

Aus der Klinik für Neonatologie  
und dem Institut für Zell- und Neurobiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Auswirkungen von neonataler Hyperoxie und Erythropoetin  
auf die Entwicklung kortikaler Pyramidenzellen im unreifen  
Gehirn der Maus

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Güven Mustafa Kutlu

**Datum der Promotion: 25.11.2022**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT (DEUTSCH)</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT (ENGLISH)</b>	<b>VIII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Frühgeburtlichkeit .....	1
1.2 Die Gehirnentwicklung des Menschen .....	3
1.3 Die Phase des schnellen Hirnwachstum bei Mensch und Maus .....	6
1.4 Hyperoxie.....	8
1.5 Erythropoetin .....	12
1.6 Erythropoetin und Neuroprotektion .....	13
<b>2 ZENTRALE FRAGESTELLUNG</b>	<b>16</b>
<b>3 METHODIK</b>	<b>17</b>
3.1 Materialien .....	17
3.1.1 Chemikalien .....	17
3.1.2 Puffer und Lösungen .....	18
3.1.3 Antikörper .....	19
3.1.4 Laborgeräte, Verbrauchsmittel und Sonstiges .....	19
3.1.5 Software und Datenbanken.....	20
3.2 Methoden.....	21
3.2.1 Schematischer Überblick der Experimente .....	21
3.2.2 Tierschutzrichtlinien.....	22
3.2.3 Tierversuchsmodell .....	22

3.2.4	Narkoseeinleitung, Fixierung und Präparation .....	22
3.2.5	Kryoschnitte für Immunhistochemie .....	23
3.2.6	Immunhistochemische Färbung .....	23
3.2.7	Golgi-Cox-Färbung.....	24
3.2.8	Histologische Schnitte.....	25
3.2.9	Mikroskopie.....	26
3.2.10	Analyse mit ImageJ-Software .....	27
3.2.11	Statistische Auswertung .....	27
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>29</b>
4.1	Physiologische Parameter der Tiere.....	29
4.2	Immunhistochemische Analyse der Pyramidenzellen.....	29
4.2.1	Cux1 und DAPI bei P7 .....	30
4.2.2	Cux1 und DAPI bei P23 .....	30
4.3	Morphometrische Analyse des Dendritenbaums der Pyramidenzelle bei P23 .....	32
4.3.1	Einfluss von Hyperoxie und rEPO im cingulären Kortex .....	33
4.3.2	Einfluss von Hyperoxie und rEPO im motorischen Kortex .....	34
4.3.2.1	Motorischer Kortex – oberflächliche Schicht .....	34
4.3.2.2	Motorischer Kortex – tiefe Schicht.....	36
4.3.3	Einfluss von Hyperoxie und rEPO im sensorischen Kortex.....	38
4.3.3.1	Sensorischer Kortex – oberflächliche Schicht .....	39
4.3.3.2	Sensorischer Kortex – tiefe Schicht .....	41
4.4	Histologische Analyse der Synapsen der Pyramidenzelle für P23 .....	43
4.4.1	Einfluss von Hyperoxie und rEPO im motorischen Kortex .....	44
4.4.2	Einfluss von Hyperoxie und rEPO im sensorischen Kortex.....	44
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>46</b>
5.1	Allgemeine Betrachtung.....	46
5.2	Interpretation und Einordnung der Ergebnisse .....	51
5.2.1	Hyperoxie und rEPO haben keine Auswirkung auf die Anzahl von CUX1 <sup>+</sup> -Pyramidenzellen .....	51

5.2.2	Applikation von rEPO vermindert die hemmende Wirkung der Hyperoxie auf die Dendritogenese von Pyramidenzellen .....	55
5.2.3	Hyperoxie und rEPO haben keinen Einfluss auf die Synaptogenese von Pyramidenzellen .....	59

<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>63</b>
----------	-------------------------------------	-----------

**LITERATURVERZEICHNIS**

ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</b>	<b>90</b>
--	-------------------------------------	-----------

	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>91</b>
--	--------------------	-----------

	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>93</b>
--	-------------------	-----------

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µm .....	Mikrometer
ADHS.....	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung
AKT.....	Protein kinase B
AP-1.....	Activator protein 1
ASK .....	Apoptosis signal-regulating kinase
ASS .....	Autismus-Spektrum-Störung
Atg12 .....	autophagy related 12
Atg3 .....	autophagy related 3
Atg5 .....	autophagy related 5
Bcl.....	B-cell lymphoma
BDNF.....	Brain-derived neurotrophic factor
BPD .....	Bronchopulmonale Dysplasie
C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> .....	Saccharose
C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> .....	Ethylenglykol
CA1.....	cornu Ammonis 1
CUX1 .....	Cut like homeobox 1
DAPI .....	4',6-diamidino-2-phenylindole
dd-H <sub>2</sub> O.....	double-distilled water
DISC1.....	Disrupted in schizophrenia 1
DNA.....	Deoxyribonucleic acid
ELBW .....	extremely low birth weight
EPO .....	Erythropoetin
EPO-R.....	Erythropoetinrezeptor
ERK .....	extracellular signal-regulated kinase
FiO <sub>2</sub> .....	Fraction of inspired oxygen
FOXO3a .....	Forkhead box O3a
g. ....	Gramm
GA .....	Gestationsalter
GDNF .....	Glial cell-derived neurotrophic factor
GG .....	Geburtsgewicht
GSH.....	Glutathione

## Abkürzungsverzeichnis

---

GSSG	Glutathione disulfide
HIE	Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
HO-1	Heme oxygenase 1
Hz	Hertz
i.e.	id est
i.p.	intraperitoneal
IE	Internationale Einheit
IL-18	Interleukin 18
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 beta
ILCOR	International Liaison Committee on Resuscitation
IVH	intraventrikuläre Hämorrhagie
IZ	Intermediärzone
JAK2	Janus kinase 2
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm, Kilogramm
KG	Körpergewicht
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LBW	low birth weight
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDI	Mental Development Index
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MMP-2	matrix metalloproteinase-2
MMP-9	matrix metalloproteinase-9
mRNA	Siehe messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian target of rapamycin
MZ	Marginalzone
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid

## Abkürzungsverzeichnis

---

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
NEC.....	nekrotisierende Enterokolitis
NMDA.....	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS.....	Neuronal nitric oxide synthases
NRG1.....	Neuregulin 1
NRP1.....	Neuropilin 1
P.....	postnataler Tag
p.c.....	post conceptionem
p <sub>a</sub> O <sub>2</sub> .....	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS.....	phosphate-buffered saline
PI3K.....	Phosphoinositide 3-kinase
PVL.....	periventrikuläre Leukomalazie
PVP360.....	Polyvinylpyrrolidone average mol wt 360.000
rEPO.....	rekombinantes Erythropoetin
ROP.....	Retinopathia praematurorum
ROS.....	reaktive Sauerstoffspezies
SSW.....	Schwangerschaftswoche
STAT5.....	Signal transducer and activator of transcription 5
SVZ.....	Subventrikulärzone
SYP.....	Synaptophysin
TNF-α.....	Tumornekrosefaktor
v/v.....	volume per volume; Volumenprozent
VLBW.....	very low birth weight
VZ.....	Ventrikulärzone
w/v.....	weight per volume; Gewichtsprozent
WHO.....	Weltgesundheitsorganisation
ZNS.....	zentrales Nervensystem

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Embryologische Entwicklung des Neokortex nach dem inside-out-layering Prinzip. ....	6
Abbildung 1.2: Die Phase des schnellen Hirnwachstums beim Menschen und bei der Maus.....	8
Abbildung 1.3: Perinataler Anstieg von Sauerstoff. ....	12
Abbildung 3.1: Schematischer Überblick des Hyperoxie-Modells mit rEPO. ....	21
Abbildung 3.2: Schematischer Überblick der Versuche und Untersuchungen.....	21
Abbildung 4.1: Immunhistochemisch gefärbtes Maushirnpräparat .....	30
Abbildung 4.2: Verhältnis von CUX1 positiven Zellen zu allen Zellen (DAPI) bei P7 im sensorischen Kortex .....	31
Abbildung 4.3: Verhältnis von CUX1 positiven Zellen zu allen Zellen (DAPI) bei P23 im sensorischen Kortex .....	31
Abbildung 4.4: Golgi-Cox-Färbung eines Maushirnpräparats zur morphometrischen Untersuchung.....	32
Abbildung 4.5: Anzahl der Basal- und Apikaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma im cingulären Kortex.....	34
Abbildung 4.6: Anzahl der Basaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma in der oberflächlichen Schicht des motorischen Kortex.....	35
Abbildung 4.7: Anzahl der Apikaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma in der oberflächlichen Schicht des motorischen Kortex. ....	36
Abbildung 4.8: Anzahl der Basaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma in der tiefen Schicht des motorischen Kortex. ....	37
Abbildung 4.9: Anzahl der Apikaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma in der tiefen Schicht des motorischen Kortex .....	38
Abbildung 4.10: Anzahl der Basaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma in der oberflächlichen Schicht des sensorischen Kortex .....	39



Abbildung 4.11: Anzahl der Apikaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma in der oberflächlichen Schicht des sensorischen Kortex .....	40
Abbildung 4.12: Anzahl der Basaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma in der tiefen Schicht des sensorischen Kortex. ....	41
Abbildung 4.13: Anzahl der Apikaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma in der tiefen Schicht des sensorischen Kortex. ....	42
Abbildung 4.14: Golgi-Cox-Färbung eines Maushirnpräparats zur Untersuchung der Spines. ....	43
Abbildung 4.15: Synapsen pro $\mu\text{m}$ basaler Dendrit bei P23 im cingulären Kortex .....	44
Abbildung 4.16: Synapsen pro $\mu\text{m}$ basaler Dendrit bei P23 im motorischen Kortex. ....	45
Abbildung 4.17: Synapsen pro $\mu\text{m}$ basaler Dendrit bei P23 im sensorischen Kortex. ....	45

## **ABSTRACT (DEUTSCH)**

### **Einleitung:**

Frühgeborene Kinder haben ein deutlich erhöhtes Risiko für psychointellektuelle und kognitive Entwicklungsstörungen. Der massive Anstieg der O<sub>2</sub>-Konzentration durch die Frühgeburt führt zur relativen Hyperoxie, wodurch die frühe Gehirnentwicklung erheblich gestört werden kann. Für neurologische Entwicklungsstörungen bei Frühgeborenen existiert bislang keine erfolgreiche Therapie. Jedoch zeigte Erythropoetin (EPO) in jüngsten experimentellen Studien neuroprotektive Eigenschaften. Die Hypothese lautet, dass dendritisches und synaptisches Wachstum kortikaler Pyramidenzellen und die absolute Anzahl an Pyramidenzellen durch eine relative neonatale Hyperoxie vermindert wird, was durch die Anwendung von rEPO abgewehrt werden kann.

### **Methoden:**

Am fünften Lebenstag (P5) wurden gesunde C57BL/6-Mäuse in drei Gruppen eingeteilt: 1) Exposition von 80% O<sub>2</sub> über 48 h, 2) gleichzeitig zur Hyperoxie-Exposition 3 Injektionen mit jeweils 5000 I.E./kg KG rEPO s.c. (zu Beginn, nach 24 h und nach 48 h), 3) unbehandelte Kontrollgruppe. Um die dendritische Morphogenese und Anzahl der Spines der kortikalen Pyramidenzellen im cingulären und sensorischen Kortex zu analysieren, erfolgte an P23 die Imprägnierung der Gehirne mittels Golgi-Cox-Färbung und darauffolgend die histologische Aufarbeitung für die Sholl-Analyse und Zählung der Spines durch ImageJ Software. Für die Sholl-Analyse wurden 30 konzentrische Kreise im Abstand von 10 µm zentral um das Soma gelegt und die basalen und apikalen Dendriten ausgezählt. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden die Pyramidenzellen immunhistochemisch gefärbt und gezählt.

### **Ergebnisse:**

Hyperoxie führte im cingulären Kortex zu einer signifikanten Reduktion der dendritischen Verzweigung der Basaldendriten der Pyramidenzellen im Radius von 30 und 50 µm ( $p \leq 0,05$ ). Gleiches war im motorischen Kortex in oberflächlichen Kortexschichten im Radius von 20-80 µm ( $p \leq 0,05$ ) bei Basaldendriten, im Radius von 40 µm ( $p \leq 0,05$ ) bei Apikaldendriten und in tieferen Schichten von 30-110, 150, 180-190 µm ( $p \leq 0,05$ ) bei Basaldendriten und im Radius von 40-80 und 110-140 µm ( $p \leq 0,05$ ) bei Apikaldendriten zu sehen. Im sensorischen Kortex zeigte sich eine signifikante Verzweigungsreduktion in

oberflächlichen Schichten im Radius von 10-80  $\mu\text{m}$  ( $p \leq 0,05$ ) bei Basaldendriten, im Radius von 30-60  $\mu\text{m}$  ( $p \leq 0,05$ ) bei Apikaldendriten und in tieferen Schichten von 10-90 und 110  $\mu\text{m}$  ( $p \leq 0,05$ ) bei Basaldendriten und von 90 und 190-200  $\mu\text{m}$  ( $p \leq 0,05$ ) bei Apikaldendriten. Die mit rEPO behandelten Pyramidenzellen zeigten in allen untersuchten Kortexbereichen selektiv eine Normalisierung der dendritischen Verzweigung. In der absoluten Zahl von Pyramidenzellen und der Anzahl der Synapsen waren keine Unterschiede unter den Gruppen nachweisbar.

**Diskussion:**

Neonatale Hyperoxie führt zur signifikanten Hemmung des dendritischen Wachstums der kortikalen Pyramidenzellen im cingulären und sensorischen Kortex. Die Applikation von rEPO verhindert die Schädigung der Dendritogenese, was den Stellenwert von EPO zur Neuroprotektion bei Frühgeborenen bestärkt

## **ABSTRACT (ENGLISH)**

### **Introduction**

Premature infants have a significantly increased risk for neurological and developmental disorders. Massive increase in O<sub>2</sub> concentration due to preterm birth leads to relative hyperoxia, which can disrupt early brain development. To date, no successful therapy exists for neurodevelopmental disorders in preterm infants. However, erythropoietin (EPO) has shown neuroprotective effects in recent experimental studies. The hypothesis is that dendritic and synaptic growth of cortical pyramidal cells and their absolute cell number is reduced by neonatal hyperoxia, which can be averted by application of rEPO.

### **Methods:**

Five day old healthy C57BL/6 mice were divided into three groups: 1) exposure to 80% O<sub>2</sub> for 48 h, 2) concurrent to hyperoxia exposure, 3 injections of 5000 I.U./kg bw rEPO s.c. (at baseline, after 24 and after 48 h), 3) untreated control group. To analyze dendritic morphogenesis and number of spines of cortical pyramidal cells in cingulate and sensorimotor cortex, impregnation of brains by Golgi-Cox staining was performed at P23, followed by histological processing for Sholl analysis and counting of spines by ImageJ software. For Sholl analysis, 30 concentric circles were placed 10  $\mu$ m apart centrally around the soma and the basal and apical dendrites were counted. Pyramidal cells were immunohistochemically stained and counted to determine cell number.

### **Results:**

Hyperoxia resulted in significant reduction of dendritic branching of basal dendrites of pyramidal cells in the radius of 30 and 50  $\mu$ m ( $p \leq 0.05$ ) in cingulate cortex. The same was seen in motor cortex in superficial cortex layers in the radius of 20-80  $\mu$ m ( $p \leq 0.05$ ) for basal dendrites, of 40  $\mu$ m ( $p \leq 0.05$ ) for apical dendrites and in deeper layers of 30-110, 150, 180-190  $\mu$ m ( $p \leq 0.05$ ) for basal dendrites and of 40-80 and 110-140  $\mu$ m ( $p \leq 0.05$ ) for apical dendrites. In the sensory cortex, significant branching reduction was seen in superficial layers at the radius of 10-80  $\mu$ m ( $p \leq 0.05$ ) for basal dendrites, of 30-60  $\mu$ m ( $p \leq 0.05$ ) for apical dendrites, and in deeper layers of 10-90 and 110  $\mu$ m ( $p \leq 0.05$ ) for basal dendrites and from 90 and 190-200  $\mu$ m ( $p \leq 0.05$ ) for apical dendrites. Pyramidal cells treated with rEPO selectively showed normalization of dendritic branching in all cortex

areas examined. No differences were detectable in the absolute number of pyramidal cells and the number of synapses.

**Discussion:**

Neonatal hyperoxia leads to significant inhibition of dendritic growth of cortical pyramidal cells in the cingulate and sensorimotor cortex. Application of rEPO prevents damage to dendritogenesis, reinforcing the value of EPO for neuroprotection in preterm infant.



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Frühgeburtlichkeit

Die Frühgeburt, nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert als eine Geburt vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW) bzw. vor Erreichen eines Gestationsalters (GA) von 259 Tagen nach dem ersten Tag der letzten Menstruationsblutung der Mutter, stellt heute weltweit eine der Hauptursachen für Mortalität und Morbidität im Säuglings-, Kinder- und Jugendalter dar.<sup>1-4</sup> Durch intensive Forschung in der Perinatalmedizin und stetiger Verbesserung der medizinischen Versorgung konnte nicht nur das Gestationsalter als Grenze der Lebensfähigkeit von Frühgeborenen gesenkt, sondern auch die Überlebenswahrscheinlichkeit und das Langzeit-Outcome insgesamt deutlich verbessert werden.<sup>5-10</sup> Durch diesen kontinuierlichen Fortschritt in der Versorgung Neu- und Frühgeborener können heute sogar Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht (GG) unter 500 Gramm überleben. Da die Risiken für eine schwere Schädigung unreifer Organe und für Mortalität in hohem Maße mit niedrigem Geburtsgewicht korrelieren ist die klinische Einteilung von Neugeborenen anhand ihres Geburtsgewichts in die drei Kategorien *low birth weight* (LBW, GG <2.500 g), *very low birth weight* (VLBW, GG <1.500 g) und *extremely low birth weight* (ELBW, GG <1.000 g) weltweit übliche Praxis.<sup>11,12</sup>

Allen Fortschritten zum Trotz geht die gesunkene Mortalität mit einer erhöhten Morbidität einher, besonders bei den extrem unreifen Frühchen.<sup>12-16</sup> In Deutschland sind heute immer noch ungefähr 75% der perinatalen Mortalität und mehr als 50% der neurologischen Langzeitmorbidität frühgeburtsassoziiert.<sup>17</sup> Deutschland hat im europäischen Vergleich zudem die höchste Frühgeburtenrate mit 8,7 % im Jahr 2013 und damit jährlich ungefähr 60.000 Frühgeburten.<sup>17</sup> Weltweit kamen im Jahre 2014 10,6 % aller Lebendgeborenen, also ca. 15 Millionen Säuglinge, zu früh auf die Welt.<sup>11</sup> 2016 war Frühgeburtlichkeit mit 18% weltweit die häufigste Todesursache für Kinder unter 5 Jahren (ca. 1 Million absolut).<sup>18</sup> Die Zahlen verdeutlichen die Relevanz dieses Problems, sowohl im Hinblick auf sozioökonomische Aspekte als auch auf die enormen emotionalen Belastungen, denen Betroffene und Angehörige ausgesetzt sind.<sup>19-21</sup>

Zu den häufigsten langfristigen Beeinträchtigungen Frühgeborener zählen sowohl motorische als auch psychoneurologische Entwicklungsstörungen. Zahlreiche

Nachuntersuchungsergebnisse aus epidemiologischen Studien belegen, dass extrem unreife Frühgeborene ein deutlich höheres Risiko für psychointellektuelle und kognitive Entwicklungsstörungen einschließlich Autismus-Spektrum-Störung (ASS), Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS), mentale Retardierung, Depressionen und Schizophrenie haben.<sup>22–28</sup> Da dieses Risiko, neben dem GA und GG, von zahlreichen weiteren Faktoren abhängig ist, findet man je nach Studie unterschiedlich hohe Zahlen über die Inzidenz psychoneurologischer Entwicklungsstörungen.<sup>16</sup> Unbestritten ist jedoch die enge Korrelation zum GA. So zeigen mehrere große Kohortenstudien aus verschiedenen Industrienationen, dass das Risiko sowohl für akute Komplikationen als auch für neurologische Entwicklungsstörungen mit vermindertem GA steigt.<sup>8, 13, 29–34</sup>

Als wesentliche Auslöser für die Genese dieser Erkrankungen vermutet man neben genetischen Faktoren auch noch in der Prä- und Perinatalperiode entstandene Störungen der Neurogenese.<sup>35, 36</sup> Dazu zählen als Ursache neben maternaler Mangelernährung auch prä-, peri- und postpartale Komplikationen, wie z.B. Plazentainsuffizienz, (Prä-)Eklampsie, Infektion oder ischämisch-hämorrhagische Insulte. Schwangerschaftsbedingte Komplikationen stellen wiederum ein hohes Risiko für eine Frühgeburt dar.<sup>3, 37, 38</sup> Kommt es zu einer Frühgeburt, so wird der Fetus in eine für seine weitere Entwicklung unphysiologische Umgebung *ex utero* versetzt. Zudem bedingt eine zunehmende Unreife der Organe ein erhöhtes Risiko einer unzureichenden postnatalen Anpassung, insbesondere von Kreislauf, Atmung, Stoffwechsel und Thermoregulation. Hierdurch steigt wiederum das Risiko für Hypo- und Hypertension, Ischämie, Hypoxie, Azidose u.a., bekannte und wichtige Faktoren, die über Inflammation und ischämisch-hämorrhagische Insulte zu einem Hirnschaden führen können.<sup>39</sup> Dieser pathogenetische Mechanismus ist klinisch und experimentell belegt.<sup>40–42</sup> Das Frühgeborene reagiert jedoch auch auf Noxen aus der Umwelt besonders vulnerabel. So ist bekannt, dass zu hohe Sauerstoffkonzentrationen schädigend auf Retina und Lunge wirken.<sup>43, 44</sup> Zuletzt deuten außerdem einige klinische und experimentelle Studien darauf hin, dass der geburtsbedingte drastische Anstieg des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks mit dem Ergebnis einer neonatalen Hyperoxie auch eine schädigende Wirkung auf das unreife Gehirn haben könnte.<sup>45</sup>



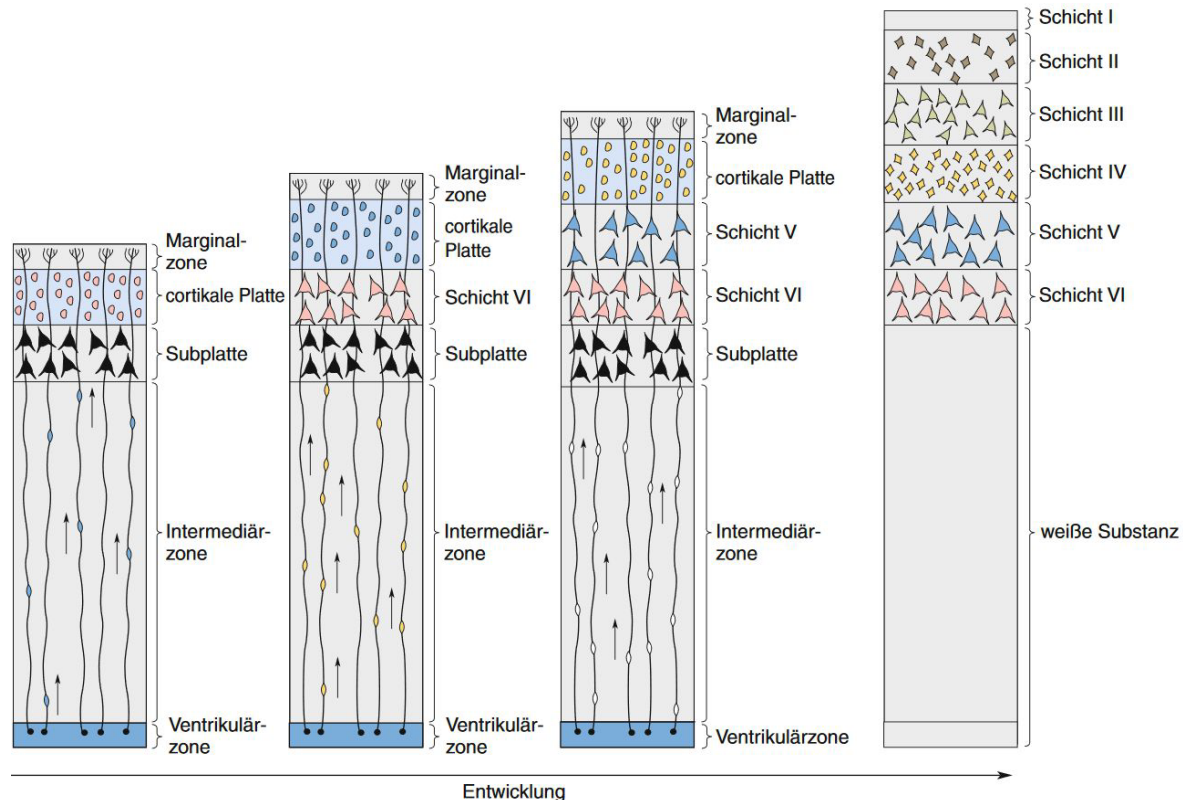
### 1.2 Die Gehirnentwicklung des Menschen

Die primäre Neurulation und damit Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) beginnt beim Menschen ab dem 16. Tag *post conceptionem* (p.c.).<sup>46, 47</sup> Aus dem Ektoderm entsteht unter Einfluss von Faktoren das Neuroepithel, das über die Neuralplatte, Neuralrinne und schließlich über die Fusion der beiden Neuralleisten in der Mittellinie zum Verschluss der Neuralrinne und zur Bildung des Neuralrohrs führt.<sup>48</sup> Durch intensive symmetrische Proliferation ab der 3. – 4. Woche breiten sich die Neuroepithelzellen nach lateral und radial weiter aus und bilden die Ventrikulärzone (VZ, später Ependym). Parallel dazu teilen sich die ersten Neuroepithelzellen im Rahmen eines ersten Differenzierungsprozesses in Radialgliazellen.<sup>49</sup> Diese Zellen sind nicht nur Vorläuferzellen, aus denen die meisten Neuronen und Gliazellen des ZNS hervorgehen, sie durchspannen mit ihren länglichen Zellfortsätzen die gesamte Wand des Neuralrohrs und bilden damit als Leitgerüst für die folgenden Neurone die Grundlage der Zellmigration.<sup>50, 51</sup> Die Radialgliazellen sind ebenfalls zur symmetrischen Zellteilung fähig, proliferieren jedoch im Sinne der Neurogenese überwiegend asymmetrisch.<sup>49</sup> Demnach bleibt nach der Mitose eine Tochterzelle als Radialgliazelle erhalten und teilungsfähig. Aus der anderen Tochterzelle jedoch geht entweder ein postmitotisches Neuron (direkte Neurogenese) hervor, oder, viel häufiger, eine intermediäre Vorläuferzelle (indirekte Neurogenese), die wiederum zu (a-)symmetrischen Zellteilungen fähig ist und postmitotische Neurone produziert.<sup>49</sup> Dabei kommt es aufgrund der unterschiedlichen mitotischen Aktivität zu lokalen morphologischen Veränderungen des kranialen Neuralrohrs aus denen die Anlage für das Prosencephalon, Mesencephalon, Rhombencephalon und Rückenmark hervorgehen.<sup>48</sup> Zu den früh produzierten Neuronen gehören vor allem die horizontal ausgerichteten bipolaren Cajal-Retzius Zellen, die entlang der Radialgliazellen aus der VZ auswandern und die subpial liegende Marginalzone (MZ) bilden (5. Woche).<sup>49</sup> Sobald ein Neuron produziert wurde, migriert es zu seinem Zielort. Gegen Ende der 6. Woche entsteht zusätzlich die über der VZ (extrem zell dicht) liegende Subventrikulärzone (SVZ, weniger zell dicht), in der zusammen mit der VZ weiterhin Proliferation stattfindet.<sup>48</sup> Ab der 6 – 7. Woche beginnt daher auch die eigentliche Migration.<sup>48, 52</sup> Die ersten migrierenden Zellen bilden bei ihrer Wanderung zunächst die zwischen SVZ und MZ liegende Intermediärzone (IZ) (später weiße Substanz). Auf ihrer Wanderung gelangen die Zellen dabei in die dahinter liegende Subplatte.<sup>48, 50</sup> Die im Folgenden migrierenden Zellen durchqueren die Subplatte und

bilden die noch vor der Marginalzone liegende kortikale Platte (später graue Substanz).<sup>50</sup> Die hier eingewanderten Zellen bilden nach Differenzierung und Reifung die Schicht VI. Die nächsten Zellen durchqueren wiederum die Schicht VI und bilden vor der Marginalzone erneut eine kortikale Platte, aus der die nächste Schicht V entsteht. Nach diesem Prinzip entstehen am Ende sechs Schichten, wobei Schicht I die Marginalzone mit Cajal-Retzius Neuronen darstellt, welche das Reelin-Protein produzieren, das als Stoppsignal für neu eingewanderte Zellen darstellt. Dieses Phänomen bezeichnet man als *inside-out-layering*. Mit einem Höhepunkt von der 12. bis 24. Woche ist die Migration ab der 26. – 29. Woche weitestgehend abgeschlossen.<sup>46, 49, 50, 53–55</sup> Die Neurogenese selbst hat seinen Höhepunkt vom 2. – 3. Monat mit bis zu 250.000 Neurone pro Minute und gilt zum größten Teil nach 5 Monaten als abgeschlossen.<sup>46, 56</sup> Nach der Neurogenese beginnen die Radialgliazellen erst die eigentliche Gliogenese.<sup>49</sup> Ein weiterer entscheidender Schritt in der Gehirnentwicklung ist die Differenzierung. Differenzierung ist ein Prozess bei dem unter Einfluss von Hormonen, Zellkontakten und Herkunft ein bestimmtes räumlich-zeitliches Muster der Genexpression abläuft. Die erste strukturelle und funktionelle Spezialisierung von Zellen beginnt bereits unmittelbar nach Mitose der neuroepithelialen Stammzellen. Eine weitere Differenzierung erfolgt, sobald eine Zelle das Ziel ihrer Migration in der kortikalen Platte erreicht hat. So sind Pyramidenzellen der Schichten V und VI als solche bereits erkennbar, bevor die Zellen der Schicht II eingewandert sind.<sup>50</sup> Um die 30. – 32. Woche herum sind alle sechs Schichten als solche differenziert erkennbar.<sup>52, 57</sup> Nach der Differenzierung der Neurone, erfolgt die der Astrozyten, die ihren Höhepunkt um die Geburt erreicht, und als letztes die der Oligodendrozyten.<sup>50</sup> Der nächste wichtige Schritt ist die Dendrito- und Axonogenese des apolaren Neuroblasten im Rahmen der Reifung. Dieser Schritt ermöglicht erst die Kommunikation mit anderen Neuronen und die damit einhergehende Integration des Neurons in das adäquate neuronale Netzwerk.<sup>53</sup> Zu Beginn sind Dendriten und Axon nicht voneinander zu unterscheiden und werden kollektiv als Neuriten bezeichnet. Jeder Neurit besitzt an seiner Spitze einen Wachstumskegel, der über sein Zytoskelett, seine Lamellipodien und Filopodien, darauf spezialisiert ist, den richtigen Weg für die Verlängerung zu finden. Dabei erfolgt ein Wachstum nur, wenn in der extrazellulären Matrix die richtigen Faserproteine gefunden werden. Die Axone bilden zusätzliche Zelladhäsionsmoleküle aus, die sie aneinanderbindet und für ein synchrones Wachstum sorgt. Wenn ein Wachstumskegel sein Ziel erreicht hat, kommt es über eine proteingesteuerte Wechselwirkung von Wachstumskegel und Zielmembran zur

Ausbildung synaptischer Strukturen (Synaptogenese).<sup>50, 53</sup> Die Synaptogenese beginnt um die 20. Woche und erreicht seinen Höhepunkt zwischen dem ersten und zweiten Lebensjahr.<sup>54, 58</sup> Bis zum zweiten Lebensjahr findet eine Überproduktion sowohl von Synapsen als auch von Neuronen statt. Bereits pränatal beginnend erfolgt anschließend bis ins späte Jugendalter eine Reduktion der Synapsen um bis zu 50%, wohingegen eine ähnlich hohe Rate an Neuronen bereits pränatal mit Beginn der Reifung durch Apoptose eliminiert wird. Dieser Prozess gilt für die erfolgreiche Integration der Nervenzellen in ihr adäquates neuronales Netzwerk, was unter anderem mit Lernprozessen in Verbindung steht, als obligat.<sup>49, 52, 53, 56, 58, 59</sup> Als letzter Reifeprozess des Gehirns erfolgt ab der 32. Woche bis ins Erwachsenenalter die Myelinisierung durch Oligodendrozyten mit einem Höhepunkt bei 6 Monaten bis 2 Jahre.<sup>49, 53, 58</sup> All diese Prozesse (Proliferation, Migration, Differenzierung, Reifung, Synaptogenese, Apoptose, Myelinisierung) werden auch von der Pyramidenzelle und ihren Vorläuferzellen durchlaufen. Die Pyramidenzellen stellen eine essentielle Neuronenklasse im zerebralen Kortex, des Hippocampus und der Amygdala dar.<sup>50</sup> Sie sind die einzigen Projektionsneurone, die über ihr langes Axon sowohl benachbarte als auch weit entferntere Gebiete sowie das Rückenmark erreichen können.<sup>60-62</sup> Als Neurotransmitter nutzen sie Glutamat.<sup>57</sup> Organisiert in dichten Säulen zeigen die pyramidenförmigen Neuronen eine sehr ausgeprägte Polarität mit einem lang verzweigten Dendriten aus dem Apex (Apikaldendrit) orthogonal zur Oberfläche. Aus der Zellbasis entspringen seitlich mehrere sich verzweigende Dendriten (Basaldendriten) und mittig ein orthogonal zur weißen Substanz laufendes und sich ebenfalls verzweigendes langes Axon als einzige Efferenz.<sup>60-63</sup> Die Gesamtheit der Dendriten einer Pyramidenzelle wird wegen ihrer morphologischen Assoziation auch als Dendritenbaum bezeichnet. Mit einem Anteil von 75% bis 80% aller Neuronen im zerebralen Kortex repräsentieren die Pyramidenzellen dort die bedeutendsten exzitatorischen Nervenzellen.<sup>57</sup> Folglich sind pathologische Veränderungen in Morphologie und Funktion mit vielen verschiedenen neurologischen Krankheiten und Entwicklungsstörungen assoziiert, i.e. ASS und damit verwandte Störungen (Rett-Syndrom, Fragile-X-Syndrom, tuberöse Sklerose, u.a.) und ADHS, aber auch Schizophrenie, Demenz-Erkrankungen, Depressionen u.v.m. Insbesondere spielen Veränderungen im Dendritenbaum und den darauf befindlichen postsynaptischen Endigungen eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der genannten Erkrankungen.<sup>64,65</sup> Physiologisch sind die Pyramidenzellen besonders hervorzuheben in ihrer Funktion im *tractus corticospinalis*, über die die gesamte quergestreifte Muskulatur innerviert wird und im präfrontalen

Kortex, welcher für höhere kognitive Fähigkeiten verantwortlich ist und die Verarbeitung von Informationen aus verschiedenen Hirnarealen ermöglicht.<sup>50, 66</sup>



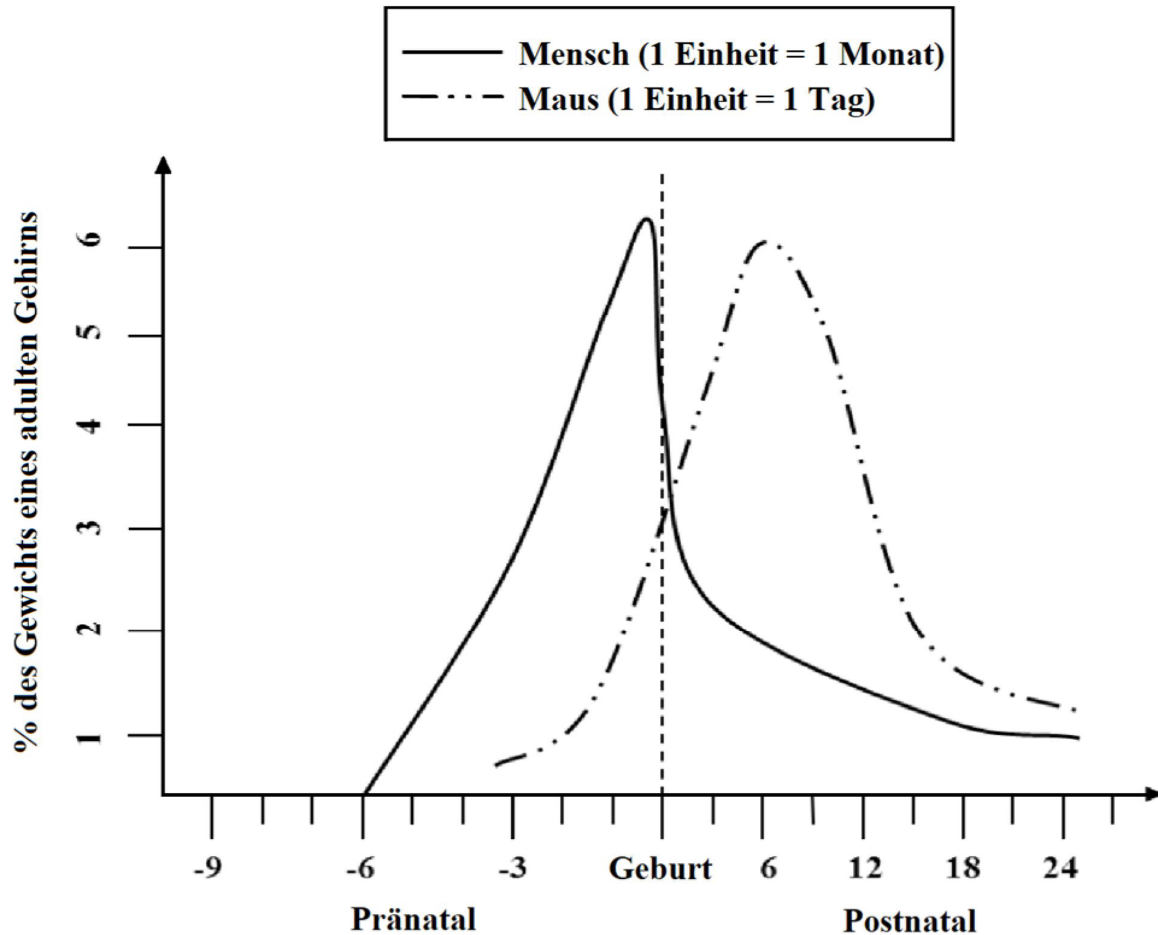
**Abbildung 1.1:** Embryologische Entwicklung des Neokortex nach dem inside-out-layering Prinzip. Die in der Ventrikulärzone neu entstandenen Zellen migrieren nach apikal durch die Intermediärzone und Subplatte bis zur kortikalen Platte, um hier eine neue Kortexschicht zu bilden. Die danach migrierenden Zellen durchwandern die neu entstandene Schicht, um in der dahinter apikal liegenden kortikalen Platte eine neue Kortexschicht zu bilden. Nach diesem Prinzip entstehen die Schichten II – VI. Schicht I ist die Marginalzone mit Cajal-Retzius Zellen. Intermediärzone und Subplatte werden zur weißen Substanz.

### 1.3 Die Phase des schnellen Hirnwachstum bei Mensch und Maus

Die pränatale Entwicklung des menschlichen Gehirns ist ein hoch komplexer Prozess mit mehreren zum Teil parallel ablaufenden Entwicklungsschritten, bei der jeder für sich eine wesentliche Rolle für die weitere Entwicklung und für die Ausbildung physiologischer Funktionen des adulten Gehirns einnimmt. Eine weitere Besonderheit stellt die Wachstumsdynamik des Gehirns während seiner Entwicklung dar: Das stärkste Wachstum findet im dritten Trimenon statt, und die größte Wachstumsrate wird um den Zeitpunkt der Geburt erreicht (Siehe Abbildung 2).<sup>67</sup> Um die 20. Woche p.c. hat das Gehirn 10%, um die 34. Woche etwa 65% des Gewichts eines reifen Feten der 40. Woche erreicht.<sup>67</sup> Um die 34. Woche liegt das Gewicht bei 65% eines reifen Gehirns.<sup>68</sup> Auch die

graue Substanz gewinnt von der 29. – 41. Woche das Vierfache an Volumen.<sup>69</sup> Das kortikale Volumen selbst entspricht in der 28. Woche nur zu 13% und zu 53% in der 34. Woche dem eines reifen Feten.<sup>69</sup> In der weißen Substanz kann man zwischen der 35. und 41. Woche ein Anstieg des myelinisierten Volumens um das Fünffache beobachten.<sup>69</sup> Das bedeutet also, dass mehr als die Hälfte der Gehirnmasse, des kortikalen Volumens und des Anteils myelinisierter weißer Substanz erst im 3. Trimenon erlangt wird. Aus diesem Grund wird diese Phase mit dieser enormen Wachstumsrate als eine sehr vulnerable Zeit in der Gehirnentwicklung betrachtet.<sup>68</sup> Im Alter von 2 – 3 Jahren sind 90% – 95% des adulten Hirngewichts erreicht.<sup>58</sup> Ursächlich für dieses ausgeprägte Wachstum sind sowohl umfangreiche Differenzierungs- und Reifungsprozesse der Nerven- und Gliazellen, insbesondere die Dendrito- und Axonogenese, als auch die erst um die 32. Woche einsetzende Myelinisierung in der weißen Substanz. Zudem erleben die Gliazellen um den Zeitpunkt der termingerechten Geburt einen Höhepunkt in ihrer Proliferation, genauso wie die überschießende Synaptogenese durch die Neuronen und die Gyrierung des zerebralen Kortexes.<sup>68, 70–72</sup> Dieses Wachstum, wie auch die im vorangehenden Kapitel genannten Entwicklungsschritte, finden bei verschiedenen Spezies zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt.<sup>71, 73</sup> Jedoch sind zentrale Vorgänge der pränatalen Entwicklung des Kortex innerhalb der Klasse der Säugetiere konserviert geblieben.<sup>58, 74, 75</sup> Ein häufig verwendetes *in vivo* Tiermodell für neurobiologische Experimente und für die Erforschung der Entwicklung des zentralen Nervensystems ist die Maus. Grund dafür ist, dass die Phase der neuronalen Differenzierung und Reifung, wie auch die darauffolgenden Entwicklungsschritte, erst postnatal erfolgt.<sup>58</sup> So konnte anhand der Reifung der Oligodendrozyten gezeigt werden, dass der Entwicklungsstand der weißen Substanz und des axonalen Wachstums bei Nagetieren im postnatalen Alter von ein bis drei Tagen (P1 – P3) ungefähr dem Niveau eines Menschen um die 23. – 32. Woche entspricht. Analog dazu korreliert ein Alter von P7 ungefähr mit der 32. – 36. Woche und erst bei P10 ein Entwicklungsstand vergleichbar mit dem eines reifen Feten erreicht ist, zumindest was die weiße Substanz betrifft.<sup>58</sup> Die Myelinisierung ist bei P10 – P14 bereits angelaufen und erreicht ein Höhepunkt bei P20.<sup>58</sup> Die größte Hirnwachstumsrate wird ebenfalls um P7 – P10 erst postnatal erreicht (siehe Abbildung 2).<sup>58</sup> Ein weiterer Aspekt, der die Maus zu einem geeigneten Tiermodell für dieses und andere neurobiologische Experimente macht, liegt darin, dass alle anderen lebensnotwendigen Organe zum Zeitpunkt der Geburt weitestgehend ausgereift sind. Dadurch ist das Risiko für mögliche Störfaktoren, die durch kranke oder unreife Organe

bedingt sein könnten, gering und Versuchsergebnisse am Gehirn erlauben direkte Schlussfolgerungen.



**Abbildung 1.2:** Die Phase des schnellen Hirnwachstums beim Menschen und bei der Maus  
Die Phase des schnellen Hirnwachstums erreicht beim Menschen seinen Höhepunkt um die Geburt. Bei der Maus wird dieser Gipfel erst postnatal erreicht. Modifiziert nach Dobbing und Sands (1979).

## 1.4 Hyperoxie

Eine mögliche Definition von Hyperoxie könnte lauten: Ein über das physiologische Maß erhöhter Sauerstoffgehalt der Körpergewebe infolge einer Hyperoxämie aufgrund eines erhöhten Sauerstoffpartialdrucks in der Atemluft. In der medizinischen Praxis ist Sauerstoff eines der am häufigsten eingesetzten Medikamente in der Behandlung schwer kranker Patienten und gehört zur Standardmedikation in der akuten Schocktherapie und Notfallmedizin.<sup>76</sup> Um eine ausreichende Oxygenierung zu gewährleisten, übersteigt die auch heutzutage noch großzügige, liberale Anwendung von Sauerstoff häufig physiologische Werte.<sup>76-78</sup> Die wesentlichen Mechanismen von Sauerstofftoxizität sind

bekannt, jedoch sind sich viele über den schädlichen Effekt durch Hyperoxie nicht bewusst.<sup>76, 77</sup> Die aktuelle klinische Studienlage belegt hingegen eine klare Korrelation zwischen Hyperoxie und einer erhöhten Mortalität und Morbidität, insbesondere bei Früh- und Neugeborenen.<sup>76, 77, 79–82</sup> Aus diesem Grund rückten sowohl die WHO im Jahre 1998, als auch die *International Liaison Committee on Resuscitation* (ILCOR) im Jahre 2005/6, von ihrer Empfehlung ab, für die Wiederbelebung Neugeborener 100% O<sub>2</sub> einzusetzen, und erklärten stattdessen, dass Raumluft mindestens ebenso effektiv, wenn nicht überlegen ist.<sup>83, 84</sup>

Eine der Ursachen für den schädigenden Effekt von Hyperoxie liegt in der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), vereinfacht Sauerstoffradikale.<sup>76–80</sup> Radikale sind Moleküle mit mindestens einem ungepaarten Valenzelektron, welche besonders reaktionsaktiv exergonische Reaktionen mit anderen Molekülen eingehen, um einen thermodynamisch günstigeren Zustand einzunehmen. Bei Sauerstoffradikalen handelt es sich um reaktive Sauerstoffverbindungen, die durch physiologische Prozesse (z.B. Zellatmung, Immunabwehr u.a.) in niedriger Konzentration im Körper vorhanden und für die Gesundheit erforderlich sind.<sup>76, 85</sup> Aus einer pathologisch erhöhten Konzentration von ROS durch Hyperoxie resultiert jedoch eine als oxidativer Stress bezeichnete Stoffwechsellage, bei der die zelleigenen antioxidativen Schutzsysteme nicht ausreichen und es folglich zu Schädigungen zellulärer Strukturen kommt. Grund dafür ist, dass ROS mit nahezu allen Molekülen in der Zelle reagieren können, insbesondere DNA, Proteine und Lipide. Diese werden dabei strukturell verändert und können dadurch ihre Funktion verlieren. Besonders folgenreich ist die durch ROS verursachte DNA-Oxidation, da hierdurch das Risiko für Mutationen und Malignome steigt. Durch ROS oxidierte Proteine, auch Carbonylproteine genannt, können unlösliche und funktionslose Proteinaggregate bilden, die auch als Ursache für verschiedene neurodegenerative Erkrankungen bekannt sind. Bei der Oxidation von Lipiden (Lipidperoxidation) kommt es zu einer radikalischen Kettenreaktion, bei der die Zellmembran und ggf. die Zellintegrität geschädigt wird. Diese Schädigungen beeinflussen nicht nur wichtige Signalkaskaden, sondern führen mitunter zur Einleitung von Apoptose.<sup>44, 76, 78, 86–88</sup>

Die relative Hyperoxie für ein Neugeborenes ist dem Umstand geschuldet, dass es durch die Geburt zu einem drastischen Anstieg des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (p<sub>a</sub>O<sub>2</sub>) kommt. Ein Fetus hält intrauterin einen p<sub>a</sub>O<sub>2</sub> von ca. 25 – 35 mmHg. Nach der Geburt steigt dieser Wert ohne zusätzliche Beatmung um ein Vielfaches auf ungefähr 65 – 80 mmHg an.<sup>89–91</sup> Bei zusätzlich beatmeten Frühchen, was aufgrund der zusätzlichen

Unreife der Lunge häufig vorkommt, verschärft sich die pathophysiologische relative Hyperoxie mitunter noch. Bei einem reifen Neugeborenen führt diese relative Hyperoxie zu einem Anstieg von ROS mit der Folge einer verbesserten neonatalen Anpassung und Reifeinduktion der antioxidativen Schutzsysteme durch bspw. eine verstärkte Synthese antioxidativer Enzyme.<sup>44, 79</sup> Mit zunehmender Unreife des Neugeborenen tritt diese Reaktion nicht oder nur eingeschränkt ein. Grund dafür ist, dass die antioxidativen Schutzsysteme erst im dritten Trimenon entstehen und reifen, sodass das Frühgeborene mit einer erschwerten postnatalen Adaptation und eingeschränkter Fähigkeit ROS zu detoxifizieren konfrontiert wird.<sup>44, 88, 92, 93</sup>

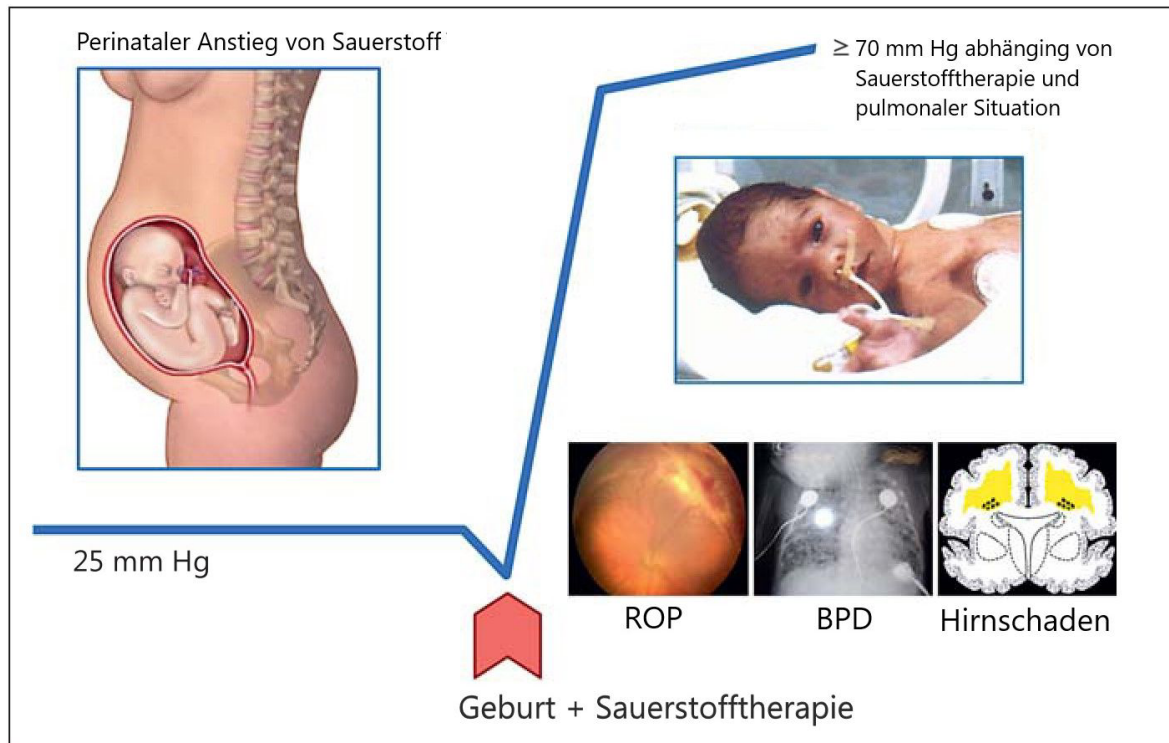
Berücksichtigt man, neben der relativen Hyperoxie und den unreifen antioxidativen Schutzsystemen,<sup>94</sup> die Unreife des Organismus, so erklärt sich die hohe Vulnerabilität Frühgeborener gegenüber Sauerstoff. Daten aus klinischen Studien zeigen, dass Hyperoxie dabei insbesondere mit der Pathogenese der Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD), Retinopathia praematurorum (ROP), Periventrikulären Leukomalazie (PVL), Nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) und einem schlechten neurologischen Outcome in direktem Zusammenhang steht.<sup>43, 81, 82, 95–100</sup> Je geringer das GA und je unreifer das Neugeborene zur Welt kommt, desto höher ist auch die Inzidenz dieser pathologischen Erscheinungen. Daraus etablierte sich der Ausdruck *oxygen radical disease of prematurity*.<sup>101</sup> Im klinischen Umgang mit Sauerstoff bei Frühgeborenen gibt es bis heute noch wenig wissenschaftlichen Konsens. So ist im Hinblick auf die Mortalität und Morbidität Frühgeborener unklar, ob zur Wiederbelebung initial eine höhere ( $\text{FiO}_2 \geq 0,4$ ) oder niedrigere ( $\text{FiO}_2 < 0,4$ ) Sauerstoffkonzentration gewählt werden sollte, um eine gewünschte Sauerstoffsättigung zu erreichen.<sup>102</sup> Bei der Festlegung der optimalen Sauerstoffsättigungsgrenzen für Frühgeborene konnte zumindest gezeigt werden, dass eine niedrigere Sättigung (85% – 89%) mit einem höheren Mortalitätsrisiko assoziiert ist als eine höhere (91% – 95%).<sup>103, 104</sup>

Das ZNS reagiert besonders empfindlich auf Hyperoxie. Zelldegeneration, Inflammation sowie Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene mit Langzeitschäden konnten mehrfach in experimentellen Studien am Tiermodell gezeigt werden.<sup>45, 105–109</sup> So verursachte Hyperoxie bei neugeborenen Ratten über weite Teile des unreifen Gehirns eine signifikant erhöhte Zelldegeneration.<sup>109, 110</sup> Weiterhin konnte eine Vielzahl struktureller und funktioneller Veränderungen an pro-inflammatorischen Mediatoren, Matrix-Metalloproteasen, Autophagie relevanten Genen und ZNS-spezifischen Proteinen nachgewiesen werden, unter anderem auch an Proteinen, die



dem antioxidativem Schutzsystem angehören, wie z.B. Glutathion.<sup>95, 111–113</sup> Ein weiterer relevanter Befund ist die Schädigung der weißen Substanz und der Myelinisierung durch Hyperoxie, mit gesteigerter Apoptose von Oligodendrozyten(-vorläuferzellen) und ultrastrukturelle Schäden der Myelinscheiden. Es kommt dabei zu einer dauerhaften Schädigung der frühen Entwicklung der weißen Substanz mit beeinträchtigten Leitungseigenschaften und gestörter Integrität.<sup>105, 106, 114–116</sup> Die Folgen dieser Schädigung waren auch in einem einfachen und komplexen Laufradtest mit Mäusen zu dokumentieren, die darin ein hyperaktives Verhalten und Defizite in der motorischen Koordination offenbarten.<sup>117</sup> Diese Beobachtung könnte darauf deuten, dass neonatale Hyperoxie im unreifen Gehirn unter anderem eine wichtige Rolle in der Pathogenese des ADHS ehemals frühgeborener Kinder spielt. Bei Hyperoxie-exponierten Ratten wurden zudem Veränderungen im Gyrus dentatus des Hippocampus und Defizite der Gedächtnisfunktion zusammen mit einer verminderten synaptischen Plastizität nachgewiesen, passend zu Symptomen bei Kindern mit Autismus-Spektrum-Störung.<sup>109, 118–120</sup> Auch auf das Kleinhirn scheint Hyperoxie einen schädigenden Effekt zu haben. So wurde im Kleinhirn der Ratte eine verminderte Proliferation der Vorläuferzellpopulation für Körnerzellen und Dendritenschädigung von Purkinjezellen gefunden, die zu langfristigen Veränderungen führten.<sup>121</sup> Darüber hinaus konnte eine veränderte Genexpression in zerebellären Astrozyten und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen gezeigt werde.<sup>122</sup>

Diese experimentellen Untersuchungsergebnisse verdeutlichen die Spannbreite an schädlichen Effekten, die durch Sauerstofftoxizität auf zellulärer Ebene und in der Hirnentwicklung ausgelöst werden. Unbekannt sind allerdings die Auswirkungen von neonataler relativer Hyperoxie auf die *in utero* ablaufende Entwicklung kortikaler Pyramidenzellen unter dem Aspekt des drastischen Anstiegs des Sauerstoffpartialdrucks im Rahmen einer Frühgeburt. Die vorliegende Arbeit soll unter anderem einen Teil dieser Lücke in der Erforschung des Hyperoxie-Modells schließen und erstmals Erkenntnisse über die morphologische Entwicklung kortikaler Pyramidenzellen unter Hyperoxie im unreifen Gehirn der Maus liefern.



**Abbildung 1.3:** Perinataler Anstieg von Sauerstoff.

Die embryonale und fetale Entwicklung des Menschen erfolgt intrauterin mit einem Sauerstoffpartialdruck von ungefähr 25 mmHg unter hypoxämischen Bedingungen verglichen zu extrauterin. Der perinatale Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks auf über 70 mmHg führt zu einer relativen Hyperoxie, welche bei Frühgeborenen mit der Pathogenese verschiedener frühgeburtsassoziiierter Erkrankungen in direktem Zusammenhang steht, insbesondere der Retinopathia praematurorum (ROP), Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) und verschiedenen ZNS-Erkrankungen. Modifiziert nach B. Reich.

## 1.5 Erythropoetin

Erythropoetin (EPO) ist ein relativ hitze- und pH-stabiles, saures, 30,4 kDa schweres Glykoprotein-Hormon, bestehend aus 165 Aminosäuren, das phylogenetisch zur Zytokinfamilie der koloniestimulierenden Faktoren gehört.<sup>123-125</sup> Als Wachstumsfaktor für erythroide Vorläuferzellen sind EPO und der Erythropoetinrezeptor (EPO-R) essentiell für die Erythropese.<sup>(126, 127)</sup> Bei Erwachsenen entstammt EPO zu ungefähr 80% aus peritubulären Fibroblasten des Nierenkortex und zu 20% aus Hepatozyten und Ito-Zellen der Leber.<sup>128-130</sup> Dabei ist in diesen Zellen die Gewebshypoxie der primäre Stimulus, der zu einer Dimerisierung der zwei Untereinheiten des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF-1) führt, der als Transkriptionsfaktor die EPO-Synthese initiiert.<sup>123, 131, 132</sup> Über endokrine Sekretion gelangt EPO ins Knochenmark, supprimiert in den erythroiden Vorläuferzellen die Apoptose und induziert deren Proliferation, Differenzierung und Reifung. Die Signaltransduktion erfolgt dabei nach Rezeptordimerisierung über den JAK2/STAT5-,

MAPK/ERK-, PI3K/AKT- und FOXO3a-Signalweg, welche Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung fördern und Apoptose verhindern können.<sup>125, 128, 133, 134</sup> Mit diesen Eigenschaften erlangte EPO schon früh klinische Relevanz in der therapeutischen Behandlung von Anämien, auch in der Neonatologie und gilt seither als ein sicheres Medikament.<sup>95, 126, 135, 136</sup> Neben seiner wichtigen Funktion in der Hämatopoese entfaltet parakrin sezerniertes EPO allerdings auch eine Vielzahl an nicht-hämatopoetischen Effekten. Mehrere Untersuchungen konnten EPO- und EPO-R-mRNA in Gehirn, Lunge, Herz, Milz, Reproduktionstrakt, Haarfollikel u.a. eines Erwachsenen nachweisen. Hier umfassen die pleiotropen Eigenschaften von EPO unter anderem modulierende Wirkungen auf Inflammation, Immunreaktion sowie vaso- und angiogene Effekte.<sup>137-140</sup> Aber auch in der embryonalen und fetalen Entwicklung scheint EPO eine wichtige Rolle einzunehmen. Knock-out Mäuse, die kein EPO oder EPO-R synthetisieren, versterben bereits intrauterin. Im menschlichen Fetus wurde der EPO-R ebenfalls auf mehreren organspezifischen Zellen nachgewiesen, einschließlich Gehirn, Herz, Lunge, Dünndarm u.a.<sup>(139, 141, 142)</sup> Ebenfalls durch Gewebshypoxie stimuliert, zeigt EPO in der Entwicklung dieser Organe proliferative, anti-apoptotische und zellprotektive Eigenschaften.<sup>129, 131, 143</sup> Da EPO die Plazentaschranke nicht überwinden kann, wird es vom Fetus selbst synthetisiert, hauptsächlich in der Leber. Ab der 30. SSW übernehmen die Nieren diese Aufgabe sukzessive.<sup>129, 143</sup> Analog zur Plazentaschranke stellt auch die (intakte) Blut-Hirn-Schranke eine Barriere dar, die von EPO nur durch hohe exogene Dosen überwunden werden kann, sodass die Zellen des sich entwickelnden ZNS ihr eigenes EPO synthetisieren.<sup>144, 145</sup> Die EPO- und EPO-R-Synthese des ZNS ist im fetalen Stadium um ein Vielfaches erhöht und fällt kurz nach der Geburt ab.<sup>146, 147</sup> Nach erlittenem Hirnschaden steigt die Expression im Gehirn allerdings wieder an, sowohl bei Tieren, als auch beim Menschen, was darauf hinweist, dass EPO nicht nur in der fetalen Entwicklung, sondern auch im späteren Leben noch neuroprotektive Funktionen ausübt.<sup>148,149, 150</sup> Im Folgenden sollen die bisherigen Erkenntnisse zu neuroprotektiven Eigenschaften von EPO durchleuchtet werden.

### 1.6 Erythropoetin und Neuroprotektion

Als das EPO im Serum unter Hypoxie nach beidseitiger Nephrektomie bei Ratten nicht mehr anstieg, wurde in den 1950er Jahren deutlich, dass die Nieren eine essentielle Rolle in der EPO-Synthese einnehmen. In den 1980ern konnte erstmals EPO- und EPO-

R-mRNA molekularbiologisch im Nierenkortex von Nagetieren nachgewiesen werden. Im menschlichen Gehirn wurde erst ab 1990 EPO- und EPO-R-mRNA nachgewiesen, sowohl in Neuronen und Gliazellen, als auch in Endothelzellen des Gehirns.<sup>123, 130, 137, 141, 151</sup> Dadurch öffnete sich ein großes Forschungsgebiet der Neurowissenschaften. Zahlreiche Studienergebnisse konnten seither eine Vielzahl an neuroprotektiven Effekten und Mechanismen durch EPO und EPO-R belegen, sowohl für das reife, als auch das unreife Gehirn bei Frühgeborenen.<sup>131, 133, 143, 150, 152–156</sup>

Die experimentell am Nagetier (Maus/Ratte) getesteten Schädigungsmodelle umfassen bisher Hypoxie, Hypoxie/Ischämie, Ischämie/Reperfusion, Exzitotoxizität, intrazerebrale und -ventrikuläre Hämorrhagie, Rückenmarksverletzung und PVL. Hier zeigte die Anwendung von rekombinantem EPO (rEPO) in Kombination mit jedem der genannten Schädigungsmodelle neuroprotektive Effekte hinsichtlich Apoptose, Inflammation, Exzitotoxizität und oxidativen Stress. Darüber hinaus war eine Erholung der Neuro- und Angiogenese und Migration regenerierter Neurone nachweisbar, sowie eine signifikante Verbesserung des neurologischen Langzeit-Outcome.<sup>140, 155, 157–165</sup>

Bisherige Experimente, die den Effekt von rEPO in Kombination mit neonataler Hyperoxie im unreifen Gehirn von Mäusen/Ratten testeten, untersuchten verschiedene, zum Teil ZNS-spezifische Proteine, z.B. Neurotrophine (BDNF, GDNF u.a.), Marker für oxidativen Stress (GSH/GSSG, Malondialdehyde, HO-1 u.a.), pro-inflammatorische (IL-1 $\beta$ , IL-18) und -apoptotische (Caspase 2, 3, 8) Mediatoren, Matrix-Metalloproteasen (MMP-2,-9), Autophagie-assoziierte Proteine (Atg3, 5, 12, Beclin-1, u.a.) und die mRNA-Expression von Genen, die für neuronale Plastizität wichtig sind (SYP, NRG1, NRP1). Hier zeigte Hyperoxie in allen Untersuchungen negative Effekte im Sinne einer Schädigung der Zellen. Gleichzeitig zeigte die mit rEPO behandelte Gruppe eine signifikante Abschwächung des Hyperoxie-induzierten Schadens im Sinne einer Zellprotektion. Weiterhin führte rEPO zu einem verminderten Zelluntergang von Oligodendrozyten und zu einem verbesserten neurokognitiven Outcome bei Verhaltenstests (Open-Field-Test, Barnes-Maze, Objekterkennung).<sup>95, 111–113, 118, 166</sup>

Klinische Studien über die Anwendung von rEPO an Frühgeborenen gibt es vereinzelt. Zwei große Metaanalysen ergaben, dass prophylaktisch verabreichtes rEPO bei sehr unreifen Frühgeborenen, gemessen am Bayley-II *Mental Development Index* (MDI) zu einer statistisch signifikant verbesserten neurologischen und kognitiven Entwicklung führt, mit einer Abnahme neurologischer Entwicklungsstörungen und einem verminderten Risiko für intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH), PVL und NEC.<sup>136, 167</sup>

Dennoch wird bezüglich eines Nutzens oder Empfehlung von rEPO für das neurologische Langzeit-Outcome gemessen nach 18 – 24 Monaten mit korrigiertem Alter aufgrund zum Teil widersprüchlicher Ergebnisse einzelner Studien und eines hohen Risikos einer Verzerrung in der größten untersuchten Studie keine eindeutige Aussage getroffen und stattdessen auf die Notwendigkeit der noch erwarteten prospektiven Daten verwiesen. Tatsächlich sind Unterschiede in der neurologischen Entwicklung vor dem 5. Lebensjahr häufig nicht erkennbar.<sup>168, 169</sup> Unterschiede bezüglich Mortalität, psychomotorischer Entwicklung, zerebraler Lähmung und Hör- und Sehstörungen waren nicht zu beobachten.<sup>136, 167</sup> Zwei weitere Reviews aus 2014 und 2015 untersuchten jeweils Studien mit den gleichen Patienten und führten daher nicht zu erweiterten Erkenntnissen.<sup>136</sup>

Bei Reifgeborenen wurde rEPO mehrfach als Therapie für die Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie nach Asphyxie getestet. Ein aktuelles Review kam zu dem Ergebnis, dass EPO einen positiven Effekt auf das neurologische Langzeit-Outcome nach 12 – 24 Monaten postnatal hat und das Risiko für Lähmungen und bleibende Hirnschäden verringert.<sup>158</sup> Aber auch hier ist die Aussagekraft aufgrund geringer Fallzahlen begrenzt.

Die genauen Mechanismen für die bisherigen experimentellen und klinischen Untersuchungsergebnisse sind noch nicht vollumfänglich verstanden. Nach derzeitigem Stand kommt der Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege durch den EPO-R eine Schlüsselrolle zu (siehe vorheriges Kapitel).<sup>134, 155</sup>

Um jedoch weitere Erkenntnisse über die neuroprotektive Eigenschaften von EPO zu bekommen, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals die morphologische Entwicklung kortikaler Pyramidenzellen im unreifen Gehirn unter Einfluss von rEPO in Kombination mit neonataler Hyperoxie untersucht. Ein weiterer Grund, weshalb rEPO als potentiell Medikament bei Neugeborenen von besonderem Interesse ist, liegt in der begrenzten Anzahl bereits zugelassener Medikamente in der Neonatologie. Als vorteilhaft ist zu sehen, dass sich rEPO bereits in der Therapie der perinatalen Anämien als sicheres Medikament bewährt hat, sodass bereits viel Erfahrung in der Anwendung von rEPO vorliegt.<sup>(135)</sup>

## 2 ZENTRALE FRAGESTELLUNG

Zu früh geborene Kinder zeigen signifikant häufiger kognitive und psychomotorische Entwicklungsstörungen im Vergleich zu termingerecht Geborenen. Dazu zählen Lernschwierigkeiten, emotionale Regulationsstörungen, Autismus-Spektrum-Syndrom, Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom, mentale Retardierung, und Psychosen. Neben genetischen Faktoren als Ursache liegt bei Frühgeborenen vor allem die drastische Umweltveränderung als potentielle exogene Ursache nahe. Für eine neuroprotektive Therapie stellt Erythropoetin derzeit ein potentielles Medikament dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob neonatale Hyperoxie im unreifen Gehirn der Maus zu mikroskopisch nachweisbaren Veränderungen kortikaler Pyramidenzellen führt und ob diese Schäden durch die postnatale Anwendung von EPO verhindert werden können. Konkret wurden zur Beantwortung dieser Frage drei Hypothesen aufgestellt.

1. Hyperoxie führt zu einem signifikant vermehrten Zelluntergang CUX1-positiver kortikaler Pyramidenzellen im Verhältnis zu allen Zellen im sensorischen Kortex.
2. Hyperoxie führt zu einer signifikanten Hemmung der Dendritogenese und Synaptogenese kortikaler Pyramidenzellen im cingulären, motorischen und sensorischen Kortex.
3. Die Anwendung von rEPO führt zur Prävention der Pyramidenzellschädigung aus Hypothese 1. und 2.

Verifizierung oder Falsifizierung dieser Hypothesen soll einen wichtigen Beitrag zur Klärung der zentralen Frage leisten, ob und wie neonatale Hyperoxie die Entwicklung und Reifung kortikaler Pyramidenzellen im unreifen Gehirn beeinträchtigt und wenn ja, ob Erythropoetin ein geeignetes Mittel darstellt, diese schädlichen Effekte durch Hyperoxie auf das sich entwickelnde Gehirn zu vermindern.

## 3 METHODIK

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller und Katalognummer</b>
Agarose	Promega, Fitchburg, USA; V2111
Ammoniak	Carl Roth, Karlsruhe; 6774.2
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA; D9542
Ethanol (vergällt)	Carl Roth, Karlsruhe; K928.4
Ethylene Glykol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA; 324558-2L
Erythropoietin	Roche Pharma (Schweiz)
Kaliumchromat	Carl Roth, Karlsruhe; HN33.2
Kaliumdichromat	Merck, Darmstadt; 1.04862
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe; 9265.2
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe; T878.3
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe; P030.2
Natriumthiosulfat-5-hydrat	Merck, Darmstadt; 1.06516.1000
Polyvinylpyrrolidone (Av. Mol. Wt.: 360.000; PVP360)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA; P5288
Quecksilber(II)-chlorid	Carl Roth, Karlsruhe; KK04.2
Roti®-Histol	Carl Roth, Karlsruhe; 6640.4
Saccharose	Merck, Darmstadt; 1.07687.1000

### 3.1.2 Puffer und Lösungen

Die im Folgenden aufgeführten Puffer und Lösungen wurden mit dd-H<sub>2</sub>O hergestellt.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
Golgi-Cox-Stammlösungen:	
Kaliumdichromat-Lösung	5% (w/v) Kaliumdichromat
Quecksilber(II)-chlorid-Lösung	5% (w/v) Quecksilber(II)-chlorid
Kaliumchromat-Lösung	5% (w/v) Kaliumchromat
Golgi-Cox-Arbeitslösung	20,83% (v/v) Kaliumdichromat-Lösung 20,83% (v/v) Quecksilber(II)-chlorid-Lösung 16,67% (v/v) ml Kaliumchromat-Lösung
0,1 M PBS (pH 7,2)	26,5 mM Natriumdihydrogenphosphat 77,06 mM di-Natriumhydrogenphosphat 307,99 mM Natriumchlorid
Gewebeschutz-Lösung	50% (v/v) 0,1 M PBS (pH 7,2) 0,96 M (30% (w/v)) Saccharose 0,01% (w/v) PVP360 30% (v/v) Ethylene Glykol
50% Ethanol-Lösung	50% (v/v) Ethanol
70% Ethanol-Lösung	70% (v/v) Ethanol
95% Ethanol-Lösung	95% (v/v) Ethanol
Ammoniak-Lösung	2/3 (v/v) Ammoniak
Natriumthiosulfat-Lösung	5% (w/v) Natriumthiosulfat
Agarose-Gel	4% (w/v) Agarose



### 3.1.3 Antikörper

Antikörper	in	Verwendung	Hersteller
CDP (M-222)	1% Pferdeserum	1:500	Santa Cruz Biotechnology sc-13024
Cy3®	10% Pferdeserum	1:500	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc 711-165-152

### 3.1.4 Laborgeräte, Verbrauchsmittel und Sonstiges

#### Verbrauchsmittel:

Bezeichnung	Hersteller
Aqua-Poly/Mount	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
UltraCruz Delicate Task Wipers	Santa Cruz Biotechnology
Objektträger	Gerhard Menzel
Deckgläser 24 x 60 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Deckgläser 18 x 18 mm	Menzel-Gläser
Sekundenkleber	Marston-Domsel MD GLUE 111.495
Rasierklinge	Feather Hi-STAINLESS Platinum Coated
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Falcon BP
Eukitt® Quick hardening mountin medium	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Plastikform	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Aluminiumfolie	

#### Laborgeräte:

Bezeichnung	Hersteller
Microm HM650V Vibration microtome	Thermo Fisher Scientific
Laborwaage	Ohaus Navigator N24120
Magnetrührer	Janke&Kunkel IKA-COMBIMAG RET

Mikrowelle	Sharp R-937
Kühlschrank	Liebherr ProfiLine
Mikroskop Olympus IX81S1F-3	Olympus
Mikroskop Olympus BX60F-3	Olympus
Mikroskop Olympus BX51TF	Olympus
OxyCycler	BioSpherix, Lacona, NY, USA

**Sonstiges:**

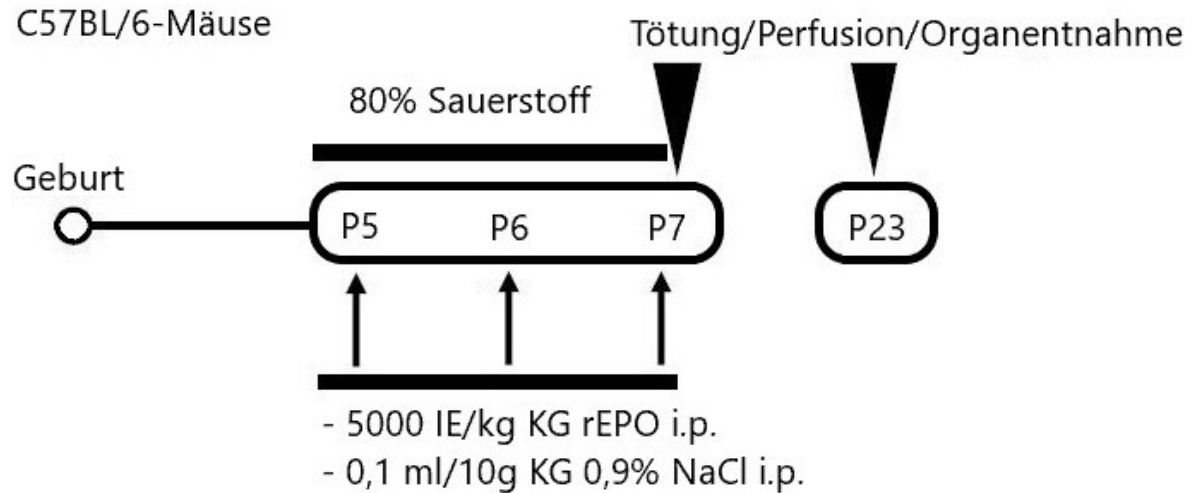
<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Messzylinder 100 – 1000 ml	Brand
Glasflaschen 250 – 1000 ml	Duran
Wasserfilteranlage	Milli-Q, Merck Millipore
Objekträgerkasten	Heathrow Scientific

**3.1.5 Software und Datenbanken**

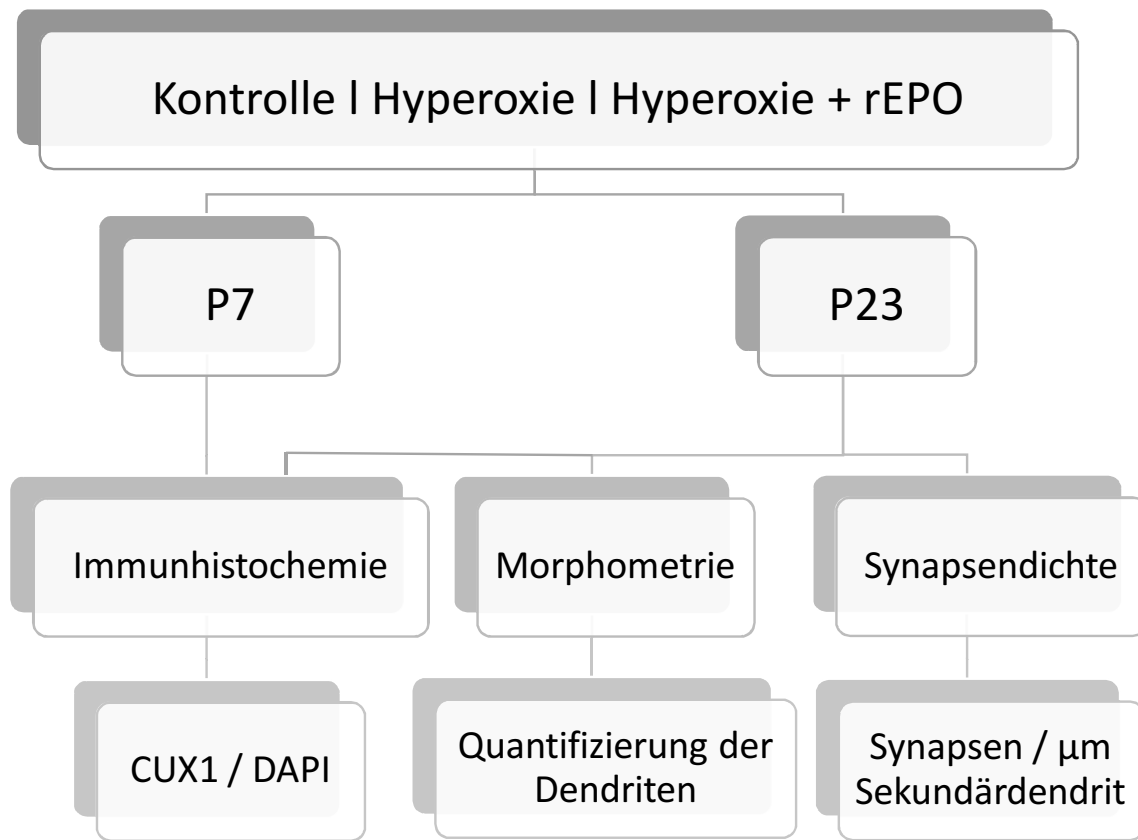
<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft
GraphPad Prism 8.0.1	GraphPad Software
ImageJ	<a href="https://imagej.net/Fiji/Downloads">https://imagej.net/Fiji/Downloads</a>
NCBI Datenbank	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>
Cochrane Library	<a href="https://www.cochranelibrary.com/">https://www.cochranelibrary.com/</a>
Citavi 6	Swiss Academic Software GmbH

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Schematischer Überblick der Experimente



**Abbildung 3.1:** Schematischer Überblick des Hyperoxie-Modells mit rEPO.  
P = Postnataler Tag



**Abbildung 3.2:** Schematischer Überblick der Versuche und Untersuchungen

#### 3.2.2 Tierschutzrichtlinien

Die Tierexperimente erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen des Landes Berlin und wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) in Berlin genehmigt (Lizenz G 0224/16).

#### 3.2.3 Tierversuchsmodell

5 Tage alte gesunde C57BL/6-Mäuse wurden in drei Gruppen eingeteilt: Kontrolle, Hyperoxie und Hyperoxie + rEPO. Die Kontrolltiere wurden unter normaler Raumluft zusammen mit ihrer Mutter gehalten. Die Mäuse der Hyperoxie- und der Hyperoxie + rEPO-Gruppe wurden vom 5. bis zum 7. Lebenstag zusammen mit einem Muttertier über 48 Stunden in einer Kammer (OxyCycler BioSpherix) einer Atemluft mit 80% Sauerstoff ausgesetzt. Die Gruppe der mit rEPO behandelten Tiere erhielten zu Beginn der Sauerstoff-Exposition an P5, nach 24 Stunden an P6 und am Ende der Sauerstoff-Exposition nach 48 Stunden an P7 jeweils eine intraperitoneale (i.p.) Injektion mit 5000 IE/kg KG rEPO. Die Tiere der Kontroll- und Hyperoxie-Gruppe erhielten stattdessen 0,1 ml/10g KG 0,9% NaCl als Placebo. Das Injektionsvolumen von 10 ml/kg KG wurde dabei nicht überschritten. Während der 48-stündigen Sauerstoff-Exposition wurden die Muttertiere nach 24 Stunden gegen ein unter Normoxie gehaltenes Muttertier ausgetauscht, um Beeinträchtigungen in der Versorgung der Jungtiere zu vermeiden.

Für die immunhistochemische Färbung wurden sowohl für P7 als auch für P23 für alle drei Gruppen jeweils 2 Tiere verwendet. Für die Golgi-Cox Färbung wurden für die Kontrollgruppe 9, die Hyperoxie-Gruppe 6 und die Hyperoxie + rEPO-Gruppe 5 Tiere verwendet.

#### 3.2.4 Narkoseeinleitung, Fixierung und Präparation

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die neugeborenen Mäuse unmittelbar nach der Hyperoxie (P7) oder nach weiteren 15 Tagen (P23) an Raumluft narkotisiert, transkardial mit PBS und nachfolgend 4% Paraformaldehyd in PBS perfundiert und die Organe entnommen. Für die morphometrischen Untersuchungen wurden die Tiere lediglich an P23 narkotisiert, getötet, die Gehirne entnommen und *ex vivo* in die Golgi-Cox-Färbung überführt. Die Narkose erfolgte durch Ketamin (100

mg/kg), Xylazin (20 mg/kg) und Acepromazin (3 mg/kg), das intraperitoneal injiziert wurde. Dieser Schritt erfolgte durch Yuliya Sharkovska.

#### **3.2.5 Kryoschnitte für Immunhistochemie**

Die über 16 – 20 Stunden bei 4°C in 4% Paraformaldehyd und PBS fixierten Gehirne wurden zur Kryoprotektion für eine Stunde in 5% Saccharose in PBS und anschließend 30% Saccharose in PBS gelegt bis die Organe zum Glasboden abgesunken sind. Als nächstes wurden die Gehirne mittels Isopentane auf -38°C – -40°C eingefroren. Anschließend wurden 50 µm dicke koronare Schnitte mit dem Kryotom angefertigt. Die Schnitte wurden in einer 0,01% Natriumazid Lösung in PBS gesammelt. Dieser Schritt erfolgte durch Yuliya Sharkovska.

#### **3.2.6 Immunhistochemische Färbung**

Durch die Fluoreszenz-Immunhistochemie wurden in Kryoschnitten spezifische Zellmarker für kortikale Pyramidenzellen nachgewiesen. Dazu wurden die Kryoschnitte initial 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einer Zellkulturplatte mit 0,4% (v/v) Triton X 100 permeabilisiert. Anschließend erfolgte eine Blockierung der Schnitte mit 10% Pferdeserum und 0,5% (v/v) Triton X 100 in PBS ebenfalls über 30 Minuten bei Raumtemperatur, um unspezifische Signale zu unterbinden. Nach der Blockierung wurden zu den Schnitten der erste primäre CUX1-Antikörper (M-222, aus dem Kaninchen) in der Lösung 1:500 in 1% Pferdeserum zusammen mit 0,05% Triton X 100 und DAPI in der Verdünnung 1:10.000 hinzugefügt über Nacht bei 4°C gehalten. Die Schnitte wurden 3 Mal über 10 Minuten in PBS gewaschen ehe der zweite sekundäre Antikörper (Anti-Rabbit Cy3) in 10% Pferdeserum in PBS hinzugefügt wurde. Nach 2 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Schnitte 2 Mal über 10 Minuten in PBS erneut gewaschen. Zuletzt wurden die Schnitte für die immunhistochemischen Analysen eingesammelt und mit Aqua-poly/mount und Deckglas über einem Objektträger abgedeckt. Dieser Schritt erfolgte durch Yuliya Sharkovska.

### 3.2.7 Golgi-Cox-Färbung

Zunächst wurde die Golgi-Cox-Stammlösungen hergestellt. Die 3 Lösungen wurden lichtgeschützt bei Raumtemperatur in Glasflaschen aufbewahrt. In einer weiteren Glasflasche wurde anschließend die Golgi-Cox-Arbeitslösung hergestellt. Die Glasflasche mit der Arbeitslösung wurde in Alufolie eingewickelt und 48 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Für jedes Gehirnpräparat wurde ein 15 ml FALCON-Röhrchen mit 10 ml klarer Golgi-Cox Lösung aus den oberen Anteilen der Lösung gefüllt. Die Flasche mit der Golgi-Cox Lösung durfte bei diesem Vorgang nicht geschüttelt werden, um eine Vermischung mit der Fällung zu verhindern. Nach der Präparation des Gehirns, wurden die Präparate in ein mit Golgi-Cox-Lösung gefülltes Röhrchen gelegt und lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Nach 24 Stunden wurden die Präparate mithilfe von Histologie-Kassetten in ein neues Röhrchen mit Golgi-Cox-Lösung umgefüllt. Im neuen Röhrchen wurden die Präparate sieben Tage lang bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert. Als nächstes wurden die Präparate in ein mit 10 ml Gewebeschutz-Lösung gefüllten Röhrchen transferiert. Zur Herstellung der Gewebeschutz-Lösung wurde zuvor im ersten Schritt ein 0,1 molarer Phosphatpuffer (PBS) angerührt. Für diesen wurde 1,59 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), 5,47 g di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) und 9,0 g Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ) mit 500 ml dd- $\text{H}_2\text{O}$  vermischt. Im zweiten Schritt wurde zu dem hergestellten Phosphatpuffer 300 g Saccharose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ), 10 g Polyvinylpyrrolidone (PVP360) und 300 ml Ethylenglykol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ ) hinzugefügt und mit dd- $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 Liter aufgefüllt. 500 ml der Gewebeschutzlösung wurde in eine zweite Glasflasche umgefüllt, um damit im nächsten Schritt das Vibratombekken zu füllen. Die restlichen 500 ml waren ausreichend um mit 25 Präparaten weiterzuarbeiten. Die Präparate verblieben für 24 Stunden in der Gewebeschutz-Lösung bei 4°C im lichtgeschützten Raum, ehe sie anschließend erneut in ein neues Röhrchen mit 10 ml Gewebeschutz-Lösung umgefüllt wurden und für weitere 4 Tage lichtgeschützt bei 4°C lagerten.

Nach Anfertigung der Schnitte mittels Vibratom (siehe nächster Abschnitt) und Auftragen auf Objektträger, erfolgte die finale Entwicklung der Golgi-Cox-Färbung. Für diesen Schritt wurden jeweils 300 ml der folgenden Lösungen hergestellt. Die Lösungen wurden in Färbekästen gefüllt und die Objektträger in ein dafür passendes Färbegestell gelegt, um die Hirnschnitte nach folgendem Schema zu entwickeln:

1. 2 x dd $\text{H}_2\text{O}$  für jeweils 5 min.

2. 50% Ethanol für 5 min.
3. Ammoniak-Lösung für 8 min.
4. 2 x dd-H<sub>2</sub>O für jeweils 5 min.
5. Natriumthiosulfat-Lösung für 10 min lichtgeschützt.
6. 2 x dd-H<sub>2</sub>O für jeweils 1 min.
7. 70, 95, und 100% Ethanol für jeweils 6 min.
8. Roti®-Histol für 6 min (hier wurden die Schnitte für das weitere Verfahren länger belassen).

Alle Lösungen wurden in Glasflaschen bei Raumtemperatur gelagert und wiederverwendet. Die Natriumthiosulfat-Lösung wurde zusätzlich lichtgeschützt aufbewahrt. Bei Verfärbung wurde die Lösung neu angesetzt. Für den letzten Schritt wurden immer jeweils zwei Objektträger aus der Roti®-Histol herausgenommen, für 1 Minute getrocknet und anschließend mit ca. 10 Tropfen Eukitt betröpfelt. Der Objektträger wurde anschließend mit ein wenig Druck mit einem Deckglas bedeckt, um Luftblasen zu vermeiden. Am Ende wurden die Objektträger auf einer Mappe lichtgeschützt für 48 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Dieser Schritt wurde selbstständig durchgeführt.

#### **3.2.8 Histologische Schnitte**

Die histologischen Schnitte wurden selbstständig durchgeführt. Als Vorbereitung für die histologischen Schnitte mit dem Vibratom wurde zunächst eine 4% Agarose-Lösung durch das Auflösen von 2 g Agarose („low melting point“) in 50 ml dd-H<sub>2</sub>O hergestellt. Hierzu wurde durch initiales Rühren und anschließendes Erhitzen in der Mikrowelle eine vollständige Auflösung erreicht. Nun wurden die Gehirne mithilfe von Histologie-Kassetten vorsichtig auf Zellstofftüchern getrocknet und in eine würfelförmige und nach oben offene Plastikform gelegt. Sobald die Agarose-Lösung auf 47°C runtergekühlt war, wurde sie in die Plastikformen gegossen, bis die Gehirne vollständig bedeckt waren. Anschließend wurde vorsichtig mit einer Plastikpipette das Gehirn in der Plastikform so positioniert, dass es mit der basalen Seite auf dem Boden der Form liegt. Nach vollständigem Aushärten der Agarose bei 4°C, wurden alle vier Seiten der Plastikform mit einer Rasierklinge abgetrennt, das Präparat aus der Plastikform entnommen und überschüssige Agarose abgeschnitten.

Mit ein bis zwei Tropfen Sekundenkleber wurde das Präparat auf der Plattform des Vibratoms fixiert und die Plattform mittig ins Becken vor dem Gerät platziert. Das Becken

wurde mit der Gewebeschutzlösung gefüllt und die Rasierklinge an die vorgesehene Stelle befestigt. Die Schnitte wurden durchgeführt mit einer Schnittdicke von 200 µm, einer Frequenz von 40 Hz und einer Geschwindigkeit 15 mm/s. Beim Schneiden wurden die Schnitte vorsichtig mit zwei Pinseln aus dem mit Gewebeschutzlösung gefüllten Becken herausgeholt und auf einen Objektträger aufgetragen. Sobald alle Schnitte aufgetragen wurden, wurde die überschüssige Gewebeschutzlösung auf den Objektträgern mittels hoch absorbierenden Zellstofftüchern entfernt. Dazu wurden die Zellstofftücher mit Gewebeschutzlösung angefeuchtet und anschließend mit vertikalem moderatem Druck über den Handballen auf die Objektträger gepresst. Die Objektträger wurden anschließend zum Trocknen in eine Objektträger-Mappe gelegt und für 2 bis 3 Tage lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Die Gewebeschutzlösung im Becken wurde am Ende durch ein Filterpapier gefiltert und in die gleiche Flasche zurück gegossen. Diese wurde wieder lichtgeschützt bei 4°C gelagert und mehrfach benutzt. Diese Gewebeschutzlösung wurde ausschließlich für das Vibratomecken verwendet und nicht für den Schritt davor.

#### **3.2.9 Mikroskopie**

Für die immunhistochemische Analyse wurde das Fluoreszenzmikroskop Olympus BX51TF mit dazugehöriger Kamera von Olympus, Lichtfilter und die MagnaFire-Software verwendet. Für die Analysen wurden die Aufnahmen bei 10-facher Vergrößerung angefertigt.

Für die morphometrische Analyse wurde das Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81S1F-3 mit entsprechender Kamera und der cellSens Dimension-Software verwendet. Gearbeitet wurde allerdings nur im Hellfeld. Um den Dendritenbaum vollständig erfassen zu können, wurden Z-Stapel Aufnahmen mit einem Abstand von 7,5 – 8,5 µm gemacht. Die Aufnahmen wurden bei 40-facher Vergrößerung angefertigt.

Für die Analyse der Synapsen wurde das Fluoreszenzmikroskop Olympus BX60F-3 mit der AxioCam Kamera und der AxioVision-Software verwendet. Auch hier wurde aber nur im Hellfeld gearbeitet. Untersucht wurden ausschließlich Sekundärdendriten mit einer Mindestlänge von 40 µm bei 100-facher Vergrößerung. Für die 100-fache Vergrößerung wurde das Öl Immersol 518 F von ZEISS verwendet. Die Mikroskopie wurde selbstständig durchgeführt.



#### 3.2.10 Analyse mit ImageJ-Software

Die Analyse mit ImageJ-Software wurde selbstständig durchgeführt. Für die immunhistochemische Analyse wurden zwei Bilder (eines für CUX1, eines für DAPI) bei 10-facher Vergrößerung digital übereinandergelegt. Es wurde ein 300 x 300 Pixelgroßer Ausschnitt in der oberflächlichen und der unmittelbar darunter liegenden tiefen Schicht im sensorischen Kortex ausgewählt und die Zellen sowohl für CUX1 als auch für DAPI mithilfe von ImageJ Software per Hand ausgezählt und der Wert für CUX1 durch den Wert für DAPI dividiert.

Für die morphometrische Analyse wurde am Mikroskop mit 10-facher Vergrößerung gearbeitet. Im cingulären, motorischen und sensorischen Kortex wurden digitale Aufnahmen mithilfe der Software des Lichtmikroskops angefertigt und anschließend sowohl die Basal- als auch die Apikaldendriten mit der ImageJ-Software durch die Sholl-Analyse quantifiziert. Hierzu wurde zunächst die Skalierung auf 1,53 Pixel/ $\mu\text{m}$  eingestellt. Danach wurden 30 konzentrische Kreise mit einem Abstand von 10  $\mu\text{m}$  zentral um das Soma gelegt und die Dendriten per Hand ausgezählt. Es wurden ausschließlich vollständig und intensiv gefärbte Pyramidenzellen ausgewertet, bei denen die Zugehörigkeit der Dendriten zu den Pyramidenzellen möglichst zweifelsfrei bestimmt werden konnte. Wenn nötig, wurden Einstellungen in der Bildhelligkeit und im Bildkontrast vorgenommen.

Für die Analyse der Synapsen wurde am Mikroskop mit 100-facher Vergrößerung gearbeitet. Es wurden ausschließlich basale Sekundärdendriten mit einer Länge von mindestens 40  $\mu\text{m}$  im cingulären, motorischen und sensorischen Kortex sowohl in der oberflächlichen als auch tiefen Schicht untersucht. Für die exakte Längenbestimmung mit der Software des Mikroskops wurde die Skalierung zunächst auf 15,6 Pixel/ $\mu\text{m}$  eingestellt. Die Synapsen wurden mithilfe der ImageJ Software per Hand ausgezählt und durch die entsprechende Länge des Dendriten dividiert, um die Synapsendichte zu ermitteln.

#### 3.2.11 Statistische Auswertung

Bei allen quantitativen Messungen wurden die Primärdaten aus *ImageJ* in *Excel* übertragen und auf den Servern der Arbeitsgruppe hinterlegt, bevor sie zur statistischen Analyse in *GraphPad Prism* übertragen und ausgewertet wurden.

Bei der Messung zweier Gruppen (z.B. Kontrolle vs. Hyperoxie) wurde der Mann-Whitney-*U*-Test gewählt, der berechnet, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen gibt. Die Signifikanzwerte (p-Wert) sind ebenso wie der Mittelwert und Standardfehler bei den entsprechenden Grafiken angegeben. Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

Die statistische Auswertung wurde selbstständig durchgeführt.

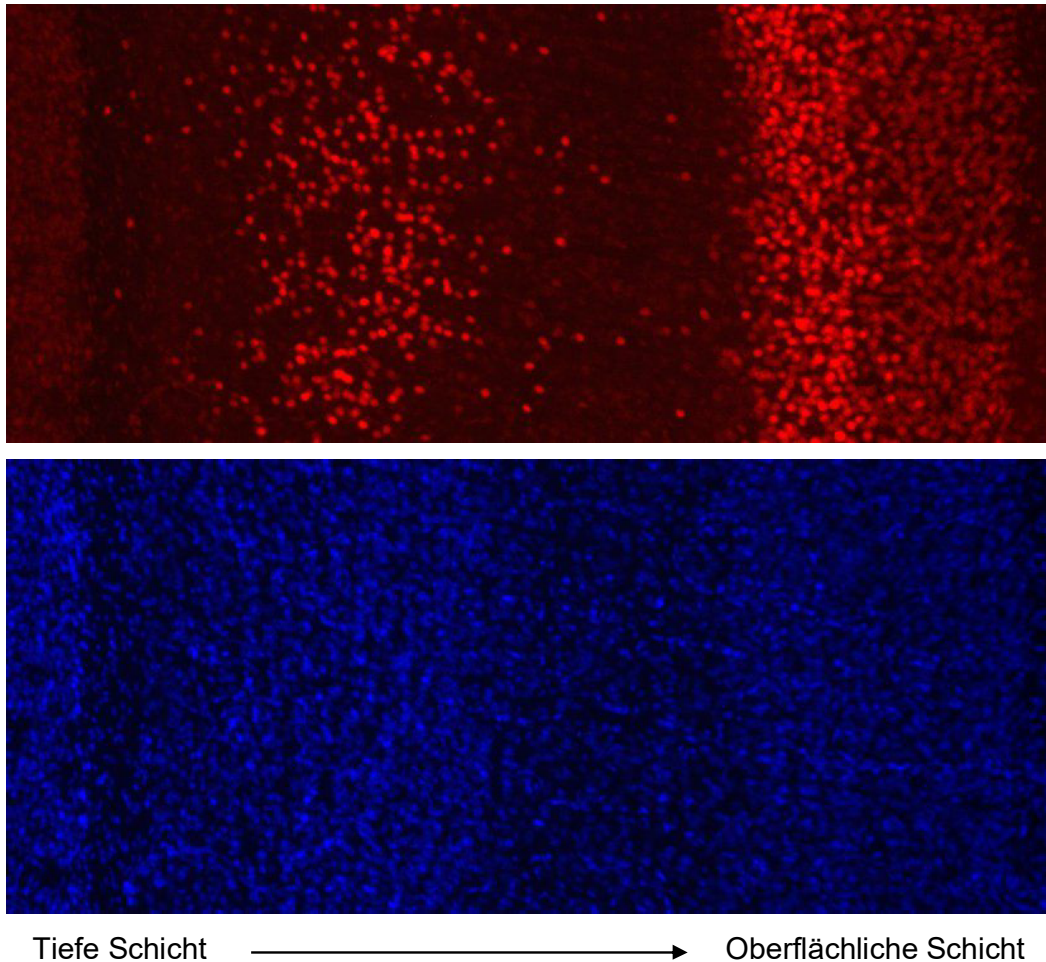
## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Physiologische Parameter der Tiere**

Zwischen den Versuchstieren der Hyperoxie-Gruppe (80% O<sub>2</sub> über 48 h), der mit rEPO (5000 IE/kg KG i.p. zu Beginn, nach 24 h und am Ende) behandelten Hyperoxie-Gruppe und den Kontrolltieren, die unter Normoxie gehalten wurden und ein Placebo (0,1 ml 0,9% NaCl/10 g KG) erhielten, gab es keine Unterschiede im Körpergewicht, Körpergröße oder anderen phänotypischen Parametern. Es wurden in allen drei Gruppen keine körperlichen Beeinträchtigungen festgestellt. Während der Experimente waren bei den Versuchstieren, die unter Hyperoxie gehalten wurden, auch zusammen mit rEPO Gabe zu keiner Zeit Nebenwirkungen zu beobachten.

### **4.2 Immunhistochemische Analyse der Pyramidenzellen**

Um das Verhältnis von Pyramidenzellen und allen Zellen analysieren zu können, wurden als Antikörper CUX1 als Marker für Pyramidenzellen und DAPI als DNA-Marker für alle Zellen verwendet. Mittels Immunfluoreszenzmikroskop wurde bei 10-facher Vergrößerung ein ausgewählter Abschnitt in einer definierten Größe im sensorischen Kortex bei P7 und P23 sowohl in der oberflächlichen als auch tiefen Schicht betrachtet. Anschließend wurden die Zellen mit ImageJ-Software ausgezählt und die beiden Werte miteinander dividiert. Abbildung 4.1 verdeutlicht wie die verwendeten immunhistochemischen Färbungen, CUX1 und DAPI, unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung aussehen.



**Abbildung 4.1:** Immunhistochemisch gefärbtes Maushirnpräparat  
Hier beispielhaft bei P7 der Kontrollgruppe im sensorischen Kortex bei 10-facher Vergrößerung. Im Bild oben sind die CUX1-positiven Pyramidenzellen als rot aufleuchtende Punkte sichtbar. Im unteren Bild ist derselbe Abschnitt zu sehen in dem alle kernhaltigen Zellen durch DAPI gefärbt blau aufleuchten.

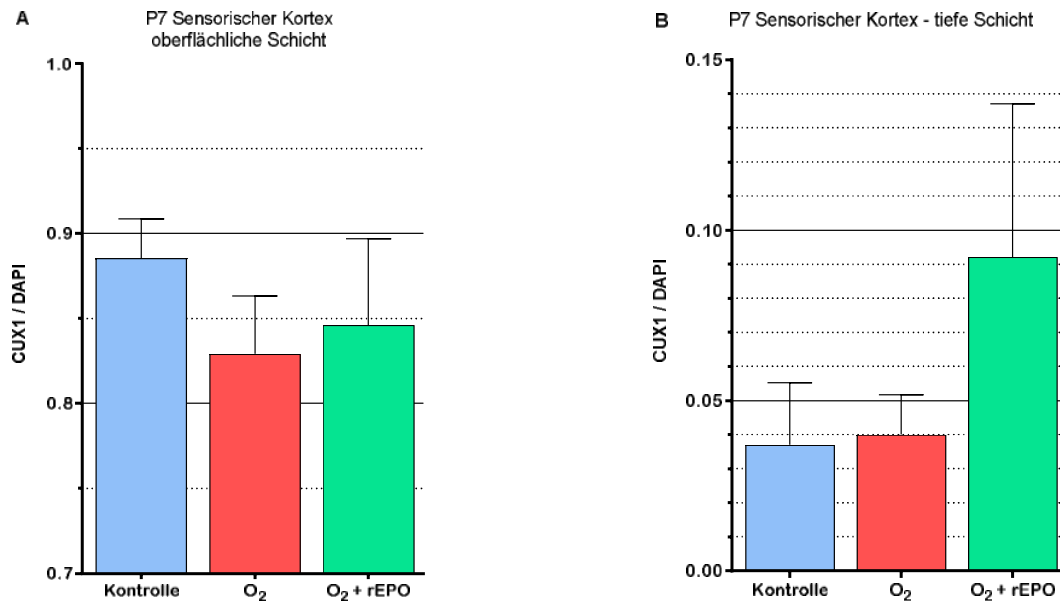
### 4.2.1 Cux1 und DAPI bei P7

Unter allen drei Gruppen findet sich bei P7 kein signifikanter Unterschied im Verhältnis von Pyramidenzellen und allen Zellen insgesamt. Dies betrifft sowohl die oberflächliche als auch die tiefe Schicht (siehe Abbildung 4.2).

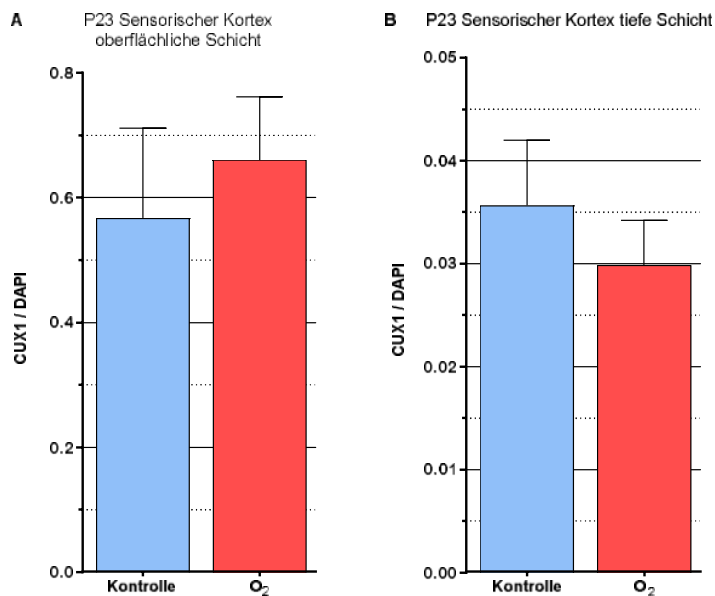
### 4.2.2 Cux1 und DAPI bei P23

Das gleiche Verfahren wie für P7 wurde für die Gruppen Kontrolle und Hyperoxie bei P23 angewendet. Auch hier zeigt sich im sensorischen Kortex sowohl in der oberflächlichen als auch tiefen Schicht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (siehe Abbildung 4.3). Aus diesem Grund und wegen fehlender

Signifikanz bei P7 wurde bei P23 auf die zusätzliche Analyse der mit rEPO behandelten Tiere verzichtet.



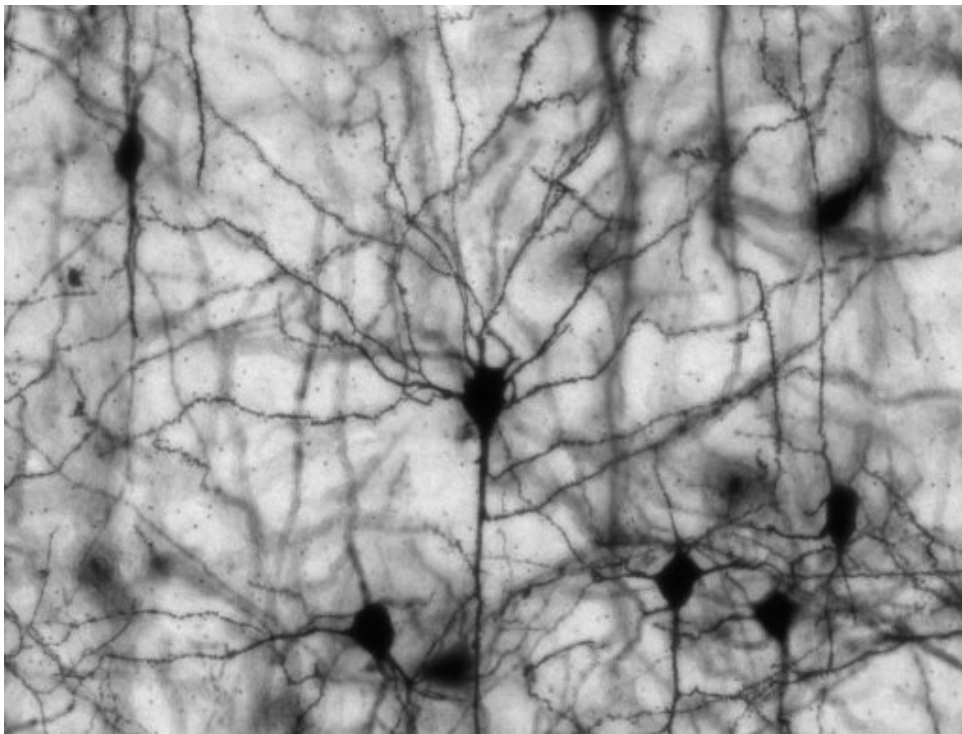
**Abbildung 4.2:** Verhältnis von CUX1 positiven Zellen zu allen Zellen (DAPI) bei P7 im sensorischen Kortex O<sub>2</sub> = Hyperoxie. A: Oberflächliche Schicht. B: Tiefe Schicht. Kontrolle: n = 9. O<sub>2</sub>: n = 10. O<sub>2</sub> + rEPO: n = 6 Mittelwert ± Standardfehler. Mann-Whitney-U-Test



**Abbildung 4.3:** Verhältnis von CUX1 positiven Zellen zu allen Zellen (DAPI) bei P23 im sensorischen Kortex. O<sub>2</sub> = Hyperoxie  
A: Oberflächliche Schicht  
B: Tiefe Schicht  
Kontrolle: n = 3. O<sub>2</sub>: n = 6  
Mittelwert ± Standardfehler  
Mann-Whitney-U-Test

### 4.3 Morphometrische Analyse des Dendritenbaums der Pyramidenzelle bei P23

Für die morphometrische Untersuchung der Pyramidenzellen im cingulären, motorischen und sensorischen Kortex bei P23 wurden nach vorheriger histologischer Aufarbeitung digitale Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop gemacht und anschließend sowohl die Basal- als auch die Apikaldendriten mit der ImageJ-Software durch die Sholl-Analyse quantifiziert (siehe Abschnitt 3.2 Methoden). Abbildung 4.4 verdeutlicht wie die kortikale Pyramidenzelle in der Golgi-Cox-Färbung unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung aussieht. Es wurden ausschließlich vollständig und intensiv gefärbte Pyramidenzellen ausgewertet, bei denen die Zugehörigkeit der Dendriten zu den Pyramidenzellen möglichst zweifelsfrei bestimmt werden konnte.



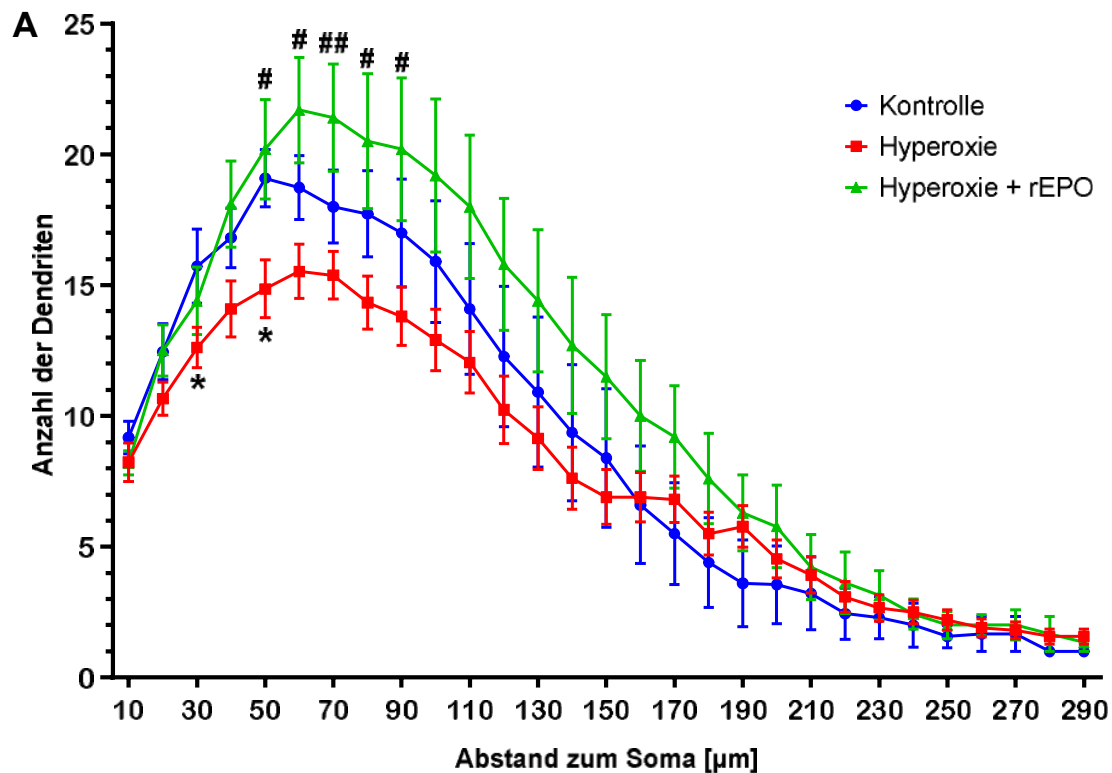
---

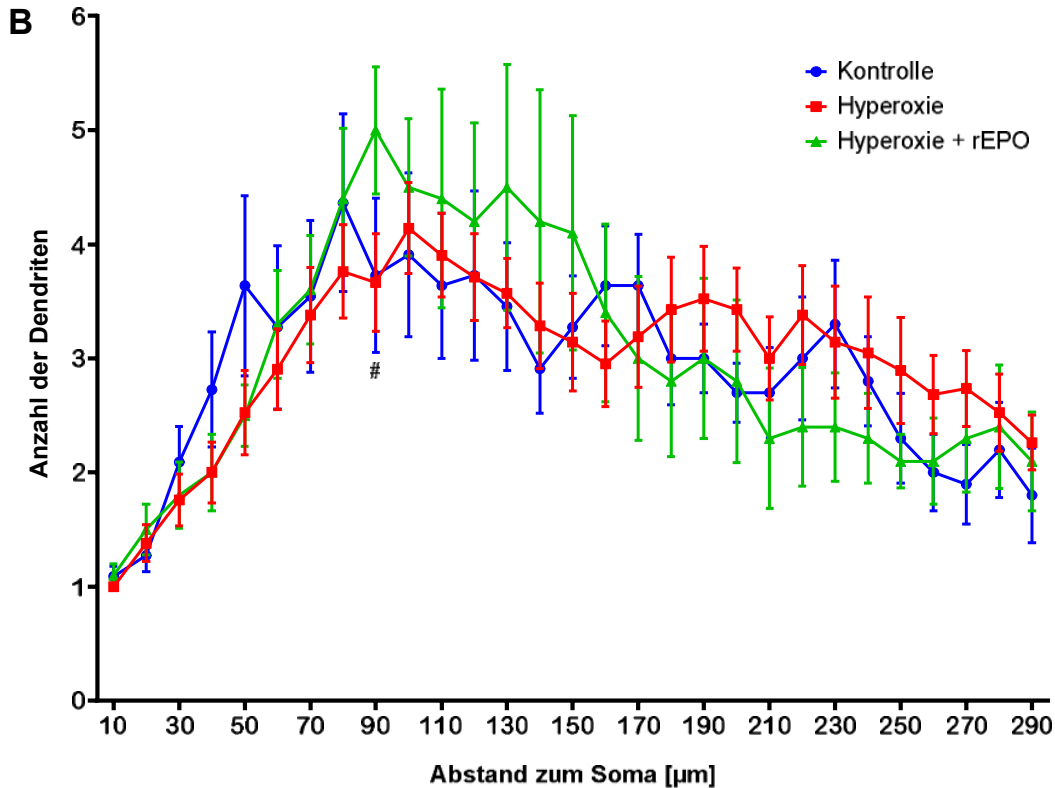
**Abbildung 4.4:** Golgi-Cox-Färbung eines Maushirnpräparats zur morphometrischen Untersuchung. Beispielhaft hier aus der oberflächlichen Schicht des motorischen Kortex einer Maus der Hyperoxie-Gruppe in 40-facher Vergrößerung. In der Mitte ist deutlich erkennbar die Pyramidenzelle mit ihrem Dendritenbaum.

### 4.3.1 Einfluss von Hyperoxie und rEPO im cingulären Kortex

Da im cingulären Kortex nicht genügend Pyramidenzellen in der Qualität gefärbt waren, die für diese Arbeit als Grundlage erforderlich war, wurden die wenigen Zellen aus der oberen und tieferen Schicht zusammengelegt, um trotzdem ein statistisch valides Ergebnis zu bekommen. Graph A in Abbildung 4.5 zeigt die Anzahl der Basaldendriten in Abhängigkeit vom Abstand zum Soma auf. Die Basaldendriten der Hyperoxie-Gruppe zeigten eine signifikante Verzweigungsreduktion bei 30 und 50  $\mu\text{m}$  im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Pyramidenzellen der rEPO-Gruppe zeigten selektiv eine Annäherung der basaldendritischen Verzweigung an die der Kontrollgruppe. So war eine signifikante Verzweigungsvermehrung der Basaldendriten der rEPO-Gruppe bei einer Entfernung von 50 – 90  $\mu\text{m}$  im Vergleich zur Hyperoxie-Gruppe nachweisbar. Zwischen der rEPO- und Kontrollgruppe gab es keine signifikanten Unterschiede.

Graph B zeigt die Anzahl der Apikaldendriten in Abhängigkeit vom Abstand zum Soma auf. Hier waren lediglich in der rEPO-Gruppe bei 90  $\mu\text{m}$  signifikant mehr Dendriten nachweisbar im Vergleich zur Hyperoxie-Gruppe.





**Abbildung 4.5:** Anzahl der Basal- und Apikaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma im cingulären Kortex  
 A: Basaldendriten. B: Apikaldendriten. Kontrolle: n = 11. Hyperoxie: n = 21. Hyperoxie + rEPO: n = 10  
 \*P ≤ 0,05 Hyperoxie gegenüber Kontrolle. #P ≤ 0,05, ##P ≤ 0,01 Hyperoxie gegenüber Hyperoxie + rEPO  
 Mittelwert ± Standardfehler. Mann-Whitney-U-Test

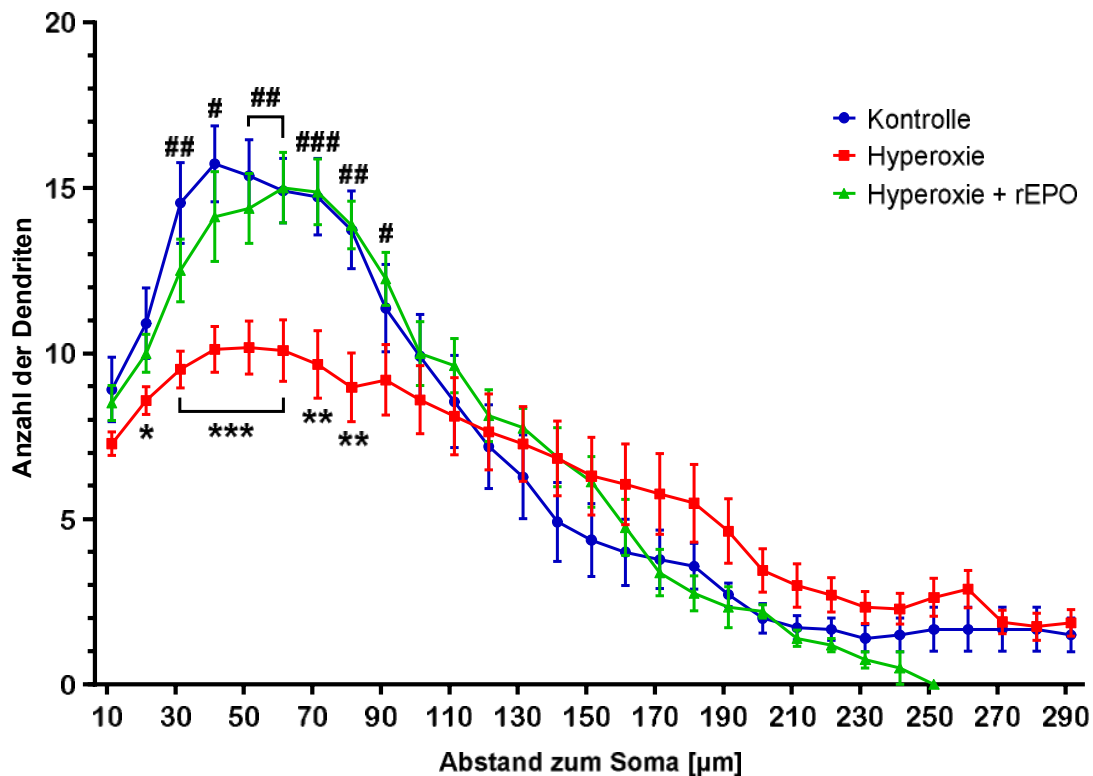
### 4.3.2 Einfluss von Hyperoxie und rEPO im motorischen Kortex

Das gleiche Verfahren wie für den cingulären Kortex wurde für den motorischen Kortex verwendet. Für den motorischen Kortex wurde zwischen einer oberflächlichen und tiefen Schicht unterschieden.

#### 4.3.2.1 Motorischer Kortex – oberflächliche Schicht

Hier zeigte sich, dass die Pyramidenzellen der Hyperoxie-Gruppe bei einem Abstand zum Soma von 20 – 80 µm signifikant weniger basale dendritische Verzweigungen aufwiesen als die der Kontrolltiere. Die Pyramidenzellen der mit rEPO behandelten Gruppe zeigten erneut eine Annäherung des Verzweigungsgrades der Basaldendriten an die der Kontrolltiere. Statistisch konnte ein signifikant höherer Verzweigungsgrad in der rEPO-Gruppe von 30 – 90 µm im Vergleich zur Hyperoxie-Gruppe nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.6).

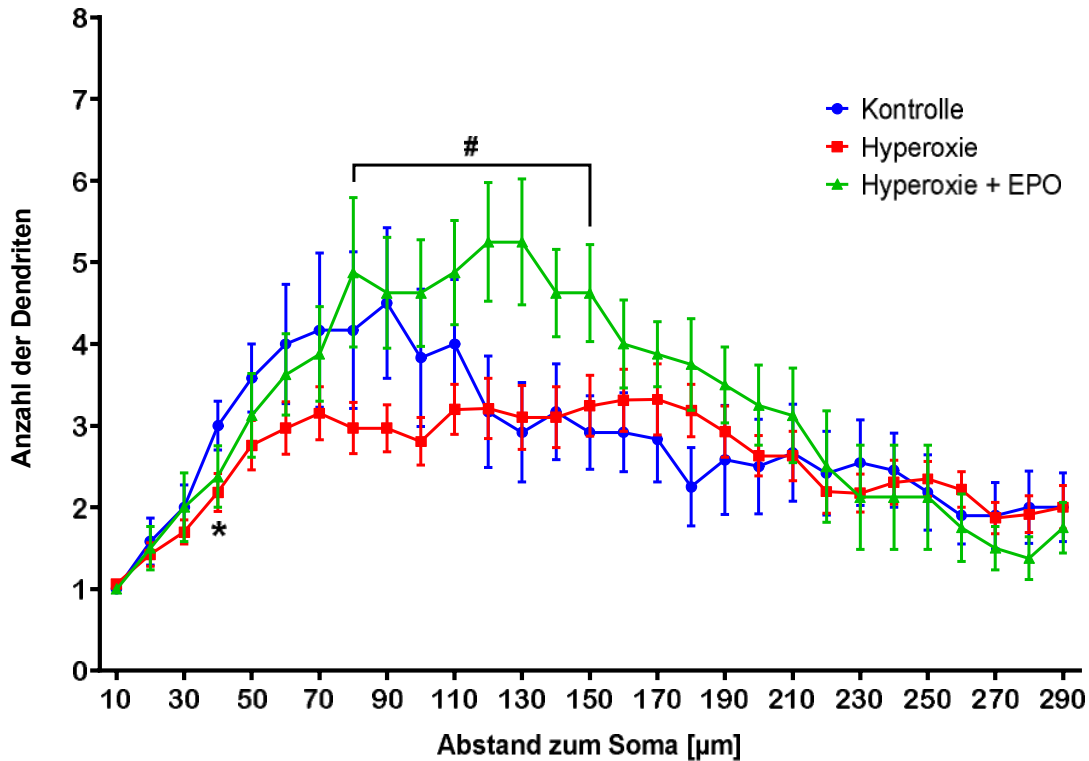




**Abbildung 4.6:** Anzahl der Basaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma in der oberflächlichen Schicht des motorischen Kortex.

Kontrolle: n = 11. Hyperoxie: n = 33. Hyperoxie + rEPO: n = 8. \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$  Hyperoxie gegenüber Kontrolle. # $P \leq 0,05$ , ## $P \leq 0,01$ , ### $P \leq 0,001$  Hyperoxie gegenüber Hyperoxie + rEPO. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Mann-Whitney-U-Test

Bei den apikalen Dendriten konnte bei den Pyramidenzellen der Hyperoxie-Gruppe eine signifikante Verzweigungsreduktion bei einem Abstand von 40  $\mu\text{m}$  im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Die Pyramidenzellen der mit rEPO behandelten Tieren enthielten signifikant mehr Apikaldendriten bei 80 – 150  $\mu\text{m}$  im Vergleich zur Hyperoxie-Gruppe. Zum Teil übertrafen die Pyramidenzellen der rEPO-Gruppe die der Kontrolle im dendritischen Wachstum. So konnten in der rEPO-Gruppe bei 130, 150 und 180  $\mu\text{m}$  signifikant mehr Dendriten gezählt werden als in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 4.7).

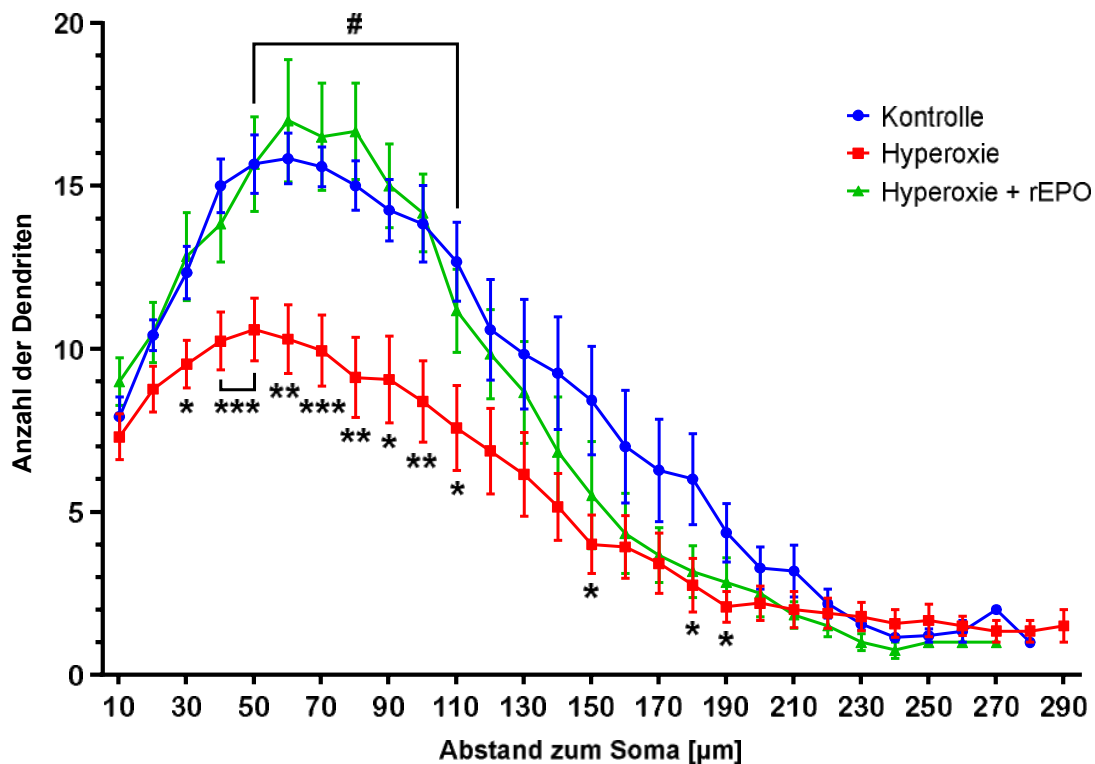


**Abbildung 4.7:** Anzahl der Apikaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma in der oberflächlichen Schicht des motorischen Kortex.

Kontrolle: n = 12. Hyperoxie: n = 33. Hyperoxie + rEPO: n = 8. \*P ≤ 0,05 Hyperoxie gegenüber Kontrolle. #P ≤ 0,05 Hyperoxie gegenüber Hyperoxie + rEPO. Mittelwert ± Standardfehler. Mann-Whitney-U-Test

#### 4.3.2.2 Motorischer Kortex – tiefe Schicht

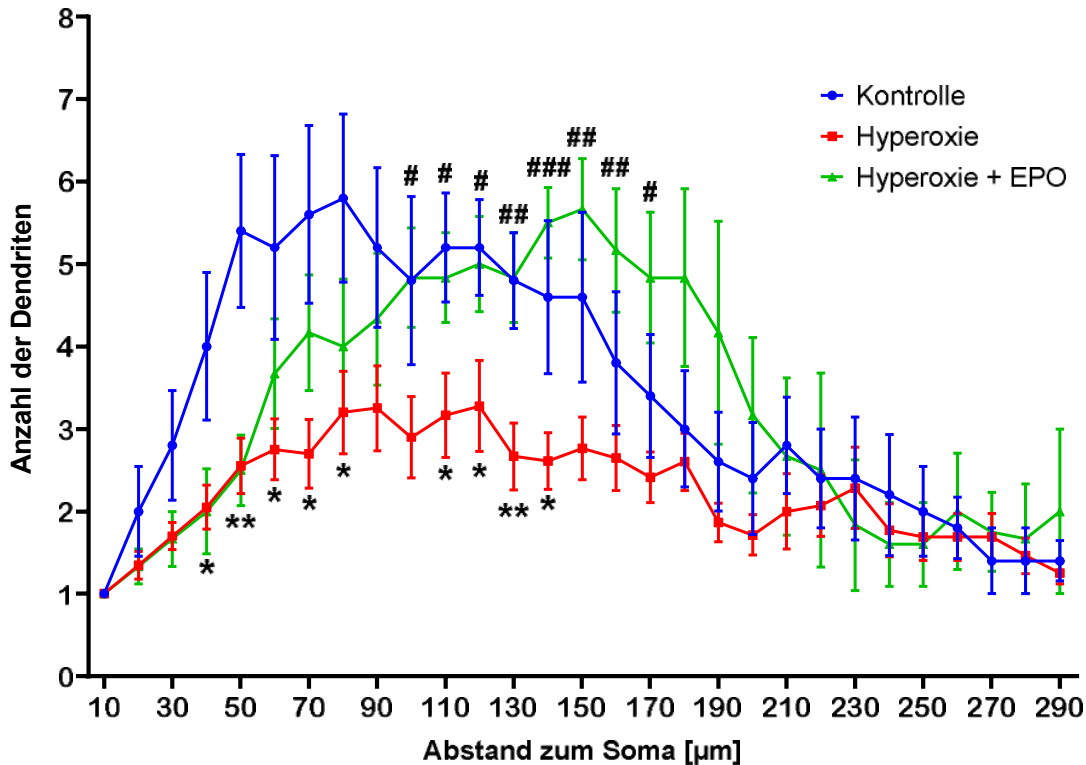
In den tiefen Schichten sah man in der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Verzweigungsreduktion der Basaldendriten bei einer Entfernung von 30 – 110 µm, 150 µm und 180 – 190 µm. Die mit rEPO behandelten Zellen zeigten erneut eine annähernde Normalisierung der Werte. So war in der rEPO-Gruppe eine signifikant vermehrte Verzweigung bei 50 – 110 µm im Vergleich zur Hyperoxie-Gruppe nachweisbar (siehe Abbildung 4.8).



**Abbildung 4.8:** Anzahl der Basaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma in der tiefen Schicht des motorischen Kortex.

Kontrolle:  $n = 12$ . Hyperoxie:  $n = 17$ . Hyperoxie + rEPO:  $n = 6$ . \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$  Hyperoxie gegenüber Kontrolle. # $P \leq 0,05$  Hyperoxie gegenüber Hyperoxie + rEPO. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Mann-Whitney-U-Test

Bei den Apikaldendriten konnte man in der Hyperoxie-Gruppe signifikant weniger Dendriten bei 40 – 80 und 110 – 140  $\mu\text{m}$  im Vergleich zur Kontrolle zählen. Die Zellen der rEPO-Gruppe zeigten erneut eine selektive Annäherung an die Kontrollgruppe, sodass signifikant mehr Dendriten im Vergleich zur Hyperoxie-Gruppe bei 100 – 170  $\mu\text{m}$  zu sehen waren. Bei 50  $\mu\text{m}$  waren zusätzlich signifikant weniger Dendriten in der rEPO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen (Siehe Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9:** Anzahl der Apikaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma in der tiefen Schicht des motorischen Kortex

Kontrolle: n = 5. Hyperoxie: n = 20. Hyperoxie + rEPO: n = 6. \*P ≤ 0,05, \*\*P ≤ 0,01 Hyperoxie gegenüber Kontrolle. #P ≤ 0,05, ##P ≤ 0,01, ###P ≤ 0,001 Hyperoxie gegenüber Hyperoxie + rEPO. Mittelwert ± Standardfehler. Mann-Whitney-U-Test

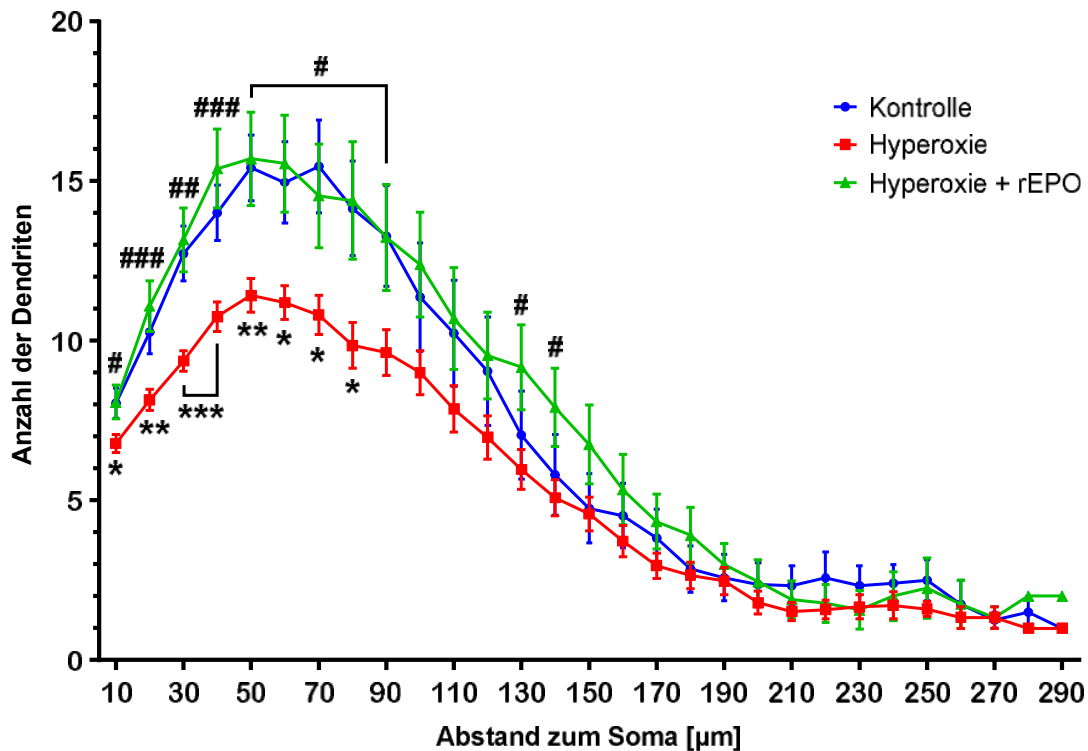
Allerdings ist für die tiefe Schicht des motorischen Kortex wichtig zu erwähnen, dass ein hoher Anteil der Pyramidenzellen in dieser Auswertung tendenziell in den tieferen Schichten gesehen wurde, eine zweifelsfrei eindeutige Zuordnung zu einer tieferen oder oberflächlichen Schicht war lichtmikroskopisch jedoch nicht sicher genug. Weiterhin zu berücksichtigen ist niedrige die Fallzahl in der Kontrollgruppe für Apikaldendriten und in der rEPO-Gruppe sowohl für Basal-, als auch Apikaldendriten.

### 4.3.3 Einfluss von Hyperoxie und rEPO im sensorischen Kortex

Im sensorischen Kortex wurde methodisch identisch vorgegangen wie für den cingulären und motorischen Kortex. Ebenso wurde zwischen einer oberflächlichen und tiefen Schicht unterschieden.

## 4.3.3.1 Sensorischer Kortex – oberflächliche Schicht

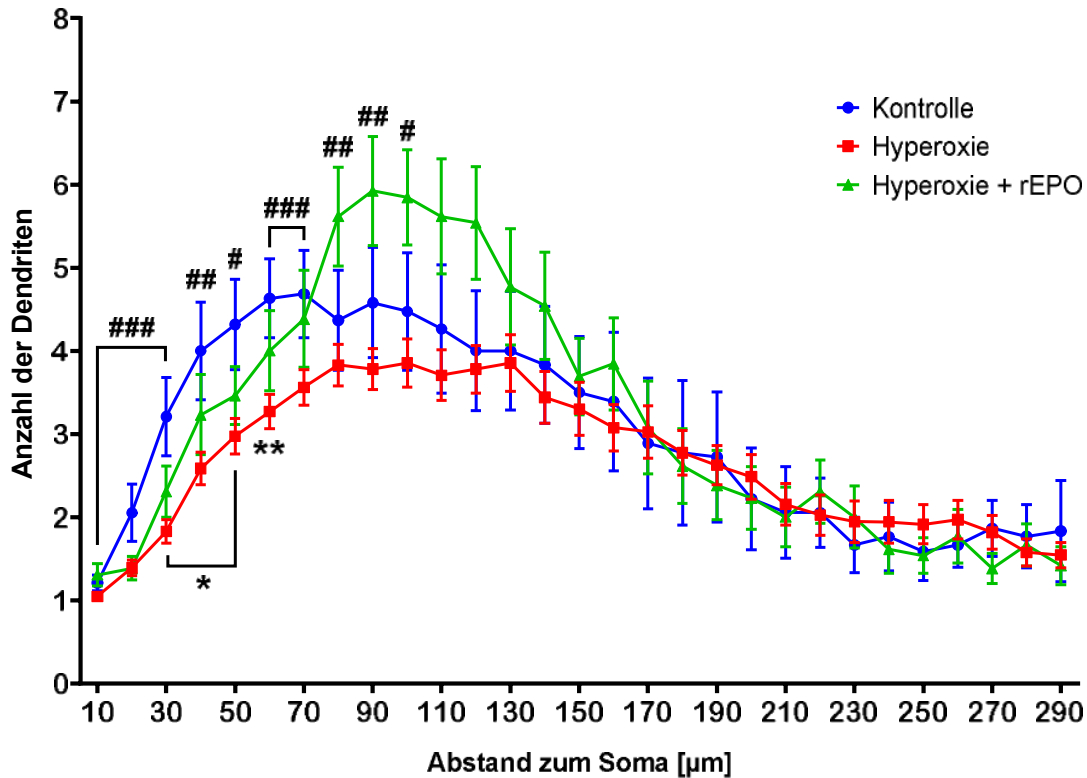
Hier zeigte sich, dass die Pyramidenzellen der Hyperoxie-Gruppe bei einem Abstand zum Soma von 10 – 80  $\mu\text{m}$  weniger basale Dendriten aufwiesen als die der Kontrolltiere. Erneut glichen sich die Werte der mit rEPO behandelten Neurone denen der Kontrolltiere an. Die Pyramidenzellen der rEPO-Gruppe zeigte im Vergleich zur Hyperoxie-Gruppe signifikant mehr Dendriten ab einer Distanz von 10 – 90  $\mu\text{m}$  und erneut ab 130 – 140  $\mu\text{m}$  (siehe Abbildung 4.10).



**Abbildung 4.40:** Anzahl der Basaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma in der oberflächlichen Schicht des sensorischen Kortex

Kontrolle: n = 22. Hyperoxie: n = 41. Hyperoxie + rEPO: n = 13. \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$ , Hyperoxie gegenüber Kontrolle. # $P \leq 0,05$ , ## $P \leq 0,01$ , ### $P \leq 0,001$ , Hyperoxie gegenüber Hyperoxie + rEPO. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Mann-Whitney-U-Test

Die apikalen Dendriten der Hyperoxie-Gruppe zeigten in der oberflächlichen Schicht signifikant weniger Verzweigungen bei 30 – 60  $\mu\text{m}$  im Vergleich zur Kontrolle. Außerdem war in der rEPO-Gruppe signifikant mehr Apikaldendriten bei 10 – 100  $\mu\text{m}$  gegenüber der Hyperoxie-Gruppe zu sehen (siehe Abbildung 4.11).



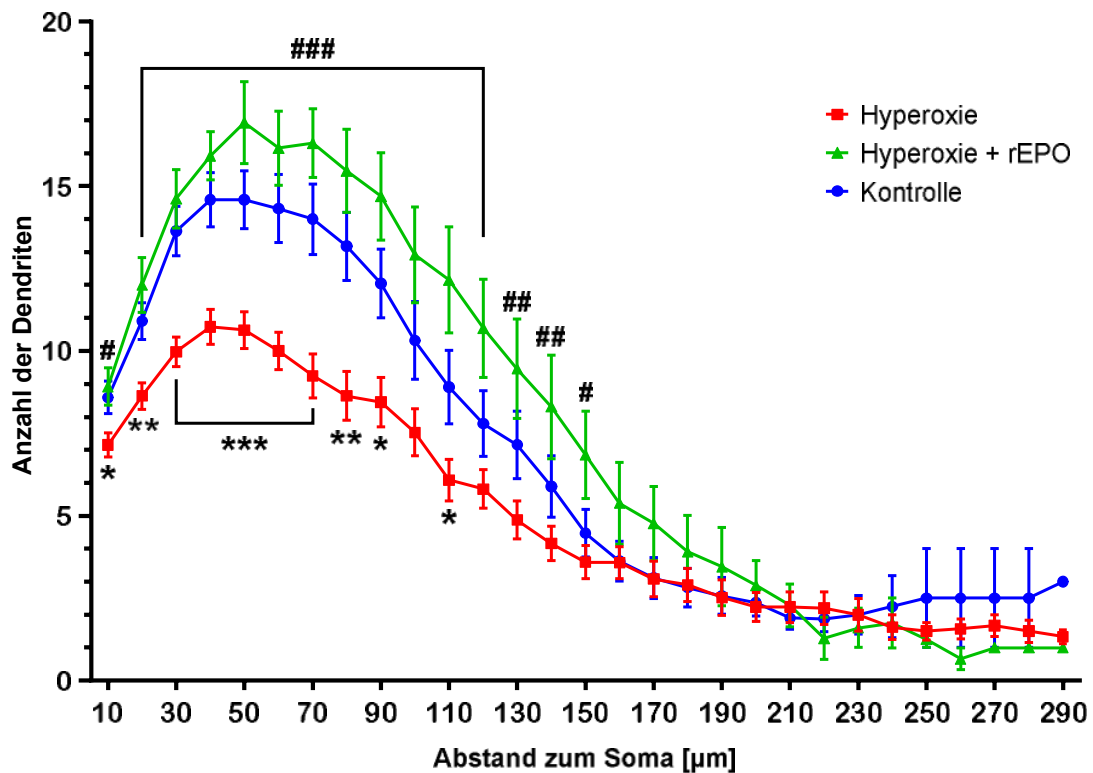
**Abbildung 4.51:** Anzahl der Apikaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma in der oberflächlichen Schicht des sensorischen Kortex

Kontrolle: n = 19. Hyperoxie: n = 41. Hyperoxie + rEPO: n = 13. \*P ≤ 0,05, \*\*P ≤ 0,01 Hyperoxie gegenüber Kontrolle. #P ≤ 0,05, ##P ≤ 0,01, ###P ≤ 0,001 Hyperoxie gegenüber Hyperoxie + rEPO. Mittelwert ± Standardfehler. Mann-Whitney-U-Test

Wichtig zu erwähnen ist hier erneut der hohe Anteil an Pyramidenzellen in der Auswertung der Basaldendriten, die nicht eindeutig der tiefen oder oberflächlichen Schicht zugeordnet werden konnten. Bei den Apikaldendriten trifft dies lediglich auf die Zellen der Kontroll- und rEPO-Gruppe zu.

## 4.3.3.2 Sensorischer Kortex – tiefe Schicht

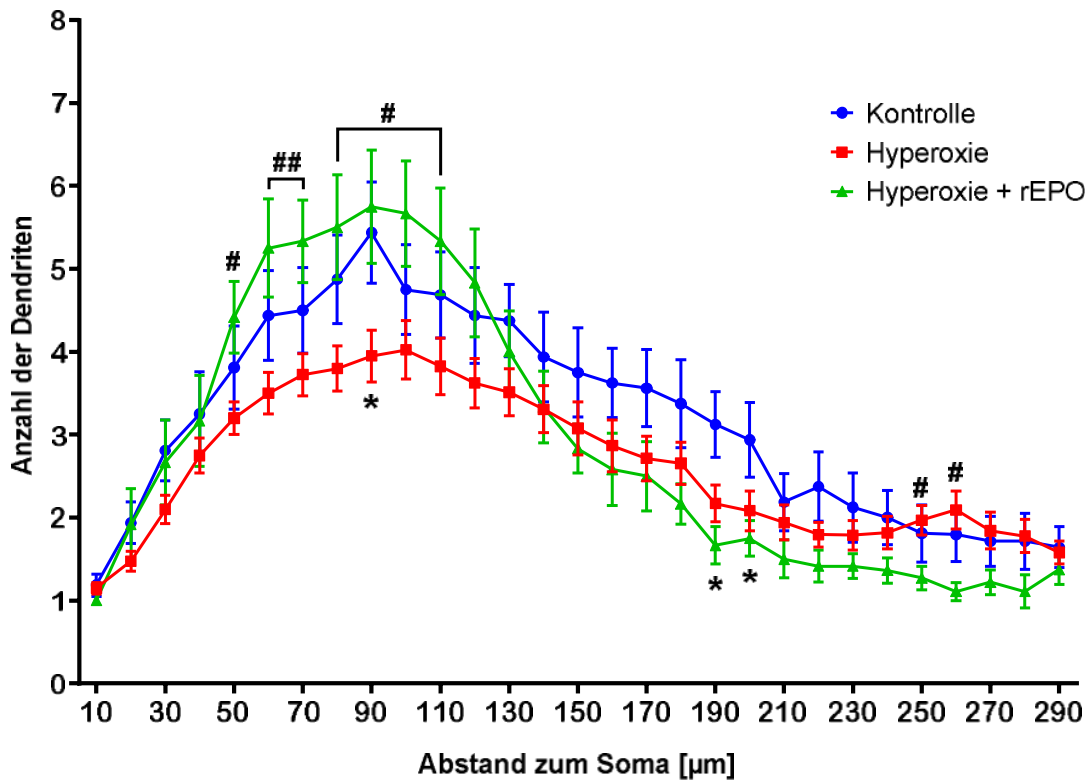
Auch hier konnte in der Hyperoxie-Gruppe eine signifikante Verzweigungsreduktion basaler Dendriten bei einem Abstand von 10 – 90  $\mu\text{m}$  und 110  $\mu\text{m}$  im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Pyramidenzellen der rEPO-Gruppe zeigten wieder eine Annäherung der basaldendritischen Verzweigung an die der Kontrollgruppe. Bei einem Abstand von 10 – 150  $\mu\text{m}$  war eine signifikant vermehrte Anzahl basaler Dendriten der rEPO-Gruppe im Vergleich zur Hyperoxie-Gruppe nachweisbar (siehe Abbildung 4.12).



**Abbildung 4.62:** Anzahl der Basaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma in der tiefen Schicht des sensorischen Kortex.

Kontrolle:  $n = 22$ . Hyperoxie:  $n = 41$ . Hyperoxie + rEPO:  $n = 13$ . \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$  Hyperoxie gegenüber Kontrolle. # $P \leq 0,05$ , ## $P \leq 0,01$ , ### $P \leq 0,001$  Hyperoxie gegenüber Hyperoxie + rEPO. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Mann-Whitney-U-Test

Weiterhin konnte in den tieferen Schichten signifikant weniger Apikaldendriten in der Hyperoxie-Gruppe bei 90  $\mu\text{m}$  und 190 – 200  $\mu\text{m}$  im Vergleich zur Kontrollgruppe gezählt werden. In der rEPO-Gruppe waren bei 50 – 110  $\mu\text{m}$  signifikant mehr und bei 250 – 260  $\mu\text{m}$  signifikant weniger Dendriten im Vergleich zur Hyperoxie-Gruppe nachweisbar (Siehe Abbildung 4.13).



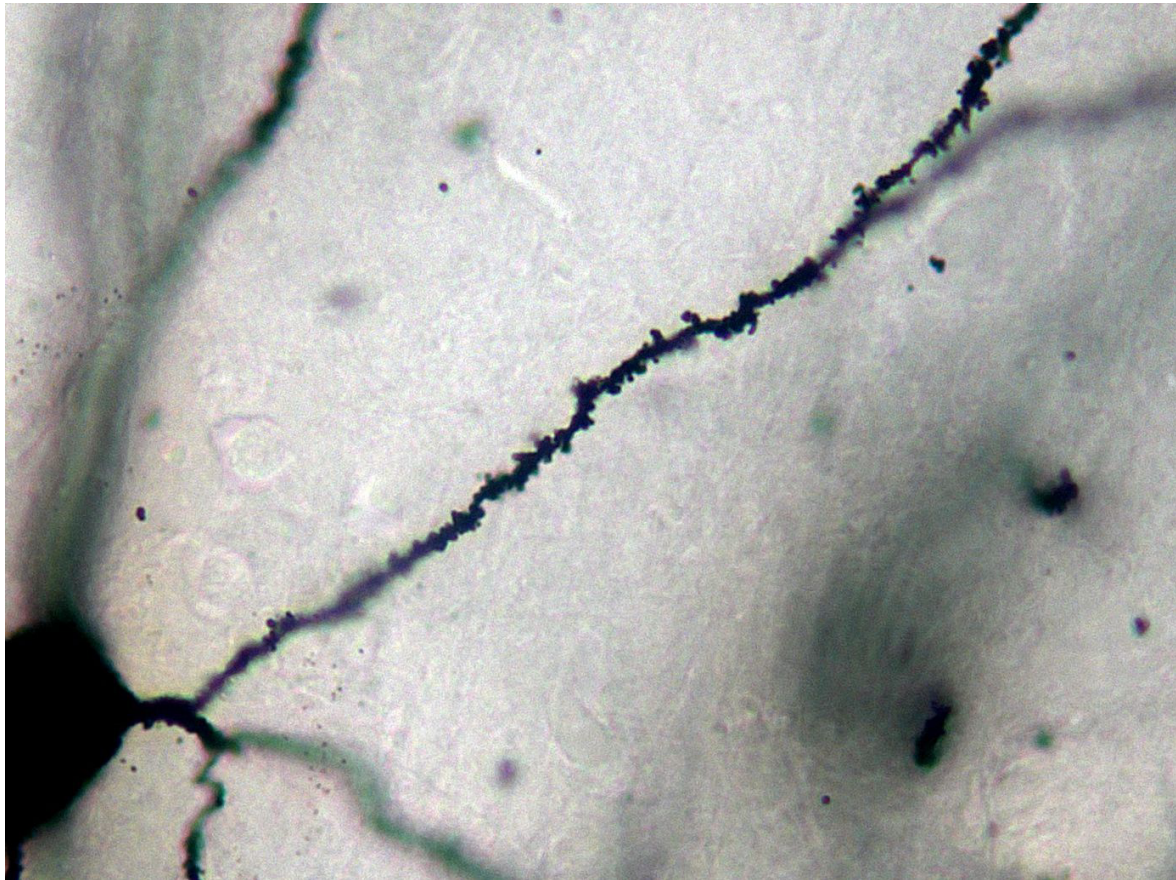
**Abbildung 4.73:** Anzahl der Apikaldendriten in Abhängigkeit zum Abstand zum Soma in der tiefen Schicht des sensorischen Kortex.

Kontrolle: n = 16. Hyperoxie: n = 40. Hyperoxie + rEPO: n = 12. \* $P \leq 0,05$  Hyperoxie gegenüber Kontrolle. # $P \leq 0,05$ , ## $P \leq 0,01$  Hyperoxie gegenüber Hyperoxie + rEPO. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Mann-Whitney-U-Test



#### 4.4 Histologische Analyse der Synapsen der Pyramidenzelle für P23

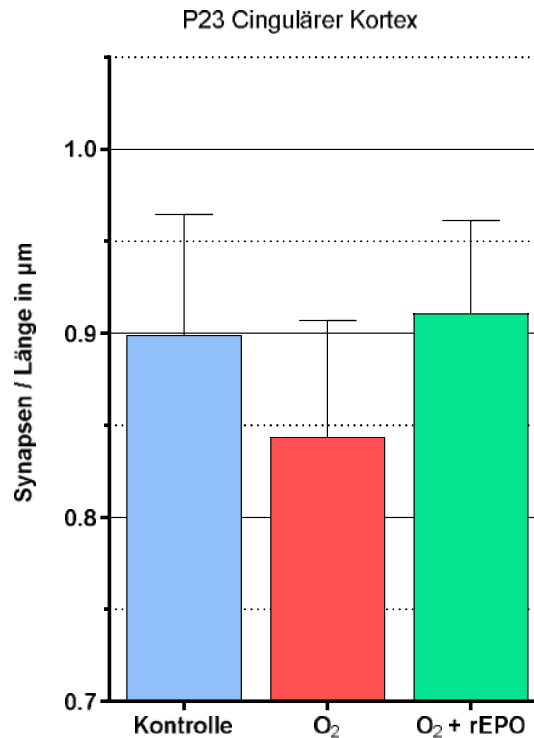
Zur Visualisierung der Synapsen wurden die gleichen Hirnpräparate, die für die morphometrischen Untersuchungen verwendet wurden, bei 100-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch untersucht. Hierfür wurden ausschließlich basale Dendriten mit einer Länge von mindestens 40  $\mu\text{m}$  im cingulären, motorischen und sensorischen Kortex herangezogen. Abbildung 4.14 verdeutlicht wie die Pyramidenzelle, insbesondere die Dendriten, in der Golgi-Cox-Färbung in 100-facher unter dem Mikroskop aussehen. Die Synapsen wurden mittels ImageJ Software ausgezählt und durch die entsprechende Länge dividiert, um das Verhältnis von Synapsen zur Dendritenlänge bzw. die Synapsendichte zu ermitteln.



**Abbildung 4.84:** Golgi-Cox-Färbung eines Maushirnpräparats zur Untersuchung der Spines. Beispielhaft hier aus der tiefen Schicht des sensorischen Kortex einer Maus der Kontrollgruppe in 100-facher Vergrößerung. Der Dendritenverlauf und die Spines als pilzförmige Vorwölbung sind deutlich erkennbar.

#### 4.4.1 Einfluss von Hyperoxie und rEPO auf den cingulären Kortex

Auch im cingulären Kortex wurde nicht zwischen einer oberflächlichen und tiefen Schicht differenziert. Hier zeigte sich unter allen drei Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Synapsen pro  $\mu\text{m}$  Dendrit (siehe Abbildung 4.15).



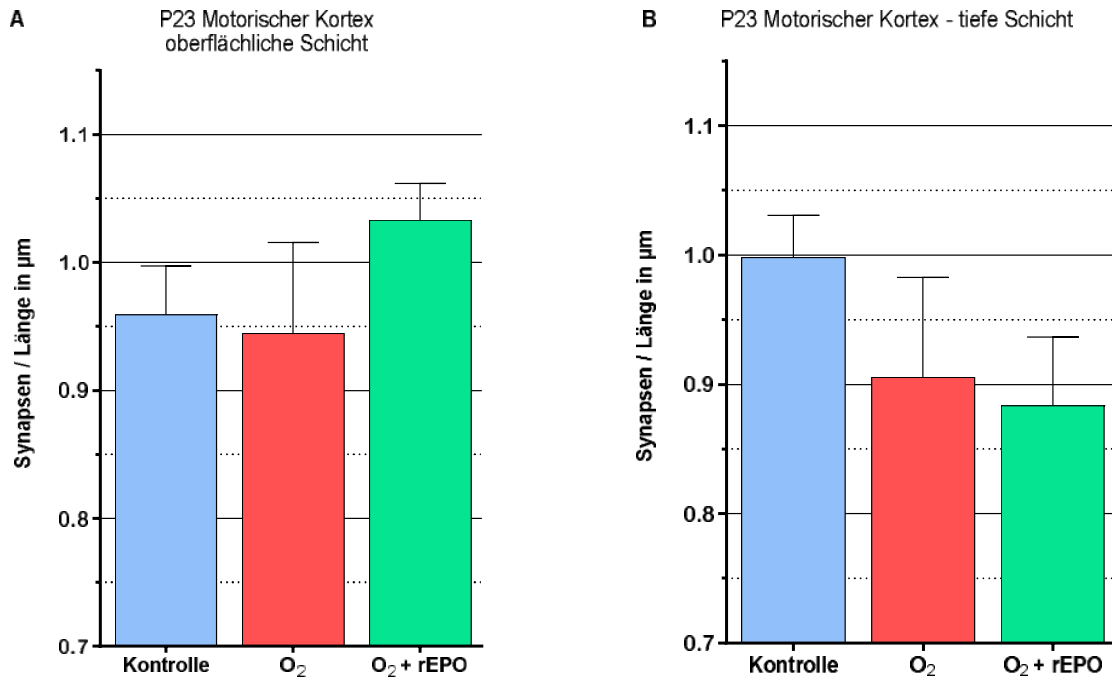
**Abbildung 4.95:**  
Synapsen pro  $\mu\text{m}$  basaler Dendrit bei P23 im cingulären Kortex.  
O<sub>2</sub> = Hyperoxie  
Kontrolle und O<sub>2</sub>: n = 10. O<sub>2</sub> + rEPO: n=12  
Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Mann-Whitney-U-Test

#### 4.4.1 Einfluss von Hyperoxie und rEPO im motorischen Kortex

Bis auf die Unterscheidung zwischen einer oberflächlichen und tiefen Schicht wurde im motorischen Kortex in der Methodik identisch vorgegangen wie im cingulären Kortex. Hier zeigt sich unter allen drei Gruppen ebenfalls kein signifikanter Unterschied, sowohl in der oberflächlichen als auch tiefen Schicht (Siehe 4.16).

#### 4.4.2 Einfluss von Hyperoxie und rEPO im sensorischen Kortex

Auch im sensorischen Kortex wurde zwischen oberflächlicher und tiefer Schicht unterschieden und methodisch identisch wie im präfrontalen und motorischen Kortex vorgegangen. Auch hier zeigt sich in der oberflächlichen und tiefen Schicht unter allen drei Gruppen kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 4.17).

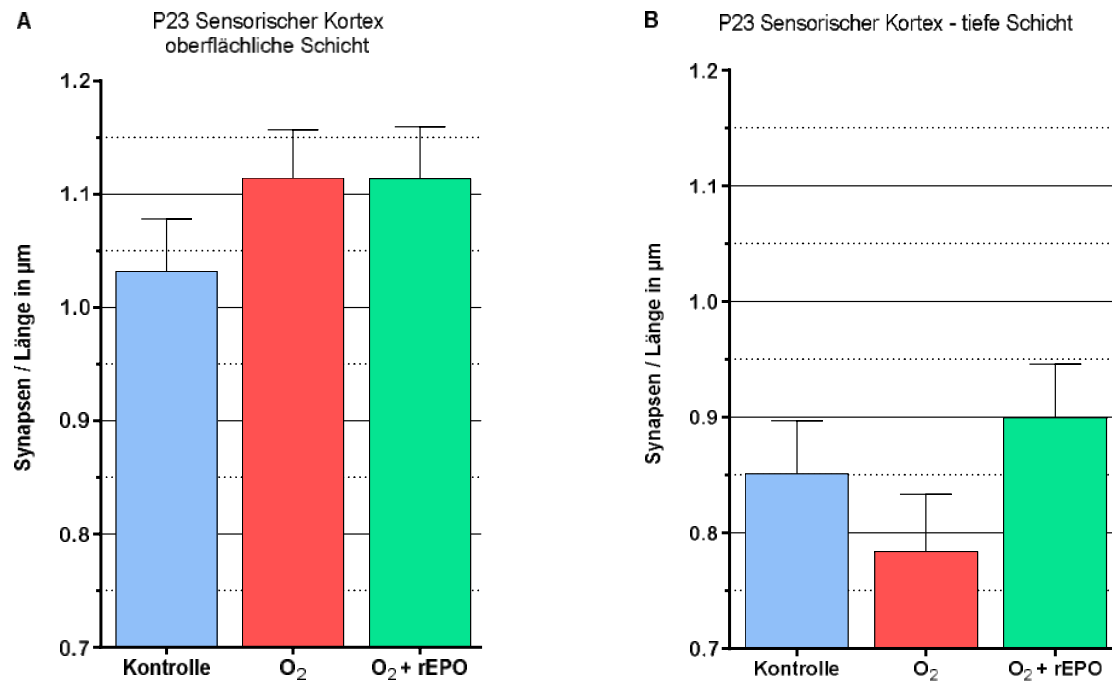


**Abbildung 4.16:** Synapsen pro  $\mu\text{m}$  basaler Dendrit bei P23 im motorischen Kortex.

A: Oberflächliche Schicht. Kontrolle und O<sub>2</sub> + rEPO: n = 11. O<sub>2</sub>: n = 10

B: Tiefe Schicht. Kontrolle: n = 12. O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> + rEPO: n = 10

O<sub>2</sub> = Hyperoxie. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Mann-Whitney-U-Test



**Abbildung 4.17:** Synapsen pro  $\mu\text{m}$  basaler Dendrit bei P23 im sensorischen Kortex.

A: Oberflächliche Schicht. Kontrolle: n = 21. O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> + rEPO: n = 11

B: Tiefe Schicht. Kontrolle und O<sub>2</sub>: n = 10. O<sub>2</sub> + rEPO: n = 11.

O<sub>2</sub> = Hyperoxie. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Mann-Whitney-U-Test

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Allgemeine Betrachtung

Klinische Daten aus pro- und retrospektiven Studien deuten darauf, dass neonatale Hyperoxie bei Frühgeborenen nicht nur Retina und Lunge schädigt, sondern auch das unreife Gehirn in einer Weise angreift, in der es nachhaltig zu pathologischen Veränderungen und Entwicklungsverzögerungen kommen kann mit lebenslangen Einschränkungen von kognitiven und psychomotorischen Fähigkeiten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es neue Erkenntnisse über die Auswirkungen von neonataler Hyperoxie und rEPO auf das unreife Gehirn zu erlangen. Genauer analysiert wurden dabei kortikale Pyramidenzellen, da sie in diesem Zusammenhang noch nicht zuvor untersucht wurden und mit jenen neurologischen Entwicklungsstörungen pathophysiologisch in Verbindung stehen können, die bei Frühgeborenen gehäuft auftreten. Dazu gehören u.a. die Autismus-Spektrum-Störung (ASS), die Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung, mentale Retardierung, Depressionen und Schizophrenie.<sup>27, 28</sup>

Da die entscheidenden Prozesse und Abläufe in der Gehirnentwicklung unter Säugetieren evolutionär gut erhalten geblieben sind, wurde als Tiermodell die fünf Tage alte Maus gewählt. Die Hirnentwicklung ähnelt in diesem Alter in vielerlei Hinsicht derjenigen von fetalen Gehirnen in der 24. Gestationswoche. In der postnatalen Maus erfolgt zudem ein vergleichbarer Wachstumsschub des Gehirns wie beim Feten im letzten Trimenon der Schwangerschaft. Untersucht wurden in dieser Arbeit der präfrontale, der motorische und der sensorische Kortex.

Nachdem fünf Tage alte Mäuse 48 Stunden bei 80% Sauerstoff verbrachten, zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der absoluten Zellzahl der mit CUX1 markierten Pyramidenzellen in den immunhistochemisch präparierten Hirnschnitten im Vergleich zu den Kontrolltieren an Raumluft. Die gleichzeitige Gabe von rEPO hatte ebenfalls keinen sichtbaren Effekt auf die Zahl der CUX1 positiven Zellen. In der Untersuchung des Dendritenbaums der Pyramidenzellen konnte jedoch in den untersuchten Kortices eine signifikante Verminderung der dendritischen Verzweigung durch Hyperoxie im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden, sowohl in

oberflächlichen als auch tiefen Kortexschichten. Die gleichzeitige Gabe von rEPO bewirkte zudem eine nahezu vollständige Normalisierung der Dendritenzahl in allen untersuchten Kortex-Arealen. Bei der Analyse der Synapsendichte auf sekundären Basaldendriten zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den drei Gruppen.

Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass neonatale Hyperoxie zu einer starken Hemmung der dendritischen Entwicklung der kortikalen Pyramidenzellen führt, und dass durch Anwendung von rEPO diese Schäden vermieden oder gemindert werden. Die Pyramidenzellzahl und Synapsendichte sind zwar im untersuchten Zeitraum unverändert, allerdings könnten theoretisch Veränderungen zu späteren Zeitpunkten der Entwicklung auftreten, die nicht Gegenstand dieser Arbeit waren.

Weitere bisher gut untersuchte und klinisch relevante Ursachen bzw. Modelle für perinatale Hirnschädigung bei Früh- und Reifgeborenen umfassen u.a. Hypoxie/Ischämie, Infektion/Inflammation, Exzitotoxizität durch Glutamat und deren Wechselwirkung. Für diese Schädigungswege sind im Labor entsprechende Tiermodelle etabliert, durch die das Verständnis über die pathophysiologischen Zusammenhänge zu erklären sind.<sup>42, 170, 171</sup> Bekannte und häufige Risikofaktoren für perinatale Hirnschädigung sind uteroplazentare Insuffizienz, Gestose, Infektion, Nabelschnurzwischenfälle, Geburtstraumata (z.B. abnorme Lage, Schulterdystokie u.a.), Frühgeburtlichkeit u.a.<sup>39, 172</sup>

Bei hypoxisch-ischämischen Insulten, unabhängig der Genese, kommt es aufgrund des Sauerstoffmangels zu einer inflammatorischen Reaktion, in dessen Folge große Mengen Glutamat und ROS ausgeschüttet bzw. gebildet werden, welche die Hirnzellen im weiteren Verlauf zum Teil schwer schädigen und ggf. zum Zelltod durch Apoptose führen.<sup>42, 170, 173</sup>

Frühgeborene tragen aufgrund der unreifen zerebralen Vaskularisierung ein hohes Risiko für einen hypoxisch-ischämischen Insult. Zudem wird das Risiko für eine Hypoperfusion zusätzlich durch den unreifen kardiopulmonalen Kreislauf erhöht und das Gehirn besitzt nur begrenzt autoregulatorische Fähigkeiten um die Perfusion aufrechtzuerhalten.<sup>174</sup> Dabei zeigt sich, dass bei Frühgeborenen vor allem die weiße Substanz extrem anfällig ist, mit einem Verlust der hier pränatal mehrheitlich vorkommenden Prä-Oligodendrozyten.<sup>175</sup> Es kommt zu einer fokalen periventrikulären Nekrose und einer diffusen Schädigung der weißen Substanz, typischerweise auf Höhe der Seitenventrikel und der *Foramina interventricularia* gelegen. Diese als

periventrikuläre Leukomalazie (PVL) bezeichnete Hirnschädigung ist vor allem typisch für Frühgeborene.<sup>(42, 98, 176)</sup>

Bei der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie (HIE) reifer Neugeborener sind dagegen insbesondere Areale der tiefer gelegenen grauen Substanz betroffen, so etwa in Thalamus, Basalganglien, Hippocampus.<sup>42, 170, 177</sup>

Schwere und zeitlicher Ablauf des Insults und/oder der Inflammation, der Reifegrad, Komorbiditäten, Geschlecht und Genetik bestimmen die individuelle Vulnerabilität für Hirnschäden und damit das klinische Bild.<sup>(178)</sup>

Experimentelle Studien über die Auswirkungen von Hypoxie/Ischämie auf kortikale Pyramidenzellen von neugeborenen Ratten und Schafen konnten übereinstimmend zeigen, dass Hypoxie/Ischämie zu einem verminderten dendritischen Wachstum führt.<sup>179, 180</sup> Auch bei ausgewachsenen Ratten konnte nach Hypoxie/Ischämie ein vermindertes dendritisches Wachstum kortikaler Pyramidenzellen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren nachgewiesen werden.<sup>181</sup> Für hippocampale CA1 Pyramidenzellen bei Ratten wurde ebenfalls ein vermindertes dendritisches Wachstum nach Hypoxie/Ischämie nachgewiesen.<sup>182</sup>

Hinsichtlich der weiteren Pathophysiologie zeigen zahlreiche experimentelle Studien, dass Ausmaß und Schwere einer perinatalen Hirnschädigung eng mit der Menge an pro-inflammatorischen Zytokinen und der Aktivität von Immunzellen, insbesondere der Mikroglia, assoziiert sind, vergleichbar wie bei Frühgeborenen.<sup>183</sup> Die initial nach Hirnschädigung aktivierte Mikroglia spielt eine zentrale Rolle in der Neuroinflammation, bei der über pro-inflammatorische Zytokine, vor allem TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL-6 und IL-18, und weiteren Immunzellen aus der Peripherie die Ausschüttung von Proteasen, Glutamat und ROS getriggert und die Hirnschädigung weiter unterhalten wird.<sup>174, 184</sup> Eine große klinische Studie aus der Schweiz zeigte darüber hinaus, dass eine systemische Inflammation im Rahmen einer Neugeborenenensepsis ebenfalls zu signifikanten Beeinträchtigungen in der neurologischen Entwicklung Frühgeborener führt, unabhängig von anderen Risikofaktoren wie z.B. ein geringes GA, BPD, Hirnblutungen, PVL und ROP.<sup>185</sup> Experimentell konnte nach systemischer Inflammation neugeborener Mäuse eine verzögerte Reifung von Oligodendrozyten nachgewiesen werden.<sup>183</sup>

In einer experimentellen Studie wurden die Auswirkungen einer pränatalen viralen Infektion mittels eines synthetischen Doppelstrang-RNA Moleküls auf kortikale Pyramidenzellen ausgewachsener Mäuse untersucht.<sup>186</sup> Bei erhöhter Aktivität von Mikroglia zeigten die kortikalen Pyramidenzellen ein verändertes dendritisches

Wachstum mit einer reduzierten Dendritenanzahl bei einem Radius von 50  $\mu\text{m}$  Abstand zum Soma und sogar verstärkt ab 100  $\mu\text{m}$  Abstand zum Soma. Insgesamt war die Komplexität des Dendritenbaums deutlich vermindert.<sup>186</sup> Nach Injektion eines synthetischen Doppelstrang RNA-Moleküls bei schwangeren Rhesusaffen, zeigten die neugeborenen Affen im Alter von 3,5 Jahren keine signifikanten Unterschiede im dendritischen Wachstum kortikaler Pyramidenzellen, jedoch andere morphologische Veränderungen, wie z.B. ein verminderter Durchmesser der Apikaldendriten.<sup>187</sup> In einem weiteren Experiment wurde bei Ratten eine pränatale inflammatorische Reaktion mittels Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) getriggert um anschließend die Auswirkungen auf kortikale und hippocampale Pyramidenzellen an drei Zeitpunkten zu untersuchen. Zu allen Altersstufen (P10, 35, 60) war ein vermindertes dendritisches Wachstum nach LPS Injektion nachweisbar.<sup>188</sup> Vergleichbare Resultate ergaben Experimente aus Zellkulturen mit embryonalen Neuronen des Kortex und Hippocampus der Maus/Ratte. Die Neurone wurden pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6) ausgesetzt und zeigten daraufhin ein vermindertes Wachstum der Neuriten.<sup>189, 190</sup>

Die exzitotoxische Wirkung durch pathologisch erhöhte Mengen von Glutamat spielt im Rahmen der perinatalen Hirnschädigung für Früh- und Reifgeborene pathophysiologisch eine wichtige Rolle.<sup>178</sup> Sowohl nach Hypoxie/Ischämie als auch nach Inflammation konnte experimentell in Zellkulturen und Tiermodellen eine erhöhte Ausschüttung und verminderte Wiederaufnahme von Glutamat nachgewiesen werden. Weiterhin waren im Liquor von Neugeborenen mit HIE eine erhöhte Konzentration Glutamat messbar, welche zudem mit der Schwere der HIE korrelierte.<sup>191</sup> Mittels Magnetresonanztomographie wurden auch erhöhte Mengen Glutamat in den Basalganglien und Thalami Neugeborener mit schwerer HIE nachgewiesen.<sup>192</sup> Der erhöhte extrazelluläre Gehalt von Glutamat aktiviert dabei nicht nur synaptische, sondern auch extrasynaptische NMDA Rezeptoren - mit einem massiven zellulären Calciumeinstrom als Folge. Der Calciumüberschuss und die durch Calcium getriggerte Aktivierung der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) führen zusammen zu mitochondrialer Dysfunktion und Produktion von ROS. Im weiteren Verlauf kommt es zur Aktivierung von Caspasen und folglich zur Apoptose.<sup>170, 193</sup>

Hinsichtlich der Auswirkungen von Glutamat auf Pyramidenzellen konnte für kortikale und hippocampale CA1 Pyramidenzellen von neugeborenen Ratten gezeigt werden, dass erhöhte Mengen Glutamat zu einem signifikant verminderten dendritischen Wachstum führt, ähnlich wie in der vorliegenden Studie.<sup>194, 195</sup>

Insgesamt sind die in diesen Studien gezeigten pathologischen Veränderungen an kortikalen Pyramidenzellen im unreifen Gehirn vergleichbar mit denen der vorliegenden Studie. Dies deutet erstmals darauf hin, dass neonatale Hyperoxie im unreifen Gehirn kortikale Pyramidenzellen ähnlich schwer schädigt, wie in den genannten bereits etablierten Schädigungsmodellen.

Wie in der Einleitung erwähnt, wurde rEPO erfolgreich als potenzielles Neuroprotektivum in vielen verschiedenen experimentellen Tiermodellen für perinatale Hirnschädigung getestet, i.e. Hypoxie, Hypoxie/Ischämie, Ischämie/Reperfusion, Exzitotoxizität, intrazerebrale und -ventrikuläre Hämorrhagie, Rückenmarksverletzung und PVL.<sup>155, 157–159, 165</sup> In einigen Studien wurde zudem die Auswirkungen von rEPO auf perinatale Hirnschädigung durch neonatale Hyperoxie bei Mäusen/Ratten getestet. Auch hier zeigte rEPO in allen bisher durchgeführten Studien neuro- und zellprotektive Eigenschaften und verminderte den Hyperoxie induzierten Schaden. Die Anwendung von rEPO erfolgte hierbei in der Mehrzahl der Studien über eine einmalige intraperitoneale Gabe von 20.000 IE/kg rEPO.<sup>95, 111–113, 118</sup> In einer Studie wurde rEPO intraperitoneal mit 1.000 IE/kg/Tag über fünf Tage appliziert.<sup>166</sup>

Ein wichtiger zu diskutierender Aspekt ist dabei die Dosierung und Anwendungsform von rEPO. Damit rEPO die (intakte) Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, sind höhere Dosierungen notwendig als für die Stimulation der Erythropoese. Verschiedene Studien über die Auswirkungen von rEPO auf perinatale Hirnschädigung bei Nagetieren zeigen den größten neuroprotektiven Effekt durch mehrmalige Gaben von 1000 – 5000 IE/kg.<sup>145, 196</sup> In einer Studie wurden verschiedene rEPO Dosierungen bei neugeborenen hypoxisch-ischämischen Ratten hinsichtlich größtmöglicher Neuroprotektion untersucht. Hier erzielte die dreimalige Gabe von 5000 IU/kg oder eine einmalige Gabe von 30.000 IU/kg den größten neuroprotektiven Effekt. Insgesamt zeigte die Effektivität der Neuroprotektion eine U-förmige Dosiskurve: sowohl zu geringe, als zu hohe Mengen rEPO verhinderten eine neuroprotektive Wirkung.<sup>160</sup> Bei zu hohen Mengen steigt jedoch das Risiko für negative Effekte, so zeigte eine sehr hohe Dosis rEPO (40 IE/ml) neurotoxische Effekte auf neuronale Zellkulturen *in vitro* und gesteigerte Zelldegeneration neugeborener Ratten unter moderater Hypoxie.<sup>197</sup> Bisher bekannte Nebenwirkungen bei dauerhafter Einnahme von EPO bei erwachsenen Menschen sind Polyzythämie, Hautausschlag, Bluthochdruck, Herzinfarkt, Schlaganfall, selten Krampfanfälle u.a. Über keine dieser oder andere relevante Nebenwirkungen wurde bisher bei Neu- und Frühgeborenen berichtet, sowohl bei geringen EPO Dosierungen als



Therapie im Rahmen einer Anämie, als auch bei hohen Dosierungen im Rahmen klinischer Studien.<sup>136, 198</sup> Allerdings wurde in einigen Studien eine transiente Neutropenie bei Neugeborenen beobachtet.<sup>145, 199</sup> Weiterhin zeigte eine retrospektive Studie, dass die Anwendung von EPO mit einer erhöhten Inzidenz von Hämangiomen bei Frühgeborenen assoziiert ist.<sup>200</sup>

Hinsichtlich der Anwendungsform im experimentellen Setting konnte bereits in früheren Studien ein eindeutiger neuroprotektiver Effekt durch intraperitoneal appliziertes rEPO nachgewiesen werden, auch im Hyperoxie-Schädigungsmodell.<sup>108, 111, 196</sup> Im Vergleich zur subkutanen Injektion zeigt die intraperitoneale Gabe bei neugeborenen Ratten eine schnellere Aufnahme ins Blut und ein höhere maximale Plasmakonzentration.<sup>201</sup> Da die Passage von rEPO durch die Blut-Hirn-Schranke abhängig vom Plasmaspiegel ist, kann über die intraperitoneale Applikation in kürzerer Zeit mehr rEPO ins ZNS gelangen als über eine subkutane.<sup>201</sup> Die Anwendung bei Patienten kann subktan oder intravenös erfolgen.<sup>202</sup>

Für die Experimente in dieser Studie kann die angewendete Dosierung und intraabdominelle Verabreichung des rEPO als sichere Methode angesehen werden, um den hier nachgewiesenen neuroprotektiven Effekt auf das rEPO zurückführen zu können.

## 5.2 Interpretation und Einordnung der Ergebnisse

### 5.2.1 Hyperoxie und rEPO haben keine Auswirkung auf die Anzahl von CUX1<sup>+</sup>-Pyramidenzellen

In experimentellen Studien an sechs Tage alten (P6) Wistar Ratten, die über 2 – 72 Stunden 80% Sauerstoff ausgesetzt waren, wurde eine erhöhte Rate degenerierender oder apoptotischer Zellen in mehreren Hirnregionen anhand von Silberfärbung nachgewiesen.<sup>107, 166</sup> Anstelle von Ratten wurden in den hier durchgeführten Experimenten im Hyperoxie-Modell Mäuse im Alter von 5 Tagen über 48 Stunden (von P5 – P7) 80% Sauerstoff ausgesetzt. Bei neugeborenen Mäusen im Alter P5 ähnelt der Reifegrad des Gehirns dem eines 24 Wochen alten menschlichen Feten. Um in den Mäusen spezifischer zu analysieren, ob neonatale Hyperoxie auch zu einem Zelluntergang von kortikalen Pyramidenzellen führt, wurde die Anzahl von Pyramidenzellen mittels CUX1 als charakteristischem Marker in immunhistologischer Färbung gleich nach Hyperoxie im Alter P7 und nach einer Erholungsphase an Raumluft

im Alter P23 ermittelt. Im Alter von P7 vollzieht das Gehirn bei Mäusen wie bei Ratten den größten Wachstumsschub und ist durch exogene Noxen empfindlich zu stören.<sup>45</sup> Die Hirnreifung im Alter P23 ähnelt hingegen derjenigen eines 3 – 4-jährigen Kleinkindes, bei dem 90 – 95% des adulten Gehirnvolumens bereits erreicht ist.<sup>58</sup> Weiteres Ziel der Studie war es zu untersuchen, ob eine Hyperoxie-induzierte Schädigung von Pyramidenzellen durch die Applikation von rekombinantem Erythropoetin (rEPO) vermieden oder vermindert werden kann. Mehrere Studienergebnisse weisen auf eine anti-apoptotische Wirkung durch rEPO hin, wie auch im Hyperoxie-Modell der Ratte bereits dargelegt wurde.<sup>111, 118</sup> Unter anderem wurde die verminderte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und pro-apoptotischen Proteinen der Bcl-Familie und Caspasen unter rEPO Gabe nachgewiesen.<sup>111, 112, 134</sup>

In den immunhistochemischen Färbungen der vorliegenden Studie an Pyramidenzellen der oberen Schichten II und III mit CUX1-Antikörpern und Darstellungen der Zellkerne mit DAPI konnte in der Auswertung im sensorischen Kortex sowohl für P7 als auch für P23 kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden werden. Zudem fand sich in der mit rEPO behandelten Gruppe bei P7 ebenfalls kein signifikanter Unterschied der CUX1 positiven Pyramidenzellen im Vergleich zwischen den Hyperoxie- und den Kontrolltieren. Dies weist darauf hin, dass neonatale Hyperoxie zu keinem vermehrten Zelluntergang unreifer kortikaler Pyramidenzellen und anderer kernhaltiger Zellen im sensorischen Kortex bei P7 und P23 führt. Die Anwendung von rEPO bei P7 hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Zellzahl nach Hyperoxie-Exposition. Diese Ergebnisse widersprechen somit der Hypothese, dass neonatale Hyperoxie einen erhöhten Zelluntergang in Pyramidenzellen bewirkt. Auch wenn 75 – 80% der Zellen im Kortex Pyramidenzellen sind, wurde in den Studien aus 2004 und 2008 nicht spezifiziert, welche Zelltypen in welchen Kortexarealen von der erhöhten Apoptose betroffen waren, es wurden lediglich Marker für Zelldegeneration (TUNEL-Methode, DeOlmos-Silberfärbung oder ELISA für DNA-Fragmente) quantifiziert.<sup>107, 166</sup> Im Gegensatz dazu haben wir in dieser Studie eine spezifische Markierung der zu untersuchenden Zellpopulation durchgeführt. Daher ist anzunehmen, dass die zuvor berichtete Erhöhung von Degeneration oder Apoptose zerebraler Zellen eine andere Zellart betrifft. Zu beachten ist, dass in unserer Arbeit Mäuse anstelle von Ratten benutzt wurden. Auch wenn diese Tierarten sehr viele Gemeinsamkeiten teilen, so gibt es doch Unterschiede in der Gehirnentwicklung. Dies könnte theoretisch einen Einfluss auf die Ergebnisse bei postnatalen Schädigungsmodellen haben.<sup>203, 204</sup> In Versuchen zur Auswirkung von

neonataler Hyperoxie auf die Entwicklung von Oligodendroglia wurde in Mäusen gezeigt, dass nach Hyperoxie Exposition insbesondere die Proliferation und die Reifung von oligodendroglären Vorläuferzellen zu verzeichnen war, und auch dort Zelltod keine wesentliche Rolle spielte.<sup>105</sup>

Wie in der Einleitung bereits erläutert spielen Veränderungen kortikaler Pyramidenzellen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie vieler verschiedener neurologischer Entwicklungsstörungen. Exzitatorische Pyramidenzellen stellen die dominierende Neuronenklasse sowohl im präfrontalen als auch im sensomotorischen Kortex dar, also jene Hirnareale, die aufgrund der gezeigten Symptome vor allem im Spektrum autistischer Störungen und des Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndroms (ADHS), aber auch Schizophrenie von großem Interesse sind. An dieser Stelle sollen die bisherigen Ergebnisse anhand bisheriger Erkenntnisse im Autismus-Spektrum-Syndrom (ASS) als ein Vertreter für neurologische Entwicklungsstörungen mit überaus vielfältigen Ausprägungen diskutiert werden.<sup>119, 205</sup> In einer post-mortem Studie an 2- bis 16-jährigen mit ASS, die parallel zu mehreren Längsschnittstudien durchgeführt wurde, konnte eine um 67% erhöhte Anzahl von Neuronen im Präfrontalkortex nachgewiesen werden.<sup>206</sup> Der (Prä-)Frontalkortex kontrolliert verschiedene exekutive Funktionen, einschließlich höherer kognitiver Prozesse wie Entscheidungsfindung, Planen, Lernen, Sozialverhalten und das Verarbeiten von Emotionen und ist daher angesichts der Symptomatik der ASS von besonderem Interesse in der Forschung.<sup>207</sup> Bei den Längsschnittstudien wurden durch MRT-Untersuchungen das Gehirn von Kindern mit ASS mit denen gleichaltriger gesunder Kontrollen verglichen. Übereinstimmend fand sich bei Kleinkindern mit ASS ein signifikant übermäßiges Wachstum des Gehirns zusammen mit einer erhöhten Hirnoberfläche, insbesondere im Frontalkortex, gefolgt von einer Verminderung des Hirnwachstums und der weiteren Entwicklung, die bis zum Erwachsenenalter anhielt.<sup>207-210</sup> Allerdings beziehen sich diese Studien nicht auf Frühgeborene und es bleibt unklar, worin die Ursache dieser Veränderungen in Volumen und Oberfläche liegt. In einer vergleichbaren Studie war nach Auszählung von Pyramidenzellen im anterioren Gyrus temporalis superior allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen Menschen mit und ohne ASS zu erkennen.<sup>211</sup> Dieser Hirnbereich ist mitverantwortlich für das Verarbeiten auditorischer Signale, von Sprache, sozialer Kognition, z.B. Gesichtserkennung, und mit funktionellen Veränderungen bei Autismus assoziiert.<sup>211</sup> Aber auch hier war die Fallzahl gering, sodass diese Studienergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden müssen. Studien über absolute

Zellzahlen bei ehemals Frühgeborenen mit ASS oder anderen neurologischen Entwicklungsstörungen gibt es derzeit nicht. Hier konnten allerdings auch MRT-Studien bei ehemals sehr unreifen Frühgeborenen mit ASS (MRT zum eigentlichen Geburtstermin durchgeführt) signifikante Veränderungen in Wachstum und Größe verschiedener Hirnbereiche nachweisen. Dazu zählen verringerte Volumina im temporalen, okzipitalen, orbitofrontalen und anterior cingulären Kortex, in der Inselrinde und im Cerebellum.<sup>212, 213</sup> Veränderungen in diesen Hirnregionen wurden ebenfalls mehrfach mit ASS in Verbindung gebracht. Allerdings waren im Gegensatz zu den zuvor genannten Studien keine Veränderungen des Gesamtvolumens des Gehirns nachweisbar. Hier wäre es interessant zu schauen, wie die Veränderungen in Volumen und Gewicht bei ehemals frühgeborenen ASS-Patienten auf mikroskopischer Ebene zu Stande kommen, ob es tatsächlich zu Veränderungen in der Anzahl kortikaler Pyramidenzellen kommt und wenn ja, welche Rolle dies für die Pathophysiologie des ASS spielt. Im tierexperimentellen Hyperoxie-Modell wäre es daher sinnvoll weitere Zellzahlen aus weiteren Kortexarealen zu ermitteln und Volumen und Gewicht der verschiedenen Hirnareale im zeitlichen Verlauf zu messen, um zu sehen, ob es hier zu den beschriebenen Veränderungen ähnlich wie bei Frühgeborenen kommt, auch in Kombination mit rEPO. Bei ähnlichen Ergebnissen ließe sich hier eine Verbindung herstellen zwischen neonataler Hyperoxie und Veränderungen in Volumina und Gewicht in den verschiedenen Hirnarealen, die mit ASS als neurologische Entwicklungsstörung assoziiert sind.

Aus methodischer Sicht sind die vorliegenden Ergebnisse als aussagekräftig zu bewerten, da die immunhistochemische Markierung und Darstellung bestimmter Zelltypen durch spezifische Primär- und Sekundärantikörper ein qualitativ hochwertiges und sicheres Verfahren darstellt, welches international zu den etabliertesten Forschungsmethoden zählt. Die Auszählung der Zellen per Hand bei festgelegter Fenstergröße im gleichen Kortexareal erlaubt zusätzlich einen direkten Vergleich zwischen den Gruppen. Dass die Zellen nur von einem Untersucher ausgezählt wurden und nicht von weiteren, um die Zahlen überprüfen zu können, ist als methodischer Kritikpunkt zu nennen.

### **5.2.2 Applikation von rEPO vermindert die hemmende Wirkung der Hyperoxie auf die Dendritogenese von Pyramidenzellen**

Die Dendritogenese ist ein komplizierter Prozess, bei der eine Vielzahl an intra- und extrazellulären Signalen beteiligt sind. Dazu zählen u.a. Transkriptionsfaktoren, neuronale Aktivität, parakrine Signalmoleküle und Zellkontakte. Eine präzise Koordination des dendritischen Wachstums ist essentiell, um eine adäquate neuronale Funktion und Konnektivität des ZNS, vor allem der Hirnrinde, zu gewährleisten.<sup>214–217</sup> Eine gestörte Dendritogenese kortikaler Pyramidenzellen korreliert eng mit dem Auftreten psychoneurologischer Entwicklungsstörungen und Erkrankungen.<sup>64, 65</sup> Da Frühgeborene, wie bereits erwähnt, ebenfalls ein höheres Risiko für psychoneurologische Entwicklungsstörungen/Erkrankungen aufweisen, war eine detaillierte morphologische Untersuchung der unreifen kortikalen Pyramidenzellen Ziel der vorliegenden Arbeit, um den Einfluss neonataler Hyperoxie auf dendritisches Wachstum darzulegen. Weitergehend war eine zweite Hyperoxie-exponierte Gruppe erforderlich, um zu testen, ob die Hyperoxie-induzierte Veränderungen durch die Anwendung von rEPO verhindert bzw. abgeschwächt werden und damit eine Neuroprotektion erreicht wird.

Bei den drei untersuchten Kortexarealen, dem motorischen, sensorischen und präfrontalen Kortex, zeigten die Pyramidenzellen des motorischen und sensorischen Kortexes eine deutlich höhere Vulnerabilität als die des präfrontalen Kortexes. Außerdem scheint das Wachstum der basalen Dendriten empfindlicher auf Hyperoxie zu reagieren als das der apikalen. In der Untersuchung der Pyramidenzellen der Hyperoxie-exponierten Mäuse, die dreimalig mit jeweils 5000 IE/kg KG i.p. rEPO behandelt wurden, zeigte sich bei den Basaldendriten in allen drei Kortexarealen eine Normalisierung des dendritischen Wachstums an das der Kontrollgruppe. In den tiefen Schichten des sensorischen Kortexes übertraf das Wachstum der mit rEPO behandelten Pyramidenzellen sogar teilweise das der Kontrollzellen. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene und durchgeführte Untersuchung des Dendritenbaums kortikaler Pyramidenzellen des unreifen Gehirns Hyperoxie-exponierter und mit rEPO behandelter Mäuse verdeutlicht somit, dass neonatale Hyperoxie das dendritische Wachstum kortikaler Pyramidenzellen im unreifen Gehirn signifikant hemmt und dass dieser schädigende Effekt durch die Anwendung von rEPO vermindert oder gar verhindert wird. Beide Resultate sind als neuwertige und relevante Erkenntnisse über die schädlichen

Auswirkungen der Sauerstofftoxizität und der neuroprotektiven Effekte durch rEPO auf das unreife Gehirn zu sehen.

Die zugrunde liegenden Mechanismen für diese Resultate lassen sich anhand von Erkenntnissen der jüngsten Forschung diskutieren. Es ist bekannt, dass die durch die Hyperoxie hervorgerufene Akkumulation von Sauerstoffradikalen zu oxidativem Stress führt, der funktionelle und strukturelle Zellschäden verursacht und damit ursächlich an Inflammation, zellulärer Dysfunktion und Apoptose beteiligt ist.<sup>76, 101, 111, 118</sup> Die Dendritogenese stellt einen streng organisierten Prozess dar, mit vielen ex- und intrinsischen Einflussfaktoren. Die Hyperoxie-induzierten Sauerstoffradikale könnten das dendritische Wachstum der Pyramidenzellen durch Dysregulation von wichtigen Entwicklungsschritten beeinträchtigen. Eine wichtige Komponente zur Steuerung des Dendritenwachstums sind Wachstumsfaktoren wie *brain-derived neurotrophic factor (BDNF)* und *glial-derived neurotrophic factor (GDNF)*, die eine zentrale Rolle in der Gehirnentwicklung einnehmen und einen starken dendritischen Wachstumsreiz in kortikalen Pyramidenzellen auslösen.<sup>218</sup> Es konnte in vorigen Arbeiten gezeigt werden, dass die Synthese dieser und weiterer Neurotrophine nach Hyperoxie-Exposition bei Mäusen/Ratten deutlich reduziert ist, was zu einem verminderten dendritischen Wachstum beitragen kann.<sup>45, 107, 111</sup> Das unreife Gehirn gilt als deutlich vulnerabler für oxidativen Stress als das reife Gehirn.<sup>84, 96</sup> Zum einen sind die antioxidativen Schutzsysteme nur unzureichend ausgebildet, zum anderen besitzt der unreife Organismus nur eine verminderte Kapazität die Synthese antioxidativer Enzyme unter erhöhtem oxidativen Stress hochzuregulieren.<sup>84</sup> Zusätzlich verbraucht das unreife Gehirn mehr Sauerstoff, enthält hohe Mengen an Eisen und bietet aufgrund seines erhöhten Anteils an leicht oxidierbaren mehrfach ungesättigten Fettsäuren mehr Angriffsfläche für die schädlichen Sauerstoffradikale.<sup>84, 134</sup> Diese Umstände könnten dazu beitragen, dass die unreifen kortikalen Pyramidenzellen in unserem Modell empfindlich auf Hyperoxie-bedingten oxidativen Stress reagieren.

Die Bedeutung von EPO für die embryonale und fetale Gehirnentwicklung und dessen Eigenschaften als neuroprotektives Zytokin im Rahmen eines Hirnschadens unterschiedlicher Natur im unreifen Gehirn wurde bereits mehrfach experimentell belegt.<sup>155, 156, 165</sup> Dabei wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, auf denen die Wirkungen von rEPO beruhen, insbesondere auch nach Hyperoxie-induziertem Hirnschaden.<sup>134</sup> Eine zur Protektion nützliche Eigenschaft von rEPO besteht in der Reduzierung von oxidativem Stress.<sup>95</sup> So zeigte die Anwendung von rEPO bei Hyperoxie-

exponierten neugeborenen Ratten eine höhere Konzentration von Glutathion und eine geringere Konzentration von oxidiertem Glutathion-Disulfid im Vergleich zur nicht behandelten Hyperoxie-Gruppe. Außerdem zeigte die Gabe von rEPO im gleichen Experiment eine verminderte Lipidperoxidation und erhöhte Level von Hämoxigenase-1.<sup>95</sup> Zusätzlich bewirkt rEPO durch die Aktivierung der Erythropoese eine gesteigerte Verwertung und Bindung von frei zirkulierendem Eisen.<sup>128, 156</sup> Weiterhin wirkt rEPO anti-inflammatorisch, indem es die Synthese Hyperoxie-induzierter pro-inflammatorischer Zytokine und Aktivierung der Mikroglia hemmt. Damit wird eine Neubildung von Sauerstoffradikalen unterbunden.<sup>112, 165</sup> Durch diese modulierenden Eigenschaften könnten die schädlichen Auswirkungen von oxidativem Stress auf die Pyramidenzellen vermindert worden sein. Darüber hinaus induziert rEPO die Synthese von Neurotrophenen, wie z.B. BDNF und GDNF, wodurch Zelluntergang verhindert, die Neuro- und Gliogenese stimuliert und dendritisches Wachstum angeregt wird.<sup>145, 159, 219, 220</sup> Hierüber könnten die Pyramidenzellen ebenfalls geschützt und zur Dendritogenese angeregt worden sein. Vermittelt werden diese zellulären Effekte von rEPO letztlich über direkte Signaltransduktion durch seinen Rezeptor. Die Bindung von rEPO an seinen Rezeptor aktiviert dabei verschiedene Signaltransduktionsketten, u.a. den JAK2/STAT5-, MAPK/ERK- und PI-3K/AKT-Signalweg. Diese Signalwege haben nicht nur direkten Einfluss auf Dendriten- und Zellwachstum, Proliferation und Apoptose, sondern interagieren auch mit weiteren für die Zellfunktion der unreifen Pyramidenzelle wichtigen Proteinen und Signalmolekülen, wie z.B. Neuregulin, DISC1 u.a.<sup>65, 134, 214, 215</sup> Es ergibt sich somit aus den bisherigen Erkenntnissen zu Hyperoxie und rEPO ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher Faktoren und Mechanismen, die auch für die Schädigung und Protektion des Dendritenwachstums von Pyramidenzellen in unserem Schädigungsmodell bedeutsam sind.

Aus klinischer Sicht sind die Ergebnisse aus der Morphometrie deshalb interessant, weil sie belegen, dass neonatale Hyperoxie im unreifen Gehirn langfristig zu morphologischen Veränderungen im dendritischen Wachstum kortikaler Pyramidenzellen führt, wie sie auch bei Menschen mit verschiedenen neurologischen Entwicklungsstörungen und Erkrankungen beobachtet wurden. Dazu zählen unter anderem Autismus-Spektrum-Störung (ASS) und damit verwandte Störungen, Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS), Schizophrenie, mentale Retardierung und die Alzheimer-Demenz.<sup>65, 215, 221–224</sup> Es ist noch offen, ob diese morphologischen Veränderungen beim Menschen die primäre Ursache (z.B. durch eine

genetische Mutation) der Entwicklungsstörungen darstellen oder wie groß deren pathogener Anteil als einer von mehreren Ursachen zu sehen ist.

Bei vielen Frühgeborenen zeigen sich im Laufe der Entwicklung auch ohne den Nachweis eindeutiger Komplikationen wie Asphyxie, Hirnblutung, zystischer PVL eine verzögerte neurologische Entwicklung. Aktuell geht man von einer multifaktoriellen Genese aus, die sich aus genetischen und nichtgenetischen Risikofaktoren und ihrer komplexen Interaktion zusammensetzt.<sup>65, 205</sup> Die erhöhte Prävalenz neurologischer Entwicklungsstörungen bei Frühgeborenen kann jedoch weniger durch genetische Faktoren erklärt werden, sondern vor allem durch exogene Noxen aus der Umwelt – im Fall des Tiermodells neonatale Hyperoxie – die zu Schäden im vulnerablen unreifen Gehirn führt. Eine der Fragen, die sich aus diesen Ergebnissen ergibt, ist, inwiefern neonatale Hyperoxie in diesem Tiermodell zu auffälligem Verhalten im Sinne einer neurologischen Entwicklungsstörung führt. Zumindest für ADHS konnte in einer Publikation von Schmitz et al. 2011 gezeigt werden, dass neonatale Hyperoxie bei Mäusen zu hyperaktivem Verhalten und zu verminderter motorischer Koordination führt, ähnliche wie es bei Kindern mit ADHS auch beobachtet werden kann.<sup>105</sup> Interessant wäre weitergehend zu untersuchen, ob Hyperoxie-exponierte Mäuse oder Ratten in geeigneten Verhaltenstests auch z.B. Autismus- oder Schizophrenie-ähnliches Verhalten zeigen und ob bei sichtbaren Veränderungen die Anwendung von rEPO auch auf der Verhaltensebene zu einer signifikanten Verbesserung führt. Die Normalisierung der Hyperoxie-bedingten morphologischen Schäden durch rEPO unterstreicht dessen potentiellen Stellenwert zur Neuroprotektion. Somit unterstützen die experimentellen Erkenntnisse dieser Arbeit die Rolle von rEPO für Neuroprotektion in der Neonatologie, speziell bei Frühgeborenen.

Methodisch gilt die Golgi-Cox-Färbung als Goldstandard zur histologischen Darstellung von Pyramidenzellen und stellt sowohl die Dendriten als auch die Ultrastrukturen der Pyramidenzellen im Vergleich zu anderen Färbemethoden sehr detailliert dar. Die Sholl-Analyse erlaubt zudem eine detaillierte morphometrische Quantifizierung der Dendriten. Darüber hinaus wurden zur Optimierung der Methode ausschließlich Pyramidenzellen analysiert, die vollständig und intensiv gefärbt waren und bei denen die Dendriten den Pyramidenzellen eindeutig zugeordnet werden konnten, wodurch die Verlässlichkeit der morphometrischen Untersuchung der Dendriten verbessert ist. Ein Schwachpunkt der zweidimensionalen Auswertung war, dass einzelne



Pyramidenzellen lichtmikroskopisch nicht sicher der oberflächlichen oder tiefen Schicht zugeordnet werden konnten.

### **5.2.3 Hyperoxie und rEPO haben keinen Einfluss auf die Synaptogenese von Pyramidenzellen**

Synapsen sind die eigentlichen Kontaktstellen über die Neurone miteinander kommunizieren. Im ZNS lassen sich verschiedene Typen von Synapsen unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit wurden Postsynapsen kortikaler Pyramidenzellen untersucht, welche als kleine pilzförmige Vorwölbung zahlreich auf Dendriten erkennbar sind und funktionell Informationen aufnehmen und über die Dendriten zum Zellkörper weiterleiten.<sup>225</sup> Für die Funktionalität des neuronalen Netzwerks ist daher eine korrekt und präzise ablaufende Synaptogenese essentiell.<sup>64</sup> Zahlreiche Untersuchungen haben bei verschiedenen psychoneurologischen Erkrankungen, i.e. ASS und damit verwandte Störungen, ADHS, mentale Retardierung, Schizophrenie, Depression, Alzheimer-Demenz u.a. eine Störung der Synaptogenese und Synapsenfunktion nachgewiesen.<sup>224–227</sup> Aus diesem Grund ist eine detaillierte Untersuchung der Synapsen in dem Tiermodell dieser Arbeit sinnvoll, um die potentielle Schädigung von neuronaler Synapsenbildung sowie Dendritenbildung durch neonatale Hyperoxie erstmals zu erfassen und dabei den Effekt von therapeutischer rEPO Anwendung zu definieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkungen von Hyperoxie und rEPO auf die Synapsendichte kortikaler Pyramidenzellen im unreifen Gehirn untersucht. Hierzu wurden die Synapsen auf mindestens 40 µm langen Basaldendriten per Hand gezählt und durch die entsprechende Dendritenlänge dividiert. Es zeigten sich unter den drei Gruppen (Normoxie, Hyperoxie, Hyperoxie mit rEPO) keine signifikanten Unterschiede. Dies deutet darauf hin, dass Hyperoxie allein und zusammen mit der Gabe von rEPO keinen Effekt auf die Ausbildung dendritischer Synapsen haben. Zuvor wurden verschiedenartige Auswirkungen von oxidativem Stress auf Synapsen berichtet; oxidativer Stress kann demnach sowohl zu einem Verlust als auch zu einem angeregten Wachstum von Synapsen führen.<sup>45, 228, 229</sup> Zudem könnte oxidativer Stress auch eine Rolle in der synaptischen Aktivität bei kognitiven Prozessen wie Lernen und Gedächtnis spielen.<sup>45, 230</sup> Eine mögliche Erklärung, warum Hyperoxie in dieser Arbeit nicht zu einem deutlichen Verlust von Synapsen geführt hat, könnte sein, dass Sauerstoffradikale durch die Aktivierung des JNK-AP-1 Signalweges und der Autophagie eine stimulierende Rolle

im Wachstum und Bildung von Synapsen spielen. Die Jun-N-terminal kinase (JNK), eine MAP-Kinase (MAPK), und Activator protein 1 (AP-1), ein Transkriptionsfaktor, sind Mediatoren, die durch oxidativen Stress aktiviert werden können und für die synaptische Funktion und das synaptische Wachstum wichtig sind.<sup>231</sup> Die Aktivierung erfolgt dabei vor allem über eine Apoptosis-signal-regulating-kinase (ASK), eine JNK Kinase Kinase, die durch Oxidation von Thioredoxinen aktiviert wird, eine Gruppe antioxidativer Proteine, welche im unreifen Gehirn der Ratte unter Hyperoxie signifikant stärker exprimiert werden.<sup>108</sup> Daneben konnte für die Autophagie gezeigt werden, dass Hyperoxie zu einem Anstieg Autophagie-assoziiierter Proteine im unreifen Gehirn der Maus führt.<sup>113</sup> Unabhängig davon fand man zusätzlich ein gesteigertes synaptisches Wachstum durch gesteigerte Autophagie und umgekehrt ein reduziertes synaptisches Wachstum, nachdem die Autophagie durch induzierte Mutationen in dafür relevanten Genen inhibiert wurde.<sup>230, 232</sup> Darüber hinaus aktiviert der JNK-AP-1-Signalweg unter oxidativem Stress auch die Transkription Autophagie-relevanter Gene. Diese Mechanismen könnten in der Summe dazu beigetragen haben, dass die Synapsendichte in der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht wesentlich vermindert war. Wichtig zu erwähnen ist allerdings, dass sich diese Erkenntnisse auf Präsynapsen am Axon beziehen und nicht auf dendritische Synapsen, obwohl JNK auch hier nachweisbar ist. Gegen eine Stimulation der Synapsenbildung durch Sauerstoffradikale sprechen auch Ergebnisse einer experimentellen Studie mit genetisch veränderten Drosophila Fliegen, in der ein Verlust von neuromuskulären axonalen Präsynapsen durch Sauerstoffradikale nachzuweisen war.<sup>229</sup> Darüber hinaus zeigten Experimente, die dendritische Synapsen hippocampaler CA1 und kortikaler Pyramidenzellen von Nagetieren untersucht haben, dass oxidativer Stress sogar zu einer signifikanten Reduzierung der Synapsendichte führt.<sup>233–236</sup> Allerdings wurden hier zum einen reife Gehirne ausgewachsener Ratten/Mäuse und keine unreifen Gehirne neonataler oder juveniler Tiere untersucht und zum anderen wurden zur Induktion von oxidativem Stress Kainsäure, Ozon und Mefloquin anstelle von erhöhter Sauerstoffkonzentration in der Atemluft verwendet. Daher sind diese Studien nur eingeschränkt mit der vorliegenden vergleichbar. Die Gabe von rEPO hatte ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die Synapsendichte. Auch dazu gibt es in der Literatur nur wenig Daten für einen Vergleich. Einerseits konnte in zwei Experimenten gezeigt werden, dass EPO zu einer signifikant erhöhten dendritischen Synapsendichte in hippocampalen Vorläufer- und Pyramidenzellen führt.<sup>237, 238</sup> Andererseits konnte eine weitere experimentelle Studie an hippocampalen

Pyramidenzellen keine Veränderungen in der Morphologie und Dichte der Synapsen durch die Gabe von EPO beobachten.<sup>239</sup> Diese Studien verwendeten allerdings mehrere Monate alte Mäuse/Ratten, zwei hiervon im Zusammenspiel mit einem Modell für zerebrale Hypoperfusion. Zu diskutieren ist, dass rEPO als Wachstumsfaktor fungiert und die Expression von Neurotrophinen induziert, welche wiederum die Synaptogenese fördern, weshalb eine erhöhte Synapsendichte durchaus plausibel wäre. Bezüglich einer Beteiligung des JNK-AP-1-Signalweges bei rEPO vermittelten Effekten gibt es aus Experimenten an hämatopoetischen Zellkulturen zum Teil widersprüchliche Daten.<sup>240-243</sup> Eine Studie, die die Beteiligung der durch rEPO aktivierten MAPK-Signalwege im unreifen Gehirn des Mäuseembryos nach Hypoxie untersucht hat, führte zu dem Ergebnis, dass rEPO die durch Hypoxie erhöhte Aktivität des JNK-Signalweges nicht beeinflusst und dass JNK daher im Hypoxie-Modell keine Rolle in der Neuroprotektion durch rEPO spielt.<sup>244</sup> Ob dieser Signalweg bei der Gabe von rEPO im Hyperoxie Modell relevant sein könnte, bleibt unklar. Zu diskutieren ist ebenfalls die potentielle Rolle von Autophagie. Es konnte zwar gezeigt werden, dass die Genexpression für Autophagie-assoziiierter Proteine im unreifen Gehirn durch Hyperoxie induziert und durch rEPO Gaben wiederum vermindert wird und dass Autophagie mit gesteigertem synaptischem Wachstum assoziiert ist, allerdings scheint dieser Effekt auf die kortikalen Pyramidenzellen keine ausschlaggebenden Veränderungen bewirkt zu haben.<sup>113</sup>

Es ist bekannt, dass verschiedene neurologische Entwicklungsstörungen, insbesondere jene, die zum Spektrum der autistischen Störungen gezählt werden, aber auch Schizophrenie, Alzheimer und Depressionen, mit Veränderungen in der Synapsendichte und -morphologie einhergehen. Zudem ist zu beachten, dass bei jeder differenzierbaren Entwicklungsstörung auch eine veränderte Dynamik bei der Synaptogenese und beim selektiven Untergang vorliegt. Bei der tuberösen Sklerose werden beispielsweise initial weniger Synapsen gebildet, sind dann jedoch im Erwachsenenalter deutlich erhöht im Vergleich zum Gesunden. Beim Fragile-X-Syndrom ist es genau umgekehrt mit noch normaler Synapsendichte im Erwachsenenalter.<sup>245-247</sup> Diesen Veränderungen in der Synapsendichte werden nach aktuellen Kenntnissen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Entwicklungsstörungen beigemessen. In Bezug auf Autismus wurde in einer älteren Studie aus dem Jahr 1980 über eine verminderte Synapsendichte auf Apikaldendriten von Pyramidenzellen im Neokortex berichtet. Neuere Untersuchungen von Golgi-gefärbten kortikalen Pyramidenzellen im Kortex zeigen jedoch eine erhöhte Dichte dendritischer Synapsen bei Menschen mit

Autismus im Vergleich zu Gesunden. Dies betrifft die apikalen Dendriten in Schicht II im frontalen, temporalen und parietalen Kortex und in Schicht V im tempolaren Kortex. Letzteres korrelierte hierbei mit einer eingeschränkten Autophagie bedingt durch eine Hyperaktivität im mTOR-Signalweg. Die erhöhte Synapsendichte korrelierte außerdem hierbei negativ mit dem Gehirngewicht und den kognitiven Funktionen.<sup>248–250</sup> Weiterhin bleibt zu bemerken, dass die Synapsendichte in den vorliegenden Experimenten nur zu einem Zeitpunkt untersucht wurden. Die Synaptogenese unterliegt allerdings bis ins Erwachsenenalter einer hohen Dynamik.<sup>227</sup> Es wäre interessant zu sehen, wie die dynamische Entwicklung der Synapsen unter neonataler Hyperoxie bis ins spätere adulte Alter verläuft, und ob eine erhöhte oder verminderte selektive Eliminierung der Synapsen im Vergleich zur Kontrolle erfolgt. Da außerdem verschiedene Entwicklungsstörungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine normale Synapsendichte aufweisen können, lässt sich aus diesen Ergebnissen eine pathologische Veränderung weder sicher ableiten noch ausschließen, zumal lediglich eine Aussage über die Dichte getroffen wird, nicht jedoch über die Morphologie, die ebenfalls eine wichtige Rolle für die Aktivität und Funktion neuronaler Netzwerke einnimmt.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Auch wenn die Mortalitätsrate Frühgeborener in Deutschland und weltweit dank besserer medizinischer Versorgung stetig sinkt, ist Frühgeburtlichkeit weiterhin die häufigste Todesursache für Kinder unter 5 Jahren. Bei sinkender Mortalität bleibt jedoch die langfristige Morbiditätsrate hoch, mit großen sozioökonomischen und besonders emotionalen Belastungen für Betroffene und Angehörige. Insbesondere das breite Spektrum an neurologischen Erkrankungen und Entwicklungsstörungen stellt Ärzte sowie Forscher vor große medizinische Herausforderungen hinsichtlich Therapie und Prävention. Auch bei einem komplikationsfreien Verlauf der ersten Wochen und Monate nach Geburt hat ein Frühgeborenes, so zeigen es mehrere große retrospektive Nachuntersuchungen, ein deutlich erhöhtes Risiko für neurologische Beeinträchtigungen im späteren Leben. Dazu zählen neben Störungen aus dem autistischen Formenkreis auch ADHS, Schizophrenie, Demenzerkrankungen und affektive Störungen. Eine potentielle Ursache für Hirnschädigung, für die sich experimentell und in klinischen Studien Hinweise finden, ist die unphysiologisch erhöhte Sauerstoffexposition durch Frühgeburt und die damit verbundenen Auswirkungen durch Hyperoxie. Die Unreife des Organismus insgesamt mit einem Mangel an antioxidativen Schutzsystemen bedingen die enorme Vulnerabilität des Frühchens gegenüber jeglicher Umwelttoxine, sogar dem Sauerstoff in der Raumluft. Hier gilt es Wege und Maßnahmen zu finden um das empfindliche unreife Gehirn besser schützen können.

Zelldegeneration und Inflammation, gestörte Axon-Oligodendrozyten-Interaktion, und hyperaktives Verhalten sind nur einige Aspekte, welche experimentell die schädigenden Effekte durch neonatale Hyperoxie im unreifen Gehirn auf molekularer, zellulärer und Verhaltens Ebene verdeutlichen. Auf der Suche nach geeigneten pharmakologischen Therapien konnte für Erythropoetin verschiedene zellprotektive Eigenschaften im ZNS nachgewiesen werden, sowohl experimentell als auch in der klinischen Anwendung. Klinische Daten weisen zudem auf einen Nutzen durch die Anwendung von EPO für das neurologische Langzeit-Outcome bei Frühgeborenen mit Hirnblutung an.

In der vorliegenden Studie wurde der Effekt von neonataler Hyperoxie und EPO auf kortikale Pyramidenzellen untersucht, welche u.a. mit o.g. Morbiditäten assoziiert sind. Hier konnte in dieser Studie erstmals nachgewiesen werden, dass neonatale

Hyperoxie die Dendritogenese der Pyramidenzellen massiv einschränkt. Darüber hinaus normalisierte sich die Anzahl der Dendriten unter Gabe von EPO. Allerdings blieben Anzahl der Pyramidenzellen und die Synapsendichte unverändert. Auch wenn die in der Fragestellung formulierten Hypothesen damit nur eingeschränkt verifiziert werden können, kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass durch die stark eingeschränkte Dendritogenese kortikaler Pyramidenzellen unter Hyperoxie signifikanter Schaden im unreifen Gehirn entstanden ist mit möglichen längerfristigen Auswirkungen. Weiterhin belegen die Ergebnisse, dass die Gabe von EPO einen protektiven Effekt auf die gestörte Dendritogenese kortikaler Pyramidenzellen unter Hyperoxie hat.

Eine Limitation dieser Arbeit ist, dass keine Aussage über den weiteren Verlauf der Entwicklung der Pyramidenzellen getroffen werden kann. Weitere histologische Nachuntersuchungen könnten in künftigen Arbeiten Aufschluss darüber geben. Interessant wäre auch zu sehen, ob Veränderungen von Biomarkern für oxidativen Stress messbar sind, die als Ursache für die Veränderungen (Schädigung wie auch Protektion) auf molekularer Ebene in Frage kommen. Die Analyse der Synapsen könnte zudem vertieft werden, indem Veränderungen der Synapsenmorphologie untersucht werden. Weitere Fragen schließen sich an die vorliegende Studie an und sollten in weiterführenden Studien adressiert werden. So könnte mittels geeigneter Verhaltenstest in weiteren Details zu klären sein, inwieweit neonatale Hyperoxie auch im Mausmodell zu verändertem Verhalten führt, wie sie bei ehemals frühgeborenen Menschen mit neurologischen Entwicklungsstörungen beobachtet werden kann und ob die Gabe von EPO auch dafür eine geeignete Therapie darstellt. Zudem könnte in Bezug auf die veränderten Pyramidenzellen untersucht werden, ob neonatale Hyperoxie neben morphologischen Veränderungen auch zu funktionellen Veränderungen führt und wenn ja, ob EPO auch hier einen protektiven Effekt erzielt, wozu elektrophysiologische Untersuchungen dienen können.

Insgesamt liefern die Ergebnisse dieser Studie neue und wichtige Erkenntnisse über die Auswirkungen neonataler Hyperoxie und EPO auf kortikale Pyramidenzellen im unreifen Gehirn. Darüber hinaus stützt diese Studie die Theorie, dass neonatale Hyperoxie schädliche Auswirkungen auf das unreife Gehirn Frühgeborener hat und die Gabe von EPO als ein bereits etabliertes Medikament ein potentielles Neuroprotektivum darstellt.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1977; 56(3):247–53.
2. Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, Rudan I, Campbell H, Cibulskis R, Li M, Mathers C, Black RE. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *The Lancet* 2012; 379(9832):2151–61.
3. Blencowe H, Cousens S, Chou D, Oestergaard M, Say L, Moller A-B, Kinney M, Lawn J. Born Too Soon: The global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod Health* 2013; 10(Suppl 1):S2.
4. Wang H, Zhang L, Jin Y. A meta-analysis of the protective effect of recombinant human erythropoietin (rhEPO) for neurodevelopment in preterm infants. *Cell Biochem Biophys* 2015; 71(2):795–802.
5. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Walsh MC, Carlo WA, Shankaran S, Laptook AR, Sánchez PJ, van Meurs KP, Wyckoff M, Das A, Hale EC, Ball MB, Newman NS, Schibler K, Poindexter BB, Kennedy KA, Cotten CM, Watterberg KL, D'Angio CT, DeMauro SB, Truog WE, Devaskar U, Higgins RD. Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012. *JAMA* 2015; 314(10):1039–51.
6. Fellman V, Hellström-Westas L, Norman M, Westgren M, Källén K, Lagercrantz H, Marsál K, Serenius F, Wennergren M. One-year survival of extremely preterm infants after active perinatal care in Sweden. *JAMA* 2009; 301(21):2225–33.
7. Zegers MJ, Hukkelhoven CWPM, Uiterwaal CSPM, Kollée LAA, Groenendaal F. Changing Dutch approach and trends in short-term outcome of periviable preterms. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2016; 101(5):F391-6.
8. Ancel P-Y, Goffinet F, Kuhn P, Langer B, Matis J, Hernandorena X, Chabanier P, Joly-Pedespan L, Lecomte B, Vendittelli F, Dreyfus M, Guillois B, Burguet A, Sagot P, Sizun J, Beuchée A, Rouget F, Favreau A, Saliba E, Bednarek N, Morville P,

- Thiriez G, Marpeau L, Marret S, Kayem G, Durrmeyer X, Granier M, Baud O, Jarreau P-H, Mitanchez D, Boileau P, Boulot P, Cambonie G, Daudé H, Bédu A, Mons F, Fresson J, Vieux R, Alberge C, Alberge C, Arnaud C, Vayssière C, Truffert P, Pierrat V, Subtil D, D'Ercole C, Gire C, Simeoni U, Bongain A, Sentilhes L, Rozé J-C, Gondry J, Leke A, Deiber M, Claris O, Picaud J-C, Ego A, Debillon T, Poulichet A, Coliné E, Favre A, Fléchelles O, Samperiz S, Ramful D, Branger B, Benhammou V, Foix-L'Hélias L, Marchand-Martin L, Kaminski M. Survival and morbidity of preterm children born at 22 through 34 weeks' gestation in France in 2011: results of the EPIPAGE-2 cohort study. *JAMA Pediatr* 2015; 169(3):230–8.
9. Ishii N, Kono Y, Yonemoto N, Kusuda S, Fujimura M. Outcomes of infants born at 22 and 23 weeks' gestation. *Pediatrics* 2013; 132(1):62–71.
  10. Rogers EE, Hintz SR. Early neurodevelopmental outcomes of extremely preterm infants. *Semin Perinatol* 2016; 40(8):497–509.
  11. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller A-B, Lumbiganon P, Petzold M, Hogan D, Landoulsi S, Jampathong N, Kongwattanakul K, Laopaiboon M, Lewis C, Rattanakanokchai S, Teng DN, Thinkhamrop J, Watananirun K, Zhang J, Zhou W, Gülmezoglu AM. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Glob Health* 2018; 7(1):e37-46.
  12. Maitre NL, Ballard RA, Ellenberg JH, Davis SD, Greenberg JM, Hamvas A, Pryhuber GS. Respiratory consequences of prematurity: evolution of a diagnosis and development of a comprehensive approach. *J Perinatol* 2015; 35(5):313–21.
  13. Moore T, Hennessy EM, Myles J, Johnson SJ, Draper ES, Costeloe KL, Marlow N. Neurological and developmental outcome in extremely preterm children born in England in 1995 and 2006: the EPICure studies. *BMJ* 2012; 345:e7961.
  14. Paranjothy S, Dunstan F, Watkins WJ, Hyatt M, Demmler JC, Lyons RA, Fone D. Gestational age, birth weight, and risk of respiratory hospital admission in childhood. *Pediatrics* 2013; 132(6):e1562-9.
  15. Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Stark AR, Bauer CR, Donovan EF, Korones SB, Laptook AR, Lemons JA, Oh W, Papile L-A, Shankaran S, Stevenson DK, Tyson JE, Poole WK. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196(2):147.e1-8.



16. Myers E, Ment LR. Long-Term Outcome of Preterm Infants and the Role of Neuroimaging. *Clin Perinatol* 2009; 36(4).
17. Weichert A, Weichert TM, Bergmann RL, Henrich W, Kalache KD, Richter R, Neymeyer J, Bergmann KE. Factors for Preterm Births in Germany - An Analysis of Representative German Data (KiGGS). *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2015; 75(8):819–26.
18. The United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation (UN IGME). *Child\_Mortality\_Report\_2017*. 2017. <https://childmortality.org/wp-content/uploads/2018/10/UN-IGME-Child-Mortality-Report-2017.pdf>
19. Sullivan MC, Hawes K, Winchester SB, Miller RJ. Developmental origins theory from prematurity to adult disease. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2008; 37(2):158–64.
20. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller A-B, Narwal R, Adler A, Vera Garcia C, Rohde S, Say L, Lawn JE. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *The Lancet* 2012; 379(9832):2162–72.
21. Blencowe H, Lee ACC, Cousens S, Bahalim A, Narwal R, Zhong N, Chou D, Say L, Modi N, Katz J, Vos T, Marlow N, Lawn JE. Preterm birth-associated neurodevelopmental impairment estimates at regional and global levels for 2010. *Pediatr Res* 2013; 74 Suppl 1:17–34.
22. Doyle LW, Anderson PJ. Adult outcome of extremely preterm infants. *Pediatrics* 2010; 126(2):342–51.
23. Moreira RS, Magalhães LC, Alves CRL. Effect of preterm birth on motor development, behavior, and school performance of school-age children: a systematic review. *J Pediatr (Rio J)* 2014; 90(2):119–34.
24. Mahoney AD, Minter B, Burch K, Stapel-Wax J. Autism spectrum disorders and prematurity: a review across gestational age subgroups. *Adv Neonatal Care* 2013; 13(4):247–51.
25. Sun J, Buys N. Early executive function deficit in preterm children and its association with neurodevelopmental disorders in childhood: a literature review. *Int J Adolesc Med Health* 2012; 24(4):291–9.

26. Johnson S, Marlow N. Preterm Birth and Childhood Psychiatric Disorders. *Pediatr Res* 2011; 69:11R EP -.
27. Johnson S, Marlow N. Early and long-term outcome of infants born extremely preterm. *Arch Dis Child* 2017; 102(1):97–102.
28. Synnes A, Hicks M. Neurodevelopmental Outcomes of Preterm Children at School Age and Beyond. *Clin Perinatol* 2018; 45(3):393–408.
29. Rysavy MA, Li L, Bell EF, Das A, Hintz SR, Stoll BJ, Vohr BR, Carlo WA, Shankaran S, Walsh MC, Tyson JE, Cotten CM, Smith PB, Murray JC, Colaizy TT, Brumbaugh JE, Higgins RD. Between-hospital variation in treatment and outcomes in extremely preterm infants. *N Engl J Med* 2015; 372(19):1801–11.
30. Serenius F, Kallen K, Blennow M, Ewald U, Fellman V, Holmstrom G, Lindberg E, Lundqvist P, Marsal K, Norman M, Olhager E, Stigson L, Stjernqvist K, Vollmer B, Stromberg B. Neurodevelopmental outcome in extremely preterm infants at 2.5 years after active perinatal care in Sweden. *JAMA* 2013; 309(17):1810–20.
31. Su B-H, Hsieh W-S, Hsu C-H, Chang J-H, Lien R, Lin C-H. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from taiwan: comparison with Canada, Japan, and the USA. *Pediatr Neonatol* 2015; 56(1):46–52.
32. Costeloe KL, Hennessy EM, Haider S, Stacey F, Marlow N, Draper ES. Short term outcomes after extreme preterm birth in England: comparison of two birth cohorts in 1995 and 2006 (the EPICure studies). *BMJ* 2012; 345:e7976.
33. Agarwal P, Sriram B, Rajadurai VS. Neonatal outcome of extremely preterm Asian infants  $\leq 28$  weeks over a decade in the new millennium. *J Perinatol* 2015; 35(4):297–303.
34. Patel RM. Short- and Long-Term Outcomes for Extremely Preterm Infants. *Am J Perinatol* 2016; 33(3):318–28.
35. Woodward LJ, Edgin JO, Thompson D, Inder TE. Object working memory deficits predicted by early brain injury and development in the preterm infant. *Brain* 2005; 128(Pt 11):2578–87.
36. Inder TE, Warfield SK, Wang H, Hüppi PS, Volpe JJ. Abnormal cerebral structure is present at term in premature infants. *Pediatrics* 2005; 115(2):286–94.

37. Mwaniki MK, Atieno M, Lawn JE, Newton CR. Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review. *The Lancet* 2012; 379(9814):445–52.
38. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *The Lancet* 2008; 371(9606):75–84.
39. Speer CP, Gahr M, Dötsch J. *Pädiatrie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. 865 p.
40. Volpe JJ. Brain injury in the premature infant: Overview of clinical aspects, neuropathology, and pathogenesis. *Semin Pediatr Neurol* 1998; 5(3):135–51.
41. Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Research Reviews* 1999; 30(2):107–34.
42. Novak CM, Ozen M, Burd I. Perinatal Brain Injury: Mechanisms, Prevention, and Outcomes. *Clin Perinatol* 2018; 45(2):357–75.
43. Stone WL, Shah D, Hollinger SM. Retinopathy of prematurity: an oxidative stress neonatal disease. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2016; 21:165–77.
44. Berkelhamer SK, Farrow KN. Developmental Regulation of Antioxidant Enzymes and Their Impact on Neonatal Lung Disease. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21(13):1837–48.
45. Reich B, Hoeber D, Bendix I, Felderhoff-Mueser U. Hyperoxia and the Immature Brain. *Dev Neurosci* 2016; 38(5):311–30.
46. Behrman RE, Butler AS, Hrsg. *Preterm birth: Causes, consequences, and prevention*. Washington, DC: National Academies Press; 2007. 772p.
47. Monk CS, Webb SJ, Nelson CA. Prenatal neurobiological development: molecular mechanisms and anatomical change. *Dev Neuropsychol* 2001; 19(2):211–36.
48. Zilles K, Tillmann B. *Anatomie*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010.
49. Jiang X, Nardelli J. Cellular and molecular introduction to brain development. *Neurobiol Dis* 2016; 92(Pt A):3–17.

50. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neurowissenschaften: Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie. 4. Aufl. 2018. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
51. Campbell K, Götz M. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* 2002; 25(5):235–8.
52. Tau GZ, Peterson BS. Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35(1):147–68.
53. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev* 2010; 20(4):327–48.
54. Lenroot RK, Giedd JN. Brain development in children and adolescents: insights from anatomical magnetic resonance imaging. *Neurosci Biobehav Rev* 2006; 30(6):718–29.
55. Gressens P. Neuronal migration disorders. *J Child Neurol* 2005; 20(12):969–71.
56. Kolb B, Gibb R. Brain plasticity and behaviour in the developing brain. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry* 2011; 20(4):265–76.
57. Andiman SE, Haynes RL, Trachtenberg FL, Billiards SS, Folkerth RD, Volpe JJ, Kinney HC. The cerebral cortex overlying periventricular leukomalacia: analysis of pyramidal neurons. *Brain Pathol* 2010; 20(4):803–14.
58. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* 2013; 106-107:1–16.
59. Anlar B, Atilla P, Cakar N, Tombakoglu M, Bulun A. Apoptosis in the developing human brain: a preliminary study of the frontal region. *Early Hum Dev* 2003; 71(1):53–60.
60. Kasper EM, Larkman AU, Lubke J, Blakemore C. Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. I. Correlation among cell morphology, intrinsic electrophysiological properties, and axon targets. *J Comp Neurol* 1994; 339(4):459–74.

61. Kasper EM, Larkman AU, Lubke J, Blakemore C. Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. II. Development of electrophysiological properties. *J Comp Neurol* 1994; 339(4):475–94.
62. Kasper EM, Lubke J, Larkman AU, Blakemore C. Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. III. Differential maturation of axon targeting, dendritic morphology, and electrophysiological properties. *J Comp Neurol* 1994; 339(4):495–518.
63. Megias M, Emri Z, Freund T, Gulyás A. Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 2001; 102(3):527–40.
64. Kulkarni VA, Firestein BL. The dendritic tree and brain disorders. *Mol Cell Neurosci* 2012; 50(1):10–20.
65. Copf T. Impairments in dendrite morphogenesis as etiology for neurodevelopmental disorders and implications for therapeutic treatments. *Neurosci Biobehav Rev* 2016; 68:946–78.
66. Salimi I, Friel KM, Martin JH. Pyramidal tract stimulation restores normal corticospinal tract connections and visuomotor skill after early postnatal motor cortex activity blockade. *J Neurosci* 2008; 28(29):7426–34.
67. Guihard-Costa AM, Larroche JC. Differential growth between the fetal brain and its infratentorial part. *Early Hum Dev* 1990; 23(1):27–40.
68. Kinney HC. The near-term (late preterm) human brain and risk for periventricular leukomalacia: a review. *Semin Perinatol* 2006; 30(2):81–8.
69. Hüppi PS, Warfield S, Kikinis R, Barnes PD, Zientara GP, Jolesz FA, Tsuji MK, Volpe JJ. Quantitative magnetic resonance imaging of brain development in premature and mature newborns. *Ann Neurol* 1998; 43(2):224–35.
70. Dobbing J, Sands J. Quantitative growth and development of human brain. *Arch Dis Child* 1973; 48(10):757–67.
71. Dobbing J. The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics* 1974; 53(1):2–6.

72. Dobbing J, Smart JL. Vulnerability of developing brain and behaviour. *Br Med Bull* 1974; 30(2):164–8.
73. Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 1979; 3(1):79–83.
74. Molnár Z, Clowry G. Cerebral cortical development in rodents and primates. *Prog Brain Res* 2012; 195:45–70.
75. Finlay BL, Darlington RB. Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science* 1995; 268(5217):1578–84.
76. Helmerhorst HJF, Schultz MJ, van der Voort PHJ, Jonge E de, van Westerloo DJ. Bench-to-bedside review: the effects of hyperoxia during critical illness. *Crit Care* 2015; 19:284.
77. Stolmeijer R, Bouma HR, Zijlstra JG, Drost-de Klerck AM, ter Maaten JC, Ligtenberg JJM. A Systematic Review of the Effects of Hyperoxia in Acutely Ill Patients: Should We Aim for Less? *Biomed Res Int* 2018; 2018.
78. Bitterman H. Bench-to-bedside review: oxygen as a drug. *Crit Care* 2009; 13(1):205.
79. Millán I, Piñero-Ramos JD, Lara I, Parra-Llorca A, Torres-Cuevas I, Vento M. Oxidative Stress in the Newborn Period: Useful Biomarkers in the Clinical Setting. *Antioxidants (Basel)* 2018; 7(12).
80. Hafner S, Beloncle F, Koch A, Radermacher P, Asfar P. Hyperoxia in intensive care, emergency, and peri-operative medicine: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? A 2015 update. *Ann Intensive Care* 2015; 5(1):42.
81. Deuber C, Terhaar M. Hyperoxia in very preterm infants: a systematic review of the literature. *J Perinat Neonatal Nurs* 2011; 25(3):268–74.
82. Saugstad OD, Aune D. Optimal oxygenation of extremely low birth weight infants: a meta-analysis and systematic review of the oxygen saturation target studies. *Neonatology* 2014; 105(1):55–63.
83. Vento M, Saugstad OD. Resuscitation of the term and preterm infant. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010; 15(4):216–22.
84. Ikonomidou C, Kaindl AM. Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14(8):1535–50.

85. Roy J, Galano J-M, Durand T, Le Guennec J-Y, Lee JC-Y. Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses. *FASEB J* 2017; 31(9):3729–45.
86. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Krause K-H. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* 2012; 142:w13659.
87. Hrycay EG, Bandiera SM. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Adv Pharmacol* 2015; 74:35–84.
88. Lee JW, Davis JM. Future applications of antioxidants in premature infants. *Curr Opin Pediatr* 2011; 23(2):161–6.
89. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, Hrsg. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie. Sonderausgabe der 31. Auflage.* Berlin: Springer; 2017.
90. Torres-Cuevas I, Parra-Llorca A, Sánchez-Illana A, Nuñez-Ramiro A, Kuligowski J, Cháfer-Pericás C, Cernada M, Escobar J, Vento M. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biol* 2017; 12:674–81.
91. Castillo A, Sola A, Baquero H, Neira F, Alvis R, Deulofeut R, Critz A. Pulse oxygen saturation levels and arterial oxygen tension values in newborns receiving oxygen therapy in the neonatal intensive care unit: is 85% to 93% an acceptable range? *Pediatrics* 2008; 121(5):882–9.
92. Lee Y-S, Chou Y-H. Antioxidant profiles in full term and preterm neonates. *Chang Gung Med J* 2005; 28(12):846–51.
93. Davis JM, Auten RL. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010; 15(4):191–5.
94. Saugstad OD. Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001; 13(2):147–53.
95. Sifringer M, Brait D, Weichelt U, Zimmerman G, Endesfelder S, Brehmer F, Haefen C von, Friedman A, Soreq H, Bendix I, Gerstner B, Felderhoff-Mueser U. Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain. *Brain Behav Immun* 2010; 24(5):792–9.
96. Ozsurekci Y, Aykac K. Oxidative Stress Related Diseases in Newborns. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016:2768365.

97. Poggi C, Dani C. Antioxidant strategies and respiratory disease of the preterm newborn: an update. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014:721043.
98. Haynes RL, Baud O, Li J, Kinney HC, Volpe JJ, Folkerth DR. Oxidative and nitrative injury in periventricular leukomalacia: a review. *Brain Pathol* 2005; 15(3):225–33.
99. Collins MP, Lorenz JM, Jetton JR, Paneth N. Hypocapnia and other ventilation-related risk factors for cerebral palsy in low birth weight infants. *Pediatr Res* 2001; 50(6):712–9.
100. Deulofeut R, Critz A, Adams-Chapman I, Sola A. Avoiding hyperoxia in infants < or = 1250 g is associated with improved short- and long-term outcomes. *J Perinatol* 2006; 26(11):700–5.
101. Perrone S, Santacroce A, Longini M, Proietti F, Bazzini F, Buonocore G. The Free Radical Diseases of Prematurity: From Cellular Mechanisms to Bedside. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018:7483062.
102. Lui K, Jones LJ, Foster JP, Davis PG, Ching SK, Oei JL, Osborn DA. Lower versus higher oxygen concentrations titrated to target oxygen saturations during resuscitation of preterm infants at birth. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; 5:CD010239.
103. Askie LM, Darlow BA, Davis PG, Finer N, Stenson B, Vento M, Whyte R. Effects of targeting lower versus higher arterial oxygen saturations on death or disability in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 4:CD011190.
104. Kayton A, Timoney P, Vargo L, Perez JA. A Review of Oxygen Physiology and Appropriate Management of Oxygen Levels in Premature Neonates. *Adv Neonatal Care* 2018; 18(2):98–104.
105. Schmitz T, Ritter J, Mueller S, Felderhoff-Mueser U, Chew L-J, Gallo V. Cellular changes underlying hyperoxia-induced delay of white matter development. *J Neurosci* 2011; 31(11):4327–44.
106. Ritter J, Schmitz T, Chew L-J, Buhner C, Mobius W, Zonouzi M, Gallo V. Neonatal hyperoxia exposure disrupts axon-oligodendrocyte integrity in the subcortical white matter. *J Neurosci* 2013; 33(21):8990–9002.
107. Felderhoff-Mueser U, Bittigau P, Sifringer M, Jarosz B, Korobowicz E, Mahler L, Piening T, Moysich A, Grune T, Thor F, Heumann R, Buhner C, Ikonomidou C.



- Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiol Dis* 2004; 17(2):273–82.
108. Bendix I, Weichelt U, Strasser K, Serdar M, Endesfelder S, Haefen C von, Heumann R, Ehrkamp A, Felderhoff-Mueser U, Sifringer M. Hyperoxia changes the balance of the thioredoxin/peroxiredoxin system in the neonatal rat brain. *Brain Res* 2012; 1484:68–75.
109. Endesfelder S, Zaak I, Weichelt U, Bührer C, Schmitz T. Caffeine protects neuronal cells against injury caused by hyperoxia in the immature brain. *Free Radic Biol Med* 2014; 67:221–34.
110. Sifringer M, Bendix I, Börner C, Endesfelder S, Haefen C von, Kalb A, Holifanjaniaina S, Prager S, Schlager GW, Keller M, Jacotot E, Felderhoff-Mueser U. Prevention of neonatal oxygen-induced brain damage by reduction of intrinsic apoptosis. *Cell Death Dis* 2012; 3:e250.
111. Kaindl AM, Sifringer M, Koppelstaetter A, Genz K, Loeber R, Boerner C, Stuwe J, Klose J, Felderhoff-Mueser U. Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes. *Ann Neurol* 2008; 64(5):523–34.
112. Sifringer M, Genz K, Brait D, Brehmer F, Löber R, Weichelt U, Kaindl AM, Gerstner B, Felderhoff-Mueser U. Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced cell death by modulation of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases. *Dev Neurosci* 2009; 31(5):394–402.
113. Bendix I, Schulze C, Haefen C von, Gellhaus A, Endesfelder S, Heumann R, Felderhoff-Mueser U, Sifringer M. Erythropoietin modulates autophagy signaling in the developing rat brain in an in vivo model of oxygen-toxicity. *Int J Mol Sci* 2012; 13(10):12939–51.
114. Gerstner B, Bührer C, Rheinländer C, Polley O, Schüller A, Berns M, Obladen M, Felderhoff-Mueser U. Maturation-dependent oligodendrocyte apoptosis caused by hyperoxia. *J Neurosci Res* 2006; 84(2):306–15.
115. Gerstner B, DeSilva TM, Genz K, Armstrong A, Brehmer F, Neve RL, Felderhoff-Mueser U, Volpe JJ, Rosenberg PA. Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter. *J Neurosci* 2008; 28(5):1236–45.

116. Brehmer F, Bendix I, Prager S, van de Looij Y, Reinboth BS, Zimmermanns J, Schlager GW, Brait D, Sifringer M, Endesfelder S, Sizonenko S, Mallard C, Bühner C, Felderhoff-Mueser U, Gerstner B. Interaction of inflammation and hyperoxia in a rat model of neonatal white matter damage. *PLoS ONE* 2012; 7(11):e49023.
117. Schmitz T, Endesfelder S, Reinert M-C, Klinker F, Müller S, Bühner C, Liebetanz D. Adolescent hyperactivity and impaired coordination after neonatal hyperoxia. *Exp Neurol* 2012; 235(1):374–9.
118. Hoeber D, Sifringer M, van de Looij Y, Herz J, Sizonenko SV, Kempe K, Serdar M, Palasz J, Hadamitzky M, Endesfelder S, Fandrey J, Felderhoff-Müser U, Bendix I. Erythropoietin Restores Long-Term Neurocognitive Function Involving Mechanisms of Neuronal Plasticity in a Model of Hyperoxia-Induced Preterm Brain Injury. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016:9247493.
119. Gilbert J, Man H-Y. Fundamental Elements in Autism: From Neurogenesis and Neurite Growth to Synaptic Plasticity. *Front Cell Neurosci* 2017; 11.
120. Andersen PN, Skogli EW, Hovik KT, Geurts H, Egeland J, Øie M. Working memory arrest in children with high-functioning autism compared to children with attention-deficit/hyperactivity disorder: results from a 2-year longitudinal study. *Autism* 2015; 19(4):443–50.
121. Scheuer T, Sharkovska Y, Tarabykin V, Marggraf K, Brockmüller V, Bühner C, Endesfelder S, Schmitz T. Neonatal Hyperoxia Perturbs Neuronal Development in the Cerebellum. *Mol Neurobiol* 2018; 55(5):3901–15.
122. Scheuer T, Klein LS, Bühner C, Endesfelder S, Schmitz T. Transient Improvement of Cerebellar Oligodendroglial Development in a Neonatal Hyperoxia Model by PDGFA Treatment. *Dev Neurobiol* 2019; 79(3):222–35.
123. Jelkmann W, Metzen E. Erythropoietin in the control of red cell production. *Ann Anat* 1996; 178(5):391–403.
124. Jelkmann W. Physiology and pharmacology of erythropoietin. *Transfus Med Hemother* 2013; 40(5):302–9.
125. Elliott S, Sinclair AM. The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. *Biologics* 2012; 6:163–89.

126. Faulds D, Sorkin EM. Epoetin (recombinant human erythropoietin). A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in anaemia and the stimulation of erythropoiesis. *Drugs* 1989; 38(6):863–99.
127. Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 1990; 248(4953):378–81.
128. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev* 2013; 27(1):41–53.
129. Kowalska-Kańska A, Maciejewski T, Niemiec KT. The role and regulation of secretion of erythropoietin in pregnancy. *Med Wieku Rozwoj* 2013; 17(3):270–5.
130. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 1996; 8(4):666–76.
131. Dame C, Juul SE, Christensen RD. The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate* 2001; 79(3-4):228–35.
132. Bruegge K, Jelkmann W, Metzen E. Hydroxylation of hypoxia-inducible transcription factors and chemical compounds targeting the HIF-alpha hydroxylases. *Curr Med Chem* 2007; 14(17):1853–62.
133. Ehrenreich H, Bartels C, Sargin D, Stawicki S, Krampe H. Recombinant human erythropoietin in the treatment of human brain disease: focus on cognition. *J Ren Nutr* 2008; 18(1):146–53.
134. Mallet RT, Ryou M-G. Erythropoietin: Endogenous Protection of Ischemic Brain. *Vitam Horm* 2017; 105:197–232.
135. Maier RF, Obladen M, Müller-Hansen I, Kattner E, Merz U, Arlettaz R, Groneck P, Hammer H, Kössel H, Verellen G, Stock G-J, Lacaze-Masmonteil T, Claris O, Wagner M, Matis J, Gilberg F. Early treatment with erythropoietin beta ameliorates anemia and reduces transfusion requirements in infants with birth weights below 1000 g. *J Pediatr* 2002; 141(1):8–15.
136. Ohlsson A, Aher SM. Early erythropoiesis-stimulating agents in preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2020; 2:CD004863.

137. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol* 2007; 78(3):183–205.
138. Eckardt K-U, Kurtz A. Regulation of erythropoietin production. *Eur J Clin Invest* 2005; 35 Suppl 3:13–9.
139. Nairz M, Sonnweber T, Schroll A, Theurl I, Weiss G. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation. *Microbes Infect* 2012; 14(3):238–46.
140. Gonzalez FF, Abel R, Almlí CR, Mu D, Wendland M, Ferriero DM. Erythropoietin sustains cognitive function and brain volume after neonatal stroke. *Dev Neurosci* 2009; 31(5):403–11.
141. Juul SE, Yachnis AT, Christensen RD. Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus. *Early Hum Dev* 1998; 52(3):235–49.
142. Juul SE. Erythropoietin in the neonate. *Current Problems in Pediatrics* 1999; 29(5):133–49.
143. Teramo KA, Klemetti MM, Widness JA. Robust increases in erythropoietin production by the hypoxic fetus is a response to protect the brain and other vital organs. *Pediatr Res* 2018; 84(6):807–12.
144. Juul SE, McPherson RJ, Farrell FX, Jolliffe L, Ness DJ, Gleason CA. Erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of nonhuman primates and fetal sheep following high-dose recombinant erythropoietin. *Biol Neonate* 2004; 85(2):138–44.
145. Juul S. Neuroprotective role of erythropoietin in neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25 Suppl 4:105–7.
146. Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res* 1998; 43(1):40–9.
147. Juul SE, Yachnis AT, Rojiani AM, Christensen RD. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol* 1999; 2(2):148–58.

148. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, Mackenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19(6):643–51.
149. Juul SE, Stallings SA, Christensen RD. Erythropoietin in the cerebrospinal fluid of neonates who sustained CNS injury. *Pediatr Res* 1999; 46(5):543–7.
150. Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Bruck W, Ehrenreich H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol* 2001; 101(3):271–6.
151. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* 1994; 269(30):19488–93.
152. Siren AL, Ehrenreich H. Erythropoietin--a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2001; 251(4):179–84.
153. Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(7):4044–9.
154. Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 2001; 21(24):9733–43.
155. Juul S, Felderhoff-Mueser U. Epo and other hematopoietic factors. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 12(4):250–8.
156. Juul SE, Pet GC. Erythropoietin and Neonatal Neuroprotection. *Clin Perinatol* 2015; 42(3):469–81.
157. 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; 38(10):2795–803.
158. Garg B, Sharma D, Bansal A. Systematic review seeking erythropoietin role for neuroprotection in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy: presently where do we stand. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2018; 31(23):3214–24.

159. Dzierko M, Felderhoff-Mueser U, Siffringer M, Krutz B, Bittigau P, Thor F, Heumann R, Bühner C, Ikonomidou C, Hansen HH. Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 2004; 15(2):177–87.
160. Kellert BA, McPherson RJ, Juul SE. A comparison of high-dose recombinant erythropoietin treatment regimens in brain-injured neonatal rats. *Pediatr Res* 2007; 61(4):451–5.
161. Demers EJ, McPherson RJ, Juul SE. Erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcomes in juvenile rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 2005; 58(2):297–301.
162. Kumral A, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, Genc K, Yilmaz O, Gokmen N, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate* 2005; 87(1):15–8.
163. Osredkar D, Sall JW, Bickler PE, Ferriero DM. Erythropoietin promotes hippocampal neurogenesis in in vitro models of neonatal stroke. *Neurobiol Dis* 2010; 38(2):259–65.
164. Gonzalez FF, McQuillen P, Mu D, Chang Y, Wendland M, Vexler Z, Ferriero DM. Erythropoietin enhances long-term neuroprotection and neurogenesis in neonatal stroke. *Dev Neurosci* 2007; 29(4-5):321–30.
165. Rangarajan V, Juul SE. Erythropoietin: Emerging role of erythropoietin in neonatal neuroprotection. *Pediatr Neurol* 2014; 51(4):481–8.
166. Yiş U, Kurul SH, Kumral A, Cilaker S, Tuğyan K, Genç S, Yilmaz O. Hyperoxic exposure leads to cell death in the developing brain. *Brain Dev* 2008; 30(9):556–62.
167. Fischer HS, Reibel NJ, Bühner C, Dame C. Prophylactic Early Erythropoietin for Neuroprotection in Preterm Infants: A Meta-analysis. *Pediatrics* 2017; 139(5).
168. Dame C. Erythropoietin for Neuroprotection in preterm infants. *Ann Neurol* 2016; 80(6):952.
169. Marlow N. Is survival and neurodevelopmental impairment at 2 years of age the gold standard outcome for neonatal studies? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2015; 100(1):F82-4.

170. Hagberg H, David Edwards A, Groenendaal F. Perinatal brain damage: The term infant. *Neurobiol Dis* 2016; 92(Pt A):102–12.
171. Smyser CD, Wheelock MD, Limbrick DD, Neil JJ. Neonatal brain injury and aberrant connectivity. *Neuroimage* 2019; 185:609–23.
172. Martinez-Biarge M, Diez-Sebastian J, Wusthoff CJ, Mercuri E, Cowan FM. Antepartum and intrapartum factors preceding neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2013; 132(4):e952-9.
173. Gunn AJ, Thoresen M. Neonatal encephalopathy and hypoxic-ischemic encephalopathy. *Handb Clin Neurol* 2019; 162:217–37.
174. Li B, Concepcion K, Meng X, Zhang L. Brain-immune interactions in perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Prog Neurobiol* 2017; 159:50–68.
175. Wang H, Abajobir AA, Abate KH, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abera SF, Abraha HN, Abu-Raddad LJ, Abu-Rmeileh NME, Adedeji IA, Adedoyin RA, Adetifa IMO, Adetokunboh O, Afshin A, Aggarwal R, Agrawal A, Agrawal S, Ahmad Kiadaliri A, Ahmed MB, Aichour MTE, Aichour AN, Aichour I, Aiyar S, Akanda AS, Akinyemiju TF, Akseer N, Al Lami FH, Alabed S, Alahdab F, Al-Aly Z, Alam K, Alam N, Alasfoor D, Aldridge RW, Alene KA, Al-Eyadhy A, Alhabib S, Ali R, Alizadeh-Navaei R, Aljunid SM, Alkaabi JM, Alkerwi A, Alla F, Allam SD, Allebeck P, Al-Raddadi R, Alsharif U, Altirkawi KA, Alvis-Guzman N, Amare AT, Ameh EA, Amini E, Ammar W, Amoako YA, Anber N, Andrei CL, Androudi S, Ansari H, Ansha MG, Antonio CAT, Anwari P, Ärnlöv J, Arora M, Artaman A, Aryal KK, Asayesh H, Asgedom SW, Asghar RJ, Assadi R, Assaye AM, Atey TM, Atre SR, Avila-Burgos L, Avokpaho EFGA, Awasthi A, Babalola TK, Bacha U, Badawi A, Balakrishnan K, Balalla S, Barac A, Barber RM, Barboza MA, Barker-Collo SL, Bärnighausen T, Barquera S, Barregard L, Barrero LH, Baune BT, Bazargan-Hejazi S, Bedi N, Beghi E, Béjot Y, Bekele BB, Bell ML, Bello AK, Bennett DA, Bennett JR, Bensenor IM, et al. Global, regional, and national under-5 mortality, adult mortality, age-specific mortality, and life expectancy, 1970–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet* 2017; 390(10100):1084–150.
176. Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008; 93(2):F153-61.

177. Galinsky R, Lear CA, Dean JM, Wassink G, Dhillon SK, Fraser M, Davidson JO, Bennet L, Gunn AJ. Complex interactions between hypoxia-ischemia and inflammation in preterm brain injury. *Dev Med Child Neurol* 2018; 60(2):126–33.
178. Pregolato S, Chakkarapani E, Isles AR, Luyt K. Glutamate Transport and Preterm Brain Injury. *Front Physiol* 2019; 10:417.
179. Dean JM, McClendon E, Hansen K, Azimi-Zonooz A, Chen K, Riddle A, Gong X, Sharifnia E, Hagen M, Ahmad T, Leigland LA, Hohimer AR, Kroenke CD, Back SA. Prenatal cerebral ischemia disrupts MRI-defined cortical microstructure through disturbances in neuronal arborization. *Sci Transl Med* 2013; 5(168):168ra7.
180. Ranasinghe S, Or G, Wang EY, Levins A, McLean MA, Niell CM, Chau V, Wong PKH, Glass HC, Sullivan J, McQuillen PS. Reduced Cortical Activity Impairs Development and Plasticity after Neonatal Hypoxia Ischemia. *J Neurosci* 2015; 35(34):11946–59.
181. García-Chávez D, González-Burgos I, Letechipía-Vallejo G, López-Loeza E, Morali G, Cervantes M. Long-term evaluation of cytoarchitectonic characteristics of prefrontal cortex pyramidal neurons, following global cerebral ischemia and neuroprotective melatonin treatment, in rats. *Neurosci Lett* 2008; 448(1):148–52.
182. Zhao YD, Ou S, Cheng SY, Xiao Z, He WJ, Zhang JH, Ruan HZ. Dendritic development of hippocampal CA1 pyramidal cells in a neonatal hypoxia-ischemia injury model. *J Neurosci Res* 2013; 91(9):1165–73.
183. Hagberg H, Mallard C, Ferriero DM, Vannucci SJ, Levison SW, Vexler ZS, Gressens P. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Rev Neurol* 2015; 11(4):192–208.
184. Du Plessis AJ, Volpe JJ. Perinatal brain injury in the preterm and term newborn. *Curr Opin Neurol* 2002; 15(2):151–7.
185. Schlapbach LJ, Aebischer M, Adams M, Natalucci G, Bonhoeffer J, Latzin P, Nelle M, Bucher HU, Latal B. Impact of sepsis on neurodevelopmental outcome in a Swiss National Cohort of extremely premature infants. *Pediatrics* 2011; 128(2):e348-57.
186. Li W-Y, Chang Y-C, Lee LJ-H, Lee L-J. Prenatal infection affects the neuronal architecture and cognitive function in adult mice. *Dev Neurosci* 2014; 36(5):359–70.



187. Weir RK, Forghany R, Smith SEP, Patterson PH, McAllister AK, Schumann CM, Bauman MD. Preliminary evidence of neuropathology in nonhuman primates prenatally exposed to maternal immune activation. *Brain Behav Immun* 2015; 48:139–46.
188. Baharnoori M, Brake WG, Srivastava LK. Prenatal immune challenge induces developmental changes in the morphology of pyramidal neurons of the prefrontal cortex and hippocampus in rats. *Schizophr Res* 2009; 107(1):99–109.
189. Gilmore JH, Fredrik Jarskog L, Vadlamudi S, Lauder JM. Prenatal infection and risk for schizophrenia: IL-1beta, IL-6, and TNFalpha inhibit cortical neuron dendrite development. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29(7):1221–9.
190. Neumann H, Schweigreiter R, Yamashita T, Rosenkranz K, Wekerle H, Barde Y-A. Tumor Necrosis Factor Inhibits Neurite Outgrowth and Branching of Hippocampal Neurons by a Rho-Dependent Mechanism. *J Neurosci* 2002; 22(3):854–62.
191. Hagberg H, Thornberg E, Blennow M, Kjellmer I, Lagercrantz H, Thiringer K, Hamberger A, Sandberg M. Excitatory amino acids in the cerebrospinal fluid of asphyxiated infants: relationship to hypoxic-ischemic encephalopathy. *Acta Paediatr* 1993; 82(11):925–9.
192. Pu Y, Li QF, Zeng CM, Gao J, Qi J, Luo DX, Mahankali S, Fox PT, Gao JH. Increased detectability of alpha brain glutamate/glutamine in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000; 21(1):203–12.
193. Johnston MV. Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain Pathol* 2005; 15(3):234–40.
194. Beas-Zárate C, Pérez-Vega MI, González-Burgos I. Neonatal exposure to monosodium l-glutamate induces loss of neurons and cytoarchitectural alterations in hippocampal CA1 pyramidal neurons of adult rats. *Brain Res* 2002; 952(2):275–81.
195. González-Burgos I, Pérez-Vega M, Beas-Zárate C. Neonatal exposure to monosodium glutamate induces cell death and dendritic hypotrophy in rat prefrontocortical pyramidal neurons. *Neurosci Lett* 2001; 297(2):69–72.
196. van der Kooij MA, Groenendaal F, Kavelaars A, Heijnen CJ, van Bel F. Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in in vitro and in vivo

- experimental models for hypoxia/ischemia. *Brain Research Reviews* 2008; 59(1):22–33.
197. 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; 20(2):594–600.
198. Juul SE, McPherson RJ, Bauer LA, Ledbetter KJ, Gleason CA, Mayock DE. A phase I/II trial of high-dose erythropoietin in extremely low birth weight infants: pharmacokinetics and safety. *Pediatrics* 2008; 122(2):383–91.
199. Ohls RK. THE USE OF ERYTHROPOIETIN IN NEONATES. *Clin Perinatol* 2000; 27(3):681–96.
200. Doege C, Pritsch M, Frühwald MC, Bauer J. An association between infantile haemangiomas and erythropoietin treatment in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2012; 97(1):F45-9.
201. Statler PA, McPherson RJ, Bauer LA, Kellert BA, Juul SE. Pharmacokinetics of high-dose recombinant erythropoietin in plasma and brain of neonatal rats. *Pediatr Res* 2007; 61(6):671–5.
202. Costa S, Romagnoli C, Zuppa AA, Cota F, Scorrano A, Gallini F, Maggio L. How to administrate erythropoietin, intravenous or subcutaneous? *Acta Paediatr* 2013; 102(6):579–83.
203. Snyder JS, Choe JS, Clifford MA, Jeurling SI, Hurley P, Brown A, Kamhi JF, Cameron HA. Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster-maturing and more involved in behavior in rats than in mice. *J Neurosci* 2009; 29(46):14484–95.
204. Ellenbroek B, Youn J. Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Dis Model Mech* 2016; 9(10):1079–87.
205. Park HR, Lee JM, Moon HE, Lee DS, Kim B-N, Kim J, Kim DG, Paek SH. A Short Review on the Current Understanding of Autism Spectrum Disorders. *Exp Neurobiol* 2016; 25(1):1–13.
206. Courchesne E, Mouton PR, Calhoun ME, Semendeferi K, Ahrens-Barbeau C, Hallet MJ, Barnes CC, Pierce K. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA* 2011; 306(18):2001–10.

207. Donovan APA, Basson MA. The neuroanatomy of autism – a developmental perspective. *J Anat* 2016; 230(1):4–15.
208. Schumann CM, Bloss CS, Barnes CC, Wideman GM, Carper RA, Akshoomoff N, Pierce K, Hagler D, Schork N, Lord C, Courchesne E. Longitudinal magnetic resonance imaging study of cortical development through early childhood in autism. *J Neurosci* 2010; 30(12):4419–27.
209. Ohta H, Nordahl CW, Iosif A-M, Lee A, Rogers S, Amaral DG. Increased Surface Area, but not Cortical Thickness, in a Subset of Young Boys With Autism Spectrum Disorder. *Autism Res* 2016; 9(2):232–48.
210. Hazlett HC, Gu H, Munsell BC, Kim SH, Styner M, Wolff JJ, Elison JT, Swanson MR, Zhu H, Botteron KN, Collins DL, Constantino JN, Dager SR, Estes AM, Evans AC, Fonov VS, Gerig G, Kostopoulos P, McKinsty RC, Pandey J, Paterson S, Pruett JR, Schultz RT, Shaw DW, Zwaigenbaum L, Piven J. Early brain development in infants at high risk for autism spectrum disorder. *Nature* 2017; 542(7641):348–51.
211. Kim E, Camacho J, Combs Z, Ariza J, Lechpammer M, Noctor S, Martínez-Cerdeño V. Preliminary findings suggest the number and volume of supragranular and infragranular pyramidal neurons are similar in the anterior superior temporal area of control subjects and subjects with autism. *Neurosci Lett* 2015; 0:98–103.
212. Ure AM, Treyvaud K, Thompson DK, Pascoe L, Roberts G, Lee KJ, Seal ML, Northam E, Cheong JL, Hunt RW, Inder T, Doyle LW, Anderson PJ. Neonatal brain abnormalities associated with autism spectrum disorder in children born very preterm. *Autism Res* 2016; 9(5):543–52.
213. Padilla N, Eklöf E, Mårtensson GE, Bölte S, Lagercrantz H, Ådén U. Poor Brain Growth in Extremely Preterm Neonates Long Before the Onset of Autism Spectrum Disorder Symptoms. *Cereb Cortex* 2017; 27(2):1245–52.
214. Urbanska M, Blazejczyk M, Jaworski J. Molecular basis of dendritic arborization. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2008; 68(2):264–88.
215. Ledda F, Paratcha G. Mechanisms regulating dendritic arbor patterning. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74(24):4511–37.

216. Lefebvre JL, Sanes JR, Kay JN. Development of dendritic form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2015; 31:741–77.
217. Dong X, Shen K, Bülow HE. Intrinsic and extrinsic mechanisms of dendritic morphogenesis. *Annu Rev Physiol* 2015; 77:271–300.
218. McAllister AK. Neurotrophins and neuronal differentiation in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(8):1054–60.
219. Viviani B, Bartesaghi S, Corsini E, Villa P, Ghezzi P, Garau A, Galli CL, Marinovich M. Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* 2005; 93(2):412–21.
220. Traudt CM, Juul SE. Erythropoietin as a neuroprotectant for neonatal brain injury: animal models. *Methods Mol Biol* 2013; 982:113–26.
221. Dierssen M, Ramakers GJA. Dendritic pathology in mental retardation: from molecular genetics to neurobiology. *Genes Brain Behav* 2006; 5 Suppl 2:48–60.
222. Šišková Z, Justus D, Kaneko H, Friedrichs D, Henneberg N, Beutel T, Pitsch J, Schoch S, Becker A, Kammer H von der, Remy S. Dendritic structural degeneration is functionally linked to cellular hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* 2014; 84(5):1023–33.
223. Koleske AJ. Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14(8):536–50.
224. Martínez-Cerdeño V. Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models. *Dev Neurobiol* 2017; 77(4):393–404.
225. Forrest MP, Parnell E, Penzes P. Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* 2018; 19(4):215–34.
226. Bagni C, Zukin RS. A Synaptic Perspective of Fragile X Syndrome and Autism Spectrum Disorders. *Neuron* 2019; 101(6):1070–88.
227. Chidambaram SB, Rathipriya AG, Bolla SR, Bhat A, Ray B, Mahalakshmi AM, Manivasagam T, Thenmozhi AJ, Essa MM, Guillemin GJ, Chandra R, Sakharkar MK. Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2019; 92:161–93.

228. Kim SM, Kumar V, Lin Y-Q, Karunanithi S, Ramaswami M. Fos and Jun potentiate individual release sites and mobilize the reserve synaptic vesicle pool at the *Drosophila* larval motor synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(10):4000–5.
229. Mast JD, Tomalty KMH, Vogel H, Clandinin TR. Reactive oxygen species act remotely to cause synapse loss in a *Drosophila* model of developmental mitochondrial encephalopathy. *Development* 2008; 135(15):2669–79.
230. Milton VJ, Sweeney ST. Oxidative stress in synapse development and function. *Dev Neurobiol* 2012; 72(1):100–10.
231. West RJH, Sweeney ST. Oxidative stress and autophagy: Mediators of synapse growth? *Autophagy* 2012; 8(2):284–5.
232. Milton VJ, Jarrett HE, Gowers K, Chalak S, Briggs L, Robinson IM, Sweeney ST. Oxidative stress induces overgrowth of the *Drosophila* neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(42):17521–6.
233. Avila-Costa MR, Colín-Barenque L, Fortoul TI, Machado-Salas P, Espinosa-Villanueva J, Rugerio-Vargas C, Rivas-Arancibia S. Memory deterioration in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat hippocampus CA1. *Neurosci Lett* 1999; 270(2):107–9.
234. Zaja-Milatovic S, Gupta RC, Aschner M, Montine TJ, Milatovic D. Pharmacologic suppression of oxidative damage and dendritic degeneration following kainic acid-induced excitotoxicity in mouse cerebrum. *Neurotoxicology* 2008; 29(4):621–7.
235. Bello-Medina PC, Prado-Alcalá RA, Rivas-Arancibia S. Effect of Ozone Exposure on Dendritic Spines of CA1 Pyramidal Neurons of the Dorsal Hippocampus and on Object-place Recognition Memory in Rats. *Neuroscience* 2019; 402:1–10.
236. Hood JE, Jenkins JW, Milatovic D, Rongzhu L, Aschner M. Mefloquine induces oxidative stress and neurodegeneration in primary rat cortical neurons. *Neurotoxicology* 2010; 31(5):518–23.
237. Ma S, Chen J, Chen C, Wei N, Xu J, Yang G, Wang N, Meng Y, Ren J, Xu Z. Erythropoietin Rescues Memory Impairment in a Rat Model of Chronic Cerebral Hypoperfusion via the EPO-R/JAK2/STAT5/PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  Pathway. *Mol Neurobiol* 2018; 55(4):3290–9.

238. Oh DH, Lee IY, Choi M, Kim SH, Son H. Comparison of Neurite Outgrowth Induced by Erythropoietin (EPO) and Carbamylated Erythropoietin (CEPO) in Hippocampal Neural Progenitor Cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 2012; 16(4):281–5.
239. Gruneberg D, Montellano FA, Plaschke K, Li L, Marti HH, Kunze R. Neuronal prolyl-4-hydroxylase 2 deficiency improves cognitive abilities in a murine model of cerebral hypoperfusion. *Exp Neurol* 2016; 286:93–106.
240. Jacobs-Helber SM, Ryan JJ, Sawyer ST. JNK and p38 are activated by erythropoietin (EPO) but are not induced in apoptosis following EPO withdrawal in EPO-dependent HCD57 cells. *Blood* 2000; 96(3):933–40.
241. Shan R, Price JO, Gaarde WA, Monia BP, Krantz SB, Zhao ZJ. Distinct roles of JNKs/p38 MAP kinase and ERKs in apoptosis and survival of HCD-57 cells induced by withdrawal or addition of erythropoietin. *Blood* 1999; 94(12):4067–76.
242. Nagata Y, Nishida E, Todokoro K. Activation of JNK signaling pathway by erythropoietin, thrombopoietin, and interleukin-3. *Blood* 1997; 89(8):2664–9.
243. Nagata Y, Takahashi N, Davis RJ, Todokoro K. Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood* 1998; 92(6):1859–69.
244. Jeong JE, Park JH, Kim CS, Lee SL, Chung HL, Kim WT, Lee EJ. Neuroprotective effects of erythropoietin against hypoxic injury via modulation of the mitogen-activated protein kinase pathway and apoptosis. *Korean J Pediatr* 2017; 60(6):181–8.
245. Phillips M, Pozzo-Miller L. Dendritic spine dysgenesis in Autism Related Disorders. *Neurosci Lett* 2015; 601:30–40.
246. Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen J-E, Woolfrey KM. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 2011; 14(3):285–93.
247. Lai K-O, Jordan BA, Ma X-M, Srivastava DP, Toliaas KF. Molecular Mechanisms of Dendritic Spine Development and Plasticity. *Neural Plast* 2016; 2016.
248. Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, Warda T, Wicinski B, Dickstein DL, Harony-Nicolas H, Rubeis S de, Drapeau E, Buxbaum JD, Hof PR. Autism spectrum disorder: Neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol* 2017; 134(4):537–66.

249. Hutsler JJ, Zhang H. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res* 2010; 1309:83–94.
250. Tang G, Gudsnuk K, Kuo S-H, Cotrina ML, Rosoklija G, Sosunov A, Sonders MS, Kanter E, Castagna C, Yamamoto A, Yue Z, Arancio O, Peterson BS, Champagne F, Dwork AJ, Goldman J, Sulzer D. Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron* 2014; 83(5):1131–43.

## EIDESSTÄTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Güven Mustafa Kutlu, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Auswirkungen von neonataler Hyperoxie und Erythropoetin auf die Entwicklung kortikaler Pyramidenzellen im unreifen Gehirn der Maus“ bzw „The effects of neonatal hyperoxia and erythropoietin on development of cortical pyramidal neuron in the immature mouse brain“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Berlin, 26.05.2021

Unterschrift



## **LEBENS LAUF**

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



## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich sehr gerne die Chance nutzen und meinen großen Dank an all jene aussprechen, die mich bei meiner Promotion bis zum Schluss so motiviert und unterstützt haben und ohne deren Hilfe diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre.

Allen voran gilt mein Dank meinem Doktorvater, PD Dr. Thomas Schmitz, Oberarzt der Klinik für Neonatologie an der Charité Berlin, für seine überaus motivierende Art, seine bestmögliche Unterstützung und Betreuung für diese Promotion und auch darüber hinaus. Nicht nur im Rahmen der Experimente und Dissertation, sondern auch für Kongressteilnahmen, Fragen rund um den Berufseinstieg und vieles weitere war Thomas immer mit konstruktiven Ideen, breiter Unterstützung und seiner wertvollen Erfahrung für mich da. Als Mentor ist Thomas beruflich und menschlich ein Vorbild für mich.

Weiterhin möchte ich besonders meiner Betreuerin, Dr. Yuliya Sharkovska, danken für die durchweg sehr enge Betreuung und für die Einführung und Durchführung der Experimente. Ihr Engagement, sich fast immer am gleichen Tag noch zurückzumelden, wusste ich sehr zu schätzen und war für mich alles andere als selbstverständlich. Mit ihrer humorvollen und sympathischen Art hatte Yuliya zudem auch für alle anderen Fragen rund um die Promotion, das Studium und den Berufseinstieg immer ein offenes Ohr und war mit ihren schnellen und konstruktiven Lösungen eine enorme Stütze.

Ein weiteres großes Dankeschön gilt den MitarbeiterInnen und KollegInnen im Labor, allen voran PD Dr. Stefanie Endesfelder und Dr. Theres Schaub, die mir immer mit viel Geduld und wertvollen Tipps zur komplikationsfreien Durchführung der Experimente zur Seite standen. Auch die fachliche und praktische Beratung und die konstruktiven Diskussionen rund um das Forschungsprojekt waren äußerst wertvoll für mich.

Zum Abschluss möchte ich mich an dieser Stelle in ganz besonderer Weise bei meiner Familie, Johanna und meinen engsten Freunden bedanken, die auch an schlechten und stressigen Tagen jederzeit da waren, um mich aufzufangen, zu ertragen und wieder aufzubauen. Ohne euch wäre es auch nicht gegangen.