

Diplom-Pharmazeutin Olga Chechneva

## **Neurodegeneration und Neurogenese in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen nach Hypoxie/Hypoglykämie**

### ZUSAMMENFASSUNG

Adulte neurogenese spielt eine Rolle bei vielen physiologischen (z.B. Gedächtnisbildung) und pathologischen (z.B. Schlaganfall, Depression) Prozessen. In neueren Studien wurde eine erhöhte Neurogenese als Antwort auf eine Verletzung des Gehirns gezeigt, die als ein Mechanismus der Regeneration nach dem Verlust von Neuronen angesehen wird. Es gibt Hinweise darauf, dass eine Vielzahl von Faktoren, wie z.B. Glutamat, Entzündungs- und Wachstumsfaktoren, zum Anstieg der Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen nach einem Insult beitragen. Der Mechanismus, der durch eine Verletzung Neurogenese induziert, ist bisher jedoch weitgehend unklar.

In der vorliegenden Studie wurde die frühe Neurogenese *in vitro* an organotypischen Hippokampusschnittkulturen der Ratte (OHC) charakterisiert und das komplizierte Wechselspiel zwischen neuronaler Schädigung, Mikroglia-Aktivierung, Zellproliferation, Neurogenese und der Rolle der Entzündung nach Sauerstoff-Glukose Entzug (OGD) untersucht. Außerdem wurde die Wirkung exogener Wachstumsfaktoren, nämlich des basalen Fibroblastenwachstumsfaktors (bFGF), des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), des vom Gehirn gebildeten neurotrophen Faktors und des Nervenwachstumsfaktors, auf die Proliferation und die Neurogenese in OHC bei Anwesenheit und Abwesenheit einer Schädigung überprüft.

Die Proliferation wurde über die Aufnahme von Bromodeoxyuridin (BrdU), die Neurogenese durch eine Doppelmarkierung mit Bromodeoxyuridin und Doublecortin (DCX) oder  $\beta$ -III Tubulin, die neuronale Schädigung über die Propidiumiodidaufnahme, Mikroglia durch eine OX-42 Färbung und proentzündliche Zytokine mittels Echtzeit-RT-PCR bestimmt.

Es wurde eine massive Zellproliferation in der glialen Umhüllung des Schnittes beobachtet. Die gliale Umhüllung wurde während der Kultivierung der Schnitte von GFAP bzw. GFAP/Nestin-positiven Astrozyten sowie aktivierter Mikroglia gebildet. Die Proliferation innerhalb der Schnittkultur war geringer. bFGF und EGF zeigten mitogene Eigenschaften und erhöhten die Zahl BrdU-positiver Zellen. Es konnte gezeigt werden, daß es in OHC zusätzlich zum Gyrus dentatus (DG) eine weitere neurogene Zone gibt: den posterioren Periventrikel (pPV), der einen Teil der lateralen Ventrikelwand darstellt. Diese an das Stratum oriens grenzende Struktur enthielt Nestin-positiv Vorläuferzellen. Es konnten morphologische und funktionelle Unterschiede zwischen DG und pPV Vorläuferzellpopulationen identifiziert werden. Im DG wurden Nestin-positiv Zellen mit einer sternförmigen Morphologie gefunden, während im pPV elliptisch geformte Nestin-positiv Zellen auftraten. Eine bFGF-Behandlung verursachte eine schnelle aber kurzlebige neurogene Antwort im DG, wobei bFGF im pPV einen ausgeprägteren und langlebigeren neurogenen Effekt bewirkte.

Wenn die OHC einer 40 min OGD ausgesetzt wurden, war eine Aktivierung der Mikroglia und die Hochregulation von IL-1 $\beta$ -, TNF- $\alpha$ - und IL-6-mRNA (2h nach OGD) zu beobachten, die der Entwicklung der neuronalen Schädigung (6h nach OGD) und einem Anstieg der Zellproliferation (16h nach OGD) voranging. Eine Behandlung mit BDNF, EGF oder NGF verminderte die OGD-induzierte Proliferation. Die Neurogenese war an Tag 3 nach OGD in beiden neurogenen Zonen gehemmt. Die Wiederherstellung der Neurogenese konnte aber bereits am Tag 6 beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante Erhöhung der Anzahl neugebildeter Neurone im pPV gefunden. Die Zahl BrdU/ $\beta$ -III Tubulin-positiven Neurone im pPV OGD-exponierter OHC konnte durch die Gabe von bFGF erheblich gesteigert werden.

MK-801, Indomethacin oder Minozyklin verhinderten die OGD-induzierte neuronale Schädigung, Zellproliferation und verursachten eine Abnahme von OX-42 positiver Mikroglia

im geschädigten Bereich. Unter Kontrollbedingungen induzierten MK-801, Indomethacin und Minozyklin Neurogenese im pPV. Nach OGD verminderte eine MK-801 Behandlung die Zahl der BrdU/DCX-positiven Zellen des pPV. Indomethacin oder Minozyklin beeinflussten die OGD-induzierte Neurogenese im pPV jedoch nicht.

Zusammenfassend zeigt diese Studie erstmals i) dass es in als Oberflächenschnitte kultivierten OHC zwei neurogene Zonen gibt, den DG und den pPV ii) das DG und pPV neuronale Vorläuferzellen mit unterschiedlichen neurogenen Eigenschaften enthalten. Die Neurogenese im pPV war hoch, während die Neurogenese im DG von OHC niedrig war; iii) eine Entzündung tritt in OHC schon zu einem frühen Zeitpunkt nach OGD auf. Sie ist mit der Aktivierung, Migration und Proliferation von Mikroglia verbunden; iv) wegen Änderungen des Mikromilieus wird die Neurogenese in beiden neurogenen Zonen früh nach OGD (3 Tage) gehemmt und später (6 Tage) wieder hergestellt. OGD regt die Neurogenese im pPV an; v) Neuroprotektion gegen OGD-induzierte Schädigung durch anti-inflammatorische Behandlung ist in OHC von intakter Neurogenese begleitet. Somit lieferten die *in vitro* Daten wichtige Hinweise, die für ein weiteres Verständnis der Mechanismen der Neurogenese und der anti-inflammatorischen Behandlung nach Schlaganfall nützlich sein könnten.