

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die neuronale Funktion und Plastizität in der hippocampalen Formation nach einer globalen zerebralen Ischämie zu untersuchen.

Eine transiente Vorderhirnischämie bewirkte einen selektiven Zelluntergang in der CA1-Region des Hippokampus, während der benachbarte *Gyrus dentatus* morphologisch (Nisslfärbung) unbeeinträchtigt blieb. Trotzdem war schon zu einem frühen Zeitpunkt nach transientser globaler Ischämie die Aktionspotential-Generierung (PSA) im *Gyrus dentatus* sehr stark vermindert oder blockiert, während die synaptische Transmission (fEPSP) kaum beeinflusst wurde. Eine Tetanisierung 10 Tage nach Ischämieinduktion führte zu einer Verstärkung oder erst zur Induktion messbarer Potentiale. In *ex vivo* hippocampalen Schnittpräparaten von ischämischen Tieren wurden bei der Populationsspike-Generierung, bei der Doppelpuls-Inhibition und bei der LTP keine Funktionsbeeinträchtigungen beobachtet.

Weiterführende immunhistochemische Untersuchungen zeigten zeitlich korrelierende morphologische Veränderungen im Vorderhirn. Es wurde eine signifikante Proliferationssteigerung 1 und 3 Tage nach einer globalen Ischämie detektiert, wobei die Mehrzahl der neu gebildeten Zellen an Tag 3 nach Ischämie im geschädigten CA1-Bereich, im *Gyrus dentatus*, in der *Fissura hippocampi*, im Hilus und im Striatum als Mikrogliazellen/Makrophagen charakterisiert wurden. Die Ergebnisse dieser Experimente deuteten des Weiteren darauf hin, dass die Mikrogliazellen/Makrophagen z.T. aus gewebeständigen Mikroglia entstanden sind, aber z.T. auch aus den Blutgefäßen und aus den Ventrikelwänden in das Gehirnparenchym migriert sein könnten.

Für die Untersuchung der Veränderung der frühen Neurogenese wurden neuronale Vorläuferzellen (DCX-positiv) in den Proliferationszonen des *Gyrus dentatus* und der SVZ untersucht. Es wurde jedoch keine signifikante Erhöhung neu gebildeter neuronaler Vorläuferzellen (DCX/BrdU-positiv) in beiden Proliferationszonen detektiert. Hingegen wurde eine Reduktion der Anzahl neuronaler Vorläuferzellen (DCX-positiv) im *Gyrus dentatus* gefunden, die sich hauptsächlich auf das obere Blatt beschränkte, welches sich sehr nah an der geschädigten CA1-Region befindet.

Astrozyten wurden im Hippokampus 1 und 3 Tage nach Ischämie deutlich aktiviert, und zwar nicht nur im CA1-Bereich, in dem Zelltod auftritt, sondern u.a. auch im *Gyrus dentatus* und im Striatum. Im Gegensatz zu den Mikroglia/Makrophagen wurde fast keine Astrozytenproliferation festgestellt. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die aktivierten Astrozyten zum großen Teil auch Nestin exprimieren. Generell wird Nestin als Marker für neurale Vorläuferzellen angesehen, was bedeuten könnte, dass Vorläuferzellen sich in Astrozyten differenziert haben. Jedoch gibt es auch Hinweise für den umgekehrten Vorgang, d.h. dass es zu einer De-Differenzierung von Astrozyten kommt.

Eines der interessantesten Ergebnisse wurde mit der Methode der Thallium Autometallographie erzielt. Im Gegensatz zum Hippokampusgewebe von ungeschädigten Tieren war das Stratum moleculare und die Granularzellschicht des *Gyrus dentatus* 14 Tage nach Ischämie mit vollständigem CA1-Schaden intensiv und dunkel angefärbt, wobei es sich aber wahrscheinlich nicht um eine erhöhte Aktivität der Granularzellen des *Gyrus dentatus* handelt, sondern um eine Hyperpolarisation. Diese Veränderung der Ionen-Homöostase könnte als möglicher Grund für die signifikante Reduktion des PS nach einem ischämischen Insult in Frage kommen. Zusätzlich wurden mit dieser neuen Färbemethode ein vertikales streifenförmige Aktivierungsmuster im CA1-Band und eine sehr spät einsetzende und langsame Degeneration der CA1-Dendriten gezeigt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach einer globalen zerebralen Ischämie neben dem Zelltod der CA1-Pyramidenzellen, eine Abnahme DCX-positiver Zellen und Funktionsbeeinträchtigung in den Körnerzellen des *Gyrus dentatus* und eine massive Zunahme von Mikroglia/Makrophagen und Nestin/GFAP-positiven Zellen im gesamten Vorderhirn auftreten. Durch diese Ergebnisse wird die Komplexität der verschiedenen Vorgänge nach einer globalen Ischämie hervorgehoben, die bei der Suche nach einer endogenen regenerativen Strategie berücksichtigt werden sollten. Desweiteren zeigen die Resultate der Thallium-Autometallographie erstmals eine Synopsis von Funktion und Morphologie auf zellulärer Ebene im post-ischämischen Hippokampus.

Summary

The main aim of this work was to analyse neuronal function and plasticity in the hippocampal formation after global ischemia in rats.

Histological evaluations after global ischemia have shown selective death of CA1 pyramidal cells and no obvious damage in the dentate gyrus (DG). However, *in vivo* electrophysiological recordings of the population spike signal (PSA) in the DG revealed a significant and long-lasting impairment of this evoked response after global ischemia. The electrophysiological effects appeared as early as 1 day after the insult. Synaptic transmission (fEPSP) was much less influenced and did not show a significant decrease. Interestingly, in rats which showed no electrophysiological response at all, it was possible to induce a PSA by tetanization on day 10 post ischemia. In contrast to the *in vivo* results, electrophysiological recordings from post-ischemic *ex vivo* hippocampal slice-preparations showed no functional impairments at all.

Further experiments were conducted according to the hypothesis that detailed immunohistochemical analysis would reveal morphological changes in the post-ischemic DG. In line with this hypothesis, a pronounced activation and proliferation of microglia/macrophages was detected and their temporal/spacial expression pattern was quantified.

Early phase neurogenesis, detected by doublecortin (DCX) labelling was restricted to the neurogenic zones at the early post-ischemic times investigated. Unlike published data about increased neurogenesis at later post-ischemic times, ischemia reduced the overall number of DCX-positive cells in the DG 3 days after global ischemia. Astrocytes were activated all over the forebrain 1 and 3 days post ischemia but did not proliferate. In addition nestin was used as a marker for pluripotent neural stem cells. After ischemia, nestin was co-localized almost completely with the astrocytic marker GFAP. The expression of nestin on astrocytes is in line with the assumption that activated astrocytes may be source of nascent neurons. However, it is also possible that cells with the neural precursor marker nestin migrate from adventitial progenitor cells or the ependymal layer of the ventricle walls to the damage and differentiate into astrocytes.

Using the newly developed method of Thallium-autometallography it is possible to trace the cellular potassium metabolism. This provides the opportunity to visualize and further characterize the functional changes which had been detected by electrophysiological methods. In rats with complete loss of the CA1 pyramidal cells, the stratum moleculare and the granular neurons of the DG had changed from a slight staining (controls) to a very intensive labelling. This is the first morphological evidence of the functional impairments in the granular neurons after global ischemia and it suggests that a pronounced hyperpolarisation may be the underlying mechanism of the loss of function in the DG post ischemia. Additionally a vertical laminar periodicity of the selective vulnerability in the CA1 layer was observed.

The results of this work show that the CA1 pyramidal cell layer is not the only impaired region at an early time points after global cerebral ischemia. Furthermore a decrease of DCX-positive cells and an impairment of the granular neurons in the DG were observed. Additionally a massive increase of microglia/macrophages and nestin/GFAP-positive cells all over the forebrain were also detected. These results demonstrate the complexity of the different processes during global ischemia which should be paid regard to in search of endogenous regenerative strategies. The imaging of neuronal activity at the cellular level revealed extraordinary new insights into post-ischemic brain function.