

Aus dem  
Institut für Biochemie und Zellbiologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Eine Studie zur relativen Resilienz der cerebellaren Purkinjezellen  
im Cardiac Arrest Modell der Ratte**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von .....

aus .....

Magdeburg .....

Thi Tue Minh Nguyen  
Deutschland/Vietnam  
2020

# Dokumentationsblatt

## Bibliographische Beschreibung

Thi Tue Minh Nguyen:

**Eine Studie zur relativen Resilienz der cerebellaren Purkinjezellen im Cardiac Arrest**

**Modell der Ratte.** - 2020, Bl.: 68; Abb.: 23; Tab.: 7; Zitate: 87

## Kurzreferat:

In dieser Promotionsarbeit wurden die Auswirkungen eines Asphyxia Cardiac Arrestes mit anschließender Wiederbelebung (ACA/R) auf das neurodegenerative Muster des Cerebellums der Ratte untersucht. Zum Einsatz kamen adulte männliche Wistar-Ratten. Nach einem ACA von 6 Minuten überlebten die Tiere 6 und 24 h sowie 7 und 21 Tage. Danach wurden die Cerebellum-Präparate immunhistochemischen Doppel-Färbungen mit MAP2 (Marker für Dendriten und Axone) und GFAP (Marker für Astrozyten) oder IBA1 (Marker für Mikroglia/Makrophagen), sowie cfos, MnSOD, Bcl2, Caspase 3, alles Zellstress-relevante Marker und Parvalbumin und Calbindin D28k, zwei Calcium-bindende Proteine, unterworfen. Alle ACA-Präparate wurden mit entsprechenden Präparaten von Sham-operierten und naiven Kontrollgruppen verglichen. Es fanden sich bereits in einigen Sham-Tieren marginale Zeichen von neuronalem Stress, ganz offensichtlich ein Narkose-Effekt. In den ACA/R-Tieren waren Purkinjezell-Untergänge zu beobachten. Jedoch blieben diese überschaubar. Für diese Resilienz der Purkinjezelle können folgende protektive Systeme verantwortlich sein: (i) inhibitorische Sternzellen, die die Ischämie-induzierte Exzitation ausgleichen und Purkinjezellen inhibieren; (ii) aktivierte Calcium-Puffersysteme, die die Purkinjezellen vor einer Calcium-Überladung schützen; (iii) der aktivierte Neuronen-Astrozyten-Cross-Talk, (iv) aktivierte endogene MnSOD- und Bcl2-Verteidigungssysteme in den Purkinjezellen.

## Schlüsselwörter:

Asphyxie, Astrozyten, Calcium-Puffersysteme, Cerebellum, globale Ischämie, Herz-Kreislauf-Stillstand, Hippocampus, Mikroglia/Makrophagen, Motoneurone, Neurodegeneration, Purkinjezelle, Reoxygenierung, Sternzelle, Zellstress-Marker, Vitalparameter

## Inhaltsverzeichnis

<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
<b>1. Einführung.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Leitlinien des European Resuscitation Council (ERC) zur Reanimation .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 Pathophysiologie des ischämischen Hirnschadens nach CA/R .....</b>	<b>13</b>
1.2.1 Primärer Schaden.....	13
1.2.1.1 Laktatazidose.....	13
1.2.1.2 Exzitotoxizität und Ionen-Fehlverteilung.....	13
1.2.1.3 Nekrose .....	14
1.2.2 Schädigungsmechanismen nach Reperfusion .....	14
1.2.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	14
1.2.2.2 Inflammatorische Prozesse und zelluläre Reaktion .....	16
1.2.2.3 Mikrozirkulations- und Reperfusions-Störungen.....	18
1.2.2.4 Apoptose .....	19
<b>1.3 Hippocampus.....</b>	<b>20</b>
1.3.1 Anatomie und Funktion.....	21
<b>1.4 Cerebellum.....</b>	<b>22</b>
1.4.1 Anatomie und Funktion.....	23
1.4.2 Afferente und efferente Verbindungen des Kleinhirns.....	24
1.4.3 Die zelluläre Konnektivität des Cerebellums .....	26
<b>1.5 Das Tiermodell.....</b>	<b>27</b>
<b>2. Fragestellung .....</b>	<b>29</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Experiment.....</b>	<b>30</b>
3.1.1 Versuchstiere .....	30
3.1.2 Aufteilung der Versuchsgruppen.....	30
3.1.3 Asphyxial-Cardiac-Arrest-Modell der Ratte .....	31
3.1.3.1. Vorbereitende Präparationen .....	31
3.1.3.2. Insult und Reanimation .....	33
3.1.3.3. Nachbetreuung und postexperimentelle Phase.....	34
<b>3.2 Ausschlusskriterien .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3 Neurologischer Defizit-Score (NDS).....</b>	<b>35</b>
<b>3.4 Histologische Aufarbeitung.....</b>	<b>37</b>
3.4.1 Transkardiale In-vivo-Perfusion .....	37
3.4.2 Anfertigung der Kryoschnitte.....	37
3.4.3 Immunhistologie .....	37
<b>3.5 Auswertung/Statistik.....</b>	<b>39</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Auswirkung des ACA/R auf die Vitalparameter .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 Auswirkung des ACA/R auf den Neurologischen Defizit Score.....</b>	<b>41</b>

4.3 Auswirkung des ACA/R auf die Immunhistologie des Cerebellums .....	43
5. Diskussion.....	53
5.1 Diskussion des Tiermodells .....	53
5.2 Diskussion der analysierten Vitalparameter .....	53
5.3 Diskussion der immunhistologischen Ergebnisse.....	55
5.4 Fazit.....	58
6. Zusammenfassung .....	59
7. Literatur .....	60
8. Danksagung .....	66
9. Erklärung.....	67
10. Bildungsweg .....	68

## **Publikationsverzeichnis**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät, vertreten durch Prof. Dr. rer. nat. G. Keilhoff, vorab veröffentlicht.

Gerburg Keilhoff, Tue Minh Nguyen Thi, Torben Esser and Uwe Ebmeyer:

Relative Resilience of Cerebellar Purkinje Cells in a Cardiac Arrest/Resuscitation Rat Model.

Neurocritical Care, 2019; doi: 10.1007/s12028-019-00799-0.

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
ACA/R	Asphyxia cardiac arrest/resuscitation
AED	automatisierter externer Defibrillator
ALS	Advance life support
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxalole-4-propionate
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bew.	Bewegung
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BL	Baseline (Ausgangswert)
BLS	Basic life support
CA1	Cornu ammonis Region 1
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
CCL-3	Chemokine (C-C motif) ligand 3
Cl <sup>-</sup>	Chlorid-Ion
cm	Zentimeter
cmH <sub>2</sub> O	Zentimeter Wassersäule
Cornealrefl.	Cornealreflex
CPR	kardiopulmonale Reanimation
CTCF	corrected total cell fluorescence
d	Tag
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindole
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ERC	European Resuscitation Council
E-Selectin	Endothel-Selektin
EuReCa	European Registry of Cardiac arrest
FADD	Fas-associated protein with death domain
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Gauge (Kanülengrößenordnung)
GABA	γ-Aminobuttersäure
GCL	Körnerzellschicht
GFAP	Glial fibrillary acid protein
h	Stunden
H <sup>+</sup>	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hinterpf.	Hinterpfote
HNF4A	Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha
I.E.	internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
IBA1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
ICAM	Intercellular adhesion molecule
ID	integrierte Dichte
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
inkl.	inklusive

IP3	Inositoltrisphosphat
IPPV	intermittent positive pressure ventilation
kg	Kilogramm
kPa	Kilo-Pascal
l	Liter
LAS	Lance-Adam-Syndrom
LD	Lineare Dichte
li.	links
LSAB	labelled streptavidin biotin
m	Meter
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein-2
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Millimeter
ML	Molekularschicht
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol, Einheit für die Stoffmenge
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
mod.	modifiziert
MSE	myoklonischen Status epilepticus
N <sub>2</sub> O	Lachgas
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Ncl.	Nucleus
NDS	Neurologischer Defizit-Score
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
o.g.	oben genannt
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
ONOO-	Peroxynitrit
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCL	Purkinjezellschicht
PEA	pulslose elektrische Aktivität
PEEP	positiv-endexpiratorischer Druck
pO <sub>2</sub> , pCO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck, Kohlenstoffdioxidpartialdruck
P-Selectin	Thrombozyten-Selektin
PZ	Purkinjezelle
re.	rechts
Rez.	Rezeptor
RNOS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
ROSC	Return of spontaneous circulation
SD	Standardabweichung
sek	Sekunden
SOD	Superoxiddismutase
sog.	sogenannt
TGF-	Transforming growth factor-
TNF-	Tumornekrosefaktor-
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Tr.	Traktus
Ts	Tastsinn

ÜZ	Überlebenszeit
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsions-molekül-1
VF	ventricular fibrillation (Kammerflimmern)
vs.	versus
VT	ventrikuläre Tachykardien
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **Abbildungsverzeichnis**

### **Abbildungen**

Abb. 1.1-1 Der Basic life support-Algorithmus.....	11
Abb. 1.1-2 Algorithmus des Advance Life Supports (ALS). ....	12
Abb. 1.2-1 Eliminierung von Superoxid-Anion.....	15
Abb. 1.2-2 Triggerung der ROS-Entstehung durch Ischämie und Reperfusion.....	15
Abb. 1.2-3 Zeitlicher Ablauf und Einfluss von Exzitotoxizität, Inflammation und Apoptose bei zerebraler Ischämie. ....	16
Abb. 1.2-4 Apoptotische Signalkaskaden.....	19
Abb. 1.2-5 Das Zusammenspiel der Pathomechanismen nach ACA/R. ....	20
Abb. 1.3-1 Zytoarchitektur der Hippokampusformation. ....	21
Abb. 1.4-1 Topographische Lage des Cerebellums. ....	22
Abb. 1.4-2 Schematische Darstellung des Cerebellums.....	23
Abb. 1.4-3 Schematische Darstellung der cerebellaren Verschaltung. ....	26
Abb. 3.1-1 Versuchsanordnung nach vollständiger Präparation der Ratte ....	32
Abb. 3.1-2 Auszug aus einem in der Arbeitsgruppe verwendeten Datenblatt.....	33
Abb. 4.1-1 Exemplarisches Beispiel von EKG, Blutdruck und Beatmung. ....	40
Abb. 4.1-2 Physiologische Parameter vor und nach Reanimation. ....	41
Abb. 4.3-1 ACA/R-induzierte hippocampale CA1-Degeneration.....	43
Abb. 4.3-2 ACA/R-induzierte hippocampale CA1-Degeneration.....	44
Abb. 4.3-3 Immun-mikrographische Darstellung von cfos und MnSOD.....	45
Abb. 4.3-4 Immun-mikrographische Abbildungen von Bcl2 und GFAP.....	46
Abb. 4.3-5 Immun-mikrographische Abbildungen von Parvalbumin & Calbindin D28k.....	48
Abb. 4.3-6 Immun-mikrographische Abbildungen von Calbindin D28k und MAP2.....	49
Abb. 4.3-7 Immun-mikrographische Abbildung von IBA1 und MAP2.....	50
Abb. 5.4-1 Protektive Systeme der Purkinjezellen.....	58

### **Tabellen**

Tab. 1.4-1 Afferente und efferente Verbindungen des Kleinhirns und ihre Bedeutung. ....	25
Tab. 1.5-1 PubMed-Recherche zur CA-Literatur (April 2020).....	28
Tab. 3.3-1 Neurologischer Defizit Score (NDS; nach (39)). ....	35
Tab. 3.4-1 Eingesetzte Primärantikörper.....	38
Tab. 3.4-2 Eingesetzte Sekundärantikörper.....	38
Tab. 4.2-1 Der neurologische Defizit-Score (NDS).....	42
Tab. 4.3-1 Angaben der CTCF.....	52

## 1. Einführung

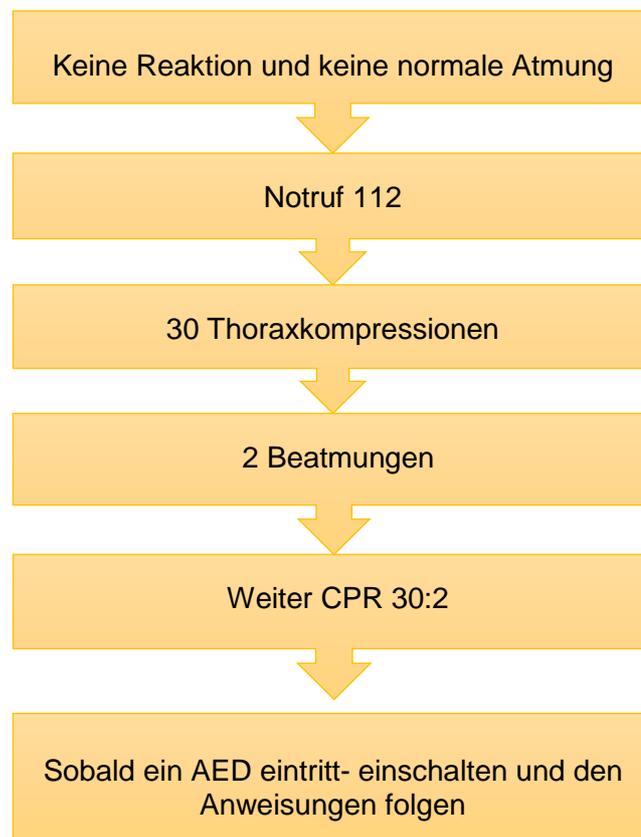
In der 2016 veröffentlichten EuReCa ONE Studie wurden Reanimationsdaten aus dem Jahre 2014 von 27 europäischen Ländern in Hinblick auf Inzidenz, Verlauf und Outcome des präklinischen Herzstillstandes ausgewertet. In Europa betrug die Inzidenz für den präklinischen Herzstillstand 84 pro 100.000 Personen/Jahr. Die Inzidenz des präklinischen Herzstillstandes, bei dem eine kardiopulmonale Reanimation (CPR) durchgeführt wurde, lag bei 49 pro 100.000 Einwohner. Somit wurden in etwa 50 % der Fälle Wiederbelebungsmaßnahmen durchgeführt. Für den Wiedereintritt eines spontanen Kreislaufs (ROSC) liegen stark variierende Zahlen vor, die von weniger als 10 % bis zu 50 % reichen, der Durchschnitt lag bei 28,6 %. Unter den Personen, die unter reanimierten Bedingungen im Krankenhaus eintrafen, überlebten nur 4,8 %. Insgesamt betrug die Überlebensrate für alle begonnenen Reanimationen nur 10,3 %. Als Überleben wurde in der Studie eine Überlebenszeit von mindestens 30 Tagen oder eine frühzeitigere Entlassung aus dem Krankenhaus definiert (1). Diese Zahlen verdeutlichen, dass trotz Reanimationsmaßnahmen die Überlebenschance nach Herzstillstand (cardiac arrest, CA) nach wie vor sehr gering ist. Der Ausgang hängt dabei maßgeblich vom Ausmaß der ischämischen Hirnschädigung ab (2). Der Verlust des Korneal- und Pupillenreflexes, sowie das Auftreten des myoklonischen Status epilepticus (MSE) sind hierbei klinische Indikatoren einer ausgeprägten neuronalen Dysfunktion, die oft mit einer infausten Prognose einhergehen (3). Beim MSE kommt es bei komatösen Überlebenden des CA zu myoklonischen Zuckungen für mindestens 30 Minuten, typischerweise innerhalb der ersten 72 Stunden (4, 5). Davon abzugrenzen ist das Lance-Adam-Syndrom (LAS), welches eine bessere Prognose besitzt und durch Aktionsmyoklonien bei kontakt- und kommunikationsfähigen Patienten gekennzeichnet ist, diese können Stunden bis Jahre nach CA/Resuscitation (CA/R) auftreten (6).

Der pathophysiologische Ursprung der Myoklonien ist hierbei noch nicht ganz geklärt (6, 7). Neben Myoklonien treten häufig auch weitere Bewegungsstörungen wie Tremor, Dystonie, Chorea und das akinetisch-rigide Syndrom auf, die hauptsächlich auf striatale Schädigungen zurückzuführen sind (5). Nichtsdestotrotz ist anzunehmen, dass auch das Kleinhirn aufgrund seiner komplexen Rolle in der Bewegungsdurchführung und seinen unterschiedlichen Eingängen aus Vestibularorgan, motorischen Kortex und Rückenmark einen Beitrag zum Auftreten von motorischen Defiziten nach CA/R leistet. Dennoch ist das Kleinhirn in klinischen Studien zu CA/R nur moderat vertreten (5, 8).

## 1.1 Leitlinien des European Resuscitation Council (ERC) zur Reanimation

Das European Resuscitation Council ist eine interdisziplinäre Zusammenkunft von Medizinern, die sich mit Wiederbelebensmaßnahmen nach Herz-Kreislauf-Stillstand befasst. In regelmäßigen Zeitabständen veröffentlichen sie Leitlinien zur Reanimation. Die letzte Aktualisierung der Leitlinien erfolgte 2015. Die für 2020 geplante Aktualisierung wurde aufgrund der Covid-19 Pandemie auf 2021 verschoben (9).

Die empfohlenen Maßnahmen zur Reanimation werden in Basismaßnahmen (Basic life support, BLS) und erweiterte Maßnahmen (Advance Life Support, ALS) unterteilt, die jeweils einem Algorithmus folgen (10). Die Basismaßnahmen beinhalten das frühe Erkennen eines Kreislaufstillstandes (inkl. Freimachung der Atemwege) und Absetzen des Notrufes, die Wiederbelebung durch Herzdruckmassage und Mund-zu-Mund-Beatmung sowie die externe Defibrillation durch einen automatisierten externen Defibrillator (AED) (► Abb. 1.1-1).

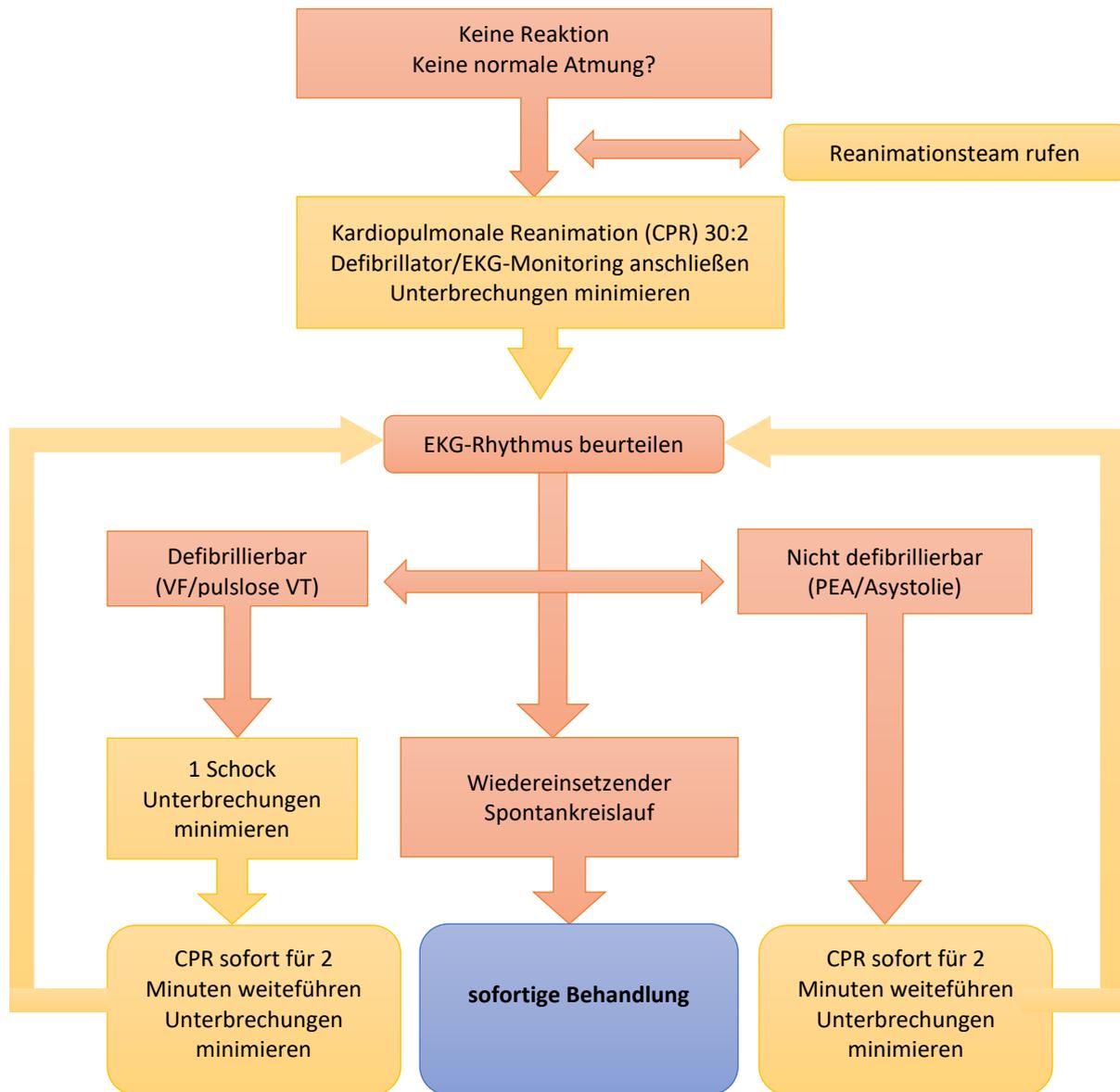


**Abb. 1.1-1 Der Basic life support-Algorithmus.**

*CPR*, Kardiopulmonale Reanimation; *AED*, automatisierter externer Defibrillator. Mod. nach (10).

Die erweiterten Reanimationsmaßnahmen für Erwachsene beinhalten zusätzlich das Atemwegsmanagement, die medikamentöse Therapie, die EKG-Analyse, die elektrische

Therapie von Herzrhythmusstörungen sowie die sofortige Behandlung. Abbildung 1.1-2 zeigt den ALS-Ablauf.



**Abb. 1.1-2 Algorithmus des Advance Life Supports (ALS).**

*CPR*, kardiopulmonale Reanimation; *VF*, Kammerflimmern; *VT*, ventrikuläre Tachykardie; *PEA*, pulslose elektrische Aktivität. Mod. nach (10).

Ausschlaggebend für eine hohe Überlebenschance nach Kreislaufstillstand sind die frühe Durchführung von ununterbrochenen und effektiven Thoraxkompressionen und der frühe Einsatz des externen Defibrillators bei Kammerflimmern und ventrikulären Tachykardien.

## 1.2 Pathophysiologie des ischämischen Hirnschadens nach CA/R

Bei der Entstehung des ischämischen Hirnschadens unterscheidet man zwischen den Schädigungsmechanismen, die primär durch den Sauerstoffwegfall entstehen und den Schädigungsmechanismen, die durch die Reperfusion entstehen.

### 1.2.1 Primärer Schaden

Die Primäre Schädigung ist Folge der ausfallenden Sauerstoffversorgung nach Einsetzen des Herz-Kreislauf-Stillstandes. Innerhalb von Minuten resultiert daraus eine Ischämie der Neuronen mit Neuronenuntergang. Grund für diesen frühen neuronalen Zelltod ist die niedrige Ischämietoleranz des Gehirns aufgrund seines hohen Energieverbrauchs und seiner geringen metabolischen Reserven (11, 12). Klinisch kommt es innerhalb von 20 Sekunden zur Bewusstlosigkeit (2). Folgende Mechanismen spielen dabei eine Rolle.

#### 1.2.1.1 Laktatazidose

Durch die fehlende Sauerstoffzufuhr kommt die Energiegewinnung durch die mitochondriale Atmungskette zum Erliegen. Der Energiestoffwechsel muss nun über die anaerobe Glykolyse erfolgen, was zu einer Laktatakkumulation im Gehirn und damit einhergehend zur Gewebsazidose führt (2).

#### 1.2.1.2 Exzitotoxizität und Ionen-Fehlverteilung

Aufgrund des ATP-Mangels ist die Natrium-Kalium-ATPase nicht mehr in der Lage, das Ruhemembranpotential in den Nervenzellen aufrechtzuerhalten. Die Zelle depolarisiert und es kommt zum intrazellulären Einstrom von Natrium, Chlorid und Wasser. Folgen sind eine Zellschwellung mit Membranruptur. Eine weitere Folge der Membrandepolarisation ist die Freisetzung von Glutamat in den Extrazellularraum (13). Zum einen wirkt Glutamat in hohen Konzentrationen zellnekrotisch und pro-apoptotisch, zum anderen aktiviert Glutamat die neuronalen, membranständigen NMDA- und AMPA-Rezeptoren, wodurch Calcium intrazellulär einströmt (►Abb. 1.2-2) (13, 14). Durch die Aktivierung des Glutamat-vermittelten IP3- Signalwegs und der o.g. Laktatazidose wird der Calciumeinstrom zusätzlich verstärkt (11, 15). Hohe Konzentrationen von Calcium wirken nekrotisch und führen zu einer Dysfunktion von Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums sowie zur Freisetzung pro-apoptotischer Proteine (15).

### 1.2.1.3 Nekrose

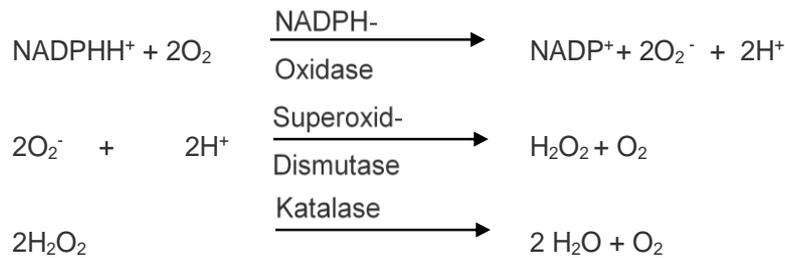
Die oben genannten Punkte führen durch den Zusammenbruch des Elektrolytgradienten über der Zellmembran sowie den akuten und massiven Veränderungen in der Homöostase zur Zellnekrose. Morphologisch kommt es dabei zu einer Zellschwellung, Verklumpung des Chromatins und Zerstörung der Zellmembran. Durch Freisetzung intrazellulärer pro-inflammatorischer Proteine wird zusätzlich eine Entzündungsreaktion getriggert (16, 17).

## 1.2.2 Schädigungsmechanismen nach Reperfusion

Die erfolgreiche Wiederherstellung der spontanen Kreislaufverhältnisse nach Herz-Kreislauf-Stillstand bringt sogenannte Reperfusionsschäden mit sich, auch als Post-CA-Syndrom bezeichnet. Diese Schäden entstehen Stunden bis Tage nach Reperfusion und sind für den Großteil der Neuronenuntergänge nach Herz-Kreislauf-Stillstand verantwortlich (► Abb. 1.2-3) (2). Folgende Mechanismen spielen dabei eine Rolle:

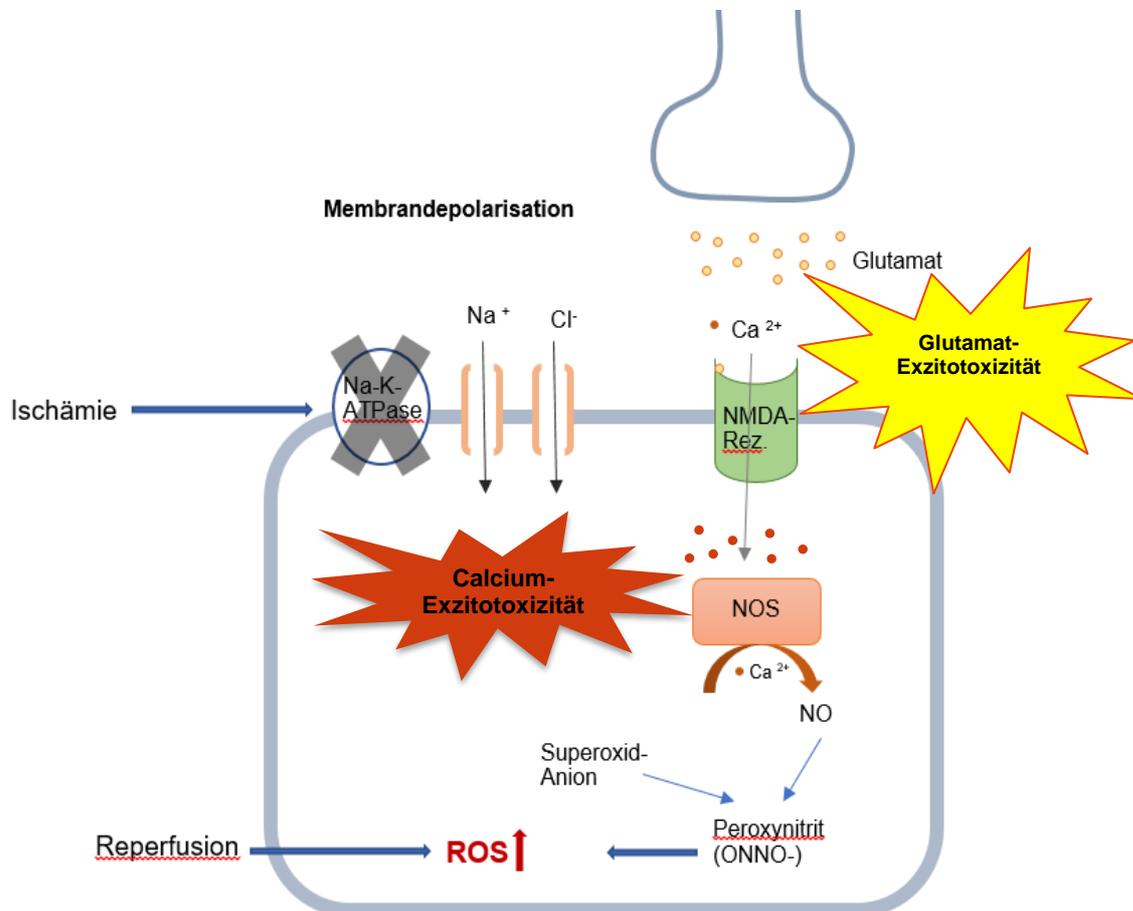
### 1.2.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

ROS wie Superoxid Anionen, Hydrogenperoxid und Hydroxylradikale haben eine hohe Reaktivität und besitzen aufgrund ihrer chemischen Aggressivität eine hohe pathophysiologische Bedeutung. Gleichzeitig sind sie aber auch bei der Signaltransduktion beteiligt und können hierfür kontrolliert von der Zelle freigesetzt werden. Sie entstehen zum einen als Nebenprodukt bei der mitochondrialen Zellatmung, können aber zum anderen auch extramitochondrial durch pro-oxidative Enzyme gebildet werden, wie der Xanthinoxidase, der NADPH-Oxidase und der Stickstoffmonoxid-Synthase (13). Anti-oxidative Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD) eliminieren reaktive Sauerstoffspezies und führen so zur Verminderung des oxidativen Stresses (► Abb. 1.2-1) (13). Die durch die o.g. Glutamat-Exzitotoxizität entstehende Calciumtoxizität führt zu einer übermäßigen Aktivierung des pro-oxidativen Enzyms Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) (15, 18). Stickstoffmonoxid (NO) reagiert wiederum indirekt mit Molekülen wie Sauerstoff und Superoxid-Anionen, wodurch reaktive Stickstoffspezies (RNOS) wie Peroxynitrit (ONNO-) entstehen (► Abb. 1.2-2) (19). Folglich kommt es zur Erhöhung des oxidativen Stresses mit pro-inflammatorischer und pro-apoptotischer Wirkung. Es resultieren Schäden an der Plasmamembran, den Zellorganellen, vor allem den Mitochondrien und die Fragmentierung von DNS (13).



### Abb. 1.2-1 Eliminierung von Superoxid-Anion.

Das bei der Oxidation von NADPHH<sup>+</sup> entstandene Superoxid-Anion wird durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff reduziert. In einem nächsten Schritt wird Wasserstoffperoxid durch die Katalase in Wasser und Sauerstoff umgesetzt und damit unschädlich gemacht.

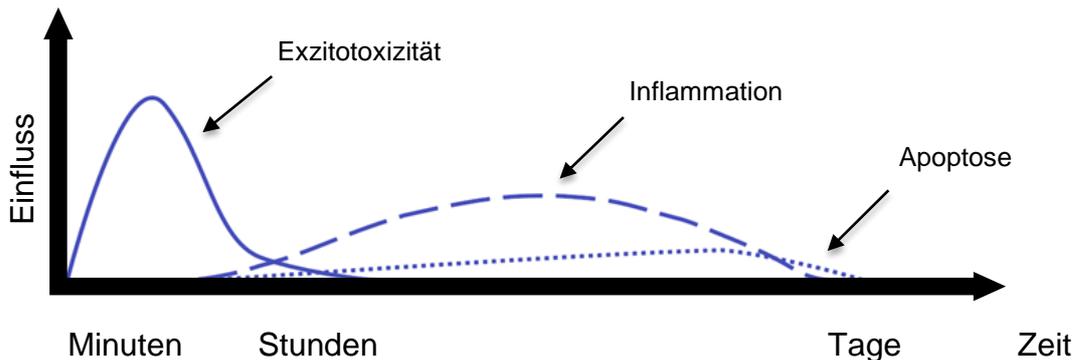


### Abb. 1.2-2 Triggerung der ROS-Entstehung durch Ischämie und Reperfusion.

Der Ischämie-bedingte Ausfall der Na-K-ATPase führt zu einer Membrandepolarisation, der Natrium und Chlorid folgen. Das führt zu einer vermehrten Freisetzung von Glutamat in den Extrazellularraum mit Aktivierung von NMDA-Rezeptoren. Folglich strömt Calcium intrazellulären ein und führt zu einer vermehrten Aktivierung der NOS. NOS reagiert indirekt mit Sauerstoff und Superoxid-Anionen, wodurch reaktive Stickstoffspezies wie ONNO<sup>-</sup> entstehen. Rez., Rezeptor; NOS, Stickstoffmonoxid-Synthase; NO, Stickstoffmonoxid; ROS, reaktive Sauerstoffspezies (eigene Abbildung).

### 1.2.2.2 Inflammatorische Prozesse und zelluläre Reaktion

Inflammatorische Prozesse sind maßgeblich am verzögerten Neuronenuntergang nach Reperfusion beteiligt (► Abb. 1.2-3). Charakteristisch hierfür sind die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, die Infiltration durch periphere Makrophagen, die Aktivierung von Gliazellen, die Freisetzung hoher Konzentrationen an ROS, pro-inflammatorischen Mediatoren, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen (13, 16).



**Abb. 1.2-3 Zeitlicher Ablauf und Einfluss von Exzitotoxizität, Inflammation und Apoptose bei zerebraler Ischämie.**

Innerhalb von Minuten kommt es zum Zelluntergang durch exzitotoxische Mechanismen, die wiederum Inflammation und letztendlich die Apoptose stimulieren. Mod. nach (13).

#### 1.2.2.2.1 Mikroglia

Mikrogliazellen sind die endogenen Immunzellen des Gehirns und sind zur Migration, Phagozytose und Antigenpräsentation fähig.

Nach Ischämieereiz kommt es zu einer sofortigen Aktivierung von Mikrogliazellen. Bis zur vollen Entwicklung können Stunden bis Tage vergehen. Die aktivierten Mikrogliazellen setzen pro-inflammatorische Zytokine wie IL6, IL11, TNF- $\alpha$  und andere potentiell zytotoxische Moleküle wie ROS, NO und Prostanoiden frei, was die Einwanderung von Neutrophilen, Makrophagen, T-Zellen und anderen peripheren Immunzellen triggert (16). Dies ist ein Mechanismus, der bei jeder Form der Hirnschädigung als first-line-Verteidigung abläuft (z.B. Infektion), im Fall der Reperfusion jedoch fehlangepasst ist (20).

#### 1.2.2.2.2 Astrozyten

Astrozyten besitzen zahlreiche Aufgaben. Beispielsweise halten sie die extrazelluläre Kaliumkonzentration stabil, entfernen überschüssiges Glutamat aus dem synaptischen Spalt, sind Bestandteil der Bluthirnschranke und interagieren mit benachbarten Zellen. Bei einer

Schädigung des ZNS verändern die Astrozyten ihre Morphologie. Sie werden reaktiv, was als Astrogliose bezeichnet wird und mit einer Hochregulierung des Intermediär-Filaments GFAP einhergeht. Bei zunehmender Astrogliose kommt es zur Bildung einer sogenannten Glianarbe; Gewebe, welches seiner Funktion nicht mehr nachgehen kann (21).

Nach Ischämieereiz werden Astrozyten innerhalb von 2 Stunden aktiviert. Zur Schadensbegrenzung setzen sie Metabolite, Antioxidantien und neurotrophische Moleküle frei. Gleichzeitig setzen sie aber auch zahlreiche Zytokine frei, mit sowohl anti- als auch pro-inflammatorischer Wirkung (16).

Einige Stunden nach Reperfusion führt die erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zur Destruktion der Mitochondrien in den Astrozyten. Folglich kann überschüssiges Glutamat nicht mehr durch den Glutamat-Transporter 1 der Astrozyten aufgenommen werden und die o.g. Glutamat-Exzitotoxizität mit all ihren Folgen verstärkt sich (22).

#### 1.2.2.2.3 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten gehören zu den Leukozyten und sind Teil des angeborenen Immunsystems. Innerhalb kurzer Zeit kommt es nach Ischämieereiz zur Adhäsion von Neutrophilen an den Endothelzellen der zerebralen Gefäße. Von dort wandern sie in verletztes Hirngebiet und setzen pro-inflammatorische Moleküle frei. Diese trans-endotheliale Migration wird durch Adhäsionsmoleküle möglich gemacht (P-Selectin, E-Selectin, ICAM-1, ICAM-2, und VCAM-1) (23). Des Weiteren stimulieren neutrophile Granulozyten die Aktivität der Matrix-Metalloprotease-9. Diese Enzyme sind in der Lage, Bestandteile der extrazellulären Matrix proteolytisch aufzuspalten und führen damit zur Zerstörung der Bluthirnschranke (23, 24).

#### 1.2.2.2.4 T-Lymphozyten

Zytotoxische T-Zellen schädigen das Hirnparenchym direkt, aber auch indirekt zusammen mit T-Helferzellen durch Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-22, IL-17), während regulatorische T-Zellen in der Lage sind die Entzündungsreaktion durch Sezernierung anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10, TGF- $\gamma$ ) zu reduzieren (13).

#### 1.2.2.2.5 Zytokine

Zytokine sind immunmodulierende Signalmoleküle, die der Kommunikation zwischen Immunzellen dienen und Einfluss auf Zelldifferenzierung und -wachstum haben. Sie werden nach Ischämieereiz durch Endothelzellen, Mikroglia, Astrozyten, Neuronen, Makrophagen,

Neutrophile und Thrombozyten sezerniert (13). Man geht davon aus, dass die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  bei zerebraler Ischämie zur einer Exazerbation der Inflammation führen (25). Den anti-inflammatorischen Zytokinen IL-10 und TGF- $\beta$  schreibt man neuroprotektive Funktionen zu. So inhibiert IL-10 TNF- $\alpha$  sowie IL-1 und hemmt dadurch inflammatorische Prozesse (26). TGF- $\beta$  konnte wiederum in vitro Neuronen vor einer, durch Ischämie induzierten, Glutamat-Exzitotoxizität schützen und führte zu einer Reduzierung der Mikroglia-Proliferation/-Aktivierung. Darüber hinaus induziert es die Expression des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 (27).

#### 1.2.2.2.6 Chemokine

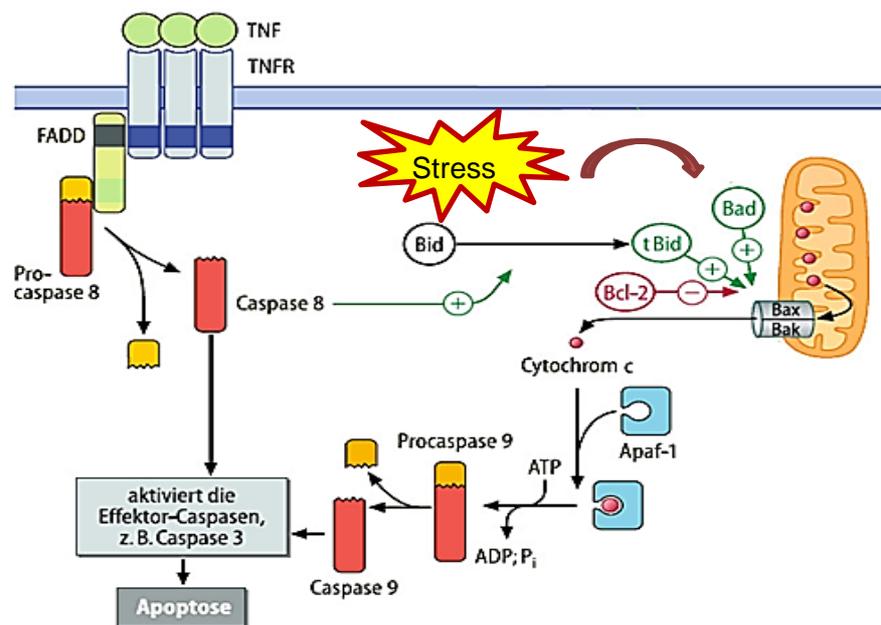
Chemokine vermitteln pro-inflammatorische Signale und induzieren die Rekrutierung von Immunzellen zum geschädigten Gewebe. Chemokine wie IL-8 und CCL-2 werden im Gehirn primär auf Neuronen und Gliazellen exprimiert. Zirkulierende Chemokine stammen oft von peripheren Immunzellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (28). Die Erhöhung der Chemokine CCL2 und CCL-3 korreliert mit einer verstärkten Infiltration der peripheren Neutrophilen, zudem sind sie in den frühen Stunden nach einem Schlaganfall hochreguliert (16, 29).

#### 1.2.2.3 Mikrozirkulations- und Reperfusion-Störungen

Die zerebrovaskulären Endothelzellen der Kapillaren bilden zusammen mit den Perizyten und den Endfüßen der Astrozyten die Bluthirnschranke. Außerdem regulieren die Endothelzellen das zerebrale Mikrozirkulationssystem sowie Entzündungs- und Koagulationsprozesse (30). Nach Wiederherstellung der Kreislauffunktion kommt es durch Einwanderung von Neutrophilen zur Aktivierung des Endothels mit Einleitung prokoagulierender, pro-inflammatorischer und pro-oxidierender Prozesse (31). Folgen sind eine Endotheldysfunktion mit gestörter Blutflussregulierung und poröser Blut-Hirn-Schranke, welche wiederum zu einem Hirnödem und Bildung von diversen Mikrothromben in den Hirngefäßen führt (2). Die Adhäsion der Neutrophilen am Endothel kann ebenso zu einem Verschluss in den Kapillaren führen (13). Die genannten Mechanismen führen somit trotz Spontanzirkulation zu einer inadäquaten zerebralen mikrovaskulären Reperfusion, was als „No-Reflow“-Phänomen bezeichnet wird. Folgen sind eine persistierende Ischämie und Mikroinfarkte (23, 32).

## 1.2.2.4 Apoptose

Bei der Apoptose kommt es zu einer kontrollierten Elimination von beschädigten, infizierten oder unkontrolliert wachsenden Zellen. Normalerweise herrscht ein Gleichgewicht zwischen dem pro-apoptotischen Proteinen Bax, Bad, Bid und dem anti-apoptotischen Protein Bcl. Beim CA führen inflammatorische Prozesse, oxidativer Stress und Exzitotoxizität zur verstärkter Expression und Aktivierung pro-apoptotischer Proteine (33). Zusammen mit weiteren mitochondrialen Proteinen bilden sie sog. Permeabilitäts-Transitions-Poren, was eine Freisetzung des mitochondrialen Apoptose-Mediatorproteins Cytochrom c zur Folge hat. Dieses bindet an ein Adapterprotein (Apaf-1, Apoptotic Protease activating Factor 1) und bildet mit ihm einen Komplex, an welchen Procaspase 9 bindet, wodurch es proteolytisch aktiviert wird. Anschließend werden weitere Effektorcaspasen aktiviert, woraus eine Induktion der Apoptose resultiert (► Abb. 1.2-4) (34).



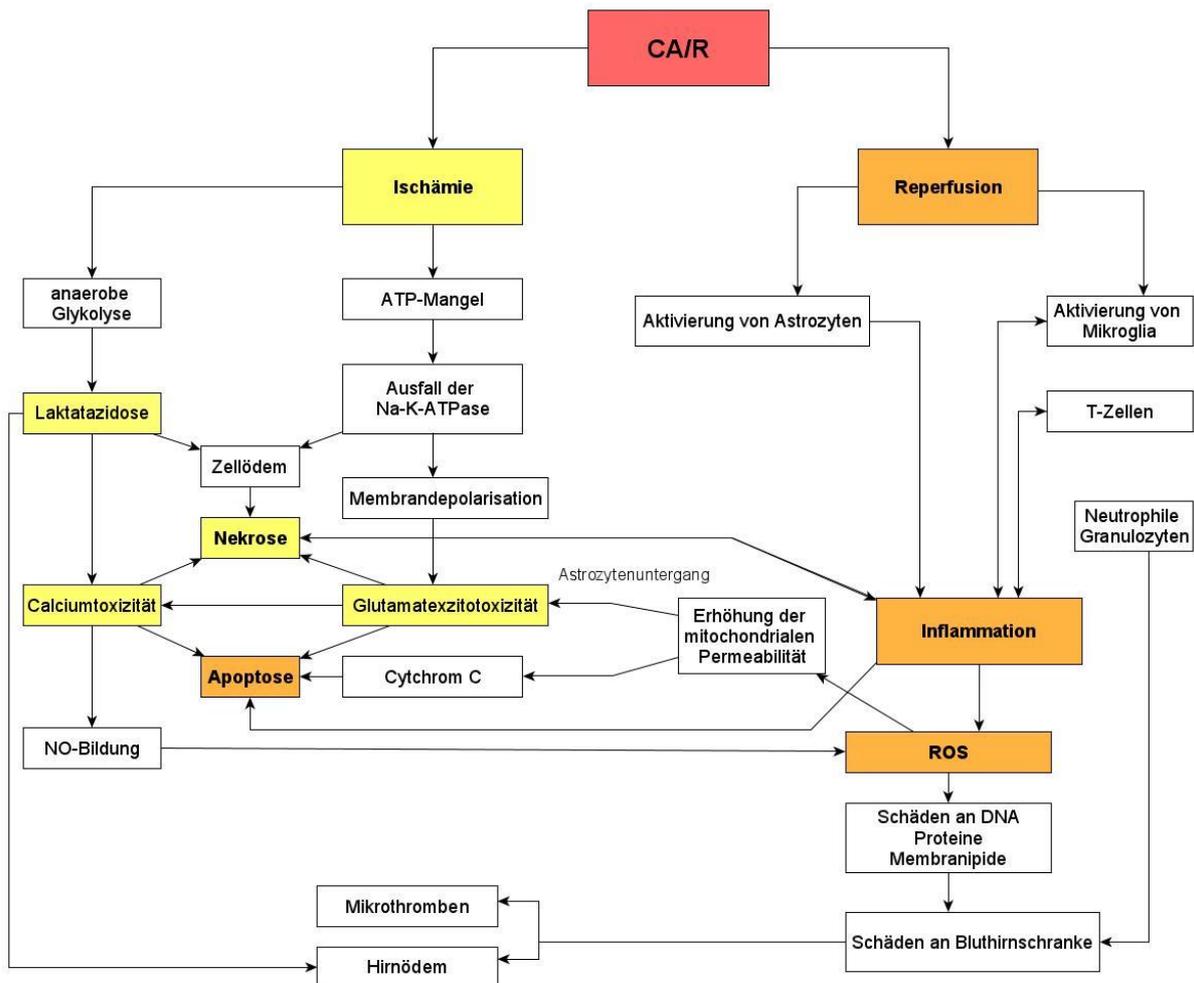
**Abb. 1.2-4 Apoptotische Signalkaskaden**

Der extrinsische Weg der Apoptose wird durch Bindung von TNF- $\alpha$  an den TNF-Rezeptor ausgelöst, der intrinsische Weg wird durch Stressfaktoren aktiviert. Mod. nach (34).

Eine weitere Einleitung der Apoptose erfolgt extrinsisch durch die Ausschüttung von pro-apoptotischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ . Dieses bindet an den TNF-Rezeptor, es folgt nach Anlagerung an ein Adaptermolekül (FADD) die Bindung der Initiatorcaspase Procaspase 8 mit proteolytischer Aktivierung und anschließend die Aktivierung von Effektorcaspasen.

Caspase 8 ist zudem in der Lage, den intrinsischen Aktivierungsweg durch Spaltung des proapoptischen Proteins Bid zusätzlich zu aktivieren (► Abb. 1.2-4) (34).

Morphologisch kommt es anschließend zur Zellschrumpfung, Kondensation des nukleären Chromatins und zur DNS-Fragmentierung. Anschließend zerfällt die Zelle in apoptotische Partikel, welche von benachbarten Makrophagen aufgenommen werden. Im Gegensatz zur Nekrose folgt der Apoptose keine Entzündungsreaktion (17). Es kommt zu einem Zusammenspiel sehr vieler unterschiedlicher Pathomechanismen (► Abb. 1.2-5)



**Abb. 1.2-5 Das Zusammenspiel der Pathomechanismen nach ACA/R.**

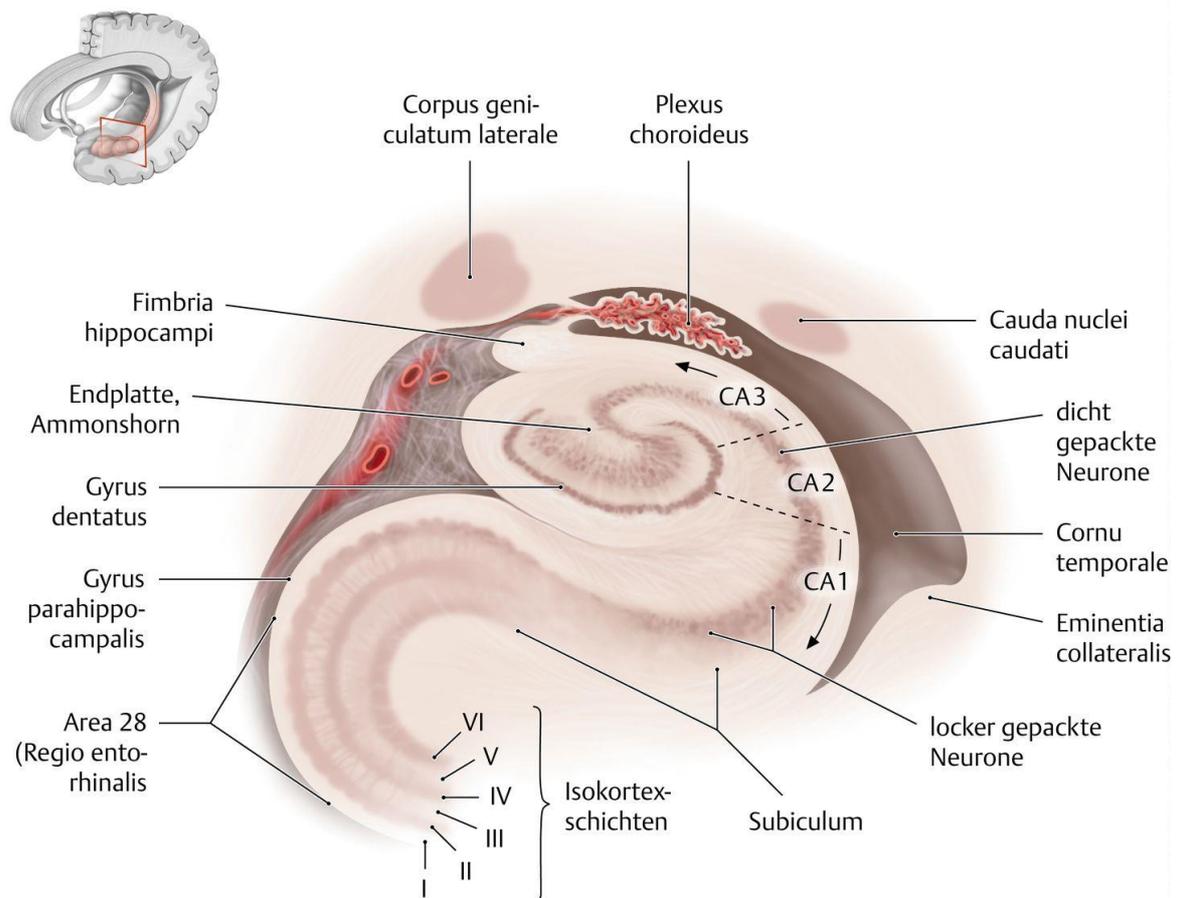
gelb: primäre Schäden durch Ischämie; orange: sekundäre Schäden nach Reperfusion; ROS, Reaktive Sauerstoffradikale; NO, Stickstoffmonoxid; (eigene Abbildung)

### 1.3 Hippocampus

Ich möchte in meiner Arbeit kurz auf den Hippocampus eingehen, da dieser besonders vulnerabel auf Ischämie reagiert und Schäden in anderen Hirnregionen über eine Vergleichsanalyse besser zu beurteilen sind.

### 1.3.1 Anatomie und Funktion

Der Hippocampus befindet sich im medialen Teil des Temporallappens. Man unterscheidet zwischen dem Hippocampus im eigentlichen Sinne und der Hippocampusformation im weiteren Sinne. Die Hippocampusformation besteht aus Gyrus dentatus, Cornu ammonis und Subiculum. Das Cornu ammonis gliedert sich zusätzlich in die Abschnitte CA1, CA2 und CA3 (► Abb. 1.3-1). Weiterhin lässt sich histologisch eine Mehrschichtung erkennen. In der Mitte liegt das Stratum pyramidale mit den Perikarya der Pyramidenzellen. Oberhalb des Stratum pyramidale bilden die Axone der Pyramidenzellen und deren Netzwerk an basalen Dendriten das Stratum oriens. Nach außen haben wir die Strata radiatum und lucidum. Hier befindet sich ein dichtes Netzwerk an apikalen Dendriten der Pyramidenzellen, diese ziehen weiter in das Stratum lacunosum und das Stratum moleculare.



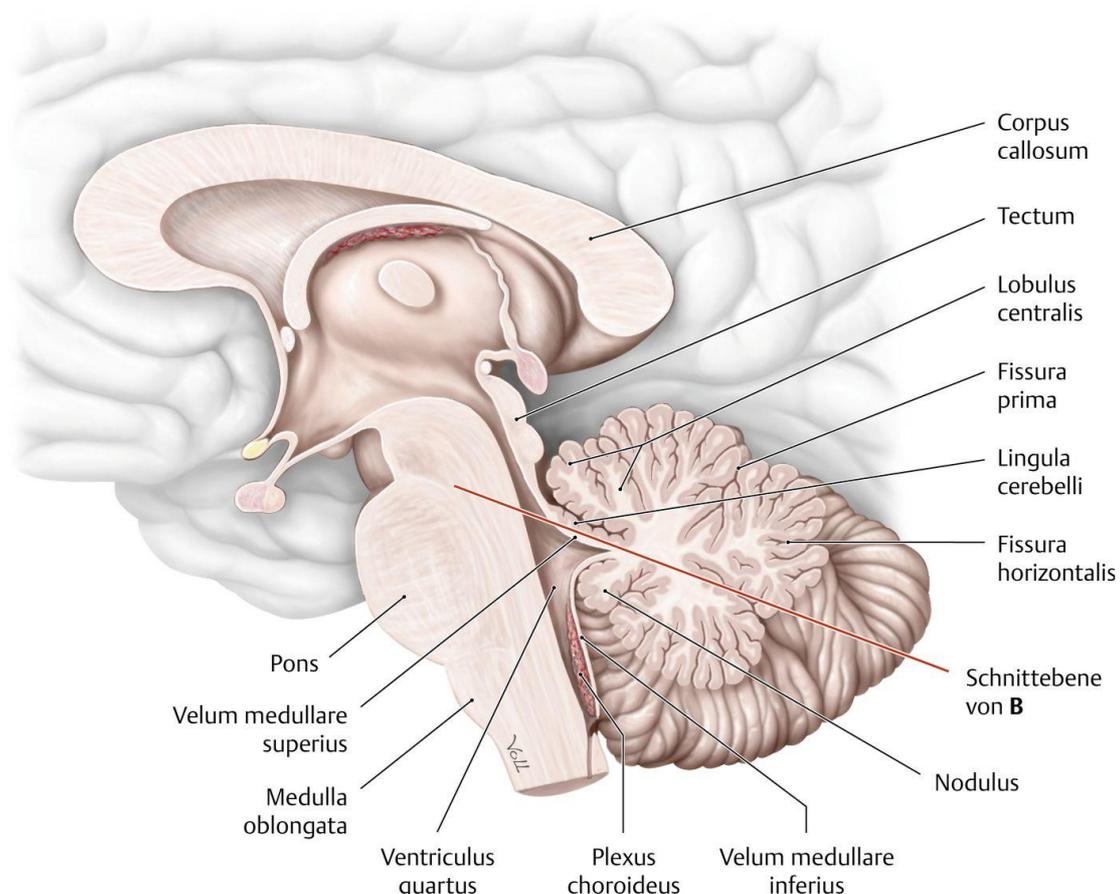
**Abb. 1.3-1 Zytoarchitektur der Hippocampusformation.**

Ansicht von links frontal. Aus (35)

Die hochkomplexe Funktion des Hippocampus ist noch nicht vollständig erforscht. Ein beidseitiger Ausfall führt jedoch zum Unvermögen, Informationen aus dem Kurzzeitgedächtnis in das Langzeitgedächtnis zu speichern. Aus diesem Grund schreibt man ihm eine wichtige Bedeutung bei der Gedächtnisbildung zu (36).

#### 1.4 Cerebellum

Das Kleinhirn befindet sich in der hinteren Schädelgrube und grenzt unmittelbar an Pons und Medulla oblongata. Vom Okzipitallappen des Großhirns wird es durch das Tentorium cerebelli, einer Dura-Duplikatur getrennt. Es bildet zusammen mit den drei Kleinhirnstielen (Pedunculi cerebellaris superior, medius und inferior), welche die zu- und abführenden Bahnen des Cerebellums enthalten, das Dach des IV. Ventrikels. Aufgabe des Kleinhirns ist es, Bewegungsabläufe zu korrigieren, zu koordinieren und zu optimieren. Bei einer Kleinhirnschädigung kommt es dementsprechend nicht zu einem kompletten Bewegungsausfall, sondern vielmehr zu komplexen Bewegungsstörungen. Abbildung 1.4-1 zeigt die topographische Lage des Cerebellums.



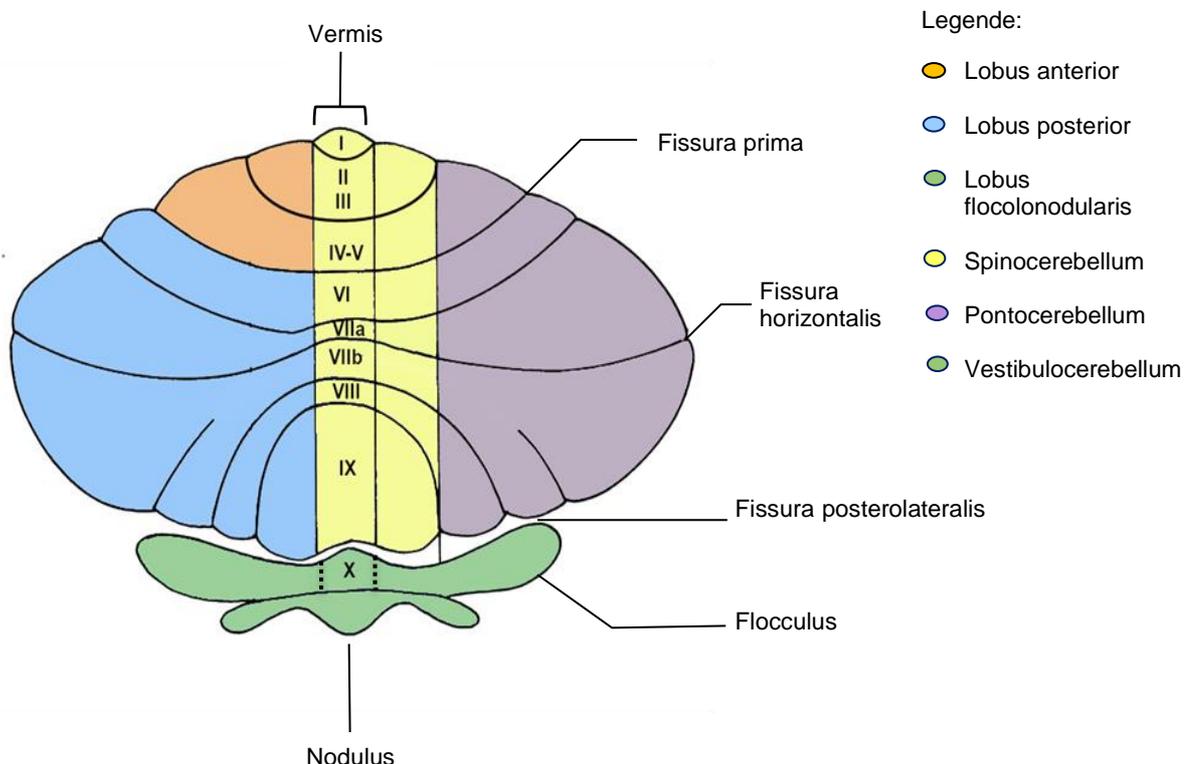
**Abb. 1.4-1 Topographische Lage des Cerebellums.**

Mediansagittalschnitt des Cerebellums. Aus (35).

### 1.4.1 Anatomie und Funktion

Das Kleinhirn setzt sich aus zwei Hemisphären und einem mittleren Teil, dem Wurm (Vermis), zusammen. Auf der Oberfläche erkennt man zahlreiche, querverlaufende Furchen, welche ohne Unterbrechung die Mittellinie überqueren. Führt man einen sagittalen Schnitt durch das Cerebellum, kommt der Arbor vitae cerebelli zum Vorschein, eine baumartige Verzweigung der weißen Substanz. Die Windungen des Kleinhirns werden aus diesem Grund Folia (Blätter) genannt. Gruppen von Folia bilden Lobuli (I-X), diese bilden wiederum Lobi (I-III). Der Lobus anterior bildet den 1. Lobus und besitzt die Lobuli I-V. Durch die Fissura prima wird er vom 2. Lobus getrennt, der die Lobuli VI-IX besitzt. Der Lobus flocculonodularis bildet den 3. Lobus und ist zugleich der X. Lobuli. In einer Arbeit zum Cerebellum im CA/R-Modell zeigten sich vor allem Degenerationen der Pyramidenzellen (PZ) im medianen Bereich des Cerebellums (37), insbesondere in den cerebellaren Lobuli III und IX (38). Bei einem Schnitt quer durch das Cerebellum sind die Kleinhirnerkerne im Kleinhirnmarklager zu erkennen. Dabei unterscheidet man Ncl. dentatus, Ncl. emboliformis, Ncl. globosus und Ncl. fastigii.

Funktionell und anatomisch unterteilt man das Kleinhirn in Vestibulocerebellum, Spinocerebellum und Pontocerebellum (► Abb. 1.4-2).



**Abb. 1.4-2 Schematische Darstellung des Cerebellums.**

Das Cerebellum besteht aus drei Lobi, die sich aus Lobuli zusammensetzen (I-X). Funktionell und anatomisch kann das Cerebellum zusätzlich in Spino-, Ponto- und Vestibulocerebellum unterteilt werden. Mod. nach (39).

Das Vestibulocerebellum befindet sich im Lobus flocculonodularis. Der mediale Teil des Vestibulocerebellums sorgt bei Durchführung einer Bewegung für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts durch Tonusadaptation von Rumpfmuskulatur und Extensoren, während der laterale Teil des Vestibulocerebellums bei Bewegung Kopf- und Augenbewegungen koordiniert. Um dies zu realisieren, erhält das Vestibulocerebellum primäre vestibuläre Afferenzen mit Lage- und Beschleunigungsinformationen aus dem Ncl. vestibularis und visuelle Afferenzen aus dem Prätektum und dem visuellen Kortex sowie somatosensorische Informationen über die Lage des Körpers. Schäden im Vestibulocerebellum können zur Stand- und Rumpfataxie, Sakkaden, Spontannystagmus und Störung des vestibulookulären Reflexes führen.

Das Spinocerebellum besteht aus Vermis und Pars intermedia. Es ist zuständig für die Feinabstimmung der Muskulatur während einer Bewegungsausführung.

Dafür erhält es Afferenzen aus dem Rückenmark mit Informationen über die aktuelle Stellung und den Tonus der Skelettmuskulatur. Die verarbeitete Information wird über Efferenzen hauptsächlich zum Ncl. ruber und zur Formatio reticularis weitergeleitet. Beide Zentren senden koordinierende, und ggf. korrigierende Signale zurück in das Rückenmark. Eine Schädigung des Spinocerebellums kann zur Dysmetrie, Dysdiadochokinese und zum Intentionstremor führen.

Das Pontocerebellum enthält die zwei Kleinhirnhemisphären. Es ist für das motorische Lernen und die Erstellung, das Erlernen und das Speichern raumzeitlich komplexer Bewegungsmuster (z.B. sprechen, Gitarre spielen) zuständig. Dies gelingt über kortikocerebellare-thalamo-kortikale Projektionsschleifen ohne, dass sensorisches Feedback oder bewusste Kontrolle nötig sind. Bei einer pontocerebellären Dysfunktion kommt es zu Dysarthrie, Asynergie und Dekomposition (40).

#### **1.4.2 Afferente und efferente Verbindungen des Kleinhirns**

Grundsätzlich ziehen afferente Fasern zur Kleinhirnrinde. Dabei geben sie wichtige Kollaterale an die Kleinhirnkern ab. Efferente Fasern ziehen von den Kleinhirnkernen in den Hirnstamm und zum Thalamus oder direkt in das Vestibularorgan.

Die afferenten- und efferenten Fasern verlaufen in den drei Kleinhirnstielen Pedunculi cerebellares superior, medius und inferior. In Tabelle 1.4-1 sind die afferenten und efferenten Verbindungen mit ihren Aus- und Eingängen sowie ihrer Bedeutung in den jeweiligen Pedunculi aufgelistet.

Kleinhirnstiel	Leitungsbahnen	Ausgang	Eingang	Bedeutung
<b>Pedunculus cerebellaris inferior</b>	Tr. cerebello vestibularis	Vestibulocerebellum Ncl. fastigi	Ncll. vestibularis Formatio reticularis Olivia inferior	Gleichgewicht Okulomotorik
	Tr. vestibulo cerebellaris	Ncll. vestibulares	Vestibulocerebellum Ncl. fastigii	
	Tr. olivocerebellaris	Ncll. olivares inf.	Als Kletterfasern in das Ponto- und Spinocerebellum	Informationen über Impulse, die im gleichen Augenblick in der Pyramidenbahn nach unten in das Rückenmark laufen
	Tr. spinocerebellaris posterior	Ncl. dorsales	Spinocerebellum	enthält propriozeptiv- sensible Informationen
<b>Pedunculus cerebellaris medius</b>	Fibrae pontocerebellares	Ncl. pontis	Pontocerebellum Ncl. dentatus Ncl. emboliformis	Koordinierung von Bewegungsentwürfen aus dem Großhirn
<b>Pedunculus cerebellaris superior</b>	Tr. Cerebello-thalamicus	Pontocerebellum Ncl. dentatus	Thalamus → motorischer Kortex	Einfluss auf Willkürmotorik
	Tr. cerebellorubralis	Spinocerebellum Ncl. emboliformis Ncl. globosus Ncl. dentatus	Ncl. ruber (Mesencephalon)	Über den Tractus rubrospinalis Einfluss auf extrapyramidale Motorik
	Tr. spinocerebellaris anterior	Ncl. dorsales	Spinocerebellum	enthält propriozeptive Informationen

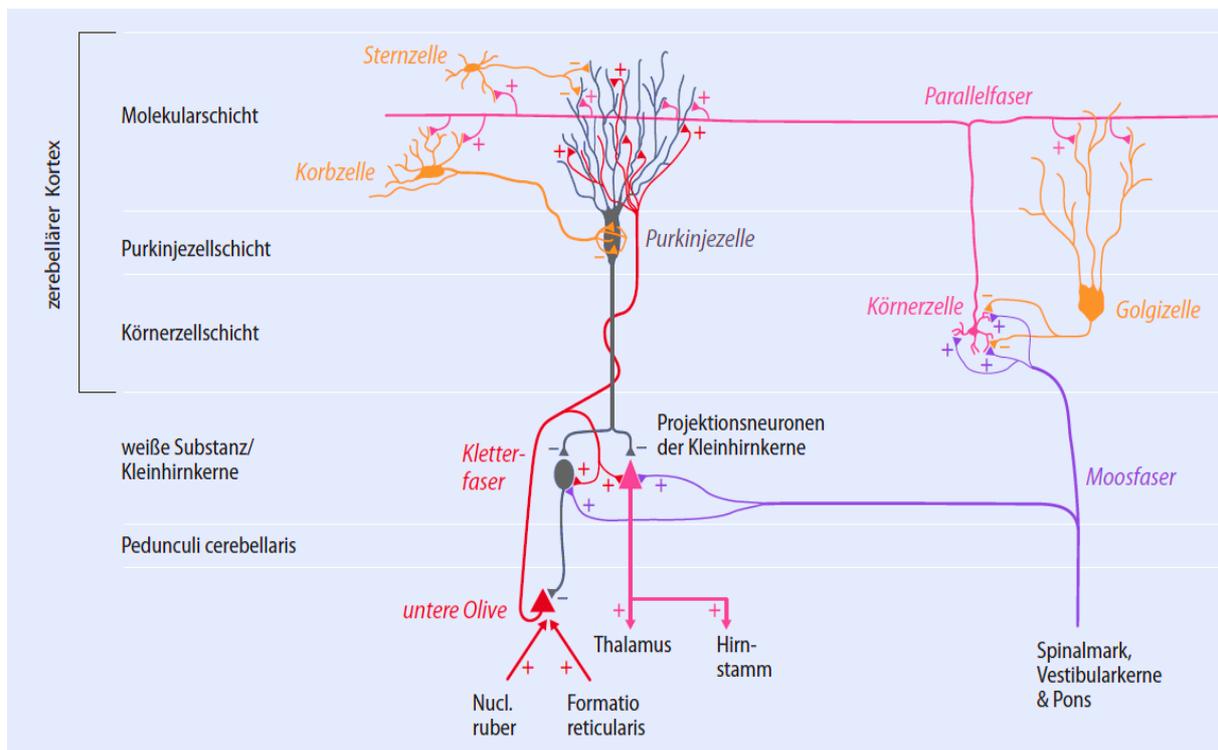
**Tab. 1.4-1 Afferente und efferente Verbindungen des Kleinhirns und ihre Bedeutung.**

Die afferenten Verbindungen sind orange, die efferenten grau unterlegt; *Tr*, Tractus; *Ncl*, Nucleus; *Ncll*, Nuclei.

### 1.4.3 Die zelluläre Konnektivität des Cerebellums

Der Kleinhirnkortex setzt sich aus drei Zellschichten zusammen: Molekular-, Purkinje- und Körnerzellschicht (► Abb. 1.4-3).

Die GABAergen PZ bilden mit ihren Perikarya die Purkinjzellschicht, sie sind von speziellen Astrozyten (Bergmann-Glia) umgeben (21). Ihre Axone projizieren zu den tiefen exzitatorischen Kleinhirnkernen bzw. beim Lobus flocculonodularis direkt zum Ncl. vestibularis lateralis und inhibieren diese. Ihre Dendriten bilden in der Molekularschicht einen großen, komplexen Dendritenbaum. Ebenfalls in der Molekularschicht befinden sich die inhibitorischen Stern- und Korbzellen. Diese werden von den Körnerzellen erregt und modulieren die Aktivität der PZ durch Inhibition. Bei Sauerstoff- und Glukosemangel kommt es auch bei Sternzellen zu einer Änderung der Morphologie und Expression der NO-Synthase (41). Zudem sind sie in der Lage, durch ihre inhibitorischen Synapsen das Maß der Ischämie-relevanten Exzitation an den PZ zu kontrollieren (33).



**Abb. 1.4-3 Schematische Darstellung der cerebellaren Verschaltung.**

Dargestellt sind die fünf wichtigsten Nervenzellen und ihre Verknüpfungen; exzitatorische Synapsen sind mit (+) dargestellt, inhibitorische mit (-); Aus (40).

Die glutamatergen Körnerzellen bilden die Körnerzellschicht und machen 99 % der cerebellaren Neurone aus. Sie sind die einzigen exzitatorischen Neurone und bilden mit ihren Axonen die sogenannten Parallelfasern, welche in der Molekularschicht senkrecht zu

den Dendriten der PZ verlaufen und diese erregen. Des Weiteren erregen sie die Dendriten der Golgizellen, welche wiederum die Körnerzellen direkt an der Stelle der synaptischen Moosfaser-Eingänge inhibieren (Rückwärtshemmung). Golgizellen modulieren somit die Aktivität der Körnerzellen.

Exzitatorische Eingänge des Cerebellums stammen von den Kletter- und Moosfasern. Die Axone der Kletterfasern entstammen der unteren Olive. Jeweils eine PZ wird von genau einer Kletterfaser exzitatorisch innerviert, eine Kletterfaser innerviert jedoch über Verzweigungen mehrere PZ. Die Axone der Moosfasern entstammen den Projektionsneuronen aus Spinalmark, Vestibulariskernen und Pons. Diese erregen die Körnerzellen, welche wiederum über ihre Parallelfasern wie oben bereits beschrieben, die PZ erregen. Darüber hinaus senden Moos- und Kletterfasern auf ihrem Weg zum cerebellaren Kortex exzitatorische Axonkollaterale an die Kleinhirnkerne. Da die Kleinhirnkerne bereits inhibitorische Signale von den PZ erhalten, bildet sich in Addition mit dem exzitatorischen Signal der Körnerzellen eine Restaktivität (Erregungsdifferenz), welche das physiologische Verrechnungsergebnis im Kleinhirn darstellt (40).

## 1.5 Das Tiermodell

Tiermodelle zur Erforschung von pathophysiologischen Mechanismen und Therapiekonzepten nach Herzstillstand und Reanimation sind essentiell, da aus ethischen und moralischen Gründen eine Erprobung direkt am Menschen ausgeschlossen ist.

In der Literatur finden sich leider viele unterschiedliche CA-Modelle mit Unterschieden beispielsweise in der zu verwendeten Tierart (z.B. Schweine, Ratten, Mäuse) und in der zum Herzstillstand führenden Technik. Eine häufige Methode zur Auslösung einer globalen Ischämie ist die Defibrillation mit Konversion in ein Kammerflimmern und damit die Erzeugung einer Pulslosigkeit. Nachteile hierbei sind jedoch eine spontane Konversion durch Selbst-Defibrillation bei kleinen Nagetieren und thermische Schäden (42). Eine weitere Möglichkeit ist die intravenöse Gabe von Kaliumchlorid zur Erzeugung einer Kardioplegie. Da Kalium jedoch zudem eine vasokonstriktorische Wirkung hat und zur endothelialen Dysfunktion beiträgt (43), können Studien dadurch verfälscht werden. Die Okklusion gehirnversorgender Arterien ist eine weitere Methode, jedoch kann es durch Kollateralen zu einer Restperfusion des Gehirns kommen (44).

Im CA-Model dieser Arbeit kommen Wistar-Ratten zum Einsatz, bei denen es durch Asphyxie zu einem Herzstillstand kommt. Dabei erfolgt nach Einleitung der Narkose und invasiver Beatmung die Abschaltung der Beatmungsgeräte. Nach einer 6-minütigen Asphyxiezeit erfolgt eine Reanimation durch Wiederbeatmung, Herzdruckmassage und

intravenöser Gabe von Adrenalin. Da der Atemstillstand bei jungen Menschen und Kindern eine nicht seltene Todesursache ist (45), kommt dieses CA-Modell der Realität sehr nahe.

Aufgrund der Heterogenität der CA-Modelle ist es schwierig, die Ergebnisse untereinander zu vergleichen. So zeigen Arbeiten zum Cerebellum Unterschiede in der Schwere der PZ-Degeneration mit sowohl massiven (37, 46, 47) als auch moderaten und minimalen (48–50) Ausprägungen, sowie Unterschiede in der zeitlichen Manifestation. Gründe für diese Diskrepanzen können die Verwendung unterschiedlicher Tiergattungen und -arten (z.B. Wistar vs. Sprague-Dawley-Ratten (51); Mäuse vs. Ratten (33)), eine Heterogenität in der Qualität der Autopsie und des postmortalen Gewebes (8), die Untersuchung unterschiedlicher Kleinhirnregionen und differente Überlebenszeiten sein.

<b>Tiermodell</b>	<b>Tierart</b>	<b>PubMed-Nennung</b>
Cardiac Arrest	Ratte	3087
	Maus	911
	Kaninchen	736
	Schwein	2352
Asphyxia Cardiac Arrest	Ratte	217
	Maus	5
	Kaninchen	20
	Schwein	95
Cardiac Arrest/brain	Ratte	940
	Maus	204
	Kaninchen	79
	Schwein	486
Cardiac Arrest/cerebellum	Ratte	58
	Maus	11
	Kaninchen	3
	Schwein	31
Asphyxia Cardiac Arrest/brain	Ratte	148
	Maus	2
	Kaninchen	7
	Schwein	29
Asphyxia Cardiac Arrest/cerebellum	Ratte	4
	Maus	1
	Kaninchen	0
	Schwein	1

**Tab. 1.5-1 PubMed-Recherche zur CA-Literatur (April 2020)**

## 2. Fragestellung

Motorische Störungen bei Überlebenden nach Herz-Kreislauf-Stillstand sind ein häufig beobachtetes Phänomen. Aufgrund der komplexen Rolle des Cerebellums in der Bewegungsdurchführung ist seine Schädigung nach CA/R naheliegend. Nichtsdestotrotz ist das Cerebellum in Arbeiten zu CA/R unterrepräsentiert. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Aufklärung des pathophysiologischen Ursprungs von Bewegungsstörungen nach ACA/R leisten und konzentriert sich dabei insbesondere auf die Rolle des Cerebellums.

In dieser Arbeit wurden männliche Wistar-Ratten nach einem 6-minütigen Herz-Kreislauf-Stillstand durch Asphyxie reanimiert und die Cerebella nach unterschiedlichen Überlebenszeiten immunhistochemisch untersucht und mit Cerebella unbehandelter und sham-operierter Tieren verglichen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Experiment

Die Experimente erfolgten in der interdisziplinären Arbeitsgruppe (Neurobiologie/Anästhesiologie) an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Als ich in die Arbeitsgruppe kam, war das Asphyxia Cardiac-Arrest/Resuscitation-Modell (ACA/R) der Ratte bereits sehr gut etabliert (51–62). Das Modell ermöglicht die Untersuchung neurologischer Schäden nach Herz-/Kreislauf-Stillstand.

##### 3.1.1 Versuchstiere

Bei den Experimenten kamen grundsätzlich männliche Albino-Ratten der Art *Rattus norvegicus*, Typ Wistar (inbred, Harlan-Winkelmann, Borchon, Deutschland) zum Einsatz. Zum Versuchsbeginn hatten diese ein Körpergewicht von etwa 350-400 g. Alle Tiere waren zwischen zweieinhalb und drei Monaten alt. Die Tiere stammten aus der institutseigenen Zucht und wurden in einem zertifizierten Tierstall des Instituts für Biochemie und Zellbiologie unter konstanten Klimabedingungen (Raumtemperatur:  $20 \pm 2$  °C; Luftfeuchte: 55 – 60 %) mit einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus (Licht an um 6:00 Uhr) und einem jederzeit freien Zugang zu Nahrung und Wasser (Standardfutter Altromin 1324™, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) gehalten.

Alle Tiere wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes behandelt. Sämtliche Versuche wurden durch die zuständigen Ämter des Landes Sachsen-Anhalt genehmigt (Tierversuchsnummer: 42502-2-2-947 Uni MD).

##### 3.1.2 Aufteilung der Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden nach dem Zufallsprinzip in eine der ACA/R-Versuchsgruppen eingeteilt. Dabei wählten wir Überlebenszeiten (ÜZ) nach ACA/R von 6 h und 1, 2, 7, und 21 Tagen. In jeder Gruppe befanden sich anfangs 8 Tiere. Die ÜZ wurden gewählt, um neben den frühen neurodegenerativen Phasen auch eine deutlich spätere abzudecken. Außerdem sind das die am häufigsten von anderen Gruppen verwendeten ÜZ, was eine vergleichende Analyse ermöglichte.

Zum Vergleich gab es weiterhin zwei Kontrollgruppen; sham-operierte ( $n = 5$ ) und völlig unbehandelte Tiere ( $n = 3$ ). Somit wurde die Studie mit 48 Tieren begonnen. Bei den sham-operierten Tieren wurde eine Narkose durchgeführt, jedoch auf den Herz-Kreislauf-Stillstand verzichtet. Nach der entsprechenden ÜZ wurden die Tiere getötet und das Groß- und

Kleinhirn für weitere Untersuchungen entnommen. In der Arbeitsgruppe wurden bereits sehr viele Untersuchungen zu den sham-operierten Tieren durchgeführt. Aus diesen ging hervor, dass es keine ÜZ-abhängigen Unterschiede in der Morphologie gibt. Aus diesem Grund kam auch im Sinne des verantwortungsvollen Umgangs mit Versuchstieren nur eine Sham-Gruppe mit der ÜZ von 7 Tagen zum Einsatz.

### **3.1.3 Asphyxial-Cardiac-Arrest-Modell der Ratte**

#### **3.1.3.1. Vorbereitende Präparationen**

Zuerst wurden die Tiere gewogen. Dann erfolgte die Narkoseeinleitung mit 5 % Sevofluran (Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland) in einem Lachgas-Sauerstoffgemisch ( $N_2O:O_2 = 40:50$ ; 4 l/min) über eine Gesichtsmaske. Bei erhaltener Spontanatmung erfolgte die endotracheale Intubation unter direkter laryngoskopischer Sicht mit einer 14G Venenverweilkanüle (Vygon, Aachen, Deutschland). So konnte während des gesamten Versuchsablaufes eine volumenkontrollierte Beatmung (IPPV) mit einem speziellen Kleintierbeatmungsgerät (Animal Ventilator SAR-830A, CWE Inc., Ardmore, OA, USA) durchgeführt, mit Hilfe des Datenerfassungsprogramms WinDaq Pro+ (DATAQ Instruments, Inc. Akron, OH, USA) auf dem Computerbildschirm dargestellt und aufgezeichnet werden. Dabei war am Expirationsschenkel des Beatmungsgerätes ein positiv-endexpiratorischer Druck (PEEP) von 3-5 cmH<sub>2</sub>O eingestellt. Damit wurde einer Atelektasenbildung entgegengewirkt. Das Atemminutenvolumen betrug 1 l/kg Körpergewicht, die Beatmungsfrequenz 65/min. Weiterhin wurden die Herzfrequenz durch ein Extremitäten-EKG und die Körperkern- und Hirntemperatur mittels einer rektalen und tympanalen Temperatursonde kontinuierlich überwacht. Um eine in unseren Experimenten nicht erwünschte neuroprotektive Hypothermie zu unterbinden, wurde die Hirntemperatur der Versuchstiere mit der beheizbaren Unterlage (Temperaturcontroller TC-813 SN 97106 (CEW, Inc.) gekoppelt und so die Temperatur zwischen 37 °C und 37.5 °C konstant gehalten. Bei Temperaturabfall kam eine zusätzliche Wärmelampe zur optimalen Temperatureinstellung zum Einsatz.

Nun erfolgte die Rasur, Desinfektion und Präparation der Arteria et Vena femoralis in der linken Leistenregion. Zuerst wurde die Vene mit einem 8 cm langen 20G Katheter (20 G arterielle Kanüle; Vygon) kanüliert. Danach erfolgte die Punktion der Arteria femoralis mittels einer 24G Venenverweilkanüle (Vygon). Der Katheter wurde so platziert, dass sein Ende am Übergang zur Arteria iliaca zu liegen kam. Beide Zugänge wurden durch eine Ligatur proximal gesichert (► Abb. 3.1-1). Die arterielle Kanüle wurde an einen Druckwandler (Combitrans MS2 Braun®, Kronberg, Deutschland) angeschlossen, um eine invasive Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) durchführen zu können. Alle Katheter wurden vor ihrer Verarbeitung mit einer Kochsalz-Heparin-Lösung (500 I.E. in 250 ml 0,9 %

NaCl; Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) gespült und auf Luftfreiheit überprüft. Alle physiologischen Vitalparameter wurden über den gesamten Versuchsablauf registriert.



**Abb. 3.1-1 Versuchsanordnung nach vollständiger Präparation der Ratte**

(a) Tubus (Venenverweilkanüle), (b) EKG-Nadelelektroden, (c) rektale Sonde, (e) tympanale Sonde, (f) arterieller Zugang, (g) venöser Zugang; Foto aus der Arbeitsgruppe.

Kurz vor Einleitung des CA - im Weiteren als Baseline bezeichnet - sowie 5, 15, 30 und 45 min post reanimationem erfolgte eine Blutentnahme mittels einer heparinisierten Spritze über den arteriellen Zugang. Das diente der Messung von Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ), Kohlenstoffdioxidpartialdruck ( $pCO_2$ ), pH-Wert, Blutglukosegehalt und Hämatokritwert (Blutgasanalysegerät ABL™77 SCi, Radiometer Copenhagen, Dänemark; Glukosemessgerät Accutrend® GC Typ 1418246 (Boeringer Mannheim, Deutschland). Alle Daten wurden für jedes Tier in ein standardisiertes Arbeitsblatt (► Abb. 3.1-2) eingetragen. Es wurde darauf geachtet, dass die Vitalparameter über den Beobachtungszeitraum hinweg in den jeweiligen Normbereichen lagen. Ein kritischer Blutdruckabfall ( $MAP < 80$  mmHg) wurde mit  $4 \mu\text{g/ml}$  ( $12 \mu\text{g/h}$ ) Noradrenalin (Braun Melsungen) behandelt. Einem Abfall des pH-Wertes von unter 7,1 wurde mit einer Gabe von Natriumhydrogenkarbonat (7,4 %, Braun Melsungen) entgegengewirkt.

Weight (g): 345 X 7,0 ml/kg=TV 2,42 ml f=50: 241,5 ml/min 0,60 s<sub>t</sub> - set: 1,20 revolutions  
 0,5 l:E f=60: 289,8 ml/min 0,50 s<sub>t</sub> - set: 1,00 revolutions  
 Narc.-Gas: 1 2,0 cm PEEP f=70: 338,1 ml/min 0,43 s<sub>t</sub> - set: 0,86 revolutions

ROSC +/- 1 Medikamente  
 in prot. +/- Norcuron 0,35 ml Lsg: 1 mg/ml 3 (Anzahl)  
 surv. time h Adrenalin 0,35 ml Lsg: 0,01 mg/ml 1 (Anzahl) 10 ug/kg

Start: 31.5.00 Study #: A\_028 Asphyxia Time: 8 min.  
 Perfusion/Tod: Perf./Dekap./Tod: Perfusat:

1=Perf.; 2=Dekap.; 3=Tod  
 Ersttemp Trect.: 36,8 °C Tlymp.: 33,5 °C  
 AA end Trect.: 35,9 °C Tlymp.: 34,8 °C  
 Hypert.b. 1st: 187 mmHg 2nd: 181 mmHg  
 pROSC urin: min respir.: 19 min

Start time	7:02	Uhr
Intubation	7:06	Uhr
IV line	7:18	Uhr
IA line	7:27	Uhr
Washout	7:40	Uhr
Asphyxia	7:45	Uhr
Arrest	190	sec.
Start CPR	7:53	Uhr
ROSC	57	sec.
Extubation	9:12	Uhr
Cage		Uhr

AA-Rhythmus: 1  
 1=Asyst.; 2=EMD; 3=VF

1 Tierbestand 1=grün, 2=gelb  
 1 Temperaturkontrolle 0=nein, 1=ja

Prep-time 0:38 = 38 min  
 MAP low 1st mmHg  
 MAP low min mmHg  
 1 VF? 0=nein, 1=ja

	pre	Baseline	ROSC 5'	ROSC 15'	ROSC 30'	ROSC 60'	45
Time	07:29	07:37	07:59	08:09	08:24	08:52	08:39
Trect.	36,2	36,8	36,3	36,6	37,3	36,8	37,3
Tlymp.	35,7	36,9	35,3	37,0	35,6	36,3	37,2
HR			85,2				23,7
MAP	71	116	130	133	102	92	97
TV	340	340	340	340	340	340	340
Frequ.	60	60	60	62,5	62,5	61	62,5
finsp.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
p-max.	10	10	16	16	14	12	12
FiO2	0,5	0,5	1	1	1	1	1
N2O	0,5	0,5	0	0	0	0	0
Narc.Gas	0,6	0,6	0	0	0	0	0
pH	7,4	7,36	7,04	7,19	7,29	7,38	7,38
pCO2	42	40	67	48	46	33	40
pO2	160	161	205	281	352	346	403
HCO3-	25,6	22,6	13,7	16,5	20,7	21,3	22,9
BE	1,3	-2,3	-14,3	-10,2	-4,7	-4	-1,9
Hct.	42	38	40	43	41	38	42
Gluc.	10,4	8,6	13,2	11,5	7,2	6	6,3
Sat.	99	99	98,7	99,5	99,7	99,8	99,8
			98,7	99,5	99,7	99,8	99,8

	IV-ora	ora-BL	ROSC-5'	5'-15'	15'-30'	30'-60'	60'-Ext.
Norc.							
Bicarb.					0,3		
NaCl							
Gluc.							

Summe	Norc.	0 mg
	Bicarb.	0,3 mmol
	NaCl	0 ml
	Gluc.	0 ml
	Epi.	10 ug/kg

Abb. 3.1-2 Auszug aus einem in der Arbeitsgruppe verwendeten Datenblatt

### 3.1.3.2. Insult und Reanimation

Nun wurden die Tiere mit Vecuroniumbromid (Norcuron®, 1 mg/kg Körpergewicht; 10 mg Durchstechflasche, Merck Darmstadt, Deutschland; gelöst in isotonischer Kochsalz-Lösung, 0,9 %, Braun Melsungen) muskelrelaxiert und ein Washout der Narkosegase durchgeführt. Mit dem Washout sollten Anästhesie-bedingte neuronale Einflüsse minimiert werden. Dazu wurde die Gabe von Lachgas und Sevofluran beendet und die Tiere 1 min mit reinem Sauerstoff und danach für 4 min mit Raumluft beatmet.

Durch Abschalten des Beatmungsgerätes erfolgte nun die Einleitung des CA. Als Beginn des Herz-Kreislaufstillstandes wurde das Fehlen von Pulsationen oder der Abfall des MAP unter 10 mmHg festgelegt. Die Asphyxiezeit betrug grundsätzlich 6 min. Die Zeit bis zum Eintritt des Kreislaufstillstandes, im Mittel knapp 3 min, wurde im Protokoll erfasst. Nach 6 min Asphyxie wurde die Beatmung wieder eingeschaltet (100 % Sauerstoff bei 64 Atemzügen pro min) und mit der Herzdruckmassage (200/min) begonnen. Unmittelbar zuvor erfolgte die Applikation von 0,01 mg/kg Adrenalin und 1 mmol/kg Natriumhydrogencarbonat (beides Braun Melsungen) über den venösen Katheter. Blutdruckwerte > 40 mmHg wurden als Wiederherstellung des spontanen Kreislaufes (ROSC) gewertet. Die Zeit bis zur Wiederbelebung wurde im Protokoll erfasst.

Bei der Sham-Gruppe kam es weder zum CA noch zur Reanimation. Deshalb musste bei diesen Tieren die Narkose nach der eigentlichen Präparation über weitere 45 min aufrechterhalten werden. Die Gruppe der Sham-Tiere wurde mit einer Sauerstoffkonzentration von 50 % beatmet.

### 3.1.3.3. Nachbetreuung und postexperimentelle Phase

Nach der letzten Blutentnahme wurden die Gefäßzugänge entfernt, Punktionsstellen proximal ligiert, die Wunde mit Octenisept (Schülke, Hamburg, Deutschland) antiseptisch gespült und durch schichtweise Nähte (tiefere Schichten: Einzelknopfnah; äußerer Hautschnitt: eine fortlaufende Naht; Nahtmaterial: Polypropylen 2/0 Prolene®blau, Ethicon Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Bei ausreichend stabiler alleiniger Atmung erfolgte die Extubation. Um zu vermeiden, dass es infolge der Immobilität der Versuchstiere zur Hypothermie kommt, erfolgte eine Unterbringung der Tiere für die ersten 24 h post reanimationem in einen Wärmeinkubator (MK III Octagon Brinsea, Sandford, UK) bei konstanten 34 °C und freiem Zugang zu Futter und Wasser. In einigen Fällen kam es zu einer Para-/Hemiplegie. Diesen Tieren wurde regelmäßig physiologische Kochsalzlösung und 40 % Glukose i.p. verabreicht.

## 3.2 Ausschlusskriterien

Nicht alle ursprünglich in die Experimente integrierten Tiere konnten in die Auswertung aufgenommen werden. Der Ausschluss erfolgte nach folgenden Ausschlusskriterien:

- Vitalparameter, die zum Zeitpunkt der Ersterhebung (Baseline) weit außerhalb des Referenzbereiches lagen und sich auch nach 5 min nicht normalisierten.
- Reanimationszeit > 120 sek; dieses Kriterium wählten wir, um eine zu große Heterogenität der Tiere zu vermeiden. Sie hätte zwingend die Verwendung größerer Tierzahlen erfordert, was den Auflagen des Tierschutzes entgegenstand.
- Vorzeitiger Tod eines Tieres.

Die Anwendung dieser Kriterien führt dazu, dass von den anfänglich 40 CA/R-Tieren 6 ausgeschlossen werden mussten und nicht in die histologische Aufbereitung/Auswertung einfließen konnten. Somit wurden in jeder CA/R-Gruppe ad minimum 6 Tiere ausgewertet. Insgesamt umfasste die Auswertung schlussendlich 42 Tiere (34 CA/R-Tiere, 5 Sham-Tiere, 3 unbehandelte Tiere).

### 3.3 Neurologischer Defizit-Score (NDS)

Der NDS wurde kurz bevor die Tiere entsprechend ihrer ÜZ-Gruppe getötet wurden, also nach 6, 24, 48 h und 7 und 21 Tagen, durchgeführt. Die jeweilige Beurteilung erfolgte durch eine nicht unmittelbar an den Experimenten beteiligte Person, um ein objektives Ergebnis zu erzielen. Typischerweise ist der NDS von unbehandelten und Sham-Tieren nahe oder gleich 0 Punkten/0 % und der von Ratten ohne jede Hirnfunktion 100 Punkte/100 %.

Der NDS umfasst folgende Parameter:

Kategorie	Parameter				
I. Allgemein	Atmung	Bewusstsein			
	0/10/20	0/10/20			
II. Hirnnerven	Geruch	Sehen	Cornealrefl.	Barthaar	Hören
	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
III. Bewegung	re. Vorderpf.	li. Vorderpf.	re. Hinterpf.	li. Hinterpf.	Schwanz
	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
IV. Tastsinn	re. Vorderpf.	li. Vorderpf.	re. Hinterpf.	li. Hinterpf.	Schwanz
	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
V. Koordination	Balance	Absetzen	Aufrichten	Stopp-Test	
	0/5	0/5	0/5	0/5	
<b>NDS</b>	<b>0 - 100 %</b>				

**Tab. 3.3-1 Neurologischer Defizit Score (NDS); Nach (39).**

Allgemein:

Die Bewusstseinslage wurde objektiv bestimmt; 0 Punkte: die Tiere sind bei Bewusstsein; 10 Punkte: Somnolenz; 20 Punkte: Bewusstlosigkeit.

Die Atmung wurde objektiv bestimmt; 0 Punkte: normaler Atemtätigkeit; 10 Punkte: pathologische Atemmuster (Stokes-Atmung u.ä.); 20 Punkte: Atemstillstand.

Hirnnerven:

Die Geruchsprüfung erfolgte durch Darbieten von Trockenfutter and die Analyse der Reaktion. 0 Punkte: Tier reagiert deutlich; 4 Punkte: keine Reaktion.

Zur Sehprüfung wurde ein Wattestäbchen auf das Auge des Tieres zu bewegt. 0 Punkte: Abwehrreaktion vorhanden; 4 Punkte: keine Reaktion.

#### Kornealreflex:

Für den Test des Kornealreflexes wurde die Hornhaut mit einem Wattetupfer kontaktiert; 0 Punkte: ausgelöster Lidschlag; 4 Punkte: keine Reaktion.

Motorische Bewegung der Barthaare; 0 Punkte: klar erkennbar; 4 Punkte: keine Reaktion.

Gehör-Test durch einen lauten Ton. 0 Punkte: eindeutige Reaktion; 4 Punkte: keine Reaktion.

#### Bewegung:

Die motorischen Funktionen wurden per Auslösen eines Schmerzreizes an der jeweiligen Extremität getestet. 0 Punkte: klare Bewegung der Extremität; 1 Punkt: sichtbare Muskelkontraktion, ohne offensichtliche Bewegung der Extremität; 2 Punkte: keine Reaktion. Dieser Test wurde an jeder Pfote und am Schwanz durchgeführt.

#### Sensibilität:

Auch die Sensibilität wurde per Auslösen eines Schmerzreizes überprüft. 0 Punkte: Bewegung einer Extremität oder eine andere körperliche Reaktion (Erhöhung der Atemfrequenz, Quieken); 1 Punkt: partielle Reaktion; 2 Punkte: keine Reaktion. Dieser Test wurde an jeder Pfote und am Schwanz durchgeführt.

#### Koordination:

Balance-Test: die Ratte wurde auf ein 2 m langes, 6 cm breites, freibeweglich befestigtes Brett gesetzt, dessen Ausrichtung mehrfach verändert wurde. 0 Punkte: das Tier hielt sich angemessen lange auf dem Brett; 5 Punkte: das Tier fiel herunter.

Absetz-Test: Die Ratte wurde am Schwanz in die Höhe gehoben. 0 Punkte: die Ratte hob beim Wiederabsetzen den Kopf und Streckte die Pfoten vor. 2 Punkte: nur Anheben des Kopfes; 5 Punkte. Keine Reaktion.

Placing-(Aufrichten)-Test: Die Ratte wird im Raum frei in der Luft gehalten, mit den Barthaaren wird eine Tischkante kontaktiert. 0 Punkte: die Ratte setzt die jeweilige Pfote seitengerecht auf den Tisch; 2 Punkte: die Ratte bewegt die richtige Pfote; 5 Punkte: keine Reaktion.

Stopp-Test: Das Tier wurde auf eine Tischkante zu bewegt. 0 Punkte: deutliches Abwenden; 2 Punkte: Wegbewegung nur des Kopfes; 5 Punkte: keine Reaktion.

### **3.4 Histologische Aufarbeitung**

#### **3.4.1 Transkardiale In-vivo-Perfusion**

Zur Gewebegewinnung erfolgte die Perfusion der einzelnen Versuchstiere nach Ablauf der jeweils festgelegten ÜZ. Dazu wurden die Tiere mittels Isofluran (10 %; Baxter, Unterschleissheim, Deutschland) narkotisiert und in Rückenlage fixiert. Es folgte eine Inzision im Thorax- und Abdomenbereich mit Eröffnung der Bauchhöhle. Nach Durchtrennung war das schlagende Herz erreichbar, so dass der linke Ventrikel des Herzens mit einer Knopfkanüle punktiert und der rechte Vorhof mit einem scharfen Skalpell inzidiert werden konnte. Danach erfolgte die Perfusion über eine perizyklische Pumpe (Cyclo I, Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Zuerst wurde der Körperkreislauf mit 200 ml physiologischer Kochsalzlösung (PBS) gespült. Danach erfolgte die Applikation der Fixationslösung (4 % Paraformaldehyd 0.1 M, pH 7.4 in 96 % PBS-Puffer; Millipore, Darmstadt, Germany). Nach erfolgreicher Perfusion wurde das Tier dekapitiert und das Gehirn in Gänze entnommen und bis zur weiteren Verwendung in 4 % PFA/0.4 % Succrose-Lösung im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

#### **3.4.2 Anfertigung der Kryoschnitte**

Bevor das jeweilige Gehirn weiterverarbeitet werden konnte, musste es für zirka 2 - 3 Tage im Kühlschrank durch Lagerung in einer Succrose-Lösung (30 % Saccharose in 0.4 % PFA in PBS) kryo-geschützt werden. Bevor das Gehirn mit Hilfe eines Kryomikrotoms (Cryostat CM 3050S, Leica, Bensheim, Germany) geschnitten werden konnte, wobei immer nur eine Hirnhälfte aufgearbeitet wurde, erfolgte das Schockfrieren in flüssigem Stickstoff. Die Gehirnhälften wurden mit Gewebekleber auf dem Mikrotomtisch fixiert und 20 µm dicke Sagittalschnitte angefertigt. Diese wurden alternierend in mit PBS (pH 7,4) gefüllten Wells aufgefangen und den verschiedenen immunhistochemischen Färbung unterzogen. Dabei wurde sichergestellt, dass für jede Färbung nicht-benachbarte Schnitte aus den jeweiligen Hirnabschnitten aufgefangen wurden.

#### **3.4.3 Immunhistologie**

Das immunhistochemische Prozedere umfasste folgende Schritte: (i) Spülen in PBS-Puffer; (ii) Blockierung der unspezifischen Bindungen in den Präparate mit fetalem Kälberserum (10 % FKS/0.3 % Triton X-100 (beide Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) bei Raumtemperatur für 1 h; (iii) Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern (► Tab. 3.4-1) über Nacht im Kühlschrank; (iv) dreimaliges Spülen mit PBS/0,3 %-Triton X-100 und (v)

der Inkubation mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (► Tab. 3.4-2, jeweils gelöst in 1 % FKS/0.3 % Triton-X in PBS) für 3 h bei Raumtemperatur. Es schloss sich wieder ein Spülschritt an. Danach wurden die Kerne mit 4', 6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich; 15 min, 37 °C) gegengefärbt, ein letztes Mal gespült, auf einen Objektträger aufgezogen und mit Immu-Mount (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) luftdicht eingedeckelt.

Antikörper	Spezifität	Spezies (Ursprung)	Verdünnung	Hersteller
MAP2	monoklonal	Maus	1: 1.000	Covance; Münster, Deutschland
NeuN	monoklonal	Maus	1: 100	Chemicon, Billerica, USA
GFAP	polyklonal	Kaninchen	1: 500	Progen, Heidelberg, Deutschland
IBA1	polyklonal	Kaninchen	1: 1.000	Abcam; Cambridge, UK
cfos	polyklonal	Schaf	1: 1.000	Chemicon
MnSOD	polyklonal	Kaninchen	1: 500	Sigma-Aldrich
Caspase 3	polyklonal	Kaninchen	1: 50	Chemicon
Bcl2	polyklonal	Kaninchen	1: 1.000	Millipore (upstate); Temecula, USA
Parvalbumin	polyklonal	Kaninchen	1: 1.000	Abcam
Calbindin D28	polyklonal	Kaninchen	1: 500	Millipore

**Tab. 3.4-1 Eingesetzte Primärantikörper**

Antikörper	Spezifität	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Alexa				
Fluor® 488	Anti-Maus	Ziege	1: 500	Invitrogen; Carlsbad, USA
Cy3	Anti-Rabbit	Esel	1: 5.000	Dianova; Hamburg, Deutschland

**Tab. 3.4-2 Eingesetzte Sekundärantikörper**

Die Visualisierung von cfos und MnSOD erfolgte mit Hilfe der Peroxidase-Antiperoxidase-Technik mit 3,3'-Diaminobenzidin. Dafür kam ein LSAB-Kit (DAKO; Carpinteria, CA, USA) zum Einsatz.

### 3.5 Auswertung/Statistik

Für die Licht-/Fluoreszenz-mikroskopische Auswertung wurde der Axiomager.M1 (Zeiss, Jena, Germany) mit Plan-Neofluar Fluorescein/Rhodamine/DAPI-Objektiven (x 10/0.3, x 20/0.50, x 40/0.75) eingesetzt.

Die Purkinjezellen wurden in den exterioren Abschnitten der cerebellaren Lobuli IXa und IXb (blauer Rahmen in Abb. X; 1388 x 1040 Pixel) semi-quantifiziert. Dazu analysierten wir 5 Calbindin D28k- und 5 Caspase 3-gefärbte Schnitte pro Tier. Mit Hilfe der ImageJ Software (<http://rsb.web.nih.gov/ij/>) wurde zuerst die Länge des Purkinjezell-Bandes ermittelt, indem eine Freihandlinie durch das Band gezogen wurde. Alle eindeutig immun-positive Purkinjezellen (Calbindin D28k und/oder MAP2; Caspase 3) wurden gezählt. Die Anzahl der Purkinjezellen geteilt durch die Länge des Zell-Bandes ergab die Lineare Dichte (linear density; LD; PZ/mm) (Louis et al., 2013). Der Mittelwert für die 5 Schnitte pro Tier wurde ermittelt und ging als Einzelwert in die Statistik ein. Analog wurde die Lineare Dichte für die hippocampalen CA1-Pyramidenzellen ermittelt, wobei die NeuN-Immunfärbung ausgewertet wurde.

Für alle anderen Färbungen wurde die Fluoreszenz-Intensität als CTCF (corrected total cell fluorescence) ermittelt. Wiederum kam dazu ImageJ zum Einsatz. Die jeweils ausgewerteten cerebellaren Areale sind in Tabelle 4.3-1 dargestellt. Die CTCF errechnet sich = (ID (integrated density) – (ausgewählter Ausschnitt x mittlere Fluoreszenz des Hintergrundes)) x  $10^{-5}$ . Sie wird in einer arbiträren Einheit angegeben.

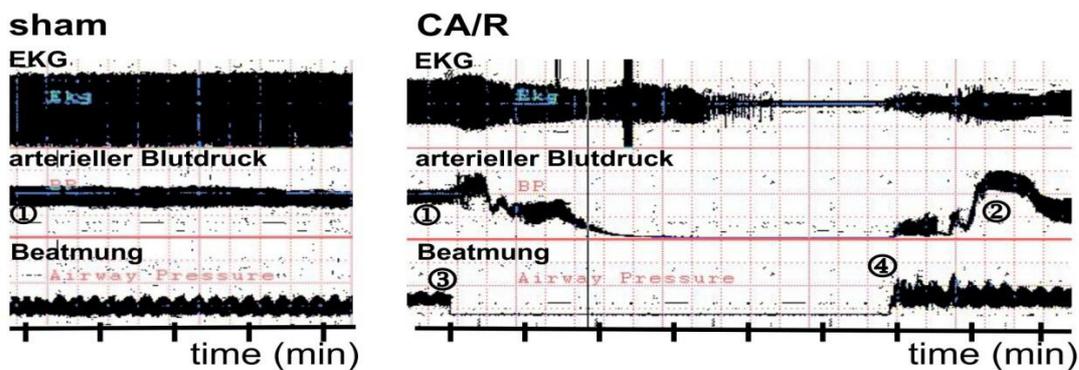
Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SD (*Standardabweichung*) pro Tier angegeben und mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test, gekoppelt mit dem Dunn's-Post-hoc-Test, ausgewertet. Dazu wurde die Software von Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) verwendet. Als Signifikanzniveau wurde  $p \leq 0.05$  festgelegt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Auswirkung des ACA/R auf die Vitalparameter

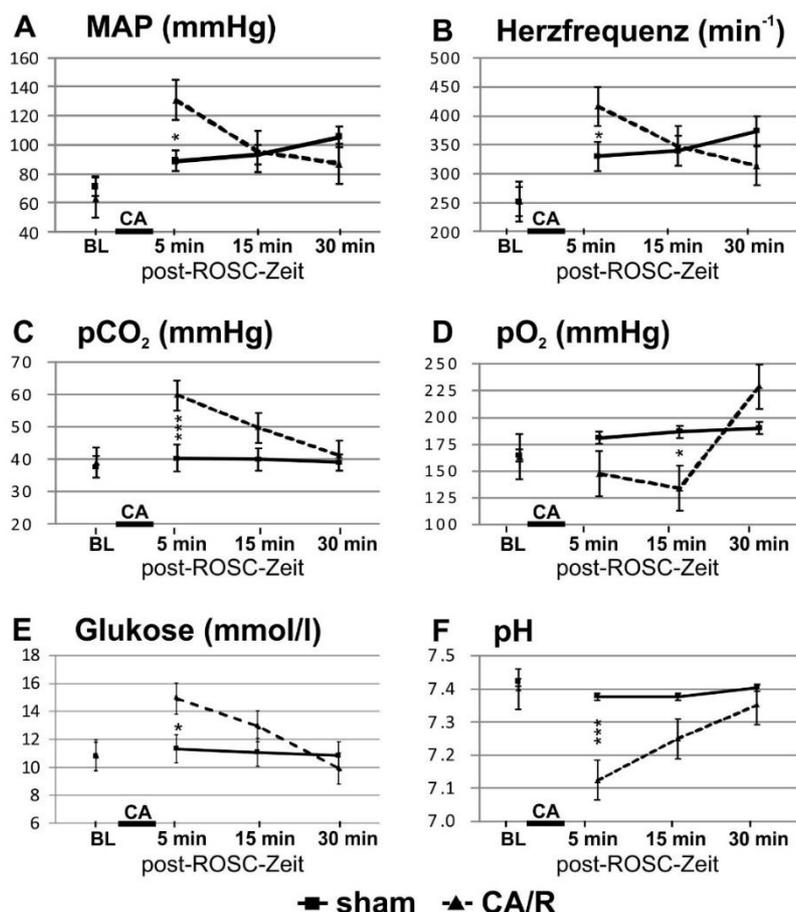
Die Vorbereitung der Tiere, welche Narkoseeinleitung über Gesichtsmaske, tracheale Intubation, Kanülierung der linken Femoralarterie und die Ermittlung der Ausgangswerte beinhaltet, dauerte  $20 \pm 5$  min. Abb. 4.1-1 zeigt exemplarische Aufnahmen von EKG, arteriellem Blutdruck und Beatmung für sham-operierte Tiere und ACA-Tiere. Nach einer Asphyxiezeit von  $170 \pm 30$  s kam es bei den CA/R Tieren zu einem Blutdruckabfall auf 0 mmHg. Anschließend wurde nach einer Asphyxiedauer von 6 min mit der Reanimation begonnen. Die Wiederherstellung spontaner Kreislaufverhältnisse (ROSC) wurde innerhalb von  $50 \pm 24$  s erreicht.

Abb. 4.1-2 zeigt die Basis-Vitalparameter in zeitlichem Verlauf: 5 Minuten nach CA zeigte sich ein vorübergehender Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) (►Abb. 4.1-2 A), der Herzfrequenz (Abb. 4.1-2 B; beide Werte zeigen eine rückläufige Tendenz nach 30 min), des arteriellen Kohlendioxidpartialdrucks ( $p\text{CO}_2$ , ►Abb. 4.1-2 C) und des Blutzuckers (►Abb. 4.1-2 E; beide Parameter befinden sich nach 30 min wieder im Normbereich). Der pH-Wert zeigte sich deutlich erniedrigt und kehrte ebenfalls innerhalb von 30 min in den Normbereich zurück (►Abb. 4.1-2 D). Während den Vorbereitungen der Tiere kam es zu keiner Beeinträchtigung der Vitalparameter; diese befanden sich innerhalb des physiologischen Bereiches (Ausgangswert, BL).



**Abb. 4.1-1 Exemplarisches Beispiel von EKG, Blutdruck und Beatmung.**

① mittlerer arterieller Druck (MAP): 120 mmHg; ② MAP: 200 mmHg; ③ Abbruch der mechanischen Ventilation und Beginn der Asphyxie; ④ Beginn der kardiopulmonalen Reanimation.



**Abb. 4.1-2 Physiologische Parameter vor und nach Reanimation.**

BL, Baseline (Ausgangswert); MAP, mittlerer arterieller Druck; pCO<sub>2</sub>, arterieller Kohlendioxidpartialdruck; pO<sub>2</sub>, arterieller Sauerstoffpartialdruck; CA, Herzstillstand; ROSC, Wiedereinsetzen des Spontankreislaufs.

Data: Mittelwert ± SD mit n ≥ 15; Kruskal-Wallis/Dunn's Post hoc Test; signifikante Unterschiede sham vs. ACA: \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001.

#### 4.2 Auswirkung des ACA/R auf den Neurologischen Defizit Score

Der Neurologische Defizit Score (NDS) weist eine kontinuierliche Erholung der neurologischen Funktionen zwischen 6 und 48 h auf sowie eine verbleibende moderate Beeinträchtigung bis zu einer ÜZ von 21 Tagen. Oft entwickelte sich eine spastische Parese des Hinterbeines kombiniert mit dem Verlust des Tastsinns. Sham-operierte Tiere, die dieselbe Narkose- und Operationsprozedur erhielten, jedoch sich keiner CA/R unterzogen, entwickelten keine dieser neurologischen Defizite. Im Durchschnitt zeigten die CA/R Ratten auch schlechtere Koordinationsfähigkeiten (z.B. Balance und Stopp-Reflexe). Die meisten der NDS-Unterschiede zeigten jedoch keine Signifikanz (Tab. ► 4.2-1).

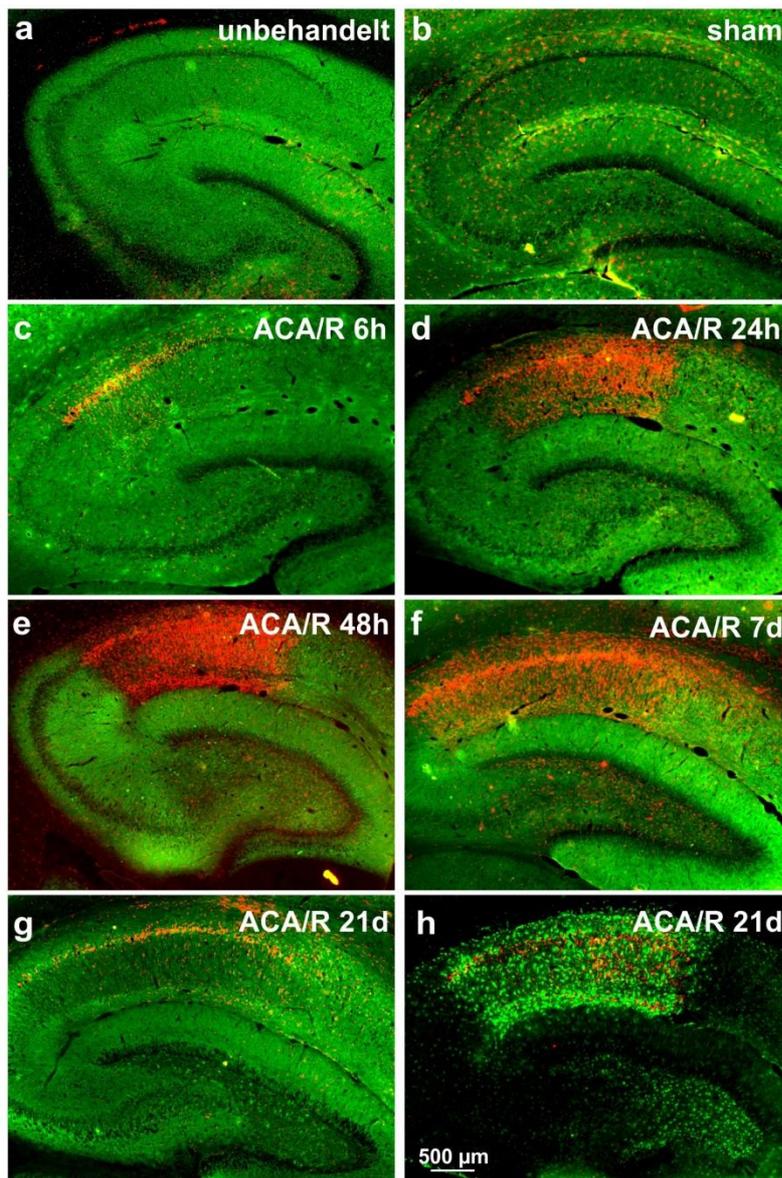
Parameter	Score	unbehandelt	sham	CA/R 6 h	CA/R 24 h	CA/R 48 h	CA/R 7 d	CA/R 21 d
<b>Bewusstsein</b>	0/10/20	0	0	8.3 ± 7.5***	0	0	0	0
<b>Atmung</b>	0/10/20	0	0	6.7 ± 5.2*	3.3 ± 5.1	0	0	0
<b>Geruch</b>	0/4	0	0	2.0 ± 2.2*	0.7 ± 1.6	0	0	0
<b>Sehen</b>	0/4	0	0	1.2 ± 2.0	1.2 ± 2.0	0.7 ± 1.6	0	0
<b>Cornealreflex</b>	0/4	0	0	0.7 ± 1.6	0.7 ± 1.6	0	0	0
<b>Barthaar</b>	0/4	0	0	0.7 ± 1.6	0	0	0	0
<b>Hören</b>	0/4	0	0	1.2 ± 2.0	0	0	0	0
<b>Bew. Schwanz</b>	0/2	0	0	0.7 ± 1.0	0	0	0	0
<b>Bew. re. Vorderpfote</b>	0/2	0	0	0.3 ± 0.8	0	0	0	0
<b>Bew. li. Vorderpfote</b>	0/2	0	0	0.3 ± 0.8	0	0	0	0
<b>Bew. re. Hinterpfote</b>	0/2	0	0	1.7 ± 0.8*	1.7 ± 0.8*	0.7 ± 1.0	0.7 ± 1.0	0.3 ± 0.8
<b>Bew. li. Hinterpfote</b>	0/2	0	0	1.3 ± 1.0	0.7 ± 1.0	0.7 ± 1.0	0.3 ± 0.8	0.3 ± 0.8
<b>Ts Schwanz</b>	0/2	0	0	0.7 ± 1.0	0.7 ± 1.0	0	0	0
<b>Ts re. Vorderpfote</b>	0/2	0	0	0.3 ± 0.8	0.3 ± 0.8	0	0	0
<b>Ts li. Vorderpfote</b>	0/2	0	0	0.7 ± 1.0	0.3 ± 0.8	0	0	0
<b>Ts re. Hinterpfote</b>	0/2	0	0	1.7 ± 0.8*	1.3 ± 1.0	0.7 ± 1.0	0.3 ± 0.8	0.3 ± 0.8
<b>Ts li. Hinterpfote</b>	0/2	0	0	1.3 ± 1.0	1.7 ± 0.8	0.7 ± 1.0	0.3 ± 0.8	0.3 ± 0.8
<b>Balance</b>	0/5	1.7 ± 2.9	1.0 ± 2.2	4.2 ± 2.0	3.3 ± 2.6	2.5 ± 2.7	1.7 ± 2.6	1.7 ± 2.6
<b>Absetzen</b>	0/5	0	0	3.3 ± 2.6	3.3 ± 2.6	1.7 ± 2.6	0.8 ± 2.0	0
<b>Aufrichten reflex</b>	0/5	0	1.0 ± 2.2	4.2 ± 2.0	2.5 ± 2.7	1.7 ± 2.6	1.7 ± 2.6	0.8 ± 2.0
<b>Stop-Reflex</b>	0/5	0	0	3.3 ± 2.6	2.5 ± 2.7	1.7 ± 2.6	0.8 ± 2.0	0
<b>Summe</b>	0 - 100	1.7 ± 2.9	2.0 ± 3.1	45.5 ± 11.4****	24.2 ± 8.29**	11.1 ± 5.95	6.6 ± 4.9	3.7 ± 3.6

**Tab. 4.2-1 Der neurologische Defizit-Score (NDS)**

Der NDS zeigt eine kontinuierliche Erholung der neurologischen Funktionen zwischen 6 und 48 h und eine moderat verbleibende Beeinträchtigung bis 21 Tage post CA/R.; 0: normal; 2, 4, 5: abwesend; 10: apathisch, hypo-/hyper-ventilierend; 20: komatös, abwesend; *Bew.*, Bewegung; *Ts*, Tastsinn; *re*, rechts; *li*, links; *d*, Tag. Die Werte sind gemittelt ± SD, analysiert mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis Test. Der Dunn's-Post-hoc-Test zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen sham und betreffenden CA/R Gruppen: \*\*\*\*p < 0.0001; \*\*\*p > 0.001; \*\*p < 0.01; p < 0.05.

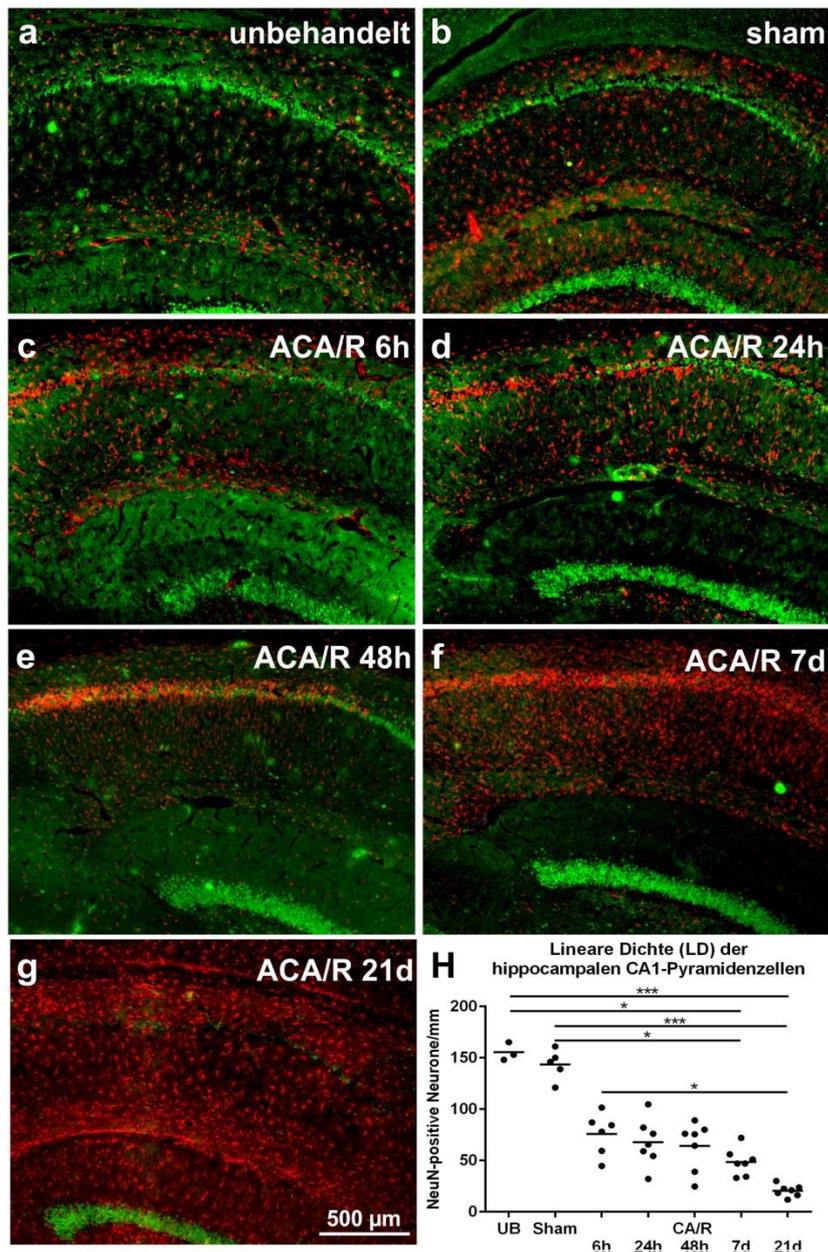
### 4.3 Auswirkung des ACA/R auf die Immunhistologie des Cerebellums

Die Abbildungen 4.3-1. und 4.3-2 geben einen Überblick über die Pyramidenzell-Degeneration in der CA1-Region des Hippocampus nach ACA/R mit Aktivierung von Mikroglia (IBA1-Immunsignal) und der Bildung einer Glianarbe (GFAP-Immunfärbung). Bereits 6 h nach ACA/R zeigen die neuronalen Marker (► Abb. 4.3-1, MAP2; Abb. 4.3-2, NeuN) einen fortgeschrittenen Verlust von Pyramidenzellen in der CA1-Region, welcher 7 Tage post-ACA/R signifikant ausfällt (► Abb. 4.3-2 f-h). Damit konnte belegt werden, dass die von uns gewählte relativ kurze CA-Zeit von 6 min ausreichend ist, um massiv neurodegenerativ zu sein.



**Abb. 4.3-1 ACA/R-induzierte hippocampale CA1-Degeneration.**

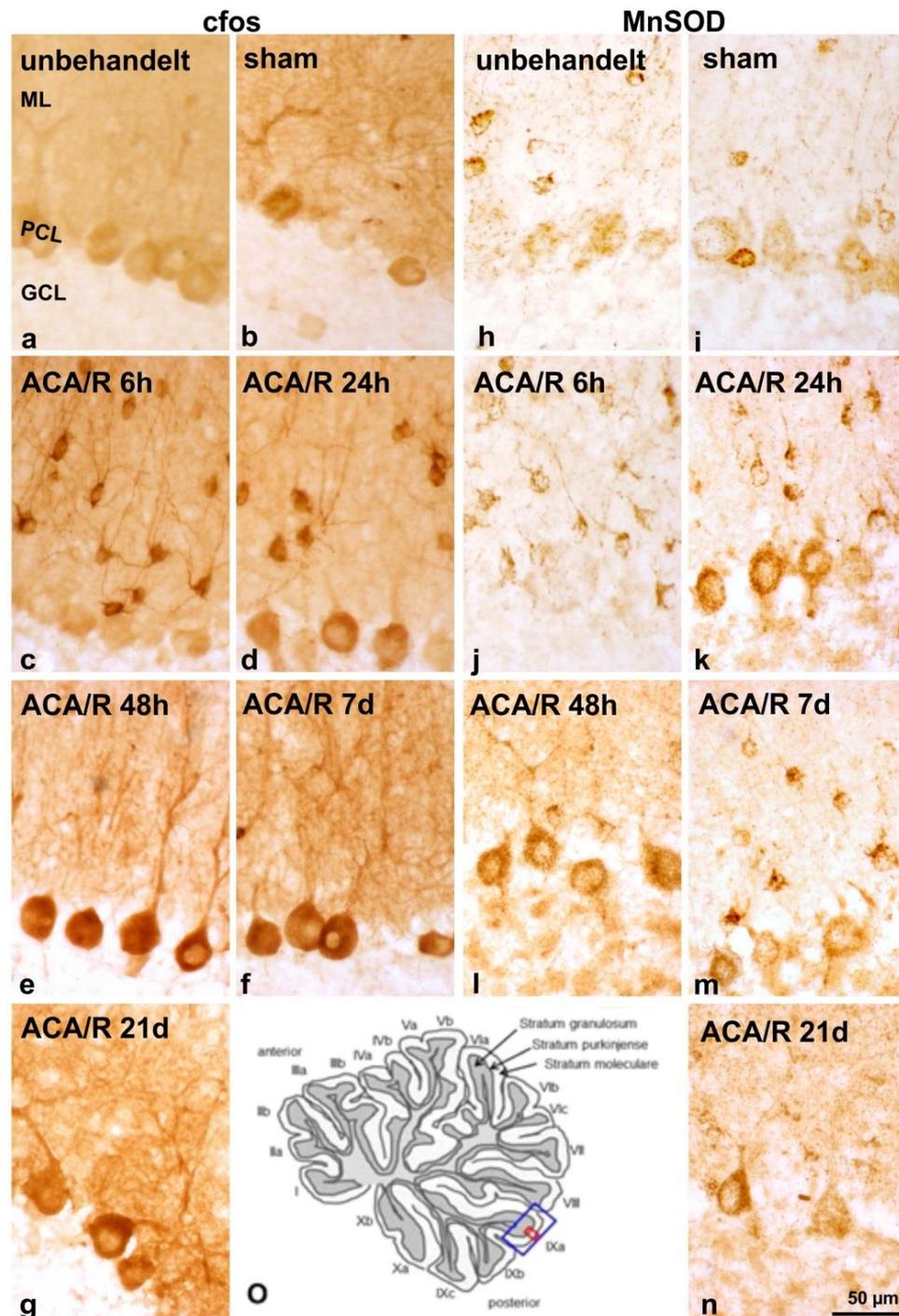
**a-g** Co-Immunfärbung mit dem neuronalen Marker MAP2 (grün) und Marker für Mikroglia IBA1 (rot); **h** Co-Immunfärbung von IBA1 (rot) und dem Astroglia-Marker GFAP (grün). *h*, Stunden; *d*, Tage. Der Maßstab ist für alle Abbildungen geltend.



**Abb. 4.3-2 ACA/R-induzierte hippocampale CA1-Degeneration**

**a–f** Co-Immunfärbung mit dem neuronalen Marker NeuN (grün) und dem Mikrogliamarker IBA1 (rot); **g** Co- Immunfärbung mit NeuN (grün) und dem Marker für Astroglialarben GFAP (rot). *h*, Stunden; *d*, Tage. Der Maßstab ist geltend für alle Abbildungen. **h** Das Streudiagramm für die lineare Dichte der CA1-Pyramidenzellen bestätigt einen signifikanten Untergang der CA1-Pyramidenzellen. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.0005$

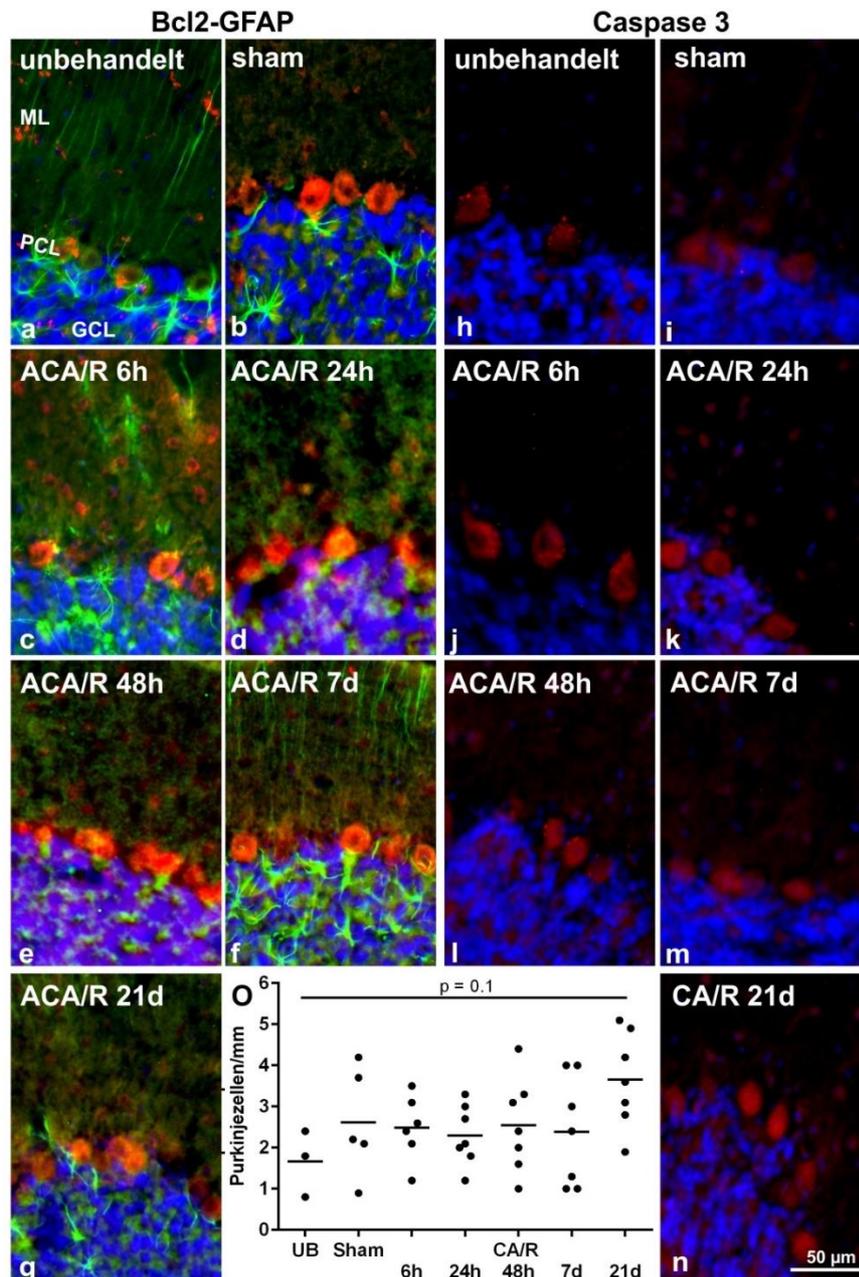
Im Cerebellum werden nach ACA/R als erstes die Sternzellen aktiviert, erkennbar an der sofortigen Aktivierung des „immediate early genes“ *cfos* (► Abb. 4.3-3 a-g). Eine verstärkte Aktivierung der Sternzellen kann bis zu 24 h beobachtet werden (► Abb. 4.3-3 d), anschließend nimmt sie mit steigender ÜZ ab (► Abb. 4.3-3 e-g). Zeitversetzt zeigt sich ebenfalls eine Induktion von *c-fos* in den PZ (► Abb. 4.3-3 d), diese bleibt bis zu einer ÜZ von 21 Tagen bestehen (► Abb. 4.3-3 e-g). Diese Aktivitätsmuster konnten durch CTCF-Analyse bestätigt werden (► Tab. 4.3.1.).



**Abb. 4.3-3 Immun-mikrographische Darstellung von cfos und MnSOD**

**a–g:** Verglichen mit unbehandelten Tieren (**a**) und sham-operierten Tieren (**b**), zeigt sich eine ACA/R-induzierte cfos-Aktivierung als erstes in den Sternzellen der Molekularschicht (**c**). Diese Aktivität hält bis zu 24 h an. Anschließend zeigt sich eine Hochregulierung auch in PZ (**d**), die bis Ende der Untersuchungen anhält (**e-g**). **h-n:** Immun-mikrographische Abbildungen des Radikalfängers MnSOD. Verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (**h**) und den sham-operierten Tieren (**i**) beginnt eine ACA/R-induzierte Hochregulierung von MnSOD ebenfalls in den Sternzellen (**j**). In PZ zeigte sich MnSOD erst nach 24 h nach ACA/R aktiv (**k**) und dann ebenfalls langanhaltend bis zu 21 Tagen (**l-n**). *ML*, Molekularschicht; *PCL*, Purkinjezellschicht; *GCL*, Körnerzellschicht; *h*, Stunden; *d*, Tage. Der Maßstab ist für alle Abbildungen geltend. (**o**) blauer Rahmen: äußere Anteile der cerebellaren Loben IXa und IXb; roter Rahmen: für die mikrographischen Aufnahmen ausgewählter Bereich.

Als Zeichen einer frühen endogenen Verteidigung zeigt sich in den Sternzellen (► Abb. 4.3-3 j) eine frühzeitige Hochregulierung des Radikalfängers MnSOD (► Abb. 4.3-3 h-n). In den PZ erfolgt die MnSOD-Aktivierung wieder zeitversetzt, erst 24 h nach ACA/R (► Abb. 4.3-3 k). Diese bleibt in einigen Zellen bis zu 21 Tage nach ACA/R bestehen (► Abb. 4.3-3 l-n). Die Analyse der CTCF bestätigt diese Aktivitätsmuster (► Tab. 4.3-1).



**Abb. 4.3-4 Immun-mikrographische Abbildungen von Bcl2 und GFAP.**

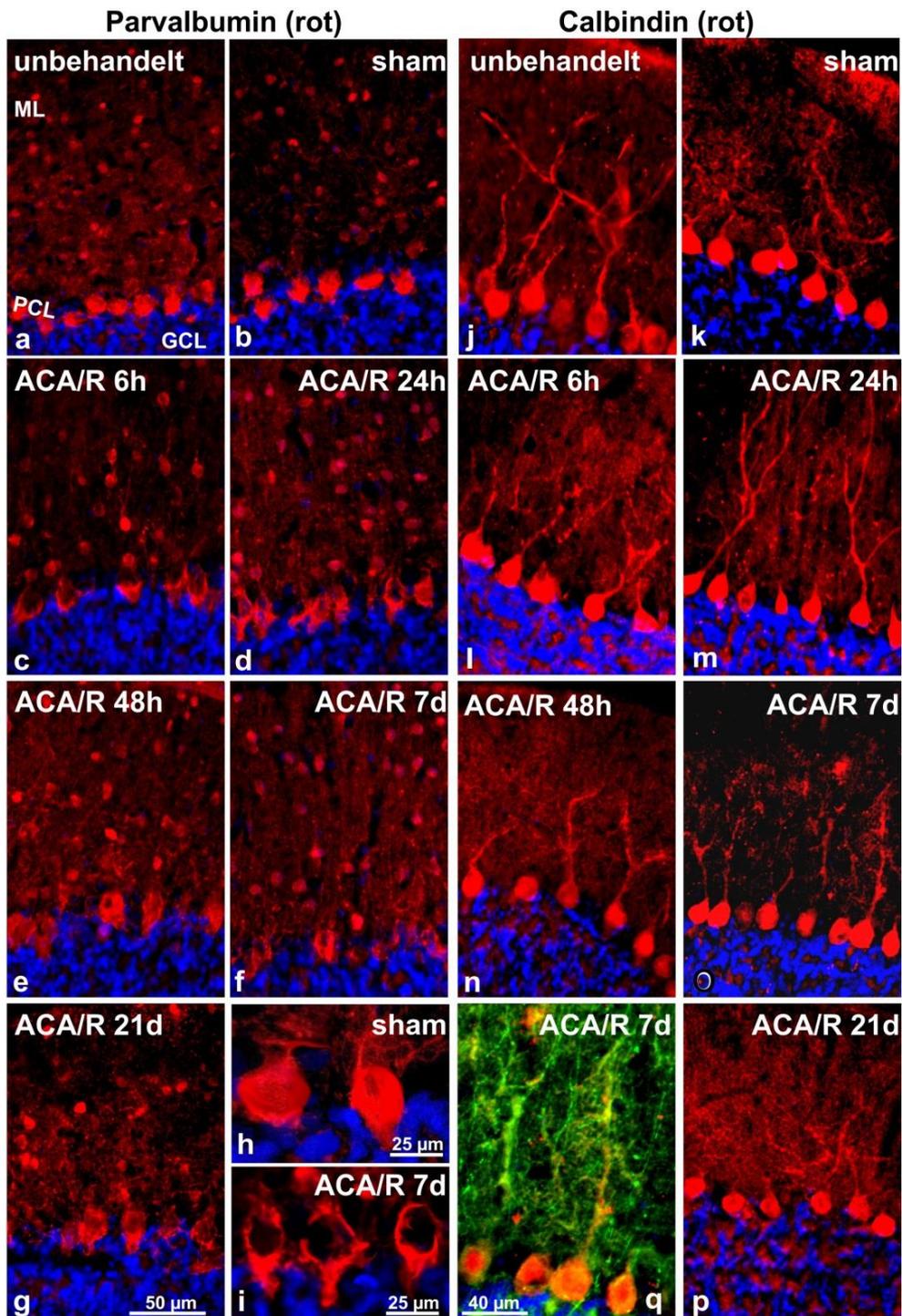
**a–g** Co-Immuno-färbung mit dem Astrogliamarker (grün) und des anti-apoptotischen Proteins Bcl (rot). Verglichen mit unbehandelten Kontrollen (**a**), zeigen Sham- Tiere eine Bcl2- Aktivierung in PZ (**b**). **c–g** ACA/R induziert eine stabile Bcl2-Expression in PZ und Sternzellen. **h–n** Immun-mikrographische Abbildung von Caspase 3 (rot), die bereits in Kontroll- und Sham-Tieren (**i**) auf niedrigem Niveau exprimiert ist und durch ACA/R aktiviert wird (**j–n**). Kernfärbung mit DAPI (blau); *ML*, Molekularschicht; *PCL*, Purkinjezellschicht; *GCL*, Körnerzellschicht; *h*, Stunden; *d*, Tage. Der Maßstab ist für alle Abbildungen geltend. **o** das Streudiagramm zeigt die lineare Dichte von Caspase 3-positiven PZ.

Das anti-apoptotische Protein Bcl2 (► Abb. 4.3-4 a-g), eine weitere Komponente der zellulären Verteidigung, zeigte sich in ACA/R-gestressten PZ früh und durchgängig stabil aktiv (► Abb. 4.3-4 c-h; Tab. 4.3-1), was für einen permanenten endogenen Kampf gegen den ACA/R-induzierten Zellstress spricht. In den Sternzellen erreichte die Bcl2-Aktivierung ihren Höhepunkt 6 h nach ACA/R (► Abb. 4.3-4 c, d; Tab. 4.3-1). Bei sham-operierten Tieren zeigte sich in den PZ ebenfalls eine Bcl2-Aktivierung (► Abb. 4.3-4 b; Tab. 4.3-1), wahrscheinlich induziert durch den Narkose-bedingten Zellstress.

Das Apoptose-Protein Caspase 3 besaß in den PZ eine erhöhte Aktivität bis zu einer Überlebenszeit von 21 Tagen (► Abb. 4.3-4 h – o). Die CTCF-Analyse (► Tab. 4.3-1) konnte eine Signifikanz der Caspase 3-Aktivität bei einer ÜZ von 21 Tagen nachweisen.

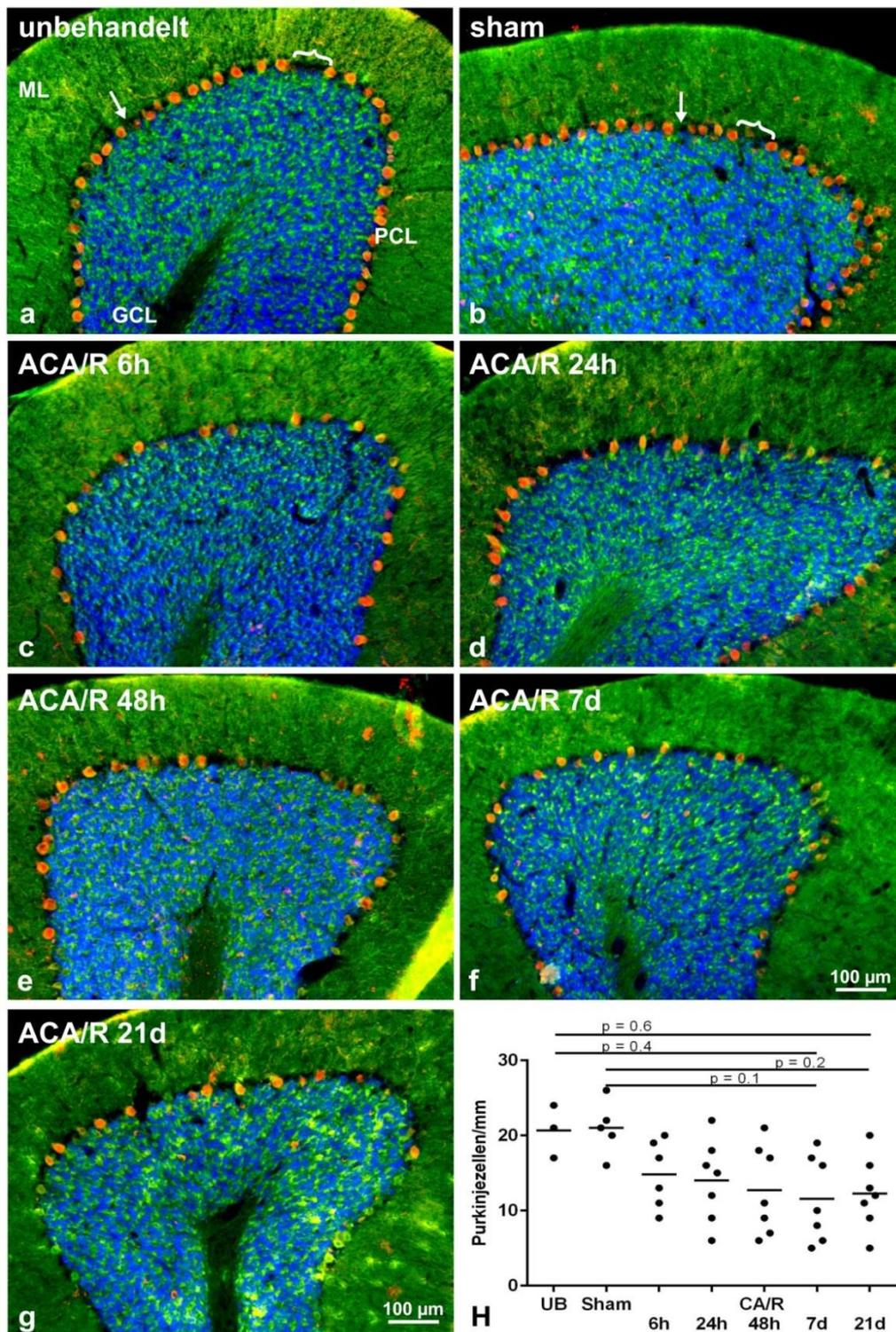
Das Calcium-bindende Protein Parvalbumin (► Abb. 4.3-5 a-i) ist regulär in PZ und Sternzellen exprimiert. Als Komponente des zellulären Calcium-Puffer-Systems ist es Teil der zellulären Abwehr. In den ACA/R-gestressten PZ kam es zur Translokation des Parvalbumins von der Zellperipherie in die subplasmamembranösen Zellkompartimente (► Abb. 4.3-5 h-i). In den Sternzellen zeigte sich nur eine temporäre Hochregulierung des Parvalbumins (► Tab. 4.3-1, Molekularschicht).

Das Calcium-bindende Protein Calbindin D28k (► Abb. 4.3-5 j-p) ist ebenfalls regulär in PZ exprimiert. In unseren Experimenten eignete es sich zudem für die Quantifizierung des ACA/R-induzierten PZ-Verlustes (33). In den Kontroll- und Sham-Tieren zeigte die immunhistochemische Färbung diesbezüglich mehrheitlich eine kompakte PZ-Schicht (► Abb. 4.3-5 j, k; 4.3-6. a, b). Nach ACA/R verlor sich dieses kompakte PZ-Band (► Abb. 4.3-5 l-q, 4.3-6 c-g). Trotzdem zeigten weder LD- (► Abb. 4.3-6 h) noch CTCF-Analysen (► Tab. 4.3-1) einen signifikanten PZ-Verlust.



**Abb. 4.3-5 Immun-mikrographische Abbildungen von Parvalbumin & Calbindin D28k**

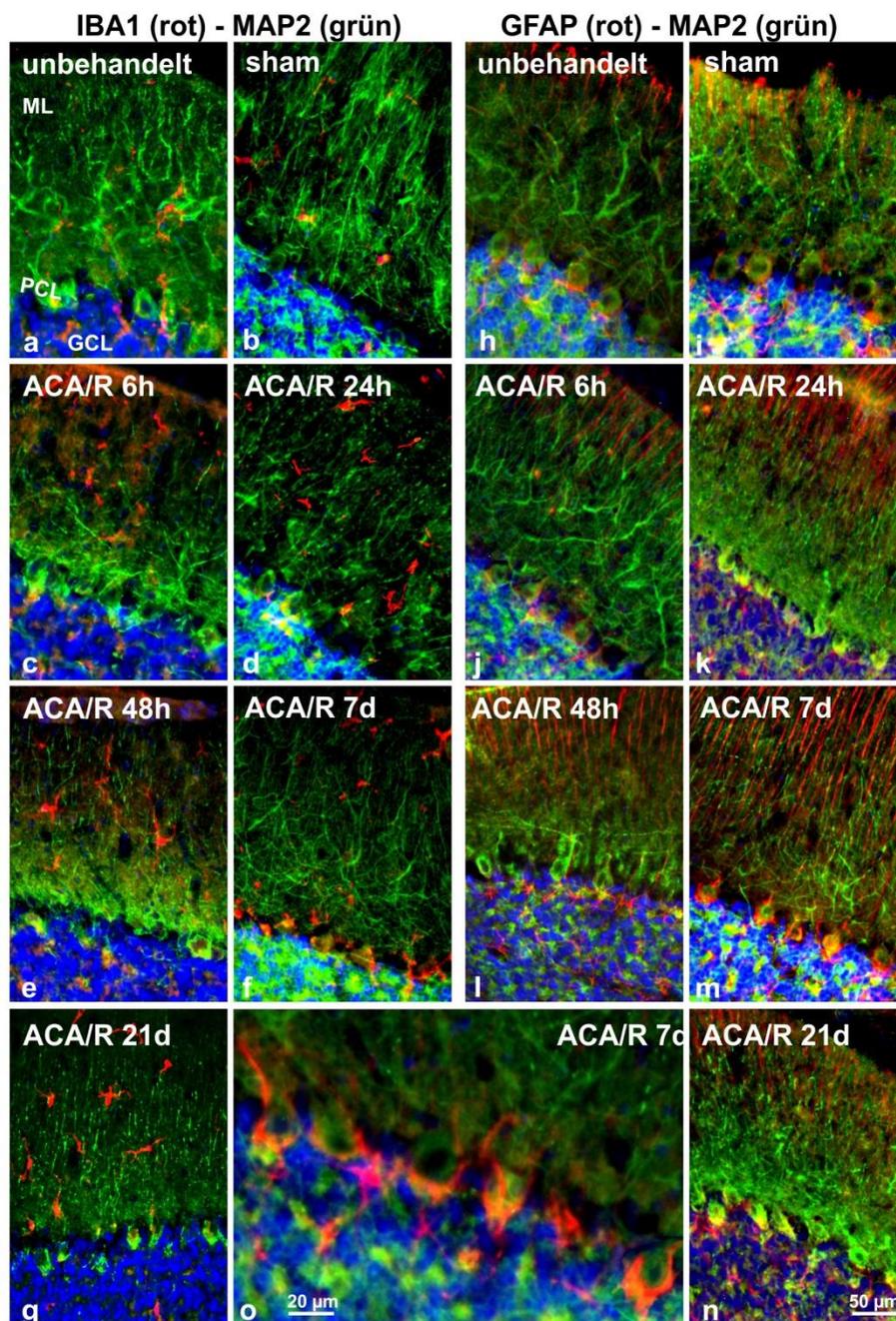
**a–i** Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (**a**), zeigt sich in sham-operierten Tieren (**b**) ein weniger kompaktes PZ-Band. Durch ACA/R kommt es zu einer deutlichen Aktivierung von Parvalbumin in den Sternzellen innerhalb der Molekularschicht (**c–g**). In den PZ kommt es neben einer Aktivierung auch noch zu einer ACA/R-induzierten Translokation der Parvalbumin-Immunfärbung in die subplasmamembranösen Kompartimente (**h** vs. **l**). **j–p** Immun-mikrographische Abbildungen von Calbindin D28k. In unbehandelten Kontrollen (**j**) und Sham-Tieren (**k**) zeigte die Immunfärbung vorwiegend kompakte PZ-Bänder, während ACA/R (**l–q**) zu einer Diskontinuität dieses PZ-Musters führt. **q** zeigt eine Co-Färbung von Calbindin D28k mit dem Nervenfasermarker MAP2 (grün). Kernfärbung mit DAPI (blau); *ML*, Molekularschicht; *PCL*, Purkinjezellschicht; *GCL*, Körnerzellschicht; *h*, Stunden; *d*, Tage. Der Maßstab ist für alle Abbildungen geltend, außer für **h**, **i**, **q**.



#### Abb. 4.3-6 Immun-mikrographische Abbildungen von Calbindin D28k und MAP2

Die Übersichtsfärbungen zeigen in unbehandelten Kontrollen (a) und Sham-Tieren deutliche Calbindin D28k-Aktivität (b) mit vereinzelt Zellausfällen im PZ-Band (Pfeile und Klammern). c-g ACA/R vergrößert diese Diskontinuität. Kernfärbung DAPI (blau); ML, Molekularschicht; PCL, Purkinjellschicht; GCL, Körnerzellschicht; h, Stunden; d, Tage. Der Maßstab ist für alle Abbildungen geltend. (H) Das Streudiagramm zeigt die lineare Dichte der Calbindin D28k- und/oder MAP2-positiven PZ.

Eine Aktivierung der Mikroglia war bei einer ÜZ von 6 h bis 48 h (► Abb. 4.3-7 c-e; Tab. 4.3-1) und auch bei einer ÜZ von 21 Tagen (► Abb. 4.3-7 g; Tab. 4.3-1) post ACA/R zu sehen, jedoch hauptsächlich in der Molekularschicht.



**Abb. 4.3-7 Immun-mikrographische Abbildung von IBA1 und MAP2.**

**a–g** Vergleiche mit unbehandelten Kontrollen (**a**) und sham-operierten Tieren (**b**) zeigen eine ACA/R-vermittelte Aktivierung von IBA1 (rot) in der ML 6 h (**c**), 24 h (**d**) und 48 h (**e**) post-CA/R. An Tag 7 (**f**) ist eine Verschiebung der IBA1-Färbung zugunsten der PCL zu erkennen. An Tag 21 (**g**) zeigt sich diese erneut in der ML. **h–o** Immun-mikrographische Abbildungen von GFAP (rot). Verglichen mit unbehandelten Kontrollen (**h**) und sham-operierten Tieren (**i**) zeigt die GFAP-Färbung (grün) eine sofortige ACA/R-vermittelte temporäre (21 h–7 Tage) Aktivierung der Bergmann-Glia (**k–m**). Man beachte das GFAP-positive perineuronale Netz um die PZ an Tag 7. Kernfärbung DAPI (blau); *ML*, Molekularschicht; *PCL*, Purkinjellschicht; *GCL*, Körnerzellschicht; *h*, Stunden; *d*, Tage. Der Maßstab ist für alle Abbildungen geltend, mit Ausnahme von (o).

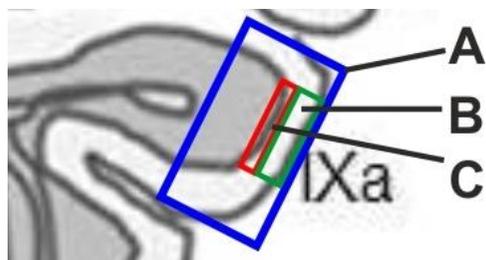
Diese Ergebnisse deuten auf eine Degeneration neuronaler Faser hin, was durch eine CTCF-Analyse von MAP2 in entsprechenden Regionen (► Tab. 4.3-1) auch bestätigt werden konnte. Zudem konnte anhand der CTCF-Analyse bei einer ÜZ von 21 Tagen eine zweite Phase des neuronalen Faseruntergangs mit begleitender, konsequenter IBA1-Aktivierung dargestellt werden (► Tab. 4.3-1).

Die GFAP-Färbung zeigte eine temporäre (24 h – 7 Tage nach ACA/R) Aktivierung der Bergman-Glia (► Abb. 4.3-7 k-m), welche jedoch keine Signifikanz aufweist (CTCF-Analyse; ► Tab. 4.3-1). Auffallend war zudem eine Umhüllung fast aller PZ mit einer Schicht aus GFAP-Fasern nach einer ÜZ von 7 Tagen (► Abb. 3.7. m, o).

Auch die immunhistochemische Färbung mit MAP2, einem klassischen Marker neuronaler Perikarya und Dendriten, in Kombination mit IBA1 (Mikroglia Marker; ► Abb. 4.3-7 a –g) oder GFAP (Astrozytenmarker; ► Abb. 4.3-7 h-o) war nicht in der Lage, einen eindeutigen Verlust von PZ-Perikarya darzustellen.

Färbung	Schicht	unbehandelt	sham	CA/R 6 h	CA/R 24 h	CA/R 48 h	CA/R 7 d	CA/R 21 d
cfos	PZ-Schicht	24.7 ± 4.1	28.2 ± 4.8	26.1 ± 3.7	40.1 ± 4.2*	51.7 ± 3.9**/#	49.0 ± 4.5***/##	38.8 ± 4.2*
	Molekularschicht	16.4 ± 4.1	23.1 ± 2.2	39.6 ± 3.6**/#	38.4 ± 4.1**/#	32.6 ± 5.0*	32.0 ± 4.7*	30.1 ± 5.3
MnSOD	PZ-Schicht	19.3 ± 2.8	21.4 ± 2.8	17.4 ± 2.9	36.8 ± 3.3**/#/+++	39.2 ± 4.0***/#/+++	30.5 ± 3.1 <sup>+</sup>	28.7 ± 3.6 <sup>+</sup>
	Molekularschicht	21.2 ± 3.4	20.1 ± 3.8	27.9 ± 2.8*/#	29.4 ± 3.4*/#	28.7 ± 3.0*/#	26.9 ± 3.3	28.1 ± 3.6*/#
Bcl2	PZ-Schicht	4.1 ± 0.9	7.0 ± 1.8**	8.7 ± 1.9**	9.1 ± 2.3***	8.9 ± 2.7**	7.5 ± 1.1**	6.8 ± 2.0*
	Molekularschicht	3.4 ± 0.7	4.9 ± 1.1	6.2 ± 1.7*	4.9 ± 1.0	4.4 ± 1.6	5.0 ± 1.3	5.1 ± 1.5
Caspase 3	PZ-Schicht	2.9 ± 1.6	2.6 ± 1.8	5.1 ± 2.1	5.9 ± 2.0	6.7 ± 1.7	6.0 ± 1.9	11.0 ± 2.4***/###
Parvalbumin	PZ-Schicht	34.4 ± 3.3	32.0 ± 3.9	25.0 ± 3.8	29.2 ± 3.7	31.4 ± 4.2	27.1 ± 2.9	28.1 ± 3.7
	Molekularschicht	21.1 ± 2.4	20.1 ± 3.6	27.0 ± 3.9	27.8 ± 4.6	23.9 ± 4.1	24.6 ± 3.2	23.2 ± 4.0
Calbindin D28k	PZ-Schicht	40.3 ± 5.2	37.4 ± 4.7	31.0 ± 7.0	31.1 ± 5.1	34.0 ± 3.6	33.9 ± 4.7	32.6 ± 5.9
	Molekularschicht	29.9 ± 8.1	25.4 ± 7.2	25.6 ± 5.3	20.6 ± 6.0	27.5 ± 4.7	22.9 ± 7.4	27.3 ± 6.6
MAP2	Molekularschicht	84.5 ± 9.8	86.9 ± 7.9	58.3 ± 7.3*/#	57.9 ± 8.3*/##	59.1 ± 6.9*/#	62.1 ± 9.4	47.8 ± 8.3***/###
IBA1	Molekularschicht	1.9 ± 0.7	2.1 ± 1.0	8.1 ± 2.8**/#	6.3 ± 1.5*/#	7.0 ± 2.0**/#	3.6 ± 1.1	5.2 ± 1.4*
GFAP	komplett	27.9 ± 7.2	29.5 ± 6.4	28.3 ± 7.3	40.1 ± 8.3	34.3 ± 7.0	44.3 ± 8.1	31.4 ± 5.9

**Tab. 4.3-1 Angaben der CTCF**



**CTCF** (korrigierte Zell-Gesamtfluoreszenz = (Integrierte Dichte (ID) – (ausgewählter Bereich x durchschnittliche Hintergrundfluoreszenz)) x 10<sup>-5</sup>) in willkürlichen Einheiten.

Daten: Mittelwert ± SD, analysiert mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis Test.

Der Dunn's-Post-hoc-Test zeigt einen signifikanten Unterschied von CA/R Gruppen bezogen auf unbehandelten Ratten: \*\*\*p > 0.001; \*\*p < 0.01; \*p < 0.05; bezogen auf Sham-Ratten: ###p > 0.001; ##p < 0.01; #p < 0.05; bezogen auf CA/R 6 h Ratten: +++p > 0.001; ++p < 0.05; A: komplett; B: Molekularschicht; C: PZ-Schicht.

## 5. Diskussion

### 5.1 Diskussion des Tiermodells

Im auch von uns genutzten ACA-Modell wird diese unkalkulierbare Mikrozirkulation durch die kleinen Kollateralkreisläufe ausgeschlossen, weil der gesamte Kreislauf komplett zum Erliegen kommt. Das so erreichte Post-Cardiac-Arrest-Syndrom (63) spiegelt die klinische Realität somit deutlich besser wieder. Allerdings, das beweisen unsere Regressionsanalysen (61), streuen auch diese Ergebnisse in starkem Maße.

Die Degeneration der CA1-Region des Hippocampus, dem Goldstandard für solche Studien, da extrem sensitiv gegenüber Ischämie, belegt, dass die von uns eingesetzte relativ kurze Asphyxiezeit von 6 min ausreicht, um einen starken Ischämie-Insult zu generieren. Selbst eine 5-minütige Asphyxie degeneriert die CA1-Region des Hippocampus signifikant (64). Als Beginn des CA galt einen MAP  $\leq 10$  mmHg. Dieser trat durchschnittlich nach 170 +/- 30 s ein. Somit betrug die CA-Dauer ca. 3 min. Aber auch nach dieser kurzen Zeit trat bei allen Tieren, deren Cerebellum für diese Dissertation ausgewertet wurde, eine deutliche Schädigung der CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus auf.

### 5.2 Diskussion der analysierten Vitalparameter

Der MAP

Durch ACA/R kommt es zum Anstieg des MAPs. Dieser ist bedingt durch die exogene Zufuhr von Noradrenalin, die standardmäßig vor der Reanimation erfolgt. Weiterhin führt eine Ischämie zur Aktivierung des Sympathikus im Bereich der Medulla oblongata, wodurch Blutdruck und Herzfrequenz steigen. Die Normalisierung erfolgte zügig und ist auf das Versiegen der Neurotransmitterreserven zurückzuführen. Die Kurve des MAP über die Versuchszeit hinweg spiegelt den ACA/R-induzierten körperlichen Stress wieder. Sie wird darüber hinaus durch die Adrenalin-Gabe beeinflusst.

Die Herzfrequenz

Der Kurvenverlauf der Herzfrequenz ist dem des MAP adäquat und lässt sich mit den selben pathophysiologischen Mechanismen wie beim MAP erklären. Wieder entfaltet das verabreichte Adrenalin eine steigende Potenz.

Der pO<sub>2</sub>

Der pO<sub>2</sub> nimmt in einem ACA-Modell eine herausragende Stellung ein. Daran ändert auch die Tatsache nichts, dass ein Organismus, eingeschlossen uns Menschen, seinen O<sub>2</sub>-Bedarf

auch unter Herzstillstand noch eine ganze Weile aus seinen endogenen O<sub>2</sub>-Speichern decken kann. Es handelt sich hierbei um das Phänomen der „Funktionellen Residualkapazität“ oder „Apnoischen Oxygenierung“. Grundlage dafür ist die auch während eines Herzstillstandes persistierende Diffusion des O<sub>2</sub> aus den Alveolen. Die diesbezügliche Kapazität des Gehirns ist fatalerweise aber sehr begrenzt. Das Gehirn besitzt so gut wie keine O<sub>2</sub>-Speicher, hat aber einen immens hohen O<sub>2</sub>-Verbrauch. Das Phänomen erklärt die relative Konstanz der pO<sub>2</sub>-Werte während des ACA. Dass es nach der Reanimation zu einem Anstieg des pO<sub>2</sub> kommt, ist ein Resultat der hyperoxische Post-ROSC-Ventilation.

#### Der pCO<sub>2</sub>

Fünf Minuten nach ACA/R kam es zu einer deutlichen Hyperkapnie, die sich unter der adaptierten Beatmung wieder normalisiert. Diese Hyperkapnie ist ein Ergebnis der dauerhaften CO<sub>2</sub>-Produktion bei fehlender CO<sub>2</sub>-Abatmung. Allerdings fällt sie aufgrund der 100 % O<sub>2</sub>-post ROSC-Ventilation geringer aus als z.B. bei normoxischer Ventilation. Das Gesetz des O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Gasaustauschs erklärt den Zusammenhang. Der Gasaustausch geschieht durch gegenläufige Diffusion; die Austausch-Diffusionsrate erhöht sich mit steigendem alveolarem O<sub>2</sub>-Druck.

#### Der pH-Wert

Der pH-Wert gehört zu den ACA/R-sensiblen Vitalparametern. Er fällt deutlich ab, es kommt zur Azidose. Diese ist wiederum unmittelbares Ergebnis der Hyperkapnie. CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O reagiert zu H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und das dissoziiert zu H<sup>+</sup> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Die steigende H<sup>+</sup>-Konzentration bedingt die respiratorische Azidose. Aber auch die anaerobe Glykolyse kann eine Azidose herbeiführen. Der ACA-bedingte O<sub>2</sub>-Mangel zwingt Zellen zur anaeroben Energiegewinnung. Also generieren die Zellen die Energie aus dem Abbau von Glukose. Zuerst wird Laktat dann Milchsäure gebildet. Das führt zur metabolischen Azidose mit pH-Wert-Abfall.

#### Der Blutzucker

Der Blutzucker geht ACA/R-bedingt in die Höhe. Es kommt zur Hyperglykämie. Es ist bekannt, dass eine nicht therapierte Hyperglykämie den neurologischen Outcome nach Reanimation deutlich verschlechtert. Wie genau es zur Hyperglykämie durch ACA/R kommt, ist aber noch kaum geklärt. Bekannt ist, dass der ACA die Insulin-Sekretion reduziert und so zur Hyperglykämie führt (65). Wahrscheinlich sind dafür die durch ACA bedingten Funktionseinschränkungen der endokrinen Organe verantwortlich. Und auch die ACA-bedingte Reduktion der mitochondrialen ATP-Produktion beeinflusst diese Stoffwechsel-Prozesse. Ohne ATP ist die Insulin-Freisetzung aus den Beta-Zellen der Langerhans'schen

Inseln massiv gestört. Und auch das verabreichte Adrenalin sollte die Glukose-Homöostase stören.

### 5.3 Diskussion der immunhistologischen Ergebnisse

Arbeiten bezüglich ACA/R-induziertem PZ-Untergang im Cerebellum weisen uneinheitliche Ergebnisse auf, die von massiv (37, 46, 47) bis moderat/gering (48–50) reichen. Unsere Ergebnisse bekräftigen die These einer moderaten Sensitivität der PZ gegenüber ACA/R. Eine Ischämiezeit von 6 Minuten, die ausreichte um die hippocampale CA1-Region massiv zu zerstören, erzielte keinen signifikanten PZ-Untergang im Cerebellum. Eine reduzierte MAP2-Immunfärbung und eine korrespondierende Mikroglia-Aktivierung in der cerebellaren Molekularschicht weisen lediglich auf eine Degeneration des neuronalen Fasernetzwerkes hin. Die Degeneration von Nervenfasern ist ein frühes Ereignis im Rahmen der Zellstressantwort, führt jedoch nicht zwangsläufig zum neuronalen Zelltod (66). Der Großteil der cerebellaren Nervenfasern ist in der Lage, sich zu regenerieren, was Grundlage einer neurologischen Funktions-Recovery ist (67).

Sowohl der stete exzitatorische Input von Kletter- und Moosfasern als auch die hohe Dichte an Calcium-Kanälen machen die PZ vulnerabel für Exzitotoxizität, ein früh auftretendes Ereignis, das maßgeblich zum Ischämie-induzierten neuronalen Zelltod beiträgt (33). Neben des exzitatorischen Inputs besitzen die PZ jedoch auch stabile inhibitorische Inputs von Interneuronen, insbesondere der Korb- und Sternzellen (37, 68). In unseren Experimenten zeigte sich zunächst eine Aktivierung von Sternzellen durch ACA/R, zu erkennen durch die Aktivierung von *cfos* und *MnSOD*. Wir vermuten, dass diese frühe Aktivierung der Sternzellen die durch Ischämie induzierte Exzitation ausgleichen kann und damit eine temporäre neuroprotektive Wirkung auf die PZ ausübt. In 4-Gefäß-Okklusionsmodell-Experimenten konnte durch die Aktivierung von GABA-Rezeptoren eine Reduktion der Ischämie-induzierten neuronalen Schäden erzielt werden (69). Darüber hinaus fanden wir eine ACA/R-vermittelte Aktivierung des anti-apoptotischen Proteins *Bcl2* in PZ und Sternzellen, was eine Gegenwehr der beiden Zellkohorten gegen den ACA/R-induzierten Zellstress darstellt. Mit abnehmender *Bcl2*-Aktivierung zeigte sich eine Hochregulierung von *Caspase 3*. Diese Beobachtung könnte auf eine abnehmende Leistung der endogenen Abwehr in den PZ hinweisen, was möglicherweise ihren verzögerten, sekundären Zelltod ermöglicht. Allerdings kann eine Kreuzreaktivität des benutzten *Caspase 3*-Antikörpers mit der inaktiven Form der *Caspase 3* nicht ausgeschlossen werden, obwohl dieser als spezifisch gegen die aktive Form der *Caspase 3* beschrieben wurde. Eine Nutzung dieser Färbung zur Quantifizierung der PZ-Degeneration wäre somit in Frage zu stellen.

Ein weiterer anti-ischämischer Abwehrmechanismus stellt die ausgeprägte Calcium-bindende Kapazität von PZ und Sternzellen dar. Im Gegensatz zu anderen Gehirnregionen, wo die verschiedenen Calcium-bindenden Proteine hauptsächlich in separaten Neuronenpopulationen exprimiert werden, exprimieren PZ Parvalbumin, Calbindin D28k, Calcineurin, Calmodulin und Hippocalcin (70). Es konnte gezeigt werden, dass die Calcium-bindenden Proteine eine protektive, anti-exzitotoxische Rolle einnehmen und damit einer Calcium-Überladung der Neuronen entgegenwirken. Calbindin ist hierbei in der Lage, eindringendes Calcium schneller abzapfen als Parvalbumin (71). Die vielfältigen Calcium-Puffersysteme der PZ (einen Überblick zeigt (71)) sollten in der Lage sein, diese Zellen gegen den Calcium-vermittelten Zellstress zu schützen, so wie es bereits für die Parvalbumin-exprimierenden hippocampalen CA1-Neuronen (72) und die Calbindin D28k-exprimierenden Zellen im Striatum (73) bekannt ist. Dabei kommt es zu einer Verschiebung des Parvalbumins vom Zytosol zur Subplasmamembran. Damit konzentriert sich die Calcium-bindende Kapazität des Parvalbumins an der Stelle, wo das Calcium in die Zelle eintritt. In Parvalbumin-knock-out-Mäusen wurde das Fehlen von Parvalbumin durch eine Hochregulierung der mitochondrialen Volumendichte kompensiert, die sich genau an der Stelle des Calcium-Eintritts präsentierte (74). Des Weiteren ist die Verdrängung von Calcium in den Extrazellularraum eine effektive Maßnahme zur schnellen Reduktion der intrazellulären Calcium-Konzentration. Hierfür werden die dafür verantwortlichen Calcium-Membranpumpen durch Parvalbumin und Calbindin D28k stimuliert (75). Sternzellen exprimieren nur Parvalbumin (71, 76). Die Anti-Exzitationskapazität ihres endogenen Calcium-Puffersystems setzt im Vergleich zu der der PZ verspätet ein. Dieser Umstand ermöglicht es den Sternzellen, die PZ durch inhibitorische Inputs für eine gewisse Zeit effektiv zu schützen, möglicherweise eine weitere Erklärung für den von Acosta und Kollegen erwähnten verzögerten PZ-Zelltod sein (38).

Aber wieso konnten andere Studien einen massiven Untergang von PZ nach ACA/R nachweisen (37, 46, 47)? Wir vermuten, dass die Ursache in der moderat angewandten Asphyxie unseres Tiermodells liegt. Bei einem moderaten ischämischen Insult sind die Zellen eher in der Lage, ihre Calcium-Homöostase aufrechtzuerhalten bzw. wiederherzustellen und damit einem neuronalen Zelltod vorzubeugen (77).

Die nachgewiesene Schicht aus sogenannten „velaten“ Astrozyten (21), die die PZ umhüllen, sowie die temporäre Aktivierung von Bergmann-Glia repräsentieren den neuronalen Cross-Talk, ein weiteres essentielles Element der neuroprotektiven Kaskade (78). Astrozyten/Bergmann-Glia schützen die Neuronen vor einer Überexzitation durch aktives Entfernen von Kalium und Neutransmittern aus dem Extrazellularraum (79). Darüber hinaus bilden Astrozyten eine Hülle um Parvalbumin-exprimierende Zellen und gewährleisten

so deren Schutz vor Redoxdysregulationen und oxidativem Stress (80), beides trägt wesentlich zu einer Neurodegeneration nach ACA/R bei (81).

Der NDS zeigt neurologische Defizite nur im moderaten Bereich. Diesbezüglich beschrieb bereits die Safar-Arbeitsgruppe das Phänomen eines nur mäßigem NDS trotz ausgeprägter Hirndefekte (82). Die Zuordnung der motorischen Defekte zu einer Hirnregion, beispielsweise dem Cerebellum, ist kaum möglich. Einerseits ist die aufgetretene spastische Paralyse der Hinterläufe in Kombination mit der Beeinträchtigung des Tastsinns ganz sicherlich das Resultat einer ACA/R-induzierten Schädigung der Medulla oblongata und des Rückenmarks. Es gibt jedoch auch Evidenzen für eine Paralyse der Hinterläufe, die durch Defekte im Kleinhirnwurm verursacht wird (83). Andererseits können die aufgetretenen Koordinierungsprobleme dem Cerebellum zugeordnet werden, jedoch sind auch motorischer Kortex, Basalganglien und Rückenmark an der motorische Koordination beteiligt (84) und reagieren ebenfalls sensibel auf ACA/R (85).

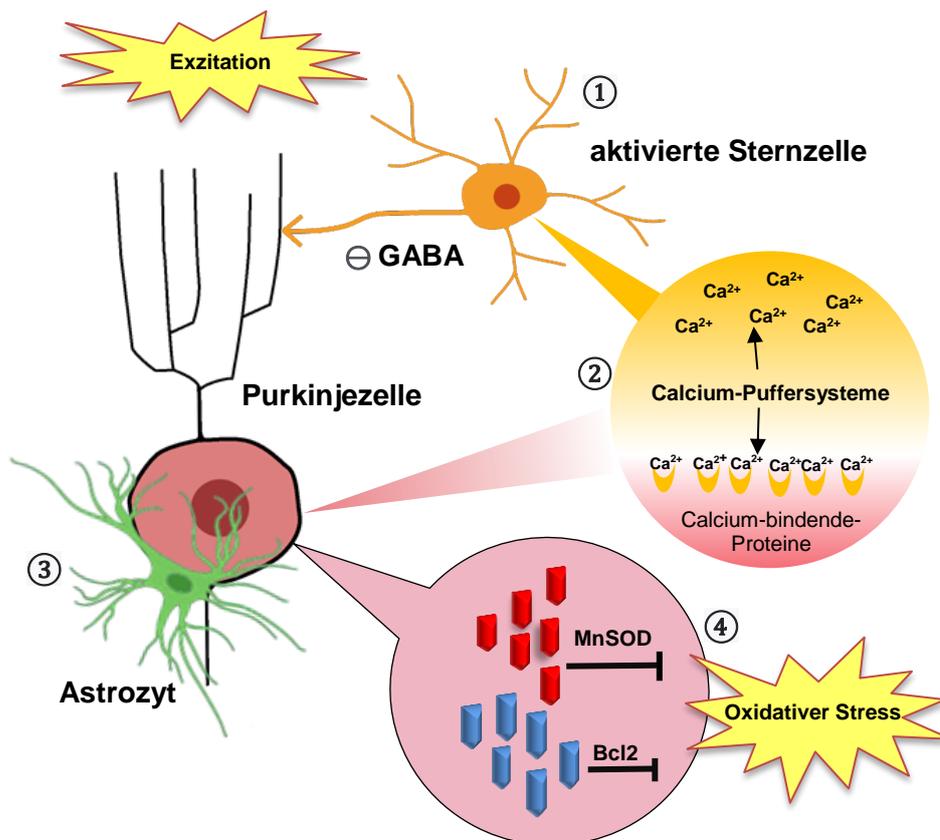
Zunächst war es unerwartet, dass wir bereits bei Sham-Tieren Anzeichen von neuronalem Stress fanden. Unterschiede zwischen sham- und komplett unbehandelten Tieren wurden jedoch schon in der Literatur beschrieben. So zeigen autoradiographische Untersuchungen, dass eine Vollnarkose per se global-zerebral zu einem reduzierten Blutglukosemetabolismus führt, annähernd im gleichen Ausmaß wie durch ACA/R (86). Darüber hinaus fanden die Autoren eine ACA/R-vermittelte Umverteilung des Glukosemetabolismus vom ACA/R-sensiblen Prosencephalon (Vorderhirn) zu dem phylogenetisch älteren und weniger ACA/R-vulnerablen Rhombencephalon (Hinterhirn), was u.a. Medulla oblongata und Cerebellum beinhaltet. Möglicherweise besitzen Cerebellum und Hippocampus eine unterschiedliche Transkriptionsantwort auf Hypoxie (87). Diesbezüglich scheint der Transkriptionsfaktor HNF4A, welcher für die Insulinausschüttung relevant ist, vor allem im Cerebellum auf Hypoxie zu reagieren. Die Autoren vermuten, dass es während einer hypoxischen Periode im Cerebellum und anderen Strukturen des Rhombencephalons mehrheitlich zur Hochregulation von Genen kommt, die relevant für das Zellüberleben sind im. Im Prosencephalon (Hippocampus) werden diese Gene dagegen mehrheitlich runterreguliert. Es scheint so, dass das Prosencephalon kognitive Funktionen zugunsten von lebenserhaltenden Funktionen des Rhombencephalons „opfert“. Diese Ansichten stimmen gut mit unseren NDS-Ergebnissen überein. Darüber hinaus besitzen Hippocampus und Cerebellum unterschiedliche Hypoxie-relevante Mechanismen des Zelltods, die Teil von NDMA-Rezeptor-Subeinheiten sind (33).

## 5.4 Fazit

Unsere Ergebnisse belegen eine relative Resilienz der PZ gegenüber ACA/R. Um einen signifikanten PZ-Untergang zu induzieren, scheint es einen stärkeren ischämischen Reiz zu benötigen. Das lässt folgende protektive Systeme vermuten (► Abb. 5.4-1):

1. Aktivierung von inhibitorischen Sternzellen, die die Ischämie-induzierte Exzitation ausgleichen und PZ inhibieren.
2. Aktivierung von Calcium-Puffersystemen, die PZ vor einer Calcium-Überladung schützen.
3. Aktivierung des Neuronen-Astrozyten-Cross-Talks.
4. Aktivierung der endogenen MnSOD- und Bcl2-Verteidigungssysteme in den PZ.

Die diskutierten Ergebnisse geben möglicherweise eine Antwort auf die Frage „Warum entwickeln Patienten mit ähnlichen klinischen hypoxischen Insulten unterschiedliche Bewegungsstörungen“ (5). Darüber hinaus bestätigt die Arbeit die limitierte Vergleichbarkeit von Tierstudien aufgrund der heterogenen Methoden.



**Abbildung 5.4-1** Protektive Systeme der Purkinjezellen.

- ① Aktivierung von Sternzellen zur Inhibition der PZ und Ausgleich der Ischämie-induzierten Exzitation
- ② Schutz vor Calcium-Überladung durch Calcium-Puffersysteme
- ③ Astrozyten-Neuronen-Cross-Talk
- ④ Aktivierung der endogenen MnSOD- und Bcl2-Verteidigungssysteme.

## 6. Zusammenfassung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind in Deutschland nach wie vor Todesursache Nr. 1. Und auch, wenn die Wiederherstellung des Kreislaufes (ROSC) gelingt, haben etwa die Hälfte der Patienten dauerhafte funktionelle Beeinträchtigungen. Eine Verbesserung dieser Situation erfordert die Erweiterung der Kenntnisse zur Pathophysiologie des Herzstillstandes und der daraus resultierenden neuropathologischen Muster.

In unserer interdisziplinären Arbeitsgruppe (Medizinische Neurobiologie/Intensivmedizin) kommt dafür ein ACA/R-(Asphyxia cardiac arrest/Resuscitation)-Modell der Ratte zum Einsatz. An diesem lassen sich die unterschiedlichen Hirnregionen nach kurzen und langen Überlebenszeiten untersuchen. Das ist erforderlich, da ein ischämisch induzierter Insult des Gehirns bi-phasisch abläuft. Den ersten Hit setzt der Ausfall der cerebralen Durchblutung. Der zweite Hit wird durch die Reanimation und durch oxidativen Stress und durch Entzündungsreaktionen während der post-ROSC-Phase gesetzt. Die hippocampale CA1-Region gilt als am stärksten ACA/R-sensitiv, weshalb sie als Goldstandard für die morphologische Beurteilung in tierexperimentellen Studien gilt. Auch das Cerebellum ist neurodegenerativ verändert. Allerdings ist die Ergebnislage recht heterogen. Aus diesem Grund bestand meine Aufgabe darin, das neuropathologische Muster des Cerebellums nach ACA/R zu beschreiben und mögliche neuroprotektive Mechanismen zu eruieren.

Zum Einsatz kamen adulte männliche Wistar-Ratten. Vor dem ACA und kontinuierlich für 45' post-ROSC erfolgte die Ermittlung der Vitalparameter (mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz, Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ), Kohlenstoffdioxidpartialdruck ( $pCO_2$ ), pH-Wert, Blutglukosegehalt). Nach Überlebenszeiten von 6 h, 1, 2, 7 und 21 Tagen wurden immunhistochemische Doppel-Färbungen mit Markern für Dendriten und Axone, Astrozyten, Mikroglia/Makrophagen, Zellstress (cfos, Caspase 3, Bcl2) und Zell-eigene Schutzsysteme (MnSOD, Calcium-Bindungsprotein Parvalbumin, Calbindin D28k) durchgeführt. Alle ACA/R-Präparate wurden mit den Präparaten der entsprechenden Sham-operierten Kontrollgruppen verglichen.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (i) PZ weisen eine relative Resilienz gegenüber ACA/R auf.
- (ii) Folgende protektive Systeme sollten dafür zumindest mitverantwortlich sein:
  - Aktivierung der inhibitorischen Sternzellen, die die Ischämie-induzierte Exzitation der PZ ausgleichen.
  - Aktivierung der Calcium-Puffersysteme, die PZ vor einer neurodegenerativen Calcium-Überladung schützen.
  - Aktivierung des Neuronen-Astrozyten-Cross-Talks.
  - Aktivierung der endogenen MnSOD- und Bcl2-Verteidigungssysteme in den PZ.

## 7. Literatur

1. Gräsner J-T, Lefering R, Koster RW, Masterson S, Böttiger BW, Herlitz J et al. EuReCa ONE-27 Nations, ONE Europe, ONE Registry: A prospective one month analysis of out-of-hospital cardiac arrest outcomes in 27 countries in Europe. *Resuscitation* 2016; 105:188–95. doi: 10.1016/j.resuscitation.2016.06.004.
2. Sekhon MS, Ainslie PN, Griesdale DE. Clinical pathophysiology of hypoxic ischemic brain injury after cardiac arrest: a "two-hit" model. *Crit Care* 2017; 21(1):90. doi: 10.1186/s13054-017-1670-9.
3. Marinšek M, Sinkovič A, Šuran D. Neurological outcome in patients after successful resuscitation in out-of-hospital settings. *Bosn J Basic Med Sci* 2020. doi: 10.17305/bjbms.2020.4623.
4. Sandroni C, Cavallaro F, Callaway CW, Sanna T, D'Arrigo S, Kuiper M et al. Predictors of poor neurological outcome in adult comatose survivors of cardiac arrest: a systematic review and meta-analysis. Part 1: patients not treated with therapeutic hypothermia. *Resuscitation* 2013; 84(10):1310–23. doi: 10.1016/j.resuscitation.2013.05.013.
5. Venkatesan A, Frucht S. Movement disorders after resuscitation from cardiac arrest. *Neurol Clin* 2006; 24(1):123–32. doi: 10.1016/j.ncl.2005.11.001.
6. Freund B, Kaplan PW. Post-hypoxic myoclonus: Differentiating benign and malignant etiologies in diagnosis and prognosis. *Clin Neurophysiol Pract* 2017; 2:98–102. doi: 10.1016/j.cnp.2017.03.003.
7. Bouwes A, van Poppelen D, Koelman JHTM, Kuiper MA, Zandstra DF, Weinstein HC et al. Acute posthypoxic myoclonus after cardiopulmonary resuscitation. *BMC Neurol* 2012; 12:63. doi: 10.1186/1471-2377-12-63.
8. Hausmann R, Seidl S, Betz P. Hypoxic changes in Purkinje cells of the human cerebellum. *Int J Legal Med* 2007; 121(3):175–83. doi: 10.1007/s00414-006-0122-x.
9. Nolan J. Impact of COVID-19 on ERC Guidelines; 2020 [Stand: 25.04.2020]. Verfügbar unter: <https://www.erc.edu/news/impact-of-covid-19-on-erc-guidelines>.
10. Dirks B. Reanimation 2015: Leitlinie kompakt; 2015 [Stand: 25.04.2020]. Verfügbar unter: <https://www.grc-org.de/wissenschaft/leitlinien>.
11. Kristián T. Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. *Cell Calcium* 2004; 36(3-4):221–33. doi: 10.1016/j.ceca.2004.02.016.
12. Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* 2000; 106(6):723–31. doi: 10.1172/JCI11003.
13. Angermaier A, Rehmann R, Kitzrow M. Vaskuläre Erkrankungen. In: Sturm D, Biesalski A-S, Höffken O, Hrsg. *Neurologische Pathophysiologie*. Heidelberg: Springer; 2019. S. 2–47.
14. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(6):657–68. doi: 10.1007/s00018-003-3319-x.
15. Dong X-x, Wang Y, Qin Z-h. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30(4):379–87. doi: 10.1038/aps.2009.24.
16. Xiang Y, Zhao H, Wang J, Zhang L, Liu A, Chen Y. Inflammatory mechanisms involved in brain injury following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. *Biomed Rep* 2016; 5(1):11–7. doi: 10.3892/br.2016.677.

17. Gulbins E, Fandrey J. Die Zelle und ihre Signaltransduktion. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF, Hrsg. *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. S. 9–21.
18. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988; 336(6197):385–8. doi: 10.1038/336385a0.
19. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271(5 Pt 1):C1424–37. doi: 10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424.
20. Bernhardt R von, Heredia F, Salgado N. Microglia Function in the Normal Brain. In: Bernhardt R von, Hrsg. *Glial Cells in Health and Disease of the CNS*. Cham: Springer International Publishing; 2016. S. 67–92.
21. Bernhardt R von, Bernhardt JE-v, Flores B. Glial Cells and Integrity of the Nervous System. In: Bernhardt R von, Hrsg. *Glial Cells in Health and Disease of the CNS*. Cham: Springer International Publishing; 2016. S. 1–24.
22. Ouyang Y-B, Voloboueva LA, Xu L-J, Giffard RG. Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *J Neurosci* 2007; 27(16):4253–60. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0211-07.2007.
23. Masahito Kawabori, Midori A. Yenari. Inflammatory Responses in Brain Ischemia.
24. Barone FC, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19(8):819–34. doi: 10.1097/00004647-199908000-00001.
25. Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(10):734–44. doi: 10.1038/35094583.
26. Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, Barone FC. IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neuroscience Letters* 1998; 251(3):189–92. doi: 10.1016/S0304-3940(98)00537-0.
27. Dhandapani KM, Brann DW. Transforming Growth Factor- $\beta$ : A Neuroprotective Factor in Cerebral Ischemia. *CBB* 2003; 39(1):13–22. doi: 10.1385/CBB:39:1:13.
28. Ferrarese C, Mascarucci P, Zoia C, Cavarretta R, Frigo M, Begni B et al. Increased cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19(9):1004–9. doi: 10.1097/00004647-199909000-00008.
29. Losy J, Zaremba J. Monocyte chemoattractant protein-1 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke. *Stroke* 2001; 32(11):2695–6. doi: 10.1161/hs1101.097380.
30. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* 2013; 9(10):1057–69. doi: 10.7150/ijbs.7502.
31. Adams JA. Targeting the Endothelium. *Signa Vitae* 2010; 5(Suppl 1):17–23. doi: 10.22514/sv51.092010.4.
32. Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Böttiger BW et al. Post-cardiac arrest syndrome: Epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke. *Resuscitation* 2008; 79(3):350–79. doi: 10.1016/j.resuscitation.2008.09.017.
33. Quillinan N, Grewal H, Deng G, Shimizu K, Yonchek JC, Strnad F et al. Region-specific role for GluN2B-containing NMDA receptors in injury to Purkinje cells and CA1 neurons

- following global cerebral ischemia. *Neuroscience* 2015; 284:555–65. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.10.033.
34. Montenarh M. Replikation und Gentechnik. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, Hrsg. *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007. S. 219–53.
  35. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. *Prometheus Lernatlas - Kopf, Hals und Neuroanatomie*. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2018. (Thieme eRef). Verfügbar unter: <https://eref.thieme.de/ebooks/2343785>.
  36. Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol* 2015; 25(23):R1116-21. doi: 10.1016/j.cub.2015.10.049.
  37. Welsh JP, Yuen G, Placantonakis DG, Vu TQ, Haiss F, O'Hearn E et al. Why do Purkinje cells die so easily after global brain ischemia? Aldolase C, EAAT4, and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. *Adv Neurol* 2002; 89:331–59.
  38. Acosta SA, Mashkouri S, Nwokoye D, Lee JY, Borlongan CV. Chronic inflammation and apoptosis propagate in ischemic cerebellum and heart of non-human primates. *Oncotarget* 2017; 8(61):102820–34. doi: 10.18632/oncotarget.18330.
  39. Mai JK. 09 Kleinhirn (Cerebellum); 2020 [Stand: 25.04.2020]. Verfügbar unter: <http://teaching.thehumanbrain.info/neuroanatomie.php?kap=9>.
  40. Kätzel D, Lehmann-Horn F, Liss B, Roeper J, Weber F. Neuronale Kontrolle von Haltung und Bewegung. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF, Hrsg. *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019.
  41. Rodrigo J, Alonso D, Fernández AP, Serrano J, Richart A, López JC et al. Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression and protein nitration in rat cerebellum after oxygen and glucose deprivation. *Brain Res* 2001; 909(1-2):20–45. doi: 10.1016/S0006-8993(01)02613-0.
  42. Chen M-H, Liu T-W, Xie L, Song F-Q, He T, Zeng Z-y et al. A simpler cardiac arrest model in rats. *Am J Emerg Med* 2007; 25(6):623–30. doi: 10.1016/j.ajem.2006.11.033.
  43. Dobson GP, Faggian G, Onorati F, Vinten-Johansen J. Hyperkalemic cardioplegia for adult and pediatric surgery: end of an era? *Front Physiol* 2013; 4:228. doi: 10.3389/fphys.2013.00228.
  44. Furlow TW. Cerebral ischemia produced by four-vessel occlusion in the rat: a quantitative evaluation of cerebral blood flow. *Stroke* 1982; 13(6):852–5. doi: 10.1161/01.str.13.6.852.
  45. Statistisches Bundesamt (Destatis). *Todesursachen in Deutschland 2015*: Statistisches Bundesamt; 2017 [Stand: 01.06.2020]. Verfügbar unter: [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/\\_inhalt.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html).
  46. Paine MG, Che D, Li L, Neumar RW. Cerebellar Purkinje cell neurodegeneration after cardiac arrest: effect of therapeutic hypothermia. *Resuscitation* 2012; 83(12):1511–6. doi: 10.1016/j.resuscitation.2012.05.022.
  47. Au AK, Chen Y, Du L, Smith CM, Manole MD, Baltagi SA et al. Ischemia-induced autophagy contributes to neurodegeneration in cerebellar Purkinje cells in the developing rat brain and in primary cortical neurons in vitro. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852(9):1902–11. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.06.007.
  48. Drabek T, Wilson CD, Janata A, Stezoski JP, Janesko-Feldman K, Garman RH et al. Unique brain region-dependent cytokine signatures after prolonged hypothermic cardiac arrest in rats. *Therapeutic Hypothermia and Temperature Management* 2015; 5(1):26–39. doi: 10.1089/ther.2014.0013.

49. Kántor O, Schmitz C, Feiser J, Brasnjevic I, Korr H, Busto R et al. Moderate loss of cerebellar Purkinje cells after chronic bilateral common carotid artery occlusion in rats. *Acta Neuropathol* 2007; 113(5):549–58. doi: 10.1007/s00401-007-0204-y.
50. Pulsinelli WA, Levy DE, Duffy TE. Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia. *Annals of Neurology* 1982; 11(5):499–502. doi: 10.1002/ana.410110510.
51. Ebmeyer U, Keilhoff G, Wolf G, Röse W. Strain specific differences in a cardio-pulmonary resuscitation rat model. *Resuscitation* 2002; 53(2):189–200. doi: 10.1016/S0300-9572(02)00003-5.
52. Keilhoff G, John R, Langnaese K, Schweizer H, Ebmeyer U. Triggered by asphyxia neurogenesis seems not to be an endogenous repair mechanism, gliogenesis more like it. *Neuroscience* 2010; 171(3):869–84. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.09.024.
53. Keilhoff G, Titze M, Esser T, Langnaese K, Ebmeyer U. Constitutive and functional expression of YB-1 in microglial cells. *Neuroscience* 2015; 301:439–53. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.06.023.
54. Ebmeyer U, Esser T, Keilhoff G. Low-dose nitroglycerine improves outcome after cardiac arrest in rats. *Resuscitation* 2014; 85(2):276–83. doi: 10.1016/j.resuscitation.2013.10.009.
55. Esser T, Keilhoff G, Ebmeyer U. Anesthesia specific differences in a cardio-pulmonary resuscitation rat model; halothane versus sevoflurane. *Brain Res* 2016; 1652:144–50. doi: 10.1016/j.brainres.2016.10.003.
56. Keilhoff G, Ebmeyer U, Schild L. Spontaneous hypothermia is not able to completely counteract cardiac arrest-induced mitochondrial impairment in the rat heart. *Neonatology* 2013; 103(2):131–3. doi: 10.1159/000345224.
57. Keilhoff G, Esser T, Titze M, Ebmeyer U, Schild L. Gynostemma pentaphyllum is neuroprotective in a rat model of cardiopulmonary resuscitation. *Exp Ther Med* 2017; 14(6):6034–46. doi: 10.3892/etm.2017.5315.
58. Keilhoff G, Esser T, Titze M, Ebmeyer U, Schild L. High-potential defense mechanisms of neocortex in a rat model of transient asphyxia induced cardiac arrest. *Brain Res* 2017; 1674:42–54. doi: 10.1016/j.brainres.2017.08.018.
59. Keilhoff G, Nguyen Thi TM, Esser T, Ebmeyer U. Relative Resilience of Cerebellar Purkinje Cells in a Cardiac Arrest/Resuscitation Rat Model. *Neurocrit Care* 2019. doi: 10.1007/s12028-019-00799-0.
60. Keilhoff G, Schweizer H, John R, Langnaese K, Ebmeyer U. Minocycline neuroprotection in a rat model of asphyxial cardiac arrest is limited. *Resuscitation* 2011; 82(3):341–9. doi: 10.1016/j.resuscitation.2010.11.011.
61. Keilhoff G, Titze M, Rathert H, Lucas B, Esser T, Ebmeyer U. Normoxic post-ROSC ventilation delays hippocampal CA1 neurodegeneration in a rat cardiac arrest model, but does not prevent it. *Exp Brain Res* 2020. doi: 10.1007/s00221-020-05746-6.
62. Langnaese K, John R, Schweizer H, Ebmeyer U, Keilhoff G. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Mol Biol* 2008; 9:53. doi: 10.1186/1471-2199-9-53.
63. Cerchiari EL, Safar P, Klein E, Cantadore R, Pinsky M. Cardiovascular function and neurologic outcome after cardiac arrest in dogs. The cardiovascular post-resuscitation syndrome. *Resuscitation* 1993; 25(1):9–33. doi: 10.1016/0300-9572(93)90003-9.
64. Sugawara T, Lewén A, Noshita N, Gasche Y, Chan PH. Effects of global ischemia duration on neuronal, astroglial, oligodendroglial, and microglial reactions in the vulnerable hippocampal CA1 subregion in rats. *J Neurotrauma* 2002; 19(1):85–98. doi: 10.1089/089771502753460268.

65. Martin GB, O'Brien JF, Best R, Goldman J, Tomlanovich MC, Nowak RM. Insulin and glucose levels during CPR in the canine model. *Annals of Emergency Medicine* 1985; 14(4):293–7. doi: 10.1016/S0196-0644(85)80089-5.
66. Neukomm LJ, Freeman MR. Diverse cellular and molecular modes of axon degeneration. *Trends in Cell Biology* 2014; 24(9):515–23. doi: 10.1016/j.tcb.2014.04.003.
67. Wang A-r, Hu M-z, Zhang Z-l, Zhao Z-y, Li Y-b, Liu B. Fastigial nucleus electrostimulation promotes axonal regeneration after experimental stroke via cAMP/PKA pathway. *Neuroscience Letters* 2019; 699:177–83. doi: 10.1016/j.neulet.2019.02.016.
68. Sotelo C. Molecular layer interneurons of the cerebellum: developmental and morphological aspects. *The Cerebellum* 2015; 14(5):534–56. doi: 10.1007/s12311-015-0648-x.
69. Zhang F, Li C, Wang R, Han D, Zhang Q-G, Zhou C et al. Activation of GABA receptors attenuates neuronal apoptosis through inhibiting the tyrosine phosphorylation of NR2A by Src after cerebral ischemia and reperfusion. *Neuroscience* 2007; 150(4):938–49. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.070.
70. Heizmann CW, Braun K. Calcium regulation by calcium-binding proteins in neurodegenerative disorders. New York: Springer-Verlag; R.G. Landes; 1995. (Neuroscience intelligence unit).
71. Schwaller B. Cytosolic Ca<sup>2+</sup> buffers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2010; 2(11):a004051. doi: 10.1101/cshperspect.a004051.
72. Tortosa A, Ferrer I. Parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the gerbil after transient forebrain ischaemia: A qualitative and quantitative sequential study. *Neuroscience* 1993; 55(1):33–43. doi: 10.1016/0306-4522(93)90452-L.
73. Burke RE, Baimbridge KG. Relative loss of the striatal striosome compartment, defined by calbindin-D28k immunostaining, following developmental hypoxic-ischemic injury. *Neuroscience* 1993; 56(2):305–15. doi: 10.1016/0306-4522(93)90333-B.
74. Chen G, Racay P, Bichet S, Celio MR, Egli P, Schwaller B. Deficiency in parvalbumin, but not in calbindin D-28k upregulates mitochondrial volume and decreases smooth endoplasmic reticulum surface selectively in a peripheral, subplasmalemmal region in the soma of Purkinje cells. *Neuroscience* 2006; 142(1):97–105. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.06.008.
75. Timmermans JA, Bindels RJ, van Os CH. Stimulation of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump by calbindin-D28k and calmodulin is additive in EGTA-free solutions. *The Journal of Nutrition* 1995; 125(7 Suppl):1981S-1986S. doi: 10.1093/jn/125.suppl\_7.1981S.
76. Bastianelli E. Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *Cerebellum* 2003; 2(4):242–62. doi: 10.1080/14734220310022289.
77. Bojarski C, Meloni BP, Moore SR, Majda BT, Knuckey NW. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger subtype (NCX1, NCX2, NCX3) protein expression in the rat hippocampus following 3 min and 8 min durations of global cerebral ischemia. *Brain Res* 2008; 1189:198–202. doi: 10.1016/j.brainres.2007.10.065.
78. Barreto GE, Gonzalez J, Torres Y, Morales L. Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. *Neurosci Res* 2011; 71(2):107–13. doi: 10.1016/j.neures.2011.06.004.
79. Helleringer R, Chever O, Daniel H, Galante M. Oxygen and Glucose Deprivation Induces Bergmann Glia Membrane Depolarization and Ca<sup>2+</sup> Rises Mainly Mediated by K<sup>+</sup> and ATP Increases in the Extracellular Space. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2017; 11:349. doi: 10.3389/fncel.2017.00349.
80. Cabungcal J-H, Steullet P, Morishita H, Kraftsik R, Cuenod M, Hensch TK et al. Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences 2013; 110(22):9130–5. doi: 10.1073/pnas.1300454110.
81. Walson KH, Tang M, Glumac A, Alexander H, Manole MD, Ma L et al. Normoxic versus hyperoxic resuscitation in pediatric asphyxial cardiac arrest: effects on oxidative stress. *Crit Care Med* 2011; 39(2):335–43. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181ffda0e.
  82. Katz L, Ebmeyer U, Safar P, Radovsky A, Neumar R. Outcome model of asphyxial cardiac arrest in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15(6):1032–9. doi: 10.1038/jcbfm.1995.129.
  83. Kuwamura M, Yoshida T, Yamate J, Kotani T, Sakuma S. Hereditary cerebellar vermis defect in the Lewis rat. *Brain Res Dev Brain Res* 1994; 83(2):294–8. doi: 10.1016/0165-3806(94)00167-7.
  84. Manto M, Bower JM, Conforto AB, Delgado-García JM, da Guarda, Suzete Nascimento Farias, Gerwig M et al. Consensus paper: roles of the cerebellum in motor control--the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement. *The Cerebellum* 2012; 11(2):457–87. doi: 10.1007/s12311-011-0331-9.
  85. Aravamuthan BR, Shoykhet M. Long-term increase in coherence between the basal ganglia and motor cortex after asphyxial cardiac arrest and resuscitation in developing rats. *Pediatric Research* 2015; 78(4):371–9. doi: 10.1038/pr.2015.114.
  86. Putzu A, Valtorta S, Di Grigoli G, Haenggi M, Belloli S, Malgaroli A et al. Regional Differences in Cerebral Glucose Metabolism After Cardiac Arrest and Resuscitation in Rats Using <sup>18</sup>F-FDG Positron Emission Tomography and Autoradiography. *Neurocrit Care* 2018; 28(3):370–8. doi: 10.1007/s12028-017-0445-0.
  87. Xu H, Lu A, Sharp FR. Regional genome transcriptional response of adult mouse brain to hypoxia. *BMC Genomics* 2011; 12(1):499. doi: 10.1186/1471-2164-12-499.

## 8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Keilhoff und Herrn Prof. Ebmeyer für die Aufnahme in die interdisziplinäre Arbeitsgruppe “Neurobiologie/Anästhesiologie/Intensivmedizin” und die Überlassung dieses faszinierenden Promotionsthemas bedanken. Das komplexe Thema ACA/R hat mir in interessanter Weise die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens näher gebracht.

Besonders möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Keilhoff, für ihre hervorragende Betreuung bedanken. Sowohl fachlich als auch menschlich stand sie mir jederzeit zur Seite. Ich habe den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit ihrer unerschöpflichen Unterstützung, Hilfe und Motivation zu verdanken.

Frau Leona Bück danke ich für ihre vielfältige, kompetente und stete labor-technische Unterstützung bei der immunhistochemischen Aufarbeitung der Kleinhirnpräparate.

Ein großer Dank gilt auch Dr. Torben Esser (KAIT) und Maximilian Titze, die viele der hier ausgewerteten Tiere in mühsamer Arbeit operiert und mir zur Verfügung gestellt haben.

Vielen Dank an meine Familie und insbesondere an meine Mutter, Nguyen Thi Quyen und meinen Vater, Nguyen Cong Thuan, die mich mein ganzes Leben lang unterstützen, lehren und lieben.

Lieben Dank an meinen Freund Michael und meine Mitbewohnerin Linh, die mich bis zum Abschluss dieser Arbeit motiviert, unterstützt und bei Laune gehalten haben.

Und zu guter Letzt bedanke ich bei den Versuchstieren, die, unter Berücksichtigung des geltenden Tierschutzgesetzes, für diese Arbeit und die daraus folgende wissenschaftliche Erkenntnis ihr Leben gegeben haben.

## 9. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

### **Eine Studie zur relativen Resilienz der cerebellaren Purkinjezellen im Cardiac Arrest Modell der Ratte**

im Institut für Biochemie und Zellbiologie und in den Laborräumen des Zentralen Tierlabors der Medizinischen Fakultät

mit Unterstützung durch Frau Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerburg Keilhoff, Herrn Dr. med. Torben Esser, Herrn Maximilian Titze und Frau Leona Bück,

ansonsten ohne weitere Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Thi Tue Minh Nguyen  
Magdeburg, den 14.06.2020

## 10. Bildungsweg

### Schulbildung

2000 – 2004	Grundschule Amstorfstraße Magdeburg
2004 – 2012	Norbertusgymnasium Magdeburg

### Studium

2012 – 2019	Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
09/2015 – 02/2016	Erasmus- Stipendium an der Marmara Universität Istanbul
Mai 2019	Abschluss des Medizinstudiums

### Ärztliche Tätigkeit

Seit 11/2019	Assistenzärztin im KRH Klinikum Neustadt am Rübenberge
--------------	--

Thi Tue Minh Nguyen  
Magdeburg, den 14.06.2020