängig vom untersuchten Areal sowohl Neurone als auch Gliazellen angefärbt werden können. Die mit der Thallium-Autometallographie erzeugten Bilder sind hochgradig komplex und zeigen deutlich, dass in den verschiedenen Regionen der hippokampalen Formation Unterschiede im Grundmetabolismus existieren. Die Strukturen sind gut abgegrenzt und die Färbungen reichen von nahezu ungefärbt bis tief schwarz. Da mit der Thallium-Autometallographie erstellte Bilder den  $K^+$ -Metabolismus und somit indirekt neuronale Aktivität widerspiegeln, lassen sich aus ihnen Informationen für die funktionelle Bildgebung und den zerebralen Metabolismus gewinnen. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass mit dieser Methode Hinweise auf die Ursache der elektrophysiologischen Beeinträchtigung (*in vivo*) nach einer globalen zerebralen Ischämie zu finden sein würden.

Gegenstand dieser Untersuchungen waren sowohl der  $K^+$ -Metabolismus als auch die neuronale und gliale Aktivität im Hippokampus in naiven Tieren und nach 14 bzw. 56 Tagen nach Ischämie.

#### **4.3.1 Vertikale streifenförmige Aktivitätsmuster der CA1-Neurone**

Bei genauen Untersuchungen von Literaturdaten mit photomikroskopischen Aufnahmen des Hippokampus wurden in einigen Fällen nach einer Läsion streifen- bzw. clusterförmige Muster in der CA1-Region/*Stratum radiatum* festgestellt. Dieses Muster stimmt mit den Ergebnissen unserer Thalliumfärbung überein (Abb. 38A, 39A). Zum Beispiel wurde bei der Anfärbung eines Hitzeschockproteins (HSP 27) nach einer Ischämie eine periodisch angeordnete Färbung beobachtet (Hsu und Buszáki, 1993; Kato et al., 1994). Außerdem wurde in ischämischen Ratten nach Anfärbung der CA1-Region/*Stratum radiatum* mit dem Mikrogliamarker OX-42 ein deutliches streifenförmiges Muster detektiert (Hsu et al., 2003). Dieses markante vertikale streifenförmige Muster wurde auch mit der Thallium-Autometallographie in der CA1-Region/*Stratum radiatum* detektiert (Abb. 38A, 39A). Nach heutigem Wissensstand wurden dieser clusterförmige Effekt und das streifenförmige Färbemuster bisher nicht erkannt bzw. diskutiert.

Literaturdaten zur Untersuchungen des lokalen zerebralen Blutflusses im Hippokampus (Kimura et al., 2002; McColl et al., 2004) zeigten keine Hinweise auf ein streifenförmiges Muster. Daher wird angenommen, dass die clusterartige TI-Färbung nicht durch regionale Unterschiede des Blutflusses bedingt war. In Übereinstimmung mit der oben aufgeführten Literatur (Hsu et al., 2003) lassen die eigenen Ergebnisse darauf schließen, dass die alternierende Thallium-Färbung vor allem nach einem partiellen Schaden zum Vorschein kommt. Hierbei werden die überlebenden von den abgestorbenen Neuronen deutlich abgetrennt (Abb. 39A, C). Die zelluläre Entscheidung über Leben und Tod der Neurone scheint clusterförmig in der CA1-Region verteilt zu sein. Deshalb zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu der bekannten spezifischen Vulnerabilität der CA1-Region zum ersten Mal, dass im Hippokampus außerdem eine vertikale streifenförmige Periodizität der Vulnerabilität existiert. Dieser Effekt kann mit einer Nissl-Färbung nicht zum Ausdruck gebracht werden, da die Zelltrümmer in der CA1-Region mit angefärbt werden und somit das clusterförmige Muster nicht zum Vorschein kommt. (Abb. 39D). Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Parameter zu erforschen, die für eine hohe oder niedrige Vulnerabilität der CA1-Neurone nach einem ischämischen Insult verantwortlich sind.

#### **4.3.2 Anfärbung einzelner Neurone im Hilus und ihr Verschwinden nach Ischämie**

Im Hilus naiver Tiere wurde eine auffällige Färbung einzelner Zellen festgestellt. Die pyramidale Gestalt und die Lage der Zellen deuteten darauf hin, dass exzitatorische Mooszellen (engl.: excitatory mossy cells) der naiven Tiere eine große Menge an  $TI^+$  aufgenommen haben (schwarze Pfeile in Abb. 38D). In den Dendriten der Neurone wurde ebenfalls  $TI^+$  festgestellt. Außerdem wurden spindelförmige Zellkörper detektiert, die nur spärlich gefärbt waren und unter der Körnerzellschicht lagen (Sternchen Abb. 38D). Die Dendriten, die von diesen Zellen ausgehen, bildeten ein schwaches Netzwerk mit einer großen Anzahl von Verzweigungen, welche mittels der  $TI^+$ -Färbung in naiven Tieren deutlich gezeigt wurde (Abb. 38D+E). Aufgrund der Morphologie dieses Zelltypes wurden diese Neurone als „Hilus-*Tractus perforans*-verbindende Zellen“ (engl.: hilar perforant path-associated cells) (Freund und Buzsáki, 1996) klassifiziert, die wahrscheinlich eine starke Feedback-Inhibition der Körnerzellen vermitteln. Die eigenen Ergebnisse zeigten, dass die Aktivität sowohl der exzitatorischen als auch der inhibitorischen Interneurone im Hilus nach einem ischämischen Insult verändert wurde. Nach der Ischämie wurden dort mittels  $TI^+$ -Autometallographie keine Zellen mit erweiterten Fortsätzen und dichtem dendritischen

Netzwerk angefärbt. Dies schien besonders für die Region im Hilus einschließlich bis zur Spitze des *Gyrus dentatus* zuzutreffen (Abb. 39E+F, 40E, 41D+E). Das Verschwinden der Färbung dieser Interneurone ließ aber keine eindeutige Aussage zu, ob im Endeffekt eine zunehmende Inhibition oder Exzitation auftrat. Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen *in vivo* nach Ischämie zeigten eine Beeinträchtigung der Doppelpuls-Depression (Buzsáki et al., 1989), was auf eine Abnahme der Inhibition schließen lässt. Es sollte außerdem hervorgehoben werden, dass das Verschwinden der  $Tl^+$ -Färbung in den Mooszellen und den „Hilus- *Tractus perforans*- verbindenden Zellen“ nicht notwendigerweise bedeutet, dass Zellen gestorben oder weggewandert sind. Andererseits zeigten frühere immunhistochemische Studien, dass zumindest die Mooszellen nach globaler Ischämie gefährdet sind (Hsu und Buzsáki, 1993). Außerdem ist interessant, dass, abgesehen von den Interneuronen unter Standardbedingungen keine Kalium-Aktivität in der beschriebenen Region der Moosfasern zu sehen war. Da auch andere Regionen des Gehirnes, in denen Axone verlaufen, wie dem *Corpus callosum*, ungefärbt waren, gehen wir davon aus, dass mit unserer Methode die Aktivität von Axonen nicht angezeigt werden konnte.

#### **4.3.3 Schadensabhängige Variationen der Intensität der Färbung des *Stratum moleculare* und der Körnerzellschicht**

Bei Tieren 14 Tage nach der Ischämie mit einem nahezu kompletten Zelltod im CA1-Band wurde mit der Thallium Autometallographie eine ausgeprägte dunkle Färbung des *Stratum moleculare* und der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* festgestellt (Vergleich Abb. 38A und 39A mit 40A). In den Tieren 14 Tage nach der Ischämie mit einem partiellen Schaden und 8 Wochen nach Ischämie wurde diese Form der Anfärbung nicht beobachtet (Abb. 39E, F; 41D, E). Die intensive Färbung war ein wichtiger Hinweis auf die Ursache der signifikanten und lang anhaltenden Abnahme der PSA im *Gyrus dentatus* nach einer transienten globalen Ischämie (siehe Kapitel 3.1.2.1), obwohl sich die Anzahl der Körnerzellen im *Gyrus dentatus* nicht signifikant reduzierte (Aoyagi et al., 1998; Henrich-Noack et al., 2005). Mithilfe der Nissl-Färbung wurde wie bei Smith et al. (1984) keine schwere morphologische Anomalie in der Körnerzellschicht festgestellt (Abb. 40F; Kapitel 3.1.1, Abb. 16B). Durch die intensive  $Tl^+$ -Färbung der Körnerzellschicht und des *Stratum moleculare* gab es jetzt erstmalig einen morphologischen Hinweis auf eine Veränderung des funktionellen Zustandes des *Gyrus dentatus*. Wahrscheinlich handelte es sich hierbei nicht um eine erhöhte Aktivität der Körnerzellen des *Gyrus dentatus*, sondern um eine

Hyperpolarisation. Diese Störung der Ionen-Homöostase könnte als möglicher Grund für die Beeinträchtigung der Bildung eines Summenaktionspotentials nach einem ischämischen Insult in den Körnerzellen des *Gyrus dentatus* in Frage kommen (Aoyagi et al., 1998; Henrich-Noack et al.; 2005). Es wurde bereits gezeigt, dass eine Änderung der Kalium-Leitfähigkeit während einer Hypoxie mit einer Hyperpolarisation verbunden ist. Diese Änderung kann möglicherweise auf viele verschiedene Arten der Leitfähigkeit zurückgeführt werden, einschließlich der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Leitfähigkeit der  $\text{K}^+$ -Ionen (Krnjevic und Leblond, 1989), die ATP-regulierte Leitfähigkeit der  $\text{K}^+$ -Ionen (Ashcroft, 1988) und die Adenosin-aktivierende-G-Protein-abhängige Leitfähigkeit der  $\text{K}^+$ -Ionen (Berne und Rubio, 1974). Diese Studien zeigten, dass die Zunahme der Kalium-Leitfähigkeit mit einer Abnahme der Erregbarkeit während einer Hypoxie/Ischämie verbunden ist und unterstützen die Hypothese, dass eine Hyperpolarisation, die durch die intensive  $\text{TI}^+$ -Färbung im *Stratum moleculare* und in den Körnerzellen angezeigt wurde, eine mögliche Erklärung für das verringerte PS-Signal im *Gyrus dentatus* nach globaler Ischämie ist. Der mit Zunahme einer persistierenden Kalium-Leitfähigkeit verbundene erhöhte  $\text{K}^+$ -Efflux würde durch eine verstärkte Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase kompensiert, die neben  $\text{K}^+$ -Ionen auch  $\text{TI}^+$ -Ionen in die Zelle transportiert und damit eine Zunahme der intrazellulären  $\text{TI}^+$ -Ionenkonzentration begünstigt. Das Phänomen der intensiven  $\text{TI}^+$ -Färbung der Körnerzellschicht und des *Stratum moleculare* nach Ischämie könnte auf eine Protektion der Neurone in der Körnerzellschicht deuten und schien auch nur für einen begrenzten Zeitraum zuzutreffen. In den Abb. 41D, E ist ersichtlich, dass 56 Tage nach der Ischämie eine unauffällige  $\text{TI}^+$ -Färbung festgestellt wurde, so dass man davon ausgehen kann, dass der physiologische Zustand der Körnerzellen des *Gyrus dentatus* wieder hergestellt wurde. Man kann davon ausgehen, dass 56 Tage nach der Ischämie die Körnerzellen wieder vollständig funktionsfähig waren und eine PSA erzeugen könnten. Diese Hypothese ist aber mit dem vorliegenden Protokoll der elektrophysiologischen Messungen *in vivo* an der freibeweglichen Ratte nicht überprüfbar, da die implantierten Elektroden 56 Tage nach der Ischämie aufgrund des Schädelwachstums nicht mehr exakt platziert sind.

#### 4.3.4 Zunahme des intrazellulären Kalium in aktivierten Gliazellen

Astrozyten werden mit der Thallium-Autometallographie in verschiedenen Regionen des Gehirnes in unterschiedlichem Maße angefärbt (Goldschmidt et al., 2004), obwohl sie fast überall zu finden sind und in einigen Regionen sogar der dominierende Zelltyp sind. Astrozyten sind maßgeblich an der Regulation des Flüssigkeitsmilieus im Gehirn beteiligt und sorgen für die Aufrechterhaltung des Kalium-Haushaltes. Die während der Erregungsleitung in Nervenzellen frei werdenden  $K^+$ -Ionen werden von den Gliazellen aufgenommen. Dieser Vorgang wird als Kaliumpufferung bezeichnet (Kofuji und Newman, 2004) und kann in aktive  $K^+$ -Aufnahme und „räumliches Puffern“ von  $K^+$  unterteilt werden. Die aktive Aufnahme von Kalium in Astrozyten wird durch zwei verschiedene Transporter, die  $Na^+/K^+$ -ATPase und den  $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransporter durchgeführt. Um die Konzentrationsverschiebung auszugleichen, wird neben der aktiven Aufnahme von Ionen passiv Wasser in die Zellen aufgenommen. Dadurch schrumpft am Ort der Pufferung der Extrazellularraum (Holthoff und Witte, 2000). Über Gap junctions (Kopplungsstellen zwischen Astrozyten) diffundieren die überschüssigen Ionen innerhalb des Synzytiums an Orte niedriger Konzentration und werden dort, zusammen mit Wasser, wieder in den interstitiellen Raum abgegeben, was dort zu einer Vergrößerung des Extrazellularraumes führt (Holthoff und Witte, 2000). Die vorliegenden Ergebnisse können jedoch noch keine Hinweise geben, in welchem Ausmaß die Kaliumpufferung zur Färbung von Gliazellen mit der Thallium-Autometallographie beiträgt. In unserer aktuellen Studie können wir nicht eindeutig zwischen  $Tl^+$ -positiven Mikrogliazellen und Astrozyten unterscheiden. Beide Zelltypen können ihre Kalium-Physiologie nach einem Insult ändern (Lyons et al., 2000; Boucsein et al., 2000; Khanna et al., 2001; Kwon et al., 2003; Thomas et al., 2004). Abbildung 40D zeigt den kompletten Schaden in der CA1-Region der hippocampalen Formation 14 Tage nach globaler Ischämie anhand einer Nissl-Färbung. Die kleinen dunkelblauen Punkte deuteten die Vielzahl von Gliazellen an, die über den ganzen Hippokampus und besonders in der CA1-Region und dem Hilus (Abb. 40F) verteilt waren. Im Gegensatz dazu wurde mit der entsprechenden  $Tl^+$ -Färbung eine deutliche streifenförmige Anfärbung von aktivierten, nicht-neuronalen Zellen in der CA1-Region/*Stratum radiatum* sichtbar (Abb. 40A). Dies deutete darauf hin, dass eine Subpopulation von Gliazellen mit dem Kalium-Tracer  $Tl^+$  zu diesem Zeitpunkt nach Ischämie angefärbt war. Im *Stratum lucidum* der CA3-Region wurde eine starke Mikrogliareaktion nach Ischämie gezeigt (Hsu und Buzsáki, 1993). Auch in den eigenen Versuchen wurde in dieser Region des Hippokampus ein sehr stark ausgeprägtes  $Tl^+$ -Signal gefunden (Abb. 40A,

B), welches 56 Tage nach Ischämie noch detektierbar war (Abb. 41E). Außerdem zeigte die Morphologie der  $Tl^+$ -gefärbten nicht-neuronalen Zellen im Hippokampus, dass zu dieser späten Phase nach dem ischämischen Insult vor allem Mikrogliazellen eine umfangreiche Kaliumaufnahme durchführten. Die Abbildungen aus der Publikation von Hsu et al. (2003) stimmten mit dieser Hypothese überein, da diese auch eine streifenförmige Anordnung von OX-42-gefärbten Zellen nach Ischämie offenbarten.

#### 4.3.5 Fragmentierung der Dendriten im *Stratum radiatum* 56 Tage nach Ischämie

Die wenigen überlebenden Neurone in der CA1-Pyramidenzellschicht 56 Tage nach Induktion einer globalen Ischämie zeigten interessante Charakteristika (Abb. 41A). In diesen Zellen war das Soma sehr dunkel angefärbt, so dass auf einen verstärkten  $K^+$ -Einstrom geschlossen werden kann. Dies stimmte mit den Ergebnissen von Zou et al. (2005) überein, der eine selektive Änderung des Kaliumstromes in den CA1-Neuronen nach einer Läsion zeigte. In der CA1-Region der hippocampalen Formation nahmen die Amplituden der verzögerten gleichgerichteten Kaliumströme in den Neuronen nach Ischämie zu. Man kann spekulieren, dass eine erhöhte  $K^+$ -Leitfähigkeit eine der Ursachen für das Überleben der Neurone in der CA1-Region und deren starke  $Tl^+$ -Färbung ist. Außerdem wurde bei den überlebenden oder neugebildeten CA1-Neurone 56 Tage nach Ischämie eine fragmentierte Färbung der Dendriten im *Stratum radiatum* detektiert. Es gibt zwei mögliche Gründe für dieses Phänomen:

- (i) die fragmentierte Färbung könnte ein Hinweis auf einen sehr langsamen degenerativen Prozess sein. Ein langsames Auflösen von postsynaptischen Strukturen nach einer langen Rezirkulationszeit wurde bereits von Bonnekoh et al. (1990) beschrieben.
- (ii) die fragmentierte Färbung zeigte einen remodelierenden Prozess an, der für neue Verbindungen dieser überlebenden bzw. neugebildeten CA1-Neurone stattfand.

Unsere Daten weisen darauf hin, dass wahrscheinlich nach der Ischämie in den präsynaptischen CA3-Neuronen keine große Aktivität mehr vorhanden ist (Vergleich Abb. 38F und 41F), die die Erregungen über die Schaffer-Kollaterale zu den CA1-Dendriten im *Stratum radiatum* vermitteln. Trotzdem sah diese Thallium-inaktive CA3-Region nach einer Nissl-Färbung unauffällig aus, was auf keine Schädigung hindeutete (Abb. 41F, links). Für die weitere Klärung der Spekulation wären elektrophysiologische Messungen *ex vivo* notwendig.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die neuronale Funktion und Plastizität in der hippocampalen Formation nach einer globalen zerebralen Ischämie zu untersuchen.

Eine transiente Vorderhirnischämie bewirkte einen selektiven Zelluntergang in der CA1-Region des Hippokampus, während der benachbarte *Gyrus dentatus* morphologisch (Nissl-Färbung) unbeeinträchtigt blieb. Trotzdem war schon zu einem frühen Zeitpunkt nach transients globaler Ischämie die Aktionspotential-Generierung (PSA) im *Gyrus dentatus* sehr stark vermindert oder blockiert, während die synaptische Transmission (fEPSP) kaum beeinflusst wurde. Eine Stimulation 10 Tage nach Ischämieinduktion führte zu einer Verstärkung oder erst zur Induktion messbarer Potentiale. In *ex vivo* hippocampalen Schnittpräparaten von ischämischen Tieren wurden bei der Populationsspike-Generierung, bei der Doppelpuls-Inhibition und bei der LTP keine Funktionsbeeinträchtigungen beobachtet.

Weiterführende immunhistochemische Untersuchungen zeigten zeitlich korrelierende morphologische Veränderungen im Vorderhirn. Es wurde eine signifikante Proliferationssteigerung 1 und 3 Tage nach einer globalen Ischämie detektiert, wobei die Mehrzahl der neu gebildeten Zellen an Tag 3 nach Ischämie im geschädigten CA1-Bereich, im *Gyrus dentatus*, in der *Fissura hippocampi*, im Hilus und im Striatum als Mikrogliazellen/Makrophagen charakterisiert wurden. Die Ergebnisse dieser Experimente deuteten des Weiteren darauf hin, dass die Mikrogliazellen/Makrophagen z.T. aus gewebeständigen Mikroglia entstanden sind, aber z.T. auch aus den Blutgefäßen und aus den Ventrikelwänden in das Gehirnparenchym migriert sein könnten.

Für die Untersuchung der Veränderung der frühen Neurogenese wurden neuronale Vorläuferzellen (DCX-positiv) in den Proliferationszonen des *Gyrus dentatus* und der SVZ untersucht. Es wurde jedoch keine signifikante Erhöhung neu gebildeter neuronaler Vorläuferzellen (DCX/BrdU-positiv) in beiden Proliferationszonen detektiert. Hingegen wurde eine Reduktion der Anzahl neuronaler Vorläuferzellen (DCX-positiv) im *Gyrus dentatus* gefunden, die sich hauptsächlich auf das obere Blatt beschränkte, welches sich sehr nah an der geschädigten CA1-Region befindet.

Astrozyten wurden im Hippokampus 1 und 3 Tage nach Ischämie deutlich aktiviert, und zwar nicht nur im CA1-Bereich, in dem Zelltod auftritt, sondern u.a. auch im *Gyrus dentatus* und im Striatum. Im Gegensatz zu den Mikroglia/Makrophagen wurde fast keine Astrozytenproliferation festgestellt. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die aktivierten Astrozyten zum großen Teil auch Nestin exprimieren. Generell wird Nestin als Marker für

neurale Vorläuferzellen angesehen, was bedeuten könnte, dass Vorläuferzellen sich in Astrozyten differenziert haben. Jedoch gibt es auch Hinweise für den umgekehrten Vorgang, d.h. dass es zu einer De-Differenzierung von Astrozyten kommt.

Eines der interessantesten Ergebnisse wurde mit der Methode der Thallium Autometallographie erzielt. Im Gegensatz zum Hippokampusgewebe von ungeschädigten Tieren war das Stratum moleculare und die Granularzellschicht des *Gyrus dentatus* 14 Tage nach Ischämie mit vollständigem CA1-Schaden intensiv und dunkel angefärbt, wobei es sich aber wahrscheinlich nicht um eine erhöhte Aktivität der Granularzellen des *Gyrus dentatus* handelt, sondern um eine Hyperpolarisation. Diese Veränderung der Ionen-Homöostase könnte als möglicher Grund für die signifikante Reduktion des PS nach einem ischämischen Insult in Frage kommen. Zusätzlich wurden mit dieser neuen Färbemethode ein vertikales streifenförmige Aktivierungsmuster im CA1-Band und eine sehr spät einsetzende und langsame Degeneration der CA1-Dendriten gezeigt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach einer globalen zerebralen Ischämie neben dem Zelltod der CA1-Pyramidenzellen, eine Abnahme DCX-positiver Zellen und Funktionsbeeinträchtigung in den Körnerzellen des *Gyrus dentatus* und eine massive Zunahme von Mikroglia/Makrophagen und Nestin/GFAP-positiven Zellen im gesamten Vorderhirn auftreten. Durch diese Ergebnisse wird die Komplexität der verschiedenen Vorgänge nach einer globalen Ischämie hervorgehoben, die bei der Suche nach einer endogenen regenerativen Strategie berücksichtigt werden sollten. Desweiteren zeigen die Resultate der Thallium-Autometallographie erstmals eine Synopsis von Funktion und Morphologie auf zellulärer Ebene im post-ischämischen Hippokampus.

## 6. ANHANG

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

2-DG	2-Deoxyglukose-Methode
2VO	2-Gefäße-Verschluss
4VO	4-Gefäße-Verschluss
aCSF	artificial cerebrospinal fluid
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BO	Bulbus olfactorius
BrdU	Bromdesoxyuridin (5'-bromo-2'-deoxyuridin)
bzw.	Beziehungsweise
C	Färbung im Cocktail
CA	cornus ammonis
ca.	circa
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II
CPS	Kryoprotektionslösung (cryoprotection solution)
CSF	colony stimulating factors
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Carboxymethylindocyanin
d3V	dorsaler 3.Ventrikel
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DCX	Doublecortin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	Esel-Normalserum
DPX	1,3-diethyl-8-phenylxanthin
d.h.	das heißt
DCX	Doublecortin
EGF	epidermal growth factor

---

EIP	Endinspiratorischer Druck
fEPSP	exzitatorischen postsynaptischen Feldpotentiale
FGF	fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
Fiss.hippoc.	Fissura hippocampalis
GABA	$\gamma$ -Amino Butyric Acid ( $\gamma$ -Aminobuttersäure)
GD	Gyrus dentatus (Dentate gyrus)
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GNS	Ziegen-Normalserum
HIV	human immunodeficiency virus
HSP	Hitzeschockprotein
IGF	insulin-like growth factor
I/O-Kurve	Reiz-Antwort-Kurve (input-output-curve)
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
Konz.	Konzentration
LTP	Langzeitpotenzierung
LV	lateraler Ventrikel
MCAO	Middle cerebral artery occlusion (mittlere Zerebralarterienokklusion)
MF	Moosfasern
MRT	Magnetresonanztomographie
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NeuN	Neuron-spezifisches Nukleär-Protein
NBQX	2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione
NGF	nerve growth factor
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
pO <sub>2</sub> , pCO <sub>2</sub>	Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PNQX	9-methyl-amino-6-nitro-hexahydro-benzo(f)quinoxalinedione
PS	population spike
PSA	population spike amplitude

---

PTP	posttetanische Potenzierung
RMS	rostraler migratorischer Strom
RT	Raumtemperatur
S	sequenzielle Färbung
SEM	standard error of the mean
SGZ	subgranulären Zone des Gyrus dentatus
SK	Schaffer-Kollaterale
STP	Kurzzeit-Potenzierung (short term potentiation)
Str. gr.	Stratum granulosum
Str.lac./mol	Stratum lacunosum moleculare
SVZ	Subventrikularzone
TBS	Theta-Burst-Stimulation
Tl	Thallium
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling
u.a.	unter anderem
v3V	ventraler 3.Ventrikel
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z.Z.	zurzeit

## 6.2 Materialien und Geräte

### Globale Ischämie

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort, Land</b>
Gase (N <sub>2</sub> O, O <sub>2</sub> )	Linde	Magdeburg, D
Halothan H169	Sigma	Deisenhofen, D
Heparin	Rathiofarm	Ulm, D
Xylocain Gel	Astra GmbH	Wedel, D
<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort, Land</b>
Blutgasanalysator ABL 5	Radiometer	Kopenhagen, DK
Blutzuckermessgerät One Touch Basic	Ortho Diagnostic / Johnsen & Johnsens Systems GmbH	Neckargemünd, D
Drucktransducer FMITBD/1220	FMI Foehr Medical	Seeheim, D
Kleintierbeatmungspumpe KTR4	Hugo Sachs Electronics	March, D
Messbrücken-Verstärker MIO 0501 Dc	FMI Foehr Medical	Seeheim, D
Narkosestand	Medimorph MedLab	Leipzig, D
Polyethylenschlauch als Katheter	NeoLab	Heidelberg, D
Staubsauger	Miele	D
Thermometer Typ MD3150	Beckmann & Egle Industrieelektronik GmbH	Kernen, D
Tubus	Eigenbau Leibniz Institut für Neurobiologie (IfN)	Magdeburg, D
Unterdruckkammer	Eigenbau IfN	Magdeburg, D
Wärmekissen	Warenhaus Karstadt	Magdeburg, D

Stereotaktischen Operation und elektrophysiologischen Messung *in vivo*

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort, Land</b>
Pentobarbital P-3761	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, D
Wasserstoffperoxid	VWR/ Merck	Darmstadt, D
<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort, Land</b>
Auswerteprogramm PWin	IfN	Magdeburg, D
CED 1401plus (Analog/Digitalwandler)	Sciencepark	Cambridge, UK
Dentalbohrer	Nouvag	Goldbach, CH
Dentalbohrkopf US 3RA; 12mm	Meisinger	Düsseldorf, D
Dentalzement-Paladur	Heraeus Kuelzer	Hanau, D
Differential-Verstärker	IfN	Magdeburg, D
Edelstahldraht 0,1mm	Baumarkt	Magdeburg, D
Edelstahlschrauben M1,4; K 2,5; L3,8; VI-081/C	Optotec	Rathenow, D
Elektrodendraht	Altbestand aus DDR	
Gummisockel	IfN	Magdeburg, D
Oszilloskop; HM 205-3	HAMEG GmbH	Frankfurt/Main, D
Reiz-, Ableit- und Erdungskabel	IfN	Magdeburg, D
Stereotaxie	Stölting	Illinois, USA
Stimulator A-M-Systems Model 2100	Science Products GmbH	Frankfurt/Main, D
Stimulus Isolator A365	World Precision Instruments (WPI)	Sarasota, USA
Swivel	Alice Cing Chatham MEDICAL ARTS	USA
Tierboxen für Elektrophysiologische Messungen am freibeweglichen Tier	IfN	Magdeburg, D
Verstärker M61W/M61K	VEB Metra Mess- und Frequenztechnik	Radebeul, D
Vierkanalverstärker	IfN	Magdeburg, D

Ex vivo-Elektrophysiologie

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort, Land</b>
Alpha-D-Glucose	Serva	Heidelberg, D
Kaliumchlorid	Merck	Darmstadt, D
Kalium-Dihydrogen-Phosphat	Serva	Heidelberg, D
Kalziumchlorid	Merck	Darmstadt, D
Magnesiumsulfat	Merck	Darmstadt, D
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, D
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, D
<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort, Land</b>
Analysierprogramm PWin	IfN	Magdeburg, D
Badheizung TR 100-SK1	INH	Magdeburg, D
Binokular	Carl Zeiss Jena	Jena, D
Edelstahl-Stimulationselektroden (ummantelt mit EpoxyLite-Lack)	VEB Drehkondensatoren	Magdeburg, D
Elektrodenziehgerät	Narishige	JP
Elektrodenhalter/Pellets	WPI	Berlin, D
EpoxyLite 6001-M	EpoxyLite International Ltd.	London, UK
Feinmanipulatoren	WPI	Berlin, D
Gewebe-Chopper	Institut für Pharmakologie und Toxikologie	Magdeburg, D
Glaselektroden	Hilgenberg GmbH	Maisfeld, D
Kammer	Institut für Pharmakologie und Toxikologie	Magdeburg, D
Oszilloskop	Gould	
Stimulator A-M Systems	A-M Systems, Inc.	Carlsborg, USA
Verstärker A-M Systems	A-M Systems, Inc.	Carlsborg, USA
Voltage-Follower	WPI	Berlin, D

Histologie

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort, Land</b>
1,3-diethyl-8-phenylxanthin (DPX)	Fluka Chemika	Buchs, CH
3,3-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, D
ABC-Kit	Vector/AXXORA	Grünberg, D
BrdU (5'-bromo-2'-deoxyuridin)	Sigma	Deisenhofen, D
Chloroform	VWR/ Merck	Darmstadt, D
Diethyldithiocarbamat-Natrium Salz (DEDTC)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, D
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	VWR/Merck	Darmstadt, D
Esel-Normalserum (DNS)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, D
Ethanol 100%	VWR/ Merck	Darmstadt, D
Ethylenglycol	VWR/ Merck	Darmstadt, D
Gelatine	VWR/ Merck	Darmstadt, D
Glutardialdehyd	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, D
Glycerol	Roth	Karlsruhe, D
Gummi arabicum	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, D
Histomount	Shandon	Pittsburgh, USA
Hydrochinon	Fluka Chemika	Buchs, CH
Kaliumdichromat	VWR/ Merck	Darmstadt, D
Konz. Essigsäure	VWR/ Merck	Darmstadt, D
Konz. Salzsäure	Roth	Karlsruhe, D
Methanol	VWR/ Merck	Darmstadt, D
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, D
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	VWR/ Merck	Darmstadt, D
Natriumsulfid-Nonahydrat	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, D
Optal	VWR/ Merck	Darmstadt, D
Paraformaldehyd	VWR/ Merck	Darmstadt, D
Paraplast	Roth	Karlsruhe, D
Ratten-Normalserum	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, D
Rotisol	Roth	Karlsruhe, D

Saccharose	VWR/ Merck	Darmstadt, D
Säurefuchsin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, D
Silbernitrat	Merck	Darmstadt, D
Thallium(I)acetat	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, D
Toluidinblau	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, D
Tri-Natriumzitat-Dihydrat	Merck	Darmstadt, D
TritonX100	Roth	Karlsruhe, D
Xylol	VWR/ Merck	Darmstadt, D
Ziegen-Normalserum (GNS)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, D
Zitronensäure	VWR/ Merck	Darmstadt, D
Zitronensäure-Monohydrat	Merk	Darmstadt, D
<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort, Land</b>
24-Well-Multischalen	Biochrom	Berlin, D
Deckgläser	Roth	Karlsruhe, D
Eppendorftubes	Roth	Karlsruhe, D
Färbegestell für Objektträger	Roth	Karlsruhe, D
Färbeküvetten (abgedunkelt und klar)	Roth	Karlsruhe, D
Gefriermikrotom	Leica, Microm	Nussloch; Walldorf, D
Konfokales-Laser-Scanning-Mikroskop LSM 5 Pascal	Carl Zeiss	Jena, D
Lichtmikroskop	Jenaval, Carl Zeiss	Jena, D
Magnetrührer mit Heizplatte	Heidolph	Schabach, D
Objektträger Superfrost Plus	Roth	Karlsruhe, D
Objektträger, geschliffen, geputzt	Roth	Karlsruhe, D
Perfusionspumpen MS-CA2-620C und ISM 914 A	Ismatec	Zürich, CH
pH-Meter	Knick	Berlin, D
Schlittenmikrotom	Leica	Nussloch, D
Schüttler THO 5	Gerlach/Ommilab	Bremen, D
Wärmeschrank	Heraeus/Kendro	Hanau, D
Wasserbad	Leica	Nussloch, D
Zentrifugenröhrchen	Biochrom	Berlin, D

<b>Antikörper</b>					
<b>Hergestellt in (Spezies)</b>	<b>Gegen Antigen (IgG)</b>	<b>Monoklonal (m) Polyklonal (p)</b>	<b>Gekoppelt mit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort, Land</b>
Esel	Huhn	p	Cy2	Dianova	Hamburg, D
Esel	Maus	p	biotinyliert	Dianova	Hamburg, D
Esel	Maus	p	Cy3	Dianova	Hamburg, D
Esel	Ratte	p	Cy2	Dianova	Hamburg, D
Esel	Ratte	p	biotinyliert	Dianova	Hamburg, D
Esel	Ziege	p	Cy3	Dianova	Hamburg, D
Kaninchen	S-100β	m		Swant	CH
Maus	βIII-Tubulin	m		Promega	Mannheim, D
Maus	GFAP	m		Chemicon	Hofheim, D
Maus	Nestin	m		BD Bioscience	Erembodegem, BE
Maus	NeuN	m		Chemicon	München, D
Maus	OX-42	m		DPC-Biermann	Bad Nauheim, D
Huhn	GFAP	p		Chemicon	Hofheim, D
Kaninchen	Mensch+Maus Caspase 3 aktiv A	p		R & D Systems	Wiesbaden-Nordenstadt, D
Ratte	BrdU IgG 2a	m		Oxford Biotechnology	Oxford, UK
Ziege	DCX	p		Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, USA
Ziege	Maus	p	Cy3	Dianova	Hamburg, D
Ziege	Kaninchen	p	Alexa Fluor 568	Mobitec	Göttingen, D
Ziege	Kaninchen	p	Cy3	Dianova	Hamburg, D

## 7. LITERATUR

- Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourchouladze R (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88:615-626.
- Åberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS (2000) Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20(8):2896-903.
- Abdel-Rahman A, Rao MS, Shetty AK (2004) Nestin expression in hippocampal astrocytes after injury depends on the age of the hippocampus. *Glia* 47:299-313.
- Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135:1127-8.
- Altman J (1963) Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. Postnatal growth and differentiation of the mammalian brain, with implications for a morphological theory of memory. *Anat Rec* 145:573-1.
- Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137:433-58.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-336.
- Altman J, Das GD (1966) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol* 126:337-390.
- Alvarez-Buylla A, Nottebohm F (1988) Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature* 335:353-354.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41(5):683-6. Review
- Amaral DG (1993) Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Curr Opin Neurobiol* 3:225-229.
- Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571-591.
- Amaral DG, Witter MP (1995) The hippocampal formation in the rat nervous system. *Acad Press Australia* 81:443-493.

- Andrabi SA, Spina MG, Lorenz P, Ebmeyer U, Wolf G, Horn TFW (2004) Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. *Brain Res* 1017 (1-2):98-107.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, and Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8 (9):963-970.
- Aoyagi A, Saito H, Abe K, Nishiyama N (1998) Early impairment and late recovery of synaptic transmission in the rat dentate gyrus following transient forebrain ischemia in vivo. *Brain Res* 799:130–137.
- Baldauf K, Reymann KG (2005) Influence of EGF/bFGF treatment on proliferation, early neurogenesis and infarct volume after transient focal ischemia. *Brain Res* 1056(2):158-67.
- Balschun D, Wolfer DP, Bertocchini F, Barone V, Conti A, Zuschratter W, Missiaen L, Lipp HP, Frey JU, Sorrentino V (1999) Deletion of the ryanodine receptor type 3 (RyR3) impairs forms of synaptic plasticity and spatial learning. *EMBO J* 18(19):5264-73.
- Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7:111-118.
- Banati RB, Graeber MB (1994) Surveillance, intervention and cytotoxicity: is there a protective role of microglia? *Dev Neurosci* 16:114-127.
- Berne RM, Rubio R (1974) Adenine nucleotide metabolism in the heart. *Circ Res* 3:109-120.
- Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A (2002) Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(17):11464-9.
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG (2000) Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 291(1):17-20.
- Blinzinger K, Kreutzberg G (1968) Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 85(2):145-157.
- Bliss TVP, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bliss TVP, Lømo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.

- Bliss TVP, Lynch MA (1988) Long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus: properties and mechanisms. In: Alan R Liss (ed.) Long-term potentiation: from biophysics to behavior, Inc:3-72.
- Bonnekoh P, Barbier A, Hossmann KA (1990) Ultrastructural findings in the gerbil hippocampus after brief global ischemia and long survival times. *Neuropatol Pol* 28(3-4):189-94.
- Borges K, Gearing M, McDermott DL, Smith AB, Almonte AG, Wainer BH, Dingleline R (2003) Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Exp Neurol* 182:21–34.
- Boucsein C, Kettenmann H, Nolte C (2000) Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices. *Eur J Neurosci* 12:2049-2058.
- Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W, Kempermann G (2003) Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 24(3):603-613.
- Britten JS, Blank M (1968) Thallium activation of the (Na<sup>+</sup>--K<sup>+</sup>)-activated ATPase of rabbit kidney. *Biochim Biophys Acta* 159(1):160-166.
- Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003a) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467:1–10.
- Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG (2003b) Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb Neurogenesis. *Eur J Neurosci* 17:2042-2046.
- Bruel-Jungerman E, Davis S, Rampon C, Laroche S (2006) Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 26(22):5888-5893.
- de Bruine J, van Royen E, Vyth A, de Jong J, van der Schoot J (1985) Thallium-201 diethyldithiocarbamate : an alternative to iodine-123 n-isopropyl-p-iodoamphetamine. *J Nucl Med* 26(8):925-930.
- Buzsàki G, Freund TF, Bayardo, F, Somogyi, P (1989) Ischemia-induced changes in the electrical activity of the hippocampus. *Exp Brain Res* 78:268-278.
- Cameron HA, McKay RD (1999) Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* 2:894-897.

- Chabot S, Williams G, Young VW (1997) Microglia production of TNF alpha is induced by activated lymphocytes. Involvement of VLA-4 and inhibition by interferon- $\beta$ 1b. *J Clin Invest* 100:604-612.
- Chauduri A, Zangenehpour S (2002) Molecular activity maps of sensory function. In: Kaczmarek L, Robertson HJ (eds), Immediate early genes and inducible transcription factors in mapping of the central nervous system function and dysfunction. *Handbook of chemical neuroanatomy*, vol 19. Elsevier, Amsterdam, pp 103-145.
- Chechneva O, Dinkel K, Schrader D, Reymann K.G. (2005) Identification and characterization of two neurogenic zones in interface organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 136:343-355.
- Chechneva O, Dinkel K, Cavaliere F, Martinez-Sanchez M, Reymann KG (2006) Anti-inflammatory treatment in oxygen-glucose-deprived hippocampal slice cultures is neuroprotective and associated with reduced cell proliferation and intact neurogenesis. *Neurobiol Dis* 23(2):247-59.
- Chopp M, Zhang ZG, Jiang Q (2007) Neurogenesis, angiogenesis, and MRI indices of functional recovery from stroke. *Stroke* 38(2 Suppl):827-31.
- Clark BA, Barbour B (1997) Currents evoked in Bergmann glial cells by parallel fibre stimulation in rat cerebellar slices. *J Physiol Lond* 502 (2):335-350.
- Clarke SR, Shetty AK, Bradley JL, Turner DA (1994) Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. *Neuroreport* 5(15):1885-1888.
- Corbett D, Nurse S (1998) The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog Neurobiol* 54:531-548.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 21(1):1-14.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D (1996) In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J. Neurosci.* 16:2649-2658.
- Danscher G (1981) Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy. *Histochemistry* 71:1-16.
- Danscher G (1991) Application of autometallography to heavy metal toxicology. *Pharmacol Toxicol* 68:414-423.

- Danscher G (1996) The autometallographic zinc-sulphide method. A new approach involving in vivo creation of nanometer-sized zinc sulphide crystal lattices in zinc-enriched synaptic and secretory vesicles. *Histochem J* 28(5):361-373.
- Danzer SC, Pan E, Nef S, Parada LF, McNamara JO (2004) Altered regulation of brain-derived neurotrophic factor protein in hippocampus following slice preparation. *Neuroscience* 126:859–869.
- DeVries AC, Nelson RJ, Traystman RJ, Hurn PD (2001) Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? *Neurosci Behav Rev* 24:325–342.
- Diemer NH, Johansen FF, Benveniste H, Bruhn T, Berg M, Valente E, Jorgensen MB (1993) Ischemia as an excitotoxic lesion: protection against hippocampal nerve loss by denervation. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 57:94–101.
- Dirnagl U, Thoren P, Villringer A, Sixt G, Them A, Einhäupl KK (1993) Global forebrain ischaemia in the rat: controlled reduction of cerebral blood flow by hypobaric hypotension and two-vessel occlusion. *Neurol Res* 15:128–130.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397.
- Dirnagl U, Meisel A (2000) Zerebrale Ischämie. In Ganten D & Ruckpaul K (Eds.), *Erkrankungen des Zentralnervensystems*. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and threedimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17(13):5046-61.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703–716.
- Doetsch F (2003) A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13(5):543-50. Review.
- Dougherty KD, Dreyfus CF, Black IB (2000) Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 7(6 Pt B):574-585.
- Douglas KT, Bunni MA, Baidur SR (1990) Thallium in biochemistry. *Int J Biochem* 22:429-438.
- Doyle KL, Khan M, Cunningham AM (2001) Expression of the intermediate filament protein nestin by sustentacular cells in mature olfactory neuroepithelium. *J Comp Neurol* 437(2):186-195.

- Duggal N, Schmidt-Kastner R, Hakim AM (1997) Nestin expression in reactive astrocytes following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 768(1-2):1-9.
- Dunwiddie T, Lynch G (1978) Long-term potentiation and depression of synaptic responses in the rat hippocampus: localization and frequency dependency. *J Physiol* 276:353-67.
- Duvernoy HM (1988) *The human hippocampus*. Munich: JF Bergmann Verlag.
- Eichenbaum H (2001) The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behav Brain Res* 127(1-2):199-207. Review.
- Eichenbaum H (2004) Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44(1):109-20. Review.
- Encinas JM, Vaahtokari A, Enikolopov G (2006) Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(21):8233-8238.
- Endoh M, Maiese K, Wagner JA (1994a) Expression of the neural form of nitric oxide synthase by CA1 hippocampal neurons and other central nervous system neurons. *Neuroscience* 63:679-689.
- Endoh M, Maiese K, Wagner JA (1994b) Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain Res* 651:92-100.
- Feasey KJ, Lynch MA, Bliss TV (1986) Long-term potentiation is associated with an increase in calcium-dependent, potassium-stimulated release of [14C]glutamate from hippocampal slices: an ex vivo study in the rat. *Brain Res* 364(1):39-44.
- Fern R (2001) Ischemia: astrocytes show their sensitive side. *Prog Brain Res* 132:405-411. Review.
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23:373-382.
- Freund TF (1992) GABAergic septal and serotonergic median raphe afferents preferentially innervate inhibitory interneurons in the hippocampus and dentate gyrus. *Epilepsy Res Suppl* 7:79-91.
- Freund TF, Buzsáki G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Frey U, Krug M, Reymann KG, Matthies H (1988) Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res* 452:57-65.
- Frey U, Huang YY, Kandel ER (1993) Effects of cAMP stimulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* 260:1661-1664.

- Frey U, Frey S, Schollmeier F, Krug M (1996) Influence of actinomycin D, a RNA synthesis inhibitor, on long-term potentiation in rat hippocampal neurons in vivo and in vitro. *J Physiol* 490:703-711.
- Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T (2003) Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 23:9357-9366.
- Gabryel B, Trzeciak HL (2001) Role of astrocytes in pathogenesis of ischemic brain injury. *Neurotox Res* 3(2):205-221.
- Gage F (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- Galea LA, McEwens BS (1999) Sex and seasonal differences in the rate of cell proliferation in the dentate gyrus of adult wild meadow voles. *Neuroscience* 89:955-964.
- Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J, Chen S, Chopp M (1993) Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 142(2):623-635.
- Geddes JW, Schwab C, Craddock S, Wilson JL, Pettigrew LC (1994) Alterations in tau immunostaining in the rat hippocampus following transient cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:554-564.
- Gehring PJ, Hammond PB (1967) The interrelationship between thallium and potassium in animals. *J Pharmacol Exp Ther* 155(1):187-201.
- Gehrmann J, Banati RB, Wiessner C, Hossmann KA, Kreutzberg GW. (1995) Reactive microglia in cerebral ischaemia: an early mediator of tissue damage? *Neuropath Appl Neurobiol* 21:277-289.
- Golgi C (1885) Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso VII. tessuto interstiziale degli organi nervosi centrali (Neuroglia). *Riv Sper freniat* 11:72-123.
- Gould E, Tanapat P (1997) Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of adult rat. *Neuroscience* 80:427-436.
- Gould E (1999) Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 21 (2 Suppl):46S-51S.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross, CG (1999a) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286:548 -552.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999b) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2(3):260-265.
- Goldschmidt J, Zuschratter W, Scheich H (2004) High-resolution mapping of neuronal activity by thallium autometallography. *Neuroimage* 23(2):638-47.

- Goldschmidt J, Wanger T, Engelhorn A, Happel M, Ohl F, Scheich H (in preparation) Thallium autometallography using the lipophilic compound thallium diethyldithiocarbamate.
- Götz M, Barde YA (2005) Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. *Neuron* 46(3):369-72. Review.
- Gu W, Brannstrom T, Wester P (2000) Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1166-1173.
- Hamann GF (1997) Der akute Hirninfarkt: Pathophysiologie und moderne Therapiekonzepte. *Radiologe* 37(11):843-852.
- Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10(11):1387-94. Review.
- Haseldonckx M, Van Reempts J, Van de Ven M, Wouters L, Borgers M (1997) Protection with lubeluzole against delayed ischemic brain damage in rats. A quantitative histopathologic study. *Stroke* 28(2):428-32.
- Hastings NB, Gould E (1999) Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol* 413:146-154.
- Hata R, Maeda K, Hermann D, Mies G, Hossmann KA (2000) Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:937-946.
- Hayashi Y, Tomimatsu Y, Suzuki H, Yamada J, Wu Z, Yao H, Kagamishi Y, Tateishi N, Sawada M, Nakanishi H (2006) The intra-arterial injection of microglia protects hippocampal CA1 Neurons against global ischemia-induced functional deficits in rats. *Neuroscience* 142 (1): 87-96.
- Heiss WD (1997) Pathophysiologie des ischämischen Insults. *Klinikerzt* 11/26, 288-292.
- Henrich-Noack P, Schröder UH, Breder J, Reymann KG (2001) Still confusing: The role of metabotropic glutamate receptors in models of excitotoxicity and ischemia. In: *Excitatory amino acids: ten years later* (Turski L, Schoepp DD, Cavalheiro EA, eds), pp 273-288. Amsterdam: IOS Press.
- Henrich-Noack P, Gorkin AG, Krautwald K, Pforte C, Schröder UH, Reymann KG (2005) Tetanus-induced re-activation of evoked spiking in the post-ischemic dentate gyrus. *J Neurosci* 133(2): 571-81.
- Hees H, Sinowatz F (2000) *Kurzlehrbuch der Zytologie und makroskopischen Anatomie*; Deutscher Ärzteverlag; Köln; 3. Auflage S.353-354.

- Herron CE, Lester RAJ, Coan EJ, Collingridge GL (1986) Frequency-dependent involvement of NMDA receptors in the hippocampus: A novel synaptic mechanism. *Nature* 322: 265–268.
- Hickey WF, Vass K, Lassmann H (1992) Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J Neuropathol Exp Neurol* 51:246-256.
- Hoehn M, Nicolay K, Franke C, van der Sanden B (2001) Application of magnetic resonance to animal models of cerebral ischemia. *J Magn Reson Imaging* 14(5):491-509. Review.
- Holleman AF, Wiberg E, Wiberg N (1995) Holleman-Wiberg Lehrbuch der anorganischen Chemie. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 101.Auflage ed.
- Holmin S, Almqvist P, Lendahl U, Mathiesen T (1997) Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury. *Eur J Neurosci* 9(1):65-75.
- Holthoff K und Witte O (2000) Directed statial potassium redistribution in rat neocortex. *Glia* 29(3):288-292.
- Hori N, Carpenter DO (1994) Functional and morphological changes induced by transient in vivo ischemia. *Exp Neurol* 129:279–289.
- Hossmann KA (1987) Experimentelle Grundlagen der Ischämietoleranz des Hirns. *Z Kardiol* 76:(Suppl.4), 47-66.
- Hossmann KA (1996) Periinfarct Depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8:195-208.
- Hossmann KA (1999) The hypoxic brain. Insights from ischemia research. *Adv Exp Med Biol* 474:155-69. Review.
- Hossmann KA (2003) Non-invasive imaging methods for the characterization of the pathophysiology of brain ischemia. *Acta Neurochir Suppl* 86:21-7.
- Hossmann KA (2005) Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol* 26(7-8):1057-83. Review.
- Hsu M, Buzsáki G. (1993) Vulnerability of mossy fiber targets in the rat hippocampus to forebrain ischemia. *J Neurosci* 13:3964-3979.
- Hsu JH, Lee YS, Chang CN, Ling EA, Lan CT (2003) Sleep deprivation prior to transient global cerebral ischemia attenuates glial reaction in the rat hippocampal formation. *Brain Res* 984:170-181.

- Huang YY, Li XC, Kandel ER (1994) cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell* 79:69-79.
- Hunter AJ, Mackay KB, Rogers DC (1998) To what extent have functional studies of ischaemia in animals been useful in the assessment of potential neuroprotective agents? *Trends Pharmacol Sci* 19:59–66.
- Imai F, Sawada M, Suzuki H, Kiya N, Hayakawa M, Nagatsu T, Marunouchi T, Kanno T (1997) Migration activity of microglia and macrophages into rat brain. *Neurosci Lett* 237(1):49-52.
- Imai F, Sawada M, Suzuki H, Zlokovic BV, Kojima J, Kuno S, Nagatsu T, Nitatori T, Uchiyama Y, Kanno T (1999) Exogenous microglia enter the brain and migrate into ischaemic hippocampal lesions. *Neurosci Lett* 272(2):127-30.
- Ito U, Spatz M, Walker JT, Klatzo I (1975) Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropathol* 32:209-223.
- Iwai M, Hayashi T, Zhang WR, Sato K, Manabe Y, Abe K (2001) Induction of highly polysialylated neural cell adhesion molecule (PS-NCAM) in postischemic gerbil hippocampus mainly dissociated with neural stem cell proliferation. *Brain Res* 902:288-293.
- Jensen MS, Lambert JD, Johansen FF (1991) Electrophysiological recordings from rat hippocampus slices following in vivo brain ischemia. *Brain Res* 554:166–175.
- Jessberger S, Kempermann G (2003) Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci* 18:2702-2712.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA (2001) Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8):4710-4715.
- Jin K, Sun Y, Xie L, Peel A, Mao XO, Bateur S, Greenberg DA (2003) Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol Cell Neurosci* 24(1):171-189.
- Jorgensen MB, Johansen FF, Diemer NH (1987) Removal of the entorhinal cortex protects hippocampal CA-1 neurons from ischemic damage. *Acta Neuropathol (Berl)* 73:189–194.
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.

- Kato H, Liu Y, Kogure K, Kato K. (1994) Induction of 27-kDa heat shock protein following cerebral ischemia in a rat model of ischemic tolerance. *Brain Res* 634:235-244.
- Kato H, Takahashi A, Itoyama Y (2003) Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Bull* 60(3):215-221.
- Katsura K, Kristian T, Smith ML, Siesjo BK (1994) Acidosis induced by hypercapnia exaggerates ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 14(2):243-50.
- Kawai T, Takagi N, Miyake-Takagi, Okuyama N, Mochizuki N, Takeo S (2004) Characterization of BrdU-positive neurons induced by transient global ischemia in adult hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:548-555.
- Kee NJ, Preston E, Wojtowicz JM (2001) Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat. *Exp Brain Res* 136(3):313-320.
- Keilhoff G, Bernstein HG, Becker A, Grecksch G, Wolf G (2004) Increased neurogenesis in a rat ketamine model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 56(5):317-22.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997a) Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10409-10414.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997b) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18:3206-3212.
- Kempermann G, Gage FH (1999) Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus* 9:321-332.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 103:391-399.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27(8):447-452. Review.
- Kempinski OS (1994) Neuroprotektion Modelle und Grundprinzipien. *Anaesthesist* 43:25-33.
- Keynes RD (1951) The leakage of radioactive potassium from stimulated nerve. *J Physiol* 113:99-114.
- Keynes RD, Ritchie JM (1965) The movements of labelled ions in mammalian non-myelinated nerve fibres. *J Physiol* 179:333-367.

- Khanna R, Poy L, Zhu X, Schlichter LC (2001) K<sup>+</sup> channels and the microglial respiratory burst. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C796-C806.
- Kimura T, Sako K, Tanaka K, Kusakabe M, Tanaka T, Nakada T (2002) Effect of mild hypothermia on energy state recovery following transient forebrain ischemia in the gerbil. *Brain Res* 145: 83-90.
- Kirino, T (1982) Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus kept unchanged in the first and second blocks of the task, or following ischemia. *Brain Res* 239:57–69.
- Kirino T, Sano K (1984) Fine structural nature of delayed neuronal death following ischemia in the gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol (Berl)* 62:209–218.
- Kirino T (2000) Delayed neuronal death. *Neuropathology* 20 Suppl: S95-7. Review.
- Kirschenbaum B, Doetsch F, Lois C, Alvarez-Buylla A (1999) Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J Neurosci* 19(6):2171-2180.
- Kluska MM, Witte OW, Bolz J, Redecker C (2005) Neurogenesis in the adult dentate gyrus after cortical infarcts: effects of infarct location, N-methyl-D-aspartate receptor blockade and anti-inflammatory treatment. *Neuroscience* 135(3):723-35.
- Kofuji P, Newman E (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129(4):1043-1054.
- Kozlova EN (2003) Differentiation and migration of astrocytes in the spinal cord following dorsal root injury in the adult rat. *Eur J Neurosci* 17(4):782-790.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19(8):312-318. Review.
- Kriegler S, Chiu SY (1993) Calcium signaling of glial cells along mammalian axons. *J Neurosci* 13 (10):4229-4245.
- Krnjevic K, Leblond J (1989) Changes in membrane currents of hippocampal neurons evoked by brief anoxia. *J Neurophysiol* 62:15-30.
- Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G (2003) Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol* 467:455–463.
- Krug M, Lossner B, Ott T (1984) Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res Bull* 13:39-42.
- Kuan CY, Schloemer AJ, Lu A, Burns KA, Weng WL, Williams MT, Strauss KI, Vorhees CV, Flavell RA, Davis RJ, Sharp FR, Rakic P (2004) Hypoxia-ischemia induces DNA

- synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain. *J Neurosci* 24(47):10763-10772.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027–2033.
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17(15):5820-5829.
- Kuhn HG, Svendsen CN (1999) Origins, functions, and potential of adult neural stem cells. *Bioessays* 21(8):625-30.
- Kwon HJ, Hwang IK, An HJ, Han SH, Yang JI, Shin HS, Yoo ID, Kang TC (2003) Changes of glial  $N^+-K^+$  ATPase (alpha 1 subunit) immunoreactivity in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Brain Res* 987:233-239.
- Lalancette-Hébert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J (2007) Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci* 27(10):2596-605.
- Landowne DA (1975) A comparison of radioactive thallium and potassium fluxes in the giant axon of the squid. *J Physiol* 252(1):79-96.
- Lang B, Liu HL, Liu R, Feng GD, Jiao XY, Ju G (2004) Astrocytes in injured adult rat spinal cord may acquire the potential of neural stem cells. *Neuroscience* 128:775–783.
- Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S (2003) Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113(6):717-730.
- Lees GJ (1993) The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia. *J Neurol Sci* 114:119–122.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60(4):585-95.
- Leonhardt W, Julius U, Schulze J, Hanefeld M, Haller H (1985) Elimination of lipofundin S during the intravenous fat tolerance test in patients with low, medium, and high fasting triglyceride concentrations. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* (4):461-463.
- Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC, Nodin C, Ståhlberg A, Aprico K, Larsson K, Yabe T, Moons L, Fotheringham A, Davies I, Carmeliet P, Schwartz JP, Pekna M, Kubista M, Blomstrand F, Maragakis N, Nilsson M, Pekny M

- (2007) Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 28(3):468-81.
- Li Y, Chopp M (1999) Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. *Brain Res* 838(1-2):1-10.
- Lin RC, Matesic DF, Marvin M, McKay RD, Brustle O (1995) Re-expression of the intermediate filament nestin in reactive astrocytes. *Neurobiol Dis* 2(2):79-85.
- Lin JH, Weigel H, Cotrina ML, Liu S, Bueno E, Hansen AJ, Hansen TW, Goldman S, Nedergaard M (1998) Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat Neurosci* 1(6):494-500.
- Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR (1998) Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18:7768-7778.
- Liu J, Bartels M, Lu A, Sharp FR (2001) Microglia/macrophages proliferate in striatum and neocortex but not in hippocampus after brief global ischemia that produces ischemic tolerance in gerbil brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 21(4):361-73.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2074.
- Lugaro, E (1907) Sulle funzioni della nevroglia. *Riv Patol Nerv Ment* 12: 225-233.
- Luskin MB, Boone MS (1994) Rate and pattern of migration of lineally related olfactory bulb interneurons generated postnatally in the subventricular zone of the rat. *Chem Senses* 19:695-714.
- Lynch G, Larson J, Kelso S, Barrionuevo G, Schottler F (1983) Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* 305:719-721.
- Lynch G, Rex CS, Gall CM (2007) LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. *Neuropharmacology* 52(1):12-23. Review.
- Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84(1):87-136. Review.
- Lyons S, Pastor A, Ohlemeyer C, Kann O, Wiegand F, Prass K, Knapp F, Kettenmann H, Dirnagl U (2000) Distinct physiological properties of microglia and blood-borne cells in rat brain slices after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1537-1549.
- Magavi S, Leavitt B, Macklis J (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405:951-955.

- Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Mauk MD, Kelly PT, Nicoll RA, Waxham MN (1989) An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* 340: 554–557.
- Malenka RC, Lancaster B, Zucker RS (1992) Temporal limits on the rise in postsynaptic calcium required for the induction of long-term potentiation. *Neuron* 9:121-128.
- Malinow R, Schulman H, Tsien RW (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245:862-866.
- Manahan-Vaughan D, Reymann KG (1996) Metabotropic glutamate receptor subtype agonists facilitate long-term potentiation within a distinct time window in the dentate gyrus in vivo. *Neuroscience* 74:723–731.
- Markakis E, Gage FH (1999) Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to the field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J. Comp. Neurol.* 406:449-460.
- McColl BW, Carswell HV, McCulloch J, Horsburgh K (2004) Extension of cerebral hypoperfusion and ischaemic pathology beyond MCA territory after intraluminal filament occlusion in C57Bl/6J mice. *Brain Res* 997:14-22.
- McNaughton B L (1982) Evidence for two physiologically distinct perforant pathways to the fascia dentata. *Brain Research* 199:1-19.
- Mies G, Iijima T, Hossmann KA (1993) Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 4(6):709-11.
- Mies G, Kohno K, Hossmann KA (1994) Prevention of periinfarct direct current shifts with glutamate antagonist NBQX following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 14(5):802-7.
- Mittmann T, Eysel UT (2001) Increased synaptic plasticity in the surround of visual cortex lesions in rats. *Neuroreport* 12:3341–3347.
- Mody I, Otis TS, Bragin A, Hsu M, Buzsaki G (1995) GABAergic inhibition of granule cells and hilar neuronal synchrony following ischemia-induced hilar neuronal loss. *Neuroscience* 69:139–150.
- Morioka T, Kalehua AN, Streit WJ (1991) The microglial reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 11(6):966-973.
- Morioka T, Kalehua AN, Streit WJ (1993) Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Comp Neurol* 327(1):123-132.

- Nacher J, Crespo C, McEwen BS (2001) Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur J Neurosci* 14(4):629-644.
- Nakajima Y, Fujimiya M, Maeda T, Mori A (1997) Morphological investigation of the neuroprotective effects of graded hypothermia after diverse periods of global cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res* 765(1):113-2.1
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirini T, Nakafuku M (2002) Regeneration of hippocampal pyramidal neurones after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110:429–441.
- Neumann J, Gunzer M, Gutzeit HO, Ullrich O, Reymann KG, Dinkel K (2006) Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J* 20(6):714-6.
- Neumann-Haefelin T, Witte OW (2000) Periinfarct and remote excitability changes after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:45–52.
- Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW (1989) Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol* 18(3):311-8.
- Nuglisch J, Rischke R, Kriegelstein J (1991) Preischemic administration of flunarizine or phencyclidine reduces local cerebral glucose utilization in rat hippocampus seven days after ischemia. *Pharmacology* 42(6):333-9.
- Opitz T, Richter P, Carter AJ, Kozikowski AP, Shinozaki H, Reymann KG (1995) Metabotropic glutamate receptor subtypes differentially influence neuronal recovery from in vitro hypoxia/hypoglycemia in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 68:989–1001.
- Palmer TD, Takahashi J, Gage FH (1997) The adult rat hippocampus contains premordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 8(6):389-404.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425(4):479-494.
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17(10):3727-3738.
- Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, Academic Press, CA USA; 4. Auflage, Paxinos, G., New York.
- Peruche B, Kriegelstein J (1993) Mechanisms of drug actions against neuronal damage caused by ischemia – an overview. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 17:21-70.

- Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F (1987) Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology* 37(8):1281-1286.
- Petrova TV, Hu J, Van Eldik LJ (2000) Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures. *Brain Res* 853(1):74-80.
- Poeck K, Hacke W (1998) *Neurologie* 10. Aufl. Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
- Popa-Wagner A, Carmichael ST, Kokaia Z, Kessler C, Walker LC (2007a) The response of the aged brain to stroke: too much, too soon? *Curr Neurovasc Res* 4(3):216-27. Review.
- Popa-Wagner A, Badan I, Walker L, Groppa S, Patrana N, Kessler C (2007b) Accelerated infarct development, cytogenesis and apoptosis following transient cerebral ischemia in aged rats. *Acta Neuropathol* 113(3):277-93.
- Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F (1982) Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11(5):491-498.
- Raineteau O, Hugel S, Sigrist M, Arber S, Gahwiler BH (2004) Visualization and analysis of the integration of newly-born granule cells in the hippocampal slice: role of neuronal activity. *FENS Forum Abstr* 2:A072.14.
- Rami A, Krieglstein J (1993) Brain damage caused by ischemia: pathophysiological and pharmacological aspects. *Dementia* 4(1):21-31. Review.
- Ratzliff AH, Howard AL, Santhakumar V, Osapay I, Soltesz I (2004) Rapid deletion of mossy cells does not result in a hyperexcitable dentate gyrus: implications for epileptogenesis. *J Neurosci* 24:2259–2269.
- Reeves TM, Lyeth BG, Phillips LL, Hamm RJ, Povlishock JT (1997) The effects of traumatic brain injury on inhibition in the hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res* 757:119–132.
- Renno T, Krakowski M, Piccirillo C, Lin JY, Owens T (1995) TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J Immunol* 154(2):944-53. Naturaleza probable de la microglia, *Bol Soc Esp Biol*:69-120.
- Reymann KG, Frey U, Jork R, Matthies H (1988) Polymyxin B, an inhibitor of protein kinase C, prevents the maintenance of synaptic long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. *Brain Res* 440(2):305-14.

- Reymann KG, Frey JU (2007) The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, 'synaptic tagging', 'late-associativity' and implications. *Neuropharmacology* 52(1):24-40. Review.
- Richerson GB, Messer C (1995) Effect of composition of experimental solutions on neuronal survival during brain slicing. *Exp Neurol* 131:133-143.
- Riedel G, Seidenbecher T, Reymann KG (1994) LTP in hippocampal CA1 of urethane narcotized rats requires stronger tetanisation parameters. *Physiol Behav* 55:1141-1146.
- Riedel G, Reymann KG (1996) Metabotropic glutamate receptors in hippocampal long-term potentiation and learning and memory. *Acta Physiol Scand* 157(1):1-19. Review.
- del Rio JA, Soriano E (1989) Immunocytochemical detection of 5'-bromodeoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* 49:311-317.
- del Rio Hortega P (1919) El "tercer elemento" de los centros nerviosos. I. La microglia en estado normal. II. Intervencion de la microglia en los procesos patologicos (Celulas en bastoncito y cuerpos granulo-adiposos). III.
- Rios C, Galvan-Arzate S, Tapia R (1989) Brain regional thallium distribution in rats acutely intoxicated with  $Tl_2SO_4$ . *Arch Toxicol* 63(1):34-37.
- Rischke R, Krieglstein J (1991) Postischemic neuronal damage causes astroglial activation and increase in local cerebral glucose utilization of rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 11(1):106-13.
- Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC (1962) Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 55:429-437.
- Rosenzweig MR, Bennett EL (1996) Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav. Brain Res.* 1996; 78: 57-65.
- Rosenzweig MR (2003) Effects of differential experience on the brain and behavior. *Dev Neuropsychol* 24:523-540.
- Romanko MJ, Radoslaw R, Fike JR, Szele FG, Dizon MLV, Felling RJ, Brazel CY, Levison SW (2004) Roles of the mammalian subventricular zone in cell replacement after brain injury. *Prog Neurobiol* 74:77-99.
- Sabelhaus CF, Schröder UH, Breder J, Henrich-Noack P, Reymann KG (2000) Neuroprotection against hypoxic/hypoglycaemic injury after the insult by the group III

- metabotropic glutamate receptor agonist (R, S)-4-phosphonophenylglycine. *Br J Pharmacol* 131:655–658.
- Schielke GP, Kupina NC, Boxer PA, Bigge CF, Welty DF, Iadecola C (1999) The neuroprotective effect of the novel AMPA receptor antagonist PD152247 (PNQX) in temporary focal ischemia in the rat. *Stroke* 30(7):1472-7.
- Schipke CG, Boucsein C, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Kettenmann H (2002) Astrocyte Ca<sup>2+</sup> waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *FASEB J* 16(2):255-7.
- Schmidt W, Reymann KG (2002) Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 334(3):153-156.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429(6988):184-7.
- Schwab ME, Bartholdi D (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76:319-370.
- Seki T, Arai Y (1995) Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport* 6:2479-2482.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen B, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-7160.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 478:359–378.
- Sharp FR, Liu J, Bernabeu R (2002) Neurogenesis following brain ischemia. *Brain Res. Dev. Brain Res* 134:23-30.
- Shinno K, Zhang L, Eubanks JH, Carlen PL, Wallace MC (1997) Transient ischemia induces an early decrease of synaptic transmission in CA1 neurons of rat hippocampus: electrophysiologic study in brain slices. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:955–966.
- Siesjö BK (1992a) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 77:169-184.
- Siesjö BK (1992b) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanism of damage and treatment. *J Neurosurg* 77:337-354.
- Siesjö BK (1993) A new perspective on ischemic brain damage? *Prog Brain Res* 96:1-9.

- Smith ML, Auer RN, Siesjo BK (1984) The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2–10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)* 64:319–332.
- Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M (1977) The [<sup>14</sup>C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: Theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 28:897-916.
- Sokoloff L, Gotoh J, Law MJ, Takahashi S (1996) Functional activation of energy metabolism in nervous tissue: Roles of neurons and astroglia. In: *Pharmacology of Cerebral Ischemia* (Kriegstein J, ed), medpharm Scientific Publishers: Stuttgart, 259-270.
- Soontornniyomkij V, Wang G, Pittman CA, Wiley CA, Achim CL (1998) Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in activated microglia of human immunodeficiency virus type 1 encephalitis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24(6):453-60.
- Squire LR, Knowlton B, Musen G (1993) The structure and organization of memory. *Annu Rev Psychol* 44:453-95. Review.
- Stoltenberg M, Danscher G (2000) Histochemical differentiation of autometallographically traceable metals (au, ag, hg, bi, zn): protocols for chemical removal of separate autometallographic metal clusters in epon sections. *Histochem J* 32(11):645-652.
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1988) Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1 (5):301-307.
- Streit WJ, Walter SA, Pennel NA (1999) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57:563-581.
- Sun W, Winseck A, Vinsant S, Park OH, Kim H, Oppenheim W (2004) Programmed cell death of adult-generated hippocampal neurons is mediated by the proapoptotic gene Bax. *J Neurosci* 24(49):11205-11213.
- Suyama K (1992) Changes of neuronal transmission in the hippocampus after transient ischemia in spontaneously hypertensive rats and the protective effects of MK801. *Stroke* 23:260–266.
- Takagi Y, Nozaki K, Takahashi J, Yodoi J, Ishikawa M, Hashimoto N (1999) Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. *Brain Res* 831(1-2):283-287.

- Takeya M, Hasuo H, Akasu T (2003) Contribution of nitric oxide to the depression of neuronal activity induced by temperature increase in the rat hippocampal CA1 area. *Neurosci Lett* 344:153–156.
- Tang Y, Lu A, Aronow BJ, Wagner KR, Sharp FR (2002) Genomic responses of the brain to ischemic stroke, intracerebral haemorrhage, kainate seizures, hypoglycemia, and hypoxia. *Eur J Neurosci* 15:1937–1952.
- Thomas R, Salter MG, Wilke S, Husen A, Allcock N, Nivison M, Nnoli AN, Fern R (2004) Acute ischemic injury of astrocytes is mediated by Na-K-Cl cotransport and not Ca<sup>2+</sup> influx at a key point in white matter development. *J Neuropathol Exp Neurol* 63(8):856-71.
- Timm F (1985a) [histochemistry of heavy metals ; the sulfide-silver procedure]. *Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med* 46(5) :706-711.
- Timm F (1985b) [histochemistry of zinc]. *Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med* 47(3) :428-431.
- Uchino H, Minamikawa-Tachino R, Kristian T, Perkins G, Narazaki M, Siesjo BK, Shibasaki F (2002) Differential neuroprotection by cyclosporin A and FK506 following ischemia corresponds with differing abilities to inhibit calcineurin and the mitochondrial permeability transition. *Neurobiol Dis* 10(3):219-33.
- Ueda T, Matsunaga T (1995) The influence of unilateral vertebral artery occlusion on brainstem and inner ear blood flow in rat. *Acta Otolaryngol* 115:742–746.
- Urban L, Neill KH, Crain BJ, Nadler JV, Somjen GG (1989) Postischemic synaptic physiology in area CA1 of the gerbil hippocampus studied in vitro. *J Neurosci* 9:3966–3975.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.
- van Rossum D, Hanisch UK (2004) Microglia. *Metab Brain Dis* 19:393-411.
- Verkhratsky A, Kettenmann H (1996) Calcium signaling in glial cells. *Trends Neurosci* 19 (8):346-352.
- Victorov LV, Barskov LV (1993) A method for staining ischemic neurons in the brain and spinal cord. *Pathol Physiol Exp Therap*, N2, 53.
- Whittingham TS, Lust WD, Christakis DA, Passonneau JV (1984) Metabolic stability of hippocampal slice preparations during prolonged incubation. *J Neurochem* 43:689–696.

- Witting A, Muller P, Herrmann A, Kettenmann H, Nolte C (2000) Phagocytic clearance of apoptotic neurons by Microglia/Brain macrophages in vitro: involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition. *Neurochem* 75(3):1060-1070.
- Xu Y, Tamamaki N, Noda T, Kimura K, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Ide C (2005) Neurogenesis in the ependymal layer of the 3<sup>rd</sup> ventricle. *Exp Neurol* 192:251-264.
- Yagita Y, Kitagawa K, Sasaki T, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M (2002) Differential expression of Musashi1 and nestin in the adult rat hippocampus after ischemia. *J Neurosci Res* 69(6):750-756.
- Yamashima T, Tonchev AB, Vachkov IH, Popivanova BK, Seki T, Sawamoto K, Okano H (2004) Vascular adventitia generates neuronal progenitors in the Monkey hippocampus after ischemia. *Hippocampus* 24:861-875.
- Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ (1999) Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat. Med.* 5:448-453.
- Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, Teramoto T, Thomas SS, Waeber C, Bakowska JC, Breakefield XO, Moskowitz MA (2001) FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(10):5874-5879.
- Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hökfelt T, Koistinaho J (1998) Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15769-15774.
- Zhao S, Forster E, Chai X, Frotscher M (2003) Different signals control laminar specificity of entorhinal fibers to the dentate gyrus. *J Neurosci* 23(19):7351-7.
- Zhao S, Chai X, Forster E, Frotscher M (2004) Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. *Development* 131(20):5117-25.
- Zhu DY, Liu SH, Sun HS, Lu YM (2003) Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus. *J Neurosci* 23:223-229.
- Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB (1998) Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 11(4):234-45.
- Zou B, Li Y, Deng P, Xu ZC (2005) Alterations of potassium currents in ischemia-vulnerable and ischemia-resistant neurons in the hippocampus after ischemia. *Brain Res* 1033:78-89.

## 8. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Klaus G. Reymann für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas danken, für seine Unterstützung und die kritische Durchsicht der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Petra Henrich-Noack für die hervorragende Betreuung und das kritische Lesen des Manuskripts. Sie stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und verstand es stets mich zu motivieren.

Ich danke allen Mitarbeitern des FAN-Teams herzlich für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit, die ich mit Ihnen verbracht habe. Mein Dank geht insbesondere an Karla Krautwald, Susanne Schöwe, Dorothee Terhardt und Markus Scharm für die hervorragende technische Unterstützung, Anja Günther-Kern für die Tipps bei den immunhistochemischen Färbungen und an Katrin Böhm für die Durchführung der *ex vivo*-Experimente.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Julietta Frey, Dr. Sabine Frey, Prof. Dr. Detlef Balschun und Dr. A.G. Gorkin für das Erlernen der elektrophysiologischen Messung *in vivo* und für das zur Verfügung gestellte Bildmaterial.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Ulrich H. Schröder, Dr. Jürgen Goldschmidt und Dr. Torsten Hecht für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit. Durch ihre Mithilfe konnte ich die hervorragenden Ergebnisse mit dem autometallographischen Nachweis von Thallium nach Ischämie erzielen.

Dr. Kathrin Baldauf, Dr. Holger Braun, Dr. Ulrich H. Schröder und Dr. Jürgen Goldschmidt danke ich für die Hilfe beim Verfassen der Arbeit.

Unseren guten Seelen Frau Christel Mühlenberg und Monika Herfurth möchte ich auch auf diesem Wege herzlich danken für ihre stets offenen Ohren und manchmal tröstenden aber vorallem aufmunternden Worte.

Meiner lieben Freundin Dr. Claudia Bühnemann danke ich für die schöne Zeit und hoffe, dass wir uns nach dieser Zeit nicht aus den Augen verlieren.

Mein größter Dank geht an meine Familie, insbesondere Alex und Fiona sowie meinen Eltern, ohne deren Geduld und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## 9. LEBENS LAUF

Name	Pforte
Vorname	Claudia
Geburtsdatum	17.04.1978
Geburtsort	Halle
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung

1984-1992	Besuch der Realschule in Hohnstedt
1992-1996	Besuch des Burg-Gymnasiums Wettin

### Berufsausbildung

1996-2002	Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle
05.2002	Diplom im Fach Tierphysiologie
08.2002-09.2005	Promotionsarbeit bei Prof. Dr. K.G. Reymann am Leibniz- Institut für Neurobiologie
10.2005-01.2007	Mutterschutz und Erziehungsjahr
01.2007-	Arbeit suchend

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

„Funktionelle und morphologische Analyse der Läsionsplastizität nach transienter zerebraler Ischämie“

selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 17.März 2008