

Aus dem Institut für Neurophysiologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Auswirkungen von Hyperoxie und Hypoxie auf  
juvenile organotypische hippocampale Schnittkulturen  
der Ratte**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ulrike Hoffmann  
aus Schmölln

Gutachter: 1.: Prof. Dr. U. Heinemann  
2.: Prof. Dr. H. Luhmann  
3.: Prof. Dr. med. U. Dirnagl

Datum der Promotion: 23.03.2007

### **Abstract**

Die Behandlung des perinatalen Sauerstoffmangels mit hohen Sauerstoffspannungen könnte das noch unreife Gehirn des Neugeborenen zusätzlich schädigen. Am Modell der juvenilen hippokampalen organotypischen Hirnschnittkultur (OHSK) wurde die Auswirkung von hohen Sauerstoffspannungen auf Funktion und Struktur von Nervenzellpopulationen unmittelbar nach Hypoxie oder Normoxie untersucht. Störungen der Funktion wurden anhand von Veränderungen reizinduzierter Feldpotentiale elektrophysiologisch gemessen. Strukturelle Zellschäden wurden mittels Messung der Propidium Jodid Fluoreszenzintensität in der Hirnschnittkultur und Bestimmung der Laktatdehydrogenase-Konzentration im Kulturmedium quantifiziert und beschrieben.

In einer ersten Versuchreihe konnte ich nachweisen, dass sich Hypoxie-induzierte strukturelle Zellschäden substantiell größer darstellen, wenn die Reoxygenation mit hohen Sauerstoffspannungen durchgeführt wurde. In einer zweiten Versuchreihe konnte ich zeigen, dass Hypoxie Veränderungen der Feldpotentialcharakteristiken in der Area CA1 induziert und die nachfolgende hyperoxische Reoxygenation einen lang andauernden Ausfall der neuronalen Funktion verursacht. In gemeinsamen Untersuchungen mit anderen Mitgliedern der Projektgruppe wurde deutlich, dass (i) erhöhte Sauerstoffspannungen per se (95 % und 60 % im Vergleich zu 20 %) zu reversiblen und irreversiblen Zellschäden in OHSK führen und (ii) eine Behandlung der OHSK mit Erythropoietin die Erhaltung der neuronalen Funktion des juvenilen Hippokampus während Ischämie und hyperoxischer Reoxygenation begünstigt.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das klinische Szenario wird kritisch diskutiert. Die Aufklärung der Schädigungsmechanismen und des neuroprotektiven Einflusses von Erythropoietin bleibt Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
<b>Methodik</b> .....	<b>9</b>
Präparation und Kultivierung von juvenilen organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (OHSK) .....	9
Inkubatorversuche .....	9
Bestimmung des strukturellen Zellschadens .....	9
Elektrophysiologische Messungen .....	10
Vorversuche zur Präinkubation mit Erythropoietin .....	10
Messung des Sauerstoffpartialdruckes .....	11
Lösungen und Pharmaka .....	11
Statistik .....	11
<b>Ergebnisse</b> .....	<b>12</b>
Akuter neuronaler Zellschaden nach Hypoxie wird durch erhöhte Sauerstoffspannungen in der Reoxygenationsphase verstärkt .....	12
Auswirkungen von Hypoxie und nachfolgender hyperoxischer oder normoxischer Reoxygenation auf die neuronale Aktivität in der Area CA1 des juvenilen Hippocampus .....	13
Hypoxie induziert Veränderungen der Feldpotentialcharakteristiken in der Area CA1 .....	14
Hyperoxische Reoxygenation verursacht einen langdauernden Ausfall der neuronalen Funktion in der CA1 Region .....	14
In Area CA3 führen hyperoxische und normoxische Reoxygenation zu keinen Unterschieden zwischen den beiden experimentellen Gruppen .....	15

Isolierte Hyperoxie führt zu akuter Zellschädigung und Abnahme der Amplitude Reiz-induzierter Feldpotentiale .....	15
Prä-Inkubation der juvenilen OHSK mit Erythropoietin verbessert die synaptische Transmission während Hypoxie/Ischämie und nachfolgender hyperoxischer Reoxygenation .....	16
<b>Diskussion</b> .....	<b>18</b>
<b>Publikationsliste</b> .....	<b>21</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>22</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>27</b>
<b>Erklärung über den Anteil an den Publikationen</b> .....	<b>28</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	<b>29</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>30</b>

## Einleitung

Die Asphyxie des Neugeborenen kurz vor oder während der Geburt (Geburtsasphyxie) ist durch Sauerstoffmangel, Atemdepression und Kreislaufversagen charakterisiert. Diese Symptome verursachen zwangsläufig einen Mangel an Sauerstoff und Glukose sowie eine Anhäufung von CO<sub>2</sub> und Metaboliten (Hypoxie/Ischämie) im Gehirn.

Etwa 4 Millionen Neugeborene sind weltweit jährlich davon betroffen, etwa 1 Million verstirbt an den Folgen und etwa 1 Million Neugeborene sind nach einer moderaten bis schweren Asphyxie durch neurologische Schädigungen ein Leben lang schwer beeinträchtigt (41).

Die Reanimation nach einer Geburtsasphyxie erfolgt in der Regel mit Sauerstoff. Obwohl internationale Leitlinien für die Reanimation von Neugeborenen standardmäßig die Ventilation mit 100 % Sauerstoff empfehlen (37, 38) erlauben die neuen Reanimationsleitlinien 2005 erstmalig in den ersten 90 Sekunden einen initialen Versuch mit Raumluftventilation zu erwägen.

Ursächlich für diese Neuerung in den Reanimationsleitlinien sind die in den letzten Jahren sich mehrenden Hinweise, daß die Therapie mit hohen Sauerstoffspannungen, insbesondere nach einer stattgehabten hypoxisch-ischämischen Episode, das noch unreife Gehirn des Neugeborenen schädigen könnte (4, 30).

Klinische Studien zum Vergleich der Reanimation mit 100 % Sauerstoff und mit Raumluft brachten unterschiedliche Ergebnisse. Vento et al (39, 40) konnten zeigen, dass bei Neugeborenen, die mit 100 % Sauerstoff reanimiert worden waren, die Marker für oxidativen Stress nach 72 Stunden und noch nach 28 Tagen signifikant erhöht waren. Die internationale Resair 2-Studie ergab hinsichtlich der Mortalität und der neurologischen Entwicklung (32) keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen, während Davis et al 2004 (4) in einer Meta-Analyse der Vergleichs-Gruppen aller eingeschlossenen Studien einen signifikanten Vorteil für Kinder, die mit Raumluft reanimiert worden waren, feststellen konnten.

Studien an neugeborenen Tieren deckten auf, dass Reoxygenation mit 15-21 % Sauerstoff im Gegensatz zu 95 % Sauerstoff das Risiko für einen Anstieg von exzitatorischen Aminosäuren sowie für Veränderungen im zellulären Energiestoffwechsel, der Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase sowie des Dopamin- und NO Metabolismus senkten (9, 14, 18, 20, 34). Die Reoxygenation mit niedriger Sauerstoffkonzentration resultierte in kleineren neurologischen Defiziten (20), kleineren Hirnschäden (26) und geringeren histopathologischen Veränderungen eine Woche nach dem hypoxischen Hirntrauma (33). Obwohl andere Arbeiten diese Beobachtungen nicht bestätigen konnten (7, 8, 28, 29) weisen die insgesamt vorliegenden Ergebnisse indirekt darauf hin, dass hohe Sauerstoffkonzentrationen einen schädigenden Einfluss auf Neurone ausüben können. Als Schädigungsmechanismen sind unter anderem ein vermehrter Anfall reaktiver Sauerstoffspezies, sowie Induktion von Apoptose und Inflammation (39, 15, 36) zu diskutieren. Deshalb wird die reduzierte antioxidative Kapazität des neugeborenen Organismus (31) als ein wesentlicher Faktor der Schädigung angesehen. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass Erythropoietin, dessen Produktion nach dem schlagartigen Anstieg des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks bei der Geburt eingestellt wird, neuroprotektive Eigenschaften besitzt. (25, 1). Folglich könnte auch ein Mangel an Erythropoietin die schädigende Wirkung der hyperoxischen Reoxygenation nach der Geburtsasphyxie begünstigen.

Die direkten funktionellen und strukturellen Auswirkungen von hyperoxischer oder normoxischer Reanimation auf hoch vulnerable Regionen des Gehirns wie den Hippokampus sind in situ nicht beobachtbar und daher unbekannt. Da sich ihre direkte Untersuchung am Neugeborenen verbietet, hat sich eine Projektgruppe der Kinderklinik und des Institutes für Neurophysiologie an der Charité zum Ziel gesetzt, entsprechende Untersuchungen an juvenilen organotypischen Hirnschnittkulturen des Hippokampus durchführen.

Das Modell der „juvenilen organotypischen Hirnschnittkultur (OHSK)“ eignet sich gut für die Untersuchung von Schädigungsmechanismen im postnatalen Hippokampus. Das neuronale Netzwerk bleibt im Wesentlichen erhalten (11, 35) und sowohl die Zusammensetzung als auch die Temperatur des artifiziellen Liquors können konstant gehalten bzw. manipuliert werden. Weiterhin sind OHSK hochauflösenden elektrophysiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Techniken zugänglich und haben gegenüber akut präparierten Hirnschnitten den Vorteil, dass Schädigungsmechanismen ohne Interferenz mit dem akuten Präparationstrauma untersucht werden können. Zudem eignen sie sich für die Präinkubation

mit neuroprotektiven Substanzen und für Untersuchungen von Langzeiteffekten. In der vorliegenden Arbeit wurde folgenden Fragen nachgegangen:

1. Werden strukturelle Schädigungen juveniler Nervenzellen nach Sauerstoffmangel durch hyperoxische oder normoxische Reoxygenierung verstärkt?
2. Werden Störungen der Funktion nach Sauerstoffmangel in juvenilen neuronalen Netzwerken durch hyperoxische oder normoxische Reoxygenierung verstärkt?
3. Verursachen hyperoxische Sauerstoffspannungen per se strukturelle Schäden und Veränderungen der Funktion in neuronalen Netzwerken?
4. Kann eine Präkonditionierung juvenilen Gewebes mit Erythropoietin einen neuronalen Zellschaden durch Ischämie und hyperoxische Reoxygenation effektiv reduzieren?



## Methodik

### **Präparation und Kultivierung von juvenilen organotypischen hippokampalen**

#### **Schnittkulturen (OHSK)**

Hippokampale Hirnschnitte wurden aus Gehirnen von Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts im Alter von 6-8 Tagen präpariert und entsprechend der Methode von Stoppini et al. (35) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte für 7-10 Tage bei einer Sauerstoffspannung von 20 %. Eine Kulturmembran enthielt je 3 OHSK. Die Dicke der OHSK betrug zunächst 400 µm und nahm während der Kultivierung auf 150-200 µm ab.

#### **Inkubatorversuche**

Nach der Kultivierungszeit wurden die Schnittkulturen in einen Inkubator transferiert, der auf eine Temperatur von 36,5 Grad Celsius, eine Sauerstoffkonzentration von 3 %, eine Kohlendioxidkonzentration von 4,6 %, gesättigtem Wasserdampfdruck und komplementäre Anteile Stickstoff eingestellt war. Unter diesen hypoxischen Bedingungen verblieben die Schnittkulturen für 30, 60 oder 120 min um dann für 60 min mit 18,8 % Sauerstoff (normoxisch) oder 85 % Sauerstoff (hyperoxisch) reoxygeniert zu werden.

#### **Bestimmung des strukturellen Zellschadens**

Es wurden zwei Methoden angewendet: Die Anfärbung der OHSK mit Propidium Jodid (PJ) unmittelbar im Anschluss an die Behandlung und die Messung der LDH-Aktivität im Kulturmedium eine Stunde nach Beendigung der Behandlung.

PJ ist eine DNA interkalierende, die intakte Zellmembran nicht durchdringende Substanz. Nur bei einer Verletzung der Membranintegrität tritt PJ in das Zytosol und den Zellkern über und bildet mit der DNA einen stabilen fluoreszierenden Komplex, dessen Fluoreszenzintensität mikroskopisch gemessen werden kann. Zur Darstellung der Schädigung wurde das Verhältnis der Intensitäten behandelter Kulturen (Hypoxie und Reoxygenation) und nicht behandelte Kontroll-Kulturen aus dem Kultur-Inkubator benutzt.

LDH ist chemisch und biologisch stabil und befindet sich bei intakter Zellmembran im Zytosol. Nur bei Membranschädigung tritt es in das extrazelluläre Medium über. Die Menge des ausgetretenen LDH korreliert mit der Anzahl der geschädigten Zellen (16). Die LDH-

Aktivität wurde nach der Methode von Koh et al. (16) bestimmt und als Verhältnis der Aktivitätswerte behandelter Kulturen und Kontroll-Kulturen dargestellt.

Die Verwendung von PJ bietet gegenüber der LDH Messung zwei entscheidende Vorteile: Im Gegensatz zum großen LDH Molekül, das einen höheren Grad an Zellmembrandesintegration benötigt, um aus der Zelle ins Medium überzutreten, ermöglicht das kleinere PJ-Molekül eine unmittelbare Beobachtung des entstehenden Zellschadens. Zweitens sind eine regionale und eine populationspezifische Zuordnung des Zellschadens im Fluoreszenzmikroskop möglich.

### **Elektrophysiologische Messungen**

Die elektrophysiologischen Messungen wurden in einer modifizierten doppelten Zwei-Phasen-Kammer, die das Einsetzen der Kulturmembran als Ganzes erlaubte, durchgeführt.

Eine Phase wurde von künstlichem Liquor gebildet, der die OHSK perfundierte. Die andere Phase bestand aus einem mit Wasserdampf gesättigten Gasgemisch. Beide Phasen enthielten je nach Experiment 0 %, 20 % oder 95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid und komplementäre Anteile Stickstoff. Spontane und Reiz-induzierte Feldpotentiale sowie Veränderungen der extrazellulären Kalzium-Konzentration wurden mit ionensensitiven Mikroelektroden im Extrazellulärraum der Regionen CA3 oder CA1 sowie des Gyrus Dentatus (GD) gemessen. Die elektrische Reizung erfolgte mit bipolaren Reizelektroden entweder im Hilus oder im Stratum radiatum der Area CA3.

### **Vorversuche zur Präinkubation mit Erythropoietin**

In 120 Versuchen wurde getestet, wie viel Einheiten Erythropoietin eine Reduktion von Zellschäden in der nachfolgenden PJ-Fluoreszenzmessung erkennen lassen. Weitere 200 Versuche dienten zur Bestimmung des für einen neuroprotektiven Effekt notwendigen Inkubationszeitfensters. Dazu wurden die Schnittkulturen je nach Ansatz 12, 24, 48 oder 72 h mit jeweils 1, 10, 40, 100 und 1000 Einheiten/ml präinkubiert, durchliefen dann 30 min Hypoxie und 60 min Reoxygenation und wurden 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 oder 24 Stunden nach dem Insult mit PJ gefärbt und fluoreszenz-mikroskopisch analysiert.

Die Vorversuche ergaben, dass eine Präinkubation mit 40 Einheiten/ml (332 ng/ml) Erythropoietin für 48 h und 1-2 Stunden Ruhezeit nach dem Experiment die geeigneten Zielparameter darstellten.

### **Messung des Sauerstoffpartialdruckes**

Der Sauerstoffpartialdruck in der OHSK wurde für alle experimentellen Bedingungen in der elektrophysiologischen Messkammer mit einer sauerstoffselektiven Mikroelektrode, beginnend an der Oberfläche bis zu einer Tiefe von 150  $\mu\text{m}$ , in Schritten von 25  $\mu\text{m}$ , gemessen.

### **Lösungen und Pharmaka**

Während der Präparation und Kultivierung von OHSK kamen Pferdeserum, Erythromycin, Penicillin und übliche industriell angebotene Kulturlösungen zum Einsatz. Während der elektrophysiologischen Messungen wurden die OHSK mit künstlichem Liquor (ACSF), der physiologische Konzentrationen von Ionen und Glukose enthielt, perfundiert. Bei Versuchen mit Sauerstoff-Glukose-Deprivation wurde glucosefreie ACSF benutzt. Als Pharmaka wurden Erythropoietin und Januskinase 2 (Jak2)- Inhibitoren verwendet.

### **Statistik**

Die Messwerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes entweder für Originalwerte oder normalisierte Werte angegeben. Zum Gruppenvergleich wurden hauptsächlich parameterfreie Verfahren angewendet (Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whithney-U-Test, Wilcoxon-Test, Friedman-Test; Chi-Quadrat-Test). In einzelnen Fällen wurde der Student-T-Test eingesetzt. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

## Ergebnisse

### **Akuter neuronaler Zellschaden nach Hypoxie wird durch erhöhte Sauerstoffspannungen in der Reoxygenationsphase verstärkt**

Um die Frage zu beantworten, ob strukturelle Schädigungen juveniler Nervenzellen nach Sauerstoffmangel durch hyperoxische oder normoxische Reoxygenierung verstärkt werden, wurden drei Versuchsgruppen organotypischer hippokampaler Schnittkulturen gebildet.

Gruppe A: Hypoxie (30, 60, oder 120 min), Reoxygenation (60 min) mit 19 % Sauerstoff.

Gruppe B: Hypoxie (30, 60, oder 120 min), Reoxygenation (60 min) mit 85 % Sauerstoff.

Gruppe C: Hyperoxie (60 oder 120 min) mit 85 % Sauerstoff, normoxische Erholung (60 min).

Als Parameter für die entstandenen strukturellen Schäden dienten die Intensität der PJ-Fluoreszenz in den Schnittkulturen sowie die LDH-Aktivität im Kulturmedium.

Im Gegensatz zur PJ-Fluoreszenzmessung verursachten 30 Minuten Hypoxie und nachfolgende Reoxygenation noch keine wesentlichen Veränderungen in der LDH Aktivität. Wir führen dies auf die Tatsache zurück, dass für den Austritt des größeren LDH Moleküls ein höherer Verlust an Membranintegrität vorhanden sein muss als für den Eintritt des kleineren PJ-Moleküls. Da der Verlust der Membranintegrität mit der Zeit und mit der Schwere des Traumas zunimmt zeigt die ausgetretene LDH einen größeren Zellschaden später an während die PJ-Fluoreszenzmessung den beginnenden Zellschaden unmittelbar detektieren kann. Deshalb beschränke ich mich im Folgenden auf die Darstellung der PJ-Fluoreszenzmessungen.

Nach 30 min Hypoxie und 60 min Reoxygenation zeigte sich in der Area CA1 ein Anstieg der Signalintensität von 40 % ( $1,4 \pm 0,1$ ) in der normoxischen Gruppe A und von 160 % ( $2,6 \pm 0,19$ ) in der hyperoxischen Gruppe B. Nach 60 min Hypoxie beobachteten wir in Gruppe A einen Anstieg der Signalintensität um 70 % ( $1,7 \pm 0,18$ ) und in Gruppe B von 200 % ( $3,0 \pm 0,47$ ). Nach 120 min Hypoxie erreichte die PJ-Signalintensität in beiden Gruppen ihre Maxima, 100 % ( $2,0 \pm 0,23$ ) Zunahme in der normoxischen Gruppe und 370 % ( $4,7 \pm 0,7$ ) in

der hyperoxischen Gruppe. Im Unterschied zur CA1 Region war in der CA3 Region nach 30 min Hypoxie noch kein Unterschied zwischen den Gruppen A und B nachzuweisen.

In Gruppe C war die Zunahme des PJ-Signals nach 60 min Hyperoxie und 60 min normoxischer Erholung gleich der Zunahme des PJ-Signals nach 120 min Hypoxie und 60 min normoxischer Reoxygenation.

Bei jeweils identischen Hypoxie-Expositionszeiten ergab der Vergleich der Gruppen A und B einen signifikant größeren Zellschaden in der Gruppe B, also nach hyperoxischer Reoxygenation. Damit konnten wir zeigen, dass sich Hypoxie-induzierte Zellschäden substantiell größer darstellen, wenn die Reoxygenation mit hohen Sauerstoffspannungen durchgeführt wurde.

### **Auswirkungen von Hypoxie und nachfolgender hyperoxischer oder normoxischer Reoxygenation auf die neuronale Aktivität in der Area CA1 des juvenilen Hippocampus**

In einigen Testversuchen war nach 60 min Hypoxie in der CA1 Region keine Erholung der Feldpotentiale zu beobachten. Deshalb wählten wir für die Untersuchung der neuronalen Aktivität während Hypoxie und normoxischer oder hyperoxischer Reoxygenation eine Hypoxie-Dauer von 30 min. Um festzustellen, ob eventuell vorhandene sauerstoffabhängige Differenzen in der Erholung der Feldpotentiale regional spezifisch sind, wurde außer der CA1 Region auch die als weniger hypoxie-empfindlich beschriebene CA3 Region untersucht. Für beide Regionen wurden je zwei Gruppen OHSK gebildet. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand in der Sauerstoffspannung (19 % oder 95 %) des während der Vorbereitung und der Reoxygenation verwendeten Gasmisches.

Zur Testung der neuronalen Erregbarkeit wurden im Abstand von 10 min durch gepaarte elektrische Pulse paarige Reizantworten in Form typischer orthodromer Feldpotential-Transienten ausgelöst. Als Parameter dienten die Feldpotential-Charakteristik (positives Feld-EPSP, Populationsspike, positives Nachpotential), die Größe des Populationsspikes, die Zeit zwischen Reizinduktion und Reizantwort (Latenzzeit) und der Paarpulsindex (das Verhältnis der Amplituden von zweiter und erster Reiz-Antwort).

Zu Beginn des Experimentes zeigten die beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede der Reizantworten.

### **Hypoxie induziert Veränderungen der Feldpotentialcharakteristiken in der Area CA1**

30 min Hypoxie führte in 77,3 % der Schnittkulturen zu Veränderungen der Feldpotentialform. Das positive Feld-EPSP, der Populationsspike und das positive Nachpotential verschwanden und es entwickelte sich eine länger andauernde negative Komponente. Während der ersten 10 min Hypoxie kam es bei allen Feldpotentialen zu einer signifikanten Abnahme der Amplitude (im Mittel auf 33 %), einer Zunahme der Latenzzeit, einem mäßigen Anstieg des Paarpuls-Index und einem Abfall der extrazellulären Kalziumkonzentration ohne signifikante Differenzen zwischen den Gruppen. Im weiteren Verlauf der Hypoxie blieben die Veränderungen nahezu konstant.

### **Hyperoxische Reoxygenation verursacht einen langdauernden Ausfall der neuronalen Funktion in der CA1 Region**

Die Feldpotentialamplituden unter 95 % oder 19 % Sauerstoff erholten sich unterschiedlich. Nach 30 min zeigte sich in der hyperoxischen Gruppe eine deutlich stärkere Zunahme der Feldpotentialamplituden (in 9 von 12 Schnitten auf  $82,3 \pm 8,11$  % des Ausgangswertes) als in der normoxischen Gruppe ( $50,6 \pm 19,07$  % in 9 von 10 Schnitten). Die restlichen Schnittkulturen reagierten nicht mehr auf die Reizung. In den nächsten 30 min verloren noch weitere 6 Schnittkulturen der hyperoxischen Gruppe und eine Schnittkultur der normoxischen Gruppe ihre Responsivität auf Stimulation. Am Ende der Reoxygenation erreichten die Feldpotentialamplituden in der hyperoxischen Gruppe (3 von 12) 70 % ( $70,4 \pm 8,07$  %) des Ausgangswertes und in der normoxischen Gruppe (8 von 10) 22 % ( $21,9 \pm 6,62$  %).

Der Verlust der Responsivität ging einher mit „terminalen negativen Potentialabweichungen“ und begleitenden Abfällen der extrazellulären Kalziumkonzentration. Diese Ereignisse waren phänomenologisch identisch mit langdauernden Aktivitäts-Depressionen („Spreading Depressions“ (SD)). Die Bezeichnung „terminal“ reflektiert, dass innerhalb der folgenden 60 min keine Reizantworten mehr auszulösen waren. Da in benachbarten Regionen wie der Area CA3 oder dem Gyrus Dentatus noch Reizantworten evoziert werden konnten, handelt es sich um regional spezifische Ereignisse, die einen kompletten Funktionsausfall anzeigen. In der normoxischen Gruppe waren „terminale negative Potentialabweichungen“ signifikant seltener zu beobachten als in der hyperoxischen Gruppe (2 von 10 versus 9 von 12). In beiden Gruppen traten vereinzelt sogenannte SD-ähnliche Ereignisse und „Anoxische Depolarisationen“ auf.

Die Ergebnisse weisen aus, dass die hyperoxische Reoxygenation eine stärkere Beeinträchtigung der neuronalen Funktion zur Folge hatte als die normoxische Reoxygenation. Die schnelle initiale Zunahme der Antwortamplituden in der hyperoxischen Gruppe koinzidierte mit dem Auftreten der „terminalen negativen Potentialabweichungen“ und dem Verlust der Responsivität. Diese Koinzidenz deutet daraufhin, dass eine schnelle Zunahme der Feldpotentialamplitude während der hyperoxischen Reoxygenation kein Nachweis für eine bessere Regeneration der neuronalen Funktion ist. Weder die Veränderungen der Feldpotentialcharakteristik noch die Veränderungen der Kalziumkonzentration während der Hypoxie oder das seltene Auftreten mutmaßlich schädigender Ereignisse (Anoxische Depolarisationen und SD-ähnliche Ereignisse) standen im Zusammenhang mit dem Auftreten der „terminalen negativen Potentialabweichungen“ in der Reoxygenation.

### **In Area CA3 führen hyperoxische und normoxische Reoxygenation zu keinen Unterschieden zwischen den beiden experimentellen Gruppen**

Während der Hypoxie verringerten sich die Feldpotentialamplituden signifikant auf 40 % ihrer Ausgangswerte in beiden Gruppen. Es wurden keine SD ähnlichen Ereignisse beobachtet und die Kalziumkonzentration blieb über die gesamte Versuchsdauer weitestgehend konstant. Während der Reoxygenation erholten sich die Feldpotentialamplituden auf rund 80 % ihrer initialen Werte, ebenfalls in beiden experimentellen Gruppen. In der hyperoxischen Gruppe wurde eine „negative terminale negative Potentialabweichung“ beobachtet.

### **Isolierte Hyperoxie führt zu akuter Zellschädigung und Abnahme der Amplitude Reiz-induzierter Feldpotentiale**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass hohe Sauerstoffspannungen nach Hypoxie in der CA1 Region eine stärkere Zellschädigung verursachen als normoxische Sauerstoffspannungen, wurde in einem Kooperationsprojekt mit Pomper et al. (ausgewählte Publikationen (1)) der Frage nachgegangen, ob hyperoxische Sauerstoffspannungen per se strukturelle Schäden und Veränderungen der Funktion in neuronalen Netzwerken verursachen können.

Während eines elektrophysiologischen Beobachtungszeitraumes von 90 min wurden 3 Gruppen OHSK untersucht, die sich nur in der Sauerstoffspannung des in der elektrophysiologischen Messkammer verwendeten Gasgemisches (20 %, 60 % und 95 %)

unterschieden. Bei Stimulation an der Grenze Hilus-CA3 erfolgte die Messung der Reiz-induzierten Feldpotentiale mit Kalium-sensitiven Mikroelektroden in der CA1 Region des Hippokampus. Im Gegensatz zur 20%-Gruppe kam es im Verlauf der Experimente mit erhöhten Sauerstoffspannungen zu einer Abnahme der Feldpotentialamplitude. Die Abnahme war in der 60%-Gruppe mäßig und in der 95%-Gruppe deutlich ausgeprägt. Insgesamt war sie in beiden Gruppen gegenüber der 20%-Gruppe signifikant größer. Die Latenz des Feldpotentials nahm im Verlauf zu und war in der 95%-Gruppe gegenüber der 20%-Gruppe signifikant erhöht.

Um strukturelle Zellschäden nachzuweisen wurden die Schnittkulturen im Anschluss an das elektrophysiologische Experiment mit Propidium Jodid gefärbt. Die Fluoreszenzintensität war in allen Regionen des Hippocampus in der 60%-Gruppe und 95%-Gruppe gegenüber der 20%-Gruppe signifikant erhöht. Die höchsten Werte fanden sich in der 95%-Gruppe.

Somit konnte gezeigt werden, dass hohe Sauerstoffspannungen per se sowohl zu Zellmembranschädigung als auch zu funktioneller Beeinträchtigung führen. Das Ausmaß der Zellschäden ist bei einer Sauerstoffspannung von 60 % mäßig und bei einer Sauerstoffspannung von 95 % deutlich erhöht. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Sauerstoffpartialdruck und Ausmaß der Zellschäden lässt sich folglich darum vermuten.

### **Prä-Inkubation der juvenilen OHSK mit Erythropoietin verbessert die synaptische Transmission während Hypoxie/Ischämie und nachfolgender hyperoxischer Reoxygenation**

Für das Zytokin Erythropoietin (EPO), das für seine entscheidende Rolle in der Erythropoese bekannt ist, wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass es neuroprotektive Eigenschaften gegenüber ischämischem, metabolischem und exzitotoxischem Stress besitzt (19, 23). Dabei aktiviert EPO via EPO-Rezeptor die intrazelluläre Janus 2-Kinase. Diese moduliert intrazelluläre Signalkaskaden die dazu beitragen, das Mitochondrienpotential aufrechtzuerhalten. Es wird davon ausgegangen, dass der Zusammenbruch des Mitochondrienpotentials eine wichtige Determinante des entstehenden Zellschadens und der Induktion von Apoptose ist.

Um der Frage nachzugehen, ob eine Präkonditionierung juvenilen Gewebes mit Erythropoietin erstens einen neuronalen Zellschaden durch Ischämie effektiv reduzieren kann



und zweitens eine protektive Wirkung gegenüber dem nachfolgenden hyperoxischen Reoxygenierungsschaden aufweisen könnten wurden drei Versuchsgruppen gebildet. Eine Gruppe wurde nicht vorbehandelt und diente als Kontrollgruppe. Die Schnittkulturen der zweiten Gruppe wurden 48 h vor der elektrophysiologische Beobachtung mit EPO präinkubiert und eine dritte Gruppe wurde 48 h mit EPO und einem Jak2-Inhibitor präinkubiert. Für die elektrophysiologische Beobachtung wurden die Schnittkulturen in die Messkammer transferiert. Der Beobachtungszeitraum umfasste 30 min Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD) und 120 min Reoxygenation mit 95 % Sauerstoff. Die neuronale Reizung erfolgte an der Grenze Hilus-CA3 und die Ableitelektrode wurde in der Area CA1 des Hippocampus positioniert.

In der Kontrollgruppe war während der Sauerstoff-Glukose-Deprivation (OGD) eine Abnahme der Feldpotentialamplituden auf  $8,9 \pm 5,8$  % des Ausgangswertes und während der hyperoxischen Reoxygenation nur eine sehr mäßige Erholung auf  $15,2 \pm 7,2$  % des Ausgangswertes nachweisbar.

In der EPO Gruppe sah man während der OGD im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Unterschied in der Reduktion der Feldpotentialamplituden. Jedoch nach 120 min hyperoxischer Reoxygenation war die mittlere Feldpotentialamplitude auf  $70,6 \pm 19,8$  % des Ausgangswertes angestiegen. Im Unterschied dazu war in der mit EPO plus Jak2-Inhibitor präinkubierten Gruppe keine signifikante Erholung der Feldpotentialamplituden ( $10,9 \pm 5,2$  % versus  $3,9 \pm 4,0$  % des Ausgangswertes) zu beobachten. Diese Befunde zeigen, dass die Behandlung mit EPO die Erholung der Feldpotentialamplituden nach OGD und hyperoxischer Reoxygenation begünstigt.

Die Ergebnisse der im Anschluss an die elektrophysiologischen Untersuchungen durchgeführten PJ-Fluoreszenzmessungen korrelierten inhaltlich eng mit den Beobachtungen der funktionellen Veränderungen. Es zeigte sich ein deutlich stärkerer Zellschaden in der Kontroll- und in der EPO plus Jak2-Inhibitor Gruppe als in der EPO Gruppe. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Erythropoietin (i) einen Teil der Hypoxie induzierten Zellschädigungen reduzieren/verhindern kann und (ii) die durch hyperoxische Reoxygenation verursachte Zellschädigung mindern kann.

## Diskussion

Bezüglich der in der Einleitung aufgeworfenen Fragen ergeben sich aus den Versuchsreihen die folgenden Antworten:

1. Hypoxie induzierte strukturelle neuronale Zellschäden im juvenilen Hirngewebe werden durch hyperoxische Reoxygenation im Vergleich zu normoxischer Reoxygenation verstärkt.
2. Reoxygenation mit hyperoxischen Sauerstoffspannungen nach Hypoxie verstärkt die Beeinträchtigung der neuronalen Funktion.
3. Hyperoxische Sauerstoffspannungen führen per se sowohl zu strukturellen Zellschäden als auch zu funktionellen Beeinträchtigungen. Das Ausmaß der Zellschäden ist bei einer Sauerstoffspannung von 60 % mäßig und bei 95 % deutlich ausgeprägt.
4. 48 Stunden Präinkubation der juvenilen OHSK mit Erythropoietin verbessert die synaptische Transmission nach Hypoxie/Ischämie und nachfolgender hyperoxischer Reoxygenation signifikant und reduziert ebenso den strukturellen Zellschaden.

Aufgrund der Unterschiede zwischen den Spezies, präparations- und kultivierungsbedingter struktureller Veränderungen (z. B. abnorme Konnektivität (11)) und einer möglicherweise kultivierungsabhängigen Vulnerabilität gegenüber Partialdruck-Veränderungen des Sauerstoffs in den OHSK ist die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die humane in vivo Situation grundsätzlich eingeschränkt. Eine weitere Einschränkung der Übertragbarkeit dieser Ergebnisse besteht darin, dass die posthypoxische hyperoxische Reoxygenation in juvenilen OHSK einen deutlich höheren Sauerstoffpartialdruck mit circa 63 kPa (in 100  $\mu\text{m}$  Tiefe) im Gewebe erzielt als dies vermutlich im humanen Gehirn der Fall ist. Erhöhte Sauerstoffspannungen entstehen im kindlichen Hippokampus, wenn z. B. im Rahmen einer Reanimation bei perinataler Asphyxie mit 100 % Sauerstoff beatmet wird. Soweit wir wissen gibt es keine Daten über den daraus resultierenden Sauerstoffpartialdruck im kindlichen Hirngewebe. Indirekte Hinweise ergeben sich aus den arteriell gemessenen Sauerstoffpartialdrücken bei Neugeborenen nach Reanimation mit 100 % Sauerstoff ( $20,9 \pm$

3,4 kPa), aus intraoperativen Messungen im Hirngewebe bei neurochirurgischen Patienten (18,4 bis 46,4 kPa) und aus arteriellen Sauerstoffpartialdrücken nach Ventilation mit 100 % Sauerstoff in Tiermodellen (47-57 kPa) (9, 10, 17, 18, 24, 40).

Da sich Untersuchungen am kindlichen Gehirn ethisch verbieten, stellt die juvenile hippocampale Schnittkultur ein gut geeignetes und zugängliches Modell für die Untersuchung von Schädigungen und Schädigungsmechanismen einer Hochsauerstoffapplikation und für die Testung mögliche Protektionsstrategien dar.

Die zellschädigende Wirkung von hohen Sauerstoffspannungen beruht auf einer Vielzahl von biochemischen Veränderungen im Gehirn, die auf die vermehrte Entstehung von Sauerstoffradikalen, unter anderem  $\text{NO}^-$  (6, 13), zurückgeführt werden. Daraus resultieren unter anderem eine Glutamat- und Aspartat- vermittelte Exzitotoxizität (5), mitochondriale Dysfunktion und Verlust des Mitochondrienmembranpotentials (22), Lipid- und Proteinperoxidation (2), Inhibition der Na-K-ATPase (10) und Triggerung von Nekrose und Apoptose durch DNA-Schädigungen (6, 15, 36).

Vorangegangene tierexperimentelle Studien beschrieben bereits indirekt, dass Zellschäden durch hyperoxische Sauerstoffspannungen nach Asphyxie auch eine Auswirkung auf die Nervenzellfunktion haben könnten, direkt gezeigt werden konnte diese Beobachtung aber erstmals durch die hier aufgeführten Versuchsergebnisse.

Obwohl die Erholung der Feldpotentialamplituden in der CA1 während der hyperoxischen Reoxygenation initial deutlich besser zu sein schien als in der normoxischen Gruppe entwickelte sich in der zweiten Hälfte der Reoxygenation in 75 % der Fälle eine lang anhaltende negative Potentialabweichung begleitet von einem extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Abfall, in deren Folge keine Reizantworten mehr auszulösen waren. Obwohl nicht ausschließen ist, dass es sich hierbei um eine vorübergehende Unerregbarkeit der Neurone handelt, liegt der Schluss nahe, dass ein Zusammenbruch des Potentialgradienten über den Zellmembranen vorlag, der zu einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Überfrachtung führte. Dies, so wird vermutet, ist ein Vorgang, der den Zelltod einleitet (12).

Die Ergebnisse der Propidium Jodid-Färbungen sowie der LDH- Messungen in OHSK, mit deutlich erhöhten Zelltodmarkierungen in der hyperoxischen Gruppe im Vergleich zur normoxischen Gruppe, stützen diese Überlegung.

Erythropoietin moduliert eine Vielzahl an vitalen zellulären Funktionen eingeschlossen Neuroprotektion, Angiogenese, DNA-Reparaturmechanismen und die Aufrechterhaltung der Zellmembranintegrität (21, 23). Ein adaptive Anstieg der Produktion und Sekretion von EPO sowie die verstärkte Expression des EPO-Rezeptors bei Sauerstoffmangel und/oder oxidativem Streß (21, 23, 27) deuten daraufhin, dass EPO eine entscheidende Rolle in der Prävention und Therapie von Hirnschädigungen spielen könnte.

Unsere Ergebnisse im juvenilen Hippokampus der Ratte zeigen, dass EPO nicht nur den Hypoxie-induzierten Zellschaden reduzieren kann, sondern auch den Hyperoxie-induzierten Zellschaden. Dabei tragen vermutlich mehrere Eigenschaften von EPO zur Neuroprotektion in juvenilen OHSK bei. So konnten Morishita et al (25) zeigen, dass EPO den durch Glutamat induzierten Zelltod in hippocampalen Neuronenkulturen signifikant reduzieren konnte. Via Janus Kinase 2 kann es die Induktion von Entzündungsreaktionen und Apoptose blockieren und damit die Entwicklung eines neuronalen Zellschadens reduzieren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass EPO bei oxidativem Stress der Zelle die Depolarisation des Mitochondrienmembranpotentials verhindern kann und damit zur Aufrechterhaltung des zellulären Energiestatus beiträgt (3, 19). Gerade letzteres könnte eine wesentliche Rolle während der hyperoxischen Reoxygenation hypoxisch vorgeschädigten Nervenzellen spielen. Es bleibt offen, ob das unreife antioxidative System des neonatalen Gehirns von der Gabe des Erythropoietin profitieren könnte. Dies wäre ein interessanter Gegenstand zukünftiger Versuchsreihen.

## Publikationsliste

### *Ausgewählte Publikationen*

- (1) Pomper JK, Graulich J, Kovács R, Hoffmann U, Gabriel S and Heinemann U. High oxygen tension leads to acute cell death in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res Dev Brain Res* 2001; 126: 109-116.
- (2) Graulich J, Hoffmann U, Maier RF, Ruscher K, Pomper JK, Ko HK, Gabriel S, Obladen M and Heinemann U. Acute neuronal injury after hypoxia is influenced by the reoxygenation mode in juvenile hippocampal slice cultures. *Brain Res Dev Brain Res* 2002; 137: 35-42.
- (3) Weber A, Maier RF, Hoffmann U, Grips M, Hoppenz M, Aktas AG, Heinemann U, Obladen M, Schuchmann S. Erythropoietin improves synaptic transmission during and following ischemia in rat hippocampal slice cultures. *Brain Res* 2002; 958: 305-311.
- (4) Hoffmann U, Pomper JK, Graulich J, Zeller M, Schuchmann S, Gabriel S, Maier RF, Heinemann U. Changes of neuronal activity in areas CA1 and CA3 during anoxia and normoxic or hyperoxic reoxygenation in juvenile rat organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res* 2006; 1069: 207-215.

### *Weitere Publikationen*

- (5) Pomper JK, Hoffmann U, Kovacs R, Gabriel S, Heinemann U. Hyperoxia is not an essential condition for status epilepticus induced cell death in organotypic hippocampal slice cultures. *Epilepsy Res* 2004; 59: 61-65.
- (6) Pomper JK, Haack S, Petzold GC, Buchheim K, Gabriel S, Hoffmann U, Heinemann U. Repetitive spreading depression-like events result in cell damage in juvenile hippocampal slice cultures maintained in normoxia. *J Neurophysiol* 2006; 95: 355-368.

### Literaturverzeichnis

1. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 643-651.
2. Chavko M and Harabin AL. Regional lipid peroxidation and protein oxidation in rat brain after hyperbaric oxygen exposure. *Free Radic Biol Med* 1996; 7: 973-978.
3. Chong ZZ, Kang JQ and Maiese K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation* 2002; 106: 2973-2979.
4. Davis PG, Tan A, O'Donnell CPF, Schulze A. Resuscitation of newborn infants with 100 % oxygen or air: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2004; 364: 1329-1333.
5. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS and Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 14: 6368-6371.
6. Elayan IM, Axley MJ, Prasad PV, Ahlers ST and Auker CR. Effect of hyperbaric oxygen treatment on nitric oxide and oxygen free radicals in rat brain. *J Neurophysiol* 2000; 83: 2022-2029.
7. Feet BA, Brun NC, Hellstrom-Westas L, Svenningsen NW, Greisen G, Saugstad OD. Early cerebral metabolic and electrophysiological recovery during controlled hypoxemic resuscitation in piglets. *J Appl Physiol* 1998a; 84: 1208-1216.
8. Feet BA, Gilland E, Groenendaal F et al. Cerebral excitatory amino acids and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase activity during resuscitation of severely hypoxic newborn piglets. *Acta Paediatr* 1998b; 87: 889-895.

9. Feet BA, Yu XQ, Rootwelt T, Öyasaeter S, Saugstad OD. Effects of hypoxemia and reoxygenation with 21 % or 100 % oxygen in newborn piglets: extracellular hypoxanthine in cerebral cortex and femoral muscle. *Crit Care Med* 1997; 25: 1384-1391.
10. Goplerud JM, Kim S, Delivoria-Papadopoulos M. The effect of post-asphyxial reoxygenation with 21 % vs. 100 % oxygen on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in striatum of newborn piglets. *Brain Res* 1995; 696: 161-164.
11. Gutierrez R and Heinemann U. Synaptic reorganization in explanted cultures of rat hippocampus. *Brain Res* 1999; 815: 304-316.
12. Hara MR, Snyder SH. Cell Signaling and Neuronal Death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006; 31: epub.
13. Hoehn T, Felderhoff-Mueser U, Maschewski K et al. Hyperoxia causes Inducible Nitric Oxide Synthetase mediated cellular damage to the immature rat brain. *Pediatr Res* 2003; 54: 179-184.
14. Huang CC, Yonetani M, Lajevardi N, Delivria-Despopoulos M, Wilson DF, Pastuszko DF. Comparison of postasphyxial resuscitation with 100 % and 21 % oxygen on cortical oxygen pressure and striatal dopamine metabolism in newborn piglets. *J Neurochem* 1995; 64: 292-298.
15. Ishikawa Y, Satoh T, Enokido Y, Nishio C, Ikeuchi T, Hatanaka H. Generation of reactive oxygen species, release of L-glutamate and activation of caspases are required for oxygen-induced apoptosis of embryonic hippocampal neurons in culture. *Brain Res* 1999; 824: 71-80.
16. Koh JY and Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods* 1987; 20(1): 83-90.

17. Kutzsche S, Ilves P, Kirkeby OJ, Saugstad OD. Hydrogen peroxide production in leukocytes during cerebral hypoxia and reoxygenation with 100 % or 21 % oxygen in newborn piglets. *Pediatr Res* 2001; 49: 834-842.
18. Kutzsche S, Kirkeby OJ, Rise IR, Saugstad OD. Effects of hypoxia and reoxygenation with 21 % and 100 %-oxygen on cerebral nitric oxide concentration and microcirculation in newborn piglets. *Biol. Neonate* 1999; 76: 153-167.
19. Li F, Chong ZZ, Maiese K. Erythropoietin on a Tightrope: Balancing Neuronal and Vascular Protection between Intrinsic and Extrinsic Pathways. *Neurosignals* 2004; 13: 265–289.
20. Liu Y, Rosenthal RE, Haywood Y, Miljkovic-Lolic M, Vanderhoek JY, Fiskum G. Normoxic ventilation after cardiac arrest reduces oxidation of brain lipids and improves neurological outcome. *Stroke* 1998; 29: 1679-1686.
21. Maiese K, Li F, Chong ZZ. Erythropoietin in the brain: can a promise be fulfilled? *Trends in Pharmacol Sci* 2004; 25: 577-583.
22. Maiese K and Chong ZZ. Insights into oxidative stress and potential novel therapeutic targets for Alzheimer disease. *Restor Neurol and Neurosci* 2004; 22: 87-104.
23. Maiese K, Li F, Chong ZZ. New Avenues of Exploration for Erythropoietin. *JAMA* 2005; 293: 90-99.
24. Meixenberger J, Dings J, Kuhnigk H, Roosen K. Studies of tissue PO<sub>2</sub> in normal and pathological human brain cortex. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1993; 59: 58-63.
25. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons and Erythropoietin prevents in vitro glutamate induced neuronal death. *Neuroscience* 1997; 76: 105-116.



26. Munkeby BH, Borke WB, Bjornland K et al. Resuscitation with 100 % O<sub>2</sub> increases cerebral injury in hypoxemic piglets. *Pediatr Res* 2004; 56: 783-790.
27. Pearce W. Hypoxic regulation of the fetal cerebral circulation. *J Appl Physiol* 2006; 100: 731-738.
28. Poulsen JP, Oyasaeter S, Saugstad OD. Hypoxanthine, xanthine, and uric acid in newborn pigs during hypoxemia followed by resuscitation with room air or 100 % oxygen. *Crit Care Med* 1993; 21: 1058-1065.
29. Rootwelt T, Odden JP, Hall C, Ganes T, Saugstad OD. Cerebral blood flow and evoked potentials during Reoxygenation with 21 % or 100 % O<sub>2</sub> in newborn pigs. *J Appl Physiol* 1993; 75: 2054-2060.
30. Saugstad OD. Is oxygen more toxic than currently believed? *Pediatrics* 2001; 108: 1203-1205.
31. Saugstad OD. Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: implications for neonatal disease. *Acta Paediatr* 1996; 85: 1-4.
32. Saugstad OD, Rootwelt T, Aalen O. Resuscitation of asphyxiated newborn infants with room air or oxygen: an international controlled trial: the Resair 2 study. *Pediatrics* 1998; 102: e1.
33. Shimbaku R, Ota A, Pereyra S et al. Hyperoxia with 100 % oxygen following hypoxia-ischemia increases brain damage in newborn rats. *Biol Neonate* 2005; 88: 168-171.
34. Solas AB, Kutzsche S, Vinje M, Saugstad OD. Cerebral hypoxemia-ischemia and Reoxygenation with 21 % or 100 % oxygen in newborn piglets: effects on extracellular levels of excitatory amino acids and microcirculation. *Pediatr Crit Care Med* 2001; 2: 340-345.

35. Stoppini L, Buchs PA and Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 1991; 37: 173-182.
36. Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H. Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol* 1999; 9: 93-117.
37. The 2005 American Heart Association (AHA) guidelines for cardiopulmonary resuscitation (CPR) and emergency cardiovascular care (ECC) of pediatric and neonatal patients: pediatric basic life support.
38. The International Liaison Committee on Resuscitation (ILCOR) consensus on science with treatment recommendations for pediatric and neonatal patients: pediatric basic and advanced life support. *Pediatrics* 2006; 117(5): e955-977.
39. Vento M, Asensi M, Sastre J et al. Resuscitation with room air instead of 100 % oxygen prevents oxidative stress in moderately asphyxiated term neonates. *Pediatrics* 2001; 107: 642-647.
40. Vento M, Asensi M, Sastre J et al. Six years of experience with the use of room air for the resuscitation of asphyxiated newly born term infants. *Biol Neonate* 2001; 79: 261-267.
41. World Health Organisation Child Health and Development: Health of the Newborn, World Health Organisation, Geneva, 1991.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Uwe Heinemann danke ich für die wissenschaftliche Anleitung während meiner Arbeit, für die immer vorhandene Möglichkeit zu anregenden, spannenden wissenschaftlichen Diskussionen, für seine Bereitschaft, Freiheit zu gewähren, wo dies beflügelte und Führung anzubieten, wenn sie nötig war. Besonders danke ich ihm für seine Geduld, seinen zugewandten, aufrichtigen Rat in schwierigen Situationen und seine stete, zuverlässige Unterstützung in jeder Hinsicht.

Frau Dr. Siegrun Gabriel danke ich für die Lehre der elektrophysiologischen Methoden und die Anleitung zum profunden wissenschaftlichen Arbeiten und Denken. Ganz besonders danke ich ihr für ihre Treue, ihre warmherzige, wohlwollende Begleitung und Unterstützung, ihre große Menschlichkeit und Weisheit und nicht zuletzt für ihre Kritik.

Herrn Dr. Johannes Graulich danke ich für die Einarbeitung in mein Projekt, für seine Einführung in die Welt der Wissenschaft und für seine Freundschaft.

Meinen Kollegen Dr. Jörn Pomper, Dennis Päsler, Melanie Zeller, Dr. Katharina Buchheim, Dr. Sebastian Schuchmann, Dr. Karsten Ruscher, Dr. Susanne Wolf, Dr. Tom Schilling, Dr. Claudia Eder, Dr. Ayse Aktas, Dr. Astrid Weber und Olaf Windmüller danke ich für die kollegiale, hilfsbereite und fruchtbare Zusammenarbeit.

Bei Herrn Dr. Hans-Jürgen Gabriel, Herrn Dr. Herbert Siegmund, Frau Dr. Kathrin Schulze, Frau Astrid Dürkopp, Frau Sieglinde Latta und Frau Sonja Frosinski bedanke ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit in technischen und organisatorischen Belangen.

Meinem Mann danke ich für seine bedingungslose Unterstützung und Begleitung und meinen Eltern für das mir geschenkte Zutrauen ins Leben und ihre aufrichtige Liebe.

### **Erklärung über den Anteil an den Publikationen**

Hiermit erkläre ich, dass sich mein Anteil an den Publikationen folgendermaßen ergibt:

Publikationen (2) und (4): Die Versuchsplanung, die Durchführung der Experimente (Präparation der Hirnschnitte und Kultivierung; Vorbereitung und Durchführung der elektrophysiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Messungen sowie der Sauerstoffmessungen), die Auswertung der Experimente (Datenerhebung, deskriptive und beurteilende Statistik) und die Erstellung der Manuskripte wurden hauptsächlich durch mich unter Betreuung von Herrn Prof. Heinemann durchgeführt. Für die Publikation (2) wurden zusätzlich Messungen der LDH Aktivität im Slicekultur-Medium durch Herrn Dr. Karsten Ruscher (Abt. für Experimentelle Neurologie) durchgeführt.

Publikationen (1): Federführend bei dieser Publikation war Herr Jörn Pomper. Ich war bei der Präparation und Kultivierung der Hirnschnittkulturen, der Durchführung der elektrophysiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Messungen, der Sauerstoffmessungen und der Korrektur des Manuskriptes beteiligt.

Publikation (3): Federführend bei dieser Publikation war Frau Dr. Astrid Weber (Abt. für Neonatologie). Ich führte alle Vorversuche zur pharmakologischen Dosisfindung von Erythropoietin und zur Bestimmung des optimalen Therapiezeitfensters durch. Des Weiteren war ich bei der Präparation und Kultivierung der Hirnschnittkulturen, der Durchführung der elektrophysiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Messungen und der Korrektur des Manuskriptes beteiligt.

Berlin, den 18.10.06

Ulrike Hoffmann

Prof. Dr. Uwe Heinemann

### **Selbstständigkeitserklärung**

„Ich, Ulrike Hoffmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

**„Auswirkungen von Hyperoxie und Hypoxie auf juvenile organotypische hippocampale Schnittkulturen der Ratte“**

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 18.10.2006

Ulrike Hoffmann

## **Lebenslauf**

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“