

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

DISSERTATION

Neuroprotektion durch Alpha-Tocopherol und Hypothermie nach Sauerstoff-Glucose-  
Deprivation bei Neocortex-Gewebeschnitten neonataler Ratten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Melanie Zeller

aus Berlin

Datum der Promotion: 22. Juni 2014

# **Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung.....	1
1.1	Allgemeine klinische Grundlagen der perinatalen Ischämie und Hypoxie.....	1
1.2	Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie.....	2
1.3	Mechanismen der hypoxischen Hirnschädigung.....	4
1.4	Experimentell untersuchte Pharmaka.....	6
1.4.1	Vitamin E und weitere Radikalfänger.....	6
1.4.1.1	Vitamin E.....	6
1.4.1.2	Weitere Radikalfänger.....	8
1.4.2	Antagonisten exzitatorischer Aminosäuren.....	8
1.4.2.1	Phenobarbital.....	9
1.4.3	Calziumkanalblocker.....	9
1.4.4	Glukokortikoide.....	10
1.5	Experimentell untersuchte nichtpharmakologische Interventionen.....	10
1.5.1	Hypothermie.....	11
1.6	Studienziele.....	12
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Verwendete Lösungen und Gase.....	14
2.2	Einteilung der Versuchsgruppen.....	14
2.3	Präparation der Hirnschnitte.....	15
2.4	Elektrophysiologische Methoden, ionensensitive Elektroden und Induktion der Sauerstoff-Glucose-Deprivation.....	15
2.5	Interventionen zur Neuroprotektion.....	17
2.5.1	Hypothermie.....	17
2.5.2	Alpha-Tocopherol.....	17
2.5.3	Kombination von Hypothermie und alpha-Tocopherol.....	18
2.5.4	Erythropoietin.....	18
2.6	Imageverfahren.....	18
2.7	Datenerfassung und Analyse.....	19
2.8	Versuchsablauf.....	22
3	Ergebnisse.....	24
3.1	Vorversuche.....	24

3.1.1	Beobachtungen nach Beginn der Sauerstoff-Glucose-Deprivation.....	24
3.1.2	Moderate Sauerstoff-Glucose-Deprivation.....	25
3.1.3	Auswahl des geeigneten alpha-Tocopherolpräparates.....	25
3.2.	Kontrollversuche.....	26
3.2.1	Zelltoadfärbung und Einzelzellzählung am konfokalen Mikroskop.....	26
3.2.2	Leerversuche.....	26
3.2.3	Applikationszeitpunkt.....	27
3.3	Hauptversuche.....	28
3.3.1	Hypothermie.....	28
3.3.2	Alpha-Tocopherol.....	30
3.3.3	Kombination von Hypothermie und Gabe von alpha-Tocopherol.....	32
3.3.4	Erythropoietin.....	34
3.3.5	Vergleich der verschiedenen Interventionen.....	36
4	Diskussion.....	39
5	Tabellenanhang.....	46
6	Literaturverzeichnis.....	50
7	Erklärungen.....	61
8	Lebenslauf.....	63
9	Publikationsliste.....	65
10	Danksagung.....	66

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:

Schematische Darstellung der Messkammer mit Hirnschnitt, calziumsensitiver Referenzmikroelektrode und Reizelektrode.....16

Abbildung 2:

Darstellung der gemittelten Reizantworten bei ansteigenden Reizintensitäten vor und nach OGD.....20

Abbildung 3:

Schematische Darstellung der ROI Areale.....22

Abbildung 4:

Anoxische Depolarisation.....24

Abbildung 5:

Hypothermie nach Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) und OGD ohne Intervention.....29

Abbildung 6:

Vergleich der Ergebnisse bei  $\alpha$ -Tocopherolgabe nach der Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) und bei OGD ohne Intervention.....31

Abbildung 7:

Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) mit kombinierter Intervention von Hypothermie und Tocopherol nach OGD und OGD ohne Intervention.....33

Abbildung 8:

Vergleich der Interventionen: Hypothermie nach OGD (OGD+Hypothermie), Tocopherol nach OGD (OGD+Toco), Tocopherol und Hypothermie nach OGD (OGD+Toco/Hypo) und Erythropoetin nach OGD (OGD+Epo).....37

## Tabellenverzeichnis

(im Text)

Tabelle 6:

Veränderungen bei Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) und Erythropoietin-Gabe nach OGD.....35

(im Tabellen-Anhang 6)

Tabelle 1:

Ausgewählte Parameter bei unterschiedlicher Dauer der OGD.....46

Tabelle 2:

Vergleich der Ergebnisse nach OGD und  $\alpha$ -Tocopherol-Applikation in Abhängigkeit vom Alkoholgehalt der Lösung.....47

Tabelle 3:

DR (PI) in Prozent und mittlere Zellzahl bei Einzelzell zählung am konfokalen Mikroskop in den Interventionsgruppen, verglichen mit der OGDgruppe und der Leergruppe.....47

Tabelle 4:

Wirkungen von Tocopherol (Toco), Alkohol (Alk) und Erythropoietin (Epo) in Kontroll-Hirnschnitten.....48

Tabelle 5:

Übersicht über die Ergebnisse bei Gabe von  $\alpha$ -Tocopherol vor und nach der OGD im Vergleich zur OGD ohne Intervention. ....49

## *Abkürzungsverzeichnis*

Abb - Abbildung	kg - Kilogramm
ACSF - artificial cerebrospinal fluid (künstlicher Liquor)	kHz - Kilohertz
ACSF <sub>G-</sub> - ACSF glucosefrei	mg - Milligramm
ACSF <sub>G+</sub> - ACSF glucosehaltig	Mg <sup>2+</sup> - Magnesiumion
AD - anoxische Depolarisation	MgSO <sub>4</sub> - Magnesiumsulphat
Alk - Alkohol	min - Minute
APGAR - Akronym: Atmung, Puls, Grundtonus, Aussehen, Reflexe.	ml - Milliliter
ATP - Adenosintri-phosphat	µm - Mikrometer
BHS - Blut-Hirn-Schranke	mM - Millimol
Ca <sup>2+</sup> - Calciumion	N <sub>2</sub> - molekulares Nitrogenium (Stickstoff)
CaCl <sub>2</sub> - Calciumchlorid	Na <sup>+</sup> - Natriumion
CCD - charge coupled device	NaCl - Natriumchlorid
Cl <sup>-</sup> - Chloridion	NADH - reduziertes Nicotinamid Adenin Dinukleotid
CO <sub>2</sub> - Kohlenstoffdioxid	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - Natriumdihydrogenphosphat
CTG - Cardiotocogramm	NaHCO <sub>3</sub> - Natriumhydrogencarbonat
DC - direct current potential	NMDA - N-Methyl-D-Aspartat
DNA - Desoxyribonucleic acid	O <sub>2</sub> - Oxygenium (Sauerstoff)
DR - death ratio	OGD - Oxygen(Sauerstoff)-Glucose-Deprivation
EB - Ethidiumbromid	p - Signifikanzwert
Epo - Erythropoietin	Pa <sub>O2</sub> - Sauerstoffpartialdruck
FADH - reduziertes Flavin Adenin Dinukleotid	pH - potentia Hydrogenii
Fe <sup>2+</sup> - zweiwertige Eisenionen	PI - Propidiumjodid
FP - Feldpotential	PiR - pixel in ROI
g - Gramm	RA - Reizartefakt
GABA - Gamma-Aminobutyric acid	RNA - Ribonucleic acid
H <sup>+</sup> - Wasserstoffion (Proton)	ROI - region of interest
HIE - hypoxisch ischämische Enzephalopathie	RRR - rechtsläufige-(R)-Konfiguration des Substituenten nach Cahn-Ingold-Prelog Konvention
Hypo - Hypothermie	Surfactant - surface active agent
IE - internationale Einheit	Tab - Tabelle
IRDS - infant respiratory distress syndrome	Toco - a-Tocopherol
KCl - Kaliumchlorid	Toco/Hypo - Tocopherol + Hypothermie

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der neuroprotektive Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol, Erythropoietin, milder Hypothermie, kombinierter Anwendung von Hypothermie und  $\alpha$ -Tocopherol nach Sauerstoff-Glucose-Deprivation an Neocortex-Gewebsschnitten sechs bis acht Tage alter Wistar-Ratten untersucht. Die Sauerstoff-Glucose-Deprivation wurde durch einen gleichzeitigen Wechsel der Begasung der Interfacekammer und des Perfusionsmediums sowie Glucose-freies Perfusionsmedium ausgelöst und dauerte 20 Minuten. Die Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) führte zu einer vollständigen Unterdrückung von stimulusinduzierten Feldpotentialen in den neokortikalen Gehirnschichten II und III

Nach Beginn der OGD konnte zunächst eine anoxische Depolarisation von etwa 9 mV sowie eine starke Abnahme der extrazellulären Calciumionenkonzentration nach einer Latenzzeit von etwa 12 Minuten beobachtet werden.  $\alpha$ -Tocopherol, das nach der OGD verabreicht wurde, konnte – im Vergleich zu unbehandelten Neocortexschnitten – die Erholung der evozierten Feldpotentiale verbessern sowie eine reduzierte Rate an Propidiumjodid-Fluoreszenzsignalen bewirken, welche als indirekter Hinweis auf eine verminderte Zellschädigung gewertet wurde. Der prozentuale Anteil der Erholung evozierter Feldpotentiale betrug  $112 \pm 9,9$  % in der  $\alpha$ -Tocopherol-Versuchsgruppe und  $96 \pm 4,7$  % in der Erythropoietin-Versuchsgruppe. Dem standen  $81 \pm 5,9$  % in der Kontrollgruppe gegenüber. Die Zelltodrate, kalkuliert anhand der Fluoreszenzsignalintensitäten, betrug  $20 \pm 2$  % bei der  $\alpha$ -Tocopherol-Versuchsgruppe sowie  $11 \pm 2,3$  % in der Erythropoietin-Gruppe im Vergleich zu insgesamt  $40 \pm 2,3$  % in der Gruppe ohne Intervention, wobei die Werte 150 Minuten nach einer Ischämiephase erhoben wurden.

Die Kombination von  $\alpha$ -Tocopherol mit geringgradiger Hypothermie, definiert als ein Temperaturabfall von 4 °C, wies einen ähnlichen neuroprotektiven Effekt auf. Dieser stellte sich als Erholung der evozierten Feldpotentiale ( $108 \pm 6,9$  %) sowie als Reduktion der Propidiumjodid-Fluoreszenz auf  $18 \pm 2$  % dar.

Zusammenfassend zeigte sich ein signifikanter protektiver Effekt bei jeder der einzelnen Interventionsgruppen. Im Trend schien die Anwendung von Erythropoietin, Hypothermie, Tocopherol sowie der Kombination Hypothermie / Tocopherol in aufsteigender Folge zu einer verbesserten Erholung am Ende der Beobachtungsphase zu führen. Es zeigte sich jedoch keine statistische Signifikanz. In den Leergruppen ohne Intervention und ohne Ischämie fand sich in der Gruppe Leer-Toco eine sehr hohe Erholungsrate nach 150 min, welches sich als protektiver Effekt der Tocopherolapplikation diskutieren lässt. Im Weiteren zeigte sich kein signifikanter

Einfluss von  $\alpha$ -Tocopherol, Alkohol und Erythropoietin auf die Erholungsrate am Ende der Beobachtungszeit.

Die vorliegende Studie an neonatalen Neocortices von Ratten belegte einen neuroprotektiven Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol per se, als auch in Kombination mit geringgradiger Hypothermie, im Rahmen einer erfolgten Ischämie, wobei sowohl die funktionelle Erholung verbessert als auch die Zelltodrate entscheidend reduziert werden konnte.



## Synopsis

The work at hand assesses the neuroprotective effects of  $\alpha$ -Tocopherol, Erythropoietin, mild hypothermia and the combined use of hypothermia and  $\alpha$ -Tocopherol on neocortex-slices of six to eight day old wistar-rats after moderate oxygen-glucose-deprivation. Oxygen-glucose-deprivation was induced by a switch of gas in the interface-chamber and the use of glucose-free perfusion-medium for twenty minutes. Oxygen-glucose-deprivation (OGD) lead to a complete suppression of stimulus-induced field-potentials in neocortical brain-layers II and III.

After the onset of OGD we initially observed an anoxic depolarization of about 9 mV as well as a strong reduction of extracellular calcium-ion-concentration after a latency period of about 12 minutes.  $\alpha$ -Tocopherol administered after OGD could – compared to untreated neocortex-slices – improve recovery of evoked field-potentials as well as reduce the rate of propidiumiodide-fluorescence-signals, which was perceived as an indirect indicator of attenuated cell-damage. The proportion of recovery of evoked field-potentials was  $112 \pm 9.9\%$  in the  $\alpha$ -Tocopherol-treatment-group and  $96 \pm 4.7\%$  in the erythropoietin-treatment-group compared to  $81 \pm 5.9\%$  in the control-group. The rate of cell-death, calculated by fluorescence-signal-intensity, was  $20 \pm 2\%$  in the  $\alpha$ -Tocopherol-treatment-group and  $11 \pm 2.3\%$  in the erythropoietin-treatment-group as compared to  $40 \pm 2.3\%$  in the control-group without an intervention. These measures were taken 150 minutes after a phase of ischemia.

The combination of  $\alpha$ -Tocopherol and mild hypothermia, defined as a temperature drop of 4 °C, demonstrated a similar neuroprotective effect. This was shown in a recovery of evoked field-potentials ( $108 \pm 6.9\%$ ) as well as a reduction of propidiumiodide-fluorescence to  $18 \pm 2\%$ .

In summary we could demonstrate a significant neuroprotective effect in each of the intervention-groups. We observed a trend of progressive neuroprotective potential demonstrated by improved recovery at the end of the observation period using Erythropoietin, hypothermia, Tocopherol and the combination of hypothermia/Tocopherol in that order. This did not achieve statistical significance. In the control-groups without intervention and without ischemia there was an extremely high recovery-rate in the Tocopherol-group after 150 minutes, which could be discussed to be a protective effect of Tocopherol-application. Subsequently we could not show a significant impact of  $\alpha$ -Tocopherol, alcohol and Erythropoietin on recovery-rate at the end of the observation-period.

The study at hand on neocortices of neonatal rats demonstrated a neuroprotective effect of  $\alpha$ -Tocopherol *per se* as well as in combination with mild hypothermia following an ischemic insult.

In this context functional recovery was improved as well as the rate of cell-death significantly reduced.

## 1. Einleitung

In der Neonatalperiode sind die Autoregulationssysteme des zerebralen Kreislaufs noch nicht vollständig ausgereift. Aus diesem Grund ist das neonatale Hirn sehr anfällig gegenüber Blutdruckschwankungen sowie gegenüber Veränderungen des Blutflusses. Fällt der intravaskuläre Druck oder vermindert sich die zerebrale Perfusion, dann hat dies eine Ischämie und schließlich eine Zellschädigung zur Folge. Steigt hingegen der Perfusionsdruck stark an, besteht wegen des noch fragilen Kapillar- und Arteriolen-systems das Risiko, dass eine Hirnblutung eintritt.

Der intrauterine und postnatale Sauerstoffmangel lebenswichtiger Organe (Asphyxia fetalis) zählt darüber hinaus zu den bedrohlichsten Situationen sowohl für den Fetus als auch das Neugeborene. Die Ausprägung der Asphyxie korreliert mit der Dauer des Sauerstoffmangels. Hält dieser lange an, so verursacht das schwere Organmanifestationen, wie z. B. Herzmuskelnekrosen, Lungenkongestionen und hypoxisch-ischämische Nieren- oder Hirninfarkte. Im Verlauf der Asphyxie kann es zu einem Multiorganversagen, zu einer hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie oder zu beiden Schädigungen gleichzeitig kommen (Niessen, 2007). Bedeutsam für die weitere kindliche Entwicklung sind vor allem zerebrale Defekte, welche aus dem entstehenden Hirnödem und den nachfolgenden Nekrosen, insbesondere im Bereich der Stammganglien und des Cortex, sowie auch aus häufig auftretenden intraventrikulären Blutungen oder Hirnmassenblutungen resultieren und schließlich zu zerebralen Lähmungen und Intelligenzdefiziten führen.

Eine perinatale Asphyxie kann durch verschiedenartige Komplikationen ausgelöst werden. Hier seien beispielhaft nur einige aufgeführt: die plötzliche Unterbrechung des umbilikalen Blutflusses, eine vorzeitige Plazentalösung, eine Hypotonie oder Hypoxie, die bei der Schwangeren auftritt, eine chronische Plazentainsuffizienz sowie eine Atemdepression oder ein Atemstillstand beim Neugeborenen. Infolge der genannten Komplikationen kommt es sowohl zur Beeinträchtigung der postnatalen Anpassungsvorgänge als auch des kindlichen Atem- und Kreislaufzentrums.

### ***1.1. Allgemeine klinische Grundlagen der perinatalen Ischämie und Hypoxie***

Die arterielle Blutgaskonzentration des Sauerstoffs ( $P_{aO_2}$ ) liegt mit 20 bis 25 mmHg während der fetalen Entwicklung generell niedrig. Als häufigste Ursache hypoxisch-ischämischer Störungen

– unabhängig davon, ob diese primär oder sekundär ausgelöst werden – ist in diesem Zusammenhang die Hypoperfusion zu nennen.

Die primäre perinatale Hypoxämie in utero tritt oft infolge einer akuten Plazentainsuffizienz auf. Kinder, die einem entsprechenden Ereignis ausgesetzt waren, leiden nachgeburtlich häufig unter respiratorischen oder kardialen Komplikationen (Vannucci, 1993; Vannucci und Hagberg, 2004). Die postnatale Hypoxämie resultiert aus einer respiratorischen und einer kardialen Insuffizienz. Die respiratorische Insuffizienz ist häufig Folge eines Surfactant-Mangels. Surfactant (aus: surface active agent), wird ab der 28. Schwangerschaftswoche gebildet und trägt dazu bei, die Oberflächenspannung der Lungenbläschen zu senken und damit ein möglichst großes Areal zum Gasaustausch zu Verfügung zu stellen (Niessen, 2007). Das infant respiratory distress syndrome (IRDS) stellt insbesondere bei Frühgeborenen eine der häufigsten Todesursachen dar (Roberts und Dalziel, 2006; Kiechle, 2007; Niessen, 2007; Sweet et al., 2007; Engle et al., 2008).

Eine massive kardiale kontraktile Dysfunktion durch Fehlbildungen oder schwere Hypoxämie, führt ebenfalls zur Hypoperfusion und zu einem Hirnödem (Vannucci et al., 1993; Vannucci und Hagberg, 2004). Eine neonatale Sepsis, beispielsweise infolge eines Amnioninfektionssyndroms der Schwangeren, stellt eine weitere Ursache der Kreislaufinsuffizienz dar.

In der Reaktion auf die hypoxisch-ischämischen Schädigungen wird das Blutvolumen beim Feten umverteilt. Hierbei werden Organe, wie beispielsweise Leber, Nieren, Darm und Lunge, sowie die Skelettmuskulatur durch Shuntverbindungen nahezu umgangen, zugunsten einer verstärkten Durchblutung unmittelbar lebensnotwendiger Organsysteme, wie Herz, Hirn und Nebennieren. Mit fortschreitendem hypoxisch-ischämischem Status fällt die Sauerstoffsättigung zunehmend ab. Herzfrequenz, Blutdruck und Herzleistung sinken und es entsteht schließlich eine systemische metabolisch-respiratorische Azidose. Diese Entwicklung lässt sich durch Reanimationsmaßnahmen verlangsamen oder unterbrechen (Vannucci, 1993; Vannucci und Hagberg, 2004; Vannucci und Vannucci, 2005).

## ***1.2. Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie***

Die häufigste Ursache bleibender Schädigungen, wie beispielsweise Lernbehinderungen, mentale Retardierung, Epilepsie oder eine spastische Zerebralparese, ist die hypoxisch-ischämische Enzephalopathie in der perinatalen Phase. Die Inzidenz liegt bei zwei bis vier unter 1.000 Neugeborenen. Etwa 15 – 20 % der Säuglinge, die eine hypoxisch-ischämische Enzephalopathie (HIE) entwickeln, sterben in den ersten 28 Lebenstagen. Bei 25 % der

überlebenden Kinder stellen sich die oben genannten neuropsychologischen Defizite, die sich kaum behandeln lassen, dauerhaft ein (Volpe, 1992; Vannucci, 2000).

Sarnat teilte 1976 die postischämisch entstandene Enzephalopathie in mehrere Schweregrade, welche von Thompson und seinen Mitarbeitern 1997 weiter aufgeschlüsselt wurden. (Sarnat, 1976, Thompson et al., 1997):

Neugeborene mit einer eher milden Verlaufsform der HIE (Grad 1) weisen nach drei Tagen keine neurologischen Symptome mehr auf. Säuglinge mit moderater HIE (Grad 2) zeigen innerhalb der ersten Lebenswoche eine Besserungstendenz ihres neurologischen Status. Bei einer schweren HIE (Grad 3) fallen nach einer kurzfristigen Stabilisierung meist komatöse Zustände auf und es entwickeln sich prolongierte, schwer behandelbare Krampfanfälle. Eine Verbesserungstendenz lässt sich bei diesem Ausprägungsgrad im Regelfall nicht erkennen (McQuillen et al., 2003; Vannucci und Hagberg, 2004).

Zu den Hauptursachen einer dauerhaften und schweren Zellschädigung zählen die vermehrte Freisetzung von freien Radikalen und deren toxische Wirkung im Gehirn (Bauer et al., 2009). Im chemischen Sinne fasst man unter dem Begriff „Radikal“ diejenigen Atome und Moleküle zusammen, die über ein ungepaartes Elektron verfügen und daher meist überaus reaktionsfreudig sind. In biologischen Zusammenhängen versteht man unter sogenannten „freien“ Radikalen im Wesentlichen Oxidantien, welche Dank ihres ungepaarten Elektrons über hohe oxidative Kapazitäten verfügen. Entsprechende Molekülfragmente treten im Rahmen zellbiologischer Prozesse auf und haben hierbei zum Teil wichtige Funktionen, z. B. bei der Keimabwehr, zu deren Zweck von speziellen Lymphozyten eigens freie Radikale produziert werden. Andererseits gehen mit der übermäßigen Freisetzung freier Radikale schädigende Wirkungen auf der Zellebene einher, welche die DNA, die RNA, Proteine und Lipide betreffen können (Harman, 2003). Hierbei wird durch die freien Radikale eine Kettenreaktion ausgelöst, welche letztendlich zur Zerstörung der zellulären und subzellulären Integrität führt (Nelson et al., 1992).

Unter Normalbedingungen fallen in allen biologischen Systemen und Prozessen, bei denen Sauerstoff entsteht oder verbraucht wird, freie Radikale an. Körpereigene Abwehr- und Reparaturmechanismen, bei welchen sogenannte „Radikalfänger“ aktiv werden (vgl. Kapitel 1.4.1 der vorliegenden Arbeit), dienen diesbezüglich zum Schutz. Zu diesen zählen Antioxidantien, wie z. B. die Enzyme Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase sowie die Vitamine Retinol (Vitamin A), Ascorbinsäure (Vitamin C) und  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E).

Bei Früh- und Neugeborenen ist die Aktivität antioxidativer Enzyme eingeschränkt und der Gehalt an den Antioxidantien Vitamin C und E im Gewebe gering (Silverstein et al., 1997; Bona

et al., 1999) während die Spiegel an freiem  $\text{Fe}^{2+}$  und freiem Hämoglobin zu diesem Zeitpunkt noch erhöht sind. Ein Überschuss an Radikalen muss zwangsweise unkomponiert bleiben.

Klinische Untersuchungen lassen darauf schließen, dass Neugeborene, die unmittelbar vor der Geburt im CTG (Aufzeichnung der Herztöne in utero sowie der Wehenaktivität der Mutter) zunehmende Akzelerationen oder Dezelerationen der Herzfrequenz erkennen lassen, in den ersten fünf bis zehn Minuten nach der Geburt sehr niedrige APGAR-Werte und eine Azidose mit pH-Wert  $< 7$  im Nabelschnurblut zeigen oder eine kardio-pulmonale Reanimation im Kreißaal benötigen, zur Hochrisikogruppe bezüglich der Entwicklung einer HIE gehören (Vanucci, 2000).

### ***1.3. Mechanismen der hypoxischen Hirnschädigung***

Die hypoxisch-ischämische Hirnschädigung beginnt während des eigentlichen Insultes, dauert über die Erholungsphase nach der Reanimation (Reperusionsintervall) hinaus an und nimmt während der Reperfusion sogar noch zu (Bauer et al., 2009). Die Gewebeschädigung manifestiert sich in Form einer Nekrose einzelner Neurone oder eines Infarktes in einer größeren Gehirnregion und umfasst dann Neurone, Gliazellen und Blutgefäße.

Auf zellulärer Ebene setzen Hypoxie und Ischämie eine Kaskade biochemischer Prozesse in Gang, beginnend mit der Umstellung vom oxidativen auf den anaeroben Stoffwechsel, der Glykolyse. In deren Folge häufen sich NADH, FADH, Laktat und  $\text{H}^+$  an. Da die Glykolyse den Energiebedarf der Zelle nicht vollständig zu decken vermag, wird die benötigte Energie aus der Reservequelle ATP ergänzt, weshalb sich die ATP-Vorräte beständig verringern. Schließlich kommt es zu einer Funktionsstörung derjenigen Ionenpumpen, die von ATP abhängig sind. Dies wiederum führt zu einer intrazellulären Ansammlung von  $\text{Na}^+$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen und zur Ausbildung eines zytotoxischen Ödems (Vannucci et al., 1989; Vannucci, 1992; Vannucci et al., 1993; Vannucci et al., 2001). Hypoxie und Ischämie stimulieren zudem die Freisetzung der neurotoxischen exzitatorischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat, welche über die Aktivierung entsprechender Rezeptoren den Einstrom weiterer  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zellen fördern (Bauer et al., 2009). Darüber hinaus werden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auch aktiv über spannungsabhängige und ligandenoperierte Kanäle aus dem extrazellulären Raum in das Zellplasma transportiert sowie aus den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt. Die steigende Calciumkonzentration in der Zelle regt letztlich das Enzym Phospholipase  $\text{A}_2$  an, was für den Austritt von Arachidonsäure aus der Zellmembran sorgt und über Zellmediatoren eine Entzündungsreaktion hervorruft, weshalb sich am Entzündungsherd neutrophile Granulozyten (Neutrophile) anhäufen. Als Nebenprodukte der Abwehrreaktionen,

die in den Neutrophilen ablaufen, oder bei der Prostaglandinsynthese entstehen schließlich freie Radikale. Infolge des erhöhten Umsatzes von Phospholipiden aus der Zellmembran fallen zudem freie Fettsäuren an, welche wiederum durch die entstandenen freien Radikale peroxidiert werden. Somit führen Hypoxie und Ischämie dadurch, dass sie über den Ablauf der genannten Reaktionen ein vermehrtes Auftreten von freien Radikalen initiieren, letzten Endes zu einer Proteindegradation und zur Peroxidation der Zellmembranlipide. Die anschließende Reperfusion der hypoxisch-ischämischen Areale geht mit einem Sauerstoffüberangebot und infolge dessen mit einer erneuten Produktion von Sauerstoffradikalen einher. Diese unumgängliche zweite Phase der Akkumulation von Radikalen mündet ebenfalls in einer Proteindenaturierung (Kinuta et al., 1989; Neumar, 2000).

Der beschriebene zelluläre Energiemangel, die Azidose, der massive Calziumeinstrom in die Zellen, die Neurotoxizität von Glutamat und Aspartat, die Bildung freier Radikale und die Lipidperoxidation führen in ihrer Gesamtheit schließlich zu einem akuten Zusammenbruch struktureller Zellkomponenten in besonders empfindlichen Hirnregionen, wie z. B. den periventrikulären Zonen (germinale Matrix im Bereich der caudothalamischen Rinne), die – neben Oligodendrozytenvorläufern – vor allem neuronale Stammzellen enthalten (Kinuta et al., 1989; Levison et al., 2001).

Die geschilderten akuten Zellschädigungen werden außerdem durch ein mittelfristig entstehendes vasogenes Ödem sowie durch einen verzögerten apoptotischen Zelltod verstärkt (Bonfoco et al., 1995; Plateel et al., 1995; Du et al., 1996). Während der Hypoxie/Ischämie und der Reperfusion kommt es zu einer zweiphasigen Öffnung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und zur Ausbildung eines vasogenen Ödems (Bäthmann et al., 1991). Bei einer kurzen Ischämiedauer tritt eine erste Öffnung der BHS in der frühen Reperusionsphase im Zuge der postischämischen Hyperperfusion auf. Eine zweite Erhöhung der Schrankenpermeabilität erfolgt dann viele Stunden später. Ursache des vasogenen Ödems ist die Extravasation von Proteinen (z. B. Albumin), Plasmafiltrat und anderen Molekülen in das extrazellulär-extravasale Kompartiment (Farooqui et al., 1994). Die Steigerung des mit dem Ödem einhergehenden intrakraniellen Drucks kann zu einer vaskulären Kompression sowie zur Herniation von Hirngewebe führen. Diese Vorgänge gelten als häufigste Ursache der Frühmortalität nach dem Eintreten einer zerebralen Ischämie (Bäthmann et al., 1991).

Obwohl das Wissen um die Mechanismen der Hirnschädigung infolge einer perinatalen Asphyxie stetig wächst, gibt es bis heute noch keine effektiven Behandlungsmethoden. Deshalb ist es von größter Bedeutung, dass Ärzte und Wissenschaftler konsequent nach neuen Ansätzen suchen, um erfolgreiche Interventionsmaßnahmen zu entwickeln.

## **1.4. Experimentell untersuchte Pharmaka**

Bisher wurden verschiedene Wirkstoffe hauptsächlich im Tierversuch zur Behandlung der HIE eingesetzt. Chemisch betrachtet sind diese den Substanzklassen der Radikalfänger (Antioxidantien), der Antagonisten exzitatorischer Aminosäuren, der Calciumkanal-Antagonisten, und der Corticosteriode zuzuordnen.

Aufgrund der unübersichtlichen Datenlage zu Beginn dieser Arbeit entschieden wir uns für Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) als zu untersuchendes Pharmakon. Im Folgenden soll daher auf dieses ausführlich eingegangen werden. Die weiteren Substanzklassen werden zusammengefasst dargestellt.

### **1.4.1. Vitamin E und weitere Radikalfänger**

Radikale, die unter physiologischen Bedingungen anfallen, können – wie bereits in Kapitel 1.2. erwähnt – durch verschiedene Enzyme (Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase) und nichtenzymatische Substanzen (Cholesterin, Vitamin A, Vitamin C, Vitamin E) rasch und ohne Schäden beseitigt werden. Diese Wirkstoffe bezeichnet man als „Radikalfänger“.

Während und nach einer Hypoxie treten freie Radikale in sehr großer Anzahl auf. Zum einen werden sie in den Mitochondrien produziert und in das Zytoplasma abgegeben, wenn das Enzym Cytochrom-P-Oxidase nicht vollständig sauerstoffgesättigt ist, zum anderen entstehen Radikale – insbesondere während des Reperfusionintervalls – als Nebenprodukte der Prostaglandinsynthese aus Arachidonsäure. Früh- und Neugeborene leiden sowohl an einer gewissen Bindungsstörung freien Eisens (niedrige Transferrinspiegel) als auch an einem relativen Defizit an Antioxidantien. Sie sind deshalb für Schädigungen durch freie Radikale besonders prädestiniert (Günther et al., 1993; Vannucci, 2000). Hier können Pharmaka ansetzen, die eine Radikalbildung verhindern oder entstandene freie Radikale eliminieren.

#### **1.4.1.1. Vitamin E**

Vitamin E wird als eines der wichtigsten Antioxidantien des Organismus eingestuft. Es schützt Zellen und Gewebe vor oxidativer Belastung. Biochemisch betrachtet fasst man unter dem Überbegriff Vitamin E acht verschiedene Tocopherole und Tocotrienole zusammen, die allesamt fettlöslich sind (Herrera und Barbas, 2001; Packer et al., 2001).

$\alpha$ -Tocopherol weist unter allen Vitamin-E-Derivaten die höchste Bioverfügbarkeit auf und wird am besten absorbiert (Brigelius-Flohé und Traber, 1999). Es ist in der Lage, die Lipidperoxidation der Zellmembranen zu verhindern (Herrera et Barbas, 2001; Traber und



Atkinson, 2008). Nach einer erfolgten Oxidation wird  $\alpha$ -Tocopherol durch andere Antioxidantien letztlich wieder in seine aktive Ausgangsform reduziert, z. B. durch Ascorbat, Retinol und Ubiquinol (Wang und Quinn, 1999).

Vitamin-E-Mangel führt beim Menschen zu neuromuskulären Störungen und wird unter anderem durch Mukoviszidose, chronische Lebererkrankungen, Abetalipoproteinämie, Kurzdarmsyndrom oder weitere Malabsorptionssyndrome bedingt (Sokol, 1990; Tanyel und Mancano, 1997; Hoffmann und Grau, 2004; Rino et al., 2007).

Eine Behandlung mit Tocopherol erweist sich jedoch aus folgenden Gründen als problematisch: zum einen ist das Vitamin äußerst lipophil und lässt sich ohne ein ungiftiges Detergens nicht gesichert applizieren, zum anderen kann ein Vitamin-E-Mangel bei Früh- und Neugeborenen mithilfe einer Blutuntersuchung nur schwer eingeschätzt werden, da diese in jedem Fall einen deutlich niedrigeren Tocopherolwert als Erwachsene aufweisen und der Tocopherolgehalt stets auch vom Serumlipidspiegel abhängig ist (Böhles, 1995; Hoffmann und Grau, 2004).

Wegen seiner antioxidativen Fähigkeiten untersuchte man die prophylaktische Applikation von Vitamin E sowohl in Tierstudien als auch an beatmeten oder gefährdeten Neugeborenen. Die Ergebnisse erwiesen sich jedoch als widersprüchlich, zumal eine Reihe dieser Studien allenfalls einen marginalen oder gar keinen Einfluss einer Vitamin-E-Gabe auf die Entwicklung einer Retinopathia praematurorum oder einer bronchopulmonalen Dysplasie erkennen ließen (Phelps et al., 1987; Watts et al., 1991; Berger et al., 1998). Hingegen berichteten andere Untersuchungen nicht nur über eine Verminderung der Anzahl geschädigter Kinder, sondern ebenso über die Verringerung des Schweregrades von periventrikulären Blutungen, nachdem den Säuglingen eine Vitamin-E-Supplementation verabreicht worden war (Sinha, 1993; Johnson et al., 1995; Böhles, 1997).

Sowohl nach intravenöser als auch nach enteraler Gabe von  $\alpha$ -Tocopherol reicherte sich das Vitamin bei adulten Ratten in einer erhöhten Konzentration im Hirngewebe an (Vatassery et al., 1984; Martin et al., 1999). Darüber hinaus führte die Verabreichung zu einer Reduktion der Lipidperoxidation sowie von Nekrosen und der Apoptose (Villalobos et al., 1994; Inan et al., 1995). In einer Tierstudie verbesserte sich das neurologische Outcome der Jungen nach einer Asphyxie, wenn dem trächtigen Muttertier  $\alpha$ -Tocopherol appliziert worden war (Iwasa et al., 1990). Bisher wurde lediglich eine Studie bekannt, in welcher sich eine erhöhte postischämische neuronale Zellschädigung nach der Gabe von  $\alpha$ -Tocopherol zeigte (Dyatlov et al., 1998). Möglicherweise muss dieses Ergebnis dem verwendeten Detergens oder auch der eingesetzten Konzentration zugeschrieben werden.

Die Ergebnisse, die bei Untersuchungen an adulten Tieren gewonnen werden konnten, lassen sich nur bedingt auf die Verhältnisse beim Neugeborenen übertragen, zumal die antioxidative Kapazität im unreifen Gehirn von der im adulten Gehirn abweicht (Glozman et Yavin, 1997).

Da  $\alpha$ -Tocopherol nicht die maternale Plazentaschranke zu überwinden vermag (Bortolotti et al., 1990; Sinha, 1993; Njeru et al., 1994; Böhles, 1997), erweist sich eine prophylaktische Gabe im Rahmen der Schwangerschaftsvorsorge als schwierig.

#### ***1.4.1.2. Weitere Radikalfänger***

Ein weiterer therapeutischer Versuch wurde mit der Gabe von Superoxiddismutase und Katalase gemacht. Beide Enzyme sind dafür bekannt, dass sie äußerst effektiv hochreaktive Radikale zu nichtreaktiven Substanzen abbauen. Sowohl im Tierversuch als auch im in-vitro-Modell reduzierten die genannten Enzyme die hypoxisch-ischämische Schädigung und trugen zugleich zu einer Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke bei (Nelson et al., 1992; Schleien et al., 1994; Lagrange et al., 1999). Durch Ankopplung an verschiedene Trägersubstanzen wurde versucht die Penetrationsfähigkeit zu erhöhen. Man vermutet, dass die so modifizierten Enzyme in der Lage sein müssten, der Formation von Hydroxyl-Radikalen vorzubeugen. (Schleien et al., 1994, Wengenack et al., 1997).

Der Versuch, die Prostaglandinsynthese zu vermindern, ist ein weiterer Ansatz, um die Entstehung freier Radikale einzudämmen. Als Wirkstoff wurde diesbezüglich der Cyclooxygenase- und Phospholipaseinhibitor Indometazin eingesetzt. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine Verringerung der Schäden, die aus der Reperfusionphase resultieren, zumindest in Studien an adulten Tieren und am neugeborenen Schwein (Vannucci, 2000).

#### **1.4.2. Antagonisten exzitatorischer Aminosäuren**

Wie oben bereits erwähnt und durch eine Reihe von Tierversuchen bestätigt, spielt Glutamat bei der Entstehung einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung im immaturen Hirngewebe offenbar eine wesentliche Rolle. Dabei scheint es von Bedeutung zu sein, ob die hypoxisch-ischämische Schädigung bereits in utero stattgefunden hat oder erst zu einem späteren Zeitpunkt. Im ersteren Fall verringert sich die Bindungsaffinität der Rezeptoren an welchen NMDA-Antagonisten angreifen könnten (Vannucci, 2000, Vannucci et al., 1999, Sheardown et al., 1993, Cai und Rhodes, 2001).

### **1.4.2.1. Phenobarbital**

Phenobarbital verstärkt die Wirkung des inhibitorischen Transmitters GABA und hemmt exzitatorische Glutamatrezeptoren. Eine neuroprotektive Wirkung zeigt sich anhand einer Verminderung des Sauerstoffverbrauchs und einer langsameren Abnahme der zellulären Energiereserven während der Hypoxie/Ischämie (Vannucci und Perlman, 1997).

Hall und seine Mitarbeiter konnten in einer prospektiven und randomisierten klinischen Studie aus dem Jahr 1998 an schwer asphyktischen Neugeborenen nachweisen, dass diese infolge einer hochdosierten Phenobarbitaltherapie (40 mg/kg intravenös, verabreicht über die Dauer von einer Stunde) ein verbessertes Outcome zeigen. Elf von 15 derart behandelten Kindern entwickelten sich gemäß einer Nachuntersuchung nach drei Lebensjahren in neurologischer Hinsicht normal, wohingegen in der Kontrollgruppe lediglich drei von 16 Kindern diesen Status erreichten ( $p = 0.003$ ) (Hall et al., 1998). Allerdings hat Phenobarbital eine proapoptische Wirkung (Forcelli et al, 2011, Bittigau et al, 2002), weshalb der Einsatz von Phenobarbital zur Therapie der HIE kontrovers diskutiert wird.

### **1.4.3. Calciumkanalblocker**

Calcium wird als sogenannter intrazellulärer „second messenger“ betrachtet. Das divalente Kation ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ist als Kofaktor in eine Reihe von biochemischen Prozessen eingebunden. Dazu zählt ebenfalls die Regulation des Stoffwechselgleichgewichts der Zelle. Eine Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration kann die Funktion einzelner Nervenzellen beeinträchtigen und die neuronalen Netzwerke schädigen (Heinemann et al., 1977, Vannucci, 2000).

Eine postischämische Behandlung von jungen Ratten mit Flunarizin ergab keine signifikante neuroprotektive Wirkung, wenn es erst nach einem hypoxisch-ischämischen Ereignis zur Anwendung kommt (Gunn und Gluckman, 1991).

Die Gabe von Magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ), welches den Calziumeinstrom in die Zelle blockiert, der durch die Rezeptoraktivierung ausgelöst wird, erwies sich im unreifen Hirngewebe ebenfalls als neuroprotektiv (Marret et al., 1995). Eine retrospektive klinische Studie von Nelson und Kollegen aus dem Jahre 1995 ergab, dass Frühgeborene, deren Müttern wegen Präeklampsie oder vorzeitigen Wehen Magnesiumsulfat verabreicht worden war, seltener eine Zerebralparese entwickelten als die Frühgeborenen unbehandelter Mütter (Nelson und Grether, 1995). Basierend auf diesen Erkenntnissen lag für Nelson und Grether die Vermutung nahe, dass Magnesiumsulfat die hypoxische Hirnschädigung vermindern könne. Diesbezügliche kontrollierte und

randomisierte Studien blieben jedoch ein Desiderat, weshalb die protektive Wirkung von Glutamatrezeptorantagonisten auf eine HIE bis heute nicht schlüssig nachgewiesen ist.

#### **1.4.4. Glukokortikoide**

Glukokortikoide lassen sich erfolgreich zur Reduktion des Hirnödems beim Menschen einsetzen. Sie modulieren die Produktionsrate bestimmter Proteine über die Bindung an einen intrazellulären Rezeptor. Glukokortikoide hemmen auf diese Weise langfristig die Calciumresorption und steigern zugleich die Calziumausscheidung. Sie bewirken zudem die Verminderung der Prostaglandinsynthese sowie anderer Entzündungsmediatoren. Ausgeprägte Therapieeffekte treten jedoch erst nach mehreren Stunden ein.

Fragen zum optimalen Effekt verschiedener Glukokortikoide (Dexamethason, Methylprednisolon) sowie über deren spezielle Wirkungsmechanismen sind weiterhin ungeklärt. Im Hinblick auf die Gabe von Dexamethason musste man stattdessen sogar eine gesteigerte Rate bezüglich der Entwicklung einer zerebralen Parese konstatieren (Yeh et al., 1998; O'Shea et al., 1999; Shinwell et al., 1999; Shinwell und Eventov-Friedman, 2009; Wilson-Costello et al., 2009).

Daneyemez und seine Kollegen berichteten schließlich über ihre Untersuchungen, dass infolge der gemeinsamen Gabe von Methylprednisolon und Vitamin E ebenfalls ein protektiver Effekt hinsichtlich des perinatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnschadens bei Ratten auftrate (Daneyemez et al., 1999). Die Aussage, ob sich die Neuroprotektion letztendlich mehr auf eine der beiden Substanzen zurückführen lässt oder ob es sich um einen synergistischen Effekt handelt, blieben die Forscher jedoch schuldig.

### ***1.5. Experimentell untersuchte nichtpharmakologische Interventionen***

Zusätzlich zu den potentiell neuen pharmakologischen Strategien, welche das perinatale Hirn vor einer hypoxisch-ischämischen Schädigung schützen sollen, gibt es nichtpharmakologische Ansätze, wie z. B. die hypoxische Präkonditionierung oder die systemische bzw. lokale Hypothermie, die Erfolge in Aussicht stellen.

Neben den bereits genannten Strategien sind in der Vergangenheit ebenfalls die Einflüsse der Hyperglykämie sowie einer leichten Hyperkapnie auf den Verlauf der HIE untersucht worden. Zumal die Ergebnisse der Arbeiten über die Anwendung einer Hyperglykämie widersprüchlich ausfielen (Vannucci und Mujsce, 1992; Vannucci et al., 1996; Chang et al., 1998; Park et al.,

2001) und die Darstellung der Befunde zur milden Hyperkapnie ausgesprochen unübersichtlich sind (Vannucci et al., 1995; Vannucci et al., 2001; Klinger et al., 2005), wird auf eine gesonderte Darstellung dieser Methoden in der vorliegenden Studie verzichtet.

Im Folgenden soll vor allem die Hypothermie beschrieben werden, da eine hypoxische Präkonditionierung über das bestehende Maß hinaus kaum möglich ist.

### **1.5.1 Hypothermie**

Seit langem ist bekannt, dass sich bei Kindern während eines Herz-Kreislaufstillstandes – z. B. im Rahmen der chirurgischen Korrektur kongenitaler Herzvitien – durch Absenkung der Körpertemperatur auf 16 – 24 °C über eine Dauer bis zu 90 Minuten eine hypoxisch-ischämische Hirnschädigung verhindern lässt (Thoresen und Wyatt, 1997). Die Wirkung der Hypothermie erfolgt dabei über eine Verminderung des zerebralen Energiebedarfs, wobei die ATP-Reserven der Zelle während der Hypoxie/Ischämie nahezu auf dem normalen Niveau verbleiben und darum der Zelle weiterhin zur Verfügung stehen.

Hauptsächlich in Tierstudien, aber auch unter klinischen Bedingungen wurden Hyperthermien unterschiedlicher Ausprägung im Umfeld eines ischämischen Insults untersucht (Shum-Tim et al., 1998; Mishima et al., 2004; Yager et al., 2004; Laptook et al., 2008). Dabei stellte sich heraus, dass diese nicht nur die hypoxisch-ischämische Hirnschädigung verstärken, sondern auch Verhaltensstörungen und zeitlich verzögerte Lernschwierigkeiten hervorrufen können. Im Gegensatz dazu vermindert eine sogenannte moderate Hypothermie, bei welcher das Gehirn systemisch oder lokal um 3 – 6 °C abgekühlt wird, das Ausmaß der ischämischen Gewebsschädigung im adulten und perinatalen Tier sowie auch beim Menschen (Yager et al., 1993; Mishima et al., 2004; Mcilvoy, 2005; Laptook et al., 2008). Yager et al. zeigten an unreifen Ratten, dass eine Absenkung der Körpertemperatur um 3 °C während der Ischämie zu einem teilweisen Benefit, eine Temperatursenkung um 6 °C zu einem vollständigen Schutz vor hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung führte (Yager et al., 1993). Zudem gelang es unserer Arbeitsgruppe nachzuweisen, dass sich evozierte Feldpotentiale (FP) in Neocortex-Schnitten neonataler Ratten durch eine postischämische Hypothermie von 4 °C besser erholten (Ko et al., 2001).

Eine moderate Hypothermie bei Neugeborenen ist nicht von relevanten Nebenwirkungen begleitet und verbessert das Outcome einer hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie (Gunn et al., 1998 und 2008; Simbruner et al., 1999; Battin et al., 2001).

Neuere Studien an adulten Tieren, in denen die Hypothermie mit verschiedenen pharmakologischen Substanzen kombiniert wurde, zeigten darüber hinaus einen verbesserten funktionalen und morphologischen Ausgang (Schmid-Elsässer et al., 1999).

### **1.6. Studienziele**

In der Vergangenheit behandelte man die HIE insbesondere dadurch, dass man versuchte, das Hirnödem zu reduzieren. Dabei kamen hauptsächlich Diuretika (Mannitol, Furosemid), Glukokortikoide und Barbiturate zur Anwendung. Da diese Substanzen jedoch nur eine geringe Wirksamkeit zeigen, zugleich jedoch erhebliche Risiken bergen, werden sie heute klinisch nicht mehr eingesetzt.

Derzeit kennt man kein Medikament, das die Folgen einer HIE klinisch nachweisbar zu verhindern vermag. Zudem wurde bisher kein einheitlicher Behandlungsstandard für Kinder mit HIE eingeführt. Darüber hinaus stellt die Tatsache ein zusätzliches Dilemma dar, dass Kinder, die einen schweren Gehirnschaden aufweisen, am wenigsten von einer Pharmakotherapie der HIE profitieren, Kinder, deren Hirnschäden jedoch als leicht oder moderat eingestuft werden können, sprechen hingegen auf spezielle Medikamente deutlich besser an. Gerade dieser Umstand unterstreicht die Bedeutung kontrollierter randomisierter, experimenteller Studien in diesem Forschungsbereich.

Wie oben dargelegt, konnte die neuroprotektive Potenz einiger Pharmaka (Antioxidantien, wie  $\alpha$ -Tocopherol, antiinflammatorische Substanzen, wie Methylprednisolon, Inhibitoren des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat) und physikalischer Methoden (milde Hypothermie) in tierexperimentellen Untersuchungen gezeigt werden. Die multiplen Mechanismen dieser Wirkstoffe und Verfahren könnten sich möglicherweise auch dann schädigungsmindernd auswirken, wenn man sie nach einer Ischämie anwendet.

In diesem Zusammenhang erhebt sich die Frage, ob das Ausmaß der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung durch die Kombination pharmakologischer Interventionen mit physikalischen Verfahren stärker reduziert werden könnte, als dies der Fall ist, wenn beide Möglichkeiten einzeln eingesetzt werden. Dies muss zunächst experimentell eruiert werden. So lässt sich beispielsweise an vitalen Hirnschnitten unter standardisierten Bedingungen sowohl eine Ischämie als Sauerstoff-Glucose-Deprivation simulieren und die resultierenden Schädigungen funktionell und morphologisch verifizieren als auch die Wirksamkeit verschiedener Interventionen testen.

In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob die Kombination einer milden Hypothermie mit der Applikation von  $\alpha$ -Tocopherol nach Sauerstoff-Glucose-Deprivation an Neocortex-Schnitten von 6 – 8 Tage alten Wistar-Ratten zu einer schnelleren und deutlicheren Erholung der neuronalen Aktivität und einer geringeren Zellschädigung führt, als deren jeweilige Einzelanwendung. Das Alter 6 - 8 Tage wurde gewählt weil die Reife des Rattengewebes etwa der des neugeborenen Menschen entspricht.

Wir gehen davon aus, dass die Erholung der neuronalen Aktivität anhand der Auslösbarkeit evozierter Feldpotentiale und des Erreichens präischämischer Amplituden dieser Potentiale evaluiert werden kann. Das Ausmaß der Zellschädigung lässt sich mithilfe einer Fluoreszenzmessung sowie durch die Zählung fluoreszierender Zellen nach deren Färbung mit Ethidiumbromid oder Propidiumjodid bestimmen.

Es werden im Einzelnen folgende Fragen aufgeworfen:

Wie lang darf die Ischämiephase idealerweise dauern, um vergleichbare Versuche anstellen zu können?

Welches toxische Detergens sollte im Zusammenhang mit  $\alpha$ -Tocopherol ausgewählt werden und wie hoch muss seine Konzentration sein?

Zu welchem Zeitpunkt sollte die Intervention mit  $\alpha$ -Tocopherol erfolgen?

Welchen protektiven Effekt zeigt  $\alpha$ -Tocopherol?

Welchen protektiven Effekt zeigt die Hypothermie?

Führt die Kombination von  $\alpha$ -Tocopherol mit der Hypothermie zu einer zusätzlichen Verbesserung des Outcomes?

Wie wirkt sich Erythropoietin (Epo) aus?

Sind die Messmethoden geeignet, um die gestellten Fragen beantworten zu können?

Wurden sowohl das Modell als auch die Behandlungsmethoden (Dauer der Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD), Ethanolkonzentration, Zeitpunkt der  $\alpha$ -Tocopherolapplikation) optimal ausgewählt?

## **2. Material und Methoden**

Alle verwendeten Chemikalien wiesen einen analytischen Grad auf und wurden von gängigen kommerziellen Herstellern bezogen. Spezielle Materialien und Geräte sind nachfolgend in Klammern aufgeführt.

## 2.1. *Verwendete Lösungen und Gase*

Artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (ACSF), Inhalt in mM:

Standard-Lösung (ACSF<sub>G+</sub>): 129 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.6 mM CaCl<sub>2</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM Glucose

Glucosefreie Lösung (ACSF<sub>G-</sub>): 134 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.6 mM CaCl<sub>2</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>

Inkubationslösungen:

Vitamin E:  $\alpha$ -Tocopherol gelöst in Ethanol (25 g/100 ml); (RRR  $\pm$   $\alpha$ -Tocopherol, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany)

ACSF-Vitamin-E-Emulsion: 32 mg  $\alpha$ -Tocopherol/Liter ACSF, 0.1 ‰ Ethanol

Erythropoeitin: Fertigspritze mit 20.000 IE/l ACSF

Färbelösungen:

Ethidiumbromid und Propidiumjodid (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA): in einer 5 mM Lösung

Begasung:

Carbogen: Sauerstoff 95 %/Kohlendioxid 5 %

Stickstoffgemisch (N<sub>2</sub>): Stickstoff 95 %/Kohlendioxid 5 %

## 2.2. *Einteilung der Versuchsgruppen*

Zunächst wurden fünf Versuchsreihen gebildet und einer simulierten Ischämie unterzogen, dabei handelte es sich experimentell um eine Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD). Die einzelnen Gruppen wurden gemäß der jeweiligen Intervention erfasst: 0 (OGD) = OGD, 1 (Hypothermie) = OGD + Hypo, 2 (Hypothermie +  $\alpha$ -Tocopherol) = OGD + Toco/Hypo, 3 ( $\alpha$ -Tocopherol) = OGD + Toco, 4 = OGD + Toco vor OGD und 5 (Erythropoietin) = OGD + Epo. Jede Intervention, mit Ausnahme der Nummer 4, wurde sofort nach Beendigung der Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) eingeleitet. Um bei den Zellfärbungen Referenzwerte für den Anteil des durch die Präparation bedingten Zelltodes und für die  $\alpha$ -Tocopherol-Inkubation am gesamten Zellschaden zu erhalten, wurden weitere vier Versuchsgruppen gebildet: 6 = Leer (ohne OGD), 7 = Leer + Toco, 8 = Leer + Alk (Alkohol) und 9 = Leer + Epo.

Hirnschnitte mit der Bezeichnung „Leer“ wurden für die Versuchszeit von 150 min in einer Interfacekammer aufbewahrt, mit ACSF perfundiert und mit Carbogen begast. Diese Schnitte wurden weder elektrophysiologisch gemessen noch einer Oxygen-Glucose-Deprivation unterworfen. Die „Leer + Toco“-Gruppe wurde nach der Präparation über die gesamte



Versuchszeit zusätzlich mit  $\alpha$ -Tocopherol, die „Leer + Alk“-Gruppe mit Alkohol (analog der Menge, in welcher das  $\alpha$ -Tocopherol gelöst wurde) perfundiert. Die „Leer + Epo“-Gruppe wurde analog zur „Leer + Toco“-Gruppe behandelt. Nach Beendigung des Experiments wurden die Hirnschnitte zusammen mit der entsprechenden Interventionsgruppe gefärbt und die resultierende Fluoreszenz gemessen.

### **2.3. *Präparation der Hirnschnitte***

Die Präparation der Hirnschnitte erfolgte nach der Methode von Luhmann und Kral (Luhmann und Kral, 1997) an 6–8 Tage alten Wistar-Ratten. Die Tiere wurden zuvor unter Standardbedingungen gehalten, d. h. Wasser und Futter zur freien Verfügung. Nach der Dekapitation wurden Kopffell und Nackenmuskulatur mit einem Skalpell entfernt, der Schädelknochen mit einer stumpfen Pinzette abgehoben und zur Seite weggezogen. Das herausgelöste Hirn wurde zur Erhöhung der O<sub>2</sub>-Defizit-Toleranz und zur Verhinderung enzymatischer Abbauvorgänge für etwa 1.5 Minuten in 4 °C bis 6 °C kalte und begaste ACSF überführt. Anschließend wurde das Hirn mit der Basalseite auf eine gekühlte Petrischale aufgebracht und das Frontal-, das Okzipitalhirn sowie die Temporalseiten mit einer Trimmklinge abgesetzt, so dass letztlich ein Block mit einer Kantenlänge von etwa 6–7 mm verblieb. Dieser wurde auf die Okzipitalseite gelegt, von der Petrischale mit Filterpapierstreifen aufgenommen und mit der Cortexkante zur Klinge weisend in die Schnittkammer eingeklebt. Die Kammer enthielt bereits tiefgekühlte ACSF, diese wurde nach dem Einbringen des Hirnblocks mit 4 – 6 °C kalter ACSF aufgefüllt. Mit dem Vibratom (Campden Instruments, Loughborough, GB) wurden schließlich 500  $\mu$ m dicke koronare „slices“ geschnitten, diese im Interhemisphärenspalt getrennt und in 35 °C warme, mit oxigenerter ACSF perfundierte und mit Carbogen begaste Interfacekammern überführt. Die Perfusionsrate betrug 1.7 ml/min.

Mit den elektrophysiologischen Messungen wurde frühestens eine Stunde später begonnen, um den Hirnschnitten nach dem Procedere der Präparation eine Erholung zu ermöglichen.

### **2.4. *Elektrophysiologische Methoden, ionensensitive Elektroden und Induktion der Sauerstoff-Glucose-Deprivation***

Für die extrazellulären Messungen (Abb. 1) wurden calziomsensitive- / Referenzmikroelektroden (nach Heinemann et al., 1977) hergestellt und getestet. Bei den ionensensitiven Elektroden handelt es sich um doppelläufige Pipetten, die mit Hilfe eines Elektrodenziehgerätes ausgezogen wurden. Der Spitzendurchmesser betrug ca. 2–3  $\mu$ m. Eine Seite der Elektrode wurde mit NaCl (154 mM) gefüllt und diente als Referenzelektrode für die ionensensitive Seite sowie

zur Aufzeichnung der Feldpotentiale. Die andere Seite wurde in ihrem Spitzenbereich silanisiert, und mit dem Ionenaustauscher FLUKA 21048 (3-4 mm) vorgefüllt. Die restliche Füllung erfolgte mit 100 mM  $\text{CaCl}_2$ . Die Testung ergab für eine 10-fache Veränderung der extrazellulären Calciumkonzentration eine Potentialänderung von 26-30 mV. Die gemessene Potentialänderung wurde mit Hilfe der Nernst-Gleichung in die entsprechende Änderung der extrazellulären Calciumkonzentration umgerechnet.

Die Verbindung von den Elektrodenkanälen zum Verstärker wurde über chlorierte Silberdrähte hergestellt. Der Verstärker erlaubte eine 10 fache Vorverstärkung und war mit einer Kapazitätsneutralisation ausgestattet.

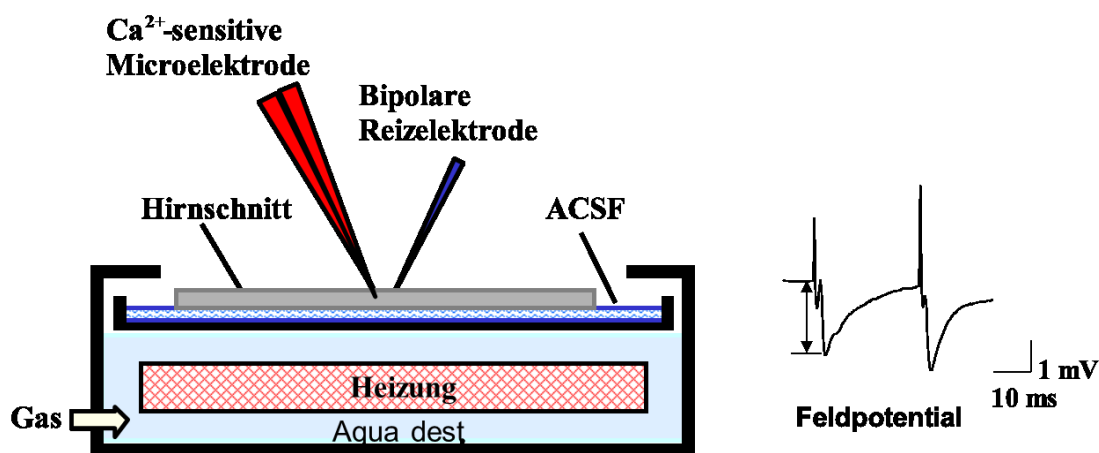


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Messkammer mit Hirnschnitt, Calciumsensitiver Referenzmikroelektrode und Reizelektrode

Die Feldpotentiale wurden durch orthodrome (synaptische) Doppelpulsreizung derjenigen Nervenfasern evoziert, die in den tiefen Cortexarealen verlaufen. Die Reizung erfolgte über bipolare Platindrahtelektroden, die bei allen Hirnschnitten im gleichen Abstand von den Indifferenzelektroden, die in der Kammer fixiert waren, positioniert wurden

Die Doppelpulse ( $n = 5$ ) wurden vor, während und nach der OGD-Phase im Abstand von 20 Sekunden ausgelöst und sowohl im Referenz- als auch im Calcium-Kanal der Mikroelektrode erfasst. Die Änderung der extrazellulären Calciumkonzentration erzeugt an der ionensensitiven Elektrode eine zusätzliche Potentialdifferenz, die im nachgeschalteten Differenzverstärker durch Subtraktion des Eingangs von der Referenz-Seite isoliert wird. Die Grundlinie von 0 mV im Calcium-Kanal entspricht der Calciumkonzentration der Perfusionslösung, die um den Anteil reduziert ist, der an  $\text{HCO}_3^-$  gebunden ist.

Die Bedingungen der Sauerstoff-Glucose-Deprivation wurden durch einen gleichzeitigen Wechsel der Begasung der Interfacekammer und des Wechsels des Perfusionsmediums geschaffen. Infolge dieser Oxygen und Glucose Deprivation (ODG) trat ein Erscheinungsbild auf, welches der „spreading depression“ ähnelte, die sogenannte „anoxische Depolarisation“ (AD). Um einen Überblick über die Widerstandsfähigkeit des postnatalen Gewebes zu erhalten, arbeiteten wir zunächst mit OGD-Phasen von unterschiedlich langer Dauer. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Protokolle etabliert und die funktionale neuronale Integrität vor, während und nach der anoxischen Depolarisation an Hand der Erholung des Gewebes im Zeitraum von zweieinhalb Stunden beurteilt:

OGD-Dauer bis sechs Minuten nach Eintritt der AD. Anschließendes Rückstellen der Begasung und der Perfusion.

OGD-Dauer: 16 Minuten. Anschließendes Rückstellen der Begasung und der Perfusion.

OGD-Dauer: 20 Minuten. Anschließendes Rückstellen der Begasung und der Perfusion.

OGD-Dauer: 30 Minuten. Anschließendes Rückstellen der Begasung und der Perfusion.

Auf diese Weise konnte als optimales Protokoll, mit welchem sich eine moderate Schädigung hervorrufen lässt, eine OGD-Dauer von 20 Minuten ermittelt werden.

## **2.5. Interventionen zur Neuroprotektion**

### **2.5.1. Hypothermie**

Unmittelbar nach Ende Sauerstoff-Glucose-Deprivation (ODG) wurden die Hirnschnitte vorsichtig um 0.15 °C/min von 35 °C auf 31 °C heruntergekühlt, was einer sogenannten milden Hypothermie gleichkommt. Die Schnitte wurden 60 Minuten lang in diesem Zustand belassen. Anschließend erwärmten wir die Hirnschnitte wieder um 0.15 °C/Minute auf 35 °C. Während des Versuchs wurde die Temperatur direkt neben dem Hirnschnitt kontrolliert.

### **2.5.2. $\alpha$ -Tocopherol**

Analog der Arbeit von Acosta (Acosta et al, 1987). wurde eine Dosierung von 32 mg  $\alpha$ -Tocopherol je Liter ACSF zur Perfusion der Schnitte in der Interfacekammer verwendet Mit verschiedenen Ansätzen wurde nach folgendem Schema gearbeitet:

Einwaschen des  $\alpha$ -Tocopherols:

1. direkt nach dem Transfer der Schnitte in die Interfacekammer (Kontrolle)
2. direkt im Anschluss an die OGD-Phase

Der Hauptteil der Versuchsreihe wurde mit letzterer Applikation ausgeführt:

II. Erstellung einer  $\alpha$ -Tocopherol-Ethanol-Lösungsreihe zur Bestimmung des bestmöglichen Kompromisses zwischen der Güte der Emulsion und der Menge des Alkohols:

1. 32 mg  $\alpha$ -Tocopherol gelöst in 0.064 ‰ Ethanol
2. 32 mg  $\alpha$ -Tocopherol gelöst in 0.1 ‰ Ethanol
3. 32 mg  $\alpha$ -Tocopherol gelöst in 0.5 ‰ Ethanol

Als bestmöglicher Kompromiss zwischen der Löslichkeit und einer Alkoholtoxizität erwies sich die Lösung von 32 mg  $\alpha$ -Tocopherol in 0.1 ‰ Ethanol (Ethanol-ACSF), mit welcher im weiteren Verlauf der Studie gearbeitet wurde.

### **2.5.3. Kombination von Hypothermie und $\alpha$ -Tocopherol**

Die Hypothermie wurde wie oben beschrieben durchgeführt und  $\alpha$ -Tocopherol analog des Versuchsansatzes II.2 aus Kapitel 2.5.2. der vorliegenden Arbeit direkt nach Beendigung der OGD-Phase eingewaschen.

### **2.5.4. Erythropoietin**

Hierfür wurden die Hirnschnitte analog des oben genannten  $\alpha$ -Tocopherolschemas (Kapitel 2.5.2.) unmittelbar nach Beendigung der OGD mit 20.000 IE Erythropoietin pro Liter ACSF perfundiert.

## **2.6. Imageverfahren**

Die Färbungen wurden mit Ethidiumbromid (EB) und Propidiumjodid (PI) durchgeführt. Beide Farbstoffe binden irreversibel an DNA- und RNA-Moleküle, wobei ein fluoreszierender Komplex gebildet wird. Darüber hinaus weisen beide Farbstoffe eine Molekülgröße auf, die es ihnen unmöglich macht, durch eine intakte Zellmembran hindurch zu dringen. Aus diesem Grund können mit EB und PI nur solche Zellen gefärbt werden, deren Membran defekt ist (Brana et al., 2002; Monette et al., 1998).

Zur Bestimmung des Zellschadens infolge der Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) wurden die Hirnschnitte direkt nach der Beendigung des elektrophysiologischen Experimentes mit EB [Vorversuche] oder PI gefärbt und die resultierende Fluoreszenz gemessen. Dazu wurden die Hirnschnitte nach der Beendigung des Versuchs unter Interface-Bedingungen 60 Minuten lang

mit 5 mM EB bzw. PI perfundiert, die in ACSF gelöst wurden. Nach einer Auswaschperiode von 90 Minuten Dauer wurden die Hirnschnitte in einen Imaging-Setup transferiert. Dieser bestand aus einem Monochromator, einer „charge-coupled device (CCD)“-Kamera und der Windows NT basierten Bearbeitungssoftware (Till Photonics, München, Deutschland). Die Bilder wurden schließlich an einem invertierten Olympus IX 50 Mikroskop über einen 500 nm dichroitischen Spiegel und einen 550 nm Longpass Emissionsfilter (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland) geführt und mit einem 20 x-Wasserimmersions Objektiv (Olympus) von einer CCD-Kamera aufgenommen (Pomper et al., 2001).

Zusätzlich wurden jeweils drei Hirnschnitte aus den Interventionsgruppen unter einem konfokalen Mikroskop betrachtet (Heinemann et al., 2002). Dabei ließ sich die aufgetretene Färbung im gesamten Hirnschnitt gut mit den Ergebnissen der Einzelzellzählungen korrelieren.

## **2.7. Datenerfassung und Analyse**

Die schnellen Feldpotentiale (FP), welche durch eine Reizung ausgelöst wurden, die Calciumkonzentrationsänderungen und der Potentialabfall während der anoxischen Depolarisation (AD) wurden auf einem Oszilloskop dargestellt und mithilfe eines Thermoschreibers aufgezeichnet.

Darüber hinaus wurden die FP mithilfe der beiden Computerprogramme SIGAVG und SPIKE2 erfasst und auf der Festplatte eines PC gespeichert, offline gemittelt ( $n = 5$ ) und ausgemessen (Abtastrate 5 kHz, Filter 1 kHz, siehe Abb.2).

Zur Bestimmung der Amplitude wurde die Spitzenamplitude der negativen FP-Transienten in Bezug auf den ersten Reiz erfasst. Ausgemessen wurde der negative Peak der Amplitude des ersten Stimulus, ausgehend vom Basispotential.

Die Sauerstoff-Glucose-Deprivation wurde von Beginn der Gasumstellung an auf Thermoschreibern (Astromed) und SPIKE2 aufgezeichnet. Vermessen wurden die AD-Latenz, die maximale AD-Amplitude, die maximale Verminderung der Calciumkonzentration sowie die Dauer der AD, beginnend beim Zeitpunkt des Potentialabfalls bis zum Wiedererreichen der Grundlinie.

Um die funktionale Integrität bzw. den funktionellen Zustand des Hirnschnittes zu bestimmen, wurde eine Reiz-Antwortkurve ermittelt. Das heißt, ausgehend von jener Reizstärke, bei welcher die maximale Reizantwort erfolgte (100 % Reiz), wurden diejenigen Reizstärken gesucht, mit denen eine Antwort von 20, 40, 60 und 80 % der maximalen FP-Amplitude ausgelöst werden konnte (Abb. 2). Zur Erzeugung eines überschwelligeren Reizes, wurde die 100 %ige Reizstärke

um 20 % erhöht. Um einen Referenzwert für die Hypothermieprotokolle zu schaffen, wurde für die Erholung in der hypothermen Phase zuerst eine solchen Reiz-Antwortkurve bei 31 °C angefertigt und nach langsamer Erwärmung (0.15 °C/min über einen Zeitraum von 30 Minuten) ein weiteres Profil bei der Arbeitstemperatur von 35 °C erstellt (Abb. 2)

Zur Bestimmung des Erholungsgrades der synaptischen Funktion in Abhängigkeit von der Dauer der OGD wurden die FP-Amplituden unter normoxischen Bedingungen vor und 150 Minuten nach der OGD sowie die 80 %ige FP-Amplitude direkt vor und nach Beendigung der OGD-Phase alle 10 Minuten aufgenommen. Der Grad der Erholung wurde als der Anteil der erreichten FP-Amplitude (bei 80%iger Reizstärke) an der Amplitude vor OGD ausgedrückt, welche direkt vor Beginn der OGD aufgezeichnet worden war, und als Prozentwert angegeben. Als vollständige funktionelle Erholung nach OGD wurde das Erreichen von 95 % der 80%-Amplitude zum Zeitpunkt  $t = 120$  Minuten nach OGD definiert.

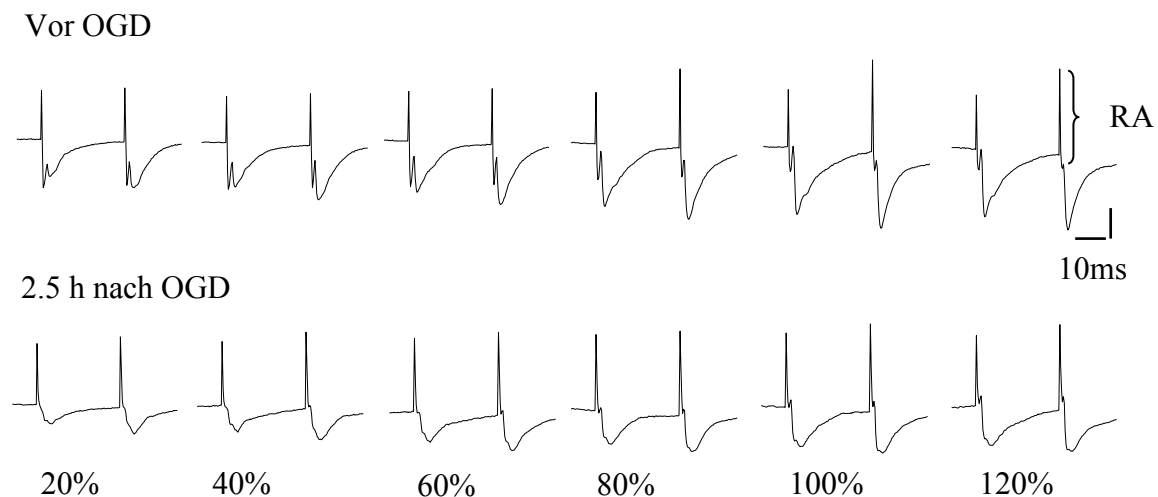


Abbildung 2: Darstellung der gemittelten Reizantworten bei ansteigenden Reizintensitäten vor und nach OGD (maximale Reizantwort: 100% Reiz, über- und unterschwellige Reize: entsprechend des prozentualen Anteiles; RA: Reizartefakt)

Die Erfassung der Fluoreszenzdaten wurde mit einer von Dr. Herbert Siegmund entwickelten Software in unserem Haus ermöglicht. Der Bereich aller Nervenzellschichten des Cortex stellt diesbezüglich unsere „region of interest“ (ROI) dar.

Wie in Abb. 3 illustriert, gibt es in jedem Hirnschnitt vier solcher ROI-Areale, die wiederum jeweils aus 512 x 480 Pixeln bestehen.

Um die Bilder auswerten zu können, wurden die Fluoreszenzsignale gemessen und in einer 256 Bit-Grau-Skala ausgedrückt. Die mittlere Fluoreszenz für jeden Hirnschnitt wurde als Summe der vier ROI-Fluoreszenzwerte errechnet, dividiert durch die Anzahl der Pixel innerhalb der ROI (PiR):

$$\bar{F} = \frac{1}{\text{PiR}} \sum_{i=1}^4 (F_i)$$

Um die interindividuelle und tagesabhängige Variabilität auszugleichen, wurde eine prozentuale „Death Ratio“ (DR) wie folgt berechnet:

$$\text{DR (\%)} = \frac{(\bar{F} - F_{\text{life point}})}{(F_{\text{dead point}} - F_{\text{life point}})}$$

Dabei steht „life point“ für das ungefärbte, „lebendige“ Gewebe (Pixel mit minimaler Fluoreszenz) und „dead point“ für das gefärbte, geschädigte Gewebe (Pixel mit maximaler Fluoreszenz).

„life point“ und „dead point“ wurden in jedem einzelnen Bild innerhalb der ROI ermittelt, d. h. viermal in jedem Hirnschnitt.

Alle erhaltenen Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SF) wiedergegeben. Um die Differenzen der einzelnen Gruppen untereinander statistisch beurteilen zu können, wurden nicht-parametrische Tests für unabhängige Stichproben (Mann-Whitney-U) angewandt. Für Differenzen innerhalb der Gruppen wurde ein nicht-parametrischer Test für abhängige Stichproben (Wilcoxon) gewählt. Zum Vergleich der quantitativen Verteilung (erholt zu nicht-erholt) wurde der exakte Chi<sup>2</sup>-Homogenitäts-Test nach Fischer verwendet. Als statistisch signifikanter Unterschied wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  festgelegt. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS software package Version 11.0 und 15,0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

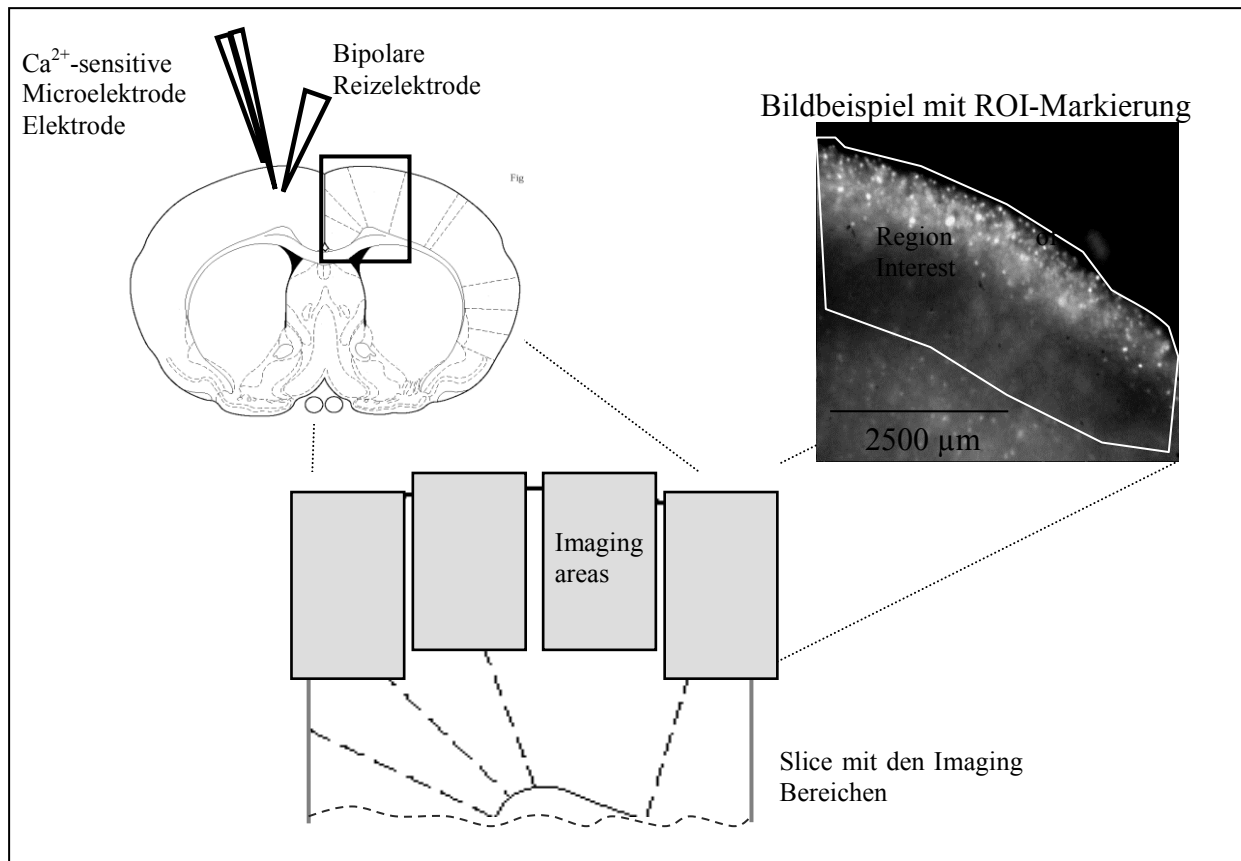


Abbildung 3: Schematische Darstellung der ROI Areale

## 2.8. Versuchsaufbau

Nach der Dekapitation wurde der Neocortex in Scheiben von 500  $\mu\text{m}$  Dicke geschnitten und sofort in eine Interface-Messkammer überführt, die bei einer Temperatur von 35  $^{\circ}\text{C}$  mit einer ACSF-Lösung perfundiert wurde (Perfusionsrate 1.7 ml/min). Um die Hirnschnitte ausreichend mit Sauerstoff versorgen und den pH-Wert der ACSF auf 7.4 einstellen zu können, wurde die ACSF-Lösung mit Carbogen (95 %  $\text{O}_2$ /5 %  $\text{CO}_2$ ) begast, ebenso wie die Gasphase der Messkammer.

Nach 60 Minuten Inkubationszeit erstellten wir das Reiz-Antwort-Profil vor OGD. Danach begann die Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) mithilfe einer Umstellung der Begasung (Carbogen  $\rightarrow$  95  $\text{N}_2$  5 %  $\text{CO}_2$ ) und der Perfusion ( $\text{ACSF}_{\text{G}^+} \rightarrow \text{ACSF}_{\text{G}^-}$ ). Diese Bedingungen blieben – je nach Protokoll – nach dem Eintreten der sogenannten AD über einen Zeitraum von 16, 20, 30 oder 60 Minuten konstant. In allen Hauptversuchen mit unterschiedlicher Intervention wurde eine OGD-Dauer von 20 Minuten eingehalten.



Im Anschluss wurden Begasung und Perfusion wieder auf die Ausgangswerte zurückgestellt und die Erholung der Hirnschnitte 150 Minuten lang beobachtet. Zu diesem Zweck wurden alle 10 Minuten jeweils fünf FP-Antworten ausgelöst (80 % der maximalen Reizantwort).

In jeder Versuchsgruppe gab es zudem sogenannte „Leerlaufreihen“. Das heißt, dass die jeweiligen Versuchsprotokolle (Interventionen, elektrophysiologische Messungen und Fluoreszenzfärbung) ohne OGD über die gesamte Zeit durchgeführt wurden.

Für die  $\alpha$ -Tocopherol-Protokolle wurden die Hirnschnitte a) nach dem Transfer in die Interface-Kammer oder b) direkt nach der Beendigung der OGD-Phase 150 Minuten lang mit einer  $\alpha$ -tocopherolhaltigen ACSF perfundiert.

Im Rahmen des Hypothermie-Protokolls wurden die Hirnschnitte zunächst bei einer Temperatur von 31 °C inkubiert und nach Erstellen des ersten Reiz-Antwort-Profiles vorsichtig über einen Zeitraum von 30 Minuten auf 35 °C erwärmt. Nach weiteren 30 Minuten Ruhezeit und einem zweiten Reiz-Antwort-Profil begann die OGD-Phase. Nach Beendigung der OGD wurde die Temperatur wieder vorsichtig über 30 Minuten auf 31 °C abgesenkt und anschließend über 60 Minuten konstant gehalten. Danach wurden die Hirnschnitte wieder auf 35 °C erwärmt und weiter analysiert.

Bei der Kombination aus Hypothermie und  $\alpha$ -Tocopherol wurden die Hirnschnitte, wie oben beschrieben, gekühlt und direkt im Anschluss an die OGD-Phase über einen Zeitraum von insgesamt 150 Minuten mit  $\alpha$ -tocopherolhaltiger ACSF perfundiert.

In einem weiteren Protokoll wurde Erythropoietin nach Ende der OGD zugesetzt, den oben genannten Vorgaben entsprechend.

Nach Ablauf der Beobachtungszeit wurde ein letztes Reiz-Antwort-Profil aufgenommen, um den Erholungsgrad der Hirnschnitte jeweils nach Intervention und Dauer der Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) bestimmen zu können. Um den Zelltod während der OGD-Phase und/oder Reoxygenierung feststellen zu können, wurden direkt im Anschluss 5 mM EB oder 5 mM PI für einen Zeitraum von insgesamt 60 Minuten eingewaschen. Nach einer 90minütigen Auswaschphase wurden die Hirnschnitte an den „Imaging Setup“ überführt, an welchem sie im untergetauchten Zustand weiter mit O<sub>2</sub>-gesättigter ACSF perfundiert wurden.

Gemessen wurde dabei die resultierende Fluoreszenz bei 550 nm, was den eigentlichen experimentellen Abschnitt zugleich beendete. Die FP-Amplituden wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren vermessen, desgleichen der maximale Calciumabfall, der Zeitraum der gesamten OGD, die Dauer der AD in und nach der OGD sowie die Fluoreszenzdaten. Sämtliche Werte wurden zusammengetragen und die Mittelwerte sowie Standardfehler statistisch berechnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Vorversuche

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Vorversuche kurz in Textform präsentiert werden, die entsprechenden tabellarischen Zusammenstellungen finden sich im Anhang, Kapitel 6.

##### 3.1.1. Beobachtungen nach Beginn der Sauerstoff-Glucose-Deprivation

Etwa 13 Minuten nach Beginn der OGD-Phase imponierte ein negativer „baselineshift“, die sogenannte anoxische Depolarisation (AD), mit einer maximalen Amplitude von etwa 7 mV. Zeitgleich kam es zu einem deutlichen und schnellen Abfall des extrazellulären Calciumpotentials mit einem langsamen Wiederanstieg, was in Abbildung 4 graphisch wiedergegeben ist. Abb. 4

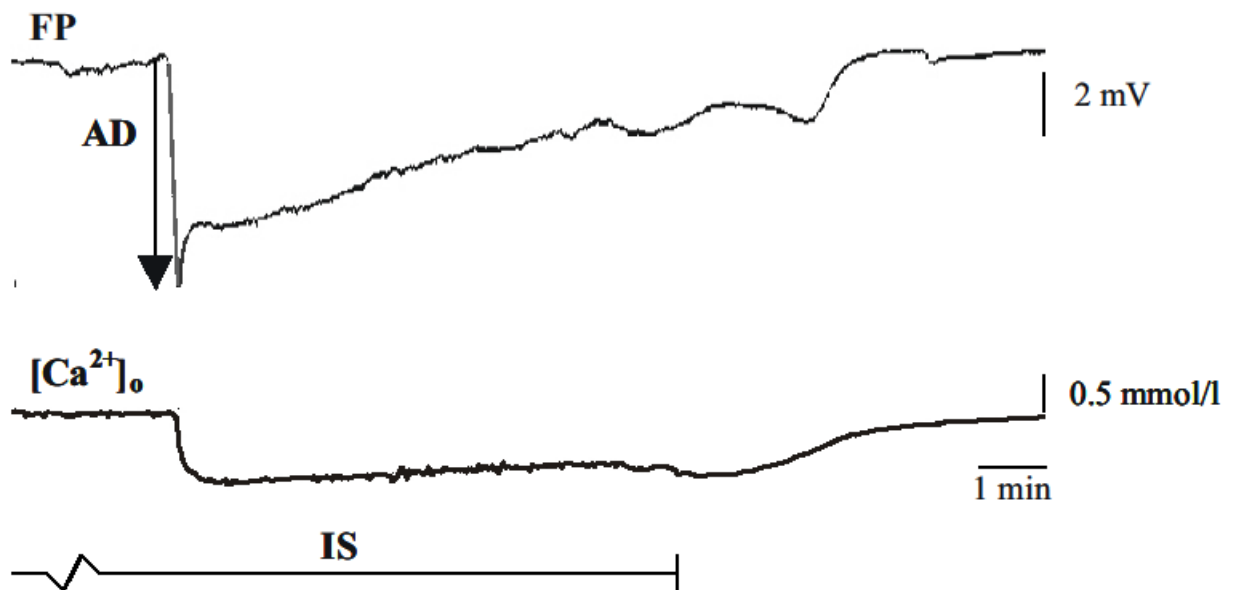


Abbildung 4: Anoxische Depolarisation (AD) etwa 13 Minuten nach Beginn der Ischämiephase, mit maximaler Amplitude von 7 mV. Zeitgleicher Abfall der extrazellulären Calciumkonzentration mit anschließendem langsamen Wiederanstieg.

Bei etwa der Hälfte der Schnitte zeigte sich im Anschluss an die AD eine leichte Postivierung des DC-Potentials von höchstens 2 mV. Während der AD und des Calciumabfalls ließ sich nach etwa zehn Sekunden ein erstes Minimum beobachten. Nach einer langsamen Erholung auf ca. 1/5 des prä-OGD Potentials am Ende der OGD-Phase zeichnete sich etwa eine Minute nach der Umstellung auf die Normalbedingungen ein zweiter Potentialabfall ab, bevor das Ausgangspotential wieder erreicht wurde.

### **3.1.2. Moderate Sauerstoff-Glucose-Deprivation**

Anfänglich sah das Protokoll einen festgelegten Zeitraum nach Eintritt der AD vor, nach welchem sowohl die Begasung als auch die Perfusion zurückgestellt werden sollten (Ko et al. 2001). Aus praktischen Erwägungen wurde für die folgenden Protokolle ein jeweils gleich bleibender OGD-Zeitraum etabliert, der unabhängig von der AD-Latenz ist. Um eine moderate von einer schwereren Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) abzugrenzen, wurden Versuchsreihen mit unterschiedlicher Dauer einer Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD) (16, 20 und 30 Minuten) durchgeführt. Die tabellarische Darstellung der Ergebnisse erfolgt im Tabellenanhang 6, Tabelle 1.

Mit zunehmender Länge der OGD verlängerte sich die Dauer der anoxischen Depolarisation, die AD-Amplitude nahm nur geringfügig zu (Tabelle 1a). Die Feldpotential (FP) - Antwort auf den 80 %igen Reiz nach der jeweiligen OGD-Phase wird mit zunehmender Dauer der OGD kleiner. Hierbei ist anzumerken, dass die FP vor OGD und am Ende der Erholungsphase nur in der Gruppe 20 min OGD signifikant differierten (Tabelle 1b).

In den Gruppen 16, 20 und 30 Minuten werden zum Zeitpunkt  $t = 120$  jeweils maximal 80, 71 und 27 % der Ausgangsamplitude erreicht. Die Werte in der Gruppe 30 min OGD sind signifikant kleiner als in den Gruppen 16 und 20 min OGD. Die Anteile der erhaltenen Hirnschnitte sind in der Gruppe 16 min OGD nur insignifikant größer als bei 20 und 30 min OGD. Da wir die Wirkung der Interventionen bei einer moderaten Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) austesten wollten, entschlossen wir uns, in den Hauptversuchen mit einer OGD-Dauer von 20 min zu arbeiten.

### **3.1.3. Auswahl des geeigneten $\alpha$ -Tocopherolpräparates**

Vitamin E ist eine lipophile, visköse Substanz, welche sich in Wasser kaum löst. Um zu gewährleisten, dass sich das Vitamin in der ACSF<sub>G+</sub> Lösung gleichmäßig verteilt und der Schnitt gleichmäßig mit  $\alpha$ -Tocopherol perfundiert wird, muss man das Vitamin mit einem Detergens versetzen. Im Hinblick auf eine mögliche  $\alpha$ -Tocopherol-Applikation beim Menschen haben wir uns für Ethanol als Detergens entschieden, dessen zellschädigende Wirkung im Vorfeld zunächst

getestet werden musste. Um einen Eindruck a) von der Löslichkeit des  $\alpha$ -Tocopherol-Ethanol-Gemisches in ACSF<sub>G+</sub> und b) vom toxischen Ausmaß der Wirkung gewinnen zu können wurden Hirnschnitte nach der OGD mit ACSF<sub>G+</sub>- $\alpha$ -Tocopherol-Ethanol-Gemischen perfundiert, die 0.064 ‰, 0.1 ‰ oder 0.5 ‰ Ethanol enthielten. In allen Gemischen betrug die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration 32 mg / l ACSF<sub>G+</sub>.

Die Unterschiede der nach Ende der OGD erreichten FP-Amplituden (gemessen in Prozent der Ausgangsamplitude vor OGD) lassen sich statistisch nicht sichern, was auf die geringen Stichprobenumfänge in den Gruppen zurückzuführen sein dürfte (Tabellenanhang 6:Tabellen 2a und 2b). Die Tabelle 2a veranschaulicht allenfalls, dass die erreichten Prozentwerte der FP-Amplitude vor OGD zu den Zeitpunkten  $t = 60$  min,  $t = 120$  min und  $t = 150$  min nach Ende der OGD bei einem Alkoholgehalt von 0.1 ‰ mehr als 90 % betragen und damit insignifikant größer sind als bei einem Alkoholgehalt von 0.064 ‰.

Gemessen am erreichten Erholungsgrad und der Potentialentwicklung in der Erholungsphase schien die Lösung von  $\alpha$ -Tocopherol in 0.1 ‰ Ethanol die wirksamste Emulsion zu sein. Gestützt auf diese Ergebnisse wurden die weiteren Experimente der  $\alpha$ -Tocopherol-Protokolle mit einer 0.1 ‰-Ethanollösung durchgeführt.

## **3.2. Kontrollversuche**

### **3.2.1. Zelltodfärbung und Einzelzellzählung am konfokalen Mikroskop**

Zur Bestimmung des Zellschadens infolge der Sauerstoff-Glucose-Deprivation wurden die Hirnschnitte direkt nach der Beendigung des Versuchs mit Ethidiumbromid (EB) [Kontrollversuche] oder Propidiumjodid (PI) gefärbt und die resultierende Fluoreszenz gemessen. Um zu entscheiden ob die erstellte „Death Ratio“ tatsächlich mit dem Anteil gefärbter Zellen korrelierbar ist wurden zusätzlich jeweils drei Hirnschnitte aus den Interventionsgruppen unter einem konfokalen Mikroskop betrachtet und die gefärbten Zellen ausgezählt. Hierbei lässt sich die Zelltodrate gut mit den Ergebnissen der Einzelzellzählungen korrelieren (Tabellenanhang 6:Tabelle 3).

### **3.2.2. Leerversuche**

Um eine Verfälschung der Messergebnisse und der Erholungsphase nach Ende der Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) durch die Einflüsse von  $\alpha$ -Tocopherol, Alkohol und Erythropoietin ausschließen zu können, wurden die Wirkungen von  $\alpha$ -Tocopherol, Alkohol und Erythropoietin nach der Präparation ohne OGD während der gesamten Dauer des Experiments untersucht. Dazu wurden vier Versuchsreihen aufgestellt: 1) Leer: Hierbei wurden die Hirnschnitte über den

Versuchszeitraum mit ACSF<sub>G+</sub> perfundiert. 2)  $\alpha$ -Tocopherol (Leer-Toco): Für diesen Versuch wurde  $\alpha$ -Tocopherol in 0.1 ‰ Ethanol gelöst und die Schnitte wurden direkt nach der Präparation mit  $\alpha$ -Tocopherol-ACSF<sub>G+</sub> perfundiert. 3) Alkohol-ACSF<sub>G+</sub> (Leer-Alk, 0.1 ‰ Ethanol). 4) Erythropoietin-ACSF<sub>G+</sub> (Leer-Epo).

In allen Gruppen wurde jeweils ein Reiz-Antwort-Profil zu Versuchsbeginn und am Versuchsende erstellt. Zudem wurden nach der Zeit, die sonst vor und während der OGD vergeht (150 min Beobachtungszeit) alle zehn Minuten die FP-Antworten gemessen – analog zur „Erholungsphase“ bei OGD. Um Referenzwerte für den Anteil des Zellschadens durch die Präparation und die Inkubationsperiode am gesamten Zellschaden zu erhalten, wurden entsprechende Schnitte aller drei Gruppen nach Versuchsende mit Propidiumjodid (PI) gefärbt.

Die Tabelle 4a im Anhang (6) präsentiert die FP-Antwort auf den 80 %igen Reiz zu Beginn und am Ende des Versuchs. Die Beobachtungszeit von 150 Minuten entspricht der Erholungsphase nach OGD. Die Tabellen 4b und 4c fassen die Parameter der Beobachtungssphase zusammen.

Auffällig war, dass die prozentualen Anteile der FP-Amplituden zu den Zeitpunkten 60, 120, und 150 min nach der „nicht stattgehabten OGD“ in der Gruppe Leer-Toco im Trend etwas höher lagen als in der Gruppe Leer-Alk, welches sich als protektiver Effekt der Tocopherol-Applikation diskutieren lässt. Tabelle 4d zeigt, dass kein signifikanter Einfluss von  $\alpha$ -Tocopherol, Alkohol und Erythropoietin auf die Zelltodrate nachweisbar ist.

### 3.2.3. Applikationszeitpunkt

Um herauszufinden, ob eine Intervention mit  $\alpha$ -Tocopherol bereits vor Beginn der Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) stärker wirksam ist, als eine Intervention nach Ende der OGD, wurden die Schnitte einer Gruppe direkt nach der Präparation, die einer anderen erst nach erfolgter OGD mit der  $\alpha$ -Tocopherol (32 mg  $\alpha$ -Tocopherol in 11 0.1-‰-Ethanol-ACSF) perfundiert.

Die AD-Profile (Tabellenanhang 6: Tabelle 5a) zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden  $\alpha$ -Tocopherolgruppen. Bei der Tocopherol-Applikation vor OGD imponierte eine größere AD-Amplitude. Bei prä- und post-OGD Applikation waren nur geringe Veränderungen der Reizantworten am Versuchsende sichtbar, während in der Gruppe ohne Intervention das Feldpotential am Versuchsende signifikant kleiner war als vor der OGD (Tabelle 5b).

In der Erholungsphase (Tabelle 5c) ergaben sich für die Anteile der erreichten FP-Amplituden vor OGD keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden  $\alpha$ -Tocopherolgruppen, während die bei Applikation nach Ende der OGD zu den Zeitpunkten  $t = 120$  min und  $t = 150$  min erzielten Werte im Vergleich zur OGD ohne Intervention signifikant größer waren.

Auch der Anteil erholter Hirnschnitte differierte nur unwesentlich zwischen prä- und post-OGD Gabe von  $\alpha$ -Tocopherol, war aber bei Applikation nach Ende der OGD signifikant höher als bei der OGD ohne Intervention (Tabelle 5d).

Ähnliche Befunde zeigt Tabelle 5e für die „Zelltodrate“.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die  $\alpha$ -Tocopherol-Applikation nach Ende der OGD eine signifikant protektive Wirkung hat (siehe auch nächstes Kapitel).

### **3.3. Hauptversuche**

#### **3.3.1. Hypothermie**

Bezüglich der Hypothermieprotokolle mussten jeweils zwei Reiz-Antwort-Profile vor der Sauerstoff-Glucose-Deprivation als Referenzwerte festgelegt werden, und zwar jeweils eines für die Hypothermie - Phase nach Beendigung der OGD (31 °C) und eines für die Normothermie-Phase (35 °C) nach dem Wiedererwärmen der Schnitte. Beim Vergleich der beiden Referenzwerte-Gruppen stellte sich eine temperaturabhängige, jedoch nicht signifikante Verstärkung der FP-Antworten bei 35 °C heraus (nicht dargestellt).

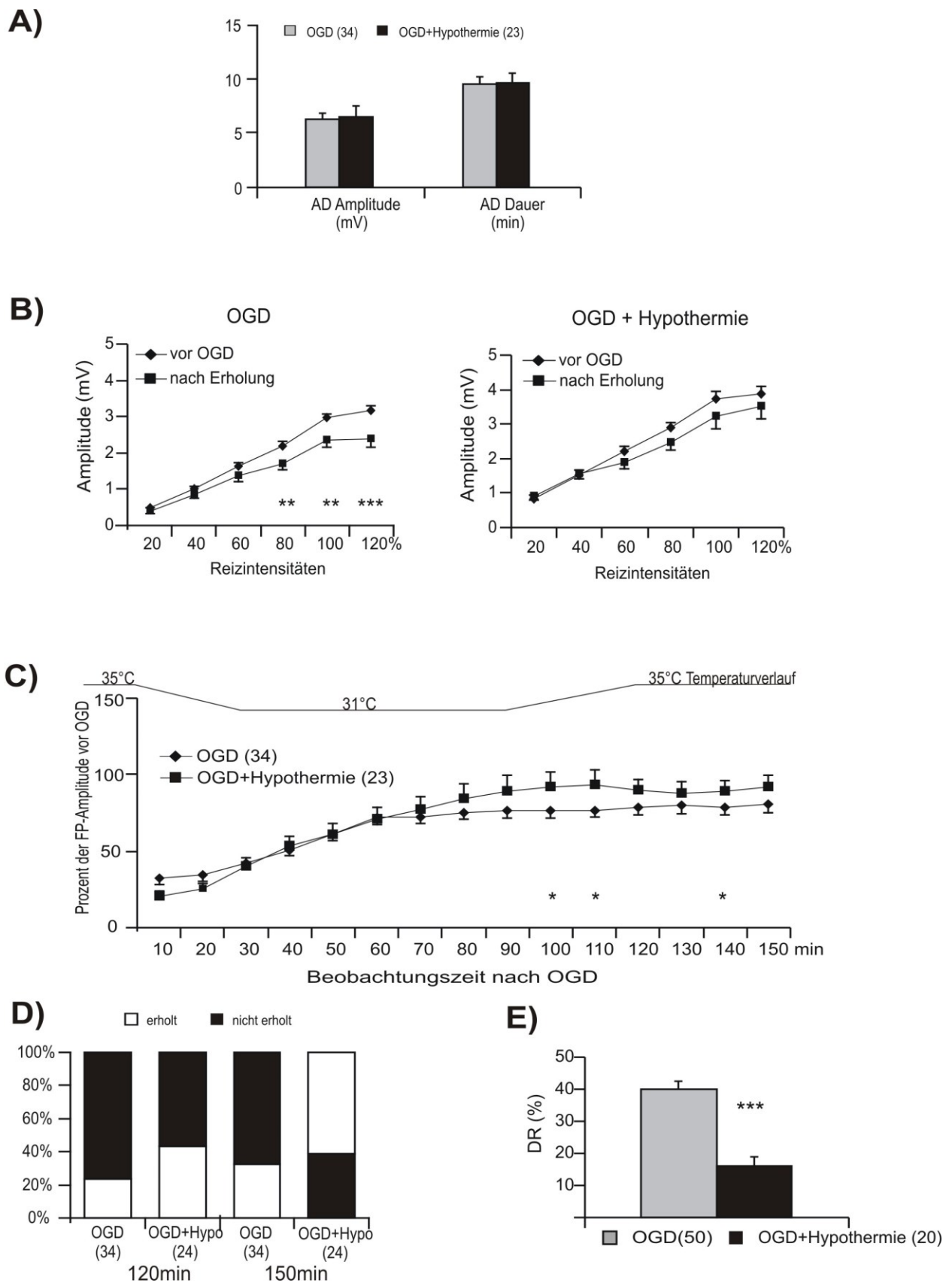
Die Schnitte wurden nach der Präparation bei 31 °C inkubiert. Nach dem Erstellen der ersten Reiz-Antwortkurve wurden sie, wie bereits oben beschrieben, auf 35 °C erwärmt und ein zweites Reiz-Antwort-Profil aufgenommen. Danach begann die Phase der Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD). An diese schloss sich unmittelbar die Hypothermiephase an, die insgesamt zwei Stunden dauerte (jeweils 30 Minuten abkühlen, eine Stunde bei 31 °C und 30 Minuten wiedererwärmen).

Abb. 5 bietet eine Übersicht über die Ergebnisse der Hypothermiegruppe sowie der Kontrollgruppe (OGD ohne Intervention).

In Abb. 5B fällt auf, dass bei ‘OGD ohne Intervention‘ die Feldpotential-Antworten auf die höheren Reizintensitäten (80-120 %) am Versuchsende signifikant kleiner sind als am Versuchsanfang, während die entsprechenden Unterschiede bei ‘OGD+Hypothermie‘ das Signifikanzniveau nicht erreichen

Außerdem zeigte sich (Abb. 5C) zu den Zeitpunkten 100 min und 110 min ‘OGD+Hypothermie‘, gemessen an der Feldpotential-Amplitude vor OGD, eine signifikant größere relative Antwort als bei ‘OGD ohne Intervention‘. Abb. 5D veranschaulicht, dass der Anteil erholter Hirnschnitte zum Zeitpunkt 120 min nach ‘OGD mit Hypothermie‘ nur insignifikant größer ist als bei ‘OGD ohne Intervention‘. Sehr viel deutlicher ist der Unterschied in den Zelltodraten.

Abbildung 5: **Hypothermie nach Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) und OGD ohne Intervention.**



A AD-Profil (Amplitude und Dauer) B Mittlere FP-Amplitude bei Reizen von 20% bis 120 % der maximalen Amplitude vor OGD und am Ende des Experiments bei identischer Reizintensität, links OGD, rechts OGD+Hypothermie. C Erreichte Prozentwerte der FP-Amplitude vor Beginn der OGD von t = 10 Minuten bis t = 150 Minuten nach Ende der OGD. D Anteil der Hirnschnitte, die zu den angegebenen Zeitpunkten 95 % der Ausgangsamplitude vor OGD erreicht haben (erholt). E Anteil ethidiumbromid-permeabler Zellen (DR in %). In A, B, C, F repräsentieren die Markierungen oder Säulen mit Fehlerbalken den Mittelwert  $\pm$  SF, in D den prozentualen Anteil der erhaltenen bzw. nicht erhaltenen Hirnschnitte in der Teilstichprobe. Die in Klammern gesetzten Zahlen bezeichnen die Anzahl der Hirnschnitte in den jeweils untersuchten Teilstichproben. Als Signifikanz-Markierungen werden für  $p \leq 0.05$  \*,  $p \leq 0.01$  \*\*,  $p \leq 0.001$  \*\*\* verwendet.

Insgesamt ist elektrophysiologisch eine mäßige positive Wirkung der Hypothermie während der Erholungsphase zu konstatieren. Im Unterschied dazu tritt die protektive Wirkung der Hypothermie in der Zelltodrate stärker zutage.

### 3.3.2. $\alpha$ -Tocopherol

Die Schnitte wurden nach der Beendigung der OGD mit  $\alpha$ -Tocopherol in einer Konzentration von 32 mg je Liter ACSF<sub>G+</sub> und einem Alkoholgehalt von 0.1 ‰ perfundiert und mit Carbogen begast.

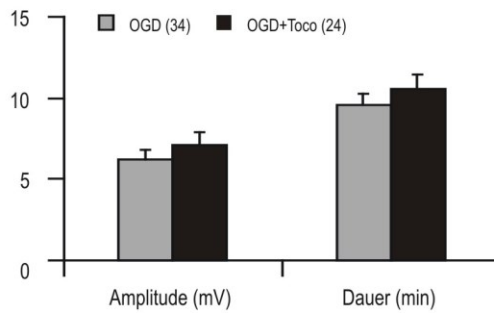
Die Beobachtungszeit betrug wie in allen anderen Protokollen 150 Minuten. Wie in Abb.6 veranschaulicht, zeigte sich in den Reiz-Antwort-Profilen vor und nach der OGD (Abb.6B) kein Unterschied in der Interventions-Gruppe. Im Verlauf der Beobachtungszeit wurden in der Interventionsgruppe schon ab 70 min nach OGD signifikant größere Anteile der prä-OGD Feldpotential-Antwort erzielt als in der Kontrollgruppe (Abb. 6C). Die Anteile der erhaltenen Hirnschnitte waren zu den Zeitpunkten 120 min und 150 min bei  $\alpha$ -Tocopherolgabe nach Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) deutlich größer als in der OGD-Gruppe ohne Intervention (Abb. 6D).

Der Anteil Propidiumjodid-permeabler Zellen war in der Interventionsgruppe signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe (Abb. 6E). In den Experimenten zeigt sich eine eindeutige positive Wirkung der Tocopherol-Intervention, sowohl funktionell als auch „histologisch“.

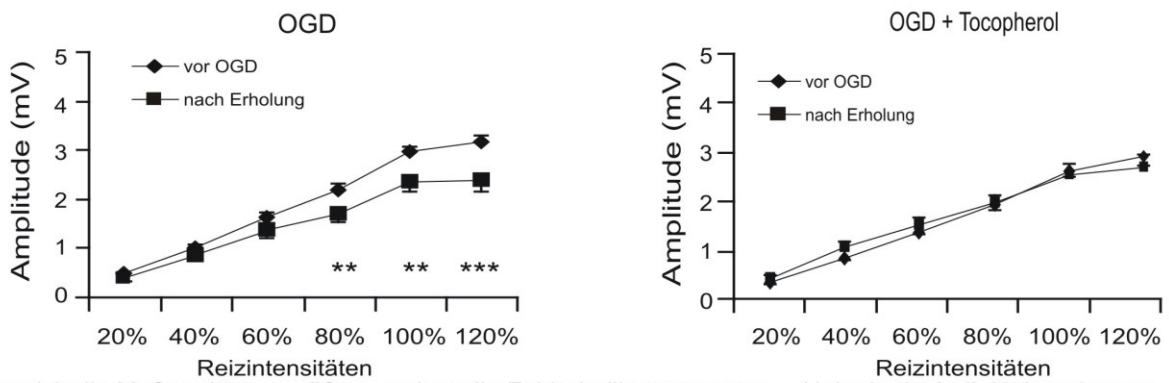


Abbildung 6: Vergleich der Ergebnisse bei  $\alpha$ -Tocopherolgabe nach der Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) und bei OGD ohne Intervention

A)

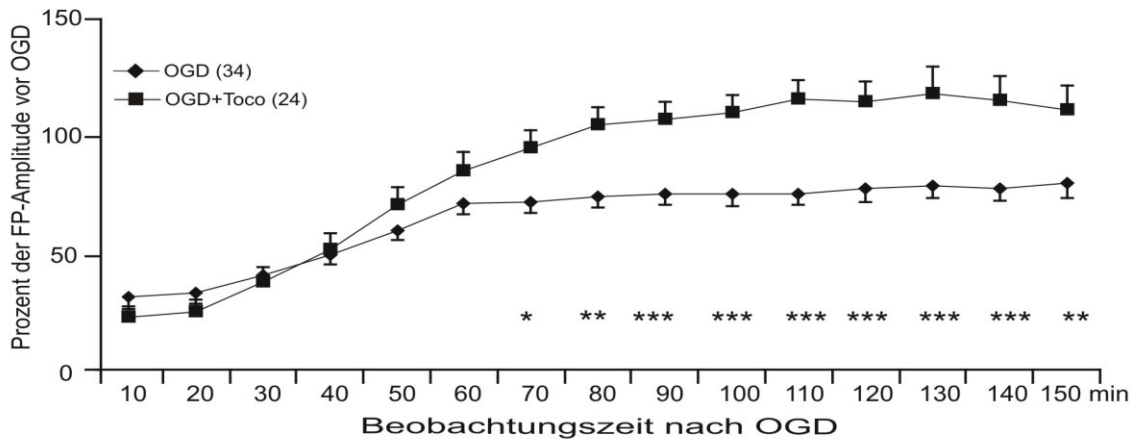


B)

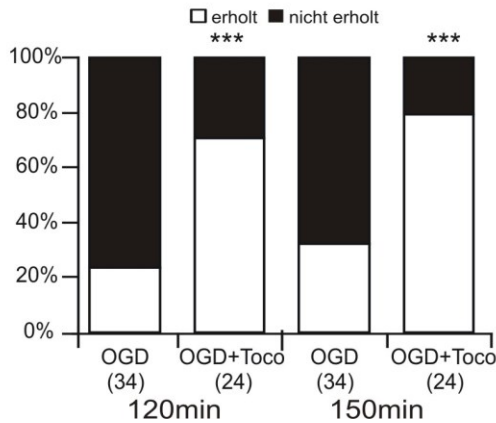


Wenn ich die Meßpunkte vergrößere, gehen die Fehlerindikatoren unter ... Hab sie deshalb klein gelassen

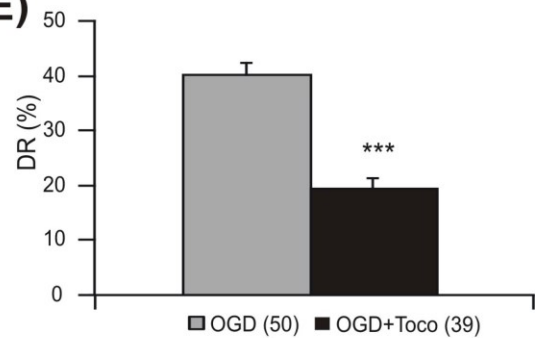
C)



D)



E)



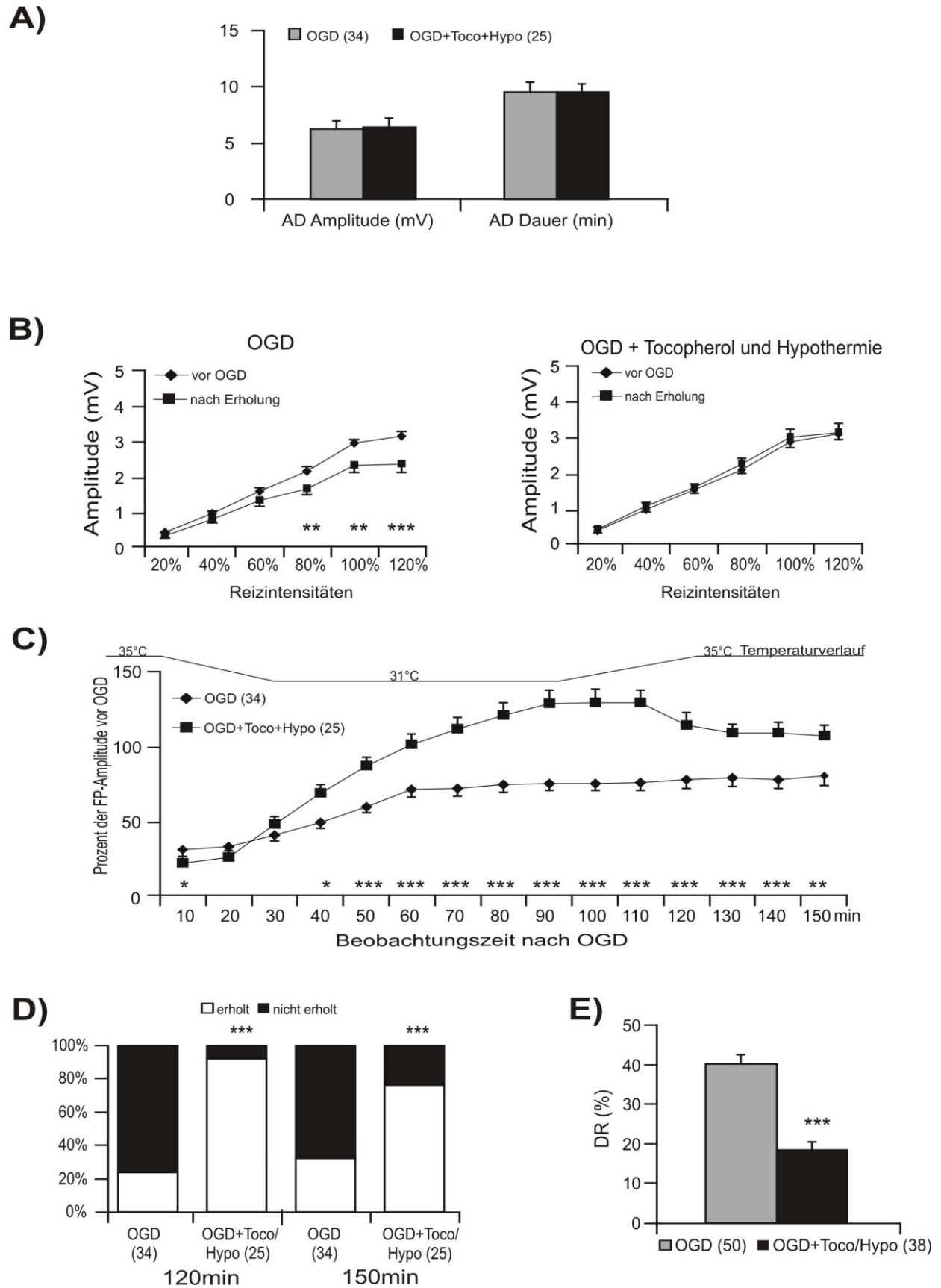
A AD Profil (Amplitude, Dauer). B Mittlere FP-Amplitude bei Reizen von 20% bis 120 % der maximalen Amplitude vor OGD und am Ende des Experiments bei identischer Reizintensität, links OGD, rechts OGD+Tocopherol. C Erreichte Prozentwerte der FP-Amplitude vor Beginn der OGD von t = 10 Minuten bis t = 150 Minuten nach Ende der OGD. D Anteil der Hirnschnitte, die zu den angegebenen Zeitpunkten 95 % der Ausgangsamplitude vor OGD erreicht haben (erholt). E Anteil Propidiumjodid-permeabler Zellen (DR in %). In A, B, C, E repräsentieren die Markierungen oder Säulen mit Fehlerbalken den Mittelwert  $\pm$  SF, in D den prozentualen Anteil der erhaltenen bzw. nicht erhaltenen Hirnschnitte in der Teilstichprobe. Die in Klammern gesetzten Zahlen bezeichnen die Anzahl der Hirnschnitte in den jeweils untersuchten Teilstichproben. Als Signifikanz-Markierungen werden für  $p \leq 0.05$  \*,  $p \leq 0.01$  \*\*,  $p \leq 0.001$  \*\*\* verwendet.

### 3.3.3. Kombination von Hypothermie und Gabe von $\alpha$ -Tocopherol

Bei der Kombination der zwei Interventionsmethoden wurde das unter 3.1 näher ausgeführte Hypothermie-Schema beibehalten und zusammen mit der  $\alpha$ -Tocopherol-Inkubation nach OGD angewendet.

Die maximale Amplitude und Dauer der AD und die Amplituden der evozierten Feldpotentiale vor und nach der OGD sowie in den Versuchsgruppen werden in Abb. 7A und Abb. 7B illustriert. Zwischen den Reiz-Antwortkurven vor und nach der Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der kombinierten Interventionsgruppe (Abb. 7B). Zwischen der kombinierten Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe waren bereits ab 50 min nach OGD hoch signifikante Differenzen hinsichtlich der jeweils erzielten Feldpotential-Antworten, im Vergleich zur FP-Antwort vor OGD, nachweisbar (Abb. 7C). Die Antworten waren in der Interventionsgruppe deutlich größer als in der Kontrollgruppe, d.h. die „funktionelle“ Erholung lief schneller ab als in der Kontrollgruppe. Auch der Anteil erholter Hirnschnitte war in der Interventionsgruppe deutlich größer (Abb. 7D) und die Zelltodrate entsprechend kleiner (Abb. 7E) als in der Kontrollgruppe. In der Kombination der Interventionen Hypothermie und post-OGD Tocopherol-Gabe zeigt sich ein sehr deutlicher positiver Effekt während der Erholungsphase, bei den „erhaltenen“ Schnitten nach Ende der Beobachtungsphase sowie in der Zelltodfärbung.

Abbildung 7: Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) mit kombinierter Intervention von Hypothermie und Tocopherol nach OGD und OGD ohne Intervention



A AD Profil (Amplitude, Dauer). B Mittlere FP-Amplitude bei Reizen von 20% bis 120 % der maximalen Amplitude vor OGD und am Ende des Experiments bei identischer Reizintensität, links OGD, rechts OGD+Tocopherol und Hypothermie. C Erreichte Prozentwerte der FP-Amplitude vor Beginn der OGD von t = 10 Minuten bis t = 150 Minuten nach Ende der OGD). D Anteil der Hirnschnitte, die zu den angegebenen Zeitpunkten 95 % der Ausgangsamplitude vor OGD erreicht haben (erholt). E Anteil propidiumjodid-permeabler Zellen (DR in %). In A, B, C, E repräsentieren die Markierungen oder Säulen mit Fehlerbalken den Mittelwert  $\pm$  SF, in D den prozentualen Anteil der erhaltenen bzw. nicht erhaltenen Hirnschnitte in der Teilstichprobe. Die in Klammern gesetzten Zahlen bezeichnen die Anzahl der Hirnschnitte in den jeweils untersuchten Teilstichproben. Als Signifikanz-Markierungen werden für  $p \leq 0.05$  \*,  $p \leq 0.01$  \*\*,  $p \leq 0.001$  \*\*\* verwendet.

### 3.3.4. Erythropoietin

Bei Erythropoietin – auch Haematopoein oder Haemopoietin genannt – handelt es sich um ein Glykoprotein-hormon, das bezeichnenderweise die Erythropoese kontrolliert und als Zytokin bezüglich der Erythrozytenvorläufer im Knochenmark zirkuliert.

Neben seinen Funktionen im Knochenmark und Wirkungen im Zuge der Wundheilung kommt Erythropoietin eine bedeutende Rolle im Rahmen der neuronalen Antwort auf Neuronenschäden im Gehirn zu (Siren et al., 2001, Demers et al., 2005, Iwai et al., 1995, Kim et al., 2008).

In Verbindung mit einem ähnlichen Projekt unserer Forschungsgruppe wurde Erythropoietin als Intervention an Hirnschnitt-Kulturen getestet (Weber et al, 2002). Um eine toxische Wirkung auf das Hirngewebe mit Sicherheit ausschließen zu können (McPherson et al., 2007), setzten wir Erythropoietin sowohl nach OGD als auch zur Verlaufskontrolle möglicher Einflüsse auf das ungeschädigte Gewebe (Leer-Epo) an Neocortex-Akutschnitten ein. Es wurde, wie in den Schnittkulturversuchen, in einer Konzentration von 20.000 IE je Liter ACSF verwendet und nach Ende der Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) appliziert. In Tabelle 6 werden die Ergebnisse der Wirkungen von Erythropoietin im Rahmen unserer Untersuchungen veranschaulicht.

Tabelle 6b dokumentiert einen signifikanten Abfall der Feldpotential-Amplitude am Ende des Experimentes im Vergleich zum Anfang des Experimentes vor OGD für die OGD ohne Intervention und eine signifikante Zunahme für die Gruppe ohne OGD. Die AD-Profile (Tabelle 6a) der Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe sind erwartungsgemäß ähnlich. In der Beobachtungsphase (Tabelle 6c) sind die geringen Differenzen zwischen Interventionsgruppe und Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten 60 min, 120 min und 150 min nach OGD statistisch nicht zu sichern. Zwischen den „Leergruppen“ und der Kontrollgruppe waren signifikante Differenzen nachweisbar. Eine ähnliche Aussage trifft für den Anteil der erhaltenen Hirnschnitte (Tabelle 6d) zu. Bezüglich der Zelltodrate ist jedoch festzustellen, dass nur die Kontrollgruppe (OGD ohne Intervention, größter Wert) von der Interventionsgruppe und den Leergruppen (Leer und Leer-Epo) abweicht.

In diesem Versuchsansatz kann eine per se toxische Wirkung von Erythropoietin auf Akutschnitte ausgeschlossen werden. Funktionell zeigt sich keine eindeutige positive Wirkung der Intervention, während die Zelltodrate sowohl bei der Gabe von Erythropoietin nach der Sauerstoff-Glucose-Deprivation als auch in den Leergruppen signifikant kleiner ist als nach OGD ohne Intervention.

**Tabelle 6: Veränderungen bei Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD) ohne und mit Erythropoietin-Applikation nach OGD (OGD + Epo vs. OGD) und zeitlich korrespondierende Effekte in Kontrollgruppen (keine OGD) ohne und mit Erythropoietin-Applikation (Leer vs. Leer-Epo).**

- a) Mittlere FP-Amplitude (80 % der maximalen Amplitude) vor der OGD und am Ende des Experiments bei identischer Reizintensität.  
 b) Erreichte Prozentwerte der FP-Amplitude vor OGD bei t = 60 min, t = 120 min und t = 150 min.  
 c) Anteil der Hirnschnitte, die zu den angegebenen Zeitpunkten 95 % der Ausgangsamplitude erreicht haben (erholte Hirnschnitte).  
 d) Anteil Propidiumjodid-permeabler Zellen [DR (PI) in %], n = Anzahl der untersuchten Hirnschnitte).

	OGD (n = 8)	OGD + EPO (n = 6)	Leer (n = 8)	Leer-Epo (n = 6)
<b>a) Mittlere FP-Amplitude</b>				
vor OGD	2.3 ± 0.14	1.8 ± 0.25	2.2 ± 0.19	2.2 ± 0.15
	**		*	
Ende des Exp.	1.5 ± 0.28	1.5 ± 0.39	2.5 ± 0.19	2.3 ± 0.10
<b>b) Erreichte Prozentwerte der FP-Amplitude vor OGD</b>				
t = 60 min	64.3 ± 9.37	73.9 ± 17.88	105.0 ± 3.97 <sup>aa</sup>	104.3 ± 1.32 <sup>a</sup>
t = 120 min	68.7 ± 10.57	86.9 ± 15.56	108.2 ± 5.67 <sup>aa</sup>	102.7 ± 2.46 <sup>a</sup>
t = 150 min	64.5 ± 10.96	79.3 ± 16.52	111.6 ± 4.97 <sup>aa, b</sup>	102.7 ± 4.15 <sup>aa</sup>
<b>c) Anteil der erholten Hirnschnitte in Prozent</b>				
t = 120 min	12,5 % (1/8)	67 % (4/6)	75 % (6/8) <sup>a</sup>	83 % (5/6) <sup>a</sup>
t = 150 min	25 % (2/8)	67 % (3/6)	88 % (7/8) <sup>a</sup>	83 % (5/6)
<b>d) Anteil Propidiumjodid-permeabler Zellen (DR in %)</b>				
	(n = 16)	(n = 10)	(n = 25)	(n = 5)
DR in %	32,4 ± 3.15	11.0 ± 2.30 <sup>aaa</sup>	13.5 ± 1.89 <sup>aaa</sup>	12.4 ± 2.07 <sup>aa</sup>

Die Zahlenangaben in den Zellen repräsentieren Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes. Die Buchstaben a, b, c, d, e und werden als Signifikanz-Zeichen für Vergleiche zwischen unabhängigen Stichproben (Mann-Whitney-Test) verwendet: OGD vs. OGD + Epo (a) Leer vs. Leer-Epo (b), IS + Epo vs. Leer-Epo (c), OGD + Epo vs. Leer (d), OGD vs. Leer (e) und OGD vs. Leer-Epo (f) ( $p \leq 0.05$ : a, b, c, d, e, f;  $p \leq 0.01$  aa, bb, cc, dd, ee, ff;  $p \leq 0.001$ : aaa, bbb, ccc, ddd, eee, fff).

### 3.3.5. Vergleich der verschiedenen Interventionen

Wie bereits zuvor abgebildet betrug die zum Ende der definierten Messphase (120 min nach OGD) erreichte Feldpotential-Antwort bei Intervention mehr als 95 % der Antwort vor OGD und war damit größer als bei OGD ohne Intervention. Dies trifft sowohl für die alleinige Applikation von  $\alpha$ -Tocopherol als auch für den alleinigen Einsatz der Hypothermie zu (Toco  $115 \pm 8,6$  %, Hypo  $98 \pm 9,1$  %, Kontrollgruppe [OGD]  $80 \pm 5,4$  %).

Auch die Kombination der Interventionen  $\alpha$ -Tocopherol und Hypothermie führte im Vergleich mit der Kontrollgruppe nach 120 Minuten zu einem verbesserten Endergebnis ( $115 \pm 7,9$  % gegen  $80 \pm 5,4$  %).

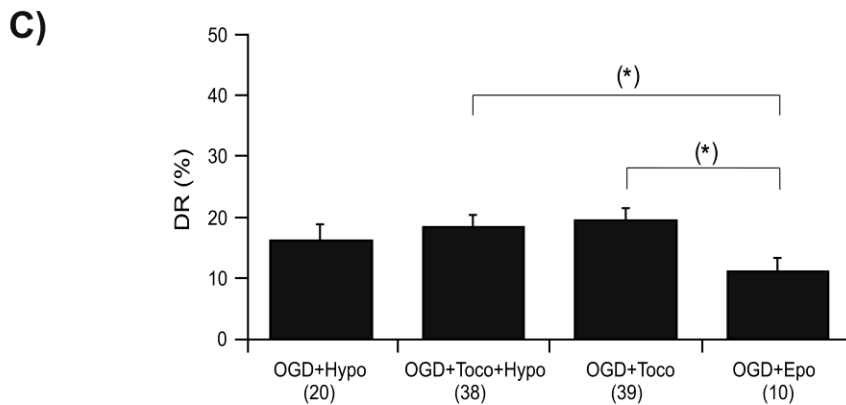
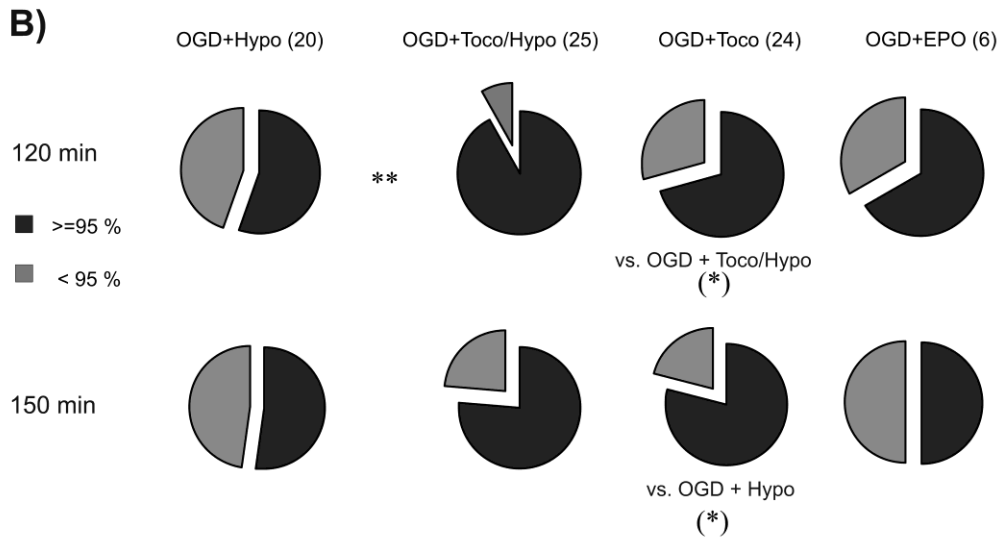
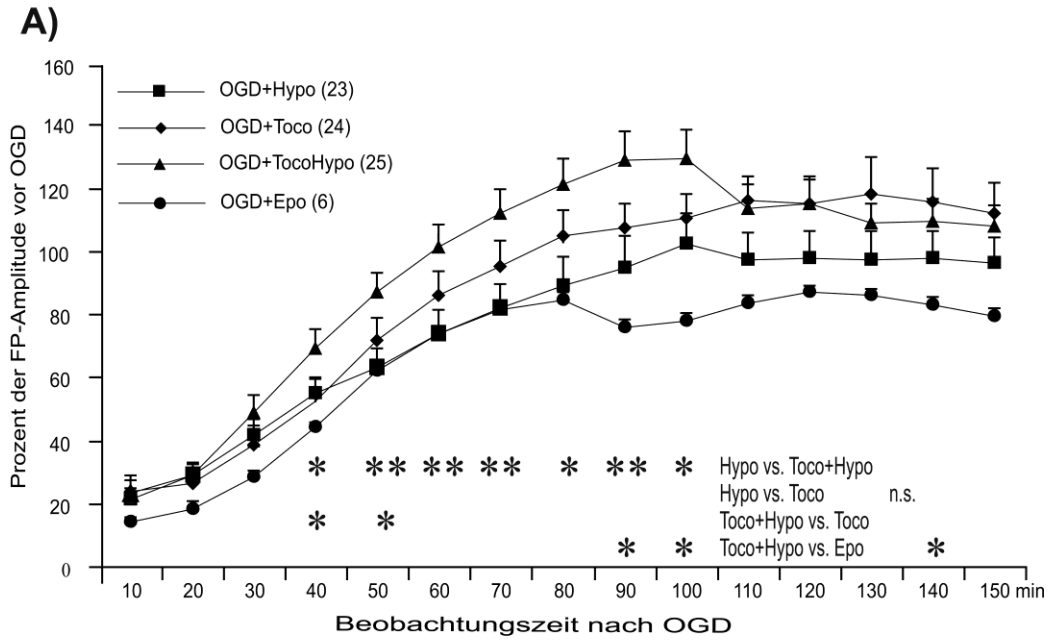
Der Verlauf der Erholung der FP-Amplituden in den verschiedenen Interventionsgruppen ist in Abbildung 8A als Prozentanteil der entsprechenden Amplitude vor OGD vergleichend dargestellt.

Im Vergleich zwischen den Interventionsgruppen sahen wir unerwartet früh bleibende signifikante Unterschiede. In der  $\alpha$ -Tocopherol/Hypothermie-Gruppe konnte schon nach etwa 40 Minuten eine signifikant höhere Amplitude festgestellt werden als in der Hypothermiegruppe ( $p < 0.05$ ). Der Unterschied blieb bis 100 min nach Ende der OGD bestehen. Im Vergleich zwischen der Toco/Hypo-Gruppe und der  $\alpha$ -Tocopherol-Gruppe waren nur zu den Zeitpunkten 40 und 50 min nach OGD Differenzen zugunsten einer schnelleren Erholung in der Toco/Hypo-Gruppe nachweisbar. Für einen entsprechenden Vergleich mit der Epo-Gruppe ergaben sich Unterschiede für die Zeitpunkte 90 min, 100 min und 140 min. Zwischen den Gruppen  $\alpha$ -Tocopherol und Hypothermie war während des gesamten Beobachtungszeitraumes keine Differenz nachzuweisen.

Die Erythropoietingruppe schien sich im letzten Drittel der Beobachtungszeit am ehesten 100 % der Ausgangsamplitude anzunähern, wohingegen die Gruppen  $\alpha$ -Tocopherol/Hypothermie,  $\alpha$ -Tocopherol über bzw. die Gruppe Hypothermie unter dem entsprechenden Wert lag (Abb.8A). Hinsichtlich des Anteils erholter Hirnschnitte war nur zum Zeitpunkt 120 min nach OGD in der Gruppe  $\alpha$ -Tocopherol/Hypothermie ein signifikant größerer Anteil erholt als in der Hypothermie-Gruppe.

Am Ende der Beobachtungsphase, nach 150 Minuten, glichen sich schließlich drei der vier Interventionsgruppen an (Toco  $112 \pm 9,9$  %, Hypo  $97 \pm 8,1$  %, Toco/Hypo  $108 \pm 6,9$  %, Epo  $79 \pm 16,6$  %), während die Epo-Gruppe einen geringeren aber nicht signifikant unterschiedlichen Prozentsatz der prä-OGD Amplitude erreichte. Die entsprechenden Anteile erholter Hirnschnitte betragen für die Interventionen Toco 79 %, Hypo 52 %, Toco/Hypo 76 % und für Epo 50 %.

Abbildung 8: Vergleich der Interventionen: Hypothermie nach OGD (OGD+Hypothermie), Tocopherol nach OGD (OGD+Toco), Tocopherol und Hypothermie nach OGD (OGD+Toco/Hypo) und Erythropoetin nach OGD (OGD+Epo).



A Erreichte Prozentwerte der FP-Amplitude vor OGD von  $t = 10$  Minuten bis  $t = 150$  Minuten nach Ende der OGD. B Anteil der Hirnschnitte, die zu den angegebenen Zeitpunkten 95 % der Ausgangsamplitude erreicht haben (erholt). C Anteil Propidiumjodid-permeabler Zellen (DR in %). In A, B, C repräsentieren die Markierungen oder Säulen mit Fehlerbalken den Mittelwert  $\pm$  SF, in D den prozentualen Anteil der erhaltenen bzw. nicht erhaltenen Hirnschnitte in der Teilstichprobe. Die in Klammern gesetzten Zahlen bezeichnen die Anzahl der Hirnschnitte in den jeweils untersuchten Teilstichproben. Als Signifikanz-Markierungen werden für  $p \leq 0.1$  (\*),  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) verwendet.

Zusammenfassend zeigt sich ein signifikanter protektiver Effekt jeder einzelnen Interventions-Strategie. Numerisch führt die Anwendung von Erythropoietin, Hypothermie, Tocopherol und der Kombination Hypothermie mit Tocopherol in aufsteigender Folge zu einer verbesserten Erholung am Ende der Beobachtungsphase. Die Kombination von Hypothermie und Tocopherol scheint im Vergleich zu den Interventionen mit  $\alpha$ -Tocopherol bzw. Hypothermie keine deutliche Verbesserung der Erholung nach Sauerstoff-Glucose-Deprivation zu bewirken. Die Zelltodrate ist in der Epo-Gruppe am kleinsten und differiert insignifikant ( $p < 0.1$ ) im Vergleich zu den Gruppen Toco und Toco/Hypo.



## 4. Diskussion

Um die Folgen einer Gewebeschädigung nach Ischämie studieren zu können beziehungsweise die Wirksamkeit von Interventionen messbar zu machen, wurden verschiedene Versuchansätze entwickelt (Vannucci und Vannucci 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Ischämie / Hypoxie durch eine Sauerstoff und Glucose Deprivation in Perfusion und Begasung der Gewebeschnitte simuliert. Die Ergebnisse zeigen einen neuroprotektiven Effekt auf das Hirngewebe unreifer Ratten bei einer Intervention nach simulierter Ischämie mit  $\alpha$ -Tocopherol, Hypothermie bzw. deren Kombination. Die Erholung der Feldpotentiale (FP) im Vergleich zur Kontrollgruppe, als ein Zeichen funktionaler Wiederherstellung, war in den Interventionsgruppen insgesamt höher. Dementsprechend zeigte sich ein signifikant geringerer Anteil permanent geschädigter Zellen in den Interventionsgruppen, gemessen anhand der Propidiumjodid-Fluoreszenzintensität.

Die Fragen, die in Kapitel 1.6 formuliert wurden, lassen sich mithilfe der Studienergebnisse wie folgt beantworten:

Die Kombination der Hypothermie mit  $\alpha$ -Tocopherol führte innerhalb der gewählten Beobachtungszeit von 150 Minuten nach der Beendigung der Ischämiephase nicht zu einem additiven neuroprotektiven Effekt. Weder die Erholung der FP noch der Anteil gefärbter Zellen unterschied sich signifikant von den entsprechenden Ergebnissen der Einzelapplikationen. Dennoch ist es bemerkenswert, dass eine Kombination beider Interventionen bereits 60 Minuten nach Ende der Ischämiezeit zu einer signifikanten FP-Erholung führte, wohingegen die alleinige Applikation von  $\alpha$ -Tocopherol erst nach 80 Minuten und die Anwendung der Hypothermie sogar erst am Ende der Beobachtungszeit eine signifikante Erholung der FP (< 95%) nach sich zogen. Dieses könnte als ein Ergebnis synergistischer neuroprotektiver Aktivitäten interpretiert werden, jedoch ließ sich diese Aussage nicht durch die Auswertung der FP und die Death Ratio (DR) am Ende der 150 Minuten bestätigen. Möglicherweise war der Endpunkt unserer Studie im Hinblick auf die Entwicklung der Zellschäden und des nachfolgenden Zelltodes zu früh gewählt.

In einer früher veröffentlichten Arbeit von Ko und Kollegen aus dem Jahre 2001, welche dem gleichen Ansatz folgte, wurden neonatale Neocortexschnitten von Ratten mit einer kürzeren Ischämiezeit (durchschnittlich 16 Minuten) und der Applikation von Hypothermie untersucht, wobei deren FP etwa 80 % der präischämischen FP-Amplitude (damaliger Grenzwert) erreichten, was zudem deutlich schneller und häufiger erfolgte, als bei den Kontrollschnitten (Ko et al., 2001).

Luhmann und Kral untersuchten im Jahre 1997 Neocortexschnitte von jungen (5 – 8 Tage alten), juvenilen (14–18 Tagen alten) sowie adulten (mehr als 28 Tage alten) Ratten, die zuvor längeren Hypoxieintervallen ausgesetzt worden waren. Dabei rief eine Hypoxie bei juvenilen und adulten Ratten eine FP-Abnahme von 42 bis 55 Prozent hervor, wohingegen die jungen Ratten lediglich eine FP-Abnahme von drei Prozent zu verzeichnen hatten (Luhmann und Kral, 1997).

Da die vorliegende Studie an 6–8 Tage alten Ratten durchgeführt wurde, können die Ergebnisse von Luhmann und Kral bedingt mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie in Relation gesetzt und miteinander verglichen werden. Es muss festgehalten werden, dass die 6-8 Tage alten Ratten in unserer Studie eine deutlich stärkere Beeinträchtigung der Zellfunktion erkennen ließen wobei Luhmann und Kral die Schnitte nur einer kürzeren Hypoxie aussetzten und damit in meinen Experimenten die Belastung deutlich größer war.

Bei asphyktischen Neugeborenen findet sich eine Suppression sowohl der cerebralen Grundaktivität, als auch der Reaktion auf Reize (Ancora et al., 2008). Zum Einschätzen der Schwere der hypoxischen Schädigung und dem Beginn einer therapeutischen Hypothermie wird daher in der Klinik das amplitudenintegrierte EEG zusammen mit dem o.g. Thompson- oder Sarnat-Score verwendet. Es gibt auch Überlegungen bestimmte Substanzen, zum Beispiel das Protein S-100 (Hilario et al., 2006) oder die neuronenspezifische Enolase als „serologische Marker“ zu verwenden.

Die Hypothermie als altes physikalisches Verfahren hat sich in den letzten Jahren zunehmend als eine sehr wirksame Methode herausgestellt, das Ausmaß einer ischämisch-hypoxischen Schädigung zu begrenzen (Cochrane Review Jacobs et al., 2007, Pediatrics Review Schulzke et al., 2007). Derzeit hat sich die Ganzkörperkühlung über 72 Stunden gegenüber der alleinigen Kopfkühlung durchgesetzt (Shankaran et al., 2005, Zanelli et al., 2008)

In unseren Experimenten wurde die zeitabhängige Erholung der FP, gemessen an der Ausgangsamplitude, als eine präzisere Definition der funktionalen Erholung gewählt. Dabei wurde im Wesentlichen eine antioxidative Behandlung nach der erfolgten Schädigung (OGD) am unreifen Hirngewebe in vitro als Einzelapplikation von Tocopherol und in Kombination mit Hypothermie untersucht. Außerdem wurde auch Erythropoietin als Einzelapplikation getestet. Bei Erythropoietin – auch Haematopoein oder Haemopoietin genannt – handelt es sich um ein Glykoprotein-hormon, das bezeichnenderweise die Erythropoese kontrolliert und als Zytokin bezüglich der Erythrozytenvorläufer im Knochenmark zirkuliert. Unsere Ergebnisse bestätigen frühere Hinweise auf eine neuroprotektive Wirkung von Erythropoietin nach hypoxischer Schädigung des Gehirnes (Aydin et al., 2003, Weber et al., 2005 und Kellert et al., 2007). Im Vergleich der Interventionen stellte sich jedoch heraus, dass die Erholung der Feldpotentiale

nach Intervention mit Erythropoietin deutlich geringer ist als nach Tocopherol und Tocopherol und Hypothermie.

Bezüglich des von uns verwendeten Tocopherol-Detergens fanden sich kaum Untersuchungen in diesem speziellen Zusammenhang. Das und Kollegen konnten allerdings einen positiven Effekt von Vitamin-B-Komplex und Tocopherolacetat auf alkoholbedingte Immunmodulation finden (Das et al., 2007).

Die Studien zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen ergaben vermehrt Hinweise auf einen möglichen neuroprotektiven Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol. Amano und Kollegen induzierten eine Lipidperoxidation von Neuroblastomzellen und Neuronenkulturen und fanden eine verminderte Zellschädigung nach Vorbehandlung der Zellen mit  $\alpha$ -Tocopherol (Amano et al., 1994). Shin und Kollegen berichteten im selben Jahr im Rahmen ihrer Untersuchungen an Gehirnzellmembranen von neugeborenen Ferkeln, dass sich die Na-K-ATP-ase Aktivität bei Zellen, die mit  $\alpha$ -Tocopherol vorbehandelt worden waren, nach erfolgter Hypoxie deutlich höher erwies, als bei Zellen in der unbehandelten Kontrollgruppe, wobei die Autoren von einem direkten neuroprotektiven Effekt des  $\alpha$ -Tocopherols ausgingen (Shin et al., 1994).

Tagami und Kollegen berichteten, dass die Applikation von Vitamin E die Apoptose in kortikalen Neuronen während Hypoxie und Sauerstoffperfusion bei Ratten zu verhindern vermag, wobei sie sich bei ihren Ergebnissen auf Zellvitalfärbungen und biochemische Parameter stützten (Tagami et al., 1998).

Acosta und Kollegen verwendeten bereits im Rahmen ihrer Untersuchungen aus dem Jahre 1987 elektrophysiologische Parameter (FP). Sie zeigten, dass in Gehirnschnitten des Hippocampus adulter Ratten bei der präischämischen Applikation von  $\alpha$ -Tocopherol eine verbesserte Erholung der präanoxischen Amplituden nach einer siebenminütigen Anoxiephase erfolgt ( $64 \pm 15$  % gegenüber von  $22 \pm 7$  %) (Acosta et al., 1987).

Der Unterschied der Amplitudenerholung betrug bei Acosta und Kollegen rund 40 %, was über der Differenz von rund 30 % in unserer Arbeit liegt, wobei sich die Ergebnisse jedoch ebenfalls nicht direkt miteinander vergleichen lassen (unterschiedlich lange Ischämiezeiten, unterschiedliche Hirnregionen, unterschiedliches Alter der Tiere und unterschiedlicher Zeitpunkt der Intervention).

Yoshida und Kollegen sowie Glozman und Yavin berichteten im Rahmen ihrer Studien an Rattenhirnen, dass eine Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Tocopherol in vitro und in vivo mit einer verminderten Lipidperoxidation einhergeht (Yoshida et al., 1985; Glozman et Yavin, 1997). Yue und Kollegen beschrieben im Jahr 1993 hingegen, dass sich die  $\alpha$ -Tocopherolspiegel im Gehirn

von Ratten und Wüstenspringmäusen durch ischämie- oder reperfusionsbedingte zerebrale Schäden nicht verändern (Yue et al., 1993).

Vitamin E geriet in Misskredit, als bei mehreren Neugeborenen im Rahmen von Studien Nieren- und Leberversagen aufgetreten war, nachdem man diesen Vitamin E intravenös verabreicht hatte (Arrowsmith et al., 1989; Bove et al., 1985). Bei anderen Untersuchungen fand man gehäuft Fälle von Sepsis und nekrotisierender Enterokolitis. Allerdings darf in diesem Zusammenhang vermutet werden, dass das Detergens, mit welchem das Vitamin E suspendiert worden war, das eigentliche Toxin darstellte. Teilweise hatte man wohl auch so hohe Dosen appliziert, dass Vitamin E letztlich als Prooxidans wirken oder die Immunantwort hemmen musste (Gorodischer, 1990).

Bis heute ist die genaue Dosis unbekannt, die notwendig ist, damit Vitamin E seinen schützenden Effekt entfalten kann. Ebenso wenig weiß man, inwiefern ein ausschließlicher Vitamin-E-Mangel eine Gefahr für den Organismus darstellt. Ungeachtet dessen, beweisen experimentelle in-vitro- und in-vivo-Studien und auch unsere Studie, dass Vitamin E einen neuroprotektiven Effekt auszuüben vermag (Yoshida et al., 1985; Acosta et al., 1987; Hara et al., 1990; Trojan, 1993; Amano et al., 1994; Stohrer et al., 1998; Tagami et al., 1998).

Die Bedeutung des plazentaren  $\alpha$ -Tocopherol-Transfers und der daraus resultierende Einfluss der mütterlichen Aufsättigung auf die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Serum und Hirngewebe des Feten (im Tierversuch) wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Bortolotti und Kollegen konstatierten diesbezüglich in ihrer Publikation aus dem Jahr 1990, dass die niedrigen  $\alpha$ -Tocopherolspiegel in der Amnionflüssigkeit von Kaninchen den Schluss zuließen, dass eine pränatale Verabreichung von  $\alpha$ -Tocopherol nicht sinnvoll erscheine (Bortolotti et al., 1990). Hidiroglou und Kollegen sowie Njeru und Kollegen bestätigten mit ihren Untersuchungen ebenfalls die Tatsache, dass  $\alpha$ -Tocopherol nur in einem sehr geringen Maße plazentagängig ist (Hidiroglou et al., 1993; Njeru et al., 1994).

Vatassery und Kollegen maßen im Hirn adulter Ratten  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen von 12.0 bis 19.6  $\mu\text{g/g}$  Feuchtgewicht in Abhängigkeit von der jeweiligen Hirnregion (Vatassery et al., 1984), die intravenöse Tocopherolkonzentration ungeborener Kaninchen nach intravenöser Bolusgabe an die Mutter wird von Bortolotti und Kollegen mit 30  $\mu\text{mol/l}$  angegeben (Bortolotti et al., 1990). Da jedoch keine aktuellen Daten über die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen im Hirngewebe von neonatalen Ratten oder Neugeborenen vorlagen, wählten wir in der vorliegenden Arbeit den Erfahrungen Acostas entsprechend eine nichttoxische Dosierung von 32 mg  $\alpha$ -Tocopherol/l ACSF.

Die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im fetalen Hirngewebe ist während der prä- und perinatalen Periode deutlich vermindert, im Vergleich mit der Konzentration während der späteren Entwicklung und der mütterlichen Konzentration, was Günther und Kollegen sowie Kelly und Kollegen in ihren Arbeiten entsprechend beschrieben (Kelly et al., 1992; Günther et al., 1993).

Ergebnisse von Studien an adultem Hirngewebe lassen sich daher nicht ohne weiteres auf die Bedingungen im unreifen Hirn übertragen. So könnte das Potential einer antioxidativen Behandlung bei unreifem Hirngewebe durchaus größer sein, als bisher angenommen. Covey und Kollegen finden hier einen dosisabhängigen Effekt von Tocopherol auf ein verbessertes Outcome nach Striatum-Hypoxie neonataler Ratten (Covey et al., 2006) Hsiao und Kollegen verwendeten Alpha-Tocopherol-Derivate, die eine wesentlich höhere antioxidative Potenz bei besserer Wasserlöslichkeit aufweisen (Hsiao et al., 2007)

Um den Effekt der  $\alpha$ -Tocopherol-Inkubation vor einer Ischämie unter den Bedingungen unserer Studie zu untersuchen (prophylaktische  $\alpha$ -Tocopherol-Gabe der Mutter, zellschädigende Einflüsse durch die Applikation), verabreichten wir in einer der Studiengruppen  $\alpha$ -Tocopherol direkt nach der Präparation und inkubierten die Gehirnschnitte über einen Zeitraum von mindestens 60 Minuten, bevor die Ischämiephase begann. Dieses Procedere führte zu keiner verminderten Zelltodrate im Vergleich zur Applikation nach Sauerstoff-Glucose Deprivation.

Diese Werte lassen sich jedoch nicht mit der elektrophysiologisch messbaren funktionalen Erholung gleichsetzen, weil die Gehirnschnitte der entsprechenden Versuchsgruppe lediglich eingefärbt wurden, um den Anteil der Protektion durch  $\alpha$ -Tocopherol nach der Präparation bestimmen zu können. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte sein, dass das Maximum der Aktivität der freien Radikale bereits einige Minuten nach der Ischämie in der Reperfusionphase erreicht worden war. Eine antioxidative Behandlung könnte dementsprechend eine der wenigen Interventionsmöglichkeiten darstellen, die postischämisch appliziert, nicht zu spät, sondern zeitpunktgenau beginnen müsste, was jedoch wiederum den Eindruck erwecken könnte, dass der neuroprotektive Effekt bei der Einzelapplikation von  $\alpha$ -Tocopherol größer wäre, als jener der Hypothermie oder einer Kombination beider Interventionsmaßnahmen zusammen.

In unserer Studie erfolgte die PI-Färbung nach der Beobachtungsphase, 150 Minuten nach Beendigung der Ischämie. Die Fluoreszenzmessungen wurden etwa 300 Minuten nach dem Ende der Ischämiephase durchgeführt. Die Nekrose als Mechanismus des Zelltodes beginnt bereits innerhalb weniger Minuten nach Eintritt der Schädigung, die Apoptose erst innerhalb einiger Stunden (Neumar, 2000), so dass beide Mechanismen in das Ergebnis unserer PI-Färbungen eingeflossen sind. In der Leer-Gruppe (keine OGD und keine Intervention) fanden wir eine mittlere Zelltodrate von 13.1 % als Basisschädigung durch Präparation und Inkubation. Diese

DR erscheint sehr hoch, trotz der von Luhman und Kollegen demonstrierten höheren Toleranz unreifen Hirngewebes gegenüber einer Anoxie (Luhmann et Heinemann, 1992; Luhmann et Kral, 1997).

Obwohl eine gewisse Toleranz bekannt ist, wurde die schnellstmögliche und zugleich behutsamste Präparationsvariante angestrebt. Der Zeitraum zwischen Dekapitation und Inkubation der Gewebsschnitte in einer Interfacekammer betrug stets weniger als zehn Minuten. Die Präparation der Gehirnschnitte erfolgte dabei in begaster eisgekühlter ACSF.

Trotz unserer Bemühungen muss dem traumatisierenden Effekt der Präparation Rechnung getragen werden. Wir fanden eine hohe Fluoreszenz an den Neocortexrändern, welche den meisten mechanischen Traumata ausgesetzt waren und zudem eine schmale Duraschicht aufwiesen, in der aufgrund dessen ein hoher Anteil toter Zellen anzutreffen war.

Eine induzierte Ischämiephase von 20 Minuten führte zu einer mittleren DR von 38.8 %, was dem dreifachen der „Leer+Toco-Gruppe“ entsprach. Unsere Intervention direkt nach der OGD – dementsprechend etwa drei bis vier Stunden nach der Präparation – hatte eine verminderte Zellschädigung und einen geringeren nachfolgenden Zelltod zur Folge, die sich, wie wir vermuten, auf die beiden Schädigungsmechanismen Präparation und Ischämie zurückführen lassen. Da jedoch die DR in der „Leergruppe“ nicht signifikant von der DR in der „Leer+Toco-Gruppe“ abwich, könnte man vermuten, dass hauptsächlich der ischämiebedingte Zelltod gemessen wurde. Mithilfe unserer Methoden lassen sich diese beiden Mechanismen nicht sicher voneinander unterscheiden.

Als Zeichen eines fortbestehenden pathogenetischen Prozesses wurde die erhöhte Konzentration von Hydroxylradikalen, eines Produktes der Lipidperoxidation (Kinuta et al., 1989), bei gleichzeitiger verminderter  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration drei Stunden nach erfolgter Ischämie beobachtet (Takamatsu et al., 1998). Die Ergebnisse von Takamatsu et al. lassen ebenfalls auf einen lang anhaltenden neuroprotektiven Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol schließen. Dieser Sachverhalt wurde jedoch in der vorliegenden Studie nicht untersucht.

Hara und Kollegen beobachteten sieben Tage nach erfolgtem fünfminütigem ischämischem Insult eine verminderte Zelltodrate im Rahmen der Administration von  $\alpha$ -Tocopherol, wobei sie ihre Untersuchungen an Hippocampus von Wüstenrennmäusen durchführten (Hara et al., 1990).

Die Apoptose beginnt einige Stunden nach dem initialen Insult, setzt sich über mehrere Tage fort und lässt sich somit durch unser „Akut-Slice-Modell“ nicht in toto erfassen. Dies könnte auch einen Grund für Unterschiede zwischen der funktionellen Erholung der Feldpotentiale und der Zelltodrate darstellen.

Die Größe der Feldpotentiale als Referenzwert für die elektrophysiologische Erholung wird nicht nur durch den Ausfall funktionsfähiger Zellen (Zelltod) vermindert sondern auch durch eine unregulierte Entladungstätigkeit und veränderte synaptische Kommunikation in geschädigten Zellverbänden beeinflusst. Daher ist anzunehmen, dass der funktionale Status der Gehirnschnitte, der über die FP-Erholung erhoben, und der Zelltod, welcher mithilfe von Fluoreszenzmessungen bestimmt wurde, durch die zeitlich begrenzten Möglichkeiten unserer Messungen hinsichtlich ihrer Aussagekraft nur eingeschränkt zu bewerten sind. So scheint es verwirrend zu sein, wenn in den Interventionsgruppen Hypothermie und Erythropoietin kleine Zelltodraten (16%, 13%), die einen starken neuroprotektiven Effekt der Intervention vermuten lassen, aber nur niedrige Anteile erholter Hirnschnitte (52%, 50%) messbar waren. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass zu den gewählten Zeitpunkten weder die Fluoreszenzmessung der Zelltodrate noch die elektrophysiologischen Parameter der funktionellen Erholung die Wirkungen der getesteten Interventionen ausreichend charakterisieren. Abschließend ist festzustellen, dass in diesem Versuchsansatz eine sichere Entscheidung darüber, ob eine Intervention oder welche Intervention nach einem hypoxisch-ischämischen Insult besser vor einer permanenten Schädigung schützt als die Hypothermie, nicht getroffen werden kann. Es sind weitere Untersuchungen an „Akut-Slice-Modellen“ und „Slice-Kultur-Modellen“ unter Einbeziehung funktionell-biochemischer und morphologischer Methoden erforderlich, damit letztlich ein neuroprotektiver Effekt auf den Prozess der zeitlich begrenzten und/oder permanenten Zellschädigung in seiner Gesamtheit erfasst werden kann.

## 5. Tabellenanhang

### 5.1. Auswahl der OGD-Zeiten

Tabelle 1: Ausgewählte Parameter bei unterschiedlicher Dauer der Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) (n = Anzahl untersuchter Hirnschnitte).

- a) Profil der „Anoxischen Depolarisation“ (AD-Profil).  
 b) Mittlere FP-Amplitude vor OGD (80 % der maximalen Amplitude) und am Ende des Experiments bei identischer Reizintensität  
 c) Erreichte Prozentwerte der FP-Amplitude vor OGD bei t = 60 min, t = 120 min und t = 150 min (jeweils nach Ende OGD).  
 d) Anteil der Hirnschnitte, die zu den angegebenen Zeitpunkten 95 % der Ausgangsamplitude erreicht haben („erholte Hirnschnitte“).

	16 min OGD (n = 9)	20 min OGD (n = 10)	30 min OGD (n = 6)
<b>a) AD Profil</b>			
AD Amplitude (mV)	8,3 ± 1,24 mV	8,5 ± 0,95	8,9 ± 1,70 mV
AD Dauer (min)	10,8 ± 0,97 min	12,5 ± 1,42	24,7 ± 2,19 min <sup>a, b</sup>
<b>b) Mittlere FP-Amplitude (mV)</b>			
vor OGD	2,9 ± 0,68	2,4 ± 0,19	1,5 ± 0,12
Signifikanz (Wilcoxon)		**	
Ende des Experiments	1,7 ± 0,36	1,7 ± 0,27	0,9 ± 0,37
<b>c) Prozent der FP-Amplitude</b>			
t = 60 min	67 ± 11,3	61 ± 9,7	19 ± 16,2 <sup>a, b</sup>
t = 120 min	80 ± 20,5	71 ± 8,9	27 ± 24,2 <sup>a, b</sup>
t = 150 min	77 ± 21,2	69 ± 9,5	58 ± 29,2
<b>d) Anteil der erhaltenen Hirnschnitte in Prozent</b>			
t = 120 min	44 % (4/9)	20 % (2/10)	17 % (1/6)
t = 150 min	44 % (4/9)	30 % (3/10)	33 % (2/6)

Die Zahlenangaben in den Zellen repräsentieren Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes. Es wurden statistische Vergleiche zwischen abhängigen Stichproben (Wilcoxon Test) innerhalb der Gruppen und zwischen den unabhängigen Stichproben der Gruppen 16, 20, und 30 min OGD (Mann-Whitney-Test) durchgeführt. Als Signifikanz-Zeichen für den Vergleich innerhalb der Stichproben gilt \* ( $p \leq 0.05$  \*). Zwischen den Stichproben dient der Buchstabe a für den Vergleich zur Stichprobe 16 min OGD und b für den Vergleich zur Stichprobe 20 min OGD ( $p \leq 0.05$ :<sup>a, b</sup>). Die Signifikanzzeichen sind hinter der jeweiligen Vergleichsgruppe positioniert.



## 5.2. Auswahl des geeigneten Tocopherolpräparates

Tabelle 2: Übersicht der Ergebnisse nach Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) und  $\alpha$ -Tocopherol-Applikation nach Ende der OGD in Abhängigkeit vom Alkoholgehalt der Lösung

a) Erreichte Prozentwerte der FP-Amplitude vor OGD bei t = 60 min, t = 120 min und t = 150 min (jeweils nach Ende der OGD).

b) Anteil der Hirnschnitte, die zu den angegebenen Zeitpunkten 95 % der Ausgangsamplitude erreicht haben (erholt).

	OGD + Toco in 0.064 ‰ (n = 4)	OGD + Toco in 0.1 ‰ (n = 10)	OGD + Toco in 0.5 ‰ (n = 3)
a) Erreichte Prozentwerte der FP-Amplitude			
t = 60 min	45 ± 10,5	91 ± 14,1	68 ± 5,9
t = 120 min	86 ± 16,3	96 ± 13,7	107 ± 16,5
t = 150 min	90 ± 6,7	102 ± 13,8	91 ± 8,2
b) Anteil der erhaltenen Hirnschnitte			
t = 120 min	50 % (2/4)	50 % (5/10)	66 % (2/3)
t = 150 min	50 % (2/4)	50 % (5/10)	33 % (1/3)

Die Zahlenangaben in den Zellen repräsentieren Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes. Es wurden statistische Vergleiche zwischen jeweils zwei unabhängigen Stichproben (Mann-Whitney-Test) durchgeführt.

## 5.3. Zelltoadfärbung und Einzellzählung am konfokalen Mikroskop

Tabelle 3: DR in Prozent und mittlere Zellzahl in den Interventionsgruppen, verglichen mit der Kontrollgruppe und der Leergruppe:

	OGD +Toco	OGD +Hypo	OGD +Toco/Hypo	OGD	Leer
DR in %	20 ± 2.0 (n = 39)	16 ± 2.6 (n = 20)	18 ± 2.0 (n = 38)	40 ± 2.3 <sup>a, b, c</sup> (n = 50)	14 ± 1,9 <sup>d</sup> (n = 25)
mittlere Zellzahl	81 ± 4.2 (n = 3)	76 ± 6 (n = 3)	61 ± 6 (n = 3)	236 ± 7.7 (n = 3)	51 ± 6 (n = 3)

Die Zahlenangaben in den Zellen repräsentieren Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes. Die Buchstaben a, b, c, d werden als Signifikanz-Zeichen für Vergleiche zwischen den jeweils markierten Gruppen und den Gruppen OGD+Toco (a), OGD +Hypo (b), OGD + Toco/Hypo (c), und OGD ohne Intervention (Leer) (d) (Mann-Whitney-Test) verwendet. ( $p \leq 0.001$ : <sup>a, b, c, d</sup>).

### 5.4. Leerversuche

Tabelle 4: Wirkungen von Tocopherol (Toco), Alkohol (Alk) und Erythropoietin (Epo) in Kontroll-Hirnschnitten (Leer = keine OGD, n = Anzahl untersuchter Hirnschnitte).

a) Mittlere FP-Amplitude (80 % der maximalen Amplitude) zu Beginn und am Ende der Beobachtungszeit bei identischer Reizintensität.

b) Erreichte Prozentwerte der Ausgangsamplitude bei t = 60 Minuten, t = 120 Minuten und t = 150 Minuten.

c) Prozentualer Anteil der Hirnschnitte, die zu den angegebenen Zeitpunkten 95 % der FP-Amplitude zu Beginn des Versuchs erreichen („erholt“).

d) Mittlerer Anteil Propidiumjodid-permeabler Zellen [DR (PI) in %], Anzahl der Tiere je 6.

	Leer (n = 8)	Leer-Toco (n = 7)	Leer-Alk (n = 9)	Leer-Epo (n = 6)
a) Mittlere FP-Amplitude (mV)				
Beginn	2 ± 0,2	2 ± 0,2	2 ± 0,2	2 ± 0,2
Sign.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Ende	2,5 ± 0,20	2,6 ± 0,24	2,1 ± 0,15	2,3 ± 0,1
b) Prozent der FP-Amplitude zu bestimmten Zeitpunkten				
t = 60 min	105 ± 4,0	116 ± 3,0	98 ± 2,7 <sup>bbb</sup>	104 ± 1,3 <sup>c</sup>
t = 120 min	108 ± 5,7	120 ± 4,6	99 ± 2,4 <sup>bb</sup>	103 ± 2,5
t = 150 min	112 ± 5,0	122 ± 4,5	96 ± 3,1 <sup>bbb</sup>	103 ± 4,1
c) Prozentualer Anteil der Hirnschnitte mit 95% der Ausgangsamplitude („erholt“)				
t = 120 min	75 % (6/8)	100 % (7/7)	89 % (8/9)	83 % (5/6)
t = 150 min	88 % (7/8)	100 % (7/7)	78 % (7/9)	83 % (5/6)
d) Mittlerer Anteil Propidiumjodid-permeabler Zellen (DR in %)				
	(n = 25)	(n = 20)	(n = 26)	(n = 5)
DR in %	14 ± 1,9	13 ± 1,4	16 ± 1,3	12,4 ± 2,1

Die Zahlenangaben in den Zellen repräsentieren Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes. Ein Stern [\*] dient als Signifikanz-Zeichen für Unterschiede zwischen abhängigen Stichproben (Wilcoxon-Test), die Buchstaben a, b, c und d werden als Signifikanz-Zeichen für Vergleiche zwischen unabhängigen Stichproben (Mann-Whitney-Test) verwendet: a Mit a bezeichnete Gruppe vs. Leer, b mit b bezeichnete Gruppe vs. Leer-Toco, c mit c bezeichnete Gruppe vs. Leer-Alk., (p ≤ 0.05: \*, a, b, c; p ≤ 0.01: \*\*, aa, bb, c; p ≤ 0.001: \*\*\*, aaa, bbb, ccc).

### 5.5. Applikationszeitpunkt

Tabelle 5: Übersicht über die Ergebnisse bei Gabe von α-Tocopherol vor und nach der Sauerstoff-Glucose-Deprivation(OGD) im Vergleich zur OGD ohne Intervention.

a) Profil der „Anoxischen Depolarisation“ (AD)

b) Mittlere FP-Amplitude (80 % der maximalen Amplitude) vor und nach der OGD bei identischer Reizintensität

c) Erreichte Prozentwerte der FP-Amplitude vor OGD bei t = 60 min, t = 120 min und t = 150 min (jeweils nach Ende der OGD).

d) Anteil der Hirnschnitte, die zu den angegebenen Zeitpunkten 95 % der Ausgangsamplitude erreicht haben (erholt).

e) Mittlerer Anteil ethidiumbromid-permeabler Zellen [DR (EB) in %].

	$\alpha$ -Tocopherol vor OGD (n = 13)	$\alpha$ -Tocopherol nach OGD (n = 24)	OGD ohne Intervention (n = 34)
<b>a) AD Profil</b>			
AD Amplitude (mV)	15 ± 2,2	7 ± 0,8 <sup>aa</sup>	6 ± 0,6 <sup>aaa</sup>
AD Dauer (min)	11 ± 0,7	11 ± 0,9	10 ± 0,7
<b>b) Mittlere FP-Amplitude</b>			
mV vor OGD	2 ± 0,2	1,9 ± 0,09	2,3 ± 0,10
Sign. (Wilcoxon)			**
mV 150 min nach OGD	1,9 ± 0,18	2,1 ± 0,17	1,8 ± 0,15
<b>c) erreichte Prozent der FP-Amplitude vor OGD</b>			
t = 60 min	80,4 ± 9,16	86 ± 7,6	72 ± 4,5
Sign. (Wilcoxon)	**	***	
t = 120 min	98,4 ± 10,57	115 ± 8,6	80 ± 5,4 <sup>bbb</sup>
t = 150 min	100 ± 10,5	112 ± 9,9	81 ± 5,9 <sup>bb</sup>
<b>d) Erholten Hirnschnitte in Prozent</b>			
t = 120 min	62 % (8/13)	79 % (19/24)	22 % (7/32) <sup>a, bbb</sup>
t = 150 min	54 % (7/13)	79 % (19/24)	33 % (11/33) <sup>bbb</sup>
<b>e) Mittlerer Anteil Ethidiumbromid-permeabler Zellen (DR in %)</b>			
	(n = 3)	(n = 39)	(n = 50)
	14 ± 7,7	19 ± 2,0	40 ± 2,3 <sup>aa, bbb</sup>

Die Zahlenangaben in den Zellen repräsentieren Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes. Ein Stern [\*] dient als Signifikanz-Zeichen für Unterschiede zwischen abhängigen Stichproben (Wilcoxon-Test). Die Buchstaben a, b und c werden als Signifikanz-Zeichen für Vergleiche zwischen den unabhängigen Stichproben (Mann-Whitney-Test) verwendet: (a) im Vergleich zu Toco vor OGD, (b) im Vergleich zu Toco nach OGD. Zur Ermittlung statistischer Gruppen-Unterschiede in Tabelle 5d wurde Fishers exakter Test eingesetzt, ( $p \leq 0.05$ : \*, a, b ;  $p \leq 0.01$ : \*\*, aa, bb;  $p \leq 0.001$ : \*\*\*, aaa, bbb).

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Acosta D. Kass IS. Cottrell JE. Effect of alpha-tocopherol and free radicals on anoxic damage in the rat hippocampal slice. *Exp Neurol.* 1987; 97: 607 – 614.
- 2 Amano S. Ohashi M. Kirihara M. Yang XH. Hazama F. Alpha-Tocopherol protects against radical-induced injury in cultured neurons. *Neurosci Lett.* 1994; 170: 55 – 58.
- 3 Ancora G. Maranella E. Locatelli C. Pierantoni L. Faldella G. Changes in cerebral hemodynamics and amplitude integrated EEG in an asphyxiated newborn during and after cool cap treatment. *Brain Dev.* 2008 Jul 21. [Epub ahead of print].
- 4 Atkinson J. Epand RF. Epand RM. Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 44 (5): 739 – 764.
- 5 Aydin A. Genç K. Akhisaroglu M. Yorukoglu K. Gokmen N. Gonullu E. Erythropoietin exerts neuroprotective effect in neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Dev.* 2003 Oct; 25 (7): 494 – 498.
- 6 Bähmann A. Schürer L. Unterberg A. Wahl W. Staub F. Kempfski O. Mediatorssubstanzen des Hirnödems bei der zerebralen Ischämie. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 1991; 41: 310 – 315.
- 7 Battin MR. Dezoete JA. Gunn TR. Gluckman PD. Gunn AJ. Neurodevelopmental Outcome of Infants Treated With Head Cooling and Mild Hypothermia After Perinatal Asphyxia. *Pediatrics.* 2001; 107: 480 – 484.
- 8 Bauer K. Groneck P. Speer CP. Neonatologie. In: Speer CP. Gahr M. (Hrsg.). Pädiatrie, 3. Auflage. Heidelberg 2009, Springer-Verlag, 137 – 205. Berger TM, Frei B. Rifai N. Avery ME. Suh J. Yoder BA. Coalson JJ. Early high dose antioxidant vitamins do not prevent bronchopulmonary dysplasia in premature baboons exposed to prolonged hyperoxia: a pilot study. *Pediatr Res.* 1998 Jun; 43 (6): 719 – 726.
- 10 Bittigau P. Sifringer M. Genz K. Reith E. Pospischil D. Govindarajalu S. Dzietko M. Pesditschek S. Mai I. Dikranian K. Olney JW. Ikonomidou C. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 Nov 12; 99 (23): 15089 - 15094. Epub 2002 Nov 4.
- 11 Bona E. Andersson AL. Blomgren K. Gilland E. Puka-Sundvall M. Gustafson K. Hagberg H. Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats. *Pediatr Res.* 1999; 45: 500 – 509.
- 12 Bonfoco E. Krainc D. Ankarcrona M. Nicotera P. Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-

- aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci.* 1995; 92: 7162 – 7166.
- 13 Bortolotti A. Traina GL. Barzago MM. Celardo A. Bonati M. Placental transfer and tissue distribution of vitamin E in pregnant rabbits. *Biopharm Drug Dispos.* 1990; 11: 679 – 688.
  - 14 Brana C. Benham C. Sundstrom L. A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2002 Oct; 10 (2): 109 – 114.
  - 15 Brigelius-Flohé R. Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 1999 Jul; 13 (10): 1145 – 1155.
  - 16 Cai Z. Rhodes PG. Intrauterine hypoxia-ischemia alters expression of the NMDA receptor in the young rat brain. *Neurochem Res.* 2001 May; 26 (5): 487 – 495.
  - 17 Chang YS. Park WS. Lee M. Kim KS. Shin SM. Choi JH. Effect of hyperglycemia on brain cell membrane function and energy metabolism during hypoxia-ischemia in newborn piglets. *Brain Res.* 1998 Jul 6; 798 (1 – 2): 271 – 280.
  - 18 Covey MV. Murphy MP. Hobbs CE. Smith RA. Oorschot DE. Effect of the mitochondrial antioxidant, Mito Vitamin E, on hypoxic-ischemic striatal injury in neonatal rats: a dose-response and stereological study. *Exp Neurol.* 2006 Jun; 199 (2): 513 – 519. Epub 2006 Feb 14.
  - 19 Daneyemez M. Kurt E. Cosar A. Yuce E. Ide T. Methylprednisolone and vitamin E therapy in perinatal hypoxic-ischemic brain damage in rats. *Neuroscience.* 1999; 92 (2): 693 – 697.
  - 20 Das SK. Gupta G. Rao DN. et al. Effect of lecithin with vitamin-B complex and tocopheryl acetate on long-term effect of ethanol induced immunomodulatory activities. *Indian J Exp Biol.* Aug 2007; 45 (8): 683 – 688.
  - 21 Demers EJ. McPherson RJ. Juul SE. Erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcomes in juvenile rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res.* 2005 Aug; 58 (2): 297 – 301. Epub 2005 Jul 31.
  - 22 Du C. Hu R. Csernansky A. Hsu CY. Choi DW. Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996; 16: 195 – 201.
  - 23 Dyatlov VA. Makovetskaia VV. Leonhardt R. Lawrence DA. Carpenter DO. Vitamin E enhances Ca(2+)-mediated vulnerability of immature cerebellar granule cells to ischemia. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25: 793 – 802.

- 24 Farooqui AA. Haun SE. Horrocks LA. Ischemia and hypoxia. In: Basic Neurochemistry (Siegel GJ. Agranoff BW. Albers RW. Molinoff PB. eds). New York 1994, Raven Press, S. 867 – 883.
- 25 Forcelli PA. Kim J. Kondratyev A. Gale K. Pattern of antiepileptic drug-induced cell death in limbic regions of the neonatal rat brain. *Epilepsia* 2011 Dec; 52 (12): 207 – 211. Epub 2011 Nov 2
- 26 Glozman S. Yavin E. Lipid peroxides are generated by the fetal rat brain after episodes of global ischemia in utero. *Neurochem Res.* 1997; 22: 201 – 208.
- 27 Gorodischer R. Micronutrients and drug response: vitamin A and vitamin E in the fetus and in the newborn. *Dev Pharmacol Ther.* 1990; 15 (3 – 4): 166 – 172.
- 28 Gunn AJ. Gluckman PD. Flunarizine, a calcium channel antagonist, is not neuroprotective when given after hypoxia-ischemia in the infant rat. *Dev Pharmacol Ther.* 1991; 17 (3 – 4): 205 – 209.
- 29 Gunn AJ. Gluckman PD. Gunn TR. Selective head cooling in newborn infants after perinatal asphyxia: a safety study. *Pediatrics.* 1998; 102: 885 – 892.
- 30 Gunn AJ. Wyatt JS. Whitelaw A. Barks J. Azzopardi D. Ballard R. Edwards AD. Ferriero DM. Gluckman PD. Polin RA. Robertson CM. Thoresen M. CoolCap Study Group. Therapeutic hypothermia changes the prognostic value of clinical evaluation of neonatal encephalopathy. *J Pediatr.* 2008 Jan; 152 (1): 55 – 58. 58. e1. Epub 2007 Oct 24.
- 31 Hall RT. Hall FK. Daily DK. High-dose phenobarbital therapy in term newborn infants with severe perinatal asphyxia: a randomized, prospective study with three-year follow-up. *J Pediatr.* 1998 Nov; 133 (5): 714.
- 32 Hara H. Kato H. Kogure K. Protective effect of alpha-tocopherol on ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus. *Brain Res.* 1990; 510: 335 – 338.
- 33 Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal.* 2003 Oct; 5 (5): 557 – 561.
- 34 Heinemann U. Lux HD. Gutnick MJ. Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Exp Brain Res.* 1977; 27: 237 – 243.
- 35 Heinemann U. Buchheim K. Gabriel S. Kann O. Kovacs R. Schuchmann S. Cell death and metabolic activity during epileptiform discharges and status epilepticus in the hippocampus. *Prog Brain Res.* 2002; 135: 197 – 210.
- 36 Herrera E. Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J Physiol Biochem.* 2001; 57 (2): 43 – 56.

- 37 Hidiroglou M. Farnworth E. Butler G. Vitamin E and fat supplementation of sows and the effect on tissue vitamin E concentrations in their progeny. *Reprod Nutr Dev.* 1993; 33: 557 – 565.
- 38 Hilario E. Goni-de-Cerio F. Alvarez FJ. Alvarez A. et al. Protein S-100 as tissue-marker of hypoxic-ischemic encephalopathy after perinatal asphyxia in lambs. *Journal of Maternal – Fetal & Neonatal Medicine.* Boca Raton: May 2006; Vol. 19: 133.
- 39 Hoffmann GF. Grau AJ. (Hrsg.) *Stoffwechselerkrankungen in der Neurologie.* Stuttgart 2004, Thieme-Verlag.
- 40 Hsiao G. Lee JJ. Chen YC. Lin JH. Shen MY. Lin KH. Chou DS. Sheu JR. Neuroprotective effects of PMC, a potent alpha-tocopherol derivative, in brain ischemia-reperfusion: reduced neutrophil activation and anti-oxidant actions. *Biochem Pharmacol.* 2007 Mar 1; 73 (5): 682 – 693. Epub 2006 Nov 17.
- 41 Inan C. Kilic I. Kilinc K. Kalayci O. Kotiloglu E. The effect of high dose antenatal vitamin E on hypoxia-induced changes in newborn rats. *Pediatr Res.* 1995; 38: 685 – 689.
- 42 Iwai M. Cao G. Yin W. Stetler RA. Liu J. Chen J. Erythropoietin promotes neuronal replacement through revascularization and neurogenesis after neonatal hypoxia/ischemia in rats. *Stroke.* 2007 Oct; 38 (10): 2795 – 2803. Epub 2007 Aug 16.
- 43 Iwasa H. Aono T. Fukuzawa K. Protective effect of vitamin E on fetal distress induced by ischemia of the uteroplacental system in pregnant rats. *Free Radic Biol Med.* 1990; 8: 393 – 400.
- 44 Jacobs S. Hunt R. Tarnow-Mordi W. Inder T. Davis P. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Oct 17; (4) : CD003311.
- 45 Johnson L. Quinn GE. Abbasi S. Gerdes J. Bowen FW. Bhutani V. Severe retinopathy of prematurity in infants with birth weights less than 1250 grams: incidence and outcome of treatment with pharmacologic serum levels of vitamin E in addition to cryotherapy from 1985 to 1991. *J Pediatr.* 1995 Oct; 127 (4): 632 – 639.
- 46 Kellert BA. McPherson RJ. Juul SE. A comparison of high-dose recombinant erythropoietin treatment regimens in brain-injured neonatal rats. *Pediatr Res.* 2007 Apr; 61 (4): 451 – 455.
- 47 Kelly FJ. Safavi M. Cheeseman KH. Tissue alpha-tocopherol status during late fetal and early neonatal life of the guinea-pig. *Br J Nutr.* 1992; 67: 457 – 462.
- 48 Kim SS. Lee KH. Sung DK. Shim JW. Kim MJ. Jeon GW. Chang YS. Park WS. Erythropoietin attenuates brain injury, subventricular zone expansion, and sensorimotor

- deficits in hypoxic-ischemic neonatal rats. *J Korean Med Sci.* 2008 Jun; 23 (3): 484 – 491.
- 49 Kinuta Y. Kikuchi H. Ishikawa M. Kimura M. Itokawa Y. Lipid peroxidation in focal cerebral ischemia. *J Neurosurg.* 1989; 71: 421 – 429.
- 50 Klinger G. Beyene J. Shah P. Perlman M. Do hyperoxaemia and hypocapnia add to the risk of brain injury after intrapartum asphyxia? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2005 Jan; 90 (1): F49 – F52.
- 51 Ko H. Zeller M. Gabriel S. Graulich J. Heinemann U. Obladen M. Mild postischemic hypothermia is neuroprotective in the immature rat neocortex slice. *Brain Res.* 2001; 894: 297 – 300.
- 52 Lagrange P. Romero IA. Minn A. Revest PA. Transendothelial permeability changes induced by free radicals in an in vitro model of the blood-brain-barrier. *Free Radic Biol Med.* 1999 Sep; 27 (5 – 6): 667 – 672.
- 53 Laptook A. Tyson J. Shankaran S. McDonald S. Ehrenkranz R. Fanaroff A. Donovan E. Goldberg R. O’Shea TM. Higgins RD. Poole WK. Elevated temperature after hypoxic-ischemic encephalopathy: risk factor for adverse outcomes. *Pediatrics.* 2008 Sep; 122 (3): 491 – 499.
- 54 Levison SW. Rothstein RP. Romanko MJ. Snyder MJ. Meyers RL. Vannucci SJ. Hypoxia/ischemia depletes the rat perinatal subventricular zone of oligodendrocyte progenitors and neural stem cells. *Dev Neurosci.* 2001; 23 (3): 234 – 247.
- 55 Liu R. Suzuki A. Guo Z. Mizuno Y. Urabe T. Intrinsic and extrinsic erythropoietin enhances neuroprotection against ischemia and reperfusion injury in vitro. *J Neurochem.* 2006 Feb; 96 (4): 1101 – 1110. Epub 2006 Jan 17.
- 56 Luhmann HJ. Heinemann U. Hypoxia-induced functional alterations in adult rat neocortex. *J Neurophysiol.* 1992; 67: 798 – 811.
- 57 Luhmann HJ. Kral T. Hypoxia-induced dysfunction in developing rat neocortex. *J Neurophysiol.* 1997; 78: 1212 – 1221.
- 58 Marret S. Gressens P. Gadiisseux JF. Evrard P. Prevention by magnesium of excitotoxic neuronal death in the developing brain: an animal model for clinical intervention studies. *Dev Med Child Neurol.* 1995 Jun; 37 (6): 473 – 484.
- 59 Martin D. Janigian B. Shukitt-Hale RL. Joseph JA. Effect of vitamin E intake on levels of vitamins E and C in the central nervous system and peripheral tissues: implications for health recommendations. *Brain Res.* 1999; 845: 50 – 59.



- 60 McIlvoy LH. The effect of hypothermia and hyperthermia on acute brain injury. *AACN Clin Issues*. 2005 Oct – Dec; 16 (4): 488 – 500.
- 61 McPherson RJ. Demers EJ. Juul SE. Safety of high-dose recombinant erythropoietin in a neonatal rat model. *Neonatology*. 2007; 91 (1): 36 – 43. Epub 2006 Nov 10.
- 62 McQuillen PS. Sheldon RA. Shatz CJ. Ferriero DM. Selective vulnerability of subplate neurons after early neonatal hypoxia-ischemia. *J Neurosci*. 2003; 23: 3308 – 3315.
- 63 Mishima K. Ikeda T. Yoshikawa T. Aoo N. Egashira N. Xia YX. Ikenoue T. Iwasaki K. Fujiwara M. Effects of hypothermia and hyperthermia on attentional and spatial learning deficits following neonatal hypoxia-ischemic insult in rats. *Behav Brain Res*. 2004 May 5; 151 (1 – 2): 209 – 217.
- 64 Monette R. Small DL. Mealing G. Morley P. A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. *Brain Res Brain Res Protoc*. 1998 Jan; 2 (2): 99 – 108.
- 65 Nelson CW. Wei EP. Povlishock JT. Kontos HA. Moskowitz MA. Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Am J Physiol*. 1992; 263 (5/2): H1356 – H1362.
- 66 Nelson KB. Grether JK. Can magnesium sulfate reduce the risk of cerebral palsy in very low birthweight infants? *Pediatrics*. 1995 Feb; 95 (2): 263 – 269.
- 67 Neumar RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann Emerg Med*. 2000; 36: 483 – 506.
- 68 Niessen KH. (Hrsg.) *Pädiatrie*. 6., unveränderte Auflage. Stuttgart 2007, Thieme-Verlag.
- 69 Njeru CA. McDowell LR. Wilkinson NS. Linda SB. Williams SN. Pre- and postpartum supplemental DL-alpha-tocopheryl acetate effects on placental and mammary vitamin E transfer in sheep. *J Anim Sci*. 1994; 72: 1636 – 1640.
- 70 O’Shea ES. Kothadia JM. Klinepeter KL. et al. Randomized placebo-controlled trial of a 42-day tapering course of dexamethasone to reduce the duration of ventilator dependency in very low birth weight infants: outcome of study participants at 1-year adjusted age. *Pediatrics*. 1999; 104: 15 – 21.
- 71 Packer L. Weber SU. Rimbach G. Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J. Nutr*. 2001; 131 (2): 369 – 373.
- 72 Park WS. Chang YS. Lee M. Effects of hyperglycemia or hypoglycemia on brain cell membrane function and energy metabolism during the immediate reoxygenation-reperfusion period after acute transient global hypoxia-ischemia in the newborn piglet. *Brain Res*. 2001 May 18; 901 (1 – 2): 102 – 108.
- 73 Perlman JM. Hyperthermia in the delivery: potential impact on neonatal mortality and morbidity. *Clin Perinatol*. 2006 Mar; 33 (1): 55 – 63.

- 74 Phelps DL. Rosenbaum AL. Isenberg SJ. Leake RD. Dorey FJ. Tocopherol efficacy and safety for preventing retinopathy of prematurity: a randomized, controlled, double-masked trial. *Pediatrics*. 1987 Apr; 79 (4): 489 – 500.
- 75 Plateel M. Dehouck MP. Torpier G. Cecchelli R. Teissier E. Hypoxia increases the susceptibility to oxidant stress and the permeability of the blood-brain barrier endothelial cell monolayer. *J Neurochem*. 1995; 65: 2138 – 2145.
- 76 Pomper JK. Graulich J. Kovacs R. Hoffmann U. Gabriel S. Heinemann U. High oxygen tension leads to acute cell death in organotypic hippocampal slices cultures. *Brain Res Dev Brain Res*. 2001 Jan 31; 126 (1): 109 – 116.
- 77 Rino Y. Suzuki Y. Kuroiwa Y. et al. Vitamin E malabsorption and neurological consequences after gastrectomy for gastric cancer. *Hepatogastroenterology*. Sep 2007; 54 (78): 1858 – 1861.
- 78 Sarnat HB. Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress: A clinical and electroencephalographic study. *Archives of Neurology*. 1976; 33: 696 – 705.
- 79 Schmid-Elsaesser R. Hungerhuber E. Zausinger S. Baethmann A. Reulen HJ. Combination drug therapy and mild hypothermia: a promising treatment strategy for reversible focal cerebral ischemia. *Stroke*. 1999; 30: 1891 – 1899.
- 80 Schulzke SM. Rao S. Patole SK. A systematic review of cooling for neuroprotection in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy – are we there yet? *BMC Pediatr*. 2007 Sep 5; 7: 30.
- 81 Shankaran S. Laptook AR. Ehrenkranz RA. Tyson JE. et al. Whole-Body Hypothermia for Neonates with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *The New England Journal of Medicine*. Boston: Oct 13. 2005; Vol. 353. Iss. 15: 1574.
- 82 Sheardown MJ. Suzdak PD. Nordholm L. AMPA, but not NMDA, receptor antagonism is neuroprotective in gerbil global ischaemia, even when delayed 24 h. *Eur J Pharmacol*. 1993 Jun 4; 236 (3): 347 – 353.
- 83 Shin SM. Razdan B. Mishra OP. Johnson L. Delivoria-Papadopoulos M. Protective effect of alpha-tocopherol on brain cell membrane function during cerebral cortical hypoxia in newborn piglets. *Brain Res*. 1994 Aug 8; 653 (1 – 2): 45 – 50.
- 84 Shinwell ES. Karplus M. Reich D. et al. Early postnatal dexamethasone therapy is associated with increased incidence of cerebral palsy. Presented at the Hot Topics in Neonatology Conference, Washington DC, December 1999.

- 85 Shinwell ES. Eventov-Friedman S. Impact of perinatal corticosteroids on neuromotor development and outcome: review of the literature and new meta-analysis. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2009 Jun; 14 (3): 164 – 170. Epub 2008 Dec. 23 Review.
- 86 Shum-Tim D. Nagashima M. Shinoka T. Bucerius J. Nollert G. Lidov HG. du Plessis A. Laussen PC. Jonas RA. Postischemic hyperthermia exacerbates neurologic injury after deep hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998 Nov; 116 (5): 780 – 792.
- 87 Silverstein FS. Barks JD. Hagan P. Liu XH. Ivacko J. Szaflarski J. Cytokines and perinatal brain injury. *Neurochem Int.* 1997; 30: 375 – 383.
- 88 Simbruner G. Haberl C. Harrison V. Linley L. Willeitner AE. Induced brain hypothermia in asphyxiated human newborn infants: a retrospective chart analysis of physiological and adverse effects. *Intensive Care Med.* 1999; 25: 1111 – 1117.
- 89 Sinha R. Patterson BH. Mangels AR. Levander OA. Gibson T. Taylor PR. Block G. Determinants of plasma vitamin E in healthy males. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1993 Sep-Oct; 2 (5): 473 – 479.
- 90 Siren AL. et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 4044 – 4049.
- 91 Sokol RJ. Vitamin E and neurologic deficits. *Adv Pediatr.* 1990; 37: 119 – 148.
- 92 Tagami M. Yamagata K. Ikeda K. Nara Y. Fujino H. Kubota A. Numano F. Yamori Y. Vitamin E prevents apoptosis in cortical neurons during hypoxia and oxygen reperfusion. *Lab Invest.* 1998; 78: 1415 – 1429.
- 93 Takamatsu H. Kondo K. Ikeda Y. Umemura K. Hydroxyl radical generation after the third hour following ischemia contributes to brain damage. *Eur J Pharmacol.* 1998; 352: 165 – 169.
- 94 Tanyel MC. Mancano LD. Neurologic findings in vitamin E deficiency. *Am Fam Physician.* Jan 1997; 55 (1): 197 – 201.
- 95 Thompson CM. Puterman AS. Linley LL. Hann FM. van der Elst CW. Molteno CD. Malan AF. The value of a scoring system for hypoxic ischemic encephalopathy in predicting neurodevelopmental outcome. *Acta Paediatr.* 1997; 86: 757 – 761.
- 96 Thoresen M. Wyatt J. Keeping a cool head, post-hypoxic hypothermia – an old idea revisited. *Acta Paediatr.* 1997; 86: 1029 – 1033.
- 97 Traber MG. Frei B. Beckman JS. Vitamin E revisited: do new data validate benefits for chronic disease prevention?. *Curr Opin Lipidol.* Feb 2008; 19 (1): 30 – 38.

- 98 Vannucci RC. Cerebral carbohydrate and energy metabolism in perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Pathol.* 1992 Jul; 2 (3): 229 – 234.
- 99 Vannucci RC. Experimental models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *APMIS Suppl.* 1993; 40: 89 – 95.
- 100 Vannucci RC. Mechanisms of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Semin Perinatol.* 1993 Oct; 17 (5): 330 – 337.
- 101 Vannucci RC. Brucklacher RM. Vannucci SJ. The effect of hyperglycemia on cerebral metabolism during hypoxia-ischemia in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996 Sep; 16 (5): 1026 – 1033.
- 102 Vannucci RC. Brucklacher RM. Vannucci SJ. CSF glutamate during hypoxia-ischemia in the immature rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 1999 Dec 10; 118 (1 – 2): 147 – 151.
- 103 Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol.* 2000; 17 (3): 113 – 120.
- 104 Vannucci RC. Brucklacher RM. Vannucci SJ. Intracellular calcium accumulation during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 2001 Jan 31; 126 (1): 117 – 120.
- 105 Vannucci RC. Christensen MA. Stein DT. Regional cerebral glucose utilization in the immature rat: effect of hypoxia-ischemia. *Pediatr Res.* 1989 Sep; 26 (3): 208 – 214.
- 106 Vannucci RC. Christensen MA. Yager JY. Nature, time-course, and extent of cerebral edema in perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Neurol.* 1993 Jan – Feb; 9 (1): 29 – 34.
- 107 Vannucci RC. Connor JR. Mauger DT. Palmer C. Smith MB. Towfighi J. Vannucci SJ. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res.* 1999 Jan 15; 55 (2): 158 – 163.
- 108 Vannucci SJ. Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol.* 2004 Aug; 207 (Pt 18): 3149 – 3154.
- 109 Vannucci RC. Mjuscic DJ. Effect of glucose on perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Biol Neonate.* 1992; 62 (4): 215 – 224.
- 110 Vannucci RC. Perlman JM. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics.* 1997 Dec; 100 (6): 1004 – 1014.
- 111 Vannucci RC. Towfighi J. Heitjan DF. Brucklacher RM. Carbon dioxide protects the perinatal brain from hypoxic-ischemic damage: an experimental study in the immature rat. *Pediatrics.* 1995 Jun; 95 (6): 868 – 874.

- 112 Vannucci RC. Towfighi J. Brucklacher RM. Vannucci SJ. Effect of extreme hypercapnia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Pediatr Res*. 2001 Jun; 49 (6): 799 – 803.
- 113 Vannucci RC. Vannucci SJ. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Dev Neurosci*. 2005 Mar – Aug; 27 (2 – 4): 81 – 86.
- 114 Vatassery GT. Angerhofer CK. Knox CA. Deshmukh DS. Concentrations of vitamin E in various neuroanatomical regions and subcellular fractions, and the uptake of vitamin E by specific areas of rat brain. *Biochim Biophys Acta*. 1984 ; 792: 118 – 122.
- 115 Villalobos MA. De La Cruz JP. Carrasco T. Smith-Agreda JM. Sanchez de la Cuesta. Effects of alpha-tocopherol on lipid peroxidation and mitochondrial reduction of tetraphenyl tetrazolium in the rat brain. *Brain Res Bull*. 1994; 33: 313 – 318.
- 116 Volpe JJ. Brain injury in the premature infant – current concepts of pathogenesis and prevention. *Biol Neonate*. 1992; 62: 231 – 242.
- 117 Wang X. Quinn P. Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res*. 1999; 38 (4): 309 – 336.
- 118 Watts JL. Milner R. Zipursky A. Paes B. Ling E. Gill G. Fletcher B. Rand C. Failure of supplementation with vitamin E to prevent bronchopulmonary dysplasia in infant less than 1,500 g birth weight. *Eur Respir J*. 1991 Feb; 4 (2): 188 – 190.
- 119 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 Dec 27; 985 (2): 305 – 311.
- 120 Weber A. Dzierko M. Berns M. Felderhoff-Mueser U. Heinemann U. Maier RF. Obladen M. Ikonomidou C. Bühner C. Neuronal damage after moderate hypoxia and erythropoietin. *Neurobiol Dis*. 2005 Nov; 20 (2): 594 – 600. Epub 2005 Jun 2.
- 121 Wengenack TM. Curran GL. Olson EE. Poduslo JF. Putrescine-modified catalase with preserved enzymatic activity exhibits increased permeability at the blood-nerve and blood-brain barriers. *Brain Res*. 1997 Aug 29; 767 (1): 128 – 135.
- 122 Wilson-Costello D. Walsh MC. Langer JC. Guillet R. Laptook AR. Stoll BJ. Shankaran S. Finer NN. van Meurs KP. Engle WA. Das A. Impact of postnatal corticosteroid use on neurodevelopment at 18 to 22 months' adjusted age: effects of dose, timing, and risk of bronchopulmonary dysplasia in extremely low birth weight infants. *Pediatrics*. 2009 Mar; 123 (3): e430 – e437. Epub 2009 Feb 9.

- 123 Yager JY. Towfighi J. Vannucci RC. Influence of mild hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Pediatr Res.* 1993 Oct; 34 (4): 525 – 529.
- 124 Yager JY. Armstrong EA. Jaharus C. Saucier DM. Wirrell EC. Preventing hyperthermia decreases brain damage following neonatal hypoxic-ischemic seizures. *Brain Res.* 2004 Jun 11; 1011 (1): 48 – 57.
- 125 Yeh TF. Lin YJ. Huang CC. et al. Early dexamethasone therapy in preterm infants: a follow-up study. *Pediatrics.* 1998; 101: E7.
- 126 Yoshida S. Busto R. Watson BD. Santiso M. Ginsberg MD. Postischemic cerebral lipid peroxidation in vitro: modification by dietary vitamin E. *J Neurochem.* 1985; 44: 1593 – 1601.
- 127 Yue TL. Barone FC. Gu JL. Feuerstein GZ. Brain alpha-tocopherol levels are not altered following ischemia/reperfusion-induced cerebral injury in rats and gerbils. *Brain Res.* 1993; 610: 53 – 56.
- 128 Zanelli SA. Naylor M. Dobbins N. Quigg M. Goodkin HP. Matsumoto JA. Fairchild KD. Implementation of a ‘Hypothermia for HIE’ program: 2-year experience in a single NICU. *J Perinatol.* 2008 Mar; 28 (3): 171 – 175. Epub 2007 Dec 6.

## 7. Erklärung

„Ich, Melanie Zeller versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Postischämische Neuroprotektion durch Alpha-Tocopherol und Hypothermie bei Neocortex-Gewebsschnitten neonataler Ratten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

Melanie Zeller

Datum 14.08.2013

## **Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Melanie Zeller hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Ko H-K, Zeller M, Gabriel S, Graulich J, Heinemann U, Obladen M, Mild postischemic hypothermia is neuroprotective in the immature rat neocortex slice., Brain Research, 894 (2001), 297-300, 2001

Beitrag im Einzelnen: Entspricht den durch die Doktorandin durchgeführten Vorversuchen der vorliegenden Arbeit.

Publikation 2: Gabriel S, Njunting M, Pomper J, Merschmke M, Sanabria E, Eilers A, Kivi A, Zeller M, Meencke H, Cavalheiro E, Heinemann and Lehmann T, Stimulus and potassium induced epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis., J Neuroscience 17 (2004)

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei der Versuchs- und Gewebepvorbereitung, Durchführen einzelner Messungen.

Publikation 3: Hoffmann U, Pomper J, Graulich J, Zeller M, Schuchmann S, Gabriel S, Maier RF, Heinemann U, Changes in neuronal activity in area CA1 and CA3 after hypoxic periods with normoxic and hyperoxic reoxygenation in juvenile rat organotypic hippocampal slice cultures, Develop Brain Res, 2005

Beitrag im Einzelnen: Zuarbeiten bei Färbung und Versorgung der Gewebekulturen.

Prof. Dr. Uwe Heinemann

Berlin, 14. August. 2013

Melanie Zeller



## **8. Lebenslauf**

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

Greifswald, den 14.08.2013

## 9. Publikationsliste

Originalarbeiten:

Mild postischemic hypothermia is neuroprotective in the immature rat neocortex slice.

Ko H-K, Zeller M, Gabriel S, Graulich J, Heinemann U, Obladen M: Brain Research, 894 (2001), 297-300,

Stimulus and potassium induced epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis.

Gabriel S, Njunting M, Pomper J, Merschmke M, Sanabria E, Eilers A, Kivi A, Zeller M, Meencke H, Cavalheiro E, Heinemann and Lehmann T: J Neuroscience, 17 (2004)

Changes in neuronal activity in area CA1 and CA3 after hypoxic periods with normoxic and hyperoxic reoxygenation in juvenile rat organotypic hippocampal slice cultures.

Hoffmann U, Pomper J, Graulich J, Zeller M, Schuchmann S, Gabriel S, Maier RF, Heinemann U: Develop Brain Res, 2005

Abstract:

Neuroprotection by mild postischemic hypothermia: Impact on functional recovery in neocortex slices of immature rat brain (Abstract)

Ko H-K, Zeller M, Gabriel S, Graulich J, Heinemann U, Obladen M: Restorative Neurol Neuroscience 2000, 16:55-6.

Poster:

Neuroprotection by mild postischemic hypothermia: Impact on functional recovery in neocortex slices of immature rat brain.

Ko H-K, Zeller M, Gabriel S, Graulich J, Heinemann U, Obladen M: International Conference for Neuroprotectoin and Neurorepair 02.-04.03.2000

Postischemic intervention with a-Tocopherol and in combination with mild hypothermia Impact on functional recovery in neocortex slices of immature rat brain.

Zeller, M., Ko, H.K., Gabriel, S., Heinemann, U., Obladen, M.: Neurophysiologisches Symposium Johannes-Müller-Institut für Physiologie 18. –19.04.2003

## 10. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Uwe Heinemann für die Überlassung des Themas, für seine andauernde Unterstützung und Förderung.

Dr. Siegrun Gabriel möchte ich für ihre unermüdliche Betreuung, ihre Ausdauer, Motivation und konstruktive Kritik sowie ihre wissenschaftliche Überzeugung danken.

Dr. Hans-Jürgen Gabriel, Dr. Herbert Siegmund und Bernd Schacht und danke ich sehr für ihre zuverlässige technische Unterstützung, die vieles möglich gemacht hat.

Dr. Richard Kovacs Dr. Sebastian Schuchmann und Dr. Claudia Eder danke ich für ihre Unterweisungen und Mithilfe bei den Zellfärbungen und Zellzählung.

Dr. Olaf Windmüller danke ich für die zuverlässige Herstellung der Meßelektroden.

Dr. Ulrike Hoffmann danke ich für ihr stets offenes Ohr und ihre Ideen.

Dr. Kathrin Schulze danke ich für ihre Hilfe bei Materialbestellungen und Organisation von Fördermitteln.

Antje Fortströer danke ich für Ihre technische Assistenz beim Herstellen der Perfusionslösungen.

Dr. Heimke von Osten danke ich für ihre Englischlektionen und ihre Diskussionsbereitschaft.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen jetzigen Arbeitskollegen für ihre bedingungslose Unterstützung auf den „letzten Metern“.