Aus der Abteilung Neurologie (Prof. Dr. med. M. Bähr) im Zentrum Neurologische Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Neurogenese und Apoptose im hippokampalen Gyrus dentatus bei Autopsiefällen nach hypoxischem Hirnschaden und Subarachnoidalblutung

INAUGURAL- DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

> vorgelegt von Wulf-Rainer Christoph Mattiesen aus Ulm

> > Göttingen 2008

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Nau

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG:

1. EINL	EITUNG	5
1.1	Überblick	5
1.1.1	Neurogenese	5
1.1.2	Apoptose	6
1.2	Hypoxischer Hirnschaden und ischämische Krankheitsbilder	7
1.2.1	Definition	7
1.2.2	Hypoxischer Hirnschaden	7
1.2.3	Pathophysiologie des hypoxischen Neurons	9
1.2.4	Fokale Ischämie	9
1.3	Subarachnoidalblutung	10
1.4	Natürlich vorkommende adulte Neurogenese unter besonderer Berücksichtigung des	
hippo	kampalen Gyrus dentatus	11
1.4.1	Anatomie und Funktion des Hippokampus	11
1.4.2	Ablauf adulter Neurogenese im hippokampalen Gyrus dentatus	13
1.4.3	Zur Historie der adulten Neurogenese	16
2. FRAG	ESTELLUNG	17
2.1	Zentrale Hypothesen	18
2.2	Weiterführende Fragen	18
3. AUTC	DPSIEFÄLLE UND METHODEN	19
3.1	Autopsiefälle und Gruppendefinition	19
3.2	Immunhistochemie	20
3.2.1	Allgemeines	20
3.2.2	Auswahl der Marker	21
3.2.3	Methoden, Laborprotokolle und Kontrollen	21
3.3	In-situ-tailing	27
3.4	Beurteilung am Mikroskop	28
3.5	Statistische Auswertung	29
4. ERGE	BNISSE	30
4.1	Autopsiefälle und Gruppen	31
4.2	Auswertbarkeit. Morphologie und Rohdaten	32
4.2.1	PCNA	32
4.2.2	<i>Tuc-4</i>	33
4.2.3	Calretinin	34
4.2.4	Apoptotische Körnerzellen	35
4.3	Zentrale Hypothesen	36
4.3.1	Neurogenese und Apoptose nach zentraler Hypoxie	36
4.3.2	Neurogenese und Apoptose nach SAB	37
4.4	Weiterführende Fragen	38
4.4.1	Neurogenese und Apoptose nach Hypoxie - Altersvergleich	38
4.4.2	Neurogenese und Apoptose bei Kontrollen - Altersvergleich	39

4.4.3	Verlauf der Neurogenese und Apoptose nach zentraler Hypoxie	
4.4.4	Mehrfachanalyse in der Hypoxiegruppe - ein Problem?	43
5. Disk	USSION	
5.1	Diskussion der Methoden	55
5.1.1	Autopsiefälle und Gruppendefinition	55
5.1.2	Immunhistochemie und In-situ-tailing	59
5.2	Diskussion der Ergebnisse - zentrale Hypothesen	62
5.2.1	Neurogenese und Apoptose nach zentraler Hypoxie	62
5.2.2	Neurogenese und Apoptose nach spontaner SAB	65
5.3	Diskussion der Ergebnisse - weiterführende Fragen	66
5.3.1	Neurogenese und Apoptose nach Hypoxie - Altersvergleich	66
5.3.2	Neurogenese und Apoptose bei Kontrollen - Altersvergleich	66
5.3.3	Verlauf der Neurogenese und Apoptose nach zentraler Hypoxie	67
5.4	Aktueller Stand der Neurogeneseforschung	68
5.4.1	Weitere Regionen adulter Neurogenese im Tiermodell	68
5.4.2	Neurogenese bei Menschen - Zusammenfassung der bisherigen Daten	69
5.4.3	Spekulationen über die Funktion adulter Neurogenese im Gyrus dentatus	
5.5	Therapeutischer Ausblick	
6. ZUSA	MMENFASSUNG	75
7. Anha	ANG	77
7.1	Methodischer Anhang	77
7.2	Abkürzungsverzeichnis	80
8. Lite	RATURVERZEICHNIS	

1. EINLEITUNG

Die Entschlüsselung der Funktionen des menschlichen Gehirns ist eines der großen Ziele unserer technischen und forschenden Gesellschaft; Stück für Stück tastet man sich diesem entgegen. Psychologie und Verhaltensforschung einerseits und Neurologie, Neurophysiologie und Bioinformatik andererseits nähern sich einander immer weiter an.

Für zahlreiche neurologische Krankheitsbilder, die noch nicht kausal therapierbar sind, könnten neuroprotektive Medikamente eine therapeutische Ansatzmöglichkeit sein, indem diese mit adulter Neurogenese und Apoptose in Wechselwirkung treten, und eventuell einen hirneigenen zellulären regenerativen Mechanismus durch Integration neuronaler Vorläuferzellen stimulieren.

Die vorliegende Arbeit sollte einen kleinen Beitrag zur Grundlagenforschung leisten, indem an Autopsiefällen nach stattgehabtem hypoxischen Hirnschaden bzw. spontaner Subarachnoidalblutung (SAB) adulte Neurogenese und Apoptose in der Körnerzellschicht des hippokampalen Gyrus dentatus beschrieben und mit Kontrollfällen verglichen werden sollten. Daraus wollten wir auf die grundsätzlich mögliche Anwesenheit eines solchen Mechanismus schließen.

1.1 Überblick

1.1.1 Neurogenese

Neurogenese bezeichnet im weiten Sinn jedes Wachstum von Neuronen. Man unterscheidet zwischen einerseits der *embryonalen* Neurogenese während der Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS), und andererseits der *adulten* Neurogenese, also der Proliferation, Entwickelung, Migration und Integration neuer Neuronen in ein bereits vollständig ausgewachsenes ZNS (Kempermann et al. 2004).

Seit langem befand sich adulte Neurogenese in wissenschaftlicher Diskussion. Im Laufe der Zeit änderten sich die Vorstellungen, Überzeugungen und Erkenntnisse gemeinsam mit den aktuellen neurowissenschaftlichen Methoden und deren Aussagekraft (Gross 2000).

Im letzten Jahrhundert war die entscheidende Frage, *ob* es adulte Neurogenese überhaupt gibt (Gross 2000) - heutzutage geht man davon aus, dass im hippokampalen Gyrus dentatus und manchen anderen Regionen des ZNS adulte Neurogenese von neuronalen Stammzellen ausgeht (engl. ,neural stem cells', NSC) (Alvarez-Buylla and Jackson 2005, S. 416-417), und

die Erforschung von Umständen, auslösenden Faktoren und vor allem therapeutischen Einsatzmöglichkeiten steht im Vordergrund aktueller Forschungsbestrebungen.

1.1.2 Apoptose

Apoptose und Nekrose sind zwei unterschiedliche Formen des Zelluntergangs, die sowohl in Ursache als auch Ablauf charakteristische Gegensätze aufweisen.

Bei der Apoptose wird das Erbgut der Zelle, die DNS (Desoxyribonukleinsäure), stark kondensiert und in Bruchstücke gespalten. Die Zellorganellen werden zu kleinen apoptotischen Körperchen zusammengeballt; insgesamt schrumpft die Zelle, sodass sie weitestgehend ohne gesteigerte Immunaktivität phagozytiert werden kann (Elmore 2007).

Apoptose kann sowohl von außen über Apoptoserezeptoren (extrinsischer Weg), wie auch von der Zelle selber aktiviert werden (intrinsischer Weg) (Adams J 2003). Molekularbiologisch spielen dabei Caspasen (<u>C</u>ysteinyl-<u>Aspartasen</u>) sowohl effektorisch als auch in der Signaltransduktion die Hauptrolle (Elmore 2007).

Apoptose wurde lange als ausschließlich physiologische Form des Zelluntergangs angesehen (Adams J 2003, Elmore 2007), da sie grundsätzlich in fast allen Geweben des Körpers vorkommt und zusammen mit ständiger Regeneration und Mitose zur Erhaltung des homöostatischen zellulären Fließgleichgewichts dient. Insbesondere in der Immunabwehr werden autoreaktive, sinnlose und überschüssige Komponenten apoptotisch abgebaut, die in großer Zahl durch ein diffiziles Zufallsprinzip entstehen, sodass eine möglichst große Vielfalt der humoralen (Antikörper) und zellulären Abwehr (Zellrezeptoren) gewährleistet ist. Auch in der embryonalen Entwicklung werden zahlreiche überzählige Gewebe apoptotisch abgebaut (Adams J 2003, Elmore 2007).

Allerdings ist in letzter Zeit gesteigerte bzw. verminderte Apoptose auch als wesentlicher Bestandteil der Pathogenese zahlreicher Krankheiten bekannt geworden (z.B. das erworbene Immundefektsyndrom durch das Humane Immundefizienz-Virus, Lupus erythematodes, Malignome, Transplantatabstoßung, Virushepatitiden, akute Neuronenschäden unterschiedlicher Pathogenese, Amyotrophe Lateralsklerose, Chorea Huntington, Demenz vom Alzheimer-Typ oder Morbus Parkinson) - und gilt somit als potentieller zukünftiger therapeutischer Angriffspunkt (Elmore 2007, Kermer et al. 2004).

Die nekrotische Zelle ist, im Gegensatz zur apoptotischen, das Opfer toxischer, erregerbedingter oder ischämischer Schädigung - daher wird Nekrose auch als pathologischer

Zelluntergang bezeichnet. Nekrotische Zellen schwellen an, platzen, und eine heftige Immunreaktion wird in der Regel ausgelöst (Elmore 2007).

1.2 Hypoxischer Hirnschaden und ischämische Krankheitsbilder

1.2.1 Definition

Man grenzt grundsätzlich drei neurologische Krankheitsbilder gegeneinander ab, die alle zu einer Minderversorgung der Neuronen mit Sauerstoff führen, sich aber sonst in Ätiologie, Pathogenese, Klinik, Diagnose und Therapie stark unterscheiden (Caplan 2002, S. 1345f):

• Der hypoxische Hirnschaden: Durch generalisierte zerebrale Minderperfusion bedingt, sind alle Neuronen betroffen. Gebräuchliche Synonyme sind globale Ischämie, hypoxische Enzephalopathie, hypoxisch-hypotensive Enzephalopathie, zentrale Hypoxie und zerebrale Hypoxie.

• Die fokale Ischämie: Durch Verschluss eines hirnversorgenden Gefäßes bedingt, sind nur Neuronen in dessen Versorgungsgebiet betroffen, z.B. Schlaganfall.

• Die hämorrhagische Ischämie wird durch eine SAB oder andere intrazerebrale Blutung verursacht.

1.2.2 Hypoxischer Hirnschaden

Der hypoxische Hirnschaden ist eines der entscheidenden Probleme in der Rettungs-, Notfall-, und Geburtsmedizin (Berger and Garnier 2000, Booth et al. 2004, Schwab et al. 1999, S. 627, Zandbergen et al. 1998, Wijdicks et al. 2006). Er stellt die Hauptursache für Komplikationen nach primär erfolgreicher kardiopulmonaler Reanimation bei Herzstillstand dar (Madl and Holzer 2004) - Ursache ist eine globale zerebrale Sauerstoffminderversorgung.

Beinahe 80% der Betroffenen lagen anschließend unterschiedlich lange im Koma bzw. 40% blieben im permanenten vegetativen Status (apallisches Syndrom) (Madl et al. 2000). Fast alle Patienten waren ihr restliches Leben lang pflegebedürftig (Thömke und Weilemann 2007). Nach einem Jahr waren 80% der Betroffenen verstorben (Madl and Holzer 2004).

Als weitere Ursachen kommen grundsätzlich Erkrankungen der hirnzuführenden Gefäße, ernst arterielle Hypotension, respiratorische Insuffizienz und Schock in Betracht; in der Geburtsmedizin ist eine verminderte umbilikale Zirkulation bei prolongiertem Geburtsverlauf die Hauptursache für hypoxische Hirnschäden des Neugeborenen (Adams R et al. 2000, S. 1140-1142, Berger and Garnier 2000).

Die Therapie beschränkte sich bisher auf Intensivmedizin und Rehabilitation über Monate bis Jahre (Thömke und Weilemann 2007). Primäres Ziel war die Lebenserhaltung; im weiteren Verlauf versuchte man für jeden Patienten individuell die größtmögliche Funktionalität zu erreichen.

Zusätzlich wird seit 2002 eine milde Hypothermie (Unterkühlung) auf 32-34°C für mindestens 24 Stunden bei allen Patienten mit Verdacht auf Hypoxie empfohlen; insbesondere nach jeder kardialen Reanimationen (Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group 2002). Weitere Indikationen dieses Therapieansatzes wurden noch diskutiert.

Eine weitere zukünftige therapeutische Option könnten neuroprotektive Medikamente sein, die mit adulter Neurogenese und Apoptose interferieren und somit evtl. das Wachstum, Auswandern und vor allem die funktionelle Integration neuronaler Vorläuferzellen stimulieren.

Mindestens genauso wichtig wie die Therapie war allerdings die Prävention des hypoxischen Hirnschadens in der Reanimationssituation (Nolan et al. 2005). Insgesamt fehlte allerdings leider immer noch eine Leitlinie für die Therapie des hypoxischen Hirnschadens bei Erwachsenen bzw. den Umgang mit frisch kardiopulmonal reanimierten Patienten.

Zur Prognoseabschätzung bei Patienten mit stattgehabtem hypoxischen Hirnschaden konnten übereinstimmend gemäß dreier aktueller Meta-Analysen mit insgesamt um die 1500 Patienten (Booth et al. 2004, Wijdicks et al. 2006, Zandbergen et al. 1998) folgende Kriterien herangezogen werden:

- Sind die direkten und indirekten Pupillenreflexe beidseits auslösbar?
- Sind die Kornealreflexe beidseits auslösbar?
- Wie stark sind die Abwehrreaktionen des Patienten gegenüber Schmerzen?

Für eine schlechte Prognose sprachen weiterhin isoelektrische und Burst-Suppressions-Muster in der Elektroenzephalografie (Wijdicks et al. 2006, Zandbergen et al. 1998), keine sensibel evozierbaren Potentiale nach Stimulation des Nervus medianus (Madl et al. 2000, Wijdicks et al. 2006, Zandbergen et al. 1998) und generalisierte myklonische Anfälle (Wijdicks et al. 2006). Ebenfalls mit schlechter Prognose assoziiert waren erhöhte Serumwerte der neuronenspezifischen Enolase (NSE), einem intrazellulären Enzym des neuronalen Glukosestoffwechsels (Phosphopyruvathydratase) über 120 ng/ml (Schaarschmidt et al. 1994, Zandbergen et al. 1998) bzw. von S-100, einem kalziumbindenden Protein astroglialer Zellen des ZNS, mit über 0,7 μg/l (Martens et al. 1998). Diese Parameter waren allerdings vor der Hypothermie-Ära erhoben worden, sodass ihr aktueller Wert noch geklärt werden musste.

1.2.3 Pathophysiologie des hypoxischen Neurons

Durch die physiologische Regulierung des zerebralen Gefäßwiderstandes toleriert das ZNS mittlere arterielle Perfusionsdrücke bis 60 mmHg herab. Fällt dieser jedoch weiter ab, kommt es nach vollständigem Verbrauch lokaler Energiequellen innerhalb von 3-5 Minuten zu Energiemangel und hypoxischem Zelluntergang (Adams R et al. 2000, S. 1141f). Besonders stark betroffen sind die Grenzgebiete der arteriellen Blutversorgung (Prinzip der letzten Wiese), wie beispielsweise die Laminae 3, 4 und 6 der Großhirnrinde, die Purkinjezellen des Kleinhirns, das Striatum und der Hippokampus (Madl and Holzer 2004, Schwab et al. 1999, S. 627).

Eine zentrale Rolle bei der Zellschädigung spielt die Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Sie wird verursacht durch die verminderte Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase und dem daraus resultierenden Anstieg des Membranpotentials. Weiterhin spielen wahrscheinlich neben weiteren Ionenverschiebungen auch der Anstieg von freien Fettsäuren und Laktat aus der anaeroben Glykolyse eine große Rolle (Adams R et al. 2000, S. 1141f).

Die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wird noch verstärkt durch Stimulation exzitatorischer Glutamatrezeptoren vom N-Methyl-D-Aspartat- und Amino-Hydroxy-Methyl-Isoxazol-Propionsäure-Typ und führt durch Aktivierung von Proteasen zum Abbau des Zytoskeletts. Außerdem regt sie durch Aktivierung der Phospholipase A2 und der Cyklooxygenase die Produktion hochreaktiver freier Radikale an, z.B. Peroxynitrit (NOO•) (Adams R et al. 2000, S. 1141f). Es resultiert insgesamt eine irreversible Schädigung der Mitochondrien und das Anschwellen der Zelle durch einströmende H₂O-Moleküle, die dem entstandenen osmotischen Gefälle folgen (Adams R et al. 2000, S. 1141f).

Eine schwer hypoxische Nervenzelle geht typischerweise in Nekrose unter, allerdings ist die Rolle der Apoptose, insbesondere bei Körnerzellen, noch nicht abschließend geklärt (siehe Seite 64).

1.2.4 Fokale Ischämie

Im Gegensatz zum hypoxischen Hirnschaden entsteht die fokale Ischämie durch plötzlichen Verschluss *einer* hirnversorgenden Arterie. Da alle Arterien distal des Circulus arteriosus Willisii im ZNS zur funktionellen Endstrombahn gehören (Trepel 2004, S. 259-268), gibt es

einen engen Zusammenhang zwischen verschlossenem Gefäß, ischämischem Gebiet und klinisch resultierendem fokal neurologischem Defizit (Caplan 2002, S. 1346-1357). Bildet sich dieses schnell oder innerhalb von maximal 24 Stunden zurück, spricht man von einer transitorisch ischämischen Attacke, engl. "warning stroke"; ist mit einer Rückbildung nicht mehr zu rechnen, geht man von einem Schlaganfall aus, engl. "complete stroke" (Caplan 2002, S. 1345f).

Am Schlaganfall und dessen Folgen starben 2004 in Deutschland 44 von 100.000 Frauen bzw. 52 von 100.000 Männern. Er war somit an dritter Stelle der deutschen Todesstatistik - nach Krankheiten des Kreislaufsystems und bösartigen Neubildungen (Organisation for Economic Cooperation and Development 2007).

Therapeutisch hat sich in den letzten Jahren der hohe Stellenwert von intensivem Monitoring (,Stoke Unit') und medikamentöser Prävention bzw. Therapie der Komplikationen herausgestellt (Poeck und Hacke 2006, S. 201, 206-214). Kausal wird versucht, die verschlossene Arterie durch eine intravenöse Lyse innerhalb eines Intervalls von 3 Stunden - bzw. durch eine gezielte kathetherangiographische Lyse nach bis zu 6 Stunden wieder zu eröffnen (Poeck und Hacke 2006, S. 203-206).

1.3 Subarachnoidalblutung

Die spontane SAB ist die häufigste intrakranielle Blutung zwischen 35 und 65 Jahren (Adams R et al. 2000, S. 869). Zwischen 1960 und 1996 erlitten 6-8 von 100.000 Personen jährlich eine SAB (Linn et al. 1996). Blutungsquelle sind meist rupturierte Aneurysmen - pathologische Aussackungen der Zerebralarterien, meist an deren Aufteilungsstellen, von durchschnittlich 7,5 mm Größe (Kassell et al. 1990). Von der spontanen SAB sind Subarachnoidalblutungen bei Schädelhirntraumata abzugrenzen.

Als klinisches Warnzeichen gilt der plötzlich einschießende Vernichtungskopfschmerz. Zusätzlich können Nackenschmerzen bzw. Meningismus, vegetative Symptome (Erbrechen, Übelkeit, Schweißausbruch, Blutdruck-, Puls-, Atmungs- und Temperaturveränderungen) sowie Störungen der Vigilanz auftreten (Poeck und Hacke 2006, S. 266f). Oft ist im nachhinein eine Warnblutung oder ein lokalneurologisches Symptom Wochen vor der SAB zu eruieren gewesen, bei denen schon Handlungsbedarf bestanden hätte (Adams R et al. 2000, S. 870f, Edlow and Caplan 2000, Poeck und Hacke 2006, S. 264). Anhand der neu aufgetretenen Neurologie wurden die Patienten nach Hunt and Hess (1968) in 5 prognosebestimmende Gruppen eingeteilt; allerdings rückt heute die Einteilungsmethode der ,World Federation of Neurological Surgeons' in den Vordergrund, die auf der Glasgow-Komaskala und dem Vorhandensein motorischer Ausfälle beruht (Teasdale et al. 1988).

Die Diagnose wird in der akuten Situation üblicherweise im CT gestellt, wobei beachtet werden muss, dass gerade kleinere Blutungen und Aneurysmen unter 4 mm oft nicht erkannt werden (Wardlaw and White 2000) - bei weiter bestehendem Verdacht wird eine Liquorpunktion empfohlen (Edlow and Caplan 2000). Anschließend wird bei kathetherangiographischem Aneurysmanachweis die Differentialindikation zur Therapie gestellt. Dazu stehen neurochirurgisch-operatives ,clipping' und neuroradiologisch-kathetherangiographisches ,coiling' zur Verfügung (Adams R et al. 2000, S. 874f, International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT) Collaborative Group 2002, Kassell et al. 1990, Poeck und Hacke 2006, S. 272-275). Die jeweilige genaue Indikationsstellung wurde noch kontrovers diskutiert.

Die Prognose gilt insgesamt als schlecht. Man geht davon aus, dass ca. 30 % der Patienten bereits prähospital wegen zentraler Dysregulation oder einer Hirntamponade versterben (Linn et al. 1996, Poeck und Hacke 2006, S. 267-270). Bei nur 30% kann mit einer Erholung auf das vorausgegangene Niveau gerechnet werden, da neben der initialen Problematik zusätzlich innerhalb der ersten zwei Wochen die Gefahr zahlreicher Komplikationen besteht: erneute Blutungen, Hydrocephali, Hyponatriämie, kardiale Arrhythmien und Vasospasmen der basalen Hirnarterien (Broderick et al. 1994, Poeck und Hacke 2006, S. 267-270).

1.4 Natürlich vorkommende adulte Neurogenese unter besonderer Berücksichtigung des hippokampalen Gyrus dentatus

1.4.1 Anatomie und Funktion des Hippokampus

Anatomischer Aufbau

Der Hippokampus befindet sich zum größten Teil im Temporallappen, medial der Innenwand des Seitenventrikelunterhornes. Rostral endet er im Pes hippocampi, dorsalkaudal setzt er sich in die Fornix fort. Er ist lateral vom Gyrus parahippocampalis und der Area entorhinalis umgeben, neokortikalen Anteilen des limbischen Systems - der Hippokampus selber gehört allerdings zum dreischichtigen Allokortex (Trepel 2004, S. 205f).

Im histologischen Querschnitt durch den Hippokampus (Abbildung 1) erkennt man die innere gebogene Struktur des Gyrus dentatus, um den sich das Cornu ammonis (CA) windet. Dieses

wird traditionell in die im Querschnitt nebeneinander liegenden Anteile CA 1 bis 4 und das Subikulum aufgeteilt.

Das CA besteht aus folgenden drei Schichten: das äußere Stratum oriens, in der Mitte das Stratum pyramidale, das wegen seiner Pyramidenzelldichte gut erkennbar ist, und das innen gelegene Stratum moleculare (Trepel 2004, S. 205f).

Der Gyrus dentatus schichtet sich analog: außen das Stratum moleculare, das gut erkennbare Stratum granulosum in der Mitte (dt. Körnerzellschicht), und innen das Stratum subgranulosum (dt. subgranuläre Zone oder Subgranulärschicht) (Trepel 2004, S. 206).



Abbildung 1. Übersichtsaufname des Gyrus dentatus des Autopsiefalls mit lfnd Nr. Ko12 (siehe Seite 54) im Querschnitt, gefärbt mit Hämalaun nach Mayer. Der Balken entspricht 0,5 mm, Beschriftung nach Trepel (2004), S. 206.

Synaptische Verschaltung des Gyrus Dentatus

Afferenzen

Den großen Dendritenbaum der Körnerzellen im Gyrus dentatus erreichen GABAerge Fasern (Neurotransmitter: Gamma-amino-buttersäure) aus der Area entorhinalis, cholinerge Fasern (Acetylcholin) aus der Septumregion, und Kommissurenfasern vom kontralateralen Gyrus dentatus (GABA und vasoaktives intestinales Polypeptid) (Frotscher et al. 1988).

Efferenzen

Die Axonen der Körnerzellen (Moosfasern) projizieren zu den proximalen Dendriten der Pyramidenzellen in den ipsilateralen CA3- und CA4-Regionen sowie in der kontralateralen CA3-Region (Schwerdtfeger 1984).

Der trisynaptische Schaltkreis

Die Afferenzen und Efferenzen des Gyrus dentatus schließen sich mit den Schaffer-Kollateralen (Projektionen von CA3 über das Subikulum und CA1 direkt zur Area entorhinalis) zu einem trisynaptischen Schaltkreis zusammen.

Dieser wird durch die Fasern des Tractus perforans ergänzt, die direkt von der Area entorinalis auf CA1 und CA3 projizieren, und somit den Gyrus dentatus umgehen (Frotscher et al. 1988, Johnson and Amaral 2003, S. 417-458, Schwerdtfeger 1984).

Funktion des Hippokampus

Der Hippokampus gehört als Teil des Papez-Neuronenkreises zum limbischen System. Dieses hat herausragende Funktionen bei grundlegenden Emotionen und der Speicherung expliziter Gedächtnisinhalte (Johnson and Amaral 2003, S. 417-458, Trepel 2004, S. 203-208).

In den Anfängen der Neurochirurgie stellte man fest, dass massive Läsionen des Hippokampus zu komplettem Verlust des antero- und retrograden expliziten Gedächtnisses führen; nur früheste Erinnerungen bleiben erhalten (Scoville and Milner 1957, Steinvorth et al. 2005).

Am Tiermodell und mit computergestützten Analysen wurde nun versucht, ein modernes Funktionsmodell des Hippokampus zu entwickeln (Schwerdtfeger 1984, Treves and Rolls 1994). In diesen Modellen wurde Pufferung und Rückprojektion von bestehenden und neuen Gedächtnisinhalten in den Neokortex als Hauptfunktion des Hippokampus angesehen. Dabei galt CA3 als eigenständiges Autoassoziationsnetzwerk, das neue Sinneswahrnehmungen aus dem Neokortex mit speziellen Assoziationsmustern und anderen Gedächtnisinhalten aus dem Gyrus dentatus verrechnet. Durch einen derartigen Mechanismus könnte schon bei der kleinsten Wahrnehmung eine Vielzahl von Assoziationen abgerufen werden.

1.4.2 Ablauf adulter Neurogenese im hippokampalen Gyrus dentatus

Adulte Neurogenese wurde im Tiermodell an vielen Stellen des ZNS nachgewiesen (siehe Seite 68), bei Menschen lediglich im hippokampalen Gyrus dentatus, in CA1, im Bulbus olfactorius und in der subventrikulären Zone des Seitenventrikelunterhorns (SVZ) (siehe Seite 69). Dabei ist der Gyrus dentatus die am besten erforschte Region.

Die adulte Neurogenese ist ein extrem komplexer Prozess, der nach Gage et al. (1998) in folgende fünf Schritte unterteilt werden kann:

- Proliferation der Stammzellen,
- Überleben der Tochterzellen,
- Migration zum Zielareal der Zellen,
- Differenzierung zu reifen Neuronen und Ausbildung synaptischer Verbindungen,
- Etablierung der funktionellen Verbindung.

Im Folgenden soll auf die einzelnen Schritte näher eingegangen werden (Die geschilderten Erkenntnisse stammen allerdings ausschließlich aus Tierexperimenten, da eine solch intensive Forschung an menschlichen Gehirnen in vielerlei Hinsicht problematisch ist [siehe Seite 69]).

Proliferation der Stammzellen

Die NSC des Gyrus dentatus sind postembryonale pluripotente Stammzellen, die unter Selbsterhaltung durch asymmetrische Zellteilung Folgezellen erzeugen können (Abrous et al. 2005, Gage et al. 1995, Kempermann et al. 2004). Als ihr Ursprung wurden Radialgliazellen diskutiert, die zuvor nur als unreife Gliazellen angesehen worden waren, die embryonal das gesamte ZNS-Parenchym durchspannen und der Migration embryonaler Neuronen den Weg weisen (Alvarez-Buylla and Jackson 2005, S. 424f, Kempermann et al. 2004, Shapiro and Ribak 2005). Die NSC wurden anhand des Expressionsmusters der extrem frühen Marker junger neuronaler Vorläuferzellen "paired-box-6', "empty-spiracles-homeobox-2' und "mushashi-1 bzw. -2' in der innen gelegenen subgranulären Zone des Gyrus dentatus durch Immunhistochemie lokalisiert (Nakatomi et al. 2002).

Mit fortlaufender Entwicklung der jungen Zellen werden Nachfolgerzellen anhand ihres immunhistochemischen Expressionsmusters unterschieden (Abrous et al. 2005, Kempermann et al. 2004):

- Typ-1-Zelle: glial fibrial acid protein (GFAP) +,
- Typ-2a-Zelle: Nestin +, doublecortin (DCX) -, GFAP -,
- Typ-2b-Zelle: Nestin +, DCX -, GFAP -,
- Typ-3-Zelle: Nestin +, DCX +,
- frühe postmitotische Zelle: DCX +, Calretinin +,
- späte postmitotische Zelle: DCX +, Calbindin +.

Die frühen Nachfolgerzellen liegen in Clustern in der subgranulären Zone (Abrous et al. 2005, Kuhn et al. 1996) und könnten gut in vitro beobachtet werden, sodass die Eigenschaften (Morphologie, Elektrophysiologie, Ionenkanäle und Neurotransmitter-Rezeptoren) der einzelnen Nachfolgerzellen sehr genau bekannt sind (Bischofberger und Schmidt-Hieber 2006, Shapiro and Ribak 2005, van Praag et al. 2002).

Die frühen Nachfolgerzellen können sich noch vorübergehend teilen (engl. ,transiently amplifying cells'), worauf im Verlauf mit steigendem Differenzierungsgrad und sinkender Proliferationsbereitschaft schließlich ein postmitotischer Zustand erreicht wird (Abrous et al. 2005, Kempermann et al. 2004).

Es wurde postuliert, dass eine bestimmte Wachstumsfaktorumgebung benötigt würde, um diesen Vorgang überhaupt zu ermöglichen (sog. Umweltnischen, engl. ,microenvironments') (Seki 2003), in denen Neurotransmitter, Expression und Aktivierung von Rezeptoren und bestimmte gliale Zellpopulationen eine wichtige Rolle spielen sollten. Eventuell übt das gesamte adulte Säugerhirn eine Art allgemeinen Anti-Neurogenese-Einfluss aus, der nur in jenen Umweltnischen antagonisiert wird (Kempermann et al. 2004).

Überleben der Tochterzellen

Im Gyrus dentatus der Maus, der aus insgesamt 300.000 Körnerzellen besteht, wurden ca. 150 neue Körnerzellen pro Tag gemessen (Kempermann et al. 1997b). Der längste beobachtete Zeitraum, den die neuen Neuronen überlebten, war 11 Monate (Kempermann et al. 2003, van Praag et al. 2002).

In der Ratte wurden etwa 9.000 neue von insgesamt 4.000.000 Körnerzellen (Cameron and McKay 2001) und im Makakenaffen 200 von 4.800.000 Körnerzellen pro Tag gemessen (Kornack and Rakic 1999), die wiederum mindestens 79 Tage überlebten (Tonchev and Yamashima 2006).

Eine daraus resultierende lebenslange Größenzunahme des Gyrus dentatus durch anhaltende Neurogenese ohne entsprechenden Zelluntergang wurde diskutiert (Amrein et al. 2004). Die beschriebenen Unterschiede hingen allerdings nicht nur von der Spezies ab; auch Aufzucht und Laborbedingungen spielten eine große Rolle.

Migration zum Zielareal der Zellen

Aus der subgranulären Zone ist eine sogenannte ,short distance'-Migration der jungen postmitotischen Körnerzellen zur Körnerzellschicht beschrieben worden (Shapiro et al. 2007), durch die fortlaufende Migration entsteht ein Altersgradient der jungen Neuronen.

Differenzierung zu reifen Neuronen, synaptische Verbindungen und Etablierung der funktionellen Verbindung

Die *funktionelle* Eingliederung der jungen Neuronen in den Gyrus dentatus wird immer noch kontrovers diskutiert (siehe Seite 71). Allerdings sollen einzelne bedeutende Erkenntnisse herausgehoben werden:

• Die Differenzierung der jungen Zellen über den "point-of-no-return" zum Neuron wurde schon nach circa einer Woche festgelegt. In der Ratte wiesen cirka 70-90% der jungen Zellen neuronale Differenzierung auf, der Rest differenzierte zu Astrozyten oder anderen Gliazellen (Brandt et al. 2003, Kempermann et al. 2003, Sharp et al. 2002).

• Die jungen Neuronen hatten elektronenmikroskopisch einen für Körnerzellen typischen intrazellulären Apparat (Kaplan and Bell 1984).

• Sie ließen die für sie typischen Axonen auswachsen (Moosfasern, vgl. Seite 13) (Hastings and Gould 1999), allerdings sank deren Anzahl nach vier Tagen wieder - vermutlich durch Auslese (Shapiro et al. 2007).

• Der typische Dendritenbaum wuchs nicht nur in Richtung Area entorhinalis aus, sondern empfing auch Signale von dort (van Praag et al. 2002).

 Nach einigen Monaten waren die Membranpotentiale der jungen Körnerzellen und deren Axonen bzw. Dendriten nicht mehr von denen anderer Körnerzellen zu unterscheiden (van Praag et al. 2002).

Sie erfüllen somit gemäß Bischofberger und Schmidt-Hieber (2006) alle messbaren Kriterien ausdifferenzierter Körnerzellen des Gyrus dentatus.

1.4.3 Zur Historie der adulten Neurogenese

Vor 1960 galt adulte Neurogenese lange als unvorstellbar. Dies stützte sich vor allem auf die Ansichten des bekannten Mediziners und Neurowissenschaftlers Santiago Ramon y Cajal, der 1913 argumentierte, dass eine solch extreme Form der neuronalen Plastizität, wie die adulte Neurogenese, in einem komplexen und ausdifferenzierten System, wie einem erwachsenen Säugergehirn, nicht vorkommen könne (Gross 2000). Entgegengesetzte Meinungen waren damals kaum haltbar, schließlich gab es keine Methode, adulte Neurogenese mit Gewissheit nachzuweisen - insbesondere eine Unterscheidung zwischen Neuronen und Zellen glialer Differenzierung war damals noch nicht möglich (siehe Übersichtsarbeit Gross 2000).

Erste Forschungsbestrebungen, die auf weite Anerkennung stießen, wurden in den frühen sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts von einer Forschungsgruppe um Joseph Altmann

durchgeführt, die junge, sich teilende Zellen im Gyrus dentatus aufspürte. Sie wiesen autoradiographisch ein bestimmtes Radionuklid in Gewebeschnitten des Gyrus dentatus nach, das sie in vivo in die DNS aller mitotischen Zellen integriert hatten (H³-Thymidin), und postulierten, da der Gyrus dentatus nur aus Neuronen bestehe, dass die sich teilenden Zellen Neuronen sein müssten (Altman and Das 1965). Von Kaplan and Bell (1984) wurde später der elektronenmikroskopische Nachweis erbracht, dass die jungen Zellen auch neuronale Morphologie hatten.

Wieder gab es Gegenstimmen: Eckenhoff and Rakic 1988 kamen in großen Studien an Rhesusaffen zu dem Schluss, dass adulte Neurogenese ausschließlich auf das Gebiet des Gyrus dentatus im Hippokampus beschränkt sei, und dort auch kurz nach der Geburt wieder ende.

Doch verschiedene funktionelle Nachweise der neuronalen Identität der jungen Zellen bei adulten Versuchstieren wurden daraufhin entwickelt: Mit fluoreszierenden Markern, die sich retrograd in der gesamten jungen Zelle verteilten, beobachtete man Axonen, die aus jungen Neuronen entlang typischer Bahnen auswuchsen (Stanfield and Trice 1988), und es gelang in vitro aus isolierten NSC adulter Ratten neue Neuronen zu züchten (Gage et al. 1995).

Der eindeutige Beweis für adulte Neurogenese im adulten Säugergehirn wurde erst von Kuhn et al. (1996) an Ratten erbracht, indem sie konfokale Mikroskopie mit Immunhistochemie von Markern neuronaler Differenzierung und des Proliferationsmarkers Brom-Desoxy-Uridin (BrDU) kombinierten, einem Thymidinanalogon, das in vivo in die DNS bei der Zellteilung eingebaut wurde. Mit dieser Methode wurde schließlich adulte Neurogenese auch in verschiedenen Affenarten (Gould et al. 1998, Kornack and Rakic 1999) und in Menschen nachgewiesen (Eriksson et al. 1998).

2. FRAGESTELLUNG

Gegenstand der vorliegenden retrospektiven Arbeit war es, an Autopsiefällen nach stattgehabtem hypoxischen Hirnschaden bzw. spontaner SAB adulte Neurogenese und Apoptose in der Körnerzellschicht des hippokampalen Gyrus dentatus zu beschreiben und mit Kontrollfällen zu vergleichen. Daraus wollten wir auf die grundsätzlich mögliche Anwesenheit eines hirneigenen zellulären regenerativen Mechanismus unter diesen Bedingungen schließen.

Die folgenden Fragen wurden bearbeitet:

2.1 Zentrale Hypothesen

a. "In Autopsiefällen nach zerebraler Hypoxie sind die natürliche Neurogenese und Apoptose im Gyrus dentatus signifikant verändert gegenüber Fällen ohne neuropathologische Auffälligkeiten."

Zugehörige Nullhypothese: "In Autopsiefällen nach zerebraler Hypoxie sind die natürliche Neurogenese und Apoptose im Gyrus dentatus nicht signifikant verändert gegenüber Fällen ohne neuropathologische Auffälligkeiten."

 b. "In Autopsiefällen nach SAB sind die natürliche Neurogenese und Apoptose im Gyrus dentatus signifikant verändert gegenüber Fällen ohne neuropathologische Auffälligkeiten."

Zugehörige Nullhypothese: "In Autopsiefällen nach SAB sind die natürliche Neurogenese und Apoptose im Gyrus dentatus nicht signifikant verändert gegenüber Fällen ohne neuropathologische Auffälligkeiten."

2.2 Weiterführende Fragen

a. "Bleibt mit steigendem Patientenalter in Autopsiefällen nach hypoxischem Hirnschaden die adulte Neurogeneserate und Apoptose im Gyrus dentatus gleich?"

b. "Bleibt mit steigendem Alter bei Autopsiefällen ohne neuropathologische Auffälligkeiten die adulte Neurogeneserate und Apoptose im Gyrus dentatus gleich?"

c. "Wie ist der Verlauf der natürlichen Neurogenese im Gyrus dentatus nach Hypoxie gibt es einen Zusammenhang zwischen adulter Neurogenese bzw. Apoptose im Gyrus dentatus und dem Abstand vom hypoxischen Ereignis bis zum Tod?"

3. AUTOPSIEFÄLLE UND METHODEN

3.1 Autopsiefälle und Gruppendefinition

In dieser retrospektiven Studie wurde Hirngewebematerial von Autopsiefällen aus den Jahren 1996 bis 2004 der Abteilung Neuropathologie der Universität Göttingen untersucht. Zusätzlich standen uns die klinischen Akten und die neuroanatomisch-pathologischen Berichte zur Verfügung.

Wir stellten drei Hauptgruppen gegenüber:

• Für die Gruppe Hypoxie wählten wir Autopsiefälle mit klinisch dokumentiertem und neuropathologisch festgestelltem hypoxischem Hirnschaden aus, der mindestens 24 Stunden vor dem Tod stattgefunden hatte. Schlaganfallpatienten wurden nicht mit eingeschlossen.

• Für die Gruppe SAB suchten wir Autopsiefälle nach spontaner SAB.

• Die Kontrollgruppe stellte ein Vergleichskollektiv ohne neurologische Vorerkrankungen dar. Eine Reanimation durfte - im Gegensatz zur Hypoxiegruppe - nur bis zu 4 Stunden vor dem Tod stattgefunden haben. Das Gehirn musste allerdings neuropathologisch unauffällig sein, insbesondere sollte keinerlei Neuronenschaden festgestellt worden sein.

Ausschlusskriterien waren:

- schwere Sepsis,
- Tod in Folge einer anderen neurologischen Erkrankung,

 Tumorgeschehen, das vor dem Tod mit Chemo- oder Radiotherapie behandelt worden war, und

Autopsiefälle der Abteilung Rechtsmedizin.

Am 24.02.2000 befand die Ethik-Kommission der Universität Göttingen, dass es keine rechtlichen oder ethischen Bedenken gibt (lfd. Antragsnummer 11/9/99).

Die folgenden histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden zwischen Juli 2006 und September 2007 in den Laboren der Neurologie an der Universität Göttingen an formalinfixiertem, paraffinierten Gewebematerial der Hippokampi besagter Autopsiefälle durchgeführt.

3.2 Immunhistochemie

3.2.1 Allgemeines

Die Immunhistochemie ist ein ausgezeichnetes in-vitro-Verfahren zur Markierung von Zellen in Gewebeschnitten, das auf der Mannigfaltigkeit des Immunsystems und somit den Eigenschaften von Antikörpern beruht (sehr hohe Selektivität, Spezifität und Affinität) (Boenisch 2003a).

Gibt man einen bestimmten Antikörper auf einen Gewebeschnitt, und markiert diesen farblich bzw. fluoreszierend, lassen sich nun alle Zellen im Mikroskop darstellen, die das zugehörige Antigen (bzw. diesen "Marker") tragen (Boenisch 2003a).

Die farbliche oder fluoreszierende Markierung umfasst zur Signalverstärkung viele Schritte, in denen ein großer, nicht-kovalent gebundener Komplex aus Sekundärantikörpern und anderen Proteinen aufgebaut wird:

- 1) Vorbereitung der Präparate zur Immunhistochemie:
 - a. Erzeugung der Rohpräparate,
 - b. Demaskierung,
 - c. andere Vorbereitungsmethoden,
- 2) eigentliche Immunhistochemie mit dem Primärantikörper,
- 3) färberische Darstellung des Primärantikörpers (auch ,Methode'):
 - a. Sekundärantikörper, mit
 - b. einem gebundenen Enzym, und
 - c. dem Substrat des gebundenen Enzyms, welches zur farblichen Markierung des Komplexes führte (fluoreszierende Farbstoffe sind meist direkt an einen Sekundärantikörper gekoppelt),
- 4) Gegenfärbung und Eindecken.

3.2.2 Auswahl der Marker

Für unsere Arbeit wurden folgende Marker verwendet:

 der Proliferationsmarker *PCNA* (proliferating cell nuclear antigen) (Bravo et al. 1987, Kurki et al. 1988, Mathews et al. 1984),

der Marker unreifer Körnerzellen *Tuc-4* (TOAD-64/ Ulip/ CRMP-4) (Geschwind et al. 1996, Minturn et al. 1995, Quinn et al. 1999),

der Marker junger postmitotischer Neuronen *Calretinin* (Brandt et al. 2003, Schwaller et al. 1994),

und *In-situ-tailing*, eine Methode zur Markierung apoptotischer Zellen (Gavrieli et al. 1992, Gerber et al. 2001, Negoescu et al. 1996).

3.2.3 Methoden, Laborprotokolle und Kontrollen

Die Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode

Diese Methode wurde bei den Markern PCNA und Calretinin angewandt (Abbildung 2). Sie , beruht auf dem Enzym Peroxidase und war gut geeignet, da das untersuchte Gewebematerial selber nur eine geringe endogene Peroxidaseaktivität hatte.



Abbildung 2. Die ABC-Methode. An den Primärantikörper (rot) binden über einen biotinylierten Sekundärantikörper (blau) zahlreiche Avidin-Biotin-Komplexe mit Peroxidaseaktivität (hell- bzw. dunkelgrün). Die Peroxidase bewirkt den Farbumschlag von Diaminobezidin nach braun/ schwarz (Boenisch 2003b).

Zur Vorbereitung wurden die geschnittenen Präparate zuerst in der Mikrowelle hitzedemaskiert, und mit fetalem Kälberserum (,fetal calf serum', FCS) vorbehandelt, was durch Blockierung unspezifischer Bindungsstellen zur Reduktion der Hintergrundfärbung führte. Zusätzlich inkubierten wir die Präparate mit Wasserstoffperoxyd, um die restlichen endogenen Peroxidasen zu deaktivieren (Boenisch 2003b). Gegenfärbung erfolgte durch Blaufärbung der Zellkerne mit Hämalaun nach Mayer.

Die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Methode

Diese sehr sensitive Methode, die auf dem namensgebenden löslichen Enzymkomplex ,Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase' beruht, wurde bei der Färbung von Tuc-4 angewandt (Abbildung 3).



Abbildung 3. Die APAAP-Methode. Über zwei Sekundärantikörper (blau bzw. grün) werden an den Primärantikörper (rot) mehrere APAAP-Komplexe gebunden (braun), die das Enzym alkalische Phosphatase über den Fab-Teil des Antikörpers tragen. Einer der Sekundärantikörper wirkt als Brückenantikörper (blau). Um den Komplex richtig aufzubauen, muss der andere Sekundärantikörper (grün) von der selben Spezies stammen, wie auch der Primärantikörper, und jeder neu zugegebene Antikörper muss im Überschuss vorhanden sein. Durch die alkalische Phosphatase werden schließlich Phosphatgruppen von Naphthol-AS-Bi-Phosphat (gelb) auf Neofuchsin (gelb) übertragen, sodass es sich leuchtend rot färbt (Boenisch 2003b).

Zur Vorbereitung wurden die Schnitte ebenfalls hitzedemaskiert und mit FCS vorbehandelt. Endogen vorkommende alkalische Phosphatase wurde durch die Zugabe von Levamisol gehemmt. Gegenfärbung erfolgte auch hier durch die Blaufärbung der Zellkerne mit Hämalaun nach Mayer.

Gewebekontrollen

Gewebekontrollen wurden einerseits verwendet, um die optimale Methode zu finden, und dienten anderseits als laufende Qualitätskontrolle - vor allem in Hinsicht auf Hintergrundfärbung und Spezifität der Marker. Sie wurden genauso wie die anderen Präparate behandelt, was Fixierung, Einbettung, Immunhistochemie, Markierung, Aufbewahrung, etc. betraf.

Unter ,Positiv-Kontrollen' versteht man im Allgemeinen Gewebeschnitte, die auf jeden Fall positiv gefärbte Zellen mit dem Zielprotein enthalten. Wir verwendeten menschliches Tonsillengewebe für den Marker PCNA und embryonales Affenhirngewebe für Tuc-4 und Calretinin.

Der Begriff ,Negativ-Kontrollen' wird mitunter etwas widersprüchlich verwendet: Einerseits wird darunter Gewebe verstanden, das das Zielantigen auf keinen Fall enthält, und andererseits wird das zu untersuchende Gewebe selber verwendet, allerdings dann ohne mit dem Primärantikörper inkubieren. In beiden Fällen darf nur die Gegenfärbung zu sehen sein. Wir entschieden uns für die zweite Variante, da man mit dieser die Auswirkungen der Methode auf die Hintergrundfärbung getrennt vom Primärantikörper beobachten kann.



Abbildung 4. Teile der Ausstattung eines immunhistochemischen Labors: Mikrotom (A), Mikroskop mit digitaler Kameratechnik (B), feuchte Kammer (C, D).

Färbeprotokoll der PCNA Färbung

Methode:	ABC,
Antikörper:	monoclonal mouse anti-PCNA antibody (1:200),
	biotinylated sheep anti-mouse antibody (1:200),
Arbeitspuffer:	phosphate buffered saline (PBS),

Umgebung: Raumtemperatur, Raumluft, Inkubation in der feuchten Kammer.

Arbeitsschritt (vgl. Seite 20)	Arbeitsanweisung
1a.)	 Schneiden mit Mikrotom in 2 µm dicke Schnitte, fixieren auf einen Objektträger im Warmwasserbad, trocknen für 3 Tage im Heizlüfter, Deparaffinisierung in Xylol (100%) 3 mal 10 min, dann in absteigender Alkoholreihe (je 5 min in 100%, 100%, 90%, 70%, 50% Isopropylalkohol) (Schaukel), spülen in demineralisiertem H₂O (Schaukel),
1b.)	• Demaskierung in der Mikrowelle für 15 min (bei 800 Watt in Zitratpuffer pH=6), anschließend abkühlen (Plastikküvette),
1c.)	 10 min 3% H₂O₂ (Wasserstoffperoxyd) (Küvette), 30 min 10% FCS (feuchte Kammer),
2)	 120 min Primärantikörper monoclonal mouse anti-PCNA antibody 1:200 (feuchte Kammer), Waschschritt, PBS (Küvette).
3a.)	 60 min biotinylated sheep anti-mouse antibody, 1:200 (feuchte Kammer), Waschschritt, PBS (Küvette),
3b.)	 60 min Avidin-Biotin-Komplex, 1:100 (feuchte Kammer). Waschschritt, PBS (Küvette),
3c.)	 DAB (Diaminobenzidin) (10% in DAB-substrate-peroxid-puffer): Inkubationszeit je nach Färbegrad unter dem Mikroskop; ca. 20 min (feuchte Kammer), 10 min spülen in demineralisiertem H₂O (Küvette),
4)	 3 min Hämalaun (Schaukel), spülen in demineralisiertem H₂O dann in HCl/ Alkohol (Schaukel), 10 min wässern unter fließendem Leitungswasser (Schaukel), eindecken mit Immu-Mont und Deckgläschen.

Tabelle 1. Färbeprotokoll PCNA.

Färbeprotokoll der Tuc-4 Färbung

Methode:	APAAP,					
Antikörper:	polyclonal rabbit anti-Tuc-4 antibody (1:200),					
	monoclonal mouse anti-rabbit antibody (1:50),					
	rabbit anti-mouse antibody (1:50),					
	APAAP-complex (1:50),					
Arbeitspuffer:	tris buffered saline (TBS),					
Umgebung:	Raumtemperatur, Raumluft, Inkubation in der feuchten Kammer,					
	Primärantikörper über Nacht bei 4°C im Kühlschrank.					

Arbeitsschritt Arbeitsanweisung (vgl. Seite 20) Schneiden mit Mikrotom in 2 µm dicke Schnitte, fixieren auf einem 1a.) Objektträger im Warmwasserbad, trocknen für 3 Tage im Heizlüfter, Deparaffinisierung in Xylol (100%) 3 mal 10 min, dann in absteigender Alkoholreihe (je 5 min in 100%, 100%, 90%, 70%, 50% Isopropylalkohol) (Schaukel), spülen in demineralisiertem H₂O (Schaukel), Demaskierung in der Mikrowelle für 15 min (bei 800 Watt in Zitratpuffer 1b.) pH=6), anschließend abkühlen (Plastikküvette). 30 min 10% FCS (feuchte Kammer), 1c.) • über Nacht bei 4°C im Kühlschrank: Primärantikörper polyclonal rabbit 2) anti-Tuc-4 antibody 1:1000 (feuchte Kammer), Waschschritt, TBS (Küvette), • 60 min monoclonal mouse anti-rabbit antibody 1:50 (feuchte Kammer), 3a.) Waschschritt, TBS (Küvette), • 60 min rabbit anti-mouse antibody 1:50 (feuchte Kammer), Waschschritt, TBS (Küvette), • 60 min APAAP-complex 1:50 (feuchte Kammer), **3b.)** Waschschritt, TBS (Küvette), • ca. 22 min Neofuchsin-Lösung (Küvette) je nach mikroskopischer 3c.) Beurteilung, 10 min spülen demineralisiertem H₂O (Küvette), • 5 sek Hämalaun (Schaukel), 4) spülen in demineralisiertem H₂O (Schaukel), 10 min wässern unter fließendem Leitungswasser (Schaukel), • eindecken mit Immu-Mont und Deckgläschen.

Tabelle 2. Färbeprotokoll Tuc-4.

Färbeprotokoll der Calretinin Färbung

Methode:	ABC,										
Antikörper:	polyclonal rabbit anti-calretinin antibody (1:1000),										
	biotinylated donkey anti-rabbit antibody (1:200),										
Arbeitspuffer	PBS,										
Umgebung:	Raumtemperatur,	Raumluft,	Inkubation	in	der	feuchten	Kammer;				

Primärantikörper über Nacht bei 4°C im Kühlschrank.

Arbeitsschritt (vgl. Seite 20)	Arbeitsanweisung
1a.)	 Schneiden mit Mikrotom in 2 µm dicke Schnitte, fixieren auf einem Objektträger im Warmwasserbad, trocknen für 3 Tage im Heizlüfter, Deparaffinisierung in Xylol (100%) 3 mal 10 min, dann in absteigender Alkoholreihe (je 5 min in 100%, 100%, 90%, 70%, 50% Isopropylalkohol) (Schaukel), spülen in demineralisiertem H₂O (Schaukel),
1b.)	 Demaskierung in der Mikrowelle f ür 15 min (bei 800 Watt in Zitratpuffer pH=6), anschlie ßend abk ühlen (Plastikk üvette),
1c.)	 10 min 3% H₂O₂ (Küvette), 30 min 10% FCS (feuchte Kammer),
2)	 über Nacht bei 4°C im Kühlschrank: Primärantikörper polyclonal rabbit anti-calretinin antibody 1:2000 (feuchte Kammer), Waschschritt, PBS (Küvette),
3 a.)	 60 min biotinylated donkey anti-rabbit antibody 1:200, (feuchte Kammer), Waschschritt, PBS (Küvette),
3b.)	 60 min Avidin-Biotin-Komplex, 1:100 (feuchte Kammer), Waschschritt, PBS (Küvette),
3c.)	 ca. 3 min DAB, 10% in DAB-substrate-peroxid-puffer. Inkubationszeit je nach Färbungsgrad unter dem Mikroskop (feuchte Kammer), 10 min spülen in demineralisiertem H₂O (Küvette),
4)	 3 min Hämalaun (Schaukel), Spülen in demineralisiertem H₂O dann in HCl/ Alkohol (Schaukel), 10 min wässern unter fließendem Leitungswasser (Schaukel), eindecken mit Immu-Mont und Deckgläschen.

 Tabelle 3. Färbeprotokoll Calretinin.

3.3 In-situ-tailing

Beim apoptotischen Zelluntergang wird die DNS des Zellkerns in Fragmente von ca. 180 Basenpaaren gespalten (Elmore 2007), die durch In-situ-tailing immunhistochemisch nachgewiesen werden können (Abbildung 5). Mikroskopisch durften allerdings nur jene markierten Zellen als apoptotisch gezählt werden, die zusätzlich die typischen morphologischen Kriterien einer apoptotischen Zelle aufwiesen (siehe Seite 29) (Gerber et al. 2001, Negoescu et al. 1996).



Abbildung 5. In-situ-tailing. Mit dem 3'-Hydroxyethyl-Ende des DNS-Fragments (schwarz) reagiert die terminale desoxynukleotidyl-Transferase (TdT), an die Digoxigenin gekoppelt ist (rot). Daran bilden die Anti-Digoxigenin-Fab-Framente, die eine alkalische Phosphatase tragen (ocker). Die alkalische Phosphatase dephosphoryliert ihr Substrat BCIP (5-Bromo-4-Chlorid-3-Indolylphosphat) (hellgrün), sodass dieses mit NBT (4-Nitroblue-Tetrazoliumchlorid) (dunkelgrün) in einer Redoxreaktion zu zwei intensiv dunkelblau/ schwarzen Farbstoffen reagiert.

Technik

Antikörper: sheep anti-digoxigenin antibody (FAB fragments, 1:250),
Tailingmixtur: 10 μg Tailing-Puffer, 1 μl Digoxigenin DNA labeling mix, 2 μl Kobaltchlorid, 0.5 μl TdT ad 50 μl doppelt destilliertes Wasser (H₂O bidest.),
Arbeitspuffer: TBS,
Umgebung: Raumtemperatur, Raumluft, Inkubation in der feuchten Kammer, Proteinase K und Tailingmixtur bei 37°C im Heizlüfter,
Gewebekontrollen: Embyonales Affenhirngewebe als Postiv-Kontrolle, Gewebeschnitte von Autopsiefällen als Negativ-Kontrolle (ohne Tailingmixtur behandelt).

Arbeitsschritt (siehe Seite 20)	Arbeitsanweisung
1a.)	 Schneiden mit Mikrotom in 2 µm dicke Schnitte, fixieren auf einem Objektträger im Warmwasserbad, trocknen für 3 Tage im Heizlüfter, Deparaffinisierung in Xylol (100%) 3 mal 10 min, dann in absteigender Alkoholreihe (je 5 min in 100%, 100%, 90%, 70%, 50% Isopropylalkohol) (Schaukel), spülen in demineralisiertem H₂O (Schaukel),
1b.)	 15 min Andauen mit Proteinase K, 100 µg/ml bei 37°C (feuchte Kammer im Heizlüfter), Waschschritt, eiskaltes TBS (Küvette),
1c.)	 60 min Tailingmixtur bei 37°C (feuchte Kammer im Heizlüfter) Waschschritt, TBS (Küvette), 20 min 10% FCS (feuchte Kammer).
2)	 120 min Primärantikörper sheep anti-digoxigenin antibody (FAB fragments) 1:250 (feuchte Kammer), Waschschritt, TBS (Küvette).
3c.)	 ca. 20 min NBT/ BCIP - je nach Färbeintensität (Kontolle unter dem Mikroskop), 10 min spülen in demineralisiertem H₂O (Küvette).
4)	 10 min Kernechtrot (Schaukel), spülen in demineralisiertem H₂O (Schaukel), wässern, 10 min unter fließendem Leitungswasser (Schaukel), eindecken mit Immu-Mont und Deckgläschen.

Tabelle 4. Färbeprotokoll In-situ-Tailing.

3.4 Beurteilung am Mikroskop

Die Präparate wurden unter einem Lichtmikroskop mit digitaler Kameratechnik untersucht und von einem bezüglich der Gruppenzugehörigkeit verblindeten Untersucher beurteilt.

Der erste Blick galt als laufende Qualitätskontrolle den Gewebekontrollen (in den Positiv-Kontrollen sollten einige immunhistochemisch gefärbte Zellen zu erkennen sein, in der Negativ-Kontrolle nur die Gegenfärbung), dann wurde jedes Präparat auf Vollständigkeit, Gegenfärbung und pauschales Vorhandensein immunhistochemisch gefärbter Zellen durchgemustert. Anschließend wurde der Gyrus dentatus anhand seiner charakteristischen Struktur aufgesucht, und dessen Fläche planimetrisch bei 1 zu 10 Vergrößerung vermessen (Stratum granulosum und Grenze zum Stratum subgranulosum). Die immunhistochemisch gefärbten Zellen im Gyrus dentatus wurden darauf manuell bei einer 60x Vergrößerung nach folgenden Kriterien gezählt:

- Zellform nicht hinweisend auf eine andere Struktur (z.B. Monozyten, Gefäßendothel),
- PCNA: schwarz-brauner Zellkern,
- Calretinin: schwarz-brauner Zellkern,
- Tuc-4: rotes Zytoplasma, Zellkern nicht immunhistochemisch angefärbt,
- Apoptotische Körnerzellen: intensiv dunkelblau/ schwarzer, runder, zusammengeballter, im Vergleich zu den anderen Körnerzellen kleiner Zellkern mit einem schmalen Zytoplasmasaum (typische Morphologie eines apoptotischen Neurons nach Gerber et al. [2001] und Negoescu et al. [1996]).

3.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Färbungen wurden auf die Fläche des Gyrus dentatus des jeweiligen Schnittes bezogen. Exemplarisch für die PCNA-Färbung:

- - = Dichte PCNA-gefärbter Zellen [/mm²]

Aus dem retrospektiven Aufbau der Studie und den kleinen Gruppengrößen war abzuleiten, dass es sich um keine echte Zufallsstichprobe handelte; Eine Normalverteilung der Ergebnisse war also nicht zu erwarten. Die Gruppen wurden allerdings als unabhängig voneinander betrachtet. Die Quotienten bzw. Zelldichten waren auf metrischem, die Gruppenzugehörigkeit auf nominalem Skalenniveau.

Validierung der zentralen Hypothesen

Die zentralen Hypothesen zielten auf einen Vergleich der Hypoxie- bzw. SAB- mit der Kontrollgruppe ab. Statistische Unterschiede wurden mit dem U-Test nach Mann-Whitney im unabhängigen, ,two-tailed'-Modus errechnet (Bortz 2005, S. 150-153). Alle Voraussetzungen für diesen waren, wie aufgeführt, erfüllt. Dabei berücksichtigten wir das allgemein anerkannte Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$, und gingen bei p-Werten unter diesem von statistischer Signifikanz aus (Bortz 2005, S. 113-116).

Bestand ein signifikanter Unterschied, wurde der Quotient der Mediane berechnet. Exemplarisch für die PCNA Färbung der Hypoxiegruppe:

 Median der Dichte PCNA-gefärbter Zellen [/mm²] in der Hypoxiegruppe / Median der Dichte PCNA-gefärbter Zellen [/mm²] in der Kontrollgruppe
 = Quotient der Mediane Zur graphischen Darstellung wurde schließlich der Boxplot verwendet. Die Markierungen entsprachen von oben nach unten dem Maximum, 75%-Quantil, Median, 25%-Quantil und dem Minimum.

Argumentation bezüglich der weiterführenden Fragen

Die weiterführenden Fragen beleuchteten die Hypoxie- bzw. Kontrollgruppe genauer.

Dazu wurde für die weiterführenden Fragen a. und b. die Dichte markierter Zellen mit dem Alter der Patienten, bzw. für die weiterführende Frage c. mit dem Abstand vom hypoxischen Ereignis bis zum Tod verglichen. Wir verwendeten zunächst Spearmans Rangkorrelation, da alle Parameter auf metrischem Skalenniveau waren (Bortz 2005, S. 232-235).

Zusätzlich wurden anhand der Alters- bzw. Abstandsverteilung Untergruppen gebildet; Trennung erfolgte am 33%- und 66%-Quantil. Diese wurden mit dem U-Test nach Mann-Whitney im unabhängigen, ,two-tailed'-Modus miteinander verglichen; alle Voraussetzungen des Tests waren auch hier erfüllt (Bortz 2005, S. 150-153).

Von Signifikanz wurde ebenfalls bei p-Werten unter $\alpha = 0,05$ ausgegangen. Zur graphischen Darstellung verwendeten wir hier wegen der sehr kleinen Gruppengrößen Scatterplots, zeichneten den Median aber zusätzlich ein.

Mehrfachanalyse in der Hypoxiegruppe - ein Problem?

Wir untersuchten also für die weiterführenden Fragen a. und c. die Ergebnisse innerhalb der Hypoxiegruppe hinsichtlich zweier verschiedener Variablen, dem Alter der Patienten und dem Abstand Hypoxie - Tod.

Um zu beurteilen, ob ein Zusammenhang einer der Variablen mit den immunhistochemischen Ergebnissen nicht nur zufällig entstanden war, rechneten wir in die nach obigem Vorgehen signifikanten Korrelationen die jeweils andere Variable als interferierende Kontrollvariable mit ein (Bortz 2005, S. 361-373).

Zusätzlich wollten wir mittels Spearmans Rangkorrelation herausfinden, ob nicht das Alter der Patienten direkt mit dem Abstand Hypoxie - Tod korrelierte.

4. ERGEBNISSE

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dargestellt. Es werden zunächst die einzelnen Gruppen beschrieben, worauf technische Details der Immunhistochemie (Auswertbarkeit, Morphologie) mit den Rohdaten aus den Färbungen folgen. Aus den Rohdaten werden im Anschluss die einzelnen Themen der Fragestellung graphisch und statistisch aufgearbeitet. Mikroskopische Bilder der Färbungen und Einzelheiten zu den einzelnen Autopsiefällen sind zur besseren Übersicht erst am Schluss des Ergebnisteils beigefügt.

4.1 Autopsiefälle und Gruppen

Wir verglichen Autopsiefälle mit hypoxischem Hirnschaden bzw. SAB mit einer Kontrollgruppe, die aus Autopsiefällen ohne neurologische Vorerkrankungen und mit neuropathologisch unauffälligem Befund bestand (Tabelle 5). Die einzelnen Autopsiefälle sind auf den Seiten 48 bis 54 genauer beschrieben (Tabellen 19 - 21).

Gruppe	Hypoxie	SAB	Kontrollen	Gesamte Studie
Fallanzahl	22	11	19	52
Alter ¹⁾	63 (35 - 85)	44 (19 - 92)	59 (35 - 81)	58 (19 - 92)
Geschlecht m / w ²⁾	13/9	3 / 8	12 / 7	28 / 24
Autopsiefälle	Hy1 - 22	SAB1 - 11	Ko1 - 19	Hy1 - 22, SAB1 -
-	-			11. Kol - 19

Tabelle 5. Informationen über die Zusammensatzung der Gruppen. ¹⁾ Das Alter der Patienten der Gruppen ist in Jahren durch den Median der Altersverteilung (Alter des Jüngster - Alter des Ältesten) angegeben. ²⁾(m) männlich, (w) weiblich

4.2 Auswertbarkeit, Morphologie und Rohdaten

4.2.1 PCNA

• Auswertbarkeit: sehr gut (keine Hintergrundfärbung, sehr gute Abgrenzbarkeit der immunhistochemisch gefärbten Zellen).

In der Negativ-Kontrolle war nur die Gegenfärbung zu sehen; die Positiv-Kontrolle (Humantonsille) zeigte wie erwartet zahlreiche Lymphfollikel mit sehr vielen immunhistochemisch braun/ schwarz gefärbten Lymphozyten (Abbildung 11 I-L, Seite 44).

• Morphologie der Zellen: 7-10 μm große, schwarze bis braune, somit positiv markierte Zellkerne über das Stratum granulosum verteilt (Abbildung 11 A-H, Seite 44). Ein Teil der Zellen, bei dem auch das Zytoplasma markiert war, hatte eine recht polymorphe Struktur.

lfnd. Nr.	Anzahl	Fläche [mm2] ¹⁾	Dichte [/mm2]	lfnd. Nr.	Anzahl	Fläche [mm2] ¹⁾	Dichte [/mm2]	lfnd. Nr.	Anzahl	Fläche [mm2] ¹⁾	Dichte [/mm2]
Hy1	25	0,47	53,2	SAB1	3	0,60	5,0	Ko1	14	0,93	15,1
Hy2	52	1,31	39,8	SAB2	3	0,37	8,1	Ko2	21	1,02	20,7
Hy3	0	0,43	0	SAB3	0	0,65	0	Ko3	4	0,36	11,2
Hy4	5	0,41	12,3	SAB4	3	0,64	4,7	Ko4	0	0,54	0
Hy5	17	0,35	48,8	SAB5	6	0,21	28,6	Ko5	0	0,97	0
Hy6	3	0,40	7,5	SAB6	0	0,41	0	Ko6	0	1,12	0
Hy7	5	0,26	19,3	SAB7	2	0,48	4,2	Ko7	0	0,14	0
Hy8	6	0,52	11,5	SAB8	1	0,50	2,0	Ko8	2	1,87	1,1
Hy9	1	1,06	0,9	SAB9	7	0,75	9,3	Ko9	0	0,35	0
Hy10	1	0,79	1,3	SAB10	3	1,08	2,8	Ko10	1	0,90	1,1
Hy11	3	0,30	10,2	SAB11	3	1,43	2,1	Ko11	22	1,00	21,9
Hy12	0	0,36	0					Ko12	11	0,46	24
Hy13	3	0,26	11,6					K013	9	0,26	34,6
Hy14	101	0,89	113,5					K014	2	1,21	1,6
Hy15	9	0,26	34,6					Ko15	5	1,54	3,2
Hy16	20	0,32	61,7					Ko16	7	0,61	11,5
Hy17	0	0,36	0					Ko17	2	0,25	8,0
Hy18	0	0,23	0					Ko18	14	0,93	15,0
Hy19	10	0,25	39,5					Ko19	0	1,09	0
Hy20	5	0,41	12,1								
Hy21	24	0,45	53,4								
Hv22	7	1,32	5,3								

Tabelle 6. Rohdaten aus der PCNA Färbung. ¹⁾ Planimetrische Fläche des Gyrus dentatus im entsprechenden Schnitt.

4.2.2 Tuc-4

• Auswertbarkeit: gut (trotz leichter Hintergrundfärbung waren positive Zellen gut zu erkennen).

Die Negativ-Kontrolle zeigte nur Gegenfärbung und in den Positiv-Kontrollen (Affenhirngewebe) waren im Gyrus dentatus einige Zellen deutlich leuchtend rot markiert (Abbildung 12 I-L, Seite 44).

Morphologie der Zellen: Die immunhistochemisch lila/ rot gefärbten Zellen erschienen oval bis polymorph/ filiform, ca. 20-25 μm im Durchmesser (Abbildung 12 A-H, Seite 44). Der Zellkern war nicht immunhistochemisch markiert, sondern Hämalaun-blau, ca. 7-10 μm groß. Bei manchen Zellen waren lange Fortsätze in Richtung des Stratum moleculare zu erkennen. Die Zellen waren größtenteils am inneren Rand des Stratum granulosum, zum Stratum subgranulosum hin orientiert. Es fand sich kein Morphologieunterschied zwischen den Gruppen.

lfnd. Nr.	Anzahl	Fläche [mm2] ¹⁾	Dichte [/mm2]	lfnd. Nr.	Anzahl	Fläche [mm2] ¹⁾	Dichte [/mm2]	lfnd. Nr.	Anzahl	Fläche [mm2] ¹⁾	Dichte [/mm2]
Hy1	26	0,42	61,9	SAB1	26	0,47	55,3	Ko1	20	1,05	19,0
Hy2	24	0,58	41,4	SAB2	34	0,23	147,8	Ko2	14	1,64	8,5
Hy3	42	0,43	97,7	SAB3	28	0,62	45,2	Ko3	24	0,57	42,1
Hy4	46	0,27	168,5	SAB4	40	0,50	80,0	Ko4	17	0,64	26,6
Hy5	169	1,15	146,4	SAB5	34	0,28	121,4	Ko5	9	0,83	10,8
Hy6	32	0,55	58,2	SAB6	50	0,38	130,5	Ko6	19	0,63	30,2
Hy7	63	0,30	210,0	SAB7	32	0,48	66,7	Ko7	35	0,33	106,1
Hy8	77	0,51	151,0	SAB8	23	0,60	38,3	Ko8	8	1,17	6,8
Hy9	51	0,45	113,3	SAB9	14	1,02	13,7	Ko9	6	0,88	6,8
Hy10	32	0,52	61,8	SAB10	82	1,17	70,1	Ko10	27	0,82	32,9
Hy11	46	0,36	127,8	SAB11	52	0,63	82,5	K011	14	0,96	14,6
Hy12	14	0,12	116,7					Ko12	11	0,67	16,5
Hy13	12	0,44	27,3					Ko13	29	0,58	50,0
Hy14	17	0,91	18,6					K014	44	1,54	28,6
Hy15	7	0,26	26,9					Ko15	78	1,27	61,4
Hy16	6	0,13	46,2					K016	12	0,69	17,4
Hy17	15	0,34	44,1					Ko17	9	0,99	9,1
Hy18	16	0,47	34,0					Ko18	22	0,71	31,0
Hy19	45	0,41	109,8					Ko19	20	1,05	19,0
Hy20	29	0,39	74,4								
Hy21	32	0,67	47,8								
Hy22	15	0,88	17,0								

Tabelle 7. Rohdaten aus der Tuc-4 Färbung.¹⁾ Fläche des Gyrus dentatus.

4.2.3 Calretinin

• Auswertbarkeit: sehr gut (keine Hintergrundfärbung, sehr gute Abgrenzbarkeit der immunhistochemisch gefärbten Zellen).

Die Gewebekontrollen waren optimal: in der Negativ-Kontrolle war nur die Gegenfärbung zu sehen; in den Affenhirngewebeschnitten, die als Positiv-Kontrollen mitgefärbt worden sind, waren deutlich zahlreiche immunhistochemisch braun gefärbte Zellen auszumachen (Abbildung 13 I-L, Seite 45).

Morphologie der Zellen: Da oft die gesamten Zellen schwarz bis braun immunhistochemisch gefärbt waren, konnte man die Zellkerne nicht mehr vom Zytoplasma differenzieren. Die Zellen waren rund/ oval, 20-25 µm groß und mit zahlreichen, zum Gyrus dentatus rechtwinkligen Ausläufern in Richtung des Stratum moleculare und subgranulosum versehen, die teilweise über bis zu 200 µm zu verfolgen waren (Abbildung 13 A-H, Seite 45). Unzählige, immunhistochemisch gefärbte Strukturen ohne erkennbaren Ursprung fanden sich netz- und faserartig zwischen dem Stratum moleculare und dem Stratum granulosum. Es fand sich kein Morphologieunterschied zwischen den Gruppen.

ffnd. Nr.	Anzahl	Fläche [mm2] ¹⁾	Dichte [/mm2]	lfnd. Nr.	Anzahl	Fläche [mm2] ¹⁾	Dichte [/mm2]	lfnd. Nr.	Anzahl	Fläche [mm2] ¹⁾	Dichte [/mm2]
U _v 1	28	0.60	16.6	SAD1	10	033	57.6	Ko1	15	0.52	28.8
$\Pi y I$ $\Pi y 2$	10	0,00	26.8	SADI SADI	12	0,33	26.5	Kul Kul	20	1.22	20,0
11y2	19	0,71	20,8	SAD2	25	0,49	42.0	K02 Ko2	29	1,33	10.9
ПуЗ	15	0,57	26.6	SADJ SADJ	23	0,38	45,9	KOJ Kođ	9	0,85	10,0
Hy4	15	0,41	30,0	SAB4	10	0,47	21,3	K04	10	0,30	13,9
Нур	39	0,43	90,7	SABS	6	0,17	35,5	K05	18	0,00	27,3
Hy6	22	0,41	55,7	SAB6	5	0,31	16,1	K06	15	0,84	17,9
Hy/	9	0,65	13,8	SAB/	8	0,39	20,5	K07	0	0,05	0
Hy8	21	0,56	37,5	SAB8	6	0,36	16,7	K08	5	1,01	5,0
Hy9	23	0,75	30,7	SAB9	36	1,02	35,3	Ko9	7	1,09	6,4
Hy10	14	1,06	13,2	SAB10	41	0,78	52,6	Ko10	14	1,25	11,2
Hy11	20	0,45	44,4	SAB11	6	0,15	40,0	Ko11	23	0,67	34,3
Hy12	8	0,18	44,4					Ko12	27	1,06	25,5
Hy13	19	0,38	50,0					Ko13	13	0,58	22,4
Hy14	19	0,73	26,0					Ko14	11	1,51	7,3
Hy15	10	0,28	35,7					Ko15	8	1,15	7,0
Hy16	4	0,14	28,6					Ko16	16	0,79	20,3
Hy17	11	0,33	33,3					Ko17	4	0,7	5,7
Hv18	11	0,66	16.7					Ko18	10	0,50	20
Hv19	16	0.58	27.6					Ko19	15	0.52	28.8
Hv20	14	0.38	36.8							- 9-	-) -
Hv21	13	0.36	36.1								
Hy22	7	0,88	8,0								

Tabelle 8. Rohdaten aus der Calretinin Färbung. ¹⁾ Fläche des Gyrus dentatus.

4.2.4 Apoptotische Körnerzellen

• Auswertbarkeit: sehr gut (es gab kaum Hintergrundfärbung und die einzelnen markierten Zellen waren sehr gut abzugrenzen).

In der Negativ-Kontrolle war auch hier nur die Gegenfärbung erkennbar, in den Positiv-Kontrollen (Affenhirngewebe) waren stets auch einige Zellen im Gyrus dentatus schwarz angefärbt (Abbildung 14 I-L, Seite 46).

 Morphologie der Zellen: Der eine Teil der Zellen hatte einen stark angefärbten, kleinen, zusammengeballten Zellkern (ca. 2-3 μm) und lag direkt am Rand des Stratum granulosum. Das Zytoplasma war als kleiner Randsaum gut erkennbar (Abbildung 14 A-H, Seite 46). Der andere Teil angefärbter Strukturen hatte bizarre, größere oder aufgetriebene Formen. Nur die Zellen des erstgenannten Teils wurden als apoptotische Körnerzellen gezählt (vgl. Seite 29).

÷

.

lfnd. Nr.	Anzahl	Fläche [mm2] ¹⁾	Dichte [/mm2]	lfnd. Nr.	Anzahl	Fläche [mm2] ¹⁾	Dichte [/mm2]	lfnd. Nr.	Anzahl	Fläche [mm2] ¹⁾	Dichte [/mm2]
Hy1	5	0,54	9,3	SAB1	0	1,4	0	Ko1	0	0,74	0
Hy2	5	0,4	12,5	SAB2	0	0,22	0	Ko2	0	0,73	0
Hy3	4	0,84	4,8	SAB3	5	0,74	6,8	Ko3	2	0,47	4,3
Hy4	5	0,43	11,6	SAB4	0	0,64	0	Ko4	0	0,93	0
Hy5	16	0,62	25,8	SAB5	2	0,34	5,9	Ko5	0	0,82	0
Hy6	1	0,62	1,6	SAB6	0	0,82	0	Ko6	1	0,75	1,3
Hy7	11	0,28	39,3	SAB7	6	0,74	8,1	Ko7	0	0,12	0
Hy8	4	0,62	6,5	SAB8	0	1,12	0	Ko8	0	0,95	0
Hy9	1	1,13	0,9	SAB9	13	2,4	5,4	Ko9	5	0,36	13,9
Hy10	6	0,42	14,3	SAB10	0	0,14	0	Ko10	2	0,45	4,4
Hy11	0	0,67	0	SAB11	3	0,19	15,8	K011	0	0,72	0
Hy12	0	0,15	0					Ko12	0	0,2	0
Hy13	6	0,53	11,3					Ko13	0	0,64	0
Hy14	1	0,76	1,3					Ko14	2	0,89	2,2
Hy15	11	0,6	18,3					Ko15	3	0,54	5,6
Hy16	0	0,63	0					Ko16	0	0,47	0
Hy17	0	1,72	0					Ko17	0	1,05	0
Hy18	2	0,32	6,3					Ko18	13	0,42	31
Hy19	0	0,92	0					Ko19	0	0,74	0
Hy20	3	0,71	4,2								
Hy21	1	0,53	1,9								
Hy22	5	0,43	11,6								

Tabelle 9. Rohdaten aus den Auszählungen apoptotischer Körnerzellen. ¹⁾ Fläche des Gyrus dentatus.

4.3 Zentrale Hypothesen

4.3.1 Neurogenese und Apoptose nach zentraler Hypoxie

Zur Überprüfung der ersten zentralen Hypothese "In Autopsiefällen nach zerebraler Hypoxie sind die natürliche Neurogenese und Apoptose im Gyrus dentatus signifikant verändert gegenüber Fällen ohne neuropathologische Auffälligkeiten" stellten wir die Hypoxie- der Krontrollgruppe gegenüber.



Abbildung 6. Graphischer Vergleich der Hypoxie- mit der Kontrollgruppe in den immunhistochemischen Färbungen PCNA, Tuc-4 und Calretinin, sowie in der Dichte apoptotischer Körnerzellen, gemessen durch Insitu-tailing und morphologische Kriterien. Dargestellt sind Boxplots der Dichte markierter Zellen im Gyrus dentatus /mm² (Markierungen am Maximum, 75%-Quantil, Median, 25%-Quantil und am Minimum).

Färbung	Hypoxiegruppe [/mm ²] ¹⁾	Kontrollgruppe [/mm ²] ¹⁾	p-Wert (U-Test)	p<α=0,05, Signifikanz	Quotient der Mediane
PCNA	11,9 (2,3 - 39,8)	3,2 (0,0 - 15,0)	0,086	Nein	3,66
Tuc-4	61,8 (42,1 - 115,8)	26,6 (12,7 - 35,5)	0,0002	Ja	2,33
Calretinin	35,9 (27,0 - 44,4)	17,9 (7,1 - 22,1)	0,0001	Ja	1,95
$AKZ^{(2)}$	5,5 (1,0 - 11,6)	0,0 (0,0 - 3,3)	0,014	Ja	3)

Tabelle 10. Statistischer Vergleich der Hypoxie- mit der Kontrollgruppe mit dem U-Test nach Mann-Whitney. ¹⁾ Gefärbte Zellen /mm² im Gyrus dentatus, angegeben sind Median (25%-Quantil - 75%-Quantil) (entsprechend dem ,Kasten'des Boxplots), ²⁾ apoptotische Körnerzellen; ³⁾ wegen des mathematischen Verbotes der Teilung durch 0 kann kein Quotient angegeben werden.

Wir beobachteten einen 2,33-fachen Anstieg Tuc-4-exprimierender unreifer Körnerzellen und einen 1,95-fachen Anstieg junger Calretinin-exprimierender Neuronen im Vergleich zur
Kontrolle innerhalb des Beobachtungsintervalls (bis zu 59 Tage); Vergleichbar stieg die Dichte apoptotischer Körnerzellen (AKZ) (Abbildung 6, Tabelle 10).

4.3.2 Neurogenese und Apoptose nach SAB

Zur Validierung der zweiten zentralen Hypothese "In Autopsiefällen nach SAB ist die natürliche Neurogenese und Apoptose im Gyrus dentatus signifikant verändert gegenüber Fällen ohne neuropathologische Auffälligkeiten" verglichen wir die SAB-Gruppe mit der Kontrollgruppe.



Abbildung 7. Graphischer Vergleich der SAB- mit der Kontrollgruppe in den immunhistochemischen Färbungen gegen PCNA, Tuc-4 und Calretinin, sowie in den Auszählungen apoptotischer Körnerzellen. Die Anzahl der markierten Zellen im Gyrus dentatus /mm² sind dargestellt als Boxplots.

	SAB-Gruppe [/mm ²] ¹⁾	Kontrollgruppe [/mm ²] ¹⁾	p-Wert (U-Test)	p<α=0,05, Signifikanz	Quotient der Mediane
PCNA	4,2 (2,0 - 6,6)	3,2 (0,0 - 15,0)	0,966	Nein	1,31
Tuc-4	70,1 (50,2 - 102,0)	26,6 (12,7 - 35,5)	0,001	Ja	2,64
Calretinin	35,3 (20,9 - 41,9)	17,9 (7,1 - 22,1)	0,036	Ja	1,97
AKZ	0,0 (0,0 - 6,3)	0,0 (0,0 - 3,3)	0,482	Nein	2)

Tabelle 11. Statistischer Vergleich der SAB- und Kontrollgruppe. ¹⁾ Gefärbte Zellen /mm² im Gyrus dentatus, angegeben sind Median (25%-Quantil - 75%-Quantil); ²⁾ wegen des mathematischen Verbotes der Teilung durch 0 kann kein Quotient angegeben werden.

Nach SAB fanden wir eine Steigerung Tuc-4-exprimierender unreifer Körnerzellen um den Faktor 2,64 und eine Steigerung junger Calretinin-exprimierender Neuronen um den Faktor 1,97 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Dichte von apoptotischen Zellen unterschied sich im Gegensatz dazu nicht von der Kontrollgruppe (Abbildung 7, Tabelle 11).

4.4 Weiterführende Fragen

4.4.1 Neurogenese und Apoptose nach Hypoxie - Altersvergleich

Für die weiterführende Frage a. "Bleibt mit steigendem Patientenalter in Autopsiefällen nach hypoxischem Hirnschaden die adulte Neurogeneserate und Apoptose im Gyrus dentatus gleich?" untersuchten wir die Hypoxiegruppe genauer. Dazu verwendeten wir Spearmans Rangkorrelation, um die Ergebnisse der Immunhistochemie mit dem Alter der Patienten zu vergleichen. Zusätzlich teilten wir die Hypoxiegruppe anhand des Alters der Patienten in drei Untergruppen, und verglichen diese miteinander. Trennpunkte waren am 33%-Quantil bei 55 Jahren und am 66%-Quantil bei 74 Jahren (Tabelle 12).

	Junges Drittel, Hypoxie	Mittleres Drittel, Hypoxie	Altes Drittel, Hypoxie	Gesamte Hypoxiegruppe
Fallanzahl	7	8	7	22
Alter ¹⁾	42 (35 - 52)	63 (55 - 73)	80 (74 - 85)	63 (35 - 85)
Geschlecht m / w	4/3	6 / 2	3 / 4	13 / 9
Zeitintervall	11 (2 - 53)	20 (1 - 59)	2 (1 - 18)	11 (1 - 59)
Hypoxie - Tod ²⁾				
Autopsiefälle	Hy1 - 7	Hy8 - 15	Hy16 - 22	Hy1 - 22

Tabelle 12. Aufteilung der Hypoxiegruppe nach dem Alter der Patienten in drei Untergruppen. ¹⁾ Median des Alters (Alter des Jüngsten - Alter des Ältesten), angegeben in Jahren; ²⁾ Median des Zeitintervalls Hypoxie - Tod (kleinstes Zeitintervall- größtes Zeitintervall), angegeben in Tagen.



Abbildung 8. Graphische Aufarbeitung der Hypoxiegruppe in Abhängigkeit vom Alter der Patienten. Dargestellt sind jeweils Zellen /mm² im Gyrus dentatus durch Scatterplots.

Die beiden linken und mittleren Graphen zeigen den Vergleich zwischen den Untergruppen (zusätzlich ist der Median markiert). Die beiden rechten Abbildungen zeigen den direkten Vergleich der Rohdaten mit dem Alter des jeweiligen Patienten (in Jahren).

	Junges Drittel, Hypoxie ¹⁾	Mittleres Drittel, Hypoxie ¹⁾	Altes Drittel, Hypoxie ¹⁾	p ₁ ²⁾	p ₂ ²⁾	p ₃ ²⁾	Rangkor- relations- koeffizient	p ₄ ²⁾
PCNA	19,3	10,8	12,1	0,336	0,779	0,805	-0,03	0,890
	(0,0 - 53,2)	(0,0 -113,5)	(0,0 - 61,7)					
Tuc-4	97,7	87,6	46,2	0,336	0,397	0,073	-0,47	0,027
	(41,4 -210,0)	(18,6 -151,0)	(17,0 -109,8)					3)
Cal-	46,6	36,6	28,6	0,232	0,189	0,128	-0,41	0,057
retinin	(13,8 - 90,7)	(13,2 - 50,0)	(8,0 - 36,8)					
AKZ	11,6	3,9	1,9	0,281	0,694	0,318	-0,37	0,088
	(1,6 - 39,9)	(0,0 - 18,3)	(0,0 - 11,6)					

Tabelle 13. Statistischer Vergleich zwischen den Untergruppen der Hypoxiegruppe, die nach dem Alter der Patienten aufgeteilt worden sind mit dem U-Test nach Mann-Whitney (links) und direkte Rangkorrelation der Ergebnisse der Hypoxiegruppe mit dem Alter (rechts). ¹⁾ Gefärbte Zellen /mm² im Gyrus dentatus; angegeben sind Mediane (25%-Quantil - 75%-Quantil); ²⁾ Bedeutung der p-Werte: p1 vergleicht das junge Drittel der Hypoxiegruppe mit dem mittleren Drittel; p2 vergleicht das mittlere Drittel mit dem alten Drittel; p3 vergleicht das junge Drittel mit dem alten Drittel; p4 bezieht sich auf den Rangkorrelationskoeffizienten, ³⁾ p< α =0,05, d.h. signifikant.

Wir fanden eine signifikante negative Korrelation der Dichte unreifer Tuc-4-exprimierender Körnerzellen mit dem Alter der Patienten. Aus der Zusammenschau mit den anderen Daten aus den Tuc-4- und Calretinin-Färbungen schlussfolgerten wir, dass in unserer Hypoxiegruppe mit steigendem Alter wahrscheinlich die adulte Neurogenese insgesamt weniger wird.

Die Dichte apoptotischer Körnerzellen veränderte sich bei Fällen nach Hypoxie wahrscheinlich nicht mit dem Alter - eine Zunahme mit steigendem Alter konnten wir sicher ausschließen.

Das Niveau proliferierender Zellen (gemessen durch den Marker PCNA) veränderte sich in unserer Studie mit steigendem Alter ebenfalls nicht (Abbildung 8, Tabelle 13).

4.4.2 Neurogenese und Apoptose bei Kontrollen - Altersvergleich

Dazu passend war nun die weiterführende Frage b. von Interesse "Bleibt mit steigendem Alter bei Autopsiefällen ohne neuropathologische Auffälligkeiten die adulte Neurogeneserate und Apoptose im Gyrus dentatus gleich?"

Wir korrelierten die Rohdaten aus den einzelnen Färbungen direkt mit dem Alter der Patienten innerhalb der Kontrollgruppe. Zusätzliche Informationen bekamen wir auch hier durch die Aufteilung der Gruppe in drei Untergruppen (Trennung am 33%-Quantil bei 48 Jahren und am 66%-Quantil bei 68 Jahren) (Tabelle 14).

	Junges Drittel, Kontrolle	Mittleres Drittel, Kontrolle	Altes Drittel, Kontrolle	Gesamte Kontrollgruppe
Fallanzahl	6	6	7	19
Alter ¹⁾	41 (35 - 47)	58 (48 - 67)	73 (68 - 81)	59 (35 - 81)
Geschlecht m / w	6/0	2/4	4/3	12 / 7
Autopsiefälle	Ko1 - 6	Ko7 - 12	Ko13 - 19	Ko1 - 19

Tabelle 14. Aufteilung der Kontrollgruppe nach dem Alter der Patienten in Untergruppen. ¹⁾ Das Alter ist angegeben in Jahren durch den Median (Jüngster - Ältester).



Abbildung 9. Graphische Aufarbeitung der Kontrollgruppe in Abhängigkeit vom Alter der Patienten, dargestellt durch Scatterplots (markierte Zellen / mm² im Gyrus dentatus). Die beiden linken und mittleren Graphen zeigen den Vergleich zwischen den Untergruppen (zusätzlich ist der Median angegeben), die beiden rechten Abbildungen zeigen den direkten Vergleich der Rohdaten mit dem Alter des jeweiligen Patienten (in Jahren).

	Junges Drittel, Kontrolle ¹⁾	Mittleres Drittel, Kontrolle ¹⁾	Altes Drittel Kontrolle ¹⁾	l, p ₁ ²⁾	p ₂ ²⁾	p ₃ ²⁾	Rangkor- relations- koeffizient	p ₄ ²⁾
PCNA	5,6 (0,0 - 20,7)	1,1 (0,0 - 24,0)	8,0 (0,0 - 34,6)	0,699	0,445	0,628	0,12	0,631
Tuc-4	22,8 (8,5 - 42,1)	15,5 (5,8 - 106,1)	31,0 (0,0 - 34.6)	0,699	0,245	0,234	0,23	0,346
Cal- retinin	19,8 (10,8 - 28,8)	8,1 (0,0 - 34,3)	19,0 (5,7 - 22,4)	0,537	1,0	0,295	-0,12	0,627
AKZ	0,0 (0,0 - 4,3)	0,0 (0,0 - 13,9)	0,0 (0,0, - 31,0)	0,818	0,836	0,628	0,17	0,478

Tabelle 15. Statistischer Vergleich der Untergruppen aus der Kontrollgruppe, die durch Aufteilung nach dem Alter der Patienten entstanden sind (links) und direkte Rangkorrelation der Rohdaten mit dem Alter (rechts). ¹⁾ Gefärbte Zellen /mm² im Gyrus dentatus; angegeben sind Median (25%-Quantil - 75%-Quantil); ²⁾ Bedeutung der p-Werte: p1 vergleicht das junge Drittel der Hypoxiegruppe mit dem mittleren Drittel; p2 vergleicht das mittlere Drittel mit dem alten Drittel; p3 vergleicht das junge Drittel mit dem alten Drittel; p4 bezieht sich auf den Rangkorrelationskoeffizienten.

Es zeigten sich keine Tendenzen oder signifikanten Unterschiede. Daraus war zu folgern, dass in unserer Kontrollgruppe sowohl die allgemeine Proliferationsrate und adulte Neurogenese, als auch die Dichte apoptotischer Körnerzellen mit steigendem Alter von 35 bis 81 Jahren nahezu gleich blieb (Abbildung 9, Tabelle 15).

4.4.3 Verlauf der Neurogenese und Apoptose nach zentraler Hypoxie

Weiterhin interessierte die weiterführende Frage c. "Wie ist der Verlauf der natürlichen Neurogenese im Gyrus dentatus nach Hypoxie - gibt es einen Zusammenhang zwischen adulter Neurogenese bzw. Apoptose im Gyrus dentatus und dem Abstand vom hypoxischen Ereignis bis zum Tod?"

Wir untersuchten die Hypoxiegruppe unter diesem Aspekt genauer und verglichen nun die Rohdaten aus der Immunhistochemie mit dem Abstand zwischen dem hypoxischen Ereignis und dem Tod, erst direkt durch Rangkorrelation und dann wieder mit Hilfe von Untergruppen. Diese entstanden durch Aufteilung am 33%-Quantil des Abstandes Hypoxie - Tod bei 3,2 Tagen und am 66%-Quantil bei 19,5 Tagen (Tabelle 16).

	Hypoxie, Frühphase	Hypoxie, Übergangsphase	Hypoxie, Spätphase	Gesamte Hypoxiegruppe
Fallanzahl	8	7	7	22
Alter ¹⁾	55 (35 - 83)	55 (42 - 72)	75 (35 - 85)	63 (35 - 85)
Geschlecht m / w	2 / 6	5/2	6 / 1	13/9
Zeitintervall	2 (1 - 3)	13 (4 - 19)	26 (21 - 59)	11 (1 - 59)
Hypoxie - Tod ²⁾				
Autopsiefälle	Hy2, 14, 16, 17,	Hy1, 5, 6, 8, 12,	Hy3, 4, 7, 9,	Hy1 - 22
	18, 19, 20, 22	15, 21	10, 11, 13	

Tabelle 16. Aufteilung der Hypoxiegruppe in Untergruppen; nun nach dem Abstand zwischen dem hypoxischen Ereignis und dem Tod. Angegeben sind ¹⁾ Median des Alters der Patienten in Jahren (Jüngster - Ältester) bzw. ²⁾ Median des Zeitintervall Hypoxie - Tod in Tagen (kleinstes - größtes).



Abbildung 10. Graphische Differenzierung der Hypoxiegruppe nach dem Zeitraum von dem hypoxischen Ereignis bis zum Tod. Dargestellt sind Zellen /mm² im Gyrus dentatus in Scatterplots. Die beiden linken und mittleren Graphen zeigen den Vergleich zwischen den Untergruppen (zusätzlich ist der Median markiert), die beiden rechten Abbildungen zeigen den direkten Vergleich der immunhistochemischen Rohdaten mit dem jeweiligen Abstand vom hypoxischen Ereignis bis zum Tod.

	Hypoxie, Frühphase ¹⁾	Hypoxie, Übergangs- phase ¹⁾	Hypoxie, Spätphase ¹⁾	p1 ²⁾	p ₂ ²⁾	p ₃ ²⁾	Rangkor- relations- koeffizient	p4 ²⁾
PCNA	25,8 (0,0 - 113,5)	34,6 (0,0 - 53,4)	10,2 (0,0 - 19,3)	0,955	0,165	0,336	-0,27	0,233
Tuc-4	42,7 (17,0 -109,8)	61,9 (26,9 -151,0)	113,3 (27,3 -210,0)	0,072	0,456	0,029 ³	0,53	0,001 ³⁾
Cal- retinin	27,2 (8,0 - 36,8)	44,4 (35,7 - 90,7)	36,6 (13,2 - 73,0)	0,001 ³	0,375	0,232	0,29	0,190
AKZ	2,8 (0,0 - 12,5)	6,5 (0,0 - 25,8)	11,3 (0,0 - 39,3)	0,281	0,805	0,281	0,30	0,161

Tabelle 17. Statistischer Vergleich der Untergruppen aus der Hypoxiegruppe, die nach dem Abstand von dem hypoxischen Ereignis bis zum Tod aufgeteilt worden sind (links), und direkte Rangkorrelation der Rohdaten der einzelnen Fälle mit dem jeweiligen Zeitintervall Hypoxie - Tod (rechts). ¹⁾ Gefärbte Zellen /mm² im Gyrus dentatus, angegeben sind Median (25%-Quantil - 75%-Quantil); ²⁾ Bedeutung der p-Werte: p1 vergleicht das junge Drittel der Hypoxiegruppe mit dem mittleren Drittel; p2 vergleicht das mittlere Drittel mit dem alten Drittel; p3 vergleicht das junge Drittel mit dem alten Drittel; p4 bezieht sich auf den Rangkorrelations-koeffizienten, ³⁾ p< α =0,05, d.h. signifikant.

Wir fanden eine höhere Dichte unreifer Tuc-4-exprimierender Körnerzellen in der Spät- als in der Frühphase und ebenfalls eine höhere Dichte junger Calretinin-exprimierender Neuronen in der Übergangs- als in der Frühphase. Zusammen mit einer signifikanten positiven

Korrelation zwischen der Dichte unreifer Tuc-4-exprimierender Körnerzellen und dem Abstand zwischen dem hypoxischen Ereignis und dem Tod schlussfolgerten wir also, dass die adulte Neurogenese in unserer Hypoxiegruppe im Verlauf von 59 Tagen zunimmt. Dabei blieben allerdings die allgemeine Proliferation und die Dichte apoptotischer Körnerzellen durchgehend auf wahrscheinlich dem selben Niveau (Abbildung 10, Tabelle 17).

4.4.4 Mehrfachanalyse in der Hypoxiegruppe - ein Problem?

Wir verglichen also die Ergebnisse von der Hypoxiegruppe mit zwei Variablen: erst mit dem Alter des Patienten (siehe Seite 38) und folgend mit dem Abstand vom hypoxischen Ereignis bis zum Tod (siehe Seite 41) - und fanden bei beiden Variablen eine signifikante Korrelation zur Dichte Tuc-4-markierter unreifer Körnerzellen.

Es stellte sich also die Frage, ob eine der Variablen nicht nur zufällig mit den Ergebnissen korrelierte. Es wurde also die jeweils andere Variable als interferierende Kontrollvariable miteingerechnet (Tabelle 18). Dabei war zwar keine Signifikanz mehr zu erkennen, aber beide Zusammenhänge an sich blieben weiter bestehen blieben.

Korrelation Tuc-4 markierter Zellen mit:	Spearmans Rang- korrelation Korrelations- koeffizient/ p-Wert	Rangkorrelation n Interferierende Kontrollvariable	nit Kontrollvariable Korrelations- koeffizient/ p-Wert
Alter des Patienten	-0,47 / 0,027	Abstand Hypoxie-Tod	-0,38 / 0,088
Abstand Hypoxie-Tod	0,53 / 0,001	Alter des Patienten	0,31 / 0,175

 Tabelle
 18. Mitbetachtung von Kontrollvariablen in den bisher signifikanten Korrelationen in den weiterführenden Fragen zur Hypoxiegruppe.

Verglich man zusätzlich das Alter der Patienten direkt mit dem jeweiligen Abstand zwischen hypoxischen Ereignis und Tod, ergab sich dabei eine signifikant negative Korrelation (Spearmans Rangkorrelationskoeffizient -0,449 bei p=0,042 < α =0,05): Ältere Patienten unserer Hypoxiegruppe verstarben also deutlich schneller im Verlauf nach zentraler Hypoxie als jüngere.



Abbildung 11 A-L. Immunhistochemisch gegen PCNA gefärbte Zellen im Gyrus dentatus bei den Autopsiefällen mit der lfnd. Nr. Hy14 (A-D), Hy13 (E, F) bzw. Hy20 (G, H). Als Positiv-Kontrolle wurden Humantonsillen mitgefärbt (I, J) und als Negativ-Kontrolle Schnitte des Autopsiefalls mit lfnd. Nr. Hy18 zusätzlich ohne Primärantikörper behandelt (K, L). Die Balken entsprechen 50µm.



Abbildung 12 A-L. Immunhistochemisch gegen Tuc-4 gefärbte Zellen im Gyrus dentatus bei den Autopsiefällen mit der lfnd. Nr. Ko15 (A, B), Ko10 (C, D), Ko13 (E, F) und Ko17 (G, H). Als Positiv-Kontrolle wurde embryonales Affengehirngewebe mitgefärbt (I, J), als Negativ-Kontrolle Schnitte des Autopsiefalls mit lfnd. Nr. Hy20 zusätzlich ohne Primärantikörper behandelt. Die Balken entsprechen 50µm (K, L).



Abbildung 13 A-L. Immunhistochemisch gegen Calretinin gefärbte Zellen im Gyrus dentatus bei den Autopsiefällen mit lfnd. Nr. Hy10 (A, B), SAB7 (C, D), Ko13 (E, F) bzw. Hy19 (G, H). Als Positiv-Kontrolle wurde embryonales Affengehirngewebe mitgefärbt (I, J), als Negativ-Kontrolle Schnitte des Autopsiefalls lfnd. Nr. Hy5 zusätzlich ohne Primärantikörper behandelt (K, L). Die Balken entsprechen 50µm.



Abbildung 14 (A-L). Durch In-situ-tailing gefärbte Zellen im Gyrus dentatus bei den Autopsiefällen mit der lfnd. Nr. Hy20 (A, B), Hy9 (C, D), Sab3 (E, F) bzw. Hy20 (G, H). Als Positiv-Kontrolle wurde embryonales Affengehirngewebe mitgefärbt (I, J) und als Negativ-Kontrolle Schnitte des Autopsiefalls mit lfnd. Nr. Hy11 zusätzlich ohne Tailingmixtur behandelt (K, L). Die Balken entsprechen 50µm.

lfnd. Nr.	Alter ¹⁾ / Ge- schlecht	Todesursache/ Todestag	Tod bis Obduktion ²⁾ / bis Immun- histochemie ¹⁾	Klinische Evidenz des hypoxischen Hirnschadens/ Tag der Hypoxie	Neuropathologische Diagnose
Hy1	35 / w	Versagen der zentralen Regulation am 03.01.96.	1 / 11	Reanimationspflicht bei unklarem Kollaps am 30.12.95.	Frischer hypoxischer Hirnschaden.
Hy2	35 / w	Versagen der zentralen Regulation am 06.05.96.	1 / 10	Schwere Beeinträchtigung der Respiration im Rahmen eines Multiorganversagens und allgemeiner Verschlechterung am 04.05.96.	 Frischer hypoxischer Hirnschaden, Zeichen der intravitalen Autolyse, Hirnödem mit transtentorieller Herniation und Kleinhirntonsillenherniation.
Hy3	42 / m	Versagen der linken Herzkammer am 12.09.97.	5/9	Verzögerte Intubation bei Reanimation wegen Kammerflimmern bei Vorderwandinfarkt am 13.08.97.	Generalisierter, teils frischer, teils älterer hypoxischer Hirnschaden.
Hy4	42 / m	Versagen beider Herzkammern am 01.05.95	3 / 11	Prolongierte Reanimation bei Kammerflimmern am 09.03.95.	Schwerer hypoxischer Hirnschaden.
Hy5	44 / w	Versagen der zentralen Regulation bei Hirnischämie am 27.05.02.	2/4	60 min kardiopulmonale Reanimation nach zunehmender Dyspnoe, Verwirrtheit und Kollaps am 19.05.02.	Gehirn mit Zeichen einer erheblichen hypoxischen Enzephalopathie.
Hy6	48/ m	Rechtsherzversagen bei Compulmonale am 23.04.95.	r 1/11	15 min Reanimation nach Kollaps und Dyspnoe am 12.04.95.	Diffuser hypoxischer Hirnschaden.
Hy7	52 / m	Respiratorische Insuffizienz mit Multiorganversagen am 13.06.02.	z 1/4	Intubationspflicht wegen ARDS bei Pneumonie am 18.05.02.	Hypoxische Enzephalopathie .
Hy8	55 / m	Respiratorische Insuffizienz bei Multiorganversagen am 26.09.98.	2 3/8	Reanimation wegen Asystolie bei Aspirationspneumonie am 18.09.98.	 Generalisierte ausgeprägte hypoxische Enzephalopathie, 2. Hirnödem, 3. Zeichen des Kreislaufschocks, 4. Telangiektasie von 1,5 cm Größe okzipital rechts.

Tabelle 19 Abschnitt 1 (Abschnitt 2 und 3 siehe folgende Seiten). Informationen über die einzelnen Autopsiefälle der Hypoxiegruppe. Zeitintervalle sind angegeben ¹⁾ in Jahren bzw. ²⁾ in Tagen.

lfnd. Nr.	Alter ¹⁾ / Ge- schlecht	Todesursache/ Todestag	Tod bis Obduktion ²⁾ / bis Immun- histochemie 2)	Klinische Evidenz des hypoxischen Hirnschadens/ Tag der Hypoxie	Neuropathologische Diagnose
Ну9	55 / m	Fulminante Lungenembolie bei tiefer Bein- und Beckenvenenthrombose, Myokardreinfarkt am 24.02.01.	2/6	Reanimation bei Asystolie und anschließend fokale Krämpfe am 03.02.01.	Gehirn mit Zeichen der hypoxischen Enzephalopathie und mäßigen senilen Veränderungen.
Hy10	61/ m	Unklare Pneumonie am 09.04.02.	5/4	Reanimation mit andauerdem Koma am 09.02.02.	Gehirn mit Zeichen einer schweren hypoxischen Enzephalopathie.
Hy11	63 / m	Versagen der linken Herzkammer am 13.04.95.	5/ 11	Schwerste 3-Gefäß-KHK und Revaskularisation am 20.03.95.	 Nicht ganz frischer diffuser hypoxischer Hirnschaden, älterer kavitärer Infarkt (Zentralpons), ältere kleine intrazerebrale Blutung im Bereich des Putamen links.
Hy12	64 / m	Akuter Reinfarkt bei stattgehabtem antero- und posterolateralem Myokard- infarkt am 13.02.02.	1 / 5	Prolongiertes Koma nach Reanimation wegen Kammerflimmern bei Herz- infarkt am 25.01.02.	Ältere generalisierte hypoxische Hirnschädigung mit laminären Rindennekrosen.
Hy13	72 / w	Myokardinfarkt am 14.02.03.	3 / 4	Tracheotomie nach Weaning-Misserfolg am 24.01.03.	Hypoxische Enzephalopathie.
Hy14	73 / w	Schock am 23.02.04.	1/3	Schmerzen in der linken Brust, zyanotische Haut, Blässe am 22.02.04.	Hypoxische Enzephalopathie mit Nervenzellverlust im Pyramidenband CA1.
Hy15	73 / m	Versagen der linken Herzkammer am 07.09.00.	1 / 6	Reanimation und Intubation bei Bewusstlosigkeit, Asystolie und Asphyxie am 23.08.00.	Schwere hypoxische Enzephalopathie.
Hy16	74 / m	Hämorrhagischer Schock am 13.01.98.	0/9	Intraoperativ reanimationspflichtiges Kammerflimmern bei Bypassoperation am 12.01.98.	Zeichen eines frischen und eines nicht mehr ganz frischen hypoxischen Hirnschadens.

Tabelle 19 Abschnitt 2.

lfnd. Nr.	Alter ¹⁾ / Ge- schlecht	Todesursache/ Todestag	Tod bis Obduktion ²⁾ / bis Immun- histochemie ¹⁾	Klinische Evidenz des hypoxischen Hirnschadens/ Tag der Hypoxie	Neuropathologische Diagnose
Hy17	75 / w	Frischer Myokardinfarkt an 09.10.97.	n 1/9	Leblos im Bett aufgefunden am Tag nach Bypassoperation und Reanimation am 08.10.97.	Frischer hypoxischer Hirnschaden.
Hy18	76/ w	Versagen der linken Herzkammer am 18.06.00.	1/6	Dreimalige Reanimation bei Asystolie am 17.06.00.	Ausgeprägter, diffuser, frischer hypoxischer Hirnschaden
Hy19	80 / w	Multiorganversagen am 11.05.95.	1 / 11	Intubationspflicht bei respiratorischer Insuffizienz am 09.05.95.	1. Hypoxische Nervenzellausfälle im Ammonshorn, 2. hyperdense Angiopathie.
Hy20	81 / m	Kardio- / respiratorische Insuffizenz am 24.04.95.	2 / 11	Pulmonale Verschlechterung mit Intubationspflicht am 21.04.95.	Frische hypoxische Neuronenschädigung hippokampaler Nervenzellen.
Hy21	83 / m	Akutes respiratorisches Versagen bei akuter Bronchopneumonie beidseits am 19.11.03.	2/3	Pulmonale Dekompensation in Folge von Peritonitis bei Platzbauch am 01.11.03.	1. Hypoxisch- / ischämische Nervenzellschädigung im Bereich des Hippokampus, 2. senile Altersveränderungen.
Hy22	85 / w	Versagen der zentralen Regulation am 14.01.98.	1/9	Gefunden mit Hypothermie am 12.01.98, andauerndes Koma, NSE bei 163,9 ng/ml ³⁾ .	Diffuser hypoxischer Hirnschaden sowie Zeichen des intravitalen Hirntodes.
Tabelle	Alter ¹⁾ /	Todesursache/	Tod bis	Neuropathologische Diagnose	
19	Ge-	Todestag	Obduktion ² /		
Abschnit $t 3.^{3}$	schlecht		bis Immun- histochemie ¹⁾		
Zur NSE					
siehe					
Seite					
ð.lind. Nr					
SAB1	19/w	Versagen der zentralen	1 / 12	1. Ruptur eines Aneurysmas der A. ba	asilaris mit Subarachnoidalblutung.

		Regulation am 20.02.95.			2. Mittelhirn- und Hirnstammeinklemmung infolge der raumfordernden Wirkung der Subarachnoidalblutung mit Verschiebeblutungen.
SAB2	25 / w	Septisch- / toxischer Schock mit ausgeprägter hämorrhagischer Diathese am 20.02.95.	1 /	12	Frische Subarachnoidalblutung sowie frische multiple Blutungen in beiden Kleinhirnhemisphären.
SAB3	40 / m	Kardio- / respiratorische Insuffizienz am 23.03.96.	2 /	10	 Frische Subarachnoidalblutung frontobasal links und parietal rechts, nicht mehr ganz frische Blutungen im Putamen links der Brücke, ca. 1 cm großes Meningeom.
SAB4	42 / m	Zentraler Tod bei rezidivierter Subarachnoidalblutung am 25.08.96.	1 /	10	 Subarachnoidalblutung über der Konvexität beider Großhirnhemisphären, mehrere petechiale Blutungen in der weißen Substanz des Großhirns und im Hirnstamm, metabolische Astrozytose (hepatische Enzephalopathie).
SAB5	42 / w	Respiratorisches Versagen bei chronischen Schocklungen beidseits am 16.07.01.	1 /	5	Altersentsprechendes Gehirn mit flächiger Subarachnoidalblutung über beiden Großhirnhemisphären.
SAB6	44 / w	Zentraler Tod bei rezidivierter Subarachnoidalblutung am 14.08.97.	1 /	9	 Rupturiertes sakkuläres Aneurysma der linken A. vertebralis mit massiver Subarachnoidalblutung und Einbruch in das Ventrikelsystem, hypoplastische A. vertebralis rechts, Gefäßwandanomalie im rechten Stammganglienbereich mit frischen und älteren Blutungen.

Tabelle 20 Abschnitt 1 (Abschnitt 2 siehe folgende Seite). Informationen über die Autopsiefälle der SAB-Gruppe. Zeitintervalle sind angegeben ¹⁾ in Jahren bzw. ²⁾ in Tagen.

lfnd. Nr.	Alter Ge- schle	¹⁾ / cht	Todesursache/ Todestag	Tod b Obdu bis In histoc	his ktion ²⁾ / hmun- hemie ¹⁾	Neuropathologische Diagnose
SAB7 SAB8	44 / 58 /	m w	Herzversagen am 20.06.95. Versagen der zentralen Regulation am 15.04.97.	1 / 1 /	11 9	Diffuse beidseitige, parietookzipital betonte Subarachnoidalblutungen. 1. Rupturiertes und geclipptes Aneurysma der Arteria communicans anterior mit diffuser Subarachnoidalblutung sowie intrazerebraler Blutung rechts frontal (3 x 3 cm)

						2. Zeichen der 3. Hirndruck 1	r intravitalen Autoly nit transtentorieller	yse, Herniatio	n und Kleinhirntonsille	nherniation.
SAB9	63 /	W	Herz-/ Kreislaufversagen am 29.06.98.	1/	8	 Ausgedehn generalisier hypoxischen I 	te frische subaracht ter hypoxischer Hin nfarktzonen bis 1 x	noidale Blu rnschaden 0,5 cm G	utung mit Einbruch in d mit multiplen hämorrh röße.	len IV. Ventrikel, agischen sowie
SAB 10	75 /	w	Versagen der zentralen Regulation am 16.02.98.	3/	9	 Subarachno Blutung (6 cm geclipptes, 	idale Blutung, subo i im Durchmesser) bis 0,7 cm großes A	lurale Blut bis an den Aneurysma	tung und links parietote Seitenventrikel reicher der A. comunicans po	emporal gelegene nd, sterior.
SAB 11	92 /	W	Zentrales Kreislaufversagen bei Hirnödem am 15.02.03.	2/4	4	 Ausgedehnte Subarachnoidalblutung links temporal mit konsekutivem Hydrocephalus internus und links betontem Hirnödem, Meningotheliales Meningeom (WHO I) links frontotemporal 				utivem
Tabelle 20 Abschnit t 2.lfnd. Nr.	Alter ¹ Ge- schlec	^b /	Todesursache/ Todestag			Tod bis Obduktion ²⁾ / bis Immun- histochemie ¹⁾	Neuropatho- logische Diagnose	Hinweis auf SAB	Reanimation versucht	Hinweis auf hypoxischen Hirnschaden
Ko1	35 /	m	Koronare Embolisation bei rho Endokarditis der Aortenklappe 19.09.04.	eumati e am	scher	3 / 2	Gehirn mit alters- entsprechendem Normalbefund.	Nein	Ja (nicht erfolgreich) allerdings kurz, 1h vor dem Tod.	Nein
K02	36 /	m	Biventrikuläres Herzversagen Herzbeuteltamponade am 01.1	bei 0.04.		0 / 2	Gehirn mit alters- entsprechendem Normalbefund.	Nein	Ja (nicht erfolgreich) allerdings kurz, 1h vor dem Tod.	Nein
Ko3	39 /	m	Ertrinken am 22.11.00.			5/6	Gehirn mit alters- entsprechendem Normalbefund.	Nein	Nein	Nein
Ko4	43 /	m	Kardiogener Schock bei morp noch nicht nachweisbarem My am 28.12.01.	hologi yokard	sch infark	0 / 5 t	Gehirn mit alters- entsprechendem Normalbefund.	Nein	Ja (nicht erfolgreich) allerdings kurz, 1,5h vor dem Tod.	Nein
Ko5	45 /	m	Akute Linksherzinsuffizienz b Myokardinfarkt am 22.05.01.	ei fris	chem	1 / 5	Gehirn ohne erkennbare Pathologie.	Nein	Ja (nicht erfolgreich) allerdings kurz, 1h vor dem Tod.	Nein
K06	47 /	m	Medikamentöser Suizid am 24	1.05.01	•	1 / 5	Gehirn mit alters-	Nein	Ja (nicht erfolgreich)	Nein

entsprechendem Normalbefund. allerdings kurz, ca. 2h vor dem Tod.

Tabelle 21 Abschnitt 1 (Abschnitt 2 und 3 siehe folgende Seiten). Informationen über die Autopsiefälle der Kontrollgruppe. Zeitintervalle sind angegeben ¹⁾ in Jahren bzw. ²⁾ in Tagen.

lfnd. Nr.	Alter ¹⁾ / Ge- schlecht	Todesursache/ Todestag	Tod bis Obduktion ²⁾ / bis Immun- histochemie ¹⁾	Neuropatho- logische Diagnose	Hinweis auf SAB	Reanimation 8 versucht	Hinweis auf hypoxischen Hirnschaden
Ko7	48 / w	Respiratorische Insuffizienz mit Versagen der rechten Herzkammer am 24.02.03.	1/4	Gehirn mit alters- entsprechendem Normalbefund.	Nein	Nein	Nein
Ko8	51 / w	Herz-/ Kreislaufversagen am 03.03.00.	3 / 7	Gehirn mit alters- entsprechendem Normalbefund.	Nein	Nein, aber Intubation bei Dyspnoe, 1 h vor dem Tod.	i Nein
Ko9	58 / w	Rechtsherzversagen am 28.10.00.	2 / 6	Gehirn mit alters- entsprechendem Normalbefund.	Nein	Ja (nicht erfolgreich) allerdings kurz, 45min vor dem Tod.	Nein
Ko10	59 / m	Schwere Koronarsklerose am 21.08.00.	0 / 6	Gehirn mit alters- entsprechendem Normalbefund.	Nein	Nein, aber Intubation bei Dyspnoe, 1h vor dem Tod.	i Nein
Ko11	65 / m	Restriktive Kardiomyopathie bei Herzamyloidose am 19.10.04.	2 / 2	Gehirn mit alters- entsprechendem Normalbefund.	Nein	Ja (nicht erfolgreich) allerdings kurz, 1h vor dem Tod.	Nein
K012	67/ w	Toxisches Herz- / Kreislaufversagen am 10.03.02.	1 / 4	Gehirn mit alters- entsprechendem Normalbefund.	Nein	Nein	Nein
K013	68 / w	Toxisch- / hypoxisches Herz- / Kreislaufversagen am 17.09.00.	3 / 6	Gehirn mit alters- entsprechendem	Nein	Nein	Nein

					Normalbefund.			
K014	70 /	m	Versagen der rechten Herzkammer am 22.04.03.	2/3	Unauffälliges Erwachsenen- gehirn.	Nein	Ja (nicht erfolgreich) allerdings kurz, 4h vor dem Tod.	Nein
Ko15	71 /	m	Biventrikuläres Herzversagen am 03.11.04.	1 / 2	Gehirn mit alters- entsprechendem Normalbefund.	Nein	Nein	Nein
Tabelle 21	Absch	nitt 2	2.					
lfnd. Nr.	Alter Ge- schle	¹⁾ / cht	Todesursache/ Todestag	Tod bis Obduktion ²⁾ / bis Immun- histochemie ¹⁾	Neuropatho- logische Diagnose	Hinweis auf SAB	Reanimation versucht	Hinweis auf hypoxischen Hirnschaden
K016	73 /	m	Toxisches myokardiales Versagen bei postoperativem, paralytischem Illeus mit Perforationsperitonitis am 16.11.00.	0/6	Gehirn mit alters- entsprechendem Normalbefund.	Nein	Nein	Nein
Ko17	74 /	W	Hypovolämischer Schock bei hämorrhagischer Diathese am 07.03.00.	0 / 6	Gehirn mit alters- entsprechendem Normalbefund.	Nein	Nein	Nein
Ko18	79 /	m	Versagen der linken Herzkammer am 25.04.03.	3 / 3	Gehirn mit alters- entsprechendem Normalbefund.	Nein	Nein, aber Intubation bei Dyspnoe, 1h vor dem Tod.	Nein
Ko19	81 /	W	Akuter Myokardreinfarkt am 28.02.00.	1 / 7	Gehirn mit alters- entsprechendem Normalbefund.	Nein	Nein	Nein

Tabelle 21 Abschnitt 3.

5. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit adulter Neurogenese und Apoptose nach zerebraler Hypoxie und spontaner SAB. Es wurden Gehirngewebeproben von 52 Autopsiefällen retrospektiv untersucht:

Wir fanden durch Immunhistochemie der Marker neuronaler Differenzierung Tuc-4 und Calretinin eine signifikante Steigerung der adulten Neurogenese nach hypoxischem Hirnschaden im Vergleich zu Kontrollfällen. Vergleichbar stellten wir durch In-situ-tailing kombiniert mit morphologischen Kriterien auch eine signifikante Zunahme apoptotischer Körnerzellen fest.

Weiterhin fanden wir Hinweise darauf, dass die adulte Neurogenese nach einem hypoxischen Ereignis mit zunehmendem Alter der Patienten weniger wird, und dass im Verlauf nach dem hypoxischen Ereignis sich die adulte Neurogenese noch steigert.

Außerdem bemerkten wir nach SAB eine Steigerung der adulten Neurogenese - nicht aber apoptotischer Körnerzellen.

Bei den Kontrollfällen beobachteten wir adulte Neurogenese und Apoptose annähernd gleichbleibend im selben Umfang bis ins hohe Alter.

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Autopsiefälle und Gruppendefinition

Aus Autopsiefällen der Abteilung Neuropathologie der Universität Göttingen von den Jahren 1996 bis 2004 wurden retrospektiv anhand der klinischen Akten und der neuroanatomischpathologischen Berichte passende Gruppen erstellt, die sich im untersuchten Kriterium gegeneinander abgrenzten, aber sonst vergleichbare Kollektive ohne Störvariablen darstellen sollten.

Warum Autopsiefälle?

Grundsätzlich waren histologische Untersuchungen an menschlichen Hippokampi nur möglich, wenn dieser herausoperiert worden war (z.B. bei Hirntumoren, Epilepsie [Téllez-Zenteno et al. 2005] oder Rasmussen-Enzephalitis [Bien et al. 2005]), eine Biopsie entnommen wurde (beispielsweise bei bestehendem Verdacht auf Herpes simplex Enzephalitis [Wasiewski and Fishman 1988]) oder postmortal bei Autopsiefällen.

Gewebeproben, die nicht von Autopsiefällen stammten, konnten wir allerdings nicht in diese Studie mit einschließen, da sie ausschließlich von Patienten stammten, die an einer weiteren schweren neurologischen Krankheit litten, und so wegen der Ausschlusskriterien grundsätzlich nicht in unsere Gruppen passten.

Damit erklärte sich erstens der retrospektive Aufbau der Studie und zweitens konnten wir somit nicht in Erfahrung bringen, wie sich adulte Neurogenese und Apoptose nach Hypoxie bzw. SAB bei weiterlebenden Patienten entwickelt hätten.

Mögliche Einflussvariablen

Neben dem Alter der in Paraffin eingebetteten Gehirne und der Zeit bis zur Einbettung, spielte auch die Rekonstruktion des klinischen Verlaufs eine große Rolle. Wegen Krankenhaus- und Arztwechsel waren vor allem vor langer Zeit durchgemachte, oder auch klinisch nie erkannte Krankheiten nicht vollständig zu erfassen.

Auf Folgendes soll näher eingegangen werden:

• Die Autopsiefälle wurden alle postmortal gemäß der normalen Sektionsroutine untersucht. Dabei zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Zeit vom Versterben bis zur Sektion (Median = 1, min 0, max 5 Tage) und dem immunhistochemischen Färbeverhalten bzw. der Dichte markierter Zellen. Ein weiteres Problem könnte die Lagerzeit der Paraffinblöcke gewesen sein (Median = 6, min 2, max 12 Jahre). Es zeigte sich allerdings weder ein Einfluss auf die Qualität der Färbungen noch auf die Dichte markierter Zellen.

• Ein nicht erkanntes oder schon lange überwundenes Malignom, und die damit eventuell verbundene Radio- oder Chemotherapie, konnten durchaus Einfluss auf die Neurogenese gehabt haben. Monje et al. (2007) zeigten an Autopsiefällen, dass adulte Neurogenese im Gyrus dentatus durch Radio- und Chemotherapie bei Hirntumoren stark reduziert wird.

Ein klinisch manifestes Malignom wurde in der Fallauswahl zwar als Ausschlusskriterium definiert - allerdings war in sieben Fällen erst in der Autopsie ein Malignom aufgefallen. Es war uns nicht bekannt, ob es sich um unentdeckte Entitäten oder Rezidive handelte; eine Radio- oder Chemotherapie bekamen diese Fälle vor dem Tod jedenfalls nicht. Da diese Fälle (in Abbildung 15 auf Seite 57 blau markiert) sich allerdings diffus über die ganze Bandbreite der immunhistochemischen Ergebnisse verteilten, gingen wir davon aus, dass es sich hierbei um keinen wesentlichen Einflussfaktor handelte.

• Systemisch verabreichte Glukokortikoide sind als Suppressor der Neurogenese und als Stimulator neuronaler Apoptose beschrieben worden (Hassan et al. 1996, Tauber et al. 2006).

Neun der Autopsiefälle hatten über einen gewissen Zeitraum systemisch Glukokortikoide erhalten oder litten zumindest an einer Erkrankung, die eine solche Therapie sehr wahrscheinlich machte. Da aber auch diese Fälle (grün in Abbildung 15) nicht in eine bestimmte Richtung tendierten, gingen wir davon aus, dass ebenfalls kein bedeutsamer Zusammenhang zu den von uns untersuchten Ergebnisparametern bestand.

• Weiterhin war die Rolle der Neurogenese bei Depression nicht abschließend geklärt (siehe Seite 72). Trotzdem hatten wir zwei Fälle mit bekannter depressiver Erkrankung in unsere Studie mit eingeschlossen (rot in Abbildung 15), die aber keine Verfälschung zu verursachen schienen.



Abbildung 15. In diesem graphischen Überblick der Ergebnisse der vorliegenden Studie (Boxplots) sind jene Autopsiefälle farblich markiert, bei denen in der Autopsie ein Malignom aufgefallenen war (blau), die über zumindest einen gewissen Zeitraum systemisch Glukokortikoide erhalten hatten (grün) oder die eine bekannte depressive Erkrankung hatten (rot). Es ist zu erkennen, dass keine dieser möglichen Einflussvariablen nur in einer Gruppe, oder besonders bei solchen Fällen mit einer hohen bzw. niedrigen Dichte immunhistochemisch markierter oder apoptotischer Zellen vorkam.

• Es könnte sein, dass der genetische Hintergrund eines Menschen einen viel stärkeren Einfluss auf die natürliche Neurogeneserate hat, als die von uns untersuchten Kriterien. An Mäusen wurde zumindest die starke Abhängigkeit adulter Neurogenese von bestimmten erblichen Merkmalen festgestellt (Kempermann et al. 1997a). Würde dies auch für unser Kollektiv an Autopsiefällen zutreffen, ließen sich zwar die großen interindividuellen Unterschiede in den Rohdaten der immunhistochemischen Färbungen erklären, allerdings würden dann auch unsere Ergebnisse nichtig gewesen sein. Eine Lösung dieser Fragestellung stand allerdings noch aus.

 Uns war es weiterhin weder möglich, bei allen Autopsiefällen retrospektiv die Dauer der Hypoxie, noch den genauen klinischen Schaden ausfindig zu machen, folglich ließen wir diese Parameter unberücksichtigt.

Reanimation bei Fällen der Kontrollgruppe

In jenen 11 Fällen der Kontrollgruppe, in denen im Median 1 Stunde vor dem Tod ein Wiederbelebungsversuch unternommen wurde, zeigte sich kein Unterschied in Proliferation, adulter Neurogenese, Apoptose oder in Qualität der Immunhistochemie im Vergleich zu den anderen Kontrollfällen.

Methodische Probleme der Gruppe SAB

Die SAB-Gruppe war sehr problematisch, da sich hier die Rekonstruktion des klinischen Verlaufs als besonders schwierig gestaltete. In nur 4 Fällen wurden Aneurysmen auch neuropathologisch festgestellt; außerdem ließen sich Mirkoaneurysmen und nicht dokumentierte Traumata (z.B. bei bewusstlos aufgefundenen Patienten) nicht ausschließen. Wir schätzten, dass die Fälle der SAB-Gruppe zu 1/3 traumatische und nur zu 2/3 spontane Subarachnoidalblutungen erlitten.

Außerdem war zu bedenken, dass wahrscheinlich bei allen Autopsiefällen unserer SAB-Gruppe durch lebensrettende Maßnahmen und Intensivtherapie vor dem Tod mit einem hypoxischen Hirnschaden im Verlauf zu rechnen gewesen war, und sich auch dadurch die gemessene Steigerung der adulten Neurogenese erklären lassen würde. Weiterhin wich die Alters- und Geschlechterverteilung der SAB-Gruppe von der der Kontrollgruppe ab. Es dürfen also Daten aus unserer SAB-Gruppe nicht als Evidenz, sondern nur als Hinweis betrachtet werden.

5.1.2 Immunhistochemie und In-situ-tailing

Wir entschieden uns für die Marker PCNA, Tuc-4, und Calretinin sowie für In-situ-tailing aus ganz praktischen Gründen, wie Auswertbarkeit und Kompatibilität zu den in Formalin fixierten und paraffinierten Gewebeproben von den Autopsiefällen. Wir gingen davon aus, dass die intrazellulären Marker sich durch das neuropathologische Prozedere nicht veränderten, und wir somit an den Gewebeproben retrospektiv jenen Zustand beobachten konnten, der in den ZNS der Autopsiefälle kurz vor deren Versterben anzutreffen gewesen wäre.

Vor allem die adulte Neurogenese hätten wir gerne noch mit weiteren spezifischen Markern unterschiedlicher Bedeutung untersucht, allerdings stellte sich in zahlreichen Vorversuchen im Rahmen dieser Studie heraus, dass die Marker Calbinin, DCX, GFAP, Ki-67 und Nestin nicht zu dem formalinfixiertem paraffinierten Gewebe kompatibel waren.

Folgend sind die Eigenschaften der verwendeten Marker und deren Bedeutung näher geschildert:

PCNA

• Das Protein PCNA wird in allen mitotischen Zellen zwischen der G1-Phase und dem G2/M-Übergang exprimiert, was durch die Halbwertszeit von 20 Stunden der Zeit während und kurz nach der Mitose entspricht (Kurki et al. 1988). Es ist identisch mit Cyclin, einem intranuklearen Cofaktor der DNS-Polymerase δ und spielt somit in der S-Phase der Mitose eine zentrale Rolle (Bravo et al. 1987) - was auch erklärt, warum sich die PCNA-Proteine im Interspeziesvergleich stak ähnelten (Mathews et al. 1984).

 Der Antikörper monoclonal mouse anti-PCNA reagiert nach Angaben des Herstellers Chemicon mit dem PCNA-Protein von Insekten und Wirbeltieren, unter anderem Menschen, und markiert somit ausschließlich Zellen, die sich in oder kurz nach der Mitose befinden. Allerdings war durch diesen Marker keine Aussage über die Differenzierung der Zellen zu machen.

Tuc-4

• Tuc-4 ist ein zytoplasmatisches Protein, das eine entscheidende Rolle beim Auswachsen und der Zielfindung von Axonen in der embryonalen und adulten Neurogenese spielt, und ausschließlich während dieser exprimiert wird (Quinn et al. 1999). Die einzelnen

Mitglieder der Tuc-Familie^{*)} sind zum Teil speziesspezifisch, weisen allerdings eine große Homologität auf (Quinn et al. 1999). Im Rattenembryo waren sie ausschließlich in der Zeit vom fünften bis zum vierzehnten Tag zu finden, in der auch die Masse der Axonen auswuchsen (Minturn et al. 1995). Seki (2002) ging davon aus, dass in der adulten Neurogenese Tuc-4 nur in der ersten bis vierten postmitotischen Woche exprimiert wird.

Der Antikörper polyclonal rabbit anti-Tuc-4 reagiert nach Angaben des Herstellers Chemicon spezifisch mit bestimmten Domänen des Tuc-4-Proteins, zeigt somit wenig Kreuzreaktionen und markiert die wachsenden Neuronen hauptsächlich randständig, also zytoplasmatisch. Die Morphologie, Größe und Position der Tuc-4-gefärbten Zellen in dieser Studie ließ nur eine Interpretation als unreife Körnerzellen zu - unter der Berücksichtigung, keine Aussage über das Alter der jungen Neuronen treffen zu können.

Calretinin

• Das Calretinin-Protein ist ein Kalzium-bindendes Kanalprotein der ,EF-hand'-Familie, wichtig für die Ausbildung neuronaler Aktionspotentiale (Schwaller et al. 1994). Es wird nur in jungen postmitotischen Neuronen exprimiert, die den ,point-of-no-return' zur neuronalen Differenzierung schon überschritten haben (Brandt et al. 2003). Es war zum Teil schon einen Tag nach der Markierung durch BrdU zu erkennen, wurde aber spätestens nach sechs Wochen durch das Folgeprotein Calbindin abgelöst (Schwaller et al. 1994).

• Der Antikörper polyclonal rabbit anti-calretinin reagiert nach Angaben des Herstellers Swant spezifisch mit dem Calretinin-Protein von Menschen, Affen, Ratten und Mäusen und zeigt insbesondere keine Kreuzreaktion zu Calbinin. Wir interpretierten die Calretiningefärbten Zellen im Gyrus dentatus, auch wegen Morphologie, Größe und Position, ausschließlich als junge postmitotische Neuronen. Die zahlreichen Ausläufer sowie die faser-/ netzartigen Strukturen ohne erkennbaren Ursprung (siehe Abbildung 13, Seite 46) entsprachen dabei wahrscheinlich auswachsenden axonalen Moosfasern und dem wachsenden Dendritenbaum.

In-situ-tailing

In-situ-tailing wurde erstmals von Gavrieli et al. (1992) beschrieben und ist eine seitdem verbesserte und oft verwendete Methode zum Nachweis der bei Apoptose charakteristischen DNS-Fragmente (Negoescu et al. 1996). Eine apoptotische Zelle bliebt mit In-situ-tailing ca. 1-3 Stunden lang nachweisbar (Negoescu et al. 1996). Wir verwendeten In-situ-tailing

^{*),} Tuc' ist ein Kunstname, zusammengesetzt aus den Anfangsbuchstaben eines Teils der Mitglieder: <u>,t</u>urned on after division, 64 kD', <u>,u</u>nc-33-like phosphoprotein' und <u>,c</u>ollapsin response mediated protein'.

zusammen mit bestimmten morphologischen Kriterien (intensiv schwarzer, runder, zusammengeballter, kleiner Zellkern im Vergleich zu den anderen Körnerzellen mit einem schmalen Zytoplasmasaum), um apoptotische Körnerzellen im Gyrus dentatus zu erkennen. Durch die zusätzliche Verwendung morphologischer Kriterien konnten wir apoptotischer Körnerzellen insbesondere von nekrotischen Zellen abgrenzen (Gerber et al. 2001, Negoescu et al. 1996).

Gegenfärbungen

Hämalaun nach Mayer

Bei der Immunhistochemie von PCNA, Tuc-4 und Calretinin verwendeten wir zur Gegenfärbung den lila/ blauen basophilen Farbstoff Hämalaun nach Mayer. Dieser stellt nach der elektrostatischen Färbetheorie als positiver Ladungsträger grundsätzlich negativ geladene, also basische Strukturen dar, insbesondere die Phosphatgruppen der Kern-DNS. Durch die kontrastreiche Färbung der Kerne konnte sowohl die Fläche des Gyrus dentatus planimetrisch vermessen werden, als auch die Körnerzellen von nicht neuronalen Strukturen (z.B. Monozyten, Blutgefäße) abgegrenzt werden (Schwerdtfeger 1984).

Kernechtrot

Bei der Gegenfärbung von In-situ-tailing verwendeten wir Kernechtrot, einen basischen Lackfarbstoff, der nach Angaben des Herstellers Roche die DNS tief rot anfärbt. Das Zytoplasma und andere Strukturen werden durch den restlichen freien Farbstoff hellrosa. Vor allem die gute Darstellung der Kerne war für die Planimetrie, und als Farbkontrast zu den durch In-situ-tailing dunkelblau/ schwarz gefärbten Strukturen wichtig.

5.2 Diskussion der Ergebnisse - zentrale Hypothesen

5.2.1 Neurogenese und Apoptose nach zentraler Hypoxie

Tierexperimentelle Vergleichsmodelle

Am Tiermodell verwendete man die operative Obstruktion aller vier extrazerebralen hirnversorgenden Arterien (,4-vessel-obstruction', 4-VO) zur Erzeugung eines hypoxischen Hirnschadens (Pulsinelli and Brierley 1979). Durch Okklusion von einzelnen extra- bzw. intrazerebralen Arterien konnten fokale Ischämien erzeugt werden.

Zerebrale Hypoxie und adulte Neurogenese im hippokampalen Gyrus dentatus

Nach hypoxischem Hirnschaden fanden wir durch Immunhistochemie von Tuc-4 und Calretinin, beides Marker neuronaler Differenzierung, eine signifikante Steigerung der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus um den Faktor 1,95-2,33 im Vergleich zu Kontrollfällen.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen fanden Tonchev and Yamashima (2006) durch BrDU- und β -III-tubulin-Immunhistochemie am Makakenaffen eine Steigerung der adulten Neurogenese nach 4-VO um das 2- bis 3-Fache.

An Wüstenrennmäusen fanden Sharp et al. (2002) ebenfalls eine 5- bis 10-fach gesteigerte adulte Neurogenese nach 4-VO mittels BrDU- und NeuN-Immunhistochemie (neuronal specific nuclear protein). Dabei gingen 25% der Zellen wieder unter - der Rest differenzierte sich zu 2/3 zu jungen Neuronen, 1/3 wurde zu GFAP-gefärbten Gliazellen.

Bei *neugeborenen* Ratten wurde wiederum durch Immunhistochemie von BrDU und des ,neuronal differentation transcription factor' eine Steigerung um nur 14-27% festgestellt (Vert and Daval 2006) - wobei unklar blieb, ob bei neugeborenen Ratten gerade wegen der an sich enormen Bildung von Nervenzellen (embryonale Neurogenese) keine ähnlich ausgedehnte Steigerung der Neurogenese wie in anderen Tiermodellen möglich war, oder ob es einen anderen Grund gab (Qiu et al. 2007).

Wir konnten allerdings keine gesteigerte Anzahl proliferierender PCNA-expimierender Zellen nach Hypoxie feststellen, obwohl wir durch Tuc-4- und Calretinin-Immunhistochemie eine gesteigerte Neurogenese im Gyrus dentatus nach Hypoxie nachwiesen. Das war aufgrund der unterschiedlichen Expressionszeiten dieser Proteine im Verlauf der Entstehung eines jungen Neurons nicht verwunderlich: Das PCNA-Protein wird nur bis zum G2/M-Übergang exprimiert (Kurki et al. 1988), wohingegen Tuc-4 in der ersten bis vierten (Seki 2002) und

Calretinin in den ersten sechs postmitotischen Wochen nachzuweisen sind (Schwaller et al. 1994).

Insgesamt gab es sowohl im Tiermodell, wie auch bei Menschen sehr wohl eine Reaktion adulter Neurogenese im Gyrus dentatus auf Hypoxie, womit dieser Teil der Nullhypothesen abzulehnen war. Die funktionelle Rolle dieser Ergebnisse blieb allerdings noch ungeklärt.

Zerebrale Hypoxie und adulte Neurogenese in anderen Regionen

Zusätzlich wurde am Tiermodell eine Steigerung der adulten Neurogenese nach 4-VO in der SVZ in Makakenaffen und neugeborenen Ratten gefunden (Daval and Vert 2004, Tonchev et al. 2005). Von dort sollten unter diesen Bedingungen auch vermehrt junge Neuronen in das Striatum und den Neokortex auswandern (Tonchev and Yamashima 2006, Tonchev et al. 2005, Yang et al. 2007).

Von der hippokampalen CA1-Region gab es widersprüchliche Ergebnisse nach 4-VO: Schmidt and Reymann (2002) fanden zwar eine gesteigerte adulte Neurogenese nach Hypoxie in der Wüstenrennmaus, Tonchev and Yamashima (2006) konnten diese Beobachtung aber nicht bei Makakenaffen reproduzieren.

Fokale Ischämie und adulte Neurogenese im Gyrus dentatus

Es sei nochmals betont, dass die fokale Ischämie ein grundsätzlich anderes Krankheitsbild als der hypoxische Hirnschaden darstellt. Nun waren allerdings einige wichtige Aspekte mit der 4-VO noch nicht ausreichend untersucht, sodass aus folgenden interessanten tierexperimentellen Daten von fokaler Ischämie eventuell auf grundsätzliche Reaktionen mangelversorgter Hirnareale geschlossen werden kann:

• Eine recht lange Ischämie von über 10 Minuten war nötig, um adulte Neurogenese überhaupt zu stimulieren (Liu et al. 1998).

• In der ischämisch stark betroffenen CA1-Region bestand kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des Zelluntergangs und Neurogenese (Nakatomi et al. 2002).

• Nach einseitiger fokaler Ischämie war eine Steigerung der adulten Neurogenese sowohl im ipsilateralen, als auch im nicht betroffenen kontralateralen Gyrus dentatus zu verzeichnen (Darsalia et al. 2005).

Ob solche Angaben auch für den hypoxischen Hirnschaden gelten, musste allerdings noch eruiert werden.

Zerebrale Hypoxie und Apoptose im hippokampalen Gyrus dentatus

In der vorliegenden Studie stellten wir neben der gemessenen Steigerung der Neurogenese nach hypoxischem Hirnschaden allerdings auch eine signifikante Zunahme apoptotischer Körnerzellen durch In-situ-tailing kombiniert mit morphologischen Kriterien fest.

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen wurde ein vermehrtes Auftreten von Apoptosen in den Körnerzellen des Gyrus dentatus bereits bei ganz ähnlichen Autopsiefällen nach hypoxischem Hirnschaden (Nau et al. 2002) und auch nach Meningitiden festgestellt (Gerber et al. 2001, Nau et al. 1999).

Die einzigen tierexperimentellen Studien zu neuronaler Apoptose nach 4-VO stammten von neugeborenen Ratten, bei denen übereinstimmend mit unseren Ergebnissen auch eine Steigerung neuronaler Apoptose im Gyrus dentatus festgestellt worden war (Daval and Vert 2004, Pulera et al. 1998, Vert and Daval 2006). Allerdings muss beachtet werden, dass einige Körnerzellen des Gyrus dentatus neugeborener Ratten nach 4-VO schnell in Nekrose und andre dann erst verzögert in Apoptose untergingen (Northington et al. 2001) - und zwar ganz im Gegensatz zu Pyramidenzellen (beispielsweise in CA1), unter welchen im Tierexperiment schon fast grundsätzlich nur Nekrosen zu finden waren (Pulera et al. 1998).

Dabei wiesen alle Autopsiefälle der Hypoxiegruppe dieser Studie neben zahlreichen Apoptosen im Gyrus dentatus (Körnerzellen) ebenfalls einen erheblichen nekrotischen Schaden in der hippokampalen CA1-Region auf (Pyramidenzellen), was als typisches morphologisches Kriterium zuvor neuropathologisch zur Diagnose des hypoxischen Hirnschadens verwendet wurde.

Da alle bisherigen Studien zur Apoptose im Gyrus dentatus, inklusive dieser Arbeit, in der Kontrollgruppe im Median 0,0 apoptotische Körnerzellen pro mm² fanden, konnte wegen des mathematischen Verbots der Teilung durch Null, nie ein Steigerungsfaktor errechnet werden, wie es sonst üblich wäre, um Ergebnisse aus verschiedenen Studien miteinander zu vergleichen.

Insgesamt war dieser Teil der Nullhypothesen ebenfalls abzulehnen.

Die Rolle der Apoptose und der funktionelle Zusammenhang zu gesteigerter adulter Neurogenese waren allerdings stark umstritten (Kermer et al. 2004): einerseits könnte es sich um einen gegenregulierenden Mechanismus handeln oder andererseits um Auslese. Ein zumindest gleichzeitiges Auftreten von Apoptose und Neurogenese im Gyrus dentatus wurde im Tiermodell neben dem hypoxischen Hirnschaden auch nach Meningitiden und Ischämien nachgewiesen (Daval and Vert 2004, Pulera Gerber et al. 2003, Martin et al. 2000, Vert and Daval 2006).

5.2.2 Neurogenese und Apoptose nach spontaner SAB

Ganz im Gegensatz zu unseren Ergebnissen von einer gesteigerten hippocampalen adulten Neurogenese nach SAB wurde in einer Studie an Mäusen eine leichte Abnahme der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus festgestellt, nachdem durch katheterinterventionelle Perforation der Zerebralarterien eine SAB induziert worden war (Mino et al. 2003).

Nun wurde aber ebenfalls in einer anderen Studie an Menschen erst kürzlich das Verhalten von neokortikaler adulter Neurogenese nach SAB untersucht (Sgubin et al. 2007). Sie untersuchten Hirnmaterial, das im Rahmen von ,clipping'-Operationen entnommen worden war, um einen besseren neurochirurgischen Zugang zu erhalten. Diese ausschließlich neokortikalen Hirnanteile zeigten allerdings lediglich eine gesteigerte Expression sehr früher neuronaler Stammzellmarker und nur sehr begrenzt eine Kolokalisation mit dem Proliferationsmarker Ki-67 in den selben Zellen im Vergleich zu ähnlich gewonnenen Präparaten aus neurochirurgischen Hirntumoroperationen (zu weiteren Erkenntnissen neokortikaler adulter Neurogenese bei Menschen siehe Seite 69).

Insgesamt blieb das Verhalten der adulten Neurogenese nach spontaner SAB, auch wegen den methodischen Problemen unserer SAB-Gruppe, unklar.

Weiterhin zeigte die vorliegende Studie keine Änderung der Apoptoserate im Gyrus dentatus nach SAB bei Autopsiefällen. Zu einem komplett gegensätzlichen Ergebnis kam allerdings eine vergleichbare Studie an Autopsiefällen, die deutlich mehr Apoptosen im Gyrus dentatus bei Autopsiefällen nach SAB als bei Kontrollfällen feststellte (Nau et al. 2002). Nun wurde auch eine gesteigerte Apoptoserate an Kaninchen nach Injektion von Hämolysat-Blut in den Subarachnoidalraum gefunden - allerdings wurde recht unspezifisch der gesamte basale Anteil des Temporallappens untersucht (Wang et al. 2005). In der Apoptose von Körnerzellen wird ein eigenständiger Pathomechanismus vermutet, der neben dem bekannten nekrotischem Zelluntergang wegen Ischämie durch Vasospasmen bei SAB vorkommen soll.

Insgesamt mussten wir eingestehen, dass in Anbetracht der methodischen Probleme mit der SAB-Gruppe, trotz der Ergebnisse der vorliegenden Studie, eine Steigerung der Apoptose nach SAB bei Autopsiefällen anzunehmen war.

5.3 Diskussion der Ergebnisse - weiterführende Fragen

5.3.1 Neurogenese und Apoptose nach Hypoxie - Altersvergleich

Unsere Studie zeigte bei älteren Patienten (bis 85 Jahre) eine viel geringer ausgeprägte Steigerung der Neurogenese nach Hypoxie als bei Jüngeren (ab 35) - der Unterschied blieb auch bestehen, nachdem die unterschiedlichen Zeiten vom hypoxischen Ereignis bis zum Tod miteingerechnet worden waren - verlor allerdings die Signifikanz. Vergleichsdaten vom Tiermodell, die auch von einer weniger stark ausgeprägten Steigerung der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus und der SVZ bei älteren Ratten sprechen, existierten allerdings nur von fokaler Ischämie (Darsalia et al. 2005, Jin et al. 2004b), die grundsätzlich vom hypoxischen Hirnschaden abzugrenzen ist.

Interessanterweise fanden wir bei älteren Patienten unserer Hypoxiegruppe nicht mehr apoptotische Körnerzellen als bei jüngeren.

Diese beiden Ergebnisse könnten von zukünftiger therapeutischer Relevanz sein (siehe Seite 74).

5.3.2 Neurogenese und Apoptose bei Kontrollen - Altersvergleich

Von Tierexperimenten an Ratten war gut bekannt, dass die natürliche adulte Neurogenese im hippokampalen Gyrus dentatus mit steigendem Alter abnimmt (Tabelle 22).

	Marker	Alter der Ratten	Veränderung in diesem Zeitraum
Kuhn et al. (1996)	BrDU, Calbindin, NeuN, polysialic acid-neural cell adhesion molecule	6 bis 21 Monate	Abnahme auf ca. 12 %
Jin et al. (2004b)	BrDU, DCX	3 bis 24 Monate	Abnahme auf ca. 40%
Heine et al. (2004)	BrDU, NeuN	0,5 bis 24 Monate	Abnahme auf ca. 1 %
McDonald and Wojtowicz (2005)	BrDU, Calbindin, DCX	1 bis 12 Monate	Abnahme auf ca. 8 %
Darsalia et al. (2005)	BrdU, Ki67, DCX, NeuN	3 bis 15 Monate	Abnahme auf ca. 20%
Hattiangady and Shetty (2008)	sex determining region Y box 2	4 bis 24 Monate	Keine signifikante Veränderung

Tabelle 22. Erkenntnisse über Altersabhängigkeit der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus bei Ratten. Ratten haben eine Lebenserwartung von ca. 2-3 Jahren.

In unserer Studie kamen wir bei den Autopsiefällen ohne neuropathologische Auffälligkeiten - von wohlgemerkt ausschließlich *erwachsenen* Patienten - zu einem Schluss, der den ersten 5 Studien an Ratten in Tabelle 22 komplett widersprach: Wir stellten fest, dass natürliche adulte Neurogenese und allgemeine Proliferation im selben Umfang bis ins hohe Alter fortbestanden - und zwar ohne Zunahme apoptotischer Körnerzellen. Andere Studien zur adulten Neurogenese beim Menschen machten leider keine vergleichbare explizite Aussage zu Veränderungen der adulten Neurogenese mit steigendem Alter bei Fällen ohne neuropathologische Auffälligkeiten.

Die gänzlich anderen Ergebnisse der genannten Tierexperimente zum Verlauf adulter Neurogenese mit steigendem Alter, könnten aus einer im Vergleich sehr hohen Neurogenese in den ersten Lebensmonaten resultieren. Betrachtete man beispielsweise die Studie von Heine et al. (2004) genauer, so stellte man fest, dass ab der sechsten Woche die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus nur noch leicht abnimmt, und ab dem Alter von 12 Monaten nahezu auf einem Niveau bleibt, was durchaus mit unseren Ergebnissen zu vereinen war. In einer neulich erschienenen Studie wurde mit dem extrem frühen Neurogenesemarker ,sex determining region Y box 2' ebenfalls beschrieben, dass die Dichte von NSC im Gyrus dentatus bei Ratten ab dem 4. Lebensmonat mit steigendem Alter dann gleich bleibt (Hattiangady and Shetty 2008).

Es wäre grundsätzlich nicht verwunderlich, dass adulte Neurogenese bei Menschen mit steigendem Alter gleich bleibt, wenn man sie als physiologischen Vorgang in der Funktion des menschlichen ZNS betrachtet (siehe Seite 71).

5.3.3 Verlauf der Neurogenese und Apoptose nach zentraler Hypoxie

Grundsätzlich muss zunächst erwähnt werden, dass es bisher keine Methode gab, adulte Neurogenese im Verlauf bei der selben Zelle von dem selben Versuchsobjekt zu beobachten, da die histologische Aufarbeitung entweder nur postmortal oder zumindest nach einer Biopsie möglich war. Aussagen über den "Verlauf" basierten daher meistens auf einem Vergleich von zwei Gruppen.

Ähnlich wurde auch in der vorliegenden Studie versucht, den *Verlauf* der Neurogenese nach Hypoxie zu beschreiben, indem Autopsiefälle mit unterschiedlichen Abständen von dem jeweiligen hypoxischen Ereignis bis zum Tod miteinander verglichen wurden.

Insgesamt konnten wir in der Hypoxiegruppe also die ersten 59 Tage nach Hypoxie untersuchen, in denen wir eine Steigerung der Neurogenese im Verlauf feststellen, die auch bestehen blieb, nachdem wir das Alter der Patienten als interferierende Kontrollvariable mit hinzu gezogen hatten - allerdings ohne Signifikanz.

Im Makakenaffen nach 4-VO hatte die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus ihr Maximum nach 44 Tagen erreicht, wobei die jungen Neuronen mindestens 79 Tage überlebten (Tonchev and Yamashima 2006). Bei Wüstenrennmäusen begann der Anstieg nach 7 Tagen, fand nach 11 Tagen sein Maximum, um anschließend wieder abzusinken (Sharp et al. 2002). Allerdings gab es gerade in den ersten Tagen nach 4-VO in einer Studie an Ratten sogar einen negativen Effekt auf die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus, und es proliferierten hauptsächlich gliale Zellen (Pforte et al. 2005).

Wenn man nun davon ausginge, dass auch bei Menschen nach einem Ereignis, das Neurogenese stimuliert hatte, erst ein Anstieg und dann nach einem Maximum wieder ein Abflachen der Neurogenese zu beobachten wäre, wie es am Tiermodell nach 4-VO gezeigt wurde, dann schien bei genauerer Betrachtung der Abbildung 10 rechts unten auf Seite 42 das Maximum der Neurogenese nicht vor dem 15. bis 30. Tag nach der Hypoxie zu liegen.

Interessanterweise blieb die allgemeine Proliferation und die Apoptoserate im Verlauf nach Hypoxie durchweg auf dem selben Niveau.

5.4 Aktueller Stand der Neurogeneseforschung

Gyrus dentatus des Hippokampus	Makakenaffen, Kaninchen, Mäuse, Ratten	Gerber et al. (2003), Kempermann et al. (2003), Tauber et al. (2006), Stanfield and Trice (1988), van Praag et al. (2002)
CA1 des	Wüstenrenn-	Schmidt and Reymann (2002)
Hippokampus	mäuse	
CA3 des	Ratten	Scharfman et al. (2000)
Hippokampus		
SVZ	Makakenaffen,	Gould et al. (1999b), Shingo et al. (2003),
	Mäuse, Ratten	Zhang et al. (2006)
Bulbus olfactorius	Ratten	Winner et al. (2002)
Amygdala	Totenkopf- und	Bernier et al. (2002)
	Makakenaffen	
Substantia nigra	Mäuse	Zhao et al. (2003)
Nucleus dorsalis	Ratten	Bauer et al. (2005)
nervi vagi		
Striatum	Makakenaffen	Tonchev et al. (2005)

5.4.1 Weitere Regionen adulter Neurogenese im Tiermodell

Tabelle 23. Regionen natürlicher adulter Neurogenese bei verschiedenen Säugetieren.

Bei Säugetieren ist im Tiermodell mittlerweile in einer Vielzahl von Regionen natürliche adulte Neurogenese, d.h. ohne Stimuli, festgestellt worden (Tabelle 23). Die stärkste Aktivität adulter Neurogenese war im Gyrus dentatus und in der SVZ zu beobachten. Während der Ablauf und das Migrarionsziel adulter Neurogenese im Gyrus dentatus schon gut bekannt waren (siehe Seite 13), gab es in letzter Zeit zum Teil entgegensetzte Berichte über die Eigenschaften adulter Neurogenese in der SVZ - insbesondere das Migrationsziel der jungen Neuronen war noch unklar. Diskutiert wurden der Bulbus olfactorius, das Striatum und auch neokortikale Hirnteile (Chen et al. 2004, Gould et al. 1999b, Tonchev and Yamashima 2006, Tonchev et al. 2005, Yang et al. 2007) (zu Forschungsergebnissen von der menschlichen SVZ siehe unten).

Sonderfall Neokortex

Der Neokortex des Säugers ist das komplexeste neuronale Netzwerk überhaupt; der Nachweis adulter Neurogenese direkt aus lokalen Stammzellen des Neokortex war allerdings stark umstritten. Zwei Studien sollen exemplarisch herausgegriffen und dargestellt werden:

• Trotz erster positiver Ergebnisse an verschiedenen Affenarten zeigten Kornack and Rakic (2001) in einer groß angelegten Studie an Makakenaffen, dass keine einzige proliferierende BrDU-gefärbte Zelle im Neokortex neuronale Marker koexprimierte. Sie hoben hervor, dass es zwar einige suspekte Objekte gegeben hätte, bei denen BrDU in der Nähe eines neuronalen Markers exprimiert wurde - allerdings nie in derselben Zelle.

• Dayer et al. (2005) wiesen in einer anderen aufwändigen Arbeit durch 21 verschiedene immunhistochemische Primärantikörper bei adulten Ratten in manchen neokortikalen Arealen gewisse Vorstufen von Neuronen mit dem Neurotransmitter GABA nach.

Da adulte Neurogenese der Neuronen des Neokortex einen riesigen Sprung neuer potentieller Therapieansätze bedeuten würde (siehe Seite 74), wird es in Zukunft sicherlich zahlreiche weitere Experimente zu dieser Thematik geben.

5.4.2 Neurogenese bei Menschen - Zusammenfassung der bisherigen Daten

Erstmalig wiesen Eriksson et al. (1998) adulte Neurogenese bei Menschen nach. Sie analysierten das ZNS von 5 Autopsiefällen, die zu Lebzeiten den Proliferationsmarker BrDU zu diagnostischen Zwecken wegen einer Krebserkrankung injiziert bekommen hatten, und fanden postmortal nicht nur sehr viele BrDU markierte Zellen im Gyrus dentatus, sondern

auch, dass diese Zellen zusätzlich die immunhistochemischen Neurogenesemarker NeuN, Calbindin und NSE exprimierten.

Injektionen BrDU, wie auch viele andere übliche Methoden der Da von Neurogeneseforschung (z.B. Markierung mit Fluorogold oder Retroviren) potentiell toxisch sind, war mit diesen Substanzen aus ethischen Gründen sicherlich keine umfangreiche Forschung beim Menschen möglich. Ein wichtiger Fortschritt war die komplett postmortal, also an Autopsiefällen, durchführbare Immunhistochemie durch eine Kombination mitosenspezifischer Zellproteine mit Markern neuronaler Differenzierung, wie sie erstmals von Jin et al. (2004a) und auch in der vorliegenden Studie angewandt wurde.

Bei einer weiteren sehr interessanten Methode (Bhardwaj et al. 2006) wurde die weltweite Verbreitung des Isotops Kohlenstoff C^{14} genutzt, welches in großen Mengen fast ausschließlich bei Atombombentests während des Kalten Krieges freigesetzt wurde (so Bhardwaj et al. 2006). Wurde bei einem Menschen, der vor dem Kalten Krieg geboren wurde, zu Lebzeiten nach diesen Atombombentests in einer mitotischen Zelle bei der DNS-Synthese anstelle von C^{12} dieses Isotop C^{14} eingebaut, konnte man jene Zellen schließlich postmortal via Durchflusszytometrie detektieren, und somit das Alter der Zellen feststellen. Allerdings fanden sie mit dieser Methode keine Neurone im humanen Neokortex, die nach der Geburt entstanden sind.

Einer neuen Studie an Präparaten aus der neurochirurgischen Therapie von Epilepsien zu Folge schienen junge Neurone allerdings nicht nur in der SVZ an sich vorzukommen, sondern auch in Richtung des Neokortex auszuwandern (González-Martínez et al. 2007). Nun wurden jüngst in Gehirnbiopsien von Schlaganfallpatienten auch Zellen um Blutgefäße in der Penumbrazone gefunden, die Proliferationsmarker zum Teil gleichzeitig mit Markern junger Neuronen exprimierten (Jin et al. 2006) - was jene migrierenden jungen Neuronen gewesen sein könnten.

Alle Beobachtungen zusammengefasst (Tabelle 24) waren noch viele Fragen über adulte Neurogenese beim Menschen offen - sie schien jedenfalls keine einheitliche Reaktion auf verschiedene Stimuli zu sein, sondern ein verschiedentlich reguliertes Ereignis, dem die jeweilige Situation zu Grunde liegt.

Gyrus dentatus	✓	adulte Neurogenese	Eriksson et al. (1998)
	\checkmark	bis ins hohe Alter	Eriksson et al. (1998),
			Vorliegende Arbeit
	↑	bei Demenz vom Alzheimer-	Jin et al. (2004a),
		Typ (nicht präsenil)	
	?	nach SAB	Sgubin et al. (2007),
			Vorliegende Arbeit
	↑	nach zentraler Hypoxie	Vorliegende Arbeit
	\downarrow	durch Radio-/ Chemotherapie	Monje et al. (2007)
CA1	\checkmark	adulte Neurogenese	Jin et al. (2004a)
	↑	bei Demenz vom Alzheimer-	Jin et al. (2004a)
		Тур	
Bulbus olfactorius	\checkmark	adulte Neurogenese	Bédard and Parent (2004)
SVZ	\checkmark	adulte Neurogenese	González-Martínez et al. (2007)
	↑	bei Epilepsie	González-Martínez et al. (2007)
Neokortex	Ó	keine adulte Neurogenese,	Bhardwaj et al. (2006),
	\checkmark	aber gewisse Vorläuferzellen,	González-Martínez et al. (2007),
		evtl. aus der SVZ	Jin et al. (2006)

Tabelle 24. Überblick über die bisherigen Erkenntnisse zur adulten Neurogenese bei Menschen. Wegen der methodischen Unterschiede zwischen den Studien ist in dieser Übersicht jeweils nur angegeben, ob adulte Neurogenese bestätigt (\checkmark) oder wiederlegt worden ist (\otimes), bzw. ob eine Steigerung (\uparrow) oder Verminderung (\downarrow) der adulten Neurogenese festgestellt worden ist.

5.4.3 Spekulationen über die Funktion adulter Neurogenese im Gyrus dentatus

Über die Funktion der adulten Neurogenese kann nach wie vor nur spekuliert werden. Die drei folgenden Hypothesen sind zwar bekannt, aber nicht unumstritten:

Explizites Gedächtnis

Lange wurde die Funktion der adulten Neurogenese im hippokampalen Gyrus dentatus ausschließlich als Bestandteil des expliziten Gedächtnisses angesehen; schließlich stellt dies die Hauptfunktion des Hippokampus selber dar (siehe Seite 13). Diese These wurde von zahlreichen Studien untermauert: Bei Vögeln zum Beispiel wurde schon sehr früh ein Zusammenhang zwischen hippokampaler Neurogenese und dem Erlernen neuer Gesänge intensiv beforscht (Alvarez-Buylla et al. 1988) und bei vielen Säugetieren war ein Zusammenhang zwischen adulter Neurogenese und einer vielseitigen, neuen Umgebung bzw. zu hippokampusspezifischen Lernaufgaben bekannt (Gould et al. 1999a, Kempermann et al. 1997b, Lemaire et al. 1999), wohingegen soziale Isolation bei Ratten zu Verminderung der adulten Neurogenese führte (Lu et al. 2003). Wahrscheinlich ist auch die Steigerung der adulten Neurogenese durch körperliche Betätigung bei Mäusen hiermit in Zusammenhang zu sehen (van Praag et al. 1998).

In einer Übersichtsarbeit von Leuner et al. (2006) wurden nun erschöpfend zahlreiche Argumente für und gegen einen Zusammenhang zwischen Neurogenese und explizitem Gedächtnis diskutiert. Insgesamt kamen die Autoren zu dem Schluss, dass wenn, dann insbesondere *unreife* Neuronen im Gyrus dentatus eine besondere Rolle bei synaptischer Plastizität oder kurzzeitiger Speicherung neuer Assoziationen haben könnten, und dabei gleichzeitig wichtig sein könnten, um den Kontakt zu CA3, dem Autoassoziationsnetzwerk, aufrecht zu erhalten.

Neurogenese und Depression

Zur Pathogenese der Depression gibt es zahlreiche neurobiologische Hypothesen, die alle eine Fehlfunktion in verschiedenen Regionen bzw. Systemen des ZNS des Patienten annehmen (Schüle et al. 2007). Nun hatte sich zu diesen in letzter Zeit die "Neurotropin-Hypothese' mit eingereiht, die davon ausgeht, dass ein Mangel an neurotrophen Faktoren, vor allem von "brain-derived neurotrophic factor', durch Beeinträchtigung der hippokampalen Neurogenese zu Depression führt (Schüle et al. 2007).

Aus Magnetresonanztomographie-Studien war nun schon lange bekannt, dass starke Depression zu einer Volumenabnahme des Hippokampus führt (Sheline et al. 1999), in letzter Zeit hat sich die Evidenz der Neurotropin-Hypothese aber weiter ausgebaut:

Zum einen Teil beruft sich diese auf das Serotonin (5-HT)-System. Jüngst wurde bei Ratten eine direkte Wirkung von 5-HT auf adulte Neurogenese im Gyrus dentatus über den 5-HT 1A-Heterorezeptor nachgewiesen (Banasr et al. 2004). Aber auch der Effekt von Antidepressiva (Serotonin-Wiederaufnahmehemmer) auf depressives Verhalten ließ sich bei Mäusen nach Ausschaltung der Neurogenese nicht mehr nachweisen (Santarelli et al. 2003). Zu beachten ist allerdings, dass die Neurogenese in diesem Experiment durch Bestrahlung (15 Gy) ausgeschaltet worden war, sodass es auch zu zahlreichen anderen Wechselwirkungen gekommen sein konnte; z.B. war eine starke Steigerung neuronaler Apoptose im Gyrus dentatus aus Experimenten mit Bestrahlung an Ratten (10 Gy) und auch Mäusen (18 Gy) bekannt (Nagai et al. 2000, Peissner et al. 1999). Interessanterweise ließ sich adulte Neurogenese auch in Tiermodellen ohne Depression durch Antidepressiva stimulieren (Dranovsky and Hen 2006).

Zum anderen Teil ließe sich die klinisch zu beobachtende Latenz von der Einnahme von Antidepressiva bis zum Beginn der Wirkung (ca. 1 bis 2 Wochen) durch das Wachstum junger Neuronen erklären (Schüle et al. 2007).
Hinzu kamen noch Überlegungen zu Glukokortikoiden, die als Stresshormone bei Depressionen bekannt waren (Schüle et al. 2007), und auch als Bremse der Neurogenese wirken können (Tauber et al. 2006).

Veränderung der Neurogenese nach pathologischer Neuronenschädigung

Bei vielen verschiedenen neurologischen Krankheitsbildern ließen sich neben zerebraler Hypoxie und Ischämie sowie SAB im Tiermodell und an Menschen eine gesteigerte adulte Neurogenese im Gyrus dentatus nachweisen, wobei zahlreiche schädliche Substanzen zu einer Verminderung adulter Neurogenese führten (Tabelle 25).

Chorea Huntington	Autopsiefälle	↑	Curtis et al. (2003)
Demenz vom Alzheimer-Typ	Autopsiefälle	\uparrow	Jin et al. (2004a)
Epilepsie	Ratten	1	Parent et al. (1997)
Mechanische Hirnverletzung	Ratten	\uparrow	Dash et al. (2001)
Meningitiden	Mäuse, Kaninchen	1	Gerber et al. (2003)
Bestrahlung	Ratten	\downarrow	Parent et al. (1999)
Ethanol	Ratten	\downarrow	Nixon and Crews (2002)
Glukokortikoide	Büschelaffen	\downarrow	Tauber et al. (2006)
Stress	Büschelaffen	\downarrow	Gould et al. (1998)

Tabelle 25. Auswahl der Erkenntnisse über die Beeinflussbarkeit adulter Neurogenese durch zahlreiche weitere neurologische Krankheitsbilder und äußere Einflüsse. Auch in dieser Übersicht ist jeweils nur die untersuchte Spezies und eine Steigerung (\uparrow) bzw. Verminderung (\downarrow) der adulten Neurogenese angegeben.

Ob es sich bei der gesteigerten adulten Neurogenese bei diesen neurologischen Krankheitsbildern auch um einen kausalen Zusammenhang handelt, war noch unklar. Es kamen drei ganz unterschiedliche Möglichkeiten in Betracht (nach Abrous et al. 2005):

• Es handelt sich dabei um einen hirneigenen zellulären Regenerationsmechanismus, ähnlich der synaptischer Plastizität.

• Die gesteigerte Neurogenese ist eine besondere Reaktion des Hippokampus auf die Hirnschädigung, dient aber *nicht* der Regeneration - sondern z.B. um die Funktionsweise des Hippokampus auf die neu entstandene Situation im Rahmen der Schädigung anzupassen.

• Die aus anderen Gründen gesteigerte adulte Neurogenese ist selber die Ursache für eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber der Schädigung. Dieser nicht zu vernachlässigende Gedankengang stützt sich vor allem darauf, dass experimentelle Anordnungen in der Erforschung der adulten Neurogenese immer auf einem Gruppenvergleich basierten, und nicht jedes Versuchsobjekt vor und nach der Schädigung untersucht worden war (Abrous et al. 2005).

5.5 Therapeutischer Ausblick

Auch wenn die Theorie eines hirneigenen zellulären Regenerationsmechanismus durch adulte Neurogenese noch Gegenstand der Diskussion ist, gründen sich auf dieser aktuelle Bestrebungen, adulte Neurogenese auch therapeutisch einzusetzen. Die zentralen Fragestellungen sind, ob die jungen Neuronen vollständig funktionell integriert werden, und ob bzw. in welchen Regionen ein derartiger Mechanismus therapeutisch genutzt werden kann. Ein Erfolg würde einen enormen Sprung in der Therapie des hypoxischen Hirnschadens und zahlreicher anderer neurologischer Krankheitsbilder darstellen.

Grundsätzlich müssen nach Rossi and Cattaneo (2002) bei Überlegungen zur neuronalen Stammzelltherapie drei Gegebenheiten bedacht werden:

• die Pathogenese des Zelluntergangs, da neue Neuronen sich nur in noch vorhandene neuronale Netze eingliedern lassen,

• die Lokalisation der untergegangenen Zellen, da Areale mit wenigen Neuronenarten leichter zu ersetzen wären als komplexere Netzwerke, und

• die Progression des Zelluntergangs. Wenn die Krankheit auch nach Stammzelltherapie weiterhin fortschreitet, müsste wiederholt therapiert werden.

Zwei Ansatzpunkte kamen nun in Frage:

Exogene Stammzelltherapie

Die exogene Stammzelltherapie setzt sich zum Ziel, von außen Neuronen in bestehende neuronale Netze funktionell zu integrieren. Bei entsprechender Züchtung ließen sich Neuronen wahrscheinlich grundsätzlich sowohl aus humanen embryonalen Stammzellen (ESC), wie auch aus NSC gewinnen (Alvarez-Buylla and Jackson 2005, S. 416f, 425-428, Lindvall and Kokaia 2006), was zwar eine verlockende Idee wäre, allerdings bedeutet insbesondere die Verwendung von ESC Probleme ethischer und moralischer Art (siehe Heinemann and Honnefelder 2002).

Medikamentöse Anregung - Neurogenese aus endogenen Stammzellen

Die endogene Stammzelltherapie setzt sich zum Ziel, durch Aktivierung endogen vorhandener NSC und folgende adulte Neurogenese untergegangene Neuronen zu ersetzen. Dabei würden entweder lokale, sich direkt im beschädigten Areal befindliche NSC aktiviert, oder man ließe junge Neuronen gezielt aus bekannten Neurogenesegebieten einwandern (Sohur et al. 2006).

Die Idee besteht darin, diese beiden Vorgänge zu induzieren, wozu z.B. verschiedene Wachstumsfaktoren wie der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Yoshimura et al. 2001), der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) (Baldauf and Reymann 2005), der Heparin-bindende EGF-ähnliche Wachstumsfaktor (Jin et al. 2004c) und Erythropoetin (Shingo et al. 2001), oder lokale Mediatoren, wie z.B. Gefäßendothel-Wachstumsfaktor-Rezeptorantagonisten (Kawai et al. 2006) und die induzierbare Nitritoxidase (Zhu et al. 2003), sowie Medikamente, beispielsweise Statine (Chen et al. 2003), Antidepressiva (Dranovsky and Hen 2006) und Sildenafil (Zhang et al. 2006) infrage kommen, die aus tierexperimentellen Vorversuchen bekannt waren.

Insgesamt ist dies ein sehr vielversprechender Ansatz, der trotz vieler in letzter Zeit aufgetretener technischer Probleme in Zukunft nicht aus dem Auge verloren werden und weiter untersucht werden sollte. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie von weniger ausgeprägter Steigerung adulter Neurogenese nach Hypoxie bei älteren Patienten müsste dann allerdings zusätzlich die Frage berücksichtigt werden, ob eine therapeutische Beeinflussung adulter Neurogenese bei älteren Patienten weniger effektiv als bei jungen Patienten sein könnte.

<u>6. ZUSAMMENFASSUNG</u>

Der hypoxische Hirnschaden ist die Hauptursache für Komplikationen nach primär erfolgreicher kardiopulmonaler Reanimation und führt zu schwersten Schäden im Hippokampus und Neokortex.

Die spontane Subarachnoidalblutung (SAB) durch Aneurysmaruptur ist die häufigste intrakranielle Blutung zwischen 35 und 65 Jahren - 30% der Patienten versterben bereits prähospital.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit dem Einfluss des hypoxischen Hirnschadens bzw. der SAB auf adulte Neurogenese und Apoptose im hippokampalen Gyrus dentatus, als mögliche hirneigene zelluläre regenerative Mechanismen.

Retrospektiv wurden Gewebeproben des Hippokampus von 22 Autopsiefällen mit hypoxischem Hirnschaden, 11 mit SAB und 19 Kontrollfällen ohne neuropathologische Auffälligkeiten histologisch und immunhistochemisch untersucht.

Im Gyrus dentatus der Fälle mit hypoxischem Hirnschaden stellten wir eine signifikant höhere Dichte Tuc-4-markierter unreifer Körnerzellen und junger Calretinin-exprimierender Neuronen im Vergleich zu den Kontrollen fest (p = 0,0002 bzw. 0,0001). Vergleichbar stieg allerdings auch die Dichte apoptotischer Körnerzellen an (gemessen durch In-situ-tailing und morphologische Kriterien) (p = 0,014). Weiterhin fanden wir Hinweise darauf, dass erstens im Verlauf nach dem hypoxischen Ereignis sich die adulte Neurogenese noch steigerte, und dass zweitens die adulte Neurogenese nach einem hypoxischen Ereignis bei älteren Patienten weniger stark ausgeprägt war.

Im Gegensatz dazu wurden bei den Kontrollfällen weder die Dichte apoptotischer, noch die Tuc-4- oder Calretinin-exprimierender Zellen vom Alter beeinflusst.

In den Fällen mit SAB fanden wir ebenfalls eine signifikant erhöhte Dichte Tuc-4- und Calretinin-exprimierender Zellen im Gyrus dentatus (p = 0,001 bzw. p = 0,036), mussten aber gleichzeitig auf methodische Probleme dieser Gruppe hinweisen, insbesondere deren Inhomogenität.

Insgesamt wurde also sowohl ein Anstieg von adulter Neurogenese als auch von Apoptose nach hypoxischem Hirnschaden beobachtet.

Inwieweit adulte Neurogenese im Gyrus dentatus für therapeutische oder rehabilitative Zwecke genutzt werden könnte, ist noch Gegenstand zukünftiger Forschung.

7. ANHANG

7.1 Methodischer Anhang

Antikörper

Alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase complex (1:50, Dako, Kopenhagen, Denmark),

biotinylated donkey anti-rabbit antibody (1:200, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), biotinylated sheep anti-mouse antibody (1:200, Amersham, Buckinghamshire, UK), monoclonal mouse anti-PCNA antibody (1:200, Chemicon, Temecula, CA, USA), monoclonal mouse anti-rabbit antibody (1:50, Dako, Kopenhagen, Denmark), polyclonal rabbit anti-calretinin antibody (1:1000, Swant, Bellinzona, Switzerland), polyclonal rabbit anti-Tuc-4 antibody (1:200, Chemicon, Temecula, CA, USA),

rabbit anti-mouse antibody (1:50, Dako, Kopenhagen, Denmark),

sheep anti-digoxigenin antibody (FAB fragments, 1:250, Roche, Mannheim, Germany).

Ansetzen der Lösungen

Antikörper, Avidin-Biotin-Komplex, FCS und Proteinase K: angegebenes Verhältnis im jeweiligen Arbeitspuffer.

DAB Lösung: 10% DAB in DAB-substrate-peroxid-buffer.

FCS: 10% in Arbeitspuffer.

H₂O₂ Lösung: 3ml H₂O₂ ad 50ml PBS.

HCl/ Alcohol: 175 ml Isopropylalkohol, 2,5 ml HCl 25% ad 250 ml H₂O bidest.

NBT/ BCIP: 225 µl NBT, 175 µl BCIP ad 50ml TBS.

Neofuchsin Lösung: 20mg Levamisol ad 50 ml TBS. 10mg Natriumnitrit + 250ul H₂O bidest.

+ 100ul Neofuchsin mischen und zufügen. 14mg Naphthol-AS-Bi-Phosphat + 300ul N,N-Dimethylformamid mischen und zufügen. PH auf 8,8 einstellen mit 1M NaOH, filtern und sofort verwenden.

PBS Lösung: 9,55g PBS-Pulver ad 11 H₂O bidest.

Sinkende Alkoholreihe: 100%, 90%, 70%, 50% Isopropylalkohol in H₂O bidest.

Tailingmixtur: 10 μg Tailing-Puffer, 1 μl Digoxigenin DNA labeling mix, 2 μl Kobaltchlorid, 0,5 μl terminale Transferase ad 50 μl H₂O bidest.

TBS Lösung: 17,0g NaCl + 12,1g TRIS ad 2l H₂O bidest., pH auf 7,5 einstellen mit 1M HCl.

Zitratpuffer pH=6 Lösung: 2,1g Zitrat ad. 11 H₂O bidest. pH auf 6,0 einstellen mit 1M NaOH.

Chemikalien, Lösungen und Pulver

DAB-substrate-peroxide-buffer (Roche, Mannheim, Deutschland), Diaminobenzidin, DAB substrate (Roche, Mannheim, Deutschland), Digoxigenin DNA labeling mix (Roche, Mannheim, Deutschland), FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland), H₂O₂ 30% (Merk, Darmstadt, Deutschland), HCl, Salzsäure 1N (Merk, Darmstadt, Deutschland), Isopropylalkohol, 2-Propanolol (Merk, Darmstadt, Deutschland), Kernechtrot, red-aluminium hydroxide (Roche, Mannheim, Germany), Kobaltchlorid (Roche, Mannheim, Deutschland), Levamisole hydrochloride (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA), Hämalaun nach Mayer (Merk, Darmstadt, Deutschland), N,N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), NaCl, Natriumchlorid (Merk, Darmstadt, Deutschland), NaOH, Natronlauge 1N (Merk, Darmstadt, Deutschland), Naphthol-AS-Bi-Phosphat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Natriumnitrit (Merk, Darmstadt, Deutschland), NBT, 4-Nitroblue-Tetrazoliumchlorid (Roche, Mannheim, Deutschland), NCIP, 5-Bromo-4-Chlorid-3-Indolylphosphat (Roche, Mannheim, Deutschland), Neofuchsin Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), PBS Dublecco 9,55 g/l (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), Proteinase K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Tailing-Puffer (Roche, Mannheim, Deutschland), Terminale Transferase (Roche, Mannheim, Deutschland), TRIS (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), Xylol (Merk, Darmstadt, Deutschland). Zitrat, Zitronensäure-Monohydrat (Merk, Darmstadt, Deutschland),

Geräte

Gefrierschrank-Oeko-Super (Liebherr Hausgeräte, Biberach an der Riss, Deutschland), Heizlüfter HERAhybrid12, 100C (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland), Kühlschrank FKS 3610 (Liebherr Hausgeräte, Biberach an der Riss, Deutschland),

- Lichtmikroskop, Systemmikroskop für die Materialforschung BX 51 TF (Olympus, Hamburg, Deutschland),
 - mit Objektiv 2x, 4x, 10x, 20x, 40x, 60x, 100x,
 - mit Kamera, ColorView II Kamera Set,
 - mit Computer SIS Workstation Standart, 110400,
 - mit Bildschirm, SyncMaster 110378 (Samsung, Darmstadt, Deutschland),
 - mit Bildanalyse-Software, analySIS Doku Ver. 3.2 (Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland),
- Magnet-Rührer heat-stir CB162 (Barloworld Scientific, Staffordshire, UK),
- Mikrotom SM 2000 R (Leica, Nussloch, Deutschland),
- Mikrowelle Energia NN-E203WB EPG (Panasonic, Wiesbaden, Deutschland),
- pH-Elektrode SenTix 41 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland),
- pH-Meter inoLab pH Level 2, E 163694 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland),
- Pipetten 100-1000ul, 20-200ul, 2-20ul, 0,5-10ul (Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland),
- Waage PT 150 (Sartorius, Göttingen, Deutschland),
- Wärmeplatte KG, SP 13 (Nagel, Kiel, Deutschland).

Entsorgung

DAB-substrate-peroxid-buffer, DAB, DAB-Lösung, HCl, Kernechtrot, Levamisol, N,N-Dimethylformamid, NaOH, Naphthol-AS-Bi-Phosphat, NBT/ BCIP, Neofuchsin, Neofuchsin Lösung und Xylol durften nicht in den normalen Müll bzw. in das Abflusssystem, sondern mussten getrennt entsorgt werden.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

- ABC Avidin-Biotin-Komplex
- AKZ apoptotische Körnerzellen
- APAAP Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
- BCIP 5-Bromo-4-Chlorid-3-Indolylphosphat
- BrDU Brom-Desoxy-Uridin
- C Kohlenstoff
- CA Cornu ammonis
- DCX doublecortin
- DAB Diaminobenzidin
- DNS Desoxyribonukleinsäure
- EGF epidermaler Wachstumsfaktor
- ESC embryonale Stammzellen
- FCS fetales Kälberserum
- GABA Gamma-amino-buttersäure
- GFAP glial fibrial acid protien
- H₂O bidest. doppelt destilliertes Wasser
- H_2O_2 Wasserstoffperoxyd
- 5-HT Serotonin
- Hy Hypoxie
- Ko Kontrolle
- m männlich
- NBT 4-Nitroblue-Tetrazoliumchlorid
- NeuN neuronal specific nuclear protein
- NSC neuronale Stammzellen
- NSE neuronenspezifische Enolase
- PBS phosphate buffered saline
- PCNA proliferating cell nuclear antigen
- SAB Subarachnoidalblutung
- SVZ subventrikuläre Zone des Seitenventrikelunterhorns
- TdT terminale desoxynukleotidyl-Transferase
- Tuc-4 TOAD-64/ Ulip/ CRMP-4
- 4-VO 4-vessel-obstruction

w - weiblich

ZNS - zentrales Nervensystem

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Abrous D, Koehl M, Le Moal M (2005): Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. Physiol Rev <u>85</u>, 523 569
- Adams J (2003): Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. Genes Dev 17, 2481 1295
- Adams R, Victor M, Ropper A: Prinzipien der Neurologie. 6. Auflage, deutsche Ausgabe; hrsg. v. Hartung H, Poewe W, Reichmann H; Mcgraw-Hill Verlag, London UK 2000
- Altman J, Das G (1965): Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol <u>124</u>, 319 335
- Alvarez-Buylla A, Jackson L: Stem Cells in the Adult Brain: Their Identification and Role in Neurogenesis; in: Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine. 2.
 Ausgabe, 13. Auflage; hrsg. v. Meyers R; Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2005, 409 - 436
- Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F (1988): Birth of projection neurons in the higher vocal center of the canary forebrain before, during, and after song learning. Proc Natl Acad Sci USA <u>85</u>, 8722 - 8726
- Amrein I, Slomianka L, Lipp H (2004): Granule cell number, cell death and cell proliferation in the dentate gyrus of wild-living rodents. Eur J Neurosci <u>20</u>, 3342 - 3350
- Baldauf K, Reymann K (2005): Influence of EGF/bFGF treatment on proliferation, early neurogenesis and infarct volume after transient focal schemia. Brain Res <u>1056</u>, 158 167
- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A (2004): Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. Neuropsychopharmacology <u>29</u>, 450 - 460
- Bauer S, Hay M, Amilhon B, Jean A, Moyse E (2005): In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. Neuroscience 130, 75 90
- Bédard A, Parent A (2004): Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. Brain Res Dev Brain Res <u>151</u>, 159 168.
- Berger R, Garnier Y (2000): Perinatal brain injury. J Perinat Med 28, 261 285

- Bernier P, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A (2002): Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. Proc Natl Acad Sci USA <u>99</u>, 11464 11649
- Bhardwaj R, Curtis M, Spalding K, Buchholz B, Fink D, Björk-Eriksson T, Nordborg C, Gage F, Druid H, Eriksson P, Frisén J (2006): Neocortical neurogenesis in humans is restricted to development. Proc Natl Acad Sci USA <u>103</u>, 12564 - 12568
- Bien C, Granata T, Antozzi C, Cross J, Dulac O, Kurthen M, Lassmann H, Mantegazza R,
 Villemure J, Spreafico R, Elger C (2005): Pathogenesis, diagnosis and treatment of
 Rasmussen encephalitis: a European consensus statement. Brain <u>128</u>, 454 471
- Bischofberger J, Schmidt-Hieber C (2006): Adulte Neurogenese im Hippocampus. Neuroforum <u>3/06</u>, 212 - 221
- Boenisch T: Antikörper; in: Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden. 3. Auflage; hrsg. v. Boenisch T; Dako Cytomation, Hamburg 2003a, 5 - 13
- Boenisch T: Färbemethoden Detektionssysteme; in: Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden. 3. Auflage; hrsg. v. Boenisch T; Dako Cytomation Verlag, Hamburg 2003b, 34 - 42
- Booth C, Boone R, Tomlinson G, Detsky A (2004): Is this patient dead, vegetative, or severely neurologically impaired? Assessing outcome for comatose survivors of cardiac arrest. JAMA <u>291</u>, 870 - 879
- Bortz J: Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler. 6. Auflage; Springer Verlag, Heidelberg 2005
- Brandt M, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W, Kempermann G (2003): Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. Mol Cell Neurosci 24, 603 613
- Bravo R, Frank R, Blundell P, Macdonald-Bravo H (1987): Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. Nature <u>326</u>, 515 517
- Broderick J, Brott T, Duldner J, Tomsick T, Leach A (1994): Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage. Stroke <u>25</u>, 1342 1347
- Cameron H, McKay R (2001): Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. J Comp Neurol <u>435</u>, 406 - 417

- Caplan L: Stroke Syndromes; in: Diseases of the Nervous System. 3. Ausgabe; hrsg. v. Asbury A, McKhann G, McDonald W, Goadsby P, McArthur J; Cambridge University Press Verlag, Cambridge UK 2002, 1345 - 1360
- Chen J, Zhang Z, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H, Zhang C, Lu M, Katakowski M, Feldkamp C, Chopp M (2003): Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. Ann Neurol <u>53</u>, 743 - 751
- Chen J, Magavi S, Macklis J (2004): Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice. Proc Natl Acad Sci USA <u>101</u>, 16357 16362
- Curtis M, Penney E, Pearson A, van Roon-Mom W, Butterworth N, Dragunow M, Connor B, Faull R (2003): Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. Proc Natl Acad Sci USA <u>100</u>, 9023 - 9027
- Darsalia V, Heldmann U, Lindvall O, Kokaia Z (2005): Stroke-induced neurogenesis in aged brain. Stroke <u>36</u>, 1790 1705
- Dash P, Mach S, Moore A (2001): Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury. J Neurosci Res <u>63</u>, 313 319
- Daval J, Vert P (2004): Apoptosis and neurogenesis after transient hypoxia in the developing rat brain. Semin Perinatol <u>28</u>, 257 63
- Dayer A, Cleaver K, Abouantoun T, Cameron H (2005): New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. J Cell Bio <u>168</u>, 415 -427
- Dranovsky A, Hen R (2006): Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. Biol Psychiatry <u>59</u>, 1136 1143
- Eckenhoff M, Rakic P (1988): Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. J Neurosci <u>8</u>, 2729 2747
- Edlow J, Caplan L (2000): Avoiding pitfalls in the diagnosis of subarachnoid hemorrhage. N Engl J Med <u>342</u>, 29 - 36
- Elmore S (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 35, 495 516
- Eriksson P, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn A, Nordborg C, Peterson D, Gage F (1998): Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat Med <u>4</u>, 1313 1317
- Frotscher M, Kugler P, Misgeld U, Zilles K (1988): Neurotransmission in the hippocampus. Adv Anat Embryol Cell Biol <u>111</u>, 1 - 103

- Gage F, Coates P, Palmer T, Kuhn H, Fisher L, Suhonen J, Peterson D, Suhr S, Ray J (1995): Survival and differentiation. of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. Proc Natl Acad Sci USA <u>92</u>, 11879 - 11883
- Gage F, Kempermann G, Palmer T, Peterson D, Ray J (1998): Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. J Neurobiol <u>36</u>, 249 266
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol <u>119</u>, 493 501
- Gerber J, Brück W, Stadelmann C, Bunkowski S, Lassmann H, Nau R (2001): Expression of death-related proteins in dentate granule cells in human bacterial meningitis. Brain Pathol <u>11</u>, 422 - 431
- Gerber J, Böttcher T, Bering J, Bunkowski S, Brück W, Kuhnt U, Nau R (2003): Increased neurogenesis after experimental Streptococcus pneumoniae meningitis. J Neurosci Res <u>73</u>, 441 446
- Geschwind D, Kelly G, Fryer H, Feeser-Bhatt H, Hockfield S (1996): Identification and characterization of novel developmentally regulated proteins in rat spinal cord. Brain Res Dev Brain Res <u>97</u>, 62 - 75
- González-Martínez J, Bingaman W, Toms S, Najm I (2007): Neurogenesis in the postnatal human epileptic brain. J Neurosurg <u>107</u>, 628 635
- Gould E, Tanapat P, McEwen B, Flügge G, Fuchs E (1998): Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. Proc Natl Acad Sci USA <u>95</u>, 3168 3171
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors T (1999a): Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. Nat Neurosci <u>2</u>, 260 265
- Gould E, Reeves A, Graziano M, Gross C (1999b): Neurogenesis in the neocortex of adult primates. Science <u>286</u>, 548 552
- Gross C (2000): Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. Nat Rev Neurosci <u>1</u>, 67 73
- Hassan A, von Rosenstiel P, Patchev V, Holsboer F, Almeida O (1996): Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. Exp Neurol <u>140</u>, 43 - 52

- Hastings N, Gould E (1999): Rapid extension of axons into the CA3 region by adultgenerated granule cells. J Comp Neurol <u>413</u>, 146 - 154
- Hattiangady B, Shetty A (2008): Aging does not alter the number or phenotype of putative stem/progenitor cells in the neurogenic region of the hippocampus. Neurobiol Aging <u>29</u>, 129 - 147
- Heine V, Maslam S, Joëls M, Lucassen P (2004): Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation. Neurobiol Aging <u>25</u>, 361 - 75
- Heinemann T, Honnefelder L (2002): Principles of ethical decision making regarding embryonic stem cell research in Germany. Bioethics <u>16</u>, 530 543
- Hunt W, Hess R (1968): Surgical risk as related to time of intervention in the repair of intracranial aneurysms. J Neurosurg <u>28</u>, 14 20
- Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group (2002): Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. N Engl J Med <u>346</u>, 549 556
- International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT) Collaborative Group (2002): International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT) of neurosurgical clipping versus endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: a randomised trial. N Engl J Med <u>360</u>, 1267 - 1274
- Jin K, Peel A, Mao X, Xie L, Cottrell B, Henshall D, Greenberg D (2004a): Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA <u>101</u>, 343 347
- Jin K, Minami M, Xie L, Sun Y, Mao X, Wang Y, Simon R, Greenberg D (2004b): Ischemiainduced neurogenesis is preserved but reduced in the aged rodent brain. Aging Cell <u>3</u>, 373 - 377
- Jin K, Sun Y, Xie L, Childs J, Mao X, Greenberg D (2004c): Post-ischemic administration of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) reduces infarct size and modifies neurogenesis after focal cerebral ischemia in the rat. J Cereb Blood Flow Metab <u>24</u>, 399 - 408
- Jin K, Wang X, Xie L, Mao X, Zhu W, Wang Y, Shen J, Mao Y, Banwait S, Greenberg D (2006): Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. Proc Natl Acad Sci USA 103, 13198 - 13202

- Johnson D, Amaral D: Hippocampus; in: Synaptic Organization of the Brain. 4. Auflage; hrsg. v. Shepherd G; Oxford University Press Verlag, Oxford USA 2003, 417 - 458
- Kaplan M, Bell D (1984): Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. J Neurosci <u>4</u>, 1429 1441
- Kassell N, Torner J, Haley E, Jane J, Adams H, Kongable G (1990): The International Cooperative Study on the timing of aneurysm surgery. Part 1: Overall management results. J Neurosurg <u>73</u>, 18 - 36
- Kawai T, Takagi N, Mochizuki N, Besshoh S, Sakanishi K, Nakahara M, Takeo S (2006): Inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase attenuates cellular proliferation and differentiation to mature neurons in the hippocampal dentate gyrus after transient forebrain ischemia in the adult rat. Neuroscience <u>141</u>, 1209 - 1216
- Kempermann G, Kuhn H, Gage F (1997a): Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. Proc Natl Acad Sci USA <u>94</u>, 10409 10414
- Kempermann G, Kuhn H, Gage F (1997b): More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature <u>386</u>, 493 495
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage F (2003): Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. Development <u>130</u>, 391 - 399
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004): Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. Trends Neurosci <u>27</u>, 447 452
- Kermer P, Liman J, Weishaupt J, Bähr M (2004): Neuronal apoptosis in neurodegenerative diseases: from basic research to clinical application. Neurodegener Dis <u>1</u>, 9 19
- Kornack D, Rakic P (1999): Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. Proc Natl Acad Sci USA <u>96</u>, 5768 5773
- Kornack D, Rakic P (2001): Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. Science <u>294</u>, 2127 2130
- Kuhn H, Dickinson-Anson H, Gage F (1996): Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. J Neurosci <u>16</u>, 2027 - 2033
- Kurki P, Ogata K, Tan E (1988): Monoclonal-antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow-cytometry. J Immunol Methods <u>109</u>, 49 - 59

- Lemaire V, Aurousseau C, Le Moal M, Abrous D (1999): Behavioural trait of reactivity to novelty is related to hippocampal neurogenesis. Eur J Neurosci <u>11</u>, 4006 4014
- Leuner B, Gould E, Shors T (2006): Is there a link between adult neurogenesis and learning? Hippocampus <u>16</u>, 216 - 224
- Lindvall O, Kokaia Z (2006): Stem cells for the treatment of neurological disorders. Nature <u>441</u>, 1094 1096
- Linn F, Rinkel G, Algra A, van Gijn J (1996): Incidence of subarachnoid hemorrhage: role of region, year, and rate of computed tomography: a meta-analysis. Stroke <u>27</u>, 625 629
- Liu J, Solway K, Messing R, Sharp F (1998): Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. J Neurosci <u>18</u>, 7768 7778
- Lu L, Bao G, Chen H, Xia P, Fan X, Zhang J, Pei G, Ma L (2003): Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. Exp Neurol <u>183</u>, 600 - 609
- Madl C, Holzer M (2004): Brain function after resuscitation from cardiac arrest. Curr Opin Crit Care <u>10</u>, 213 - 217
- Madl C, Kramer L, Domanovits H (2000): Improved outcome prediction in unconscious cardiac arrest survivors with sensory evoked potentials compared with clinical assessment.
 Crit Care Med <u>28</u>, 721 726
- Martens P, Raabe A, Johnsson P (1998): Serum S-100 and neuron-specific enolase for prediction of regaining consciousness after global cerebral ischemia. Stroke <u>29</u>, 2363 2366
- Martin L, Sieber F, Traystman R (2000): Apoptosis and necrosis occur in separate neuronal populations in hippocampus and cerebellum after ischemia and are associated with differential alterations in metabotropic glutamate receptor signaling pathways. J Cereb Blood Flow Metab <u>20</u>, 153 167
- Mathews M, Bernstein R, Franza B, Garrels J (1984): Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. Nature <u>309</u>, 374 376
- McDonald H, Wojtowicz J (2005): Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. Neurosci Lett <u>385</u>, 70 - 75

- Mino M, Kamii H, Fujimura M, Kondo T, Takasawa S, Okamoto H, Yoshimoto T (2003): Temporal changes of neurogenesis in the mouse hippocampus after experimental subarachnoid hemorrhage. Neurol Res <u>25</u>, 839 - 845
- Minturn J, Fryer H, Geschwind D, Hockfield S (1995): TOAD-64, a Gene Expressed Early in Neuronal Differentiation in the Rat, Is Related to uric-33, a C. elegans Gene Involved in Axon Outgrowth. J Neurosci <u>15</u>, 6757 - 6766
- Monje M, Vogel H, Masek M, Ligon K, Fisher P, Palmer T (2007): Impaired human hippocampal neurogenesis after treatment for central nervous system malignancies. Ann Neurol <u>62</u>, 515 - 520
- Nagai R, Tsunoda S, Hori Y, Asada H (2000): Selective vulnerability to radiation in the hippocampal dentate granule cells. Surg Neurol <u>53</u>, 503 507
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M (2002): Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. Cell <u>110</u>, 429 - 441
- Nau R, Soto A, Brück W (1999): Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. J Neuropathol Exp Neurol <u>58</u>, 265 274
- Nau R, Haase S, Bunkowski S, Brück W (2002): Neuronal apoptosis in the dentate gyrus in humans with subarachnoid hemorrhage and cerebral hypoxia. Brain Pathol <u>12</u>, 329 336
- Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E (1996): In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. J Histochem Cytochem <u>44</u>, 959 - 968
- Nixon K, Crews F (2002): Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. J Neurochem <u>83</u>, 1087 1093
- Nolan J, Deakin C, Soar J, Böttiger B, Smith G; European Resuscitation Council (2005):
 European Resuscitation Council guidelines for resuscitation 2005. Section 4. Adult
 advanced life support. Resuscitation <u>67 Suppl 1</u>, 39 86
- Northington F, Ferriero D, Graham E, Traystman R, Martin L (2001): Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis. Neurobiol Dis <u>8</u>, 207 - 219
- Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) (2007): OECD Health Data 2007, gesichtet am 20.05.2008 auf www.oecd.org

- Parent J, Tada E, Fike J, Lowenstein D (1999): Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat. J Neurosci <u>19</u>, 4508 5419
- Parent J, Yu T, Leibowitz R, Geschwind D, Sloviter R, Lowenstein D (1997): Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. J Neurosci <u>17</u>, 3727 - 9738
- Peissner W, Kocher M, Treuer H, Gillardon F (1999): Ionizing radiation-induced apoptosis of proliferating stem cells in the dentate gyrus of the adult rat hippocampus. Brain Res Mol Brain Res <u>71</u>, 61 - 68
- Pforte C, Henrich-Noack P, Baldauf K, Reymann K (2005): Increase in proliferation and gliogenesis but decrease of early neurogenesis in the rat forebrain shortly after transient global ischemia. Neuroscience <u>136</u>, 1133 1146
- Poeck K, Hacke W: Neurologie. 12. Auflage; Springer Verlag, Heidelberg 2006
- Pulera M, Adams L, Liu H, Santos D, Nishimura R, Yang F, Cole G, Wasterlain C (1998): Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. Stroke <u>29</u>, 2622 - 2630
- Pulsinelli W, Brierley J (1979): A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. Stroke <u>10</u>, 267 272
- Qiu L, Zhu C, Wang X, Xu F, Eriksson P, Nilsson M, Cooper-Kuhn C, Kuhn H, Blomgren K (2007): Less neurogenesis and inflammation in the immature than in the juvenile brain after cerebral hypoxia-ischemia. J Cereb Blood Flow Metab <u>27</u>, 785 794
- Quinn C, Gray G, Hockfield S (1999): A family of proteins implicated in axon guidance and outgrowth. J Neurobiol <u>41</u>, 158 164
- Rossi F, Cattaneo E (2002): Opinion: neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. Nat Rev Neurosci <u>3</u>, 401 - 409
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003): Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science 301, 805 809
- Schaarschmidt H, Prange H, Reiber H (1994): Neuron-specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases. Stroke <u>25</u>, 558 565

- Scharfman H, Goodman J, Sollas A (2000): Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. J Neurosci <u>20</u>, 6144 - 6458
- Schmidt W, Reymann K (2002): Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia. Neurosci Lett <u>334</u>, 153 156
- Schüle C, Baghai T, Rupprecht R (2007): Neue Erkenntnisse zur Pathogenese und Pathophysiologie der Depression. Nervenarzt <u>78 Suppl 3</u>, 531 547
- Schwab S, Krieger D, Müllges W: Neurologische Intensivmedizin; Springer Verlag, Berlin 1999
- Schwaller B, Buchwald P, Blümcke I, Celio M, Hunziker W (1994): Characterization of a polyclonal antiserum against the purified human recombinant calcium-binding protein calretinin. Cell Calcium <u>14</u>, 639 - 648
- Schwerdtfeger W (1984): Structure and fiber connections of the hippocampus. A comparative study. Adv Anat Embryol Cell Biol <u>83</u>, 1 74
- Scoville W, Milner B (1957): Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. J Neurol Neurosurg Psychiatry <u>20</u>, 11 - 21
- Seki T (2002): Expression patterns of immature neuronal markers PSA-NCAM, CRMP-4 and NeuroD in the hippocampus of young adult and aged rodents. J Neurosci Res <u>70</u>, 327 334
- Seki T (2003): Microenvironmental elements supporting adult hippocampal neurogenesis. Anat Sci Int <u>78</u>, 69 - 78
- Sgubin D, Aztiria E, Perin A, Longatti P, Leanza G (2007): Activation of endogenous neural stem cells in the adult human brain following subarachnoid hemorrhage. J Neurosci Res <u>85</u>, 1647 1655
- Shapiro L, Ribak C (2005): Integration of newly born dentate granule cells into adult brains: hypotheses based on normal and epileptic rodents. Brain Res Brain Res Rev <u>48</u>, 43 56
- Shapiro L, Upadhyaya P, Ribak C (2007): Spatiotemporal profile of dendritic outgrowth from newly born granule cells in the adult rat dentate gyrus. Brain Res <u>1149</u>, 30 37
- Sharp F, Liu J, Bernabeu R (2002): Neurogenesis following brain ischemia. Brain Res Dev Brain Res <u>134</u>, 23 - 30

- Sheline Y, Wang P, Gado M, Csernansky J, Vannier M (1999): Hippocampal atrophy in recurrent major depression. Proc Natl Acad Sci USA <u>93</u>, 3908 3913
- Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S (2001): Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. J Neurosci <u>21</u>, 9733 - 9743
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross J, Weiss S (2003): Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. Science <u>299</u>, 117 - 120
- Sohur U, Emsley J, Mitchell B, Macklis J (2006): Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci <u>361</u>, 1477 - 14497
- Stanfield B, Trice J (1988): Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. Exp Brain Res <u>72</u>, 399 406
- Steinvorth S, Levine B, Corkin S (2005): Medial temporal lobe structures are needed to reexperience remote autobiographical memories: evidence from H.M. and W.R. Neuropsychologia <u>43</u>, 479 - 96
- Tauber S, Schlumbohm C, Schilg L, Fuchs E, Nau R, Gerber J (2006): Intrauterine exposure to dexamethasone impairs proliferation but not neuronal differentiation in the dentate gyrus of newborn common marmoset monkeys. Brain Pathol <u>16</u>, 209 - 217
- Teasdale G, Drake C, Hunt W, Kassell N, Sano K, Pertuiset B, De Villiers J (1988): A universal subarachnoid hemorrhage scale: report of a committee of the World Federation of Neurosurgical Societies. J Neurol Neurosurg Psychiatry <u>51</u>, 1457
- Téllez-Zenteno J, Dhar R, Wiebe S (2005): Long-term seizure outcomes following epilepsy surgery: a systematic review and meta-analysis. Brain <u>128</u>, 1188 1198
- Thömke F, Weilemann S (2007): Prognose kardiopulmonal reanimierter Patienten ein Diskussionsbeitrag. Dtsch Arztebl <u>104</u>, 2879 2885
- Tonchev A, Yamashima T (2006): Differential neurogenic potential of progenitor cells in dentate gyrus and CA1 sector of the postischemic adult monkey hippocampus. Exp Neurol <u>198</u>, 101 13

- Tonchev A, Yamashima T, Sawamoto K, Okano H (2005): Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. J Neurosci Res <u>81</u>, 776 - 788
- Trepel M: Neuroanatomie. 3. Auflage; Urban & Fischer Verlag, München 2004
- Treves A, Rolls E (1994): Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. Hippocampus <u>4</u>, 374 - 391
- van Praag H, Kempermann G, Gage F (1998): Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. Nat Neurosci <u>2</u>, 266 270
- van Praag H, Schinder A, Christie B, Toni N, Palmer T, Gage F (2002): Functional neurogenesis in the adult hippocampus. Nature <u>415</u>, 1030 1034.
- Vert P, Daval J (2006): Cell death and neurogenesis after hypoxia: a brain repair mechanism in the developing rat? Bull Acad Natl Med <u>190</u>, 469 481
- Wang L, Shi J, Yin H, Ma C, Zhang Q (2005): The influence of subarachnoid hemorrhage on neurons: an animal model. Ann Clin Lab Sci <u>35</u>, 79 85
- Wardlaw J, White P (2000): The detection and management of unruptured intracranial aneurysms. Brain <u>123</u>, 205 221
- Wasiewski W, Fishman M (1988): Herpes simplex encephalitis: the brain biopsy controversy. J Pediatr <u>113</u>, 575 - 578
- Wijdicks E, Hijdra A, Young G, Bassetti C, Wiebe S (2006): Practice parameter: Prediction of outcome in comatose survivors after cardiopulmonyry resuscitation (an evidence-based review). Neurology <u>67</u>, 203 - 10
- Winner B, Cooper-Kuhn C, Aigner R, Winkler J, Kuhn H (2002): Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. Eur J Neurosci <u>16</u>, 1681 -1689
- Yang Z, Covey M, Bitel C, Ni L, Jonakait G, Levison S (2007): Sustained neocortical neurogenesis after neonatal hypoxic/ischemic injury. Ann Neurol <u>61</u>, 199 - 208
- Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, Teramoto T, Thomas S, Waeber C, Bakowska JC, Breakefield X, Moskowitz M (2001): FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A <u>98</u>, 5874 - 587

- Zandbergen E, de Haan R, Stoutenbeek C, Koelman J, Hijdra A (1998): Systematic review of early prediction of poor outcome in anoxic-ischemic coma. Lancet <u>352</u>, 1808 1812
- Zhang R, Zhang Z, Zhang L, Wang Y, Zhang C, Chopp M (2006): Delayed treatment with sildenafil enhances neurogenesis and improves functional recovery in aged rats after focal cerebral ischemia. J Neurosci Res <u>83</u>, 1213 1219
- Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy R, Johansson C, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson A (2003): Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. Proc Natl Acad Sci USA <u>100</u>, 7925 - 7930
- Zhu D, Liu S, Sun H, Lu Y (2003): Expression of inducible nitricoxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus. J Neurosci <u>2</u>, 223 - 229

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich noch allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. med. R. Nau danke ich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit durchführen zu können und für die - wie ich betonen möchte - exzellente Betreuung.

Frau Dr. med. S. Tauber und Herrn PD Dr. med. J. Gerber danke ich für die vielseitige Unterstützung und die zahlreichen lehrreichen Gespräche.

Herrn Prof. Dr. med. W. Brück möchte ich weiterhin meinen Dank dafür aussprechen, dass er uns die Präparate zur Verfügung stellte, und mit seinem Team immer freundlich zu Antworten auf Nachfragen bereit war.

Frau S. Bunkowski möchte ich für die technische Einführung in die Immunhistochemie und die ständige Hilfestellung danken.

Außerdem möchte ich mich noch bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. R. Nau bedanken, nicht zuletzt für die angenehme Atmosphäre, insbesondere auch für die vielen zahlreichen fruchtbaren Gespräche an diesen unzähligen Freitagvormittagen.

Für die finanzielle Unterstützung danken wir der Else Kröner-Fresenius-Stiftung.

Lebenslauf Wulf-Rainer Christoph Mattiesen

Ich wurde als erster Sohn der Nervenärztin Dr. med. Sunanne-Carlola Mattiesen und des Sanitätsoffiziers Dr. med. Bernd Mattiesen in Ulm, Baden-Württemberg am 06.08.1983 geboren. Dort besuchte ich die Schönenberg Grundschule von 1989 bis 1993 und ab 1993 das Schubert Gymnasium mit den Leistungskursen in Mathematik und Chemie und den Fremdsprachen Englisch (7 Jahre) und Französisch (7 Jahre). Im Jahr 2002 erlangte ich das Abitur mit der Abschlussnote 1,5.

Nach Ende der Schulzeit trat ich die Ausbildung zum Sanitätsoffizier und Arzt bei der Bundeswehr an und begann zum Wintersemester 2003/2004 mit dem Medizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen.

Während der Vorklinik absolvierte ich Praktika beim Gebirgssanitätsregiment 42 Kempten, dem Sanitätsführungskommando in Koblenz, beim Sanitätszentrum Ulm und im Bundeswehrkrankenhaus Hamburg. Das vorgeschriebene Krankenpflegepraktikum machte ich im Bezirkskrankenhaus für Neurologie und Psychiatrie in Günzburg.

Den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum) bestand ich mit der Note 1,0.

Im folgenden Studienabschnitt, der Klinik, absolvierte ich Praktika und Famulaturen im Bundeswehrkrankenhaus Bad Zwischenahn (Radiologie), im Bundeswehrkrankenhaus Koblenz (Notfallmedizin), im Bundeswehrkrankenhaus Ulm (Anästhesie und Neurologie), in der Praxis Dr. med. Lange in Ulm (Neurologie), in der Praxis Prof. Dr. med. Kochen in Waake (Allgemeinmedizin), im Klinikum Bremen-Ost (Innere Medizin), im Reinhard-Nieter-Krankenhaus Wilhelmshaven (Chirurgie), im St.Vincenz-Krankenhaus Paderborn (Gynäkologie und Pädiatrie) sowie im Maternity House in Gardabani, Georgien (Gynäkologie).

Neben dem Studium forschte ich in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. R. Nau.

Darüber hinaus engagierte ich mich im "SanOA e.v.", dem "Studentischen Arbeitskreis für Notfallmedizin" und der Diskussionsrunde "Humanistische Mediziner Göttingens". Beim Institut für Anatomie war ich 2005 bis 2008 als studentische Hilfskraft und Tutor angestellt.

In meiner Feizeit spiele ich im Universitätssport Badminton, gehe leidenschaftlich gerne Bergssteigen, fahre mehrwöchige Radtouren, reise durch Europa und zu meinen guten Freunden in Göttingen, Ulm und im Rest der Welt.

Seit April 2008 bin ich mit Irina Mattiesen, geb. Shukvani verheiratet. Sie ist Medizinstudentin aus Georgien. Durch sie fand ich großes Interesse an ihrer Heimat, Sprache und Kultur.

In Zukunft plane ich nach Abschluss des Examens und des Promotionsverfahrens den Einstig in das Berufsleben zur Ausbildung zum Internisten oder Neurologen.