Einfluss von hypoxisch-ischämischem Hirnschaden auf die Neurogenese und das strukturelle sowie funktionelle Outcome im Rattenmodell

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Anne Beate Ehlting

aus Dernbach

2025

Angefertigt mit der Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Hemmen Sabir

2. Gutachter: Prof. Dr. Albert Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 04.08.2025

Aus der Klinik für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **5**

1. Deutsche Zusammenfassung **7**

1.1 Einleitung 7

1.2 Material und Methoden 9

1.2.1 Tiermodell 9

1.2.2 Histologie und Immunhistochemie 11

1.2.3 ELISA 12

1.2.4 Verhaltenstests 13

1.2.5 MRT 14

1.2.6 Statistische Methoden 15

1.3 Ergebnisse 15

1.3.1 Morphologischer und struktureller Hirnschaden 15

1.3.2 Auswirkungen auf das funktionelle Outcome 16

1.3.3 Auswirkungen auf die Neurogenese 16

1.3.4 Auswirkungen auf die Expression von Wachstumsfaktoren 17

1.3.5 Auswirkungen von therapeutischer Hypothermie 17

1.4 Diskussion 18

1.5 Zusammenfassung 20

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung 21

2. Veröffentlichung **28**

3. Erklärung zum Eigenanteil 29

4. Danksagung 30

Abkürzungsverzeichnis

ADC	*Apparent Diffusion Coefficient*
BDNF	*Brain-Derived Neurotrophic Factor*
BrdU	Bromdesoxyuridin
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EPI-DTI	*Echo Planar Imaging Diffusion Tensor Imaging* = echoplanare Diffusions-Tensor-Bildgebung
FA	*Fractional Anisotropy*
HI	Hypoxie-Ischämie
HIE	hypoxisch-ischämische Encephalopathie
IGF-1	*Insulin-like Growth Factor 1*
KG	Körpergewicht
NGS	*Normal Goat Serum*
NOR	*Novel Object Recognition*
NSPC	*Neural Stem and Progenitor Cell*
NT	Normothermie
P	postnataler Tag
PBS	*Phosphate Buffered Saline* = phosphatgepufferte Salzlösung
RARE	*Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*

rpm	*revolutions per minute* = Umdrehungen pro Minute
SVZ	subventrikuläre Zone
TE	*Time of Echo* = Echozeit
TH	therapeutische Hypothermie
TP	*Time Point* = Zeitpunkt
TR	*Time of Repetition* = Repetitionszeit

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Wenn das Gehirn von Neugeborenen kurz vor, während oder kurz nach der Geburt mit zu wenig Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird, kann es zu einer hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie (HIE) kommen (Danladi und Sabir, 2021; Greco et al., 2020). Gründe hierfür sind beispielweise ein Nabelschnurvorfall oder eine akute Plazentalösung (Yildiz et al., 2017). Die Inzidenz beträgt in Industriestaaten rund 2 pro 1.000 Lebendgeburten, in Entwicklungsländern ist sie mit 10-20 pro 1.000 Lebendgeburten noch deutlich höher (Greco et al., 2020; Wassink et al., 2019). Damit stellt die HIE eine der häufigsten Ursachen für das Versterben bzw. das Erleiden lebenslanger Beeinträchtigungen von reifen, also termingerecht geborenen Neugeborenen dar (Shin et al., 2020; Yildiz et al., 2017). Eine HIE äußert sich u.a. durch Krampfanfälle, einen schwachen Muskeltonus oder Stoffwechselstörungen (Greco et al., 2020). Die Letalität der HIE ist mit 15-25 % sehr hoch und viele der Überlebenden erleiden lebenslange neurologische Beeinträchtigungen (Volpe, 2012; Yildiz et al., 2017). Zu den häufigsten langfristigen Folgen zählen die Zerebralparese, Epilepsie, Probleme mit dem Seh- und Hörvermögen, kognitive Einschränkungen sowie Entwicklungsverzögerungen (Greco et al., 2020; Yildiz et al., 2017). Unter Einbeziehung verschiedener Parameter, wie z. B. der Herzfrequenz, dem Muskeltonus und weiterer Parameter aus neurologischen Untersuchungen, kann die HIE in eine milde, moderate und schwere Form unterteilt werden (Halpin et al., 2022).

Aktuell ist die einzige etablierte neuroprotektive Behandlung der HIE die therapeutische Hypothermie (TH). Hierbei wird die Körperkerntemperatur der Neugeborenen kontrolliert auf 33-34 °C herabgesenkt und so für 72 h aufrechterhalten (Greco et al., 2020; Higgins et al., 2011). Die Kühlung kann entweder als Ganzkörper-Kühlung oder als selektive Kühlung des Kopfes erfolgen, wobei für keine der beiden Methoden eine eindeutige Überlegenheit gezeigt werden konnte. TH wird standardmäßig bei moderater bis schwerer HIE eingesetzt (Wassink et al., 2019). Diese Therapie ist jedoch sehr unspezifisch und mit einer Number Needed to Treat von 9-11 profitiert nur ein geringer Teil der

Neugeborenen davon (Greco et al., 2020; Nabetani et al., 2022). Außerdem ist die TH sehr belastend für das Neugeborene und erfordert intensivmedizinische Betreuung (Backe et al., 2022). Weitere mögliche Therapieoptionen sind aktuell Gegenstand intensiver Forschung, sowohl in Kombination mit der TH als auch als eigenständige Interventionen. Dazu zählen z. B. Pharmaka wie Melatonin, Allopurinol, Topimarat oder Erythropoetin (Greco et al., 2020; Wassink et al., 2019; Yildiz et al., 2017).
Neugeborene, die lediglich eine milde Enzephalopathie erleiden, werden aktuell nicht routinemäßig mit TH therapiert. Es ist Gegenstand der aktuellen Forschung, ob die Anwendung der TH auch bei milder HIE durchgeführt werden sollte. Gegenwärtig konnten weder positive noch negative Effekte ausgeschlossen werden (Kariholu et al., 2020). Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie von milder bis moderater Hypoxie-Ischämie könnte zur Klärung dieser Frage beitragen.

Zum Zeitpunkt der Geburt unterliegt sowohl das menschliche Gehirn als auch das Gehirn von Ratten noch einem Entwicklungs- und Reifungsprozess (Donega et al., 2013). Teil dieses Prozesses ist die Neurogenese. Als Neurogenese bezeichnet man die Differenzierung von neuralen Stamm- und Vorläuferzellen (NSPC) zu reifen Neuronen. Sie beginnt pränatal, setzt sich aber auch postnatal fort und kann in bestimmten Regionen auch im adulten Gehirn noch stattfinden (Urban und Guillemot, 2014). Hierzu zählen die subgranuläre Zone im Gyrus dentatus und die subventrikuläre Zone (SVZ), die an die Seitenventrikel angrenzt (Ming und Song, 2011; Ong et al., 2005). In der SVZ befinden sich neben NSPCs auch reifere Vorstufen von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten sowie Mikroglia (Matarredona et al., 2018; Ong et al., 2005). Unter physiologischen Bedingungen wandern die neuronalen Vorläuferzellen im adulten Gehirn von der SVZ über den rostralen Migrationsstrom zum Bulbus olfactorius und entwickeln sich dort zu Interneuronen. Im Tierversuch konnte bereits gezeigt werden, dass nach einer Hirnschädigung im adulten Gehirn die Zellen auch zu den geschädigten Regionen wandern (Ong et al., 2005). Die Datenlage bezüglich der Effekte von Hypoxie-Ischämie (HI) auf die Neurogenese bei Neugeborenen ist sehr konträr und sowohl eine Steigerung als auch eine Hemmung sind beschrieben (Bregere et al., 2017; Fisch et al., 2020; Kwak et al., 2015).

Ziel dieser Arbeit ist ein besseres Verständnis für die Effekte der milden-moderaten HI auf das neonatale Gehirn v.a. hinsichtlich der Neurogenese sowie dem funktionellen Outcome. Außerdem soll der Effekt der TH in diesem Kontext untersucht werden, um zur Klärung der Frage beizutragen, ob diese Therapie auch in Fällen milder HIE eingesetzt werden soll. Hier wird ein etabliertes Tiermodell mit Ratten verwendet (Rice et al., 1981).

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Tiermodell

Als Tiermodell wurden neugeborene Wistar-Ratten beider Geschlechter verwendet. Die Ratten wurden gemeinsam mit ihrer Mutter und dem restlichen Wurf in Standardkäfigen, bei einer konstanten Raumtemperatur von 21 °C gehalten. Es bestand ein zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus. Nahrung und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Im Alter von drei Wochen wurden die Tiere von ihrer Mutter getrennt und mit maximal drei gleichgeschlechtlichen Geschwistern in einem Käfig gehalten. Für die Tierversuche liegt eine Genehmigung vor (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, 81-02.04.2018.A166).

Die Tiere wurden in drei verschiedene Versuchsgruppen eingeteilt. Diese Einteilung erfolgte randomisiert, unabhängig des Geschlechts, des Gewichts oder der Zugehörigkeit zu bestimmten Würfen. Bei den drei Gruppen handelte es sich um eine Kontrollgruppe, eine HI-Normothermie- (HI-NT) sowie eine HI-TH-Gruppe. Der Kontrollgruppe wurde weder ein Hirnschaden zugefügt noch erhielten sie eine Behandlung mit TH. Der HI-NT-Gruppe wurde ein hypoxisch-ischämischer Hirnschaden zugefügt und anschließend wurde sie bei Normothermie (rektale Temperatur von 37 °C) gehalten. Der HI-TH-Gruppe wurde ebenfalls der hypoxisch-ischämische Hirnschaden zugefügt, gefolgt von einer fünfstündigen TH, bei der die Körperkerntemperatur auf 32 °C herabgesenkt wurde.

Sieben Tage nach der Geburt (P7) wurde den Ratten der Gruppen HI-NT und HI-TH ein unilateraler hypoxisch-ischämischer Hirnschaden zugefügt. Dafür wurde den Tieren zu-

nächst subkutan 0,05 mg/kg Körpergewicht (KG) Buprenorphin zur Analgesie injiziert und mittels 5 % Isofluran die Narkose eingeleitet. Anschließend wurde die linke A. carotis communis ligiert (ischämische Komponente) gefolgt von Hypoxie für 90 min bei 8 % Sauerstoff und Körperkerntemperatur von 36 °C.

Nachdem die Hypoxie beendet und der Sauerstoff wieder auf 21 % eingestellt wurde, begann die NT bzw. TH. Die Körperkerntemperatur wurde mithilfe der Heiz- bzw. Kühlmatte auf 37 °C für die HI-NT-Gruppe und 32 °C für die HI-TH-Gruppe eingestellt und für fünf Stunden aufrechterhalten.

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidin-Analogon, das sich in die DNA proliferierender Zellen einlagert und somit als Proliferationsmarker in der Immunhistochemie dient (Ong et al., 2005). Aus diesem Grund wurde den Ratten, bei denen immunhistochemische Analysen durchgeführt werden sollen, an fünf aufeinanderfolgenden Tagen (P8-P12) BrdU (100 mg/kg KG) intraperitoneal injiziert.

Die Tierversuche endeten entweder zum Zeitpunkt P14 (Zeitpunkt 1 = TP1) oder P42 (TP2). Die Tiere, die für histologische Analysen verwendet werden, wurden durch transkardiale Perfusion mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und 4 % Paraformaldehyd getötet. Die Tiere, mit denen ein ELISA durchgeführt wurde, wurden enthauptet.

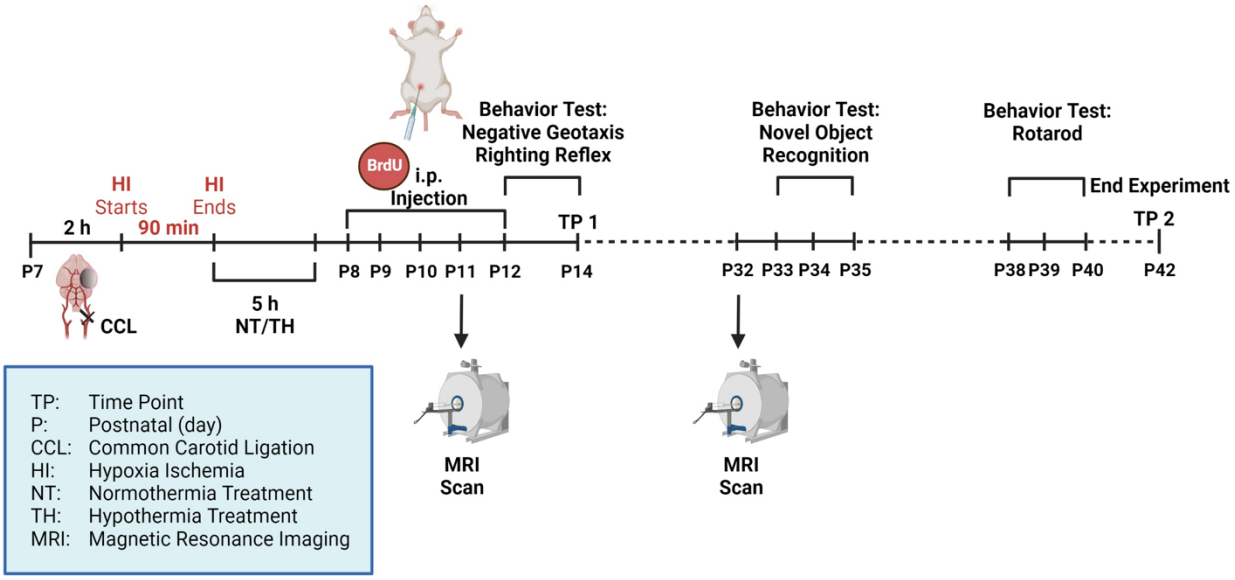

Abb. 1: Versuchsanordnung nach Figure 1 der Originalpublikation

1.2.2 Histologie und Immunhistochemie

Nach Entnahme wurden die Gehirne in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die Gehirne wurden mithilfe eines Brain Slicers in dünne Scheiben geschnitten und in Paraffin eingebettet. Mithilfe des Mikrotoms wurden 10 µm dicke Paraffinschnitte geschnitten und auf Objektträger übertragen.

Zu den beiden Zeitpunkten P14 und P42 wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (H.E.-Färbung) und immunhistochemische Färbungen angefertigt. Die H.E.-Färbung erfolgte nach einem Standard-Protokoll und diente der Bestimmung des Area Loss (Hirnsubstanzverlust). Hierfür wurde die Größe der ipsilateralen (linken) Hirnhälfte mithilfe von ImageJ (National Institutes of Health, USA) in Relation zur kontralateralen (rechten) Hirnhälfte gesetzt.

Mithilfe der Immunhistochemie wurde die Neurogenese mit besonderem Fokus auf Neurone und Mikroglia untersucht. Dafür wurden Doppelfärbungen mit BrdU + NeuN bzw. BrdU + Iba1 angefertigt. NeuN ist ein Marker für reife Neurone (Shin et al., 2020), Iba1 für Mikroglia (Fisch et al., 2020). Die Färbungen erfolgten entsprechend dem folgendem Protokoll:

- Deparaffinierung in absteigender Alkoholreihe
- Antigen-Demaskierung in kochendem PBS für 7 min
- Permeabilisierung der Zellmembran in 0,1 % Triton X-100-Lösung für 30 min
- Blocken mit 20 % Normal Goat Serum (NGS)
- Inkubation mit dem ersten primären Antikörper (Anti-NeuN oder Anti-Iba1) über Nacht bei 4 °C
- Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur
- Inkubation in 2-molarer Salzsäure (HCl) für 30 min
- Inkubation mit dem zweiten primären Antikörper (Anti-BrdU) über Nacht bei 4 °C
- Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur
- Gegenfärbung mit 4′,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

Die Färbungen wurden mithilfe des AxioScan.Z1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland) eingescannt und mithilfe von ZEN Blue 3.1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland) und ImageJ analysiert. Hierbei wurden die BrdU-positiven sowie die NeuN-BrdU- und Iba1-BrdU-positiven Zellen im Cortex, im Hippocampus und um den lateralen Ventrikel gezählt und die Zellzahl auf die Fläche normiert.

1.2.3 ELISA

Mithilfe von ELISA wurden die Konzentrationen von zwei wichtigen Wachstumshormonen im Gehirn zu den beiden Zeitpunkten TP1 und TP2 bestimmt. Bei dem ersten Wachstumshormon handelte es sich um den Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), welches die Neurogenese und die synaptische Plastizität stimuliert (Maass et al., 2016; Xiong et al., 2021). Bei dem zweiten Wachstumshormon handelte es sich um Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1). IGF-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Ge-

hirns, sowohl bei der Neurogenese als auch bei der Gliogenese (Hurtado-Chong et al., 2009; Ruddy und Morshead, 2018). Außerdem stimuliert IGF-1 die Bildung von BDNF (Park et al., 2011).

Vor Durchführung der ELISA wurden die Gehirne in die Hemisphären geteilt und lysiert. Es wurden Kits der Firma R&D Systems verwendet. Für BDNF wurde der BDNF Quantikine® ELISA Total BDNF Immunoassay (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) nach Herstellerangaben bei einer Verdünnung von 1:1000 durchgeführt. Für IGF-1 wurde der IGF-1, Quantikine® ELISA Mouse/Rat IGF-I/IGF-1 Immunoassay (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) nach Herstellerangaben bei einer Verdünnung von 1:5 durchgeführt.

1.2.4 Verhaltenstests

Um das funktionelle Outcome der Tiere zu untersuchen, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Verhaltenstests durchgeführt: an P12-P14 Righting Reflex und Negative Geotaxis, an P33-P35 Novel Object Recognition und an P38-P40 Rotarod.

Der Righting Reflex und Negative Geotaxis wurden zur Untersuchung der Motorik zu frühen Zeitpunkten durchgeführt. Beide Versuche wurden per Kamera gefilmt und dann mithilfe von Adobe Premiere (Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland) ausgewertet. Der Righting Reflex testet die Motorik und Koordinationsfähigkeit der Tiere (Sun et al., 2021). Hierbei wurden die Tiere auf den Rücken gedreht und die Zeit gemessen, bis sie sich wieder aufrichten. Der Negative Geotaxis testet die sensomotorische Funktion (Borjini et al., 2019). Hierbei wurden die Tiere auf einer 45°-geneigten Ebene mit dem Kopf nach unten platziert und die Zeit gemessen, bis sie sich um 180° drehen. Für beide Tests galt ein Cut-Off-Wert von 60 Sekunden.

Der Novel Object Recognition (NOR) Test wurde durchgeführt, um die kognitive Funktion der Tiere hinsichtlich des Gedächtnisses und der Lernfähigkeit zu untersuchen (Chavez-Gutierrez et al., 2022). Hierbei wurden die Ratten einzeln in 45 x 45 cm große Boxen gesetzt. Am ersten und zweiten Tag fand für je 10 min eine Gewöhnung in leeren Boxen statt. Am dritten Tag wurde die Ratte zunächst für 5 min in eine Box mit zwei

gleichen Objekten in gegenüberliegenden Ecken gesetzt. Nach einer Stunde Pause im Käfig wurde eines der beiden Objekte durch ein anderes ausgetauscht und die Ratte erneut für 5 min in dieselbe Box gesetzt. Der Versuch wurde per Kamera gefilmt. Mithilfe von EthoVision XT 14 (Noldus Information Technology, Wageningen, Niederlande) wurde die Zeit bestimmt, die eine Ratte mit der Erkundung eines der beiden Objekte verbringt. Anschließend wurde prozentual davon die Zeit bestimmt, die die Ratte das neue Objekt erkundet.

Um die motorischen Fähigkeiten der Ratten zu späteren Zeitpunkten zu untersuchen, wurde der Rotarod-Test durchgeführt (Borjini et al., 2019). Hierbei wurden die Tiere auf ein rotierendes Rohr gesetzt. Dieses drehte sich zu Beginn mit einer Geschwindigkeit von 4 Umdrehungen pro Minute (rpm) und beschleunigte dann gleichmäßig auf 40 rpm. An den ersten beiden Tagen wurden die Tiere an das Gerät gewöhnt. Am dritten Tag wurde die Zeit gemessen, bis die Tiere sich nicht mehr auf dem Roh halten konnten. Es galt ein Cut-Off-Wert von 300 Sekunden. Tiere, die absichtlich von dem Rohr abstiegen, wurden in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

1.2.5 MRT

Zu den beiden Zeitpunkten P11 und P32 wurden MRT-Aufnahmen der Gehirne von jeweils denselben Tieren angefertigt. Dies ermöglichte im Gegensatz zu der histologischen Untersuchung der Gehirne, die nur eine Momentaufnahme darstellt, die Beurteilung der strukturellen Veränderungen des Gehirns im zeitlichen Verlauf. Die Aufnahmen wurden mithilfe eines 11,7 Tesla horizontalen Kleinkaliber-Magneten (Biospec 117/16, Bruker, Billerica, MA, USA) und einer Protonenspule für Rattenhirne (Bruker Biospin) angefertigt. Für anatomische Bilder wurde eine T2-gewichtete Sequenz mit *Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement* (RARE) (Echozeit TE = 25 ms, Repetitionszeit TR = 2,9 ms, Auflösung 0,156 x 0,156 mm^2) durchgeführt. Zur Beurteilung der weißen Substanz wurde eine echoplanare Diffusions-Tensor-Bildgebung (EPI-DTI) (TE = 30 ms, TR = 3200 ms, b-Wert 650 s/mm^2, 46 Diffusionsrichtungen, 3 b0 Bilder, Auflösung 0,15 x 0,15 mm^2) durchgeführt. Der Apparent Diffusion Coefficient (ADC) und die Fractional Anisotropy (FA) wurden mithilfe von ImageJ bestimmt. ADC ist

ein Maß für die Diffusionsfähigkeit von Wassermolekülen innerhalb eines Gewebes (Parmentier et al., 2022; Sheng et al., 2022). FA beschreibt die Diffusionsfähigkeit von Wasser und wird u.a. von der Myelinisierung der Axone sowie deren Durchmesser beeinflusst (Massaro et al., 2015). Um die Werte für jedes Tier zu normieren, wurden die ADC- und FA-Werte der beiden Hemisphären ins Verhältnis zueinander gesetzt. Weiterhin wurde für den Cortex und den Hippocampus eine Traktographie mithilfe von Diffusion Toolkit (Version 0.6.4.1, Athinoula A. Martinos Center for Biomedical Imaging, Charlestown, MA, USA) und TrackVis (Version 0.6.1, Athinoula A. Martinos Center for Biomedical Imaging, USA) durchgeführt. Diese ermöglicht eine quantitative Bestimmung der Nervenfaserbündel. Analog zur histologischen Auswertung (s. o.) wurde der Area Loss mithilfe von ImageJ bestimmt.

1.2.6 Statistische Methoden

Die Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism 9.1.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Für die histologischen Auswertungen, die Verhaltenstests und für die ELISA wurde ein Mann-Whitney-Test durchgeführt. Für die MRT-Aufnahmen wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Die Darstellung der Daten erfolgte als Median mit Interquartilsabstand. Als statistisch signifikant galten p-Werte $< 0,05$.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Morphologischer und struktureller Hirnschaden

Mithilfe histologischer und MR-morphologischer Techniken wurde die Auswirkung der HI auf das Hirngewebe untersucht. Wie in Figure 2 der Veröffentlichung dargestellt, führte HI zu einer Größenreduktion der ipsilateralen Hemisphäre von durchschnittlich 20 % zu TP1. Mit der Zeit nahm dieser Area Loss weiter zu und lag zu TP2 bei durchschnittlich über 50 %. Auch die MR-Daten zeigten eine Zunahme des Hirnschadens im zeitlichen Verlauf (5 % zum Zeitpunkt P11, 19 % zum Zeitpunkt P32).

Die ADC-Werte waren bei den HI-Tieren sowohl im Cortex als auch im Hippocampus ipsilateral etwas erhöht, wobei sie v.a. im Hippocampus zum zweiten Zeitpunkt hin noch weiter anstiegen. Die FA-Werte waren bei den HI-Tieren in beiden untersuchten Hirnregionen reduziert, wobei auch hier eine Progredienz zum zweiten Zeitpunkt sichtbar war.
Die Traktographie zeigte eine Abnahme der Nervenfaserbündel bei den HI-Tieren zu beiden Zeitpunkten sowohl im Cortex als auch im Hippocampus. Diese zeigte sich nicht nur in der ipsilateralen, sondern auch in der kontralateralen Hemisphäre.

1.3.2 Auswirkungen auf das funktionelle Outcome

Zu frühen Zeitpunkten (P14) wurden der Righting Reflex und der Negative Geotaxis Test durchgeführt. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den HI- und den Kontrolltieren (Figure 3a-b der Veröffentlichung). Im NOR-Test, in dem die kognitiven Fähigkeiten der Tiere untersucht werden, zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen beiden Gruppen (Figure 3d der Veröffentlichung). Anders sah es bei den motorischen Fähigkeiten der Tiere aus. Im Rotarod-Test stürzten die HI-Tiere signifikant früher von dem rotierenden Rohr, als die gesunden Tiere aus der Kontrollgruppe (Figure 3c der Veröffentlichung).

1.3.3 Auswirkungen auf die Neurogenese

Um die Auswirkungen auf die Neurogenese zu untersuchen, haben wir immunhistologische Färbungen mit BrdU des Cortex, des Hippocampus und des lateralen Ventrikels durchgeführt (Figure 4 der Veröffentlichung). Im Allgemeinen war die Anzahl der BrdU-positiven Zellen zu TP1 in allen Regionen und in beiden Gruppen höher als zu TP2. Zu TP1 zeigte sich in der HI-Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren eine leichte Abnahme der BrdU-positiven Zellen im Hippocampus und lateralen Ventrikel und kein Unterschied im Cortex. Zu TP2 zeigte sich ein leichter Anstieg der BrdU-positiven Zellen im Cortex und im Hippocampus und kein Unterschied im lateralen Ventrikel.
Weiterhin wurden Doppelfärbungen von BrdU mit Iba1 bzw. NeuN zu beiden Zeitpunkten durchgeführt, um eine Zuordnung der neuen Zellen zu bestimmten Zelltypen zu

ermöglichen. Insgesamt zeigten sich hierbei keine signifikanten Veränderungen (Figure 5 und 6 der Veröffentlichung). Die Zahl der Iba1-BrdU-positiven Zellen in den HI-Tieren war zu TP1 etwas verringert und zu TP2 etwas erhöht im Vergleich zu den Kontrolltieren. Im Hippocampus zeigte sich zu beiden Zeitpunkten eine geringfügige Zunahme der Iba1-BrdU-positiven Zellen. Im lateralen Ventrikel zeigte sich eine leichte Abnahme zu TP1 und kein Unterschied zwischen den Gruppen zu TP2. Die Anzahl der NeuN-BrdU-positiven Zellen war sowohl für die HI- als auch für die Kontrolltiere zu beiden Zeitpunkten niedrig.

1.3.4 Auswirkungen auf die Expression von Wachstumsfaktoren

Hierbei wurden die Konzentrationen von BDNF und IGF-1 untersucht.

Bei den Kontrolltieren zeigten sich zu beiden Zeitpunkten ähnliche Werte für BDNF in beiden Hemisphären und ein Anstieg der Konzentration zwischen TP1 und TP2. Bei den HI-Tieren fehlte dieser Anstieg über die Zeit in der ipsilateralen Hemisphäre, sodass es zu TP2 zu einer signifikanten Reduktion von BDNF im Vergleich zu den Kontrolltieren kam. In der kontralateralen Hemisphäre zeigten sich normale BDNF-Level (Figure 7a-b der Veröffentlichung).

Die IGF-1-Konzentration war bei den Kontrolltieren ebenfalls in beiden Hemisphären ähnlich und nahm zwischen TP1 und TP2 ab. Bei den HI-Tieren zeigte sich eine Reduktion von IGF-1 im Vergleich zu den Kontrolltieren, die besonders prominent in der ipsilateralen Hemisphäre zu TP2 war und dort zu einem signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren führte (Figure 7c-d der Veröffentlichung).

1.3.5 Auswirkungen von therapeutischer Hypothermie

Die Effekte von TH wurden hinsichtlich des Ausmaßes des Hirnschadens und des funktionellen Outcomes untersucht. Zu TP1 zeigte TH keine neuroprotektive Wirkung. Allerdings führt TH zu einer geringeren Zunahme des Area Loss über die Zeit, sodass zu TP2 sowohl in der Histologie als auch im MRT der Hirnschaden in der HI-NT höher als in der HI-TH Gruppe war (Figure 8a-b der Veröffentlichung).

Hinsichtlich des funktionellen Outcomes zeigte TH keine Auswirkungen auf die kognitiven Fähigkeiten (NOR-Test), aber eine signifikante Verbesserung der motorischen Fähigkeiten (Rotarod-Test) (Figure 8c-d der Veröffentlichung).

1.4 Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit ist die Erforschung der Pathophysiologie der mild-moderaten HIE. Hierbei konnten wir zeigen, dass eine milde-moderate HI zu einem fortschreitenden Verlust von Hirngewebe, zu pathologischen Veränderungen in MRT-Scans sowie zu einer Beeinträchtigung der langfristigen motorischen Leistung führt.

Die Wirkung der TH inklusive ihrer Limitationen bei schwerer HIE wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht (Kariholu et al., 2020; Osredkar et al., 2014; Shah et al., 2021). Deshalb untersuchten wir die Frage, ob TH auch in milden Fällen wirksam ist und wenn ja, in welchem Ausmaß. Hierbei konnte TH die Zunahme des Hirnschadens über die Zeit verringern und zu einer Verbesserung der motorischen Fähigkeiten führen.

Pathophysiologisch ist der Hirnschaden nach HIE kein einmaliges Ereignis, sondern vielmehr ein fortschreitender Prozess (Greco et al., 2020). Diese Tatsache konnten wir auch in unserem Modell der milden-moderaten HI sowohl in der Histologie als auch in MRT-Scans über die Zunahme des Area Loss über die Zeit nachweisen. Das Gehirn wird auch lange nach dem Insult noch fortlaufend geschädigt und kann sich nicht normal entwickeln. Auch die Traktographie zeigte, dass die Reduktion der intakten Nervenfaserbündel über die Zeit stärker wird. Interessanterweise waren die Nervenfaserbündel nicht nur in der ipsilateralen Hemisphäre, sondern auch in der kontralateralen Hemisphäre reduziert. In Studien zu ischämischen Schlaganfällen bei Erwachsenen konnte gezeigt werden, dass die nicht-beschädigte Seite durch eine kompensatorische Zunahme der Nervenfaserbündel den Schaden auf der anderen Seite zumindest z. T. ausgleicht (Almeida et al., 2017). In dem Modell der neonatalen HI hingegen scheint aber auch die nicht direkt betroffene Seite in ihrer Entwicklung gestört zu werden.

Da im Rahmen der HI beispielweise durch oxidativen Stress und Inflammation Zellen im Gehirn irreversibel beschädigt werden und zugrunde gehen (Rocha-Ferreira und Hristova, 2016), ist die Neubildung von funktionsfähigen Neuronen durch Neurogenese ein wichtiger Ansatzpunkt. Hierbei gibt es noch viele Unklarheiten. Einige Studien zeigten beispielweise einen Anstieg der BrdU-positiven Zellen nach HI (Donega et al., 2013; Rocha-Ferreira und Hristova, 2016), während wir weder für den Cortex noch den Hippocampus oder den lateralen Ventrikel eine signifikante Steigerung im Vergleich zu den Kontrolltieren feststellen konnten. Dies könnte daran liegen, dass die benannten Studien sich v.a. auf die SVZ konzentriert haben, während in der vorliegenden Studie größere Bereiche des Gehirns untersucht wurden. So könnte es sein, dass nach HI zwar die Neurogenese in der SVZ gesteigert wird, diese Zellen aber kein ausreichendes Migrationspotential haben und langfristig in ihrer Entwicklung gestört sind und so die geschädigten Hirnareale nicht erreichen können. Das könnte auch mit den negativen Umgebungseinflüssen, die auf die Zellen wirken, in Verbindung stehen. So wurde z. B. gezeigt, dass oxidativer Stress, wie er nach HI auftritt, zu einer Beeinträchtigung der Neurogenese führt (Iqubal et al., 2022). Diese These wird durch die geringe Anzahl an NeuN-BrdU-positiven Zellen unterstützt, die zeigt, dass sich von den neu entstandenen Zellen nur ein sehr geringer Prozentsatz zu reifen, funktionsfähigen Neuronen entwickeln kann. Auch die reduzierte Expression der beiden Wachstumsfaktoren BDNF und IGF-1 führt zu einer Beeinträchtigung der Neurogenese. Die Unterschiede in der Expression zwischen den beiden Hemisphären kann auf eine gestörte Interhemisphären-Konnektivität hinweisen (Diaz et al., 2017).

Zum Einfluss von Mikroglia auf die Neurogenese liegen bisher sehr widersprüchliche Daten vor – je nach Phänotyp und Aktivätsmuster wurden sowohl positive als auch negative Effekte beobachtet (Bernis et al., 2022; Greco et al., 2020; Liu und McCullough, 2013; Serdar et al., 2019). Hier ist weitere Forschungsarbeit nötig, die die genaue Differenzierung der Mikroglia in diesem Kontext untersucht. In dieser Studie ist die Aussagekraft über die Neurogenese insgesamt eingeschränkt. Dies liegt zum einen an der großen Variabilität des Schadensausmaßes zwischen den einzelnen Tieren. Zum anderen an der Zunahme des Hirnschadens zum zweiten Zeitpunkt, sodass bestimmte Hirnareale nur eingeschränkt beurteilbar.

Bezüglich des funktionellen Outcomes konnten wir bei ca. 5 Wochen alten Ratten eine Beeinträchtigung der Motorik im Rotarod-Test aber keine Beeinträchtigung der Kognition im NOR feststellen. Dieses Ergebnis passt zu MRT-Studien, die darauf hindeuten, dass HIE besonders stark Gehirnregionen betrifft, die wichtig für die Motorik sind (Johnston et al., 2002). In ähnlichen Studien wurde auch ein pathologisch veränderter NOR beobachtet, dort waren die Tiere jedoch älter (Hawkey et al., 2020; Sinani et al., 2022) und es gibt Hinweise darauf, dass sich kognitive Beeinträchtigungen erst zu späteren Zeitpunkten der Entwicklung ausprägen (Lee und Glass, 2021).

TH ist aktuell die Standardtherapie für Neugeborene mit moderater bis schwerer HIE. Ob TH auch routinemäßig bei Neugeborenen mit milder HIE eingesetzt werden sollte, ist unklar. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass TH zu frühen Zeitpunkten bei milder bis moderater HI nicht neuroprotektiv ist und initial zu keiner Verkleinerung des Area Loss führt. Über den Verlauf der Zeit hinweg konnte TH jedoch die weitere Zunahme des Schadens abmildern. Außerdem führte TH zu keiner Verbesserung der kognitiven wohl aber der motorischen Fähigkeiten. In ähnlichen Studien konnte gezeigt werden, dass dies auch für spätere Zeitpunkte (P50-P70) zutrifft (Patel et al., 2015). Insgesamt zeigt die TH eine hohe Variabilität in dem Ausmaß ihrer Wirkung. Beim Einsatz der TH in Fällen milder HIE muss eine Kosten-Nutzen-Abwägung erfolgen, da diese Therapieform auch mit einigen Risiken sowie mit einer großen körperlichen Belastung für das Neugeborene einhergeht (Lodygensky et al., 2018; Sabir et al., 2012). Diese können bei Neugeborenen mit einer schweren HIE aufgrund des stärkeren Nutzens gerechtfertigt sein – in den milden Fällen sieht das eventuell anders aus. Ziel weiterer Forschung muss es deshalb sein, Medikamente oder andere therapeutische Optionen zu finden, die bei geringeren Nebenwirkungen die gleiche oder sogar bessere Wirkung zeigen und so diesen Kindern besser gerecht werden.

1.5 Zusammenfassung

In dem Projekt wurde die Pathophysiologie nach mildem bis moderatem hypoxisch-ischämischen Hirnschaden sowie die Wirkung von TH in diesem Kontext untersucht.

Nach milder bis moderater HI zeigte sich ein über die Zeit fortschreitender Verlust an Hirngewebe und Nervenfaserbündeln. Die Neurogenese war beeinträchtigt, was sich auch in einer Reduktion der beiden Wachstumsfaktoren BDNF und IGF-1 widerspiegelt. Im Rahmen von Verhaltenstests konnte festgestellt werden, dass die motorischen Fähigkeiten zum Zeitpunkt P14 zunächst keine Beeinträchtigung zeigen, sich dann aber zum Zeitpunkt P40 verschlechtern. Die kognitive Funktion zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

TH zeigte in dem verwendeten Modell zum Zeitpunkt TP1 noch keine neuroprotektive Wirkung bezüglich des Verlusts an Hirngewebe. Die Therapie hat jedoch die Zunahme des Hirnschadens über die Zeit abgemildert. Außerdem zeigte sich eine Verbesserung der Motorik im Vergleich zu den HI-NT-Tieren.

Insgesamt hat diese Arbeit dazu beigetragen, die pathophysiologischen Prozesse und Effekte der milden bis moderaten Hypoxie-Ischämie besser zu verstehen. Der Effekt der TH ist nur geringfügig. Hier muss eine Kosten-Nutzen-Abwägung erfolgen und v.a. weitere Forschung betrieben werden, um alternative Möglichkeiten zu finden, die bei geringer Belastung für das Kind die gleichen oder sogar besseren Effekte zeigen.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Almeida SR, Vicentini J, Bonilha L, De Campos BM, Casseb RF, Min LL. Brain Connectivity and Functional Recovery in Patients With Ischemic Stroke. J Neuroimaging. 2017; 27: 65-70

Backe P, Bruschettini M, Sibrecht G, Thernstrom Blomqvist Y, Olsson E. Pharmacological interventions for pain and sedation management in newborn infants undergoing therapeutic hypothermia. Cochrane Database Syst Rev. 2022; 11: CD015023

Bernis ME, Schleehuber Y, Zweyer M, Maes E, Felderhoff-Muser U, Picard D, Sabir H. Temporal Characterization of Microglia-Associated Pro- and Anti-Inflammatory Genes in

a Neonatal Inflammation-Sensitized Hypoxic-Ischemic Brain Injury Model. Oxid Med Cell Longev. 2022; 2022: 2479626

Borjini N, Sivilia S, Giuliani A, Fernandez M, Giardino L, Facchinetti F, Calza L. Potential biomarkers for neuroinflammation and neurodegeneration at short and long term after neonatal hypoxic-ischemic insult in rat. J Neuroinflammation. 2019; 16: 194

Bregere C, Fisch U, Sailer MH, Lieb WS, Chicha L, Goepfert F, Kremer T, Guzman R. Neonatal hypoxia-ischemia in rat increases doublecortin concentration in the cerebrospinal fluid. Eur J Neurosci. 2017; 46: 1758-1767

Chavez-Gutierrez E, Fuentes-Venado CE, Rodriguez-Paez L, Guerra-Araiza C, Larque C, Martinez-Herrera E, Ocharan-Hernandez ME, Lomeli J, Loza-Mejia MA, Salazar JR, Meneses-Ruiz DM, Gallardo JM, Pinto-Almazan R. High Fructose and High Fat Diet Impair Different Types of Memory through Oxidative Stress in a Sex- and Hormone-Dependent Manner. Metabolites. 2022; 12

Danladi J, Sabir H. Perinatal Infection: A Major Contributor to Efficacy of Cooling in Newborns Following Birth Asphyxia. Int J Mol Sci. 2021; 22

Diaz J, Abiola S, Kim N, Avaritt O, Flock D, Yu J, Northington FJ, Chavez-Valdez R. Therapeutic Hypothermia Provides Variable Protection against Behavioral Deficits after Neonatal Hypoxia-Ischemia: A Potential Role for Brain-Derived Neurotrophic Factor. Dev Neurosci. 2017; 39: 257-272

Donega V, van Velthoven CT, Nijboer CH, Kavelaars A, Heijnen CJ. The endogenous regenerative capacity of the damaged newborn brain: boosting neurogenesis with mesenchymal stem cell treatment. J Cereb Blood Flow Metab. 2013; 33: 625-634

Fisch U, Bregere C, Geier F, Chicha L, Guzman R. Neonatal hypoxia-ischemia in rat elicits a region-specific neurotrophic response in SVZ microglia. J Neuroinflammation. 2020; 17: 26

Greco P, Nencini G, Piva I, Scioscia M, Volta CA, Spadaro S, Neri M, Bonaccorsi G, Greco F, Cocco I, Sorrentino F, D'Antonio F, Nappi L. Pathophysiology of hypoxic-

ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future. Acta Neurol Belg. 2020; 120: 277-288

Halpin S, McCusker C, Fogarty L, White J, Cavaliere E, Boylan G, Murray D. Long-term neuropsychological and behavioral outcome of mild and moderate hypoxic ischemic encephalopathy. Early Hum Dev. 2022; 165: 105541

Hawkey A, Pippen E, White H, Kim J, Greengrove E, Kenou B, Holloway Z, Levin ED. Gestational and perinatal exposure to diazinon causes long-lasting neurobehavioral consequences in the rat. Toxicology. 2020; 429: 152327

Higgins RD, Raju T, Edwards AD, Azzopardi DV, Bose CL, Clark RH, Ferriero DM, Guillet R, Gunn AJ, Hagberg H, Hirtz D, Inder TE, Jacobs SE, Jenkins D, Juul S, Laptook AR, Lucey JF, Maze M, Palmer C, Papile L, Pfister RH, Robertson NJ, Rutherford M, Shankaran S, Silverstein FS, Soll RF, Thoresen M, Walsh WF, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child H, Human Development Hypothermia Workshop S, Moderators. Hypothermia and other treatment options for neonatal encephalopathy: an executive summary of the Eunice Kennedy Shriver NICHD workshop. J Pediatr. 2011; 159: 851-858 e851

Hurtado-Chong A, Yusta-Boyo MJ, Vergano-Vera E, Bulfone A, de Pablo F, Vicario-Abejon C. IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone. Eur J Neurosci. 2009; 30: 742-755

Iqubal A, Iqubal MK, Sharma S, Wasim M, Alfaleh MA, Md S, Baboota S, Ali J, Haque SE. Pathogenic mechanisms and therapeutic promise of phytochemicals and nanocarriers based drug delivery against radiotherapy-induced neurotoxic manifestations. Drug Deliv. 2022; 29: 1492-1511

Johnston MV, Nakajima W, Hagberg H. Mechanisms of hypoxic neurodegeneration in the developing brain. Neuroscientist. 2002; 8: 212-220

Kariholu U, Montaldo P, Markati T, Lally PJ, Pryce R, Teiserskas J, Liow N, Oliveira V, Soe A, Shankaran S, Thayyil S. Therapeutic hypothermia for mild neonatal

encephalopathy: a systematic review and meta-analysis. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2020; 105: 225-228

Kwak M, Lim S, Kang E, Furmanski O, Song H, Ryu YK, Mintz CD. Effects of Neonatal Hypoxic-Ischemic Injury and Hypothermic Neuroprotection on Neural Progenitor Cells in the Mouse Hippocampus. Dev Neurosci. 2015; 37: 428-439

Lee BL, Glass HC. Cognitive outcomes in late childhood and adolescence of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Clin Exp Pediatr. 2021; 64: 608-618

Liu F, McCullough LD. Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy. Acta Pharmacol Sin. 2013; 34: 1121-1130

Lodygensky GA, Battin MR, Gunn AJ. Mild Neonatal Encephalopathy-How, When, and How Much to Treat? JAMA Pediatr. 2018; 172: 3-4

Maass A, Duzel S, Brigadski T, Goerke M, Becke A, Sobieray U, Neumann K, Lovden M, Lindenberger U, Backman L, Braun-Dullaeus R, Ahrens D, Heinze HJ, Muller NG, Lessmann V, Sendtner M, Duzel E. Relationships of peripheral IGF-1, VEGF and BDNF levels to exercise-related changes in memory, hippocampal perfusion and volumes in older adults. Neuroimage. 2016; 131: 142-154

Massaro AN, Evangelou I, Brown J, Fatemi A, Vezina G, McCarter R, Glass P, Limperopoulos C. Neonatal neurobehavior after therapeutic hypothermia for hypoxic ischemic encephalopathy. Early Hum Dev. 2015; 91: 593-599

Matarredona ER, Talaveron R, Pastor AM. Interactions Between Neural Progenitor Cells and Microglia in the Subventricular Zone: Physiological Implications in the Neurogenic Niche and After Implantation in the Injured Brain. Front Cell Neurosci. 2018; 12: 268

Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. Neuron. 2011; 70: 687-702

Nabetani M, Mukai T, Shintaku H. Preventing Brain Damage from Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in Neonates: Update on Mesenchymal Stromal Cells and Umbilical Cord Blood Cells. Am J Perinatol. 2022; 39: 1754-1763

Ong J, Plane JM, Parent JM, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury stimulates subventricular zone proliferation and neurogenesis in the neonatal rat. Pediatr Res. 2005; 58: 600-606

Osredkar D, Thoresen M, Maes E, Flatebo T, Elstad M, Sabir H. Hypothermia is not neuroprotective after infection-sensitized neonatal hypoxic-ischemic brain injury. Resuscitation. 2014; 85: 567-572

Park SE, Dantzer R, Kelley KW, McCusker RH. Central administration of insulin-like growth factor-I decreases depressive-like behavior and brain cytokine expression in mice. J Neuroinflammation. 2011; 8: 12

Parmentier CEJ, de Vries LS, Groenendaal F. Magnetic Resonance Imaging in (Near-)Term Infants with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. Diagnostics (Basel). 2022; 12

Patel SD, Pierce L, Ciardiello A, Hutton A, Paskewitz S, Aronowitz E, Voss HU, Moore H, Vannucci SJ. Therapeutic hypothermia and hypoxia-ischemia in the term-equivalent neonatal rat: characterization of a translational preclinical model. Pediatr Res. 2015; 78: 264-271

Rice JE, 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. Annals of neurology. 1981; 9(2): 131–141

Rocha-Ferreira E, Hristova M. Plasticity in the Neonatal Brain following Hypoxic-Ischaemic Injury. Neural Plast. 2016; 2016: 4901014

Ruddy RM, Morshead CM. Home sweet home: the neural stem cell niche throughout development and after injury. Cell Tissue Res. 2018; 371: 125-141

Sabir H, Scull-Brown E, Liu X, Thoresen M. Immediate hypothermia is not neuroprotective after severe hypoxia-ischemia and is deleterious when delayed by 12 hours in neonatal rats. Stroke. 2012; 43: 3364-3370

Serdar M, Kempe K, Rizazad M, Herz J, Bendix I, Felderhoff-Muser U, Sabir H. Early Pro-inflammatory Microglia Activation After Inflammation-Sensitized Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. Front Cell Neurosci. 2019; 13: 237

Shah TA, Pallera HK, Kaszowski CL, Bass WT, Lattanzio FA. Therapeutic Hypothermia Inhibits the Classical Complement Pathway in a Rat Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. Front Neurosci. 2021; 15: 616734

Sheng H, Wang X, Jiang M, Zhang Z. Deep Learning-Based Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging in the Diagnosis of Ischemic Penumbra in Early Cerebral Infarction. Contrast Media Mol Imaging. 2022; 2022: 6270700

Shin JE, Lee H, Jung K, Kim M, Hwang K, Han J, Lim J, Kim IS, Lim KI, Park KI. Cellular Response of Ventricular-Subventricular Neural Progenitor/Stem Cells to Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury and Their Enhanced Neurogenesis. Yonsei Med J. 2020; 61: 492-505

Sinani A, Vassi A, Tsotsokou G, Nikolakopoulou M, Kouvelas ED, Mitsacos A. Early life stress influences basal ganglia dopamine receptors and novel object recognition of adolescent and adult rats. IBRO Neurosci Rep. 2022; 12: 342-354

Sun Y, Ma L, Jin M, Zheng Y, Wang D, Ni H. Effects of Melatonin on Neurobehavior and Cognition in a Cerebral Palsy Model of plppr5-/- Mice. Front Endocrinol (Lausanne). 2021; 12: 598788

Urban N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. Front Cell Neurosci. 2014; 8: 396

Volpe JJ. Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. Ann Neurol. 2012; 72: 156-166

Wassink G, Davidson JO, Dhillon SK, Zhou K, Bennet L, Thoresen M, Gunn AJ. Therapeutic Hypothermia in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. Curr Neurol Neurosci Rep. 2019; 19: 2

Xiong LL, Chen J, Du RL, Liu J, Chen YJ, Hawwas MA, Zhou XF, Wang TH, Yang SJ, Bai X. Brain-derived neurotrophic factor and its related enzymes and receptors play important roles after hypoxic-ischemic brain damage. Neural Regen Res. 2021; 16: 1453-1459

Yildiz EP, Ekici B, Tatli B. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment. Expert Rev Neurother. 2017; 17: 449-459

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Ehlting, A., Zweyer, M., Maes, E., Schleehuber, Y., Doshi, H., Sabir, H., & Bernis, M. E. Impact of Hypoxia-Ischemia on Neurogenesis and Structural and Functional Outcomes in a Mild-Moderate Neonatal Hypoxia-Ischemia Brain Injury Model. Life 2022; 12(8), 1164.

https://doi.org/10.3390/life12081164

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin unter Betreuung von Prof. Dr. Hemmen Sabir durchgeführt.
Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. Hemmen Sabir (Gruppenleiter) und Dr. Maria Eugenia Bernis (Postdoc).
Die folgenden Analysen und Experimente wurden auf folgende Weise durchgeführt:

- Die Operation im Rahmen des Tierversuches wurde durch Prof. Dr. Hemmen Sabir, Dr. Maria Eugenia Bernis und Elke Maes durchgeführt.
- Die Paraffinschnitte wurden durch Elke Maes erstellt. Die Färbungen habe ich nach Einarbeitung von Margit Zweyer und Dr. Maria Eugena Bernis selbstständig durchgeführt.
- Die Verhaltenstests wurden von mir gemeinsam mit Dr. Maria Eugenia Bernis, Yvonne Schleehuber, Margit Zweyer geplant und durchgeführt. Die Auswertung habe ich eigenständig durchgeführt.
- Die ELISA-Analyse habe ich nach Einarbeitung von Yvonne Schleehuber eigenständig durchgeführt.
- Die MRT-Scans wurden von Hardik Doshi durchgeführt. Die MRT-Datenanalyse habe ich mit Unterstützung von Hardik Doshi eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. Maria Eugenia Bernis.
Die Ergebnisse wurden von mir gemeinsam mit Prof. Dr. Hemmen Sabir und Dr. Maria Eugenia Bernis interpretiert und diskutiert.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich während meines Promotionsprojekts und bei der Fertigstellung dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Hemmen Sabir. Lieber Hemmen, ich danke dir herzlich dafür, dass du mir die Möglichkeit gegeben hast, dieses Projekt in deiner Arbeitsgruppe umzusetzen. Deine Offenheit für Fragen und Anregungen, deine kontinuierliche Unterstützung und dein Vertrauen in mich und das Projekt haben maßgeblich zum Erfolg beigetragen – mehr, als ich es selbst manchmal konnte. Dass wir gemeinsam ein Paper veröffentlichen konnten, war für mich ein besonderes Highlight.

Auch Dr. Maria Eugenia Bernis möchte ich ausdrücklich danken. Liebe Eugenia, deine Unterstützung – sowohl während meiner Zeit im Labor als auch darüber hinaus – war für mich von unschätzbarem Wert. Es war beruhigend zu wissen, dass ich mich mit jeder Frage an dich wenden konnte.

Mein Dank gilt ebenso den weiteren Mitgliedern der AG Sabir: Margit Zweyer, Yvonne Schleehuber und Elke Maes. Die Zusammenarbeit mit euch im Labor hat mir immer viel Spaß gemacht.

Für die finanzielle Förderung meines Promotionsprojekts danke ich dem SciMed-Promotionsstipendium von BONFOR.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre moralische Unterstützung und Motivation – besonders in Momenten, in denen ich beim Zellenzählen oder beim Feinschliff von Graphenlayouts an meine Grenzen gestoßen bin. Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Rebekka: ohne deinen beständigen Rückhalt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke, dass du immer für mich da bist.