

Aus der Klinik für Neonatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Entwicklung eines neuen Inflammationsmodells
am Gehirn der neonatalen Ratte mittels
Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA)**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maria Luise Hahnemann
aus Halle

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. U. Felderhoff-Müser
2. Priv.-Doz. Dr. med. T. Höhn
3. Prof. Dr. med. M. Rüdiger

Datum der Disputation: 05.09.2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Schädigungsmechanismen im unreifen Gehirn	5
1.2. Die Vulnerabilität des unreifen Gehirns im Rahmen des „brain growth spurt“	7
1.3. Apoptose (programmierter Zelltod)	8
1.3.1. Die Apoptose in der Hirnentwicklung	9
1.3.2. Lokalisation physiologischer Apoptosevorgänge im Rattenhirn	10
1.3.3. Aktivierung der Apoptose	10
1.3.4. Morphologische Kennzeichen der Apoptose	11
1.4. PMA als Mimikry von mikrobiellen Antigenen	12
1.4.1. Stimulation des Monozyten-Makrophagen-Systems durch PMA	13
1.4.2. Stimulation von Granulozyten durch PMA	14
1.5. Fragestellung	14
2. Material und Methoden	16
2.1. Tierversuche	16
2.2. Perfusion, Einbettung und Schnitt für die DeOlmos-Silberfärbung	17
2.3. DeOlmos Kupfersilberfärbung	18
2.4. Morphometrie	19
2.5. Statistische Auswertung	20
2.6. Perfusion, Einbettung, Schnitt für TUNEL-Färbung, Kresylviolett-Färbung, Fluoro-Jade-B-Färbung und Caspase-3-Immunhistochemie	20
2.7. TUNEL-Färbung	22
2.8. Immunhistochemischer Nachweis von Caspase-3	22
2.9. Kresylviolett-Färbung	23
2.10. Fluoro-Jade-B-Färbung	23
2.11. Morphometrie und statistische Auswertung der Zelldichte	24
3. Ergebnisse	25
3.1. Der Proteinkinase-C-Aktivatoren PMA als Verursacher von Neuronendegeneration im unreifen Rattenhirn	25

3.2. Vermehrte Apoptose durch PMA in verschiedenen Regionen des unreifen Rattenhirns	28
3.3. Altersabhängigkeit der durch PMA hervorgerufenen Neurodegeneration im unreifen Gehirn	30
3.4. Dosisabhängigkeit der neurodegenerativen Wirkung von PMA	32
3.5. Geringere Neuronendichte im heranreifenden Rattenhirn durch PMA	34
4. Diskussion	37
4.1. Diffuse Apoptose im unreifen Rattenhirn durch Inflammation	37
4.2. Langzeitschädigung des unreifen Gehirns durch Inflammation	39
4.3. Ausmaß des Hirnschadens und Stärke des Inflammationsstimulus	41
4.4. Ausblick	42
5. Zusammenfassung	44
6. Literaturverzeichnis	46
7. Abkürzungsverzeichnis	60
8. Lebenslauf	61
9. Danksagung	62
10. Eidesstattliche Erklärung	63

1. Einleitung

1.1. Schädigungsmechanismen im unreifen Gehirn

Frühgeborene zeigen ein erhöhtes Risiko für eine Entwicklung neurologischer Störungen, einschließlich kognitiver und psychomotorischer Defizite (Hack M et al., 2002). Die Ätiologie perinataler Hirnschäden ist vielfältig und komplex. Häufige neurologische Komplikationen bei Frühgeborenen, wie Hirnblutungen, zerebrale Minderperfusion und Infektionen, werden als Ursache von chronischen motorischen und kognitiven Defiziten diskutiert. Als Spätschäden zeigen sich Zerebralparese und kognitive Störungen auch im Erwachsenenalter (Volpe JJ, 2001; Hill A and Volpe JJ, 1981; Hagberg H et al., 2002).

Besonders der perinatale Sauerstoffmangel verbunden mit einem hypoxisch-ischämischen Ereignis wurde lange Zeit als Ursache eines perinatalen Hirnschadens angesehen. In letzter Zeit rücken jedoch zunehmend intrauterine und neonatale Infektionen sowie eine damit einhergehende Inflammation in den Vordergrund (Dammann O and Leviton A, 1997; Dammann O and Leviton A, 2004).

1.1.1 Frühgeborene und Inflammation

Frühgeborene zeigen ein hohes Risiko für die Entwicklung perinataler Infektionen (Stoll BJ et al., 2005; Stoll BJ et al., 2002a; Stoll BJ et al., 2002b; Stoll BJ et al., 2004). Tatsächlich entwickelten 65% der Frühgeborenen mit sehr geringem Geburtsgewicht eine nosokomiale Infektion (Stoll BJ et al., 2004). Als Reaktion auf eine früh oder spät einsetzende Sepsis, Meningitis oder nekrotisierende Enterokolitis wird dabei eine systemische Inflammationsreaktion verursacht, deren schwerste Manifestation eine klinische Dekompensation mit Multiorganversagen und Tod darstellt (Shim SS et al., 2004).

In den letzten Jahren konnte epidemiologisch ein Zusammenhang von intrauterinen und perinatalen Infektionen mit Hirnläsionen und Zerebralparese festgestellt werden (Nelson KB and Willoughby RE, 2000; Wu YW and Colford JM, 2000; Dammann O and Leviton A, 1998). So fand sich ein erhöhtes Risiko für Schäden der weißen Hirnsubstanz bei Frühgeborenen, die einer Chorioamnionitis (Wu YW, 2002), einer fetalen Vaskulitis (Leviton A et al., 1999) oder erhöhten Spiegeln von proinflammatorischen Zytokinen ausgesetzt waren (Yoon BH et al., 2000; Yoon BH et al., 1996)

Eine Schädigung der weißen Hirnsubstanz, wie die periventrikuläre Leukomalazie, gilt bei Frühgeborenen als ein typisches pathologisches Korrelat als Folge einer Inflammation (Yoon BH et al., 2003). Diese Schäden lassen sich im kranialen Ultraschall und noch besser in der Magnetresonanztomographie nachweisen und zeigen einen engen Zusammenhang besonders mit sensomotorischen Langzeitproblemen (Inder T et al., 1999; O'Shea TM et al., 2005). Ferner werden auch kognitive Störungen und Verhaltensauffälligkeiten bei sehr unreifen Neugeborenen in diesem Zusammenhang beschrieben (Whitaker AH et al., 1996; Whitaker AH et al., 1997; Marlow N et al., 2005).

Interessanterweise zeigten einige der Kinder, die vorgeburtlichen Infektionen ausgesetzt waren, keine Schäden in der weißen Substanz. Jedoch werden häufig intellektuelle Defizite und Aufmerksamkeitsstörungen der betroffenen Kinder beobachtet. Aus diesem Grund diskutieren Dammann et al. einen gestörten neuronalen Zelltod, eine verminderte Synaptogenese, eine dendritische Simplifikation und ein verändertes Neurotransmittervorkommen als ursächliche Pathomechanismen dieser kognitiven Störungen (Stoll BJ et al., 2004; Damman O et al., 2002). Deshalb stellt sich die Frage, in wie weit die graue Substanz des unreifen Gehirns durch Inflammation ebenfalls geschädigt wird.

Experimentelle Untersuchungen an Tiermodellen unterstützen die klinischen Erkenntnisse des Zusammenhanges von Inflammation mit den oben beschriebenen neurologischen Defiziten (Aubert A et al., 1995; Dantzer R et al., 1999). Zusätzlich werden weitere Faktoren, wie beispielsweise eine ischämisch bedingte Hypoxie im Synergismus mit inflammatorische Mechanismen für die Schäden verantwortlich

gemacht (Gomez R et al., 1998; Dammann O and Leviton A, 1997). Eine neuere Hypothese besagt, dass eine systemische Inflammation nicht zu sichtbaren ZNS-Läsionen führt, jedoch eine zerebrale Sensibilisierung (so genannte „sensitization“) verursacht und so mit anderen Ereignissen, wie z.B. Hypoxie, zusammen agiert und sich ggf. potenziert (Eklind S et al., 2001). So wurde bei neugeborenen Ratten, bei welchen zuvor ein Infektionsreiz (Lipopolysaccharid i.p.) gesetzt wurde, ein deutlich größeres Hirninfarktareal nach ischämisch bedingter Hypoxie beobachtet als bei Vergleichstieren, die keinen Infektionsstimulus erhielten (Eklind S et al., 2001).

1.2. Die Vulnerabilität des unreifen Gehirns im Rahmen des „brain growth spurt“

Während der intrauterinen Entwicklung dienen physiologisch auftretende apoptotische Vorgänge als Regulationsmechanismus für überschüssig angelegte Neurone im Gehirn. Diese für die Entwicklung des Gehirns notwendige Apoptose gleicht morphologisch der durch Schädigung auftretenden, pathologischen Apoptose (Cheema ZF et al., 1999; Dikranian K et al., 2001). Der pathologische Zellschaden ist in den verschiedenen Hirnregionen unterschiedlich stark ausgeprägt und zeigt eine direkte Proportionalität zum physiologischen Zelltod in einer bestimmten Hirnregion. Dieser Zusammenhang lässt eine Überaktivierung von physiologischen Apoptosemechanismen bei schädigungsbedingter Apoptose im unreifen Gehirn vermuten (Pohl D et al., 1999; Bittigau P et al., 1998; Bittigau P et al., 1999). Das Maximum der Vulnerabilität in der Entwicklung des Gehirns liegt etwa in der Phase des stärksten Hirnwachstums, dem so genannten „brain growth spurt“. Dieser vollzieht sich beim Menschen vom letzten Trimester der Schwangerschaft bis ca. zum zweiten Lebensjahr (Abbildung 1) (Huttenlocher PR et al., 1979; Bayer SA et al., 1993; Dobbing J and Sands J, 1979). In der Phase des rapiden Hirnwachstums kommt es zu Migration und Differenzierung von Nerven- und Gliazellen, zur Synaptogenese und auch zum physiologischen Zelltod. Der durch schädigende Einflüsse verursachte apoptotische Zelltod während dieser extrem vulnerablen Phase des Hirnwachstums könnte ein wesentlicher Faktor sein, um neurologische Folgeschäden auf das unreife Gehirn zu erklären (Bittigau P et al., 2002; Mehmet H et al., 1994; Bittigau P et al., 1999; Mazarakis ND et al., 1997; Adelson PD and

Kochanek PM 1998). Um Phänomene zu untersuchen, die im menschlichen Gehirn während dieser Periode stattfinden, werden Nagetiere wie Maus und Ratte während der vergleichbaren ontogenetischen Phase als Tiermodell benutzt. Bei der Ratte beginnt diese Phase postnatal und umfasst die ersten drei Lebenswochen. Die maximale Hirnwachstumsgeschwindigkeit bei der Ratte wird zwischen dem sechsten und zehnten Lebenstag beobachtet und stellt daher ein gutes Modell zum Studium der Mechanismen dar, die zu einer Neurodegeneration in der Perinatalzeit führen.

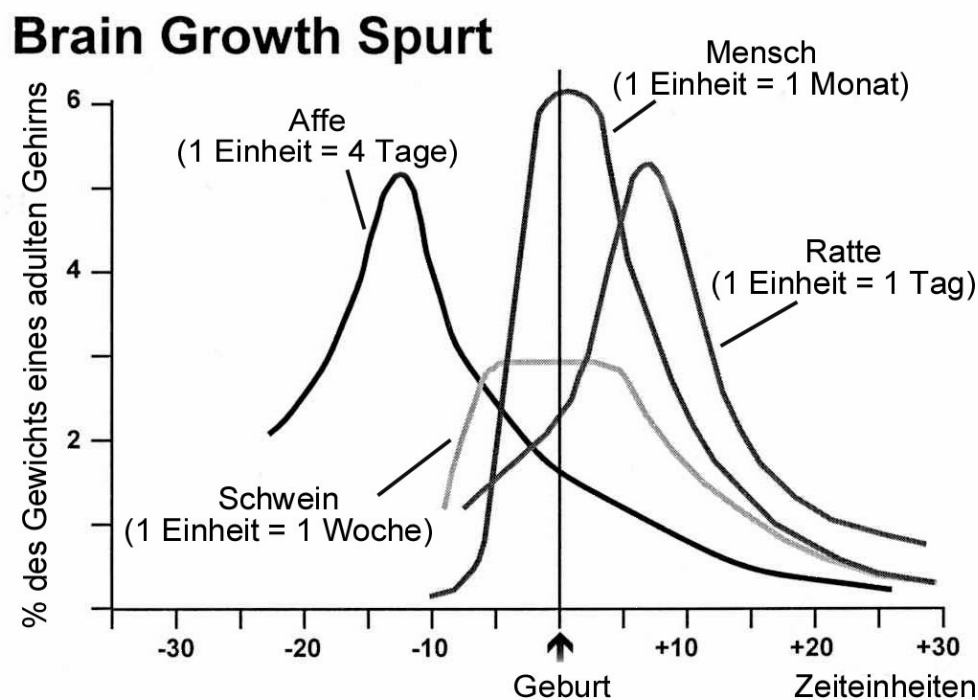


Abbildung 1: Die Periode des rapiden Hirnwachstums „brain growth spurt period“ beim Menschen, beim Affen, beim Schwein und bei der Ratte. Aus Dobbing J and Sands J, *Comparative aspects of the brain growth spurt*, *Early Hum Dev*, 3 (1979) 79-83.

1.3. Apoptose (programmierter Zelltod)

Bei der Apoptose handelt es sich um den programmierten Zelltod von überschüssigen, ektopischen, gealterten, defekten oder entarteten Zellen (Kroemer G et al., 1997). 1972 beschrieben Kerr et al. erstmals diese Art des sich aktiv vollziehenden Zelltodes. Bezug nehmend auf das natürliche, jahreszeitliche Ereignis des Abfallens der Blätter im Herbst (griechisch von apo = weg, ptosis = fallen) wurde

zur Bezeichnung dieses Zelltodes der Begriff der „Apoptose“ eingeführt (Kerr et al., 1972).

Die apoptotischen Zellen schrumpfen zu kleineren Resten, welche dann von umliegenden Zellen phagozytiert werden. Zellen, die durch Nekrose als Antwort auf ein akutes Ereignis untergehen, schwellen an, zerplatzen, schütten ihren Inhalt über benachbarte Zellen und lösen eine zerstörende entzündliche Reaktion aus.

Physiologisch findet Apoptose unter anderem während der Embryogenese statt, beispielsweise während der Entwicklung der Körperhöhlen, der Formung der Finger oder im Immunsystem durch Elimination von neu gebildeten Lymphozyten, die unbrauchbar für potenzielle Gefahren sind (Raff MC, 1992).

1.3.1. Die Apoptose in der Hirnentwicklung

Der programmierte Zelltod von Neuronen ist ein unerlässlicher Prozess bei der Entwicklung des Nervensystems. Das Gehirn wird in seiner Entwicklung mit einem Überschuss an Neuronen ausgestattet und bedarf einer Verminderung auf die Hälfte seines ursprünglichen Umfangs durch Apoptose (Burek MJ and Oppenheim RW, 1996).

Die Hauptfunktion dieses entwicklungsbedingten Zelltodes scheint im Ausgleich oder der Regulierung der Anzahl der innervierten Neurone zur Größe ihrer Zielzellen zu liegen. Es wird vermutet, dass, wie bei allen Zellpopulationen, Neurone zum Überleben eine trophische Unterstützung in Form von bestimmten Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise verschiedene Neurotrophine oder der nerve-growth-factor (NGF), benötigen. In dieser so genannten Neurotrophin-Hypothese wird vorgeschlagen, dass unreife Neurone um die trophischen Faktoren der Zielzellen konkurrieren, die nur in einer begrenzten Menge vorhanden sind. Nur Neurone, die erfolgreich in der Ausbildung synaptischer Verbindungen und Anregung ihrer Zielzelle zur Bildung von trophischen Substanzen sind, bekommen die Unterstützung der trophischen Faktoren, die das Überleben sichern (Raff MC, 1992).

Apoptose trägt aber auch zum Verlust von Nervenzellen bei Hirnschäden und neurologischen Erkrankungen bei. Die Ursachen, die hierbei zur Induktion des programmierten Zelltodes führen, sind beispielsweise das Fehlen trophischer Unterstützung, DNA-Schäden oder die Wirkung von Neurotoxinen und oxidativem Stress.

1.3.2. Lokalisation physiologischer Apoptosevorgänge im Rattenhirn

Im fetalen Rattenhirn beschränkt sich der physiologische Zelltod auf die Keimmatrixzonen und niedere Hirnzentren (Ishimaru MJ et al., 1999). Im frühen Neugeborenenalter der Ratte (erster bis fünfter Lebenstag) werden apoptotisch degenerierende Zellen in vielen Regionen im Mittel- und Frontalhirn nachgewiesen. Am zweiten Lebenstag lässt sich die physiologische Apoptose in der Nähe der Ventrikel und des Aquädukts am besten studieren. Schon am zehnten Tag nach der Geburt finden sich jedoch kaum noch Hinweise auf physiologische Apoptosevorgänge.

1.3.3. Aktivierung der Apoptose

Apoptose kann sowohl über extrazelluläre als auch intrazelluläre Faktoren induziert werden.

Die extrazelluläre Aktivierung geschieht durch die Bindung von Liganden an spezifischen Oberflächenrezeptoren (Barinaga M, 1996; Wallach D, 1997), was zur Durchführung des apoptotischen Programmes, durch sogenannte Caspasen führt (Krammer PH, 2000; Peter ME and Krammer PH, 2003). Caspasen sind eine Gruppe von Cystein-Proteasen, die in der Lage sind, Proteine zu spalten, die die Kernmembran stützen und die DNA in ihrer aktiven Form halten, was den geordneten Abbau des Zellkerns zur Folge hat. Unterstützt wird dieser Mechanismus durch die ebenfalls durch Caspasen induzierte Freisetzung von DNAsen. Darüber hinaus dienen Caspasen auch der Zerlegung von zytoskelettalen Proteinen und

interzellulären Adhäsionsmolekülen, wodurch sich die betreffende Zelle vom Zellverband zu lösen vermag.

Der intrazelluläre Weg der Apoptose wird durch Mitochondrien vermittelt. Er kann durch Strangbrüche der DNA bei radioaktiver Bestrahlung, Entzug des Wachstumsfaktors NGF (nerve growth factor), virale Faktoren, Pharmaka oder Zellschädigung durch freie Radikale im Rahmen von oxidativem Stress ausgelöst werden. Dadurch kommt es zu einer Änderung des mitochondrialen Membranpotentials. Infolgedessen wird Cytochrom C, das normalerweise an der Atmungskette in Mitochondrien beteiligt ist und den Hauptenergieüberträger bei der ATP-Bildung darstellt, aus den Mitochondrien in das Zytoplasma ausgeschüttet (Kroemer G et al., 1997 ; Kroemer G, 1997; Peter ME and Krammer PH, 1998; Kayahara M et al., 1998). Cytochrom C bindet an den Apoptotic-Protease-Activating-Factor (Apaf-1) und bildet mit diesem einen Komplex, der zur Aktivierung einer Caspasen-Kaskade führt (Susin SA et al., 1999; Yuan J and Yankner BA, 2000). Die apoptotische Signaltransduktionskaskade ist ein komplex regulierter Mechanismus und es gibt zahlreiche Apoptose-regulierende Elemente.

1.3.4. Morphologische Kennzeichen der Apoptose

Die Apoptose wird durch ein System verschiedener Caspasen eingeleitet. Durch ein proteolytisches System werden die einzelnen Schritte der Apoptose, die auch elektronenmikroskopisch beobachtbar sind, hervorgerufen (Abbildung 2).

Anfangs sind schrumpfende Zellen mit noch intakter Zellintegrität zu sehen. Die Zellkontakte lösen sich, das Chromatin kondensiert entlang der Kernmembran (kernperiphere Chromatinverklumpung), der Kern schrumpft (Karyopyknose) und die nukleäre DNA wird fragmentiert. Beim Zerfall der Zelle entstehen Fragmente, so genannte Apoptosekörperchen ("apoptotic bodies"), die anschließend phagozytiert werden, ohne dass es dabei zu einer wesentlichen inflammatorischen Reaktion kommt (Kerr JF et al., 1972). Ishimaru et al. (1999) studierten im Gehirn zwei Tage alter Ratten den Ablauf der ultrastrukturellen Veränderungen von Neuronen, die im Rahmen der physiologischen Apoptose degenerierten. Anhand der oben genannten morphologischen Kriterien kann man die Apoptose von der Nekrose abgrenzen. Die

von Ishimaru beschriebenen Veränderungen werden als Referenzstandard benutzt, um neuropathologische Veränderungen als apoptotisch einzuordnen (Dikranian K et al., 2001).

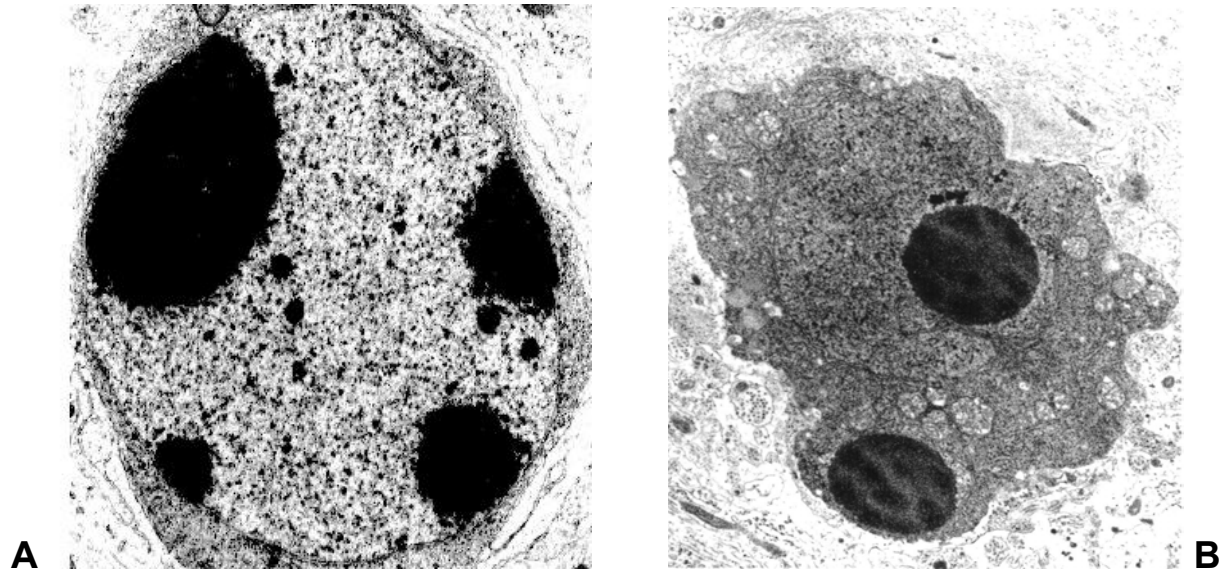


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Darstellung des Nukleus von apoptotischen Neuronen: Bild A zeigt die charakteristische Morphologie eines frühen apoptotischen Stadiums mit intakter nukleärer Membran und kondensierten “Chromatinbällen“. Ein spätes Stadium der Apoptose ist in Bild B dargestellt: Mit fortschreitender Neurodegeneration entrundet sich die nukleäre Membran und kondensiertes Chromatin stülpt sich ins Zytoplasma vor (unterer Bildrand). Aus Dikranian K et al., Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain, *Neurobiol Dis*, 8 (2001) 359-379.

1.4. PMA als Mimikry von mikrobiellen Antigenen

Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) ist ein Phorbol-ester, der als sehr potenter Tumorpromotor und unspezifischer Aktivator der Proteinkinase C (PKC) bekannt ist. Untersuchungen legen nahe, dass eine durch PMA induzierte Aktivierung der PKC in Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und in Granulozyten zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen führt.

1.4.1. Stimulation des Monozyten-Makrophagen-Systems durch PMA

Die Abwehr infektiöser Pathogene, wie der von Bakterien, Viren und Pilzen, beginnt im menschlichen Organismus zumeist im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr durch neutrophile Granulozyten sowie durch Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems (MMS). Neben doppelsträngiger RNA aus Viren und Mannan aus Pilzen spielen Lipopolysaccharide von Bakterien bei der immunologischen Erkennung verschiedener Mikroorganismen eine Rolle.

Lipopolysaccharide sind Bestandteil der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien und führen rezeptorvermittelt zur Aktivierung des Monozyten-Makrophagen-Systems (MMS). Insbesondere Moleküle aus der Gruppe der Toll-Like-Rezeptoren (TLR), welche ubiquitär von den Zellen des MMS exprimiert werden, veranlassen nach extrazellulärer Erkennung von LPS-Bestandteilen die intrazelluläre Produktion verschiedener Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ oder IL-6 und die Bildung von reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (Cohen J and Glauser MP 1991; Vadiveloo PK, 1999). Ferner wird bei der LPS-induzierten TLR-Aktivierung eine gleichzeitige Aktivierung zahlreicher Proteinkinasen beobachtet, welche vermutlich in den Prozess der Zytokinproduktion eingebunden sind. Neben verschiedenen Tyrosin- und Serin-Threonin-Kinasen sowie der MAPK (mitogen-activated-protein-kinase) ist hierbei insbesondere die Proteinkinase C von Bedeutung.

Kontny et al. (1998) konnten zeigen, dass der PKC-Aktivator PMA in Monozyten zu einer Produktion der Zytokine $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 führt. Quantitativ lag die Rate der PMA-induzierten Zytokinproduktion jedoch deutlich unterhalb der LPS-induzierten Zytokinproduktion (beispielsweise für $\text{TNF}\alpha$ 40%). Darüber hinaus konnten Hu J et al. (2002) die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch eine spezifische Hemmung der PKC in Makrophagen und Dendritischen Zellen blockieren.

1.4.2. Stimulation von Granulozyten durch PMA

Neutrophile Granulozyten spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle in der ersten immunologischen Abwehr gegen infektiöse Stoffe. Sie sind bedeutsam für die Phagozytose von opsonierten Partikeln, Degranulation mit Freisetzung von Proteasen und die Produktion von reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (NOS), zum Abtöten von Mikroben (Martins PS et al., 2003).

Ebenso zeigt die Stimulation von Granulozyten mit PMA eine inflammationstypische Reaktion der Zelle mit Freisetzung von Sauerstoffradikalen und granulozytären Enzymen (McPhail LC and Snyderman R, 1983).

Im Tiermodell ließen sich nach intravenöser Injektion von PMA Entzündungsreaktionen in Form eines akuten proteinreichen Lungenödems nachweisen (Shasby DM et al., 1982).

1.5. Fragestellung

Obwohl große Fortschritte in der Neonatologie zu einem vermehrten Überleben von Frühgeborenen geführt haben, leidet ein Teil von ihnen unter neurologischen Auffälligkeiten mit motorischen und kognitiven Defiziten. Besonders intrauterine und neonatale Infektionen, die teilweise auch die Ursache einer Frühgeburt sind, werden dabei für Gehirnschäden verantwortlich gemacht (Taylor DL et al., 1999). Dabei scheint die eigene systemische Inflamationsantwort einen schädlichen Effekt auf verschiedene Organe und längerfristig auch auf das sich entwickelnde Gehirn zu haben (Eicher DJ, 2002).

Die genauen Mechanismen, durch welche eine systemische Inflammation bei Frühgeborenen zu bleibenden Hirnschäden führt, sind komplex und noch nicht verstanden. Hierfür ist es notwendig, ein reproduzierbares Tiermodell zu entwickeln, das die genaue Untersuchung der pathophysiologischen Zusammenhänge ermöglicht und dadurch die Möglichkeit der Entwicklung neuer Therapieansätze eröffnet. Da für Inflammationen bei Frühgeborenen vor allem Bakterien verantwortlich sind, erscheint es zweckmäßig, direkt einen entsprechenden bakteriellen Stimulus zu nutzen. In diesem Zusammenhang wurden in der

Arbeitsgruppe Felderhoff-Müser Experimente mit neonatalen Ratten, die intraperitoneale Injektionen von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) erhielten, durchgeführt. In diesen Vorversuchen zeigten sich bei gleicher Dosierung einerseits massive Schäden in den Rattenhirnen und viele Tiere überlebten keine 24 Stunden, andere Versuchstiere zeigten wiederum nur wenig Schaden. Darüber hinaus ließen sich präexperimentelle Kontakte der Versuchstiere mit gramnegativen Bakterien nicht immer konsequent verhindern, so dass eine entsprechende Präkonditionierung der Tiere gegenüber LPS nicht auszuschließen war. Somit war eine einheitliche Standardisierung aller Versuchstiere nicht zu gewährleisten. Ein Inflammationsmodell an der neonatalen Ratte mit LPS erscheint somit schwer reproduzierbar, weshalb eine andere Stimulationsmöglichkeit entwickelt werden sollte.

Koshika et al. konnten zeigen, dass der als PKC-Aktivator bekannte Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) inflammatorische Eigenschaften aufweist und im Tiermodell entsprechend eine systemische Inflammation mit Hypoxie, Hypotension und erhöhtem pulmonalkapillären Widerstand bewirkt (Koshika T et al., 2001). Eine Präkonditionierung der Versuchstiere gegenüber PMA ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen, da PMA eine erprobte Substanz aus der chemisch-pharmazeutischen Forschung ist. Es kann angenommen werden, dass PMA im Gegensatz zu LPS von höherer therapeutischer Breite ist und sich daher besser dosieren lässt. PMA scheint somit zur systemischen inflammatorischen Stimulation der neonatalen Ratte sowie zur anschließenden Untersuchung neuronaler Schäden besonders geeignet.

Unter Verwendung von PMA sollte nun der Frage nachgegangen werden, inwieweit eine PMA-induzierte systemische Inflammation einen schädlichen Einfluss auf das heranreifende Gehirn ausübt. Neben der histologischen Beschreibung des Ausmaßes neuronaler Degeneration unter Einwirkung verschiedener PMA-Konzentrationen sollte darüber hinaus versucht werden, durch Zelldichtemessung auch Aussagen über bleibende Hirnschäden zu treffen und damit die Eignung als standardisiertes Tiermodell zu überprüfen.

2. Material und Methoden

2.1. Tierversuche

Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen mit 7 und 14 Tage alten Han Wistar Ratten durchgeführt. Die Genehmigung für die Tierversuche gab das Landesamt für technische Sicherheit und Arbeitsschutz Berlin. Die Tiere wurden vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV) geliefert. Den Ratten wurde entweder 0,9%ige Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, Kontrolltiere) oder Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) (Sigma, St. Louis, USA) einmalig in einer Dosierung von 100 µg/kg Körpergewicht, 200 µg/kg Körpergewicht oder 500 µg/kg Körpergewicht intraperitoneal gespritzt (siehe Tabelle 1). Das Volumen der Injektionslösung betrug 10 ml/kg Körpergewicht. Nach diesem Procedere wurden die Jungtiere zu ihren Müttern zurückgesetzt, wodurch zusätzlicher Stress und Unterkühlung sowie Hunger zu verhindern versucht wurde. Um Verzerrungen durch Mangelernährung zu vermeiden, wurde die Größe der Würfe zwischen 10 und 15 Geschwistern gehalten sowie tägliche Gewichtskontrollen durchgeführt. Die Tiere der Kontrollgruppe, die NaCl 0,9% erhielten, und die Tiere die mit PMA behandelt wurden, waren Wurfgeschwister und wurden gemeinsam unter den gleichen Bedingungen gehalten.

Substanzen i.p.	NaCl 0,9%	PMA	PMA	PMA
Dosierungen:	10 ml/kg Körpergewicht einmalig	100 µg/kg Körpergewicht Einmalig	200 µg/kg Körpergewicht einmalig	500 µg/kg Körpergewicht einmalig
Überlebenszeit	24 Stunden	24 Stunden	24 Stunden	24 Stunden
Alter der Tiere	7 Tage	7 Tage	7 Tage	7 Tage
Färbungsart	De Olmos	De Olmos	De Olmos	De Olmos
Tierzahl/Gruppe	8	7	9	10
Substanzen i.p.	NaCl 0,9%	PMA		
Dosierungen:	10 ml/kg Körpergewicht einmalig	500 µg/kg Körpergewicht Einmalig		
Überlebenszeit	24 Stunden	24 Stunden		
Alter der Tiere	14 Tage	14 Tage		
Färbungsart	De Olmos	De Olmos		
Tierzahl/Gruppe	5	8		

Tabelle 1: Übersicht zu den durchgeführten Experimenten mit den verwendeten Dosierungen und Substanzen.

2.2. Perfusion, Einbettung und Schnitt für die DeOlmos-Silberfärbung

Die Versuchstiere bekamen 24 Stunden nach der Injektion eine Überdosis Chloralhydrat (Braun, Ingelheim, Deutschland) gespritzt. Es wurde der Thorax eröffnet und eine Kanüle über den linken Ventrikel in die Aorta vorgeschoben. Die Perfusion erfolgte zunächst mit PBS, dann mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung (Merck-Schuchard, Hohenbrunn, Deutschland), gelöst in Phosphatpuffer (Sigma, St. Louis, USA, pH-Wert = 7,4). Nach der Perfusion präparierte man die Gehirne aus den Schädeln. Die Gehirne erhielten bis zur Färbung in 4%iger Paraformaldehydlösung eine 72 stündige Nachfixation und lagerten anschließend in reiner Phosphatpufferlösung. In einem weiteren Arbeitsschritt wurden die Gehirne in Agar (Sigma, St.Louis, USA) eingebettet und am Rotationsvibrator (Typ OTS 3000, Electron Microscopy Sciences, USA) koronar mit einer Dicke von 70 µm geschnitten. Jeder 7. Schnitt wurde für die DeOlmos Kupfersilberfärbung ausgelesen. Nach

weiterer Nachfixierung in 4%iger Paraformaldehydlösung für 24 Stunden erfolgte die Färbung der Schnitte nach dem DeOlmos-Protokoll (siehe 2.4.).

2.3. DeOlmos Kupfersilberfärbung

In der DeOlmos Kupfersilberfärbung werden degenerierende Axone und Neurone dunkelbraun bis schwarz gefärbt und heben sich deutlich vom goldgelben Hintergrund ab (DeOlmos JS and Ingram WR, 1971). Die Färbung beruht auf einer Reaktion des Axoplasmas von degenerierenden Neuronen mit dem Silbersalz, das durch die durchlässig gewordene Zellmembran der geschädigten Neurone in die Zellen eindringen kann. Diese Färbung eignet sich besonders gut für Screeninguntersuchungen, da sie kostengünstig und leicht durchführbar ist. Die DeOlmos Kupfersilberfärbung ist die Methode der Wahl für Experimente, bei denen es auf große Fallzahlen ankommt. Sie lässt keine Rückschlüsse auf den neuronalen Degeneration zugrunde liegenden Pathomechanismus zu. Als erstes wurden die Schnitte unter Lichtabschluss 48 bis 72 Stunden in einer Kupfer-Silber-Lösung inkubiert. Die Lösung setzte sich wie folgt zusammen: 1,5 g Silbernitrat, 3 ml 0,5%ige Kupfernitratlösung, 15 ml 0,1%ige Allantoinlösung, 9 ml Boratpuffer, 17 ml Ethanol absolut und 9 ml Pyridin. Nach der Reinigung mit reinem Aceton erfolgte die 35minütige Inkubation mit Silber-Diammin-Lösung: 24 g Silbernitrat, 120 ml zweifach destilliertes Wasser, 60 ml 0,4%ige Natronlauge und 30 ml Ammoniak. Unter Agitation wurden die Schnitte in einer ethanolischen Lösung von Formaldehyd und Zitronensäure reduziert. Die genaue Zusammensetzung war: 135 ml zweifach destilliertes Wasser, 15 ml Ethanol (100%), 180 µl 37%ige Formaldehydlösung und 10,5 mg Zitronensäure. Dann wurden sie einzeln mit 0,3%iger Kaliumferrizyanidlösung gebleicht. Zweimaliges Waschen mit zweifach destilliertem Wasser war die Vorbereitung zur abschließenden Stabilisierung des Färbeergebnisses über eine Minute mit 0,1%iger Natriumthiosulfatlösung. Nach Dehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate mit Hilfe von Paramount-Medium auf Objektträger aufgebracht und mit Deckgläsern versehen.

2.4. Morphometrie

Das infantile Rattengehirn zeigt im Rahmen der physiologischen Entwicklung Apoptose, darum ist eine genaue Quantifizierung des Ausmaßes der Apoptose bei mit PMA behandelten und mit NaCl 0,9% behandelten Tieren notwendig. Für diese Untersuchung wurde die stereologische Dissektionsmethode verwendet (unbiased stereological dissector method) (Gundersen HJ et al., 1988). Darunter ist die Aufspaltung des großen, „unzählbaren“ Gewebeblockes in kleine, „zählbare“ Untereinheiten (Fractionation) zu verstehen. Diese Fragmente werden nach zufälliger Auswahl mit Hilfe eines fixen Zählrahmens am Okular des Mikroskopes ausgezählt. Der Zählrahmen gibt die Ausdehnung in einer Ebene vor. Die dritte Dimension, die zur Beurteilung eines dreidimensionalen Objekts notwendig ist, wird durch die Dicke des Schnittes bestimmt. Das Ergebnis dieser ausgezählten Untereinheit wird mit der Gesamtzahl aller Untereinheiten multipliziert. Als Endresultat erhält man die Zellzahl in einem bestimmten Gewebevolumen. Der Zusatz „stereological dissector“ bedeutet, dass man mit dem Mikroskop den Schnitt in verschiedenen Ebenen fokussiert. Als mögliche Fehlerquellen kommen extrem inhomogene Verteilung der zu zählenden Objekte und Schwellung oder Schrumpfung des Gesamtvolumens in Betracht. In diesem Fall wurde ein 50 µm x 50 µm großer Zählrahmen verwendet. Die Schichtdicke des Schnittes betrug 70 µm. Es wurden zufällig 8 bis 10 Felder innerhalb einer Hirnregion ausgesucht und ausgezählt. Das Ausmaß der Apoptose wird als Verhältnis der Anzahl degenerierender Zellen zur Gesamtzellzahl dargestellt und durch einen Prozentwert ausgedrückt (Mittelwert +/- Standardfehler SEM). Die Dichte an degenerierenden Zellen wurde zum einem für die einzelnen ausgezählten Regionen ausgewiesen und in einem zweiten Schritt wurden die einzelnen Zelldichtewerte zu einem Gesamtscore summiert. So konnten Tiere aus Kontroll- und Versuchsgruppe an Hand eines einzelnen Wertes verglichen werden. Im einzelnen wurden die folgenden 17 Regionen ausgezählt:

1. frontaler Cortex Lamina II
2. frontaler Cortex Lamina IV
3. Gyrus cinguli Lamina II
4. Gyrus cinguli Lamina IV
5. Nucleus caudatus
6. Septum

7. parietaler Cortex Lamina II
8. parietaler Cortex Lamina IV
9. retrosplenialer Cortex Lamina II
10. retrosplenialer Cortex Lamina IV
11. laterodorsaler Thalamus
12. mediodorsaler Thalamus
13. ventraler Thalamus
14. Hypothalamus
15. Hippocampus (CA 1)
16. Gyrus dentatus
17. Subiculum

2.5. Statistische Auswertung

Die Auszählung der mit DeOlmos-Kupfersilberfärbung gefärbten Präparate erfolgte verblindet und wurde durch erfahrene Untersucher kontrolliert. Das Endresultat wurde als numerische Neuronendichte angegeben: degenerierende Neurone pro mm^3 . Es wurden insgesamt 17 Hirnregionen ausgewertet. Die Ergebnisse der Einzelzählungen jeder Region wurden gemittelt. Die Unterschiede zwischen Versuchsgruppen wurden mit Hilfe des Student's t-Test auf ihre Signifikanz hin überprüft. Die Untersuchungen zur Zeit- und Dosisabhängigkeit der PMA bedingten Schäden wurden mit Hilfe der ermittelten Gesamtscores und der Varianzanalyse (ANOVA) überprüft.

2.6. Perfusion, Einbettung, Schnitt für TUNEL-Färbung, Kresylviolett-Färbung, Fluoro-Jade-B-Färbung und Caspase-3-Immunhistochemie

Die Versuchstiere wurden 24 Stunden nach der NaCl 0,9%- oder PMA-Injektion mit einer Überdosis Chloralhydrat (Braun, Ingelheim, Deutschland) getötet und transkardial perfundiert. Nach der Perfusion erfolgte die Nachfixation der Gehirne in 4%iger Paraformaldehydlösung (Merck-Schuchard, Hohenbrunn, Deutschland) mit 2% Cacodylat-Puffer (Sigma, St.Louis, USA, pH-Wert = 7,4) für 5 Tage. Die

anschließende Paraffineinbettung begann mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-100%). Die Gehirne wurden dabei für jeweils 1 Stunde bei 40°C durch den Alkohol entwässert. Am Ende dieser Alkoholreihe lagerten die Gehirne noch für 2 weitere Stunden in 100%igem Chloroform. Nun erfolgte die Imprägnierung mit flüssigem Paraffin zuerst für 1 Stunde bei 60°C und dann in einem weiteren Paraffinbad über Nacht. Am nächsten Tag fand die endgültige Einbettung in reinem Paraffin statt. Dabei wurde flüssiges Paraffin in eine Form gegossen und die Gehirne dann in das noch flüssige Paraffin gegeben. Nach dem Erstarren des Paraffins bei Raumtemperatur konnten die Paraffinblöcke in Form geschnitten werden und am Mikrotom (HM 360, Microm, Walldorf, Deutschland) in 10 µm dicke koronare Präparate geschnitten werden, um später nach TUNEL, Caspase-3, Kresylviolett und Fluoro-Jade-B angefärbt werden zu können (siehe Tabelle 2).

Substanzen i.p.	NaCl 0,9%	PMA	NaCl	PMA
Dosierungen:	10 ml/kg Körpergewicht einmalig	500 µg/kg Körpergewicht einmalig	10 ml/kg Körpergewicht einmalig	500 µg/kg Körpergewicht einmalig
Überlebenszeit	7 Tage	7Tage	14 Tage	14 Tage
Alter der Tiere	14Tage	14 Tage	21 Tage	21 Tage
Färbungsart	Kresylviolett	Kresylviolett	Kresylviolett	Kresylviolett
Tierzahl/Gruppe	7	6	7	10
Substanzen i.p.	NaCl 0,9%	PMA	PMA	PMA
Dosierungen:	10 ml/kg Körpergewicht einmalig	500 µg / kg Körpergewicht einmalig	500 µg/kg Körpergewicht Einmalig	500 µg/kg Körpergewicht Einmalig
Überlebenszeit	24 Stunden	24 Stunden	24 Stunden	24 Stunden
Alter der Tiere	3 Tage	3 Tage	7 Tage	7 Tage
Färbungsart	FluroJade	FluroJade	Caspase-3	TUNEL
Tierzahl/Gruppe	10	11		

Tabelle 2: Übersicht über die durchgeführten Experimente mit den verwendeten Dosierungen und Substanzen.

2.7. TUNEL-Färbung

Zur Bestätigung der Apoptose wurde eine TUNEL-Färbung (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) durchgeführt. Dabei wird die Aufspaltung der nukleären DNA durch Endonukleasen in Fragmente von ca. 180 Basenpaaren Länge als Kennzeichen der Apoptose nachgewiesen. Das Enzym Terminaldesoxynucleotidyltransferase reagiert nur mit 3'-OH Enden von DNA und fügt an sie biotinylierte Polydesoxyuridylnukleotide an. Diese Biotinenden reagieren nun ihrerseits mit Avidin, das an eine Peroxidase gekoppelt ist. Diese Peroxidase katalysiert die Farbreaktion, die im histologischen Präparat sichtbar wird. Eine apoptotische Zelle ist mit der TUNEL-Methode für ca. ein bis drei Stunden nachweisbar. Die Färbung wurde mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Apoptag, ONCOR Appligene, Heidelberg) durchgeführt, die Gehirne wurden mit Methylgrün gegengefärbt. Das Resultat waren dunkelbraune Kerne von allen Zellen, die DNA-Fragmentierung zeigten. Das Zytoplasma intakter Zellen wurde mit Methylengrün gegengefärbt.

2.8. Immunhistochemischer Nachweis von Caspase-3

Ein weiterer, noch spezifischerer und sensitiverer Nachweis von apoptotisch untergehenden Zellen als die TUNEL-Färbung ist die immunhistochemische Färbung der aktiven Caspase-3. Caspase-3 liegt in ihrer inaktiven Form als Procaspase-3 vor. In apoptotischen Zellen wird dieses Protein in zwei Fragmente gespalten. Der Caspase-3-Antikörper (Cell Signalling, NEB, Frankfurt) erkennt spezifisch ein durch die Spaltung neu entstandenes Epitop des großen Fragmentes der aktivierten Caspase-3. Er reagiert weder mit Procaspase-3 noch mit einer anderen aktivierten Caspase und eignet sich somit hervorragend zum Nachweis der aktivierten Caspase-3, deren Gegenwart als spezifisch für apoptotische Zellen angesehen wird.

Die 10 µm dicken Hirnschnitte wurden auf mit 3-Aminopropyltriethoxysilanbeschichtete Objektträger aufgebracht. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Schnitte in Zitratpuffer (pH = 6,0) bei 750 W in der Mikrowelle (Shi SR et al., 1997). Hydrogenperoxid 0,6% (15 Minuten) blockierte die endogene Peroxydaseaktivität. Darauf folgte eine Inkubation der Schnitte zunächst 20 Minuten mit normalem

Ziegenserum und anknüpfend über Nacht bei 4°C mit einem 1:100 verdünnten Caspase-3-Antikörper. Die Negativkontrollen wurden mit Hilfe von Peptidimmunogen durchgeführt, einem Konkurrenten der Antikörperbindung. Die Schnitte erhielten danach ein Kaninchen-Antiziegen-IgG (Southern Biotech). Nach der Färbung mit einem ABC-Kit (Vector Laboratories, Peterborough, GB) konnten die positiven Zellen mit Hilfe von Diaminobenzidin (DAB) visualisiert und mit Mayers Hämalaun gegengefärbt werden.

2.9. Kresylviolett-Färbung

Für die Neuronendichtebestimmung wurden die Hirnschnitte der 14 bzw. 21 Tage alten Tiere mit einer Kresylviolett-Färbung bearbeitet, da sich diese Färbung zur lichtmikroskopischen Darstellung nahezu aller Neuronen in einem jeweiligen Nervengewebe eignet. Der Farbstoff Kresylviolett färbt dabei charakteristisch das endoplasmatische Retikulum der Zellen an. Während der Färbeprozedur wurde das Material zunächst kurz in destilliertem Wasser (Aqua dest.) und anschließend in 70%igem Alkohol gespült, bevor es durch eine Inkubation für ein bis zwei Minuten in Aqua dest., versetzt mit 5 Tropfen 99%igem Eisessig auf 100 ml, leicht angesäuert wurde. Die Färbung erfolgte durch eine Inkubation der Präparate für 10 min. in 1%igem Kresylviolett auf dem Schüttler. Es schlossen sich zwei kurze Spülgänge in Aqua dest. an, bevor unter optischer Kontrolle in Spülgängen in Alkohol plus Eisessig (70% und 96% Alkohol) differenziert wurde.

2.10. Fluoro-Jade-B-Färbung

Von den Gehirnen der 3 Tage alten Ratten konnten aufgrund ihrer geringen Größe keine 70 µm dünnen Schnitte hergestellt werden, welche für die DeOlmos-Silberfärbung notwendig wären. Von diesen Gehirnen wurden 10 µm dünne Schnitte angefertigt und mit der Fluoro-Jade-B-Färbung bearbeitet. Mit Hilfe der Fluoro-Jade-B-Färbung können degenerierte Zellen sichtbar gemacht werden. Hierzu wurden entparaffinierte Gewebeschnitte für 15 min. bei Raumtemperatur in einer Kaliumpermanganatlösung inkubiert. Nach dem Waschen in Aqua dest. wurden die Gewebeschnitte für 30 min. und RT in einer Fluoro-Jade-B-Gebrauchslösung

inkubiert. Anschließend wurden die Präparate erneut mit Aqua dest. gewaschen, nach dem Trocknen bei Raumtemperatur eingedeckelt und bis zur mikroskopischen Auswertung dunkel bei 4°C gelagert (Schmued LC et al., 1997).

2.11. Morphometrie und statistische Auswertung der Zelldichte

Die Zelldichten wurden in Kresylviolett gefärbten Schnitten ermittelt. Kresylviolett gilt als standardisierte Routine- und Übersichtsfärbung, die das Zytoplasma intakter Zellen anfärbt (siehe 2.9.). Die Auswertung der mit Kresylviolett angefärbten Zellen im Cortex (frontal, parietal, zingulär und retrosplenial, Lamina II und IV), Nucleus caudatus, Septum, Thalamus (laterodorsaler, mediodorsaler und ventraler), Hypothalamus, Hippocampus (CA 1), Gyrus dentatus und Subiculum erfolgte mit der stereologischen Dissektionsmethode (siehe 2.4.). Die Auszählung der mit Kresylviolett gefärbten Präparate erfolgte verblindet, die Kontrolle durch erfahrene Untersucher fand statt. Das Resultat wurde als numerische Neuronendichte angegeben (vorhandene Neurone pro mm^3), die Ergebnisse der Einzelzählungen jeder Region wurden gemittelt und die Unterschiede zwischen den ermittelten Gesamtscores der Versuchsgruppen mit Hilfe des Student's t-Tests und 2-way-ANOVA-Tests auf ihre Signifikanz hin überprüft.

3. Ergebnisse

3.1. Der Proteinkinase-C-Aktivatoren PMA als Verursacher von Neuronendegeneration im unreifen Rattenhirn

6 Tage alten Ratten wurde entweder 0,9%ige Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) 10 ml/kg Körpergewicht oder Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) in einer Konzentration von 500 µg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach 24-stündiger Exposition wurden die Tiere getötet und von den präparierten Gehirnen 70 µm dünne Schnitte angefertigt. Die Hirnschnitte erhielten anschließend eine Kupfersilberfärbung nach DeOlmos in welcher sich der Nervenzelluntergang histologisch als einzelne, bräunlich bis schwarz angefärbte degenerierende Zellen darstellt. Bei den mit NaCl 0,9% behandelten Tieren (n=8) (Kontrolltiere) zeigte sich hierbei ein physiologisch geringes Ausmaß von degenerierenden Zellen, welches altersentsprechend im unreifen Gehirn der Ratte zu erwarten ist (Abbildung 3A). Im Gegensatz dazu weisen die Gehirne von mit PMA behandelten Tieren (n=10) (PMA-Tiere) ein deutlich höheres Ausmaß an untergehenden Zellen auf (Abbildung 3 B).

Besonders deutlich zeigt sich bei den PMA-Tieren eine über das physiologische Ausmaß hinaus stattfindende Apoptose in den thalamischen Kerngebieten, im Nucleus caudatus, dem Hypothalamus, Subiculum sowie im Hippocampus.

Da die Silberfärbung keine Differenzierung zwischen Nekrose und Apoptose zulässt, wurden die Ergebnisse der Silberfärbung durch weitere Färbungen, die apoptotische Zellen darzustellen vermögen, untersucht. Dabei wurden 10 µm dünne Schnitte der Rattenhirne mit einem Antikörper für die aktivierte Form von Caspase-3, TUNEL und Fluoro-Jade-B angefärbt. Auch hier zeigen die Gehirne der Ratten, die PMA erhielten, deutlich mehr Apoptose als die Tiere, die NaCl 0,9% gespritzt bekamen.

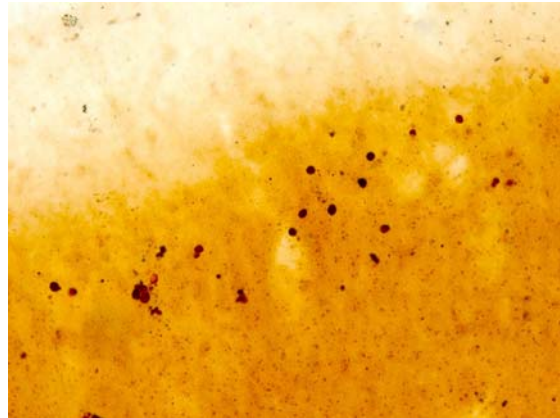
A**B**

Abbildung 3: Histologische Darstellung aus dem Gehirn 7 Tage alter Ratten (Kupfersilberfärbung nach DeOlmos).

6 Tage alte Ratten bekamen entweder NaCl 0,9% oder PMA (500 µg/kg Körpergewicht) intraperitoneal verabreicht. Am 7. Lebenstag wurden die Tiere getötet, 70 µm dünne Hirnschnitte angefärbt und mit der Kupfersilberfärbung nach DeOlmos bearbeitet. A und B zeigen Detailaufnahmen (Vergrößerungsfaktor 400) aus der Lamina II des Cortex frontalis 24 Stunden nach i.p. Applikation von NaCl 0,9% (A) oder PMA (B). Gehirne der PMA-Tiere (B) zeigen deutlich mehr dunkelbraun angefärbte apoptotische Zellen im Vergleich zu den mit NaCl 0,9% behandelten Tieren (A).

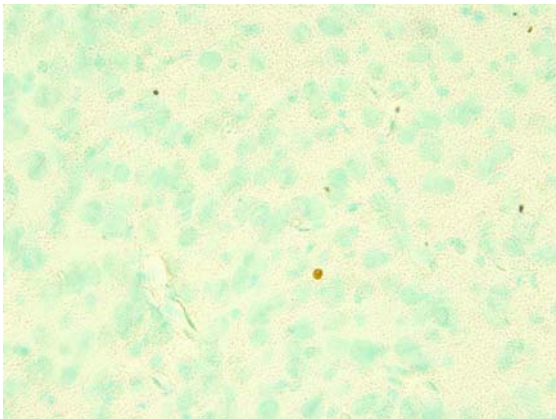
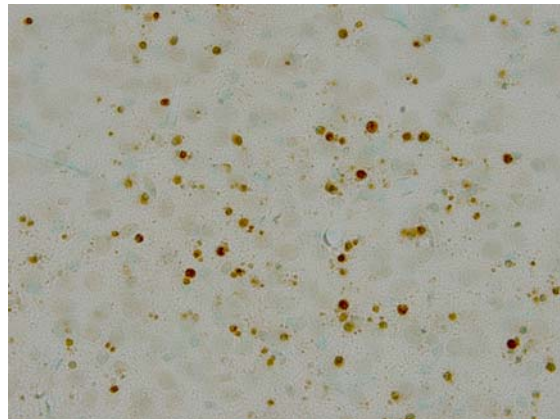
A**B**

Abbildung 4: Histologische Darstellung 10 µm dünner Schnitte aus dem Gehirn 7 Tage alter Ratten (TUNEL-Färbung).

Detailaufnahme (Vergrößerungsfaktor 400) aus dem ventralen Thalamus 7 Tage alter Ratten, die am 6. Lebenstag eine i. p. Injektion von NaCl 0,9% (A) oder von PMA (500 µg/kg Körpergewicht) (B) erhielten. Am 7. Lebenstag wurden die Tiere getötet und 10 µm dünne Hirnschnitte nach TUNEL gefärbt. In der TUNEL-Färbung zeigen alle Zellen, die eine DNA-Fragmentierung aufweisen, dunkelbraun gefärbte Kerne. Intakte Zellen wurden mit Methylengrün gegengefärbt. Die Gehirne der PMA-Tiere (B) zeigen deutlich mehr degenerierende Zellen im Vergleich zu den Kontrolltieren (A).

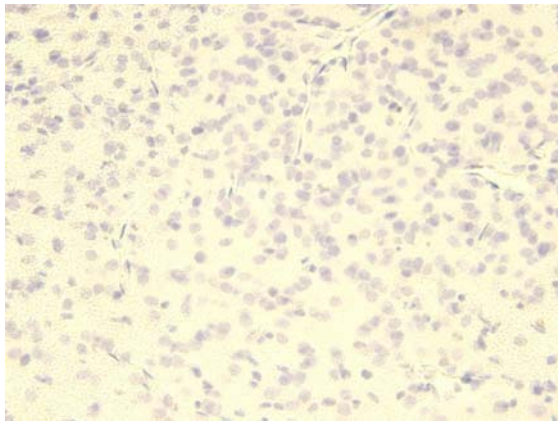
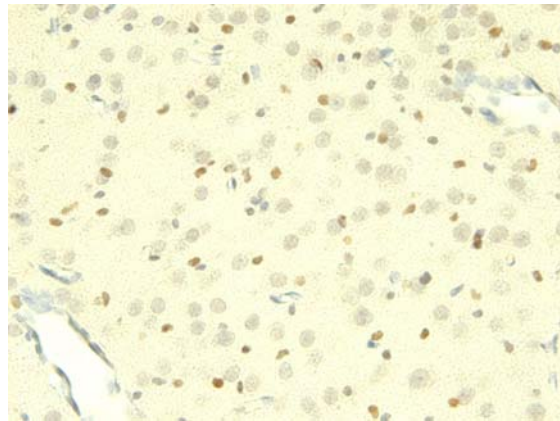
A**B**

Abbildung 5: Histologische Darstellung 10 µm dünner Schnitte aus dem Gehirn 7 Tage alter Ratten (Färbung der aktivierten Caspase-3).

Detailaufnahme (Vergrößerungsfaktor 400) aus dem Thalamus laterodorsalis 7 Tage alter Ratten denen am 6. Lebenstag NaCl 0,9% (A) oder PMA (500 µg/kg Körpergewicht) (B) in die Bauchhöhle injiziert wurde. Am 7. Lebenstag wurden die Tiere getötet und 10 µm dünne Hirnschnitte gegen die aktivierte Form von Caspase-3 gefärbt. Die Gehirne der PMA-Tiere (B) zeigen deutlich mehr degenerierende Zellen, im Vergleich zu den Kontrolltieren (A).

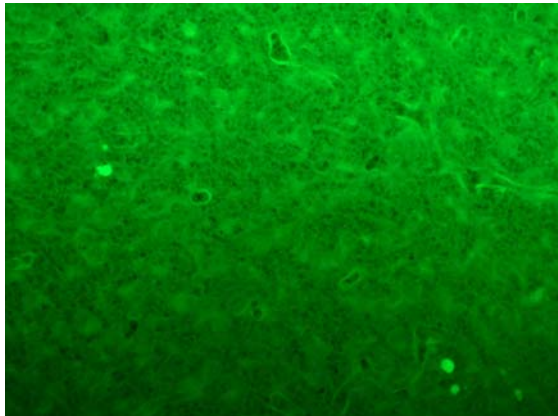
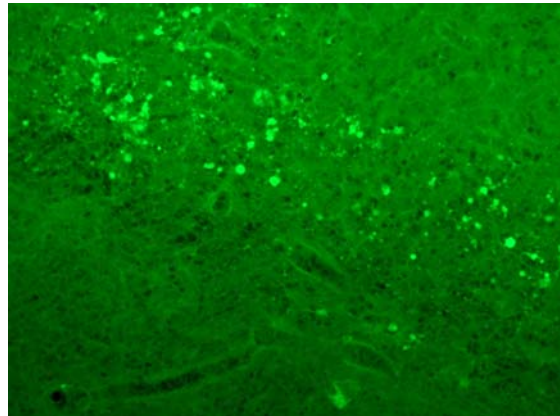
A**B**

Abbildung 6: Histologische Darstellung 10 µm dünner Schnitte aus dem Gehirn 7 Tage alter Ratten (Fluoro-Jade-B-Färbung).

Detailaufnahme (Vergrößerungsfaktor 400) aus dem Thalamus laterodorsalis 7 Tage alter Ratten 24 Stunden nach Behandlung mit NaCl 0,9% (A) oder mit PMA (500 µg/kg Körpergewicht) (B). Den 6 Tage alten Ratten wurde entweder NaCl 0,9% oder PMA intraperitoneal verabreicht. Am 7. Lebenstag wurden die Tiere getötet und 10 µm dünne Hirnschnitte mit Fluoro-Jade-B angefärbt. Gehirne der PMA-Tiere (B) zeigen deutlich mehr degenerierende Zellen im Vergleich zu den Kontrollieren (A).

3.2. Vermehrte Apoptose durch PMA in verschiedenen Regionen des unreifen Rattenhirns

Die 70 µm dicken Hirnschnitten der 7 Tage alten Ratten, denen einen Tag zuvor NaCl 0,9% oder PMA (500 µg/kg Körpergewicht) intraperitoneal verabreicht wurde, wurden mittels DeOlmos-Silberfärbung gefärbt. Mit Hilfe eines stereologischen Rasters wurden die bräunlich bis schwarz angefärbten, apoptotischen Nervenzellen ausgezählt und somit die Dichte der untergehenden Neurone in verschiedenen Hirnregionen bestimmt. In den Hirnschnitten 7 Tage alter Ratten, die 0,9%ige Kochsalzlösung erhielten (n=8), betrug die Dichte physiologisch degenerierender Zellen in den 17 ausgezählten verschiedenen Hirnregionen zwischen 89+/-21 Zellen/mm³ im Thalamus ventralis und 3446+/-570 Zellen/mm³ im Cortex frontalis Lamina II. Die Dichte der degenerierten Zellen bewegte sich im Bereich der physiologischen Apoptoserate. Die PMA-Tiere (n=10) zeigten eine signifikant vermehrte Anzahl an untergegangenen Zellen. In den Gehirnen der mit PMA behandelten Ratten war eine starke Zunahme untergehender Nervenzellen vorhanden, deren Ausmaß von 211+/-64 Zellen/mm³ im Cortex frontalis Lamina IV bis zu 9386+/-1099 Zellen/mm³ im Cortex frontalis Lamina II variierte (Diagramm 1).

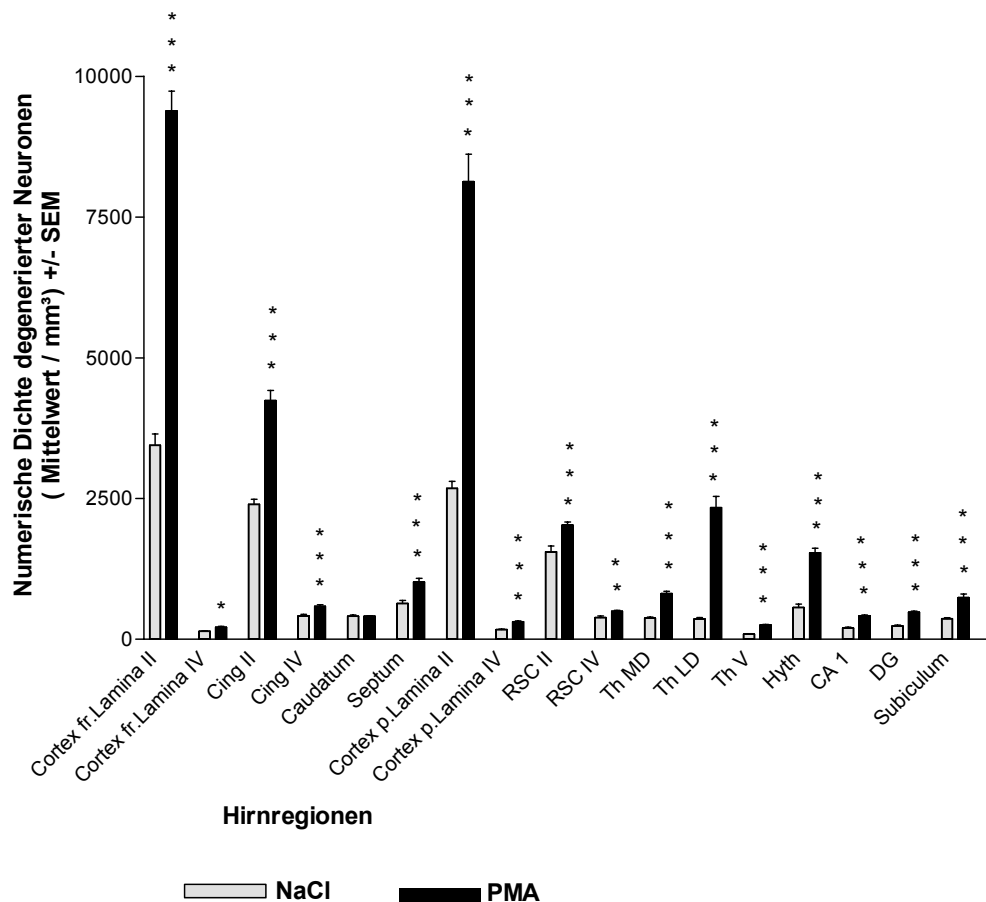


Diagramm 1: PMA erhöht die Neuronendegeneration im unreifen Rattenhirn. Am 6. Lebenstag bekamen Ratten entweder NaCl 0,9% oder PMA (500 µg/kg Körpergewicht) intraperitoneal verabreicht. Nach 24 Stunden wurden sie getötet. Mit der stereologischen Dissektionsmethode wurde an den mit der Silberfärbung angefärbten Hirnschnitten die numerische Dichte degenerierender Zellen [Zellen/mm³] in 17 Hirnregionen von Kontrolltieren (n=8) und PMA-Tieren (n=10) ermittelt. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte der numerischen Dichte apoptotischer Zellen. Statistische Vergleiche zwischen den Kontrolltieren sowie den NaCl-Tieren erfolgten mittels Student's t-Test: * = P < 0,05, ** = P < 0,01 und *** = P < 0,001.

3.3. Altersabhängigkeit der durch PMA hervorgerufenen Neurodegeneration im unreifen Gehirn

Um zu untersuchen, wie der Proteinkinase-C-Aktivator PMA seine proapoptische Wirkung auf das unreife Rattenhirn in verschiedenen postnatalen Altersstufen zeigt, wurde Ratten im Alter von 2, 6 und 13 Tagen NaCl 0,9% oder PMA (500 µg/kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. 24 Stunden nach Injektion wurden die Tiere getötet und perfundiert. Die Gehirne der 3 Tage alten Tiere wurden 10 µm dünn geschnitten und nach FluroJade gefärbt. Die Gehirne der 7 und 14 Tage alten Tiere wurden 70 µm dünn geschnitten und mit ihnen eine Silberfärbung durchgeführt. Die numerischen Dichten der degenerierenden Nervenzellen (Zellen/mm³) wurden in 17 verschiedenen Hirnregionen bestimmt. Diese Apoptosezellwertewerte wurden zu einem Gesamtwert für jede Versuchsgruppe addiert (bezeichnet als Apoptotischer Score) und statistisch verglichen. Die 3 (n=11) und 7 Tage alten Tiere (n=10) zeigten dabei eine signifikant höhere Apoptoserate im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrolltieren (n=12; n=8). Beim Vergleich der 14 Tage alten PMA-Tiere (n=8) mit ihrer Kontrollgruppe (n=5) zeigten sich in den Apoptosewerten keine signifikanten Unterschiede (Diagramm 2).

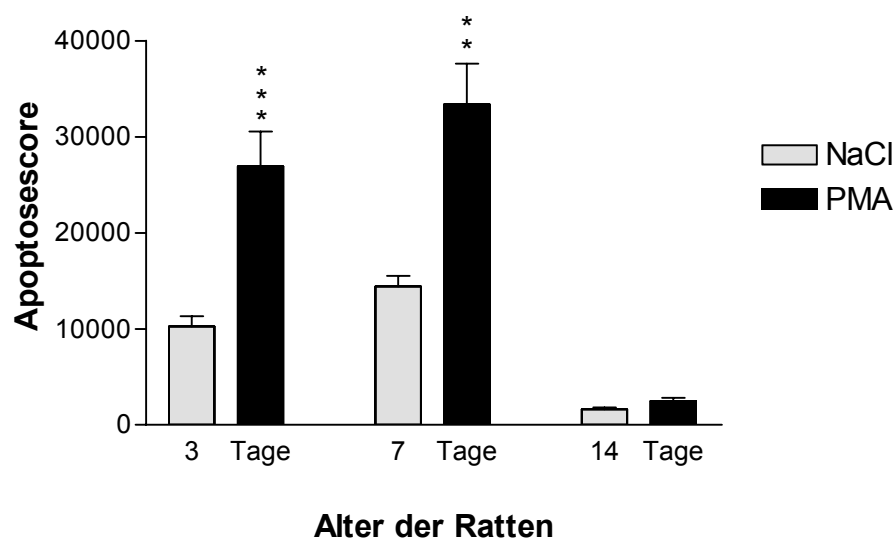


Diagramm 2: Durch PMA verursachte Neuronendegeneration ist altersabhängig. 2, 6 und 13 Tage alte Tiere bekamen NaCl 0,9% oder PMA (500 µg/kg Körpergewicht) intraperitoneal appliziert. Nach 24 Stunden wurden die Ratten getötet und perfundiert. Von den 3 Tage alten Tieren wurden 10 µm dünne Hirnschnitte angefertigt, die nach Fluoro-Jade-B gefärbt wurden. Die Gehirne der 7 und 14 Tage alten Tieren wurden 70 µm dünn geschnitten und mit der Silberfärbung bearbeitet. Es konnte eine altersabhängige Neuronendegeneration durch PMA nachgewiesen werden. Die Rattenhirne der 3 (n=11) und 7 Tage alte PMA-Tiere (n=10) zeigten signifikante Unterschiede in ihren Apoptotischen Scores zu den Rattenhirnen der Kontrolltiere (n=12; n=8). Die 14 Tage alten PMA-Tiere (n=8) zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihren Apoptosewerten im Vergleich zu den 14 Tage alten Kontrolltieren (n=5). Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels Student's t-Test: * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ und *** = $P < 0,001$.

3.4. Dosisabhängigkeit der neurodegenerativen Wirkung von PMA

Nachdem eine neurodegenerative Wirkung von PMA auf das unreife Rattengehirn mit verschiedenen histologischen Färbungen nachgewiesen werden konnte, sollte nun die Abhängigkeit der proapoptischen Wirkung des PMA von der intraperitoneal applizierten Dosis untersucht werden. Dazu bekamen 3 Gruppen 6 Tage alter Ratten jeweils eine einmalige Injektion von 100 µg PMA/kg Körpergewicht, 200 µg PMA/kg Körpergewicht oder 500 µg PMA/kg Körpergewicht. 24 Stunden später wurden die Tiere getötet, perfundiert und von den Rattenhirnen 70 µm dünne Schnitte angefertigt. In der Silberfärbung ließ sich das Ausmaß der apoptotischen Neurodegeneration mit Hilfe des stereologischen Dissektors ermitteln. Es wurden die numerischen Dichten degenerierender Zellen (Zellen/mm³) in 17 verschiedenen Hirnregionen bestimmt. Diese Apoptosezellichtewerte wurden zu einem Gesamtwert für jede Versuchsgruppe addiert (apoptotischer Score) und statistisch verglichen. Dabei zeigte sich eine Dosisabhängigkeit der proapoptischen Wirkung von PMA. Die höchste Neuronendegeneration zeigte sich bei einer Konzentration von 500 µg PMA/kg Körpergewicht (n=10). Bei einer Konzentration von 100 (n=7) und 200 µg PMA/kg Körpergewicht (n=9) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den NaCl-Tieren (n=8) (Diagramm 3).

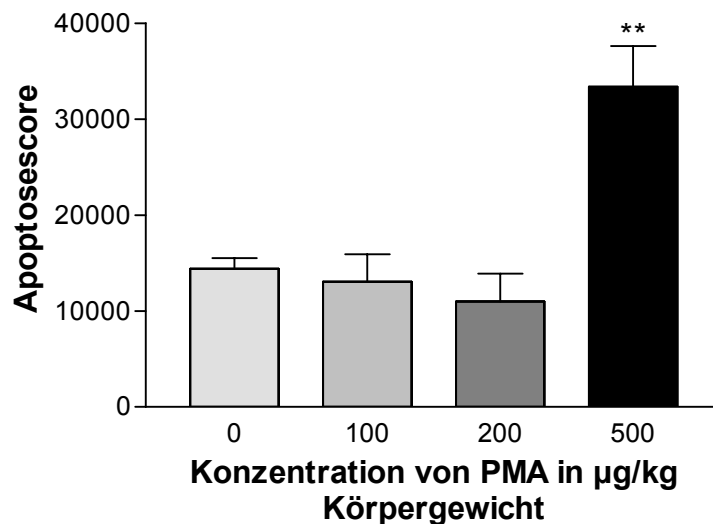


Diagramm 3: Dosis-Wirkungsbeziehung von PMA auf die Neuronendegeneration im unreifen Rattenhirn. Am 6. Lebenstag erhielten Ratten entweder NaCl 0,9% oder PMA intraperitoneal (NaCl oder 100 µg/kg Körpergewicht, 200 µg/kg Körpergewicht oder 500 µg/kg Körpergewicht) verabreicht. 24 Stunden nach der Injektion wurden sie getötet und perfundiert. An den mit Silberfärbung bearbeiteten 70 µm dünnen Hirnschnitten wurden die numerischen Dichten degenerierender Zellen (Zellen/mm³) in 17 verschiedenen Hirnregionen bestimmt. Diese Apoptosezelldichtewerte wurden zu einem Gesamtwert für jede Versuchsgruppe addiert (apoptotischer Score) und statistisch verglichen. Es konnte eine konzentrationsabhängige Neuronendegeneration durch PMA nachgewiesen werden. Tiere, die 100 µg PMA/kg Körpergewicht (n=7) und 200 µg PMA/kg Körpergewicht (n=9) erhielten, zeigten kaum Unterschiede in ihren Apoptose Scores im Vergleich mit den Kontrolltieren (n=8). Ein signifikanter Apoptoseanstieg war bei einer Konzentration von 500 µg PMA/kg Körpergewicht (n=10) nachweisbar. Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels Student's t-Test: * = P < 0,05, ** = P < 0,01 und *** = P < 0,001.

3.5. Geringere Neuronendichte im heranreifenden Rattenhirn durch PMA

Nachdem eine proapoptische Wirkung von PMA nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob durch den von PMA verursachten erhöhten Neuronenuntergang im unreifen Rattenhirn eine verminderte Neuronenzelldichte resultiert und so eventuell Spätschäden verursacht werden. Zur Untersuchung der Neuronendichte nach einer intraperitonealen PMA-Injektion in der vulnerablen Phase des unreifen Rattenhirns bekamen 7 Tage alte Ratten NaCl 0,9% oder PMA mit einer Dosis von 500 µg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach einem Zeitraum von 7 bzw. 14 Tagen wurden die Tiere getötet und die Hirnschnitte mit Kresylviolett angefärbt. Im Gegensatz zur Silberfärbung, die untergehende Neurone hervorhebt, färbt Kresylviolett alle vorhandenen Neurone gut sichtbar violett an. In 17 Hirnregionen wurden die Neuronen ausgezählt und die numerischen Dichten vorhandener Nervenzellen (Zellen/mm³) bestimmt. Bei der Auszählung der Nervenzellen in verschiedenen Hirnregionen zeigten sich sowohl bei den 14 Tage alten PMA-Tieren (n=9) (Abbildung 7B), als auch bei den 21 Tage alten PMA-Tieren (n=11) eine signifikant geringere Nervenzelldichte, im Vergleich mit den Kontrolltieren (n=7; n=11) (Abbildung 7A). Somit konnte eine Nervenzelldichteminderung durch PMA nachgewiesen werden. Die Nervenzelldichtewerte der verschiedenen Hirnregionen wurden zu einem Gesamtwert für jede Versuchsgruppe addiert (Nervenzelldichtescore) und statistisch verglichen (Diagramm 4).

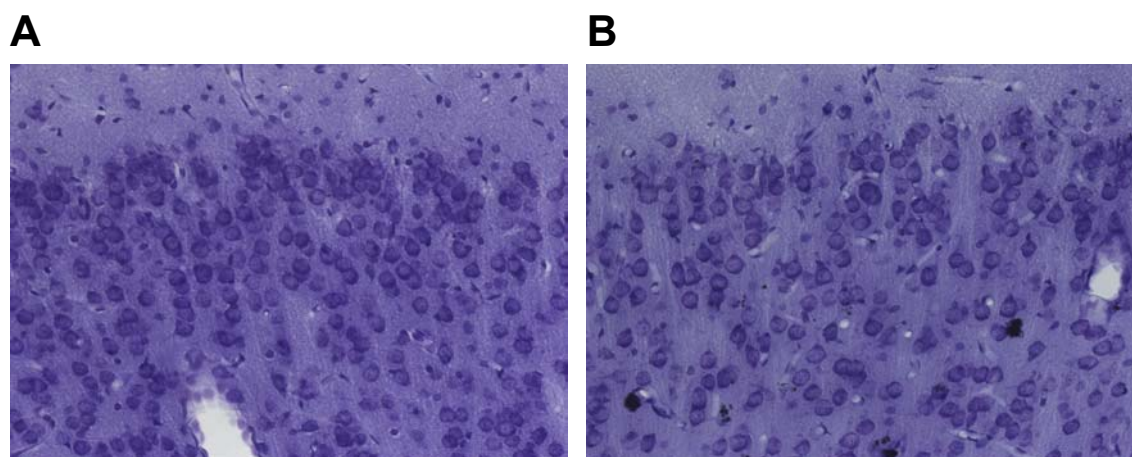


Abbildung 7: Histologische Darstellung 10 μm dünner Schnitte aus dem Gehirn 14 Tage alter Ratten (Kresylviolett).

Detailaufnahme (Vergrößerungsfaktor 400) aus dem Cortex frontalis 14 Tage alter Ratten. 7 Tage alte Ratten bekamen NaCl 0,9% (10 ml/kg KG) (A) oder PMA (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht) (B) intraperitoneal injiziert. Nach einem Zeitraum von 7 Tagen wurden die Tiere getötet und die Hirschnitte mit Kresylviolett angefärbt. Die Gehirne sowohl der 14 Tage alten PMA-Tiere ($n=9$) (B) als auch der 21 Tage alten PMA-Tiere ($n=11$) zeigen eine geringere Dichte neuronaler Zellen im Vergleich zu den Kontrolltieren ($n=7$; $n=11$) (A).

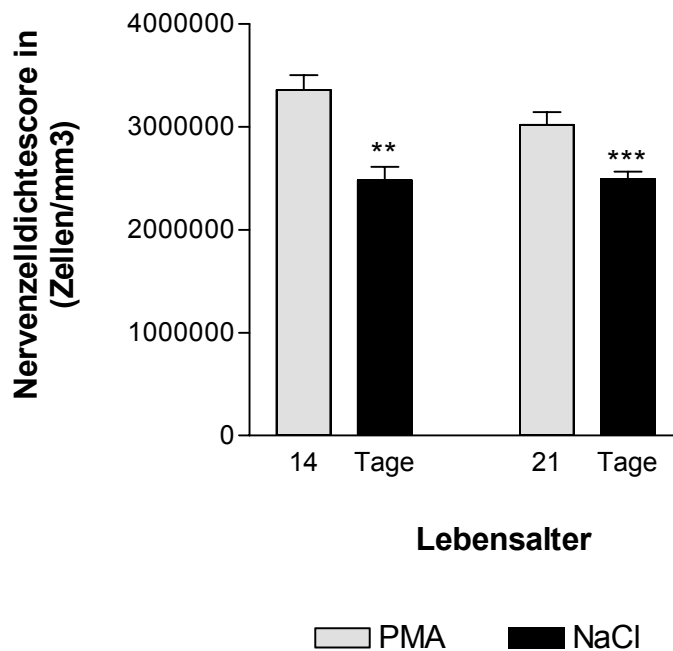


Diagramm 4: Neuronendichebestimmung nach PMA-Injektion. 7 Tage alte Tiere bekamen NaCl 0,9% oder PMA (500 µg/kg Körpergewicht) intraperitoneal verabreicht. Nach 7 bzw. 14 Tagen wurden die Ratten getötet und perfundiert. Die von diesen Tieren angefertigten 10 µm dünnen Hirnschnitte wurden, um alle Hirnzellen sichtbar zu machen mit Kresylviolett angefertigt. In 17 Hirnregionen wurden die numerischen Dichten vorhandener Nervenzellenzellen [Zellen/mm³] bestimmt. Diese Nervenzellidichtewerte wurden zu einem Gesamtwert für jede Versuchsgruppe addiert (Nervenzellidichtescore) und statistisch verglichen. Es konnte eine Nervenzellidichteminderung durch PMA nachgewiesen werden. Die PMA-Tiere zeigten eine geringere Neuronendichte nach einem Zeitraum von 7 (n=9) und 14 Tagen (n=11) im Vergleich zu den Kontrolltieren (n=7; n=11).

4. Diskussion

4.1. Diffuse Apoptose im unreifen Rattenhirn durch Inflammation

Infektionen und Sepsis stellen neben der perinatalen Hypoxie nach wie vor eines der Hauptprobleme in der Neonatologie dar. Sie gehören weltweit zu den häufigsten Erkrankungen der Neugeborenenperiode (Berner R et al., 2000; Stoll BJ et al., 1996a; Stoll BJ et al., 1996b). Die Infektionsrate bei Frühgeborenen ist im Vergleich zu reifen Neugeborenen überproportional hoch (Roos T and Martius J, 1996). Bis zu 25% der Patienten auf neonatologischen Intensivstationen erkranken an einer nachgewiesenen Sepsis (Klein J and Marcy M, 1995). Ebenso kann eine intrauterine Infektion der Mutter zu einem FIRS (fetal inflammatory response syndrome) führen (Ng PC et al., 2003; Gomez R et al., 1998). Zwar weisen Frühgeborene durch intensivmedizinische Maßnahmen verbesserte Überlebenschancen auf (Stoll BJ, 1996a), jedoch konnte die Häufigkeit schwerer neonataler Infektionserkrankungen in den letzten Jahren nicht gemindert werden. Die Untersuchung der Auswirkung von Infektionen auf das Gehirn von Neugeborenen stellt daher eine Herausforderung zur verbesserten neonatalen Betreuung dar.

Es ist bereits seit 1982 bekannt, dass PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat) im Tiermodell nach intravenöser Gabe das Auftreten von Entzündungsreaktionen in Form eines akuten Lungenödems induziert (Shasby DM et al., 1982). In der vorliegenden Arbeit sollte basierend auf diesen Beobachtungen durch eine intraperitoneale Gabe von PMA eine systemische Inflammation imitiert werden. Hierbei wurde ein neues und reproduzierbares Tiermodell zur Untersuchung der Mechanismen von inflammatorisch bedingten Hirnschäden entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass die intraperitoneale Verabreichung von PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat) im unreifen Rattengehirn zu einer apoptotischen Neuronendegeneration führt, die über das physiologische Maß hinausreicht. Somit ließ sich die bereits aus klinischen Studien bekannte Tatsache untermauern, dass peri- oder postnatale Infektionen oder Inflammationen möglicherweise zu einer langfristig ungünstigen Gehirnentwicklung führen (Murphy et al., 1995). Auch in Arbeiten, die sich mit einer intrauterinen Infektion und Inflammation während der Schwangerschaft beschäftigen, konnte eine Schädigung des sich in der Entwicklung

befindlichen Gehirns nachgewiesen werden (Dammann O et al., 2002). Zudem prognostizierten neuere Studien für Kinder, die während ihrer Neonatalperiode eine Sepsis durchmachten, ein vierfach erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Zerebralpareesen gegenüber Kindern, die keine Sepsis in der Neonatalperiode hatten (Wheater M and Rennie JM, 2000). In klinischen Studien von Frühgeborenen lässt sich die Situation einer systemischen Inflammation nicht separat betrachten, da oft noch weitere neurotoxische Begleitumstände wie Hypoxie, neurotoxische Medikamente oder respiratorische Unreife von Bedeutung für die Prognose des Säuglings sind. In der vorliegenden Arbeit gelang es, alleinig den Inflammationsstimulus und dessen Auswirkung auf das unreife Gehirn zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass eine periphere Inflammation auch im sich entwickelnden Gehirn ein Schädigungspotential besitzt.

Mit der intraperitonealen Applikation von PMA wurde eine inflammationstypische Reaktion im Organismus der neugeborenen Ratte simuliert, wie sie auch bei verschiedenen Krankheiten des menschlichen Neugeborenen stattfindet. Vergleichbare Inflammationsstimuli finden sich beispielsweise bei einer neonatalen Sepsis oder auch bei regional begrenzten Entzündungen wie der nekrotisierenden Enterokolitis. Ferner erzeugen auch intrauterin ascendierende Infektionen der Mutter, wie zum Beispiel die Chorioamnionitis, entsprechende Infektionen des Fötus, welche gleichzeitig Auslöser für eine Frühgeburt sein können (Edwards AD and Tan S, 2006). In einigen Studien konnte bereits ein Zusammenhang von Läsionen in der weißen Substanz des Gehirns, die durch intrauterine Infektionen verursacht wurden, mit einer klinisch manifesten Zerebralparese der betroffenen Frühgeborenen hergestellt werden (Murphy et al., 1995; Zupan V and Gonzales P, 1996; Verma U et al., 1997).

Bei der Untersuchung der unreifen Rattenhirne nach intraperitonealer Injektion von PMA zeigen sich keine klassischen, großen, zystischen Läsionen im Rattenhirn. Auch sind die Hirnschäden durch PMA nicht vergleichbar mit einer periventrikulären Leukomalazie oder Schäden der weißen Substanz wie sie in anderen Tiermodellen beschrieben werden (Redecker et al, 1998; Rice et al, 1981). Die Schäden die durch PMA im unreifen Rattenhirn verursacht werden, sind eher diffus und breiten sich über verschiedene Hirnregionen aus. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre,

dass diese scheinbar diffusen Hirnläsionen zu den Schäden gehören, die später nicht offensichtlich sind, aber dennoch bei den Betroffenen neurologische Auffälligkeiten verursachen können. Dieses wird durch eine Magnetresonanz-Studie von Frühgeborenen bekräftigt, in der diffuse Hirnläsionen („diffuse excessive high signal intensity“) entdeckt werden konnten, aus denen sich später keine zytische periventrikuläre Leukomalazie entwickelte (Maalouf EF et al., 1999). Ähnliche Schädigungsmuster wurden bereits durch NMDA-Antagonisten (Ikonomidou C et al., 1999), GABA-Agonisten (Bittigau P et al., 2002), Natrium-Kanal-Blocker (Jevtovic-Todorovic V et al., 2003), Ethanol (Ikonomidou C et al., 2000) und Sauerstoff (Felderhoff-Mueser U et al., 2004) beschrieben. Bei der Hyperoxie, der toxischen Wirkung von Sauerstoff, scheint oxidativer Stress in Form reaktiver Sauerstoffradikale verantwortlich für den verstärkten neuronalen Zelltod zu sein.

Die Aktivierung von Granulozyten durch PMA führt zu einer Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, wie es bei Inflammationen stattfindet (McPhail LC and Snyderman R, 1983). Es ist bekannt, dass freie Radikale direkt zu DNA-Schäden und Schäden an der Mitochondrienmembran führen können, was eine Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma und hierdurch die Aktivierung von Caspasen bewirkt (Filomeni G et al., 2003; Love S, 1999; Yuan J and Yarkner BA, 2000). Besonders das in der Entwicklung befindliche Gehirn könnte sehr anfällig auf die toxischen Reize reagieren und durch das Anfallen von reaktiven Sauerstoffspezies, die letztlich durch PMA verursacht werden, mit einer vermehrten neuronalen Apoptose antworten, wie es in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird. In welchem Ausmaß diese Radikale Einfluss auf die Menge der apoptotischen Neurone haben und in welchem Umfang andere Mechanismen als Verursacher in Frage kommen, kann nur spekuliert werden.

4.2. Langzeitschädigung des unreifen Gehirns durch Inflammation

Der durch PMA induzierte, vermehrte Zelltod zeigt sein Maximum während der ersten Lebenswoche und ist bei 14 Tage alten Tieren nicht mehr nachweisbar. Somit scheint eine Altersabhängigkeit der Vulnerabilität gegenüber PMA zu bestehen. Dabei zeigt sich ein zeitliches Zusammentreffen dieser für PMA vulnerablen Phase

und der „brain growth spurt period“ des unreifen Rattenhirns, die bei Ratten den ersten 2 Lebenswochen entspricht. Bei Menschen liegt sie zwischen dem 3. Trimester der Gestation und dem 2. Lebensjahr (Dobbing J and Sands J, 1979; Ikonomidou C et al., 1999; 2000; Olney JW et al., 2002).

Ebenso scheinen diese Schäden ein solches Ausmaß zu besitzen, dass eine spätere Neuronendichteverminderung im heranreifenden Gehirn nachweisbar ist und wahrscheinlich auch bestehen bleibt. In Untersuchungen zur Dichte der verschiedenen Rattenhirnregionen bei 14 und 21 Tage alten Tieren, die während der vulnerablen Phase im Alter von 7 Tagen PMA gespritzt bekamen, konnte eine Langzeitschädigung durch PMA nachgewiesen werden. Auch hier zeigten sich 14 Tage nach dem Schädigungsereignis keine offensichtlichen Hirnschäden, wie sie bei 7 Tage alten Ratten auch akut 24 Stunden nach Injektion nicht zu finden waren. Die nachweisbare Neuronendichteverminderung zeigte sich im gesamten Gehirn. Die diffus anfallenden, apoptotischen Zellen, die 24 Stunden nach einer PMA-Injektion auftraten, scheinen somit in der weiteren Entwicklung nicht kompensiert zu werden und die Ursache der reduzierte Neuronendichte zu sein. Es kann jedoch keine Prognose darüber abgegeben werden, ob sich die durch Inflammation ausgelöste neuronale Apoptose und die diffuse Neuronendichteverminderung auf die spätere Entwicklung auswirken. Es wird vermutet, dass eine durch Inflammation induzierte Apoptose in der frühen Entwicklung des Menschen zu sehr dezenten neurologischen Defiziten führt, wie beispielsweise einer Hyperaktivität oder Lernbehinderungen ähnlich den Verhaltensauffälligkeiten, die durch Alkohol in der Perinatalzeit ausgelöst werden (Olson HC et al., 1997). Diskutiert wird auch die Hypothese, dass ein derartiger Mechanismus frühkindlicher Hirnschädigung erst in der Adoleszenz oder sogar im Erwachsenenalter manifest wird und zu psychiatrischen Erkrankungen, wie beispielsweise Depressionen führen kann. Die Verbindung von neurologisch und psychiatrisch auffälligem Verhalten mit Infektionen in der frühen Entwicklung, lässt sich aber schwer herstellen, so lange keine äußerlichen Auffälligkeiten nachweisbar sind. So wurde man beispielsweise erst durch kraniofaziale Malformationen auf das fetale Alkoholsyndrom aufmerksam (Jones KL and Smith DW, 1973; Clarren SK et al., 1978; Sulik KK et al., 1981) und bemerkte, dass Kinder, die erhöhten Alkoholkonzentrationen in der Schwangerschaft ausgesetzt waren, häufig erst im Erwachsenenalter Depressionen und Psychosen entwickelten (Kelly SJ et al., 2000).

4.3. Ausmaß des Hirnschadens und Stärke des Inflammationsstimulus

In den Untersuchungen, in denen den Versuchstieren verschiedene Konzentrationen an PMA (100, 200 und 500 µg/kg Körpergewicht) appliziert wurden, ließ sich eine konzentrationsabhängige Schädigung auf das unreife Rattenhirn nachweisen. Niedrige PMA-Konzentrationen konnten keine signifikante Schädigungen hervorrufen, was bedeuten könnte, dass das unreife Rattenhirn die Auswirkung einer geringen Inflammation zu tolerieren vermag. Erst PMA-Konzentrationen von 500 µg/kg Körpergewicht zeigten signifikant erhöhte Apoptoseraten. In welchem Vergleich diese Konzentration zu den Inflammationsausmaßen mit bakteriellen Infektionen stehen, lässt sich nicht beantworten. Versuche, die sich mit der Wirkung von Lipopolysacchariden auf das unreife Gehirn beschäftigen, sind derzeit am Model von Katzen und Affen bekannt (Gilles FH et al., 1976; Gilles FH et al., 1977). Dabei zeigten die intraperitonealen Gaben von LPS nach Tagen und Wochen eine Astrogliose und im weiteren Verlauf zystische Nekrosen. In ähnlichen Studien mit intraperitonealen (Young RS et al., 1982) und subkutanen (Young RS et al., 1983) Injektionen von Endotoxinen in neonatalen Hunden konnte eine Nekrose der weißen Substanz beobachtet werden. In neueren Experimenten wird besonders die Kombination von Infektionsstimulus und Asphyxie an unreifen Rattenhirnen untersucht. Dabei zeigt sich, dass eine geringe Dosis von Lipopolysacchariden die Schäden einer Asphyxie enorm verstärkt und zerebrale Infarkte verursacht. Diese Infarkte hätten durch eine kurze hypoxisch-ischämische Periode allein nicht dieses Ausmaß an Schädigung erreicht (Eklind S et al., 2001; Eklind S et al., 2005). Diese Versuche mit bakteriellen Produkten zeigen ein anderes Schädigungsmuster im Vergleich mit den durch PMA hervorgerufenen Defekten. Dieses lässt vermuten, dass die sehr potenten Inflammationsstimuli, wie LPS oder bakterielle Endotoxine, eine, im Vergleich zum PMA, sehr viel stärkere Schädigung des unreifen Gehirns hervorrufen. Interessant ist aber auch, dass Ergebnisse aus Versuchen mit LPS und schwangeren Ratten eine Hochregulation von TNF α und erhöhter Apoptose im unreifen Rattenhirn 5 Tage nach Infektion der Mutter zeigen. Hier wiesen die unreifen Gehirne wie bei der intraperitonealen Gabe von PMA keine offensichtlichen Strukturschäden auf (Bell MJ and Hallenbeck JM, 2002). Ob neben den Nekrosen in den oben beschriebenen Experimenten auch diffuse Zelluntergänge durch Apoptose im unreifen Gehirn vorlagen, ist nicht bekannt, wären aber vorstellbar. Die

offensichtlichen Schäden könnten eine Steigerung der diffusen Apoptose in bestimmten Abschnitten des Gehirns darstellen.

4.4. Ausblick

Frühgeborene, die an einer bakteriellen Infektion oder Sepsis leiden, müssen meist intensivmedizinisch betreut werden. Die unspezifische Therapie einer Sepsis beinhaltet antibiotische Therapie, Flüssigkeitszufuhr und oft auch die Beatmung mit zusätzlichem Sauerstoff. Eine schädigende Wirkung von Sauerstoff konnte bereits nachgewiesen werden (Felderhoff-Mueser U et al., 2004) und lässt vermuten, dass sie durch Inflammation noch zusätzlich verstärkt werden könnte.

Umso mehr zeigt sich die Notwendigkeit eines Tiermodelles zur Untersuchung von Inflamationsmechanismen, um neuroprotektive Therapiestrategien zu entwickeln. Zurzeit gibt es noch keine Möglichkeiten, eine Inflammation mit ihren bekannten Auswirkungen, wie Radikalbildung (siehe 4.1.) und Produktion proinflammatorischer Zytokine (siehe 4.3.), vorteilhaft zu beeinflussen. Steroide unterdrücken eine Immunantwort, beeinträchtigen jedoch die Entwicklung des Gehirns (Barrington KJ, 2001). Das rekombinant aktivierte Protein C ist ein antiinflammatorischer, antithrombotischer und fibrinolytischer Wirkstoff, der bereits erfolgreich bei schwerer Sepsis von Erwachsenen Anwendung findet (Matthay MA, 2001). Er ist jedoch noch nicht erprobt für die Anwendung im Säuglingsalter.

In einer Studie mit neugeborenen Mäusen konnten exzitotoxische Hirnläsionen durch die Gabe von IL-10 vermindert werden (Mesples B et al., 2003). Weitere antiinflammatorische Strategien wären die Gabe von Rezeptor-Antagonisten, wie der IL-1 β -Rezeptorantagonist, oder Zytokinrezeptoren, wie die löslichen TNF-Rezeptoren.

Einige dieser pharmakologischen „Regulatoren“ der Inflamationsantwort werden bereits in Tiermodellen untersucht. Jedoch sind diese Therapien nicht ohne Risiko, da proinflammatorische Zytokine ein empfindliches Gleichgewicht in ihrer biologischen Aktivität besitzen und auch unerlässliche Aufgaben im Rahmen der

Abwehr von Erreger besitzen. Beispielsweise scheint das Vorhandensein von TNF α vorteilhaft zu sein, denn durch ein Blockieren von TNF α bei Erwachsenen mit septischen Schock zeigte sich eine erhöhte Sterblichkeit. Somit scheint es wichtiger, ein Gleichgewicht der Inflammationsantwort herzustellen, als dieser Antwort vorzubeugen. Somit bleibt es schwierig, eine Lösung für die sowohl nützlichen als auch schädlichen Zytokine zu finden und in dieses Gleichgewicht einzugreifen.

5. Zusammenfassung

Perinatalen Infektionen des Frühgeborenen wird bei der Entwicklung eines frühkindlichen Hirnschadens eine sehr bedeutende Rolle zugeschrieben. Hierfür scheint eine Infektion des Kindes nicht notwendig, sondern denkbar ist, dass eine systemische inflammatorische Reaktion genügt, um eine Hirnschädigung herbeizuführen. Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) ist als ein potenter Aktivator der Proteinkinase C bekannt und bewirkt in den Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems eine Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6. Im Tiermodell ließen sich nach systemischer Injektion von PMA Entzündungsreaktionen in Form eines akuten Lungenödems und Zelltod nachweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher neonatalen Ratten PMA verabreicht um eine systemische Entzündungsreaktion zu imitieren mit dem Ziel ein Tiermodell zur Untersuchung der inflammatoinsgetriggerten Hirnschädigung zu entwickeln.

Hierzu wurde 6 Tage alte Han Wistar Ratten PMA in verschiedenen Dosierungen (100, 200 oder 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht) intraperitoneal appliziert. Nach 24 Stunden wurden die Tiere getötet und die Gehirne mittels DeOlmos Kupfersilber-, Fluoro-Jade-B-, TUNEL- und Caspase-3-Färbung histologisch untersucht, um degenerierte Zellen darzustellen. Ein anderer Teil der Tiere überlebte weitere 7 Tage beziehungsweise 14 Tage, so dass im Alter von 14 und 21 Tagen eine Kresylviolettffärbung zur Bestimmung der Gesamtdichte der Neurone durchgeführt werden konnte.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Dosis von 500 μg PMA/kg Körpergewicht zu einer signifikanten Neurodegeneration im Gehirn der 7 Tage alten Ratten führt, während bei Dosen von 100 und 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG die Anzahl an untergegangenen Zellen sich im Bereich der Kontrolltiere bewegt. In Untersuchungen nach längerer Phase der PMA-Gabe konnte eine signifikant geringere Neuronendichte bei den Versuchstieren nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass inflammatorische Reaktionen eine direkte Wirkung auf das unreife Gehirn haben und nicht nur sekundär einen beispielsweise ischämisch verursachten Neuronenschaden verstärken. Bei vorangegangener inflammationsbedingter Neuronenschädigung ist daher eine Langzeitschädigung des unreifen Gehirns zu erwarten. Interessanterweise scheint jedoch gegenüber geringeren Inflammationsstimuli eine gewisse Toleranz des heranreifenden Gehirns zu bestehen.

Das in dieser Arbeit etablierte, gut reproduzierbare Inflammationsmodell an der neonatalen Ratte bietet zukünftig die Möglichkeit, molekulare Mechanismen zu evaluieren mit dem Ziel neue Therapiestrategien gegen diese inflammationsbedingten Schäden des Frühgeborenen zu entwickeln.

6. Literaturverzeichnis

Adelson PD, Kochanek PM. Head injury in children. *J Child Neurol.* 1998 Jan;13(1):2-15. Review.

Aubert A, Vega C, Dantzer R, Goodall G. Pyrogens specifically disrupt the acquisition of a task involving cognitive processing in the rat. *Brain Behav Immun.* 1995 Jun;9(2):129-48.

Barinaga M. Forging a path to cell death. *Science.* 1996 Aug 9;273(5276):735-7. Erratum in: *Science* 1996 Nov 22;274(5291):1289.

Barrington KJ. The adverse neuro-developmental effects of postnatal steroids in the preterm infant: a systematic review of RCTs. *BMC Pediatr.* 2001;1:1. Epub 2001 Feb 27. Review.

Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology.* 1993 Spring;14(1):83-144. Review.

Bell MJ, Hallenbeck JM. Effects of intrauterine inflammation on developing rat brain. *J Neurosci Res.* 2002 Nov 15;70(4):570-9.

Berner R, Tuxen B, Clad A, Forster J, Brandis M. Elevated gene expression of interleukin-8 in cord blood is a sensitive marker for neonatal infection. *Eur J Pediatr.* 2000 Mar;159(3):205-10.

Bittigau P, Pohl D, Sifringer M, Shimizu H, Ikeda M, Stadthaus D, Fuhr S, Dikranian K, Olney JW, Ikonomidou C. Modeling pediatric head trauma: mechanisms of degeneration and potential strategies for neuroprotection. *Restor Neurol Neurosci.* 1998;13(1-2):11-23.

Bittigau P, Sifringer M, Genz K, Reith E, Pospischil D, Govindarajalu S, Dzierko M, Pesditschek S, Mai I, Dikranian K, Olney JW, Ikonomidou C. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 12;99(23):15089-94. Epub 2002 Nov 4.

Bittigau P, Sifringer M, Pohl D, Stadthaus D, Ishimaru M, Shimizu H, Ikeda M, Lang D, Olney JW, Ikonomidou C. Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Ann Neurol*. 1999 Jun;45(6):724-35.

Burek MJ, Oppenheim RW. Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol*. 1996 Oct;6(4):427-46. Review.

Cheema ZF, Wade SB, Sata M, Walsh K, Sohrabji F, Miranda RC. Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB. *J Neurosci*. 1999 Mar 1;19(5):1754-70.

Clarren SK, Alvord EC Jr, Sumi SM, Streissguth AP, Smith DW. Brain malformations related to prenatal exposure to ethanol. *J Pediatr*. 1978 Jan;92(1):64-7.

Cohen J, Glauser MP. Septic shock: treatment. *Lancet*. 1991 Sep 21;338(8769):736-9. Review.

Cowell RM, Xu H, Galasso JM, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury induces macrophage inflammatory protein-1alpha expression in immature rat brain. *Stroke*. 2002 Mar;33(3):795-801.

Dammann O, Kuban KC, Leviton A. Perinatal infection, fetal inflammatory response, white matter damage, and cognitive limitations in children born preterm. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002;8(1):46-50. Review.

Dammann O, Leviton A. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr Res*. 1997 Jul;42(1):1-8. Review.

Dammann O, Leviton A. Inflammatory brain damage in preterm newborns--dry numbers, wet lab, and causal inferences. *Early Hum Dev.* 2004 Aug;79(1):1-15. Review.

Dammann O, Leviton A. Infection remote from the brain, neonatal white matter damage, and cerebral palsy in the preterm infant. *Semin Pediatr Neurol.* 1998 Sep;5(3):190-201. Review.

Dantzer R, Aubert A, Bluthé RM, Gheusi G, Cremona S, Laye S, Konsman JP, Parnet P, Kelley KW. Mechanisms of the behavioural effects of cytokines. *Adv Exp Med Biol.* 1999;461:83-105. Review.

Davies CA, Loddick SA, Toulmond S, Stroemer RP, Hunt J, Rothwell NJ. The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999 Jan;19(1):87-98.

DeOlmos JS, Ingram WR. An improved cupric-silver method for impregnation of axonal and terminal degeneration. *Brain Res.* 1971 Oct 29;33(2):523-9.

Duggan PJ, Maalouf EF, Watts TL, Sullivan MH, Counsell SJ, Allsop J, Al-Nakib L, Rutherford MA, Battin M, Roberts I, Edwards AD. Intrauterine T-cell activation and increased proinflammatory cytokine concentrations in preterm infants with cerebral lesions. *Lancet.* 2001 Nov 17;358(9294):1699-700.

Dikranian K, Ishimaru MJ, Tenkova T, Labruyere J, Qin YQ, Olney JW. Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain. *Neurobiol Dis.* 2001 Jun;8(3):359-79. Review.

Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev.* 1979 Mar;3(1):79-83.

Edwards AD, Tan S. Perinatal infections, prematurity and brain injury. *Curr Opin Pediatr.* 2006 Apr;18(2):119-24. Review.

Eicher DJ, Annibale DJ. Neonatal sepsis: evaluation and management. *J S C Med Assoc.* 2002 Jun;98(3):106-12. Review.

Eklind S, Mallard C, Leverin AL, Gilland E, Blomgren K, Mattsby-Baltzer I, Hagberg H. Bacterial endotoxin sensitizes the immature brain to hypoxic--ischaemic injury. *Eur J Neurosci.* 2001 Mar;13(6):1101-6.

Eklind S, Mallard C, Arvidsson P, Hagberg H. Lipopolysaccharide induces both a primary and a secondary phase of sensitization in the developing rat brain. *Pediatr Res.* 2005 Jul;58(1):112-6. Epub 2005 May 5.

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 Nov;17(2):273-82.

Fern R, Moller T. Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes: a fatal glutamate release feedback loop. *J Neurosci.* 2000 Jan 1;20(1):34-42.

Filomeni G, Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR. Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. *Cancer Res.* 2003 Sep 15;63(18):5940-9.

Gabryel B, Trzeciak HI. Role of astrocytes in pathogenesis of ischemic brain injury. *Neurotox Res.* 2001 Apr;3(2):205-21.

Gilles FH, Leviton A, Kerr CS. Endotoxin leucoencephalopathy in the telencephalon of the newborn kitten. *J Neurol Sci.* 1976 Feb;27(2):183-91.

Gilles FH, Averill DR Jr, Kerr CS. Neonatal endotoxin encephalopathy. *Ann Neurol.* 1977 Jul;2(1):49-56.

Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1998 Jul;179(1):194-202.

Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988 May;96(5):379-94. Review.

Hack M, Flannery DJ, Schluchter M, Cartar L, Borawski E, Klein N. Outcomes in young adulthood for very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med*. 2002 Jan 17;346(3):149-57.

Hagberg H, Peebles D, Mallard C. Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002;8(1):30-8. Review.

Hill A and Volpe JJ. Seizures, hypoxic-ischemic brain injury, and intraventricular hemorrhage in the newborn. *Ann Neurol*. 1981 Aug;10(2):109-21.

Hu J, Jacinto R, McCall C, Li L. Regulation of IL-1 receptor-associated kinases by lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2002 Apr 15;168(8):3910-4.

Huttenlocher PR. Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. *Brain Res*. 1979 Mar 16;163(2):195-205.

Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovskaja V, Turski L, Olney JW. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*. 1999 Jan 1;283(5398):70-4.

Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovskaja V, Horster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*. 2000 Feb 11;287(5455):1056-60.

Inder T, Huppi PS, Zientara GP, Maier SE, Jolesz FA, di Salvo D, Robertson R, Barnes PD, Volpe JJ. Early detection of periventricular leukomalacia by diffusion-weighted magnetic resonance imaging techniques. *J Pediatr*. 1999 May;134(5):631-4.

Ishimaru MJ, Ikonomidou C, Tenkova TI, Dikranian K, Sesma MA, Olney JW. Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J Comp Neurol*. 1999 Jun 14;408(4):461-76.

Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, Olney JW, Wozniak DF. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci*. 2003 Feb 1;23(3):876-82.

Jones KL, Smith DW. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet*. 1973 Nov 3;2(7836):999-1001.

Kayahara M, Felderhoff U, Pocock J, Hughes MN, Mehmet H. Nitric oxide (NO.) and the nitrosonium cation (NO+) reduce mitochondrial membrane potential and trigger apoptosis in neuronal PC12 cells. *Biochem Soc Trans*. 1998 Nov;26(4):S340.

Kelly SJ, Day N, Streissguth AP. Effects of prenatal alcohol exposure on social behavior in humans and other species. *Neurotoxicol Teratol*. 2000 Mar-Apr;22(2):143-9. Review.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57. Review.

Kinney HC, Back SA. Human oligodendroglial development: relationship to periventricular leukomalacia. *Semin Pediatr Neurol*. 1998 Sep;5(3):180-9. Review.

Klein JO, Marcy SM. Infection in the newborn. *Clin Obstet Gynecol*. 1970 Jun;13(2):321-47. Review.

Kontny HU, Lehrnbecher TM, Chanock SJ, Mackall CL. Simultaneous expression of Fas and nonfunctional Fas ligand in Ewing's sarcoma. *Cancer Res*. 1998 Dec 15;58(24):5842-9.

Koshika T, Ishizaka A, Nagatomi I, Sudo Y, Hasegawa N, Goto T. Pretreatment with FK506 improves survival rate and gas exchange in canine model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Jan;163(1):79-84.

Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):789-95. Review.

Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med.* 1997 Jun;3(6):614-20. Review. Erratum in: *Nat Med* 1997 Aug;3(8):934.

Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today.* 1997 Jan;18(1):44-51. Review.

Leviton A, Dammann O. Coagulation, inflammation, and the risk of neonatal white matter damage. *Pediatr Res.* 2004 Apr;55(4):541-5. Epub 2004 Feb 18. Review.

Leviton A, Paneth N, Reuss ML, Susser M, Allred EN, Dammann O, Kuban K, Van Marter LJ, Pagano M, Hegyi T, Hiatt M, Sanocka U, Shahrivar F, Abiri M, Disalvo D, Doubilet P, Kairam R, Kazam E, Kirpekar M, Rosenfeld D, Schonfeld S, Share J, Collins M, Genest D, Shen-Schwarz S, et al. Maternal infection, fetal inflammatory response, and brain damage in very low birth weight infants. *Developmental Epidemiology Network Investigators. Pediatr Res.* 1999 Nov;46(5):566-75.

Liao SL, Chen CJ. Differential effects of cytokines and redox potential on glutamate uptake in rat cortical glial cultures. *Neurosci Lett.* 2001 Feb 16;299(1-2):113-6.

Liu WS, Heckman CA. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal.* 1998 Sep;10(8):529-42. Review.

Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.* 1999 Jan;9(1):119-31. Review.

Maalouf EF, Duggan PJ, Rutherford MA, Counsell SJ, Fletcher AM, Battin M, Cowan F, Edwards AD. Magnetic resonance imaging of the brain in a cohort of extremely preterm infants. *J Pediatr.* 1999 Sep;135(3):351-7.

Marlow N, Wolke D, Bracewell MA, Samara M; EPICure Study Group. Neurologic and developmental disability at six years of age after extremely preterm birth. *N Engl J Med.* 2005 Jan 6;352(1):9-19.

Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomao R. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock.* 2003 Sep;20(3):208-12.

Matthay MA. Severe sepsis--a new treatment with both anticoagulant and antiinflammatory properties. *N Engl J Med.* 2001 Mar 8;344(10):759-62.

Mazarakis ND, Edwards AD, Mehmet H. Apoptosis in neural development and disease. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1997 Nov;77(3):F165-70. Review.

McPhail LC, Snyderman R. Activation of the respiratory burst enzyme in human polymorphonuclear leukocytes by chemoattractants and other soluble stimuli. Evidence that the same oxidase is activated by different transductional mechanisms. *J Clin Invest.* 1983 Jul;72(1):192-200.

Mehmet H, Yue X, Squier MV, Lorek A, Cady E, Penrice J, Sarraf C, Wylezinska M, Kirkbride V, Cooper C, et al. Increased apoptosis in the cingulate sulcus of newborn piglets following transient hypoxia-ischaemia is related to the degree of high energy phosphate depletion during the insult. *Neurosci Lett.* 1994 Nov 7;181(1-2):121-5.

Mesples B, Plaisant F, Gressens P. Effects of interleukin-10 on neonatal excitotoxic brain lesions in mice. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003 Mar 14;141(1-2):25-32.

Murphy DJ, Sellers S, MacKenzie IZ, Yudkin PL, Johnson AM. Case-control study of antenatal and intrapartum risk factors for cerebral palsy in very preterm singleton babies. *Lancet.* 1995 Dec 2;346(8988):1449-54.

Nelson KB, Willoughby RE. Infection, inflammation and the risk of cerebral palsy. *Curr Opin Neurol*. 2000 Apr;13(2):133-9. Review.

Ng PC, Li K, Wong RP, Chui K, Wong E, Li G, Fok TF. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003 May;88(3):F209-13.

Nosarti C, Al-Asady M, Frangou S, Stewart AL, Rifkin L, Murray RM. Adolescents who were born very preterm have decreased brain volumes. *Brain*. 2002 Jul;125(Pt 7):1616-23.

Olney JW, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V, Farber NB, Bittigau P, Ikonomidou C. Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Brain Pathol*. 2002 Oct;12(4):488-98. Review.

Olson HC, Streissguth AP, Sampson PD, Barr HM, Bookstein FL, Thiede K. Association of prenatal alcohol exposure with behavioral and learning problems in early adolescence. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1997 Sep;36(9):1187-94.

O'Shea TM, Counsell SJ, Bartels DB, Dammann O. Magnetic resonance and ultrasound brain imaging in preterm infants. *Early Hum Dev*. 2005 Mar;81(3):263-71. Review.

Pang Y, Cai Z, Rhodes PG. Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide. *Brain Res Dev Brain Res*. 2003 Feb 16;140(2):205-14.

Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol*. 1998 Oct;10(5):545-51. Review.

Pohl D, Bittigau P, Ishimaru MJ, Stadthaus D, Hübner C, Olney JW, Turski L, Ikonomidou C. N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 2;96(5):2508-13.

Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. 1992 Apr 2;356(6368):397-400. Review.

Redecker C, Hagemann G, Witte OW, Marret S, Evrard P, Gressens P. Long-term evolution of excitotoxic cortical dysgenesis induced in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 1998 Jul 1;109(1):109-13.

Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat, *Ann Neurol*, 9 (1981) 131-141.

Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 1998 Jul;179(1):194-202.

Roos T, Martius J. Pathogenese der Frühgeburt: Immunologische Aspekte. *Gynäkologe* 1996; 29: 114-21.

Schmued LC, Albertson C, Slikker W Jr. Fluoro-Jade-B: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res*. 1997 Mar 14;751(1):37-46.

Shasby DM, Vanbenthuysen KM, Tate RM, Shasby SS, McMurtry I, Repine JE. Granulocytes mediate acute edematous lung injury in rabbits and in isolated rabbit lungs perfused with phorbol myristate acetate: role of oxygen radicals. *Am Rev Respir Dis*. 1982 Apr;125(4):443-7.

Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem*. 1997 Mar;45(3):327-43. Review.

Shim SS, Romero R, Hong JS, Park CW, Jun JK, Kim BI, Yoon BH. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Oct;191(4):1339-45.).

Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR, Fanaroff AA, Lemons JA, Donovan EF, Oh W, Stevenson DK, Ehrenkranz RA, Papile LA, Verter J, Wright LL. Early-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr*. 1996a Jul;129(1):72-80.

Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR, Fanaroff AA, Lemons JA, Donovan EF, Oh W, Stevenson DK, Ehrenkranz RA, Papile LA, Verter J, Wright LL. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr*. 1996b Jul;129(1):63-71.

Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B, Higgins RD; National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA*. 2004 Nov 17;292(19):2357-65.

Stoll BJ, Hansen NI, Higgins RD, Fanaroff AA, Duara S, Goldberg R, Laptook A, Walsh M, Oh W, Hale E; National Institute of Child Health and Human Development. Very low birth weight preterm infants with early onset neonatal sepsis: the predominance of gram-negative infections continues in the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, 2002-2003. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 Jul;24(7):635-9.

Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK. Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med*. 2002a Jul 25;347(4):240-7.

Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2002b Aug;110(2 Pt 1):285-91.

Sulik KK, Johnston MC, Webb MA. Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model. *Science*. 1981 Nov 20;214(4523):936-8.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999 Feb 4;397(6718):441-6.

Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H. Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol*. 1999 Jan;9(1):93-117. Review.

Toulmond S, Parnet P, Linthorst AC. When cytokines get on your nerves: cytokine networks and CNS pathologies. *Trends Neurosci*. 1996 Oct;19(10):409-10. Review.

Vadiveloo PK. Macrophages--proliferation, activation, and cell cycle proteins. *J Leukoc Biol*. 1999 Oct;66(4):579-82. Review.

Verma U, Tejani N, Klein S, Reale MR, Beneck D, Figueroa R, Visintainer P. Obstetric antecedents of intraventricular hemorrhage and periventricular leukomalacia in the low-birth-weight neonate. *Am J Obstet Gynecol*. 1997 Feb;176(2):275-81.

Volpe JJ. Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2001;7(1):56-64. Review.

Wallach D. Apoptosis. Placing death under control. *Nature*. 1997 Jul 10;388(6638):123, 125-6.

Wheater M, Rennie JM. Perinatal infection is an important risk factor for cerebral palsy in very-low-birthweight infants. *Dev Med Child Neurol*. 2000 Jun;42(6):364-7.

Whitaker AH, Feldman JF, Van Rossem R, Schonfeld IS, Pinto-Martin JA, Torre C, Blumenthal SR, Paneth NS. Neonatal cranial ultrasound abnormalities in low birth weight infants: relation to cognitive outcomes at six years of age. *Pediatrics*. 1996 Oct;98(4 Pt 1):719-29.

Whitaker AH, Van Rossem R, Feldman JF, Schonfeld IS, Pinto-Martin JA, Tore C, Shaffer D, Paneth N. Psychiatric outcomes in low-birth-weight children at age 6 years: relation to neonatal cranial ultrasound abnormalities. *Arch Gen Psychiatry*. 1997 Sep;54(9):847-56.

Wu YW, Colford JM Jr. Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: A meta-analysis. *JAMA*. 2000 Sep 20;284(11):1417-24. Review.

Wu YW. Systematic review of chorioamnionitis and cerebral palsy. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002;8(1):25-9.

Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):802-9. Review.

Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim CJ, Kim SH, Choi JH, Han TR. Fetal exposure to an intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *Am J Obstet Gynecol*. 2000 Mar;182(3):675-81.;

Yoon BH, Romero R, Yang SH, Jun JK, Kim IO, Choi JH, Syn HC. Interleukin-6 concentrations in umbilical cord plasma are elevated in neonates with white matter lesions associated with periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol*. 1996 May;174(5):1433-40.

Yoon BH, Park CW, Chaiworapongsa T. Intrauterine infection and the development of cerebral palsy. *BJOG*. 2003 Apr;110 Suppl 20:124-7. Review.

Young RS, Hernandez MJ, Yagel SK. Selective reduction of blood flow to white matter during hypotension in newborn dogs: a possible mechanism of periventricular leukomalacia. *Ann Neurol*. 1982 Nov;12(5):445-8.

Young RS, Yagel SK, Towfighi J. Systemic and neuropathologic effects of *E. coli* endotoxin in neonatal dogs. *Pediatr Res*. 1983 May;17(5):349-53.

Zupan V, Gonzalez P, Lacaze-Masmonteil T, Boithias C, d'Allest AM, Dehan M, Gabilan JC. Periventricular leukomalacia: risk factors revisited. *Dev Med Child Neurol*. 1996 Dec;38(12):1061-7.

7. Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
DISC	Death inducing signalling complex
FADD	Fas associated death domain protein
FAS	Zelltodrezeptor, Synonyme CD 95, Apo-1
GABA	γ -Aminobuttersäure
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	mitogen-activated-protein-kinase
MHC	Major-Histocompatibility-Komplexen
MMS	Monozyten-Makrophagen-Systems
NF-Kappa B	Nuclear factor Kappa B
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Azetat
TLR	Toll-Like-Rezeptoren
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling

8. Lebenslauf

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

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. Ursula Felderhoff-Müser für die freundliche Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Versuchsumgebung sowie auch für die hervorragende fachliche Beratung bei der Arbeit.

Herzlichen Dank meinem Betreuer Herrn Dr. Mark Dzierko für die hilfreiche, gute und stets nette Betreuung ohne dessen Hilfe die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Auch vielen Dank an Dr. Oliver Polley für die wertvollen Beiträge zum Gelingen dieser Arbeit.

Vielen Dank an Frau Jessica Fassbender für die qualifizierte und immer geduldige Hilfe bei der täglichen Laborarbeit, sowie allen hier namentlich nicht erwähnten Mitarbeitern der AG Felderhoff-Müser für ihre Hilfsbereitschaft und vielen guten Ratschläge.

Außerordentlicher Dank gebührt meiner Familie und allen Freunden, die die lange Arbeit an den Experimenten und der Auswertung für diese Dissertation wohlwollend und unterstützend begleitet haben. Insbesondere danke ich meinem lieben Daniel für die beratende Anteilnahme und liebevolle Unterstützung.

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Maria Hahnemann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Entwicklung eines neuen Inflammationsmodells am Gehirn der neonatalen Ratte mittels Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA)“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift