

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für
Kinderheilkunde I

**Der Einfluss einer Hypothermie auf den Phänotyp myeloider Zellen im
geschädigten Gehirn nach neonataler Hypoxie-Ischämie**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Marina Seitz

aus
Velbert
2022

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/78301

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20230425-090517-2



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 Lizenz (CC BY 4.0) genutzt werden.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. medic. I. Bendix
2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. T. Schmitz
3. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. A. Flemmer

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Februar 2023

Publikationen:

Seitz, M., Koster, C., Dietko, M., Sabir, H., Serdar, M., Felderhoff-Muser, U., Bendix, I., and Herz, J. (2021).

Hypothermia modulates myeloid cell polarization in neonatal hypoxic-ischemic brain injury.

J Neuroinflammation 18, 266.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	Klinischer Hintergrund.....	7
1.2	Pathophysiologie der neonatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung	9
1.3	Protektive Mechanismen der Hypothermie	10
1.4	Rolle myeloider Zellen in neonataler HI	13
1.5	Myeloide Zellpolarisierung nach neonataler HI	14
1.6	Fragestellungen und Ziele	18
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Material	20
2.2	Methoden	26
2.2.1	Tierversuche	26
2.2.2	Experimentelles Modell	27
2.2.3	Histologie.....	28
2.2.3.1	Gewebeaufarbeitung.....	28
2.2.3.2	Herstellung der Gewebeschnitte.....	29
2.2.3.3	Kresylviolett-Färbung und histologische Evaluation der strukturellen Gewebeschädigung.....	29
2.2.3.4	Atrophie-Bestimmung	29
2.2.3.5	Neuropathologische Evaluation des Schadensausmaßes.	30
2.2.4	Immunhistochemie	31
2.2.4.1	Etablierung immunhistochemischer Färbungen für die Analyse typischer M1 und M2 Marker.....	31
2.2.4.2	TUNEL-Färbung zur Bestimmung der zellulären Degeneration	34
2.2.4.3	NeuN-Färbung zur Ermittlung der neuronalen Dichte.....	34
2.2.4.4	Konfokalmikroskopie und Auswertung immunhistochemischer Färbungen für Mikroglia und typische M1 und M2 Marker.....	35

2.2.4.5	Quantifizierung der zellulären Degeneration und neuronalen Dichte	36
2.2.5	Magnetische Zellsortierung (<i>magnetic-activated cell sorting</i> , MACS)	36
2.2.6	Durchflusszytometrie	38
2.2.7	RNA-Isolation und quantitative real time PCR.....	39
2.2.7.1	RNA Isolation	39
2.2.7.2	Reverse Transkription.....	40
2.2.7.3	Real-Time-Polymerasekettenreaktion.....	41
2.2.8	Statistik	41
3	ERGEBNISSE	43
3.1	Die Hypothermie wirkt neuroprotektiv auf die HI-induzierte subakute Gewebeschädigung	43
3.2	Die Hypothermie hat keinen Einfluss auf die allgemeine Mikroglia-Aktivierung	46
3.3	Der Einfluss einer Hypoxie-Ischämie und einer Hypothermie auf die Expression typischer M1 und M2 Marker ist von der Gehirnregion und vom Zeitpunkt abhängig.....	48
3.4	Die Hypothermie reguliert die myeloide Zellpolarisierung nach neonataler Hypoxie-Ischämie	51
3.4.1	Durchflusszytometrische Charakterisierung sortierter myeloider CD11b ⁺ Zellen aus dem Gehirn.....	52
3.4.2	Modulation myeloider Zellen infolge einer HI und HT.....	56
3.4.3	Einfluss einer HI und HT auf die Expression typischer M1-Moleküle in myeloiden Zellen des Gehirns	58
3.4.4	Einfluss einer HI und HT auf die Expression immunmodulatorischer Moleküle in myeloiden Zellen des Gehirns	62
3.4.5	Einfluss einer HI und HT auf die Expression typischer M2-Moleküle in myeloiden Zellen des Gehirns	64
4	DISKUSSION	67
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	78

6 LITERATURVERZEICHNIS	80
7 ANHANG	93
Abkürzungsverzeichnis	96
Tabellenverzeichnis	99
Abbildungsverzeichnis	100
DANKSAGUNG	101
LEBENS LAUF	102

1 EINLEITUNG

1.1 Klinischer Hintergrund

Die hypoxisch-ischämische Enzephalopathie (HIE) ist eine häufige Komplikation der perinatalen Asphyxie. Mit einer Prävalenz von ungefähr 6 pro 1000 reifen Neugeborenen (Levene et al., 1985) ist die Asphyxie weltweit die dritthäufigste Todesursache bei Neugeborenen (Lawn et al., 2005). Der Begriff Asphyxie bezeichnet einen Sauerstoffmangel im Blut, der durch einen unzureichenden Gasaustausch bedingt ist. Die AWMF-Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin definiert die neonatale Asphyxie als eine Kombination aus nachgewiesener Azidose im Nabelschnurblut und nachweisbarer Beeinträchtigung von Organfunktionen des Neugeborenen (Flemmer et al., 2013). Häufige Ursache für eine neonatale Asphyxie ist die Uterusruptur, vorzeitige Plazentalösung oder Plazentainsuffizienz, die zum Beispiel durch eine überschießende Wehentätigkeit oder eine intrauterine Infektion verursacht sein kann (McGuire, 2007). Darüber hinaus stellt die Nabelschnurverlegung oder –umschlingung eine wesentliche Ursache für einen Sauerstoffmangel um den Zeitpunkt der Geburt dar (McGuire, 2007). Die perinatale HIE infolge der Asphyxie ist einer der häufigsten Gründe für die Entwicklung neurologischer Dysfunktionen (Ahearne et al., 2016; Lai and Yang, 2011). Die HIE tritt bei 2 bis 4 von 1000 Neugeborenen auf und besitzt eine Mortalitätsrate von bis zu 50% (Vannucci and Hagberg, 2004). Bei überlebenden Neugeborenen kann es zu lebenslanger Behinderung, wie z.B. einer Zerebralparese, kognitiven Defiziten und Epilepsie kommen (Ahearne et al., 2016; Rice et al., 1981; Rocha-Ferreira and Hristova, 2016; Vannucci and Hagberg, 2004; Vexler et al., 2018).

Medizinische Behandlungsmöglichkeiten der HIE beschränken sich derzeit auf die obligatorische Hypothermie, bei der Neugeborene für 72 Stunden auf eine Körpertemperatur von 33-34°C gekühlt werden (Davies et al., 2019; Shankaran et al., 2005). Eine große Anzahl klinischer Studien belegte das protektive Potenzial der Hypothermie hinsichtlich des Überlebens und dem Auftreten von

Behinderungen und Entwicklungsstörungen bis in das Schulalter (Abb. 1) (Azzopardi et al., 2014).

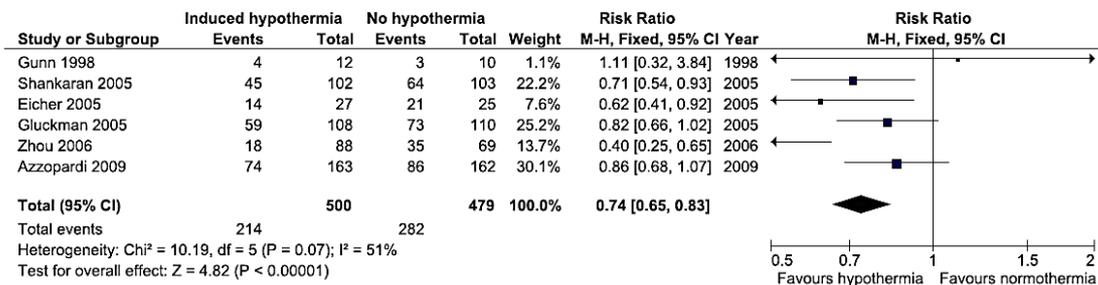


Abbildung 1: Protektiver Effekt der Hypothermie in der neonatalen HIE. Die Daten mehrerer großer klinischer Studien wurden in einer Metaanalyse von Shah et al. zusammengefasst und belegten in der Summe einen signifikanten Effekt auf das Überleben oder die Entwicklung einer moderaten bis schweren neurologische Beeinträchtigung (aus (Shah et al., 2007)).

Trotz dieser positiven Befunde weist die Hypothermie große Limitationen auf, da sie innerhalb der ersten 6 Stunden nach der Geburt initiiert werden muss. Zudem liegt die Zahl der Kinder, die behandelt werden müssen, um von der Therapie zu profitieren, derzeit immer noch bei 6 bis 7 (Azzopardi et al. 2014). Das kurze therapeutische Zeitfenster stellt insbesondere in Ländern mit schlechter Infrastruktur eine große Herausforderung dar. Zudem ist sie nur für Kinder nach der 36. Schwangerschaftswoche ausreichend erforscht und scheint bei schwerer HIE eine reduzierte Wirksamkeit zu haben (Sabir et al., 2012). Daher stellt die Identifizierung und Entwicklung möglicher additiver Therapiestrategien einen wesentlichen Schwerpunkt der aktuellen Forschung dar. Substanzen, die in diesem Zusammenhang vor allem aufgrund präklinischer Studien erfolgversprechend scheinen, sind beispielsweise Erythropoetin, Melatonin, *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1), Xenon, Phenobarbital oder mesenchymale Stammzellen (MSZ) (Davidson et al., 2015). Aktuell ist jedoch keine dieser additiven Behandlungsmethoden für den breiten klinischen Einsatz geeignet. Darüber hinaus gibt es erste Hinweise für mögliche Interaktionseffekte zwischen einer Hypothermie und einer verzögerten Stammzelltherapie, deren protektives Potenzial reduziert war, wenn sie im Tiermodell 3 Tage nach Kühlung angewendet wurde (Herz et al., 2018b). Insgesamt wird deutlich, dass für die Entwicklung neuer und adjuvanter Behandlungsmöglichkeiten zunächst ein

besseres Verständnis der HIE-Pathophysiologie und der Wirkmechanismen einer Hypothermie essenziell ist.

1.2 Pathophysiologie der neonatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung

Wesentliche pathophysiologische Merkmale der Hirnschädigung infolge einer Hypoxie-Ischämie (HI) sind Exzitotoxizität, oxidativer Stress, Zelltod, Inflammation und Reparaturmechanismen, die trotz unterschiedlicher Zeitverläufe teilweise ineinander übergreifen (Abb. 2).

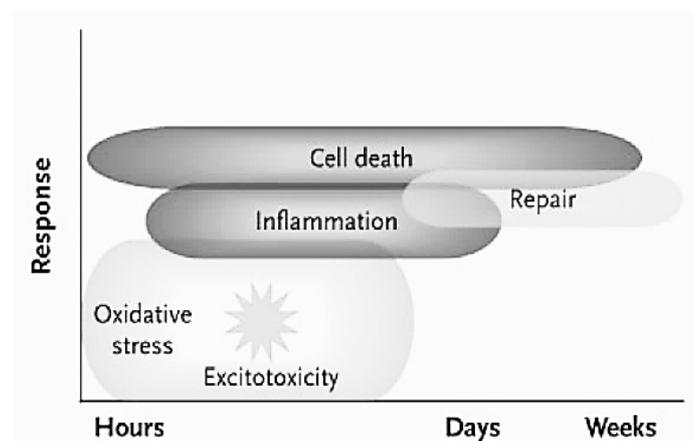


Abbildung 2: Pathophysiologische Prozesse der neonatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung im zeitlichen Verlauf. Akut bewirkt die HI oxidativen Stress, Glutamatexzitotoxizität gefolgt von apoptotischen Zelltod und Inflammation. Subakut werden jedoch auch endogene Reparaturmechanismen initiiert, die mit sekundärem Zelltod und anhaltenden Inflammationsprozessen zeitlich überlappen. Adaptiert nach (Ferriero, 2004)

Infolge des Sauerstoffmangels in der hyperakuten Phase erfolgt die Energiegewinnung durch anaerobe Stoffwechselforgänge, was insbesondere in vulnerablen Regionen mit großem Energiebedarf eine schnelle Erschöpfung der energiereichen Phosphate und somit ein primäres Energieversagen zur Folge hat (Yager et al., 1992). Das Versagen der Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Natrium/Kalium (Na^+/K^+)-Pumpe führt zu einem zytotoxischen Ödem mit Depolarisation, Freisetzung von Neurotransmittern wie Glutamat und Generierung von freien Radikalen (Lai and Yang, 2011). Die Akkumulation von Glutamat resultiert in einem massiven Kalzium-Einstrom in die Zelle (Fatemi et al., 2009), in dessen Folge Kalzium-abhängige Enzyme, wie zum Beispiel die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (*neuronal nitric oxide synthase*, nNOS)

oder die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) aktiviert werden, was in einer erhöhten Stickstoffmonoxid-Produktion und Bildung freier Radikale mündet (Bolanos and Almeida, 1999; Ferriero et al., 1996; Lafemina et al., 2006). Während der Reperfusion kommt es zu einem starken Anstieg des Sauerstoffgehalts, wodurch die Kapazität der Mitochondrien zur Reduktion von O_2 zu H_2O überschritten wird und weitere Superoxidanionen entstehen. Das neonatale Gehirn ist im Vergleich zum adulten Gehirn besonders anfällig für die Schädigung durch freie Radikale. Das liegt unter anderem an einem unreifen antioxidativen Schutzsystem (z.B. reduzierte Gluthathionperoxidaseaktivität) und hohen Eisenkonzentrationen, die zur weiteren Bildung von freien Radikalen führen (Blomgren and Hagberg, 2006; Ferriero, 2001). Obwohl während der Reperfusion die Funktion vieler primär beeinträchtigter Zellen wieder aufgenommen wird, kommt es im Verlauf zu einem zweiten Energieversagen in der sekundären Phase, die unter anderem durch mitochondriale Dysfunktion, veränderte Rezeptoraktivitäten, Apoptose und inflammatorische Ereignisse gekennzeichnet ist (Thornton et al., 2017). Die sekundäre Phase tritt bei einem betroffenen neugeborenen Kind etwa 6-15 Stunden nach der Geburt ein und dauert über mehrere Tage an (Douglas-Escobar and Weiss, 2015). Auch im Tiermodell wurde dieses biphasische Muster des Energieversagens nach HI beschrieben und verifiziert (Lorek et al., 1994; Vannucci et al., 2004). Der resultierende sekundäre Zelltod ist Folge des Zusammenspiels verschiedener pathologischer Prozesse, die vor allem inflammatorische Prozesse involvieren (Gunn and Thoresen, 2015). Zunächst werden die residenten Immunzellen des Gehirns, die Mikrogliazellen aktiviert, gefolgt von einer erhöhten endothelialen Aktivierung und peripheren Immunzellinfiltration (Herz et al., 2022; Ziemka-Nalecz et al., 2017)

1.3 Protektive Mechanismen der Hypothermie

Für die protektive Wirkung der Hypothermie (HT) wird angenommen, dass der schützende Effekt nicht auf einen bestimmten Faktor reduziert werden kann, sondern auf eine multimodale Beeinflussung unterschiedlicher Schädigungsparameter zurückzuführen ist (Yenari and Han, 2012). Protektive

Mechanismen in der akuten Phase werden vor allem auf die Hemmung des Stoffwechsels zurückgeführt. So wird der zerebrale Metabolismus pro Grad Celsius um 5-10 % reduziert (Laptook et al., 1995; Schmitt et al., 2014), was eine Schonung energiereicher Phosphatverbindungen bewirkt und dementsprechend pathologische Folgeprozesse, wie die unkontrollierte Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren (Nakashima and Todd, 1996a, b) und die Entstehung von freien Radikalen eingeschränkt (McManus et al., 2004; Schmitt et al., 2014). Der Einfluss einer HT auf den Energieumsatz allein kann die positive Wirkung jedoch nicht erklären, da das Ausmaß der Neuroprotektion nicht proportional mit dem Temperaturabfall zunimmt (Yenari und Han, 2012). Im Rahmen der Hypothermie werden zusätzlich Kälteschockproteine, wie zum Beispiel das RNA-bindende modifizierende Protein 3 (RBM3) induziert, für das anti-apoptotische Funktionen beschrieben wurden (Tong et al., 2013) So reduzierte eine siRNA (*small interfering Ribonukleinsäure*) -vermittelte spezifische RBM3-Blockade die neuroprotektiven Effekte der Hypothermie signifikant (Chip et al., 2011). Während diese Arbeiten auf einen akuten protektiven Effekt hindeuten, gibt es Hinweise, dass eine HT lediglich die Schädigungskaskaden verzögert (Trescher et al., 1997).

In der Gesamtschau publizierter Studien zum neuroprotektiven Effekt einer HT erfolgte die Analyse zumeist zu einem subakuten Zeitpunkt, d.h. 7 Tage nach HI (Carlsson et al., 2012; Reinboth et al., 2016; Sabir et al., 2012; Wood et al., 2016; Xiong et al., 2011a) während Untersuchungen zu Effekten auf den direkten Zelltod bislang diskrepante Ergebnisse lieferten (Klofers et al., 2017; Lafuente et al., 2016; Shah et al., 2021; Xiong et al., 2013). Einerseits wurde im Ratten- und Schweinmodell eine Reduktion der Anzahl apoptotischer Zellen 6 Stunden nach HI beschrieben (Lafuente et al., 2016; Shah et al., 2021). Vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe im HI-Modell der Ratte zeigten dagegen, dass eine alleinige Hypothermie die Gewebeschädigung 48 Stunden nach HI nicht signifikant reduzierte (Klofers et al., 2017). Diese präklinischen Untersuchungen unterstreichen, dass die HT vermutlich nicht allein durch Reduktion des Metabolismus in der akuten Phase ihre Effekte vermittelt, sondern auch auf sekundäre Pathomechanismen Einfluss nehmen könnte, um ihr

protektives Potenzial zu späteren Zeitpunkten, z.B. 7 Tage nach HI voll zu entfalten. Zur Klärung dieser Frage sind systematische Zeitverlaufsanalysen in ein und demselben Modell unabdingbar.

Wesentliches Kennzeichen in der neonatalen HIE-Pathophysiologie ist die HI-induzierte Neuroinflammation, die innerhalb weniger Stunden nach Insult induziert wird und bis lange in die subakute Phase anhält (Abb. 2). Neben anti-apoptischen Mechanismen stellt die Modulation neuroinflammatorischer Reaktionen einen wichtigen Wirkmechanismus der Hypothermie dar. Im adulten Schlaganfallmodell wurde gezeigt, dass die HT die Expression pro-inflammatorischer Zytokine (Zhang et al., 2008), die Blut-Hirnschranken-Schädigung (Huang et al., 1999), die Expression des Adhäsionsmoleküls *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1) (Choi et al., 2011; Deng et al., 2003; Wang et al., 2002) sowie die Infiltration peripherer Immunzellen in das Gehirn reduziert (Wang et al., 2002). Im Modell der neonatalen HIE wurde in ähnlicher Weise eine anti-inflammatorische Wirkung der HT beschrieben, wie z.B. die Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrose-Faktor- α (TNF α), eine verminderte Expression des Adhäsionsmoleküls *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) und eine geringere Infiltration peripherer Leukozyten 7 Tage nach HI (Herz et al., 2018b). Hier bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass die anti-inflammatorische Gewebeumgebung infolge einer HT vermutlich eine Reduktion der protektiven Wirkung einer zusätzlichen Stammzelltherapie bewirkt (Herz et al., 2018b). Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass ein besseres Verständnis der zeitlichen Auflösung der anti-inflammatorischen Wirkung einer HT essenziell ist, um den optimalen Zeitpunkt adjuvanter Therapien zu definieren. Neben inhibierenden Effekten auf die pro-inflammatorische Zytokinexpression, die endotheliale Aktivierung und die Leukozyteninfiltration wurde bereits mehrfach ein Zusammenhang zwischen dem neuroprotektiven Effekt der HT und einem hemmenden Effekt auf Mikrogliazellen hergestellt (Cikla et al., 2016; Davidson et al., 2016; Fukui et al., 2006; Koo et al., 2017). Andererseits führte eine Hypothermie in mikroglialen Zellkulturen neonataler Ratten zu einer reduzierten Produktion von neuroprotektivem IL-10 nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) (Matsui and Kakeda, 2008),

sodass die Hypothermie-Behandlung heterogene Einflüsse auf Mikrogliazellen zu haben scheint.

1.4 Rolle myeloider Zellen in neonataler HI

Zur Gruppe der myeloiden Zellen des ZNS zählen unter physiologischen Bedingungen parenchymale Mikroglia, perivaskuläre und meningeale Makrophagen und hämatogene Monozyten (Prinz et al., 2011). Derzeit wird davon ausgegangen, dass Mikroglia sich in der Embryonalperiode aus primitiven Makrophagen entwickeln, die aus dem Dottersack auswandern (Ginhoux et al., 2010). Unter bestimmten pathologischen Umständen können zirkulierende Monozyten in das ZNS infiltrieren und zu morphologisch Mikroglia-ähnlichen Zellen transformieren; wenngleich noch unklar ist, ob es sich hierbei um echte Mikroglia handelt (Nayak et al., 2014). Zu den Aufgaben der myeloiden Zellen im zentralen Nervensystem (ZNS) gehört die Phagozytose von Antigen-Antikörper-Komplexen, die Antigenpräsentation, die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen und die Destruktion von in das ZNS eingedrungenen Mikroorganismen, zum Beispiel durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen. Auch in der Geweberegeneration spielen myeloide Zellen eine entscheidende Rolle; zum Beispiel durch den Abbau von Zellresten und geschädigten neuronalen Synapsen (van Rossum and Hanisch, 2004).

Infolge einer ischämischen Hirnschädigung werden Mikroglia über die Bindung von DAMPs (*danger associated molecular pattern molecules*) an sogenannte *Pattern-Recognition-Rezeptoren*, wie z.B. *Toll-like-Rezeptoren* aktiviert (Gulke et al., 2018). Infolgedessen setzen sie pro-inflammatorische und neurotoxische Mediatoren wie Glutamat, Chemokine, Zytokine (TNF α , IL-1 β , IL-6, etc.) und reaktive Sauerstoffspezies frei (Li et al., 2017). Darüber hinaus bewirkt die erhöhte Menge an Zytokinen, wie z.B. IL-1 β und TNF α eine endotheliale Aktivierung, die sich in einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen äußert und die Infiltration von peripheren Immunzellen in das Parenchym fördert (Bona et al., 1999; Liu and McCullough, 2013). Zu den infiltrierenden Leukozyten gehören in der frühen Phase vor allem myeloide Zellen (z.B. Neutrophile, Makrophagen und Monozyten) (Herz et al., 2022; Palmer et al., 2004; Smith et

al., 2018). Sowohl peripher zirkulierende myeloide Zellen als auch Mikroglia exprimieren *Cluster of Differentiation* (CD) 11b auf ihrer Oberfläche, was eine Unterscheidung zwischen residenten Zellen und peripher infiltrierten myeloiden Zellen erschwert. Eine Möglichkeit der Unterscheidung ist jedoch die Expression des Antigens CD45, das auf residenten Mikroglia schwächer exprimiert wird als auf peripheren Leukozyten (Bedard et al., 2007; Sedgwick et al., 1991). Sowohl für Mikroglia als auch für aus dem Blut infiltrierte myeloide Zellen mehren sich die Hinweise, dass die von ihnen ausgehenden inflammatorischen Prozesse zu einer Progression der HI-induzierten Gewebeschädigung führen (Vexler and Yenari, 2009; Wang et al., 2007). So bewirkte beispielsweise eine Depletion myeloider Zellen zumindest im männlichen Geschlecht eine signifikante Verbesserung der Hirnschädigung (Smith et al., 2018). Demgegenüber stehen jedoch Arbeiten, die auf eine protektive Rolle myeloider Zellen, v.a. von Mikroglia, in der neonatalen HI hindeuten, da eine genetische Depletion der Mikroglia zu einer Verstärkung der Schädigung führte (Tsuji et al., 2020). Wenngleich die zugrundeliegenden Mechanismen der unterschiedlichen Wirkweisen vielfältig sind, so scheint die enorme Plastizität myeloider Zellen ein wesentlicher Faktor zu sein, denn myeloide Zellen können in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen in unterschiedliche Zelltypen polarisieren.

1.5 Myeloide Zellpolarisierung nach neonataler HI

Sowohl Makrophagen als auch Mikroglia können in Abhängigkeit von der Schädigung, Gewebeumgebung und Zeitpunkt unterschiedliche Funktionen einnehmen (Hu et al., 2015; Martinez et al., 2008). Dabei lassen sich zwei Hauptgruppen unterscheiden: Der klassische, pro-inflammatorische M1-Phänotyp, der mit neurotoxischen Effekten assoziiert ist und der alternative, neuroprotektive und -regenerative M2-Phänotyp (Abb. 3). *In vitro* Arbeiten belegten, dass der M1-Typ über Inkubation mit pro-inflammatorischen Zytokinen (z.B. Interferon (IFN)- γ) oder LPS induziert werden kann (Chhor et al., 2013; Hu et al., 2015) während der M2-Phänotyp vor allem durch Inkubation mit anti-inflammatorischen Zytokinen (wie z.B. IL-10) induziert wird (Chhor et al., 2013). Generell wird davon ausgegangen, dass M1-Zellen zu einer Exazerbation der

Entzündung und Gewebeschädigung führen, während Makrophagen bzw. Mikroglia des neuroregenerativen M2-Phänotyps protektiv wirken und Neurogenese, axonale Remodellierung, Angiogenese, Oligodendrogenese und Remyelinisierung fördern können (Abb. 3) (Hu et al., 2015). Neuere therapeutische Ansätze zielen deshalb auf die Regulation des Gleichgewichtes zwischen den beiden Phänotypen ab und nicht auf die komplette Suppression oder Depletion der Mikroglia und Makrophagen. So wurde im adulten Modell des Schlaganfalls gezeigt, dass die Injektion der microRNA-124, die die Polarisierung von Mikroglia und Makrophagen zum M2-Phänotyp induziert, ein verbessertes neuronales Überleben sowie eine verbesserte funktionelle Erholung bewirkte (Hamzei Taj et al., 2016). Auch im neonatalen Modell zeigten *in vivo* Versuche, Zellen in Richtung des M2-Phänotyps zu polarisieren, z.B. durch L-Cystein-abgeleitet H₂S oder durch von MSZ sekretierte extrazelluläre Vesikel, einen protektiven Effekt (Xin et al., 2020; Zhou et al., 2019). Unklar ist jedoch, inwiefern die obligate Standardtherapie HT Einfluss auf die myeloide Zellpolarisierung nimmt und somit einen möglichen Effektormechanismus der Hypothermie darstellt. Die unterschiedlichen myeloiden Zelltypen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Funktion, sondern auch in ihrem molekularen Profil. So werden der pro-inflammatorischen, klassischen M1 Aktivierung verschiedene pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine, wie IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-23, *C-X-C motif chemokine ligand 1* (CXCL-1) und *CC-chemokine ligand 2* (CCL-2), Enzyme wie z.B. die Cyclooxygenase 2 (Cox-2) und die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) sowie das kostimulatorische Molekül CD86 zugeordnet (Abb. 3, Tabelle 16 im Anhang). Dem alternativen, regenerativen M2-Zelltyp werden vor allem anti-inflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-10, *Transforming Growth Factor* (TGF)- β und IL-4, der Mannoserezeptor CD206, das Enzym Arginase-1 und die Moleküle *Resistin like Alpha* (Fizz-1) und *Chitinase-like protein 3* (YM-1) zugeordnet (Abb. 3, Tabelle 16 im Anhang). Zwei weitere Moleküle, die im Zusammenhang mit dem M1/M2 Phänotyp häufig diskutiert werden, sind Galectin-3 und *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS-3), die basierend auf der derzeitigen Literatur weder dem M1- noch dem M2- Phänotyp eindeutig zugeordnet werden können und daher als immunmodulatorische

Marker beschrieben werden (Chhor et al., 2017; Hellstrom Erkenstam et al., 2016).

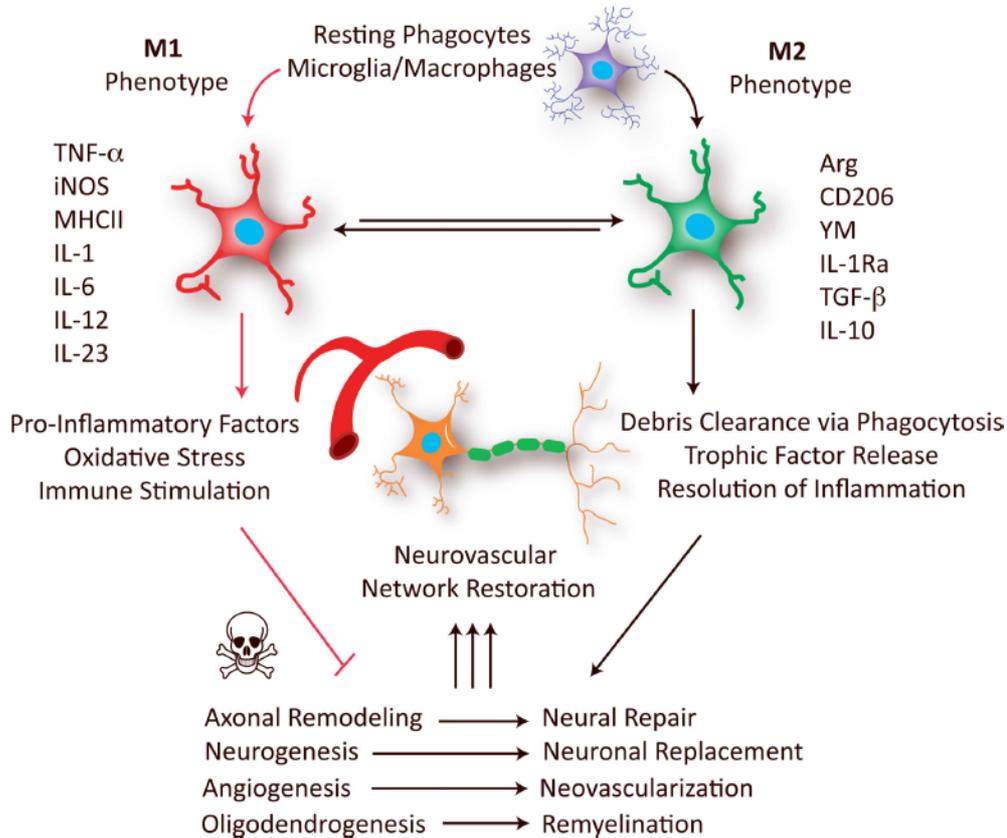


Abbildung 3: Rolle der myeloiden Zellpolarisation in der Wiederherstellung des neurovaskulären Netzwerks nach ischämischer und anderen ZNS-Schädigungen. Der pro-inflammatorische M1 Phänotyp ist mit neurotoxischen Effekten assoziiert, z.B. über die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Induktion von oxidativem Stress. Der M2 Phänotyp hingegen fördert die Neuroprotektion und -regeneration, z.B. über die Freisetzung von anti-inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Abbildung aus (Hu et al., 2015)

Nach ausführlicher Literaturrecherche ist festzustellen, dass die Datenlage zur Expression und Funktion diverser Moleküle, v.a. für die gewählten M2 und immunmodulatorischen Moleküle in der neonatalen HI limitiert ist (Tabelle 16 im Anhang). Zudem beschränkte sich ein Großteil der Studien auf Expressionsanalysen in Gewebelysaten des gesamten Gehirns (Tabelle 16 im Anhang), was eine Aussage über die Polarisierung myeloider Zellen erschwert, da viele der aufgeführten Moleküle auch von anderen ZNS-Zellen, wie z.B. Astrozyten, exprimiert werden. Darüber hinaus sollte berücksichtigt werden, dass das strikte Konzept der M1/M2 Polarisierung zunehmend in Frage gestellt wird

(Ransohoff, 2016). Dies wird vor allem durch *in vivo* Analysen gestützt. So kommt es im Modell des adulten Schlaganfalls zu einer frühen Induktion der mRNA-Expression von Molekülen sowohl des M1- als auch des M2-Phänotyps (Zarruk et al., 2012). Auch im Modell der neonatalen HIE wurde eine Hochregulation sowohl von pro-inflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF α und IL-1 β) als auch von M2-Molekülen (z.B. YM-1, Arg-1) 7 Tage nach HI beobachtet (Kaminski et al., 2020). Zudem wurde gleichzeitig eine Reduktion der M1-Enzyme Cox-2 und iNOS im Vergleich zu Kontroll-Tieren detektiert. Wenngleich diese Daten unterstreichen, dass das strikte M1/M2-Konzept aus *in vitro* Analysen nur bedingt auf die *in vivo* Situation übertragen werden kann, so bleibt zu berücksichtigen, dass lediglich ein Zeitpunkt (7 Tage nach HI) und das gesamte Gewebelysate analysiert wurde. Eine zellspezifische Analyse im Zeitverlauf erfolgte durch Hellström-Erkenstam et al. an drei verschiedenen Zeitpunkten, Tag 1, 3 und 7 nach HI. Mittels durchflusszytomtrischer Analysen wurde der Anteil CD86 positiver klassisch aktivierter und CD206 positiver alternativ aktivierter myeloider Zellen ermittelt. Insgesamt zeigte sich nach einer Hypoxie-Ischämie ein deutlicher Anstieg der CD11b⁺ myeloiden Zellen. Der Anteil CD86 positiver Zellen war insbesondere 24 h nach HI mit einem Anteil von 56% an den CD11b⁺ Zellen hoch und fiel an Tag 3 und 7 nach Schädigung ab. Der Anteil an CD206 positiven Zellen zeigte sich an Tag 1 nach Schädigung im Verhältnis zur kontralateralen Hemisphäre reduziert und an Tag 3 und 7 unverändert (Hellstrom Erkenstam et al., 2016).

Trotz dieser aufschlussreichen Erkenntnisse ist bislang unbekannt, inwiefern eine Hypothermie diese HI-induzierten Veränderungen im Zeitverlauf moduliert und in welchem Zusammenhang dies mit der neuroprotektiven Wirkung der HT steht. Darüber hinaus blieb in der vorgenannten Arbeit unklar, wie sich die aus dem geschädigten Gehirn isolierte CD11b⁺ Population zusammensetzte, d.h. wie hoch der Anteil peripher infiltrierter myeloider Zellen war und wie sich dieser wiederum zusammensetzte. Zum Einfluss einer Hypothermie liegt derzeit eine einzige Studie im adulten Schlaganfallmodell vor, die zeigte, dass eine chemisch induzierte Hypothermie zu einer Reduktion der M1-Marker IL-23, IL-12 und iNOS sowie zu einer Hochregulation der M2-Marker Fizz-1, YM-1 und Arginase-1 führt

(Lee et al., 2016). Wenngleich diese Daten nahelegen, dass eine HT die myeloide Zellpolarisation in Richtung M2-Phänotyp verschiebt, so bleibt zu berücksichtigen, dass erwachsene Tiere, ein anderes Ischämie-Modell und HT-Protokoll untersucht wurden. Darüber hinaus konzentrierten sich die Analysen erneut auf einen einzigen Zeitpunkt und es wurde das gesamte Gehirn lysat untersucht, d.h. zellspezifische Analysen, die Rückschlüsse auf die myeloide Zellpolarisierung zulassen, sind bislang weder in der neonatalen noch in der adulten Hirnschädigung durchgeführt worden.

1.6 Fragestellungen und Ziele

In Anbetracht der Limitationen der obligaten Hypothermie zur Behandlung Neugeborener mit hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung stellt die detaillierte Untersuchung der HIE-Pathophysiologie und der Wirkmechanismen der Hypothermie eine Grundvoraussetzung zur Optimierung und Entwicklung adjuvanter Therapien dar. Wesentliches Merkmal der HIE-Pathophysiologie sind inflammatorische Reaktionen. Trotz erster Hinweise auf eine anti-inflammatorische Wirkung der Hypothermie sind die detaillierten zellulären und molekularen Effektormechanismen der HT bislang nur unzureichend untersucht. Peripher infiltrierte myeloide Zellen und Mikroglia gehören zu den ersten zellulären Komponenten der HI-induzierten Entzündungsreaktion. Erste Studien belegten einen Zusammenhang zwischen Mikrogliaaktivierung bzw. myeloider Zellinfiltration/-polarisierung und dem Ausmaß der HI-Hirnschädigung. Bislang ist jedoch unklar, wie eine HT diese HI-induzierten Veränderungen im Zeitverlauf moduliert und in welchem Zusammenhang dies mit der neuroprotektiven Wirkung der HT steht. Da bislang größtenteils distinkte Zeitpunkte analysiert wurden, sollte in dieser Arbeit genauer untersucht werden, wann sich die HT-Wirkung am stärksten entfaltet und in welchem Zusammenhang das mit einer Modulation der Mikrogliaaktivierung im Allgemeinen und einer Veränderung der Zellpolarisation im Speziellen einhergeht.

Unter Verwendung des in der Arbeitsgruppe etablierten HIE-Modells in 9 Tage alten Mäusen mit anschließender Hypothermie bzw. Normothermie bei Kontrolltieren sollte das Schadensausmaß an Tag 1, 3 und 7 histologisch und

immunhistochemisch untersucht werden. Die Mikrogliaaktivierung wurde anhand des *Ionized calcium binding adaptor molecule 1* (Iba-1) als allgemeiner Marker myeloider Zellaktivierung sowie von CD86 als Marker für die klassische pro-inflammatorische Zellaktivierung und CD206 als Marker des neuroregenerativen M2-Phänotyps untersucht. Um die Expression eines größeren Spektrums charakteristischer M1 und M2 Moleküle zell-spezifisch zu quantifizieren, wurden im zweiten Experimentalansatz myeloide CD11b⁺ Zellen aus Gehirngewebe sortiert und anschließend mittels quantitativer *polymerase-chain-reaction* (PCR) analysiert. Die sortierten myeloiden Zellen wurden zusätzlich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Expression von CD86 und CD206 durchflusszytometrisch charakterisiert.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien und Geräte

BD FACS LSR II	BD Bioscience, USA
CCD Kamera	AxioCam ICc1, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Deckgläschen	Engelbrecht GmbH, Edermünde, Deutschland
Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskop: Axioplan mit AxioCam ICc1, Zeiss	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland
Kryostat Mikrotom HM 525	Thermo Fisher Scientific Inc., Erlangen, Deutschland
LS/MS-Stahlwollensäulen QuadroMACS und MiniMACS Separation Unit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Nanodrop 1000	peQlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
A1plus, Eclipse Ti Konfokalmikroskop	Nikon, Minato, Tokio, Japan
Objektträger: Superfrost Ultra Plus	Gerhard Menzel B.V. & Co.KG, Braunschweig, Deutschland
PapPen	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA
Plustek OpticLab H850 Gewebescanner	Plustek Technology GmbH, Ahrensburg, Deutschland
RNEasy Mini spin columns	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Rotator RM1	Elmi Ltd., Riga, Lettland
SilverFast Software	Plustek Technology GmbH, Ahrensburg, Deutschland
StepOnePlus Realtime PCR System	Applied Biosystems, Erlangen, Deutschland
Sterilbank (Herasafe)	Thermo Fisher Scientific Inc., Erlangen, Deutschland
T3 Thermocycler	Biometra, Jena, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Wärmematte	Harvard Apparatus, USA
Zentrifuge	Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
40-µm-Zellsiebe	BD Bioscience, USA
70-µm-Zellsiebe	BD Bioscience, USA

Tabelle 2: Software

BD FACS Diva Software	BD Bioscience, USA
GraphPad Prism (Version 6)	GraphPad Software, San Diego, California, USA
ImageJ Software	NIH, Bethesda, MD, USA
Microsoft Excel 2007/2010	Microsoft, Redmond, Washington, USA
NIS Analysesoftware	Nikon, Minato, Tokio, Japan
SilverFast Software	Plustek Technology GmbH, Ahrensburg, Deutschland
StepOnePlus Software	Applied Biosystems, Erlangen, Deutschland

Tabelle 3: Chemische Substanzen

4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Erlangen, Deutschland
Aceton	Otto Fischar GmbH & Co.KG, Saarbrücken, Deutschland
Aqua	B. Braun Meisungen AG, Meisungen, Deutschland
Bovine Serum Albumine (BSA), Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Buprenorphin	Indivior Europe Limited, Dublin, Irland
Chloralhydrat	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dako Fluoreszenz Mounting Medium	Dako, Waldbronn, Deutschland
Dinatriumdihydrogenphosphat (NA ₂ HPO ₄)	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Donkey Serum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
EDTA (25mM)	Invitrogen, Erlangen, Deutschland
Entellan	ORSAtec GmbH, Bobingen, Deutschland
Ethanol, rein	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, vergällt	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Gelatin from Cold Water Fish Skin (FSG)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isofluran	Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

Isopentan	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kresylviolett	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Normal Goat Serum (NGS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Paraffin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Percoll	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Propidiumiodid-Solution (1 mg/ml in H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sucrose	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, Deutschland
Taqman Fast Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., Erlangen, Deutschland
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tri-Sodium Citrate	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton-X-100	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Xylol	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 4: Lösungen, Puffer und Medien

10 x phosphate buffered saline (PBS)	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 12 mM Gesamtphosphat ($\text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4$), pH 7,4
10 x Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-buffered saline (TBS))	0,1 M Tris-HCl; 3 M NaCl, pH 7,4
DAPI-Lösung	1 µg/ml in PBS
DPBS w/o Mg/Ca	PanBiotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
EDTA (25 mM)	Invitrogen, Erlangen, Deutschland
HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)	Gibco, Thermofisher, Erlangen, Deutschland
HEPES Puffer (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfon-Säure)	Gibco, Thermofisher, Erlangen, Deutschland
HEPES-gepuffertes RPMI1640	1% HEPES in 1640 RPMI Medium
IHC Blockierungslösung	20 ml 1x TBS, 2 g BSA, 3 g FSG, 1 ml Tween 20
Kresylviolett	1% in Aqua Dest.
MACS Puffer	0,5% BSA in DPBS w/o Mg/Ca
Paraformaldehydlösung	4% Paraformaldehyd in PBS, pH = 7,4
PBS-0,2% Tween	0,2% Tween 20 in PBS
RPMI 1640 Medium	Gibco, Thermofisher, Erlangen, Deutschland
Sucroslösung	30% Sucrose in H_2O
TBS-T	1% Tween 20 in TBS
Zitrat-Puffer	10mM Natriumcitrat; 0,05% Tween 20; pH=6

Tabelle 5: Kits

Neural Tissue Dissociation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
RNEasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
TUNEL-Kit (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Tabelle 6: Reaktionsmixe

DNase I Reaktion	1 µl RNA (1 µg/ml) 1 µl DNase I (1 U/ml) 1 µl 10x DNase I Reaction Buffer 7 µl H ₂ O	Invitrogen, Erlangen, Deutschland
RT – Reaktionsmix II	4 µl 5x First Strand Buffer 2 µl 0,1M DTT 1 µl SuperScript II (200 U/µl) 3 µl H ₂ O	Invitrogen, Erlangen, Deutschland
RT-Reaktionsmix I	5 µl DNase I Reaktion (500 ng RNA) 1 µl Oligo dT (500 ng/µl) 1 µl Random Primer (250 ng/µl) 1 µl 10 mM dNTP 2 µl H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland; Invitrogen, Erlangen, Deutschland

Tabelle 7: Magnetische Beads

CD11b MicroBeads, mouse/human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch
Myelin Removal Beads	Gladbach, Deutschland

Tabelle 8: Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Klonalität	Spezifität	Verdünnungen
Arginase	GenTex	polyclonal	Rabbit anti mouse/rat/human	1:100, 1:200, 1:500, 1:1000
Arginase	Novus	polyclonal	Goat anti-mouse/rat	1:20, 1:50, 1:100
CD86	eBioscience	monoclonal (clone: GL 1)	Rat anti-mouse	1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200
*CD11b PE-Cy7	ebiosciences	monoclonal (clone: M1/70)	Rat anti-mouse	1:800
CD206	R&D Systems	polyclonal	Goat anti-mouse	1:50, 1:100, 1:200
*CD206 eFluor 450	Biolegend	monoclonal (clone: MR6F3)	Rat anti-mouse	1:50

*CD45 Alexa Fluor 700	BD Pharmingen	monoclonal (clone: 30-F11)	Rat anti-mouse	1:200
CD86	Abcam	monoclonal (clone: GL-1)	Rat anti-mouse	1:100, 1:200, 1:500
*CD86 PE	BD Pharmingen	monoclonal (clone: GL1)	Rat anti-mouse	1:800
Cox-2	CellSignaling	monoclonal (clone: D5H5)	Rabbit anti – mouse/rat/human	1:100, 1:200, 1:500
Iba-1	Wako	polyclonal	Rabbit anti- mouse/rat/human	1:500, 1:1000, 1:2000
Iba-1	GeneTex	monoclonal (clone: GT10312)	Mouse anti- mouse/human	1:100, 1:500, 1:1000
iNOS	Novus	polyclonal	Rabbit anti- mouse/rat/human	1:10, 1:20, 1:50
iNOS	Abcam	monoclonal (clone: NOS-IN)	Mouse anti- mouse/rat	1:50, 1:100, 1:200
*Ly6G Fitc	BD Pharmingen	monoclonal (clone: 1A8)	Rat anti-mouse	1:100
NeuN	Millipore	polyclonal	Rabbit anti- mouse	1:500
YM-1	Abcam	polyclonal	Rabbit anti- mouse/rat	1:100, 1:200, 1:500

**Diese Antikörper wurden für durchflusszytometrische Analysen verwendet, alle anderen für immunhistochemische Untersuchungen.*

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezifität	Subtyp	Verdünnung
Alexa Fluor 405	Goat anti-rabbit	IgG	1:200, 1:500
Alexa Fluor 488	Goat anti-rat	IgG	1:500
Alexa Fluor 488	Goat anti-mouse	IgG	1:500
Alexa Fluor 488	Donkey anti-rat	IgG	1:500
Alexa Fluor 488	Donkey anti-goat	IgG	1:500
Alexa Fluor 594	Donkey anti-rat	IgG	1:500
Alexa Fluor 594	Donkey anti-goat	IgG	1:500
Alexa Fluor 594	Goat anti-rabbit	IgG	1:500
Alexa Fluor 594	Goat anti-mouse	IgG	1:500

Tabelle 10: Primer und Sonden

Abkürzung	Genname	Assay-Nr.
Act- β	Beta-Aktin	Mm02619580_g1
Arg-1	Arginase, Liver	Mm00475988_m1
B2M	Beta-2-Mikroglobulin	Mm00437762_m1
CCL-2	Chemokine (C-C motif) Ligand 2	Mm00441242_m1
CD 86	CD86 Antigen	Mm00444543_m1
CD206	Mannose Rezeptor C, Typ 1	Mm01329362_m1
Cox-2	Cytochrom C Oxidase Subunit II	Mm03294838_g1
CXCL-1	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1	Mm04207460_m1
Fizz-1	Resistin like Alpha	Mm00445109_m1
Gal-3	Lectin, Galactose binding, soluble 3	Mm00802901_m1
GAPDH	GAPDH	Mm99999915_g1
IL-10	Interleukin 10	Mm01288386_m1
IL-12	Interleukin 12a	Mm00434169_m1
IL-18	Interleukin 18	Mm00434226_m1
IL-1 β	Interleukin 1 beta	Mm00434228_m1
IL-23	Interleukin 23, alpha subunit p19	Mm00518984_m1
IL-4	Interleukin 4	Mm00445259_m1
IL-6	Interleukin 6	Mm00446190_m1
iNOS	Induzierbare NO-Synthase 2	Mm00440502_m1
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3	Mm01249143_g1
TGF- β	Transforming growth factor, beta 1	Mm01178820_m1
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha	Mm00443258_m1
YM-1	Chitinase-like 3	Mm00657889_mH

Die aufgeführten Primer und Sonden wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Erlangen, Deutschland) bezogen (Assay on demand).

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

Alle Tierexperimente wurden gemäß der ARRIVE-Richtlinien und der Richtlinien der „National Institutes of Health“ (NIH) für die Pflege und Verwendung von Versuchstieren durchgeführt. Die behördliche Genehmigung erfolgte durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen. Die C57BL/6 Mäuse wurden initial von Charles River bezogen und anschließend in der tierexperimentellen Einheit des Universitätsklinikums Essen gezüchtet. Die Tiere wurden in einem Hell-Dunkel-Verhältnis von 12 h zu 12 h gehalten und erhielten Futter und Wasser ad libitum.

2.2.2 Experimentelles Modell

Zur Induktion des neonatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens wurde das initial in Ratten etablierte und mittlerweile an die Maus adaptierte Rice-Vannucci Modell verwendet (John E. Rice, 1981; Reinboth et al., 2016). Es wurden 9 Tage alte C57BL/6 Mäuse verwendet. Zu diesem Zeitpunkt entspricht der Reifezustand des Gehirns dem eines reifen menschlichen Neugeborenen (Semple et al., 2013). Der operative Eingriff wurde von PD Dr. Josephine Herz durchgeführt. Es wurden weibliche und männliche Tiere verwendet, die Aufteilung der Versuchstiere erfolgte randomisiert in 3 Gruppen: Sham (Schein-operierte Tiere), HI + Normothermie (NT) und HI + Hypothermie (HT). Die Mäuse wurden zunächst mit Isofluran (4% für die Einleitung, 1,5% zur Aufrechthaltung) anästhesiert. Unter einem Stereomikroskop erfolgte ein Halsschnitt mit Kauterisierung der rechten *Arteria carotis communis* (ACC). Die Tiere, die der Sham-Gruppe angehörten, erhielten lediglich eine Narkose und einen Halsschnitt ohne Kauterisierung der ACC. Perioperativ erfolgt eine Analgesie über die subkutane Verabreichung von 0,1 mg/kg Buprenorphin. Nach Beendigung der Operation und Wundverschluss wurden die Tiere zum Muttertier für eine Zeitdauer von 60 min zurückgesetzt. Im Anschluss erfolgte eine Hypoxie mit 10% Sauerstoff für 60 min. Zur Aufrechterhaltung der physiologischen Körpertemperatur ($T_{\text{rektal}}=35^{\circ}\text{C}$) während der Hypoxie wurden die Jungtiere auf eine Wärmematte platziert (Reinboth et al., 2016). Basierend auf dem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll erfolgte die Hypothermie direkt im Anschluss an die Hypoxie (Reinboth et al., 2016). Dazu wurden die Jungtiere der HT-Gruppe vereinzelt auf einer Hypothermie-Platte platziert und erhielten eine Kühlung für 4 h bei einer Rektaltemperatur von 32°C . Die Temperaturregulation der Hypothermieplatte erfolgte über eine Wasserkreislaufpumpe. Die Kontrollgruppe erhielt für die gleiche Zeit eine Normothermie ($T_{\text{rektal}}=35^{\circ}\text{C}$) auf einer Wärmematte (Carlsson et al., 2012; Reinboth et al., 2016). Schein-operierte Tiere verblieben beim Muttertier.

2.2.3 Histologie

2.2.3.1 Gewebeaufarbeitung

Zur Etablierung immunhistochemischer Färbungen wurden zunächst unterschiedliche Gewebeaufarbeitungen gegeneinander verglichen: 1) Perfusion mit PBS (Tabelle 4) und Schockfrierung auf Trockeneis (Kryo-PBS), 2) Perfusionsfixation mit 4% PFA (Tabelle 3) gefolgt von Entwässerung und Einfrieren (Kryo-PFA) 3) Perfusionsfixation mit 4% PFA gefolgt von Einbettung in Paraffin (Tabelle 3).

Zunächst wurden die Tiere mit einer Überdosis Chloralhydrat (Tabelle 3) anästhesiert und anschließend über einen medianen Bauchschnitt der Bauchraum eröffnet. Die Perfusion erfolgte in den linken Ventrikel mit 10 ml eiskaltem PBS. Für die Bedingungen Kryo-PFA und Paraffin erfolgte anschließend eine transkardiale Perfusion mit 10 ml 4% PFA. Für die Entnahme der Gehirne wurde zunächst das Fell von dorsal nach ventral entfernt. Mit einer Mikroschere erfolgte die Eröffnung des Kraniums ebenfalls von dorsal nach ventral, zusätzlich zu dem medianen Schnitt erfolgten zwei seitliche Schnitte zwischen Groß- und Kleinhirn. Nach Kraniotomie wurde das Gehirn mithilfe eines Spatels entnommen und das Cerebellum mit einer Rasierklinge vom Großhirn getrennt. Für die Kryo-PBS-Bedingung wurden die Gehirngewebe anschließend auf Trockeneis schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Für die Bedingungen Kryo-PFA und Paraffin erfolgte eine Lagerung in 4% PFA bei 4°C über Nacht. Anschließend wurden die Gewebe der Kryo-PFA-Bedingung in 30% Sucrose (Tabelle 3) zur Entwässerung überführt. Nach vollständiger Entwässerung erfolgte das Einfrieren durch das Überführen in auf Trockeneis gekühltem Isopentan (Tabelle 3). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Gewebe bei -80°C gelagert. Für die Bedingung Paraffin wurden die Gewebe in Einbettkassetten überführt. Die anschließende Paraffin-Einbettung der Gewebe erfolgte durch das zentrale Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Essen.

2.2.3.2 Herstellung der Gewebeschnitte

Die nativen und PFA-Perfusions-fixierten Kryo-konservierten Hirngewebe wurden mithilfe eines Kryostats in 20 µm dicke Schnitte bei -20°C (Kryo-PBS) bzw. -30°C (Kryo-PFA) geschnitten. Anschließend erfolgte die Lagerung der Schnitte bis zur Färbung bei -80° Celsius. Die ausgekühlten Paraffinblöcke wurden mithilfe eines Schlitten-Mikrotoms in 10 µm dicke Schnitte geschnitten. Für alle Bedingungen wurden pro Objektträger je 4 Schnitte aufgezogen.

2.2.3.3 Kresylviolett-Färbung und histologische Evaluation der strukturellen Gewebeschädigung

Jeder fünfte Objektträger wurde mithilfe einer Kresylviolett-Färbung (Tabelle 3) angefärbt, um zum einen eine Orientierung zwischen den Schnittebenen zu ermöglichen und zum anderen die HI-induzierte Gewebeatrophie (Tag 3 und 7 nach HI) bzw. Ödembildung (Tag 1 nach HI) sowie neuropathologische Veränderungen zu evaluieren. Die basophile Kresylviolettfärbung färbt Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ansammlungen von rauem endoplasmatischem Retikulum in intakten Neuronen an, die als Nissl-Schollen sichtbar werden (Pilati et al., 2008). Für die Kresyl-Violett-Färbung wurden die Schnitte zunächst bei 37°C und anschließend bei Raumtemperatur aufgetaut und für 2 min in 1% Kresylviolett-Lösung eingetaucht. Nach mehrmaligem Eintauchen in Aqua Dest. erfolgte die Differenzierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70% / 96% / 96% / 100%) (Tabelle 3). Danach wurden die Schnitte für mindestens 2 min in Xylol belassen, bevor sie mit Entellan (Tabelle 3) eingedeckt wurden. Die gefärbten Objektträger wurden im Anschluss bei Raumtemperatur gelagert

2.2.3.4 Atrophie-Bestimmung

Anhand der Kresylviolett-gefärbten Schnitte erfolgte die Bestimmung der Atrophie bzw. Ödembildung. Hierfür wurden für jedes Tier je 2 Kresylviolett-gefärbte Schnitte in der Ebene des Hippocampus (Bregma -1,95 mm) mittels Gewebescanner digitalisiert. Die Flächen des intakten Hirnparenchyms der ipsi- und kontralateralen Gesamthemisphären sowie der einzelnen Regionen (Cortex,

Hippocampus, Thalamus) wurden mit dem Programm Image J (Tabelle 2) gemessen und pro Tier der Mittelwert bestimmt. Der ipsilaterale Gewebeverlust bzw. die Ödembildung der Hirnhälften und der einzelnen Regionen wurden mittels folgender Gleichung im Verhältnis zu den kontralateralen Flächen ermittelt:

$$\% \text{ Gewebeverlust bzw. -zunahme} = 100 - \left(\frac{\text{Fläche ipsilateral}}{\text{Fläche contralateral}} \right) \times 100$$

2.2.3.5 Neuropathologische Evaluation des Schadensausmaßes

Die Evaluierung des Gewebes Schadens erfolgte nach einem zuvor beschriebenen neuropathologischen Punktesystem (Reinboth et al., 2016; Schlager et al., 2011; Sheldon et al., 1998), bei dem lichtmikroskopisch strukturelle und zelluläre Veränderungen in spezifischen Regionen des Hirnparenchyms der geschädigten Hirnhälfte bewertet werden. In Kresylviolett-gefärbten Schnitten wurden folgende Regionen in 3 Ebenen (Ebene des Striatums (Bregma +0,2 mm bis +0,3 mm), Ebene des Hippocampus (Bregma -1,9 mm bis -2,0 mm) und Ebene des posterioren Cortex (Bregma -2,8 mm bis -2,9 mm) untersucht: Cortex in allen 3 Ebenen; Hippocampus und Thalamus in der Hippocampusebene; sowie das Striatum in der Striatumebene. Jeder Region wurde anhand definierter Kriterien der Schadensausprägung eine Punktzahl (Score) von 0-3 zugeordnet. Die Kriterien der Schadensausprägung sind der folgenden Auflistung zu entnehmen:

- | | |
|----------|---|
| 0 Punkte | Kein erkennbarer Zellverlust |
| 1 Punkt | Kleine fokale Regionen mit neuronalem Zellverlust; geringe Größenzunahme des Ventrikels auf der striatalen Ebene, 10-40% Infarktareal (1 Tag nach HI) |
| 2 Punkte | Säulenartige Schädigung im kortikalen Bereich, moderater Zellverlust im Hippocampus, mittlere Größenzunahme des Ventrikels, 40-60% Infarktareal (1 Tag nach HI) |
| 3 Punkte | Zystische Veränderungen und Gliose, starke Größenzunahme des Ventrikels, 60-100% Infarktareal (1 Tag nach HI) |

Die kontralaterale Hemisphäre diente hierbei als Referenz für intaktes Gewebe. Quantitative Gruppenvergleiche wurden für die berechneten Gesamtpunktzahlen aller Regionen (Maximalwert 27) durchgeführt.

2.2.4 Immunhistochemie

In der Immunhistochemie werden bestimmte Antigene durch eine Antigen-Antikörper-Bindung sichtbar gemacht. Bei der hier verwendeten indirekten Immunhistochemie wurde die Bindung des spezifischen Primär-Antikörpers an das Antigen durch Zugabe eines Fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörpers sichtbar gemacht. Für alle Färbungen wurden Negativkontrollen mitgeführt, in denen ausschließlich der Zweit-Antikörper ohne Erst-Antikörper aufgetragen wurde. Alle immunhistochemischen Färbungen erfolgten in der Schnittebene des Hippocampus (-1,90 mm –2 mm von Bregma), da in dieser Ebene das größte Ausmaß der HI-induzierten Gewebeschädigung zu erwarten war (Reinboth et al., 2016).

2.2.4.1 Etablierung immunhistochemischer Färbungen für die Analyse typischer M1 und M2 Marker

Schnitte der Kryo-PBS- und Kryo-PFA-Bedingung wurden zunächst für 15 min aufgetaut. Für Paraffin-Schnitte erfolgte eine Entparaffinisierung mithilfe von Xylol (Tabelle 3) und einer absteigenden Alkoholreihe von 100% / 70% / 50%. Die Antigen-Demaskierung wurde durch eine Inkubation mit Zitratpuffer (Tabelle 4) für 30 min bei 100°C gewährleistet.

Für die Etablierung der Färbung typischer M1 und M2-Marker wurden verschiedene Antikörper (Tabelle 8) sowie unterschiedliche Fixierungs- und Blockierungsprotokolle basierend auf publizierten Arbeiten (Hellstrom Erkenstam et al., 2016) und Datenblättern gegeneinander verglichen. Die gewählten zu vergleichenden Bedingungen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Protokolle der immunhistochemischen Etablierungsfärbungen

Perfusion	Bedingung	Fixierung	Blockierung 60 min	1. Antikörper über Nacht
Kryo-PBS	A	eiskaltes (-20°C vorgekühlt) 4% PFA, 10 min	IHC Blockierungslösung in TBS-T	IHC Blockierungslösung in TBS-T
	B	eiskaltes (-20°C vorgekühlt) Aceton/Methanol (50%), 5 min	5% Normal Goat Serum, 3% Donkey Serum, 2% BSA in 0,2% Tween PBS	2% Normal Goat Serum, 1% Donkey Serum, 1% BSA in 0,2% Tween PBS

	C	eiskaltes (-20°C vorgekühlt) Aceton/Methanol (50%), 5 min	5% Normal Goat Serum, 3% Donkey Serum, 2% BSA in PBS	2% Normal Goat Serum, 1% Donkey Serum, 1% BSA in PBS
Kryo-PFA und Paraffin	A	Perfusions-Fixation durch PFA	IHC Blockierungs-lösung in TBS-T	IHC Blockierungs-lösung in TBS-T
	B	Perfusions-Fixation durch PFA	5% Normal Goat Serum, 3% Donkey Serum, 2% BSA in TBS-T	2% Normal Goat Serum, 1% Donkey Serum, 1% BSA in TBS-T
	C	Perfusions-Fixation durch PFA	5 % Normal Goat Serum, 3% Donkey Serum, 2% BSA in PBS	2% Normal Goat Serum, 1% Donkey Serum, 1% BSA in PBS

Die Färbungen erfolgten für alle Gewebetypen (Kryo-PBS, Kryo-PFA, Paraffin) nach folgendem allgemeinen Ablauf: Nach einmaligem Waschen in PBS erfolgte die Blockierung und anschließend die Inkubation mit dem Primär-Antikörper über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min am nächsten Tag wurden die Schnitte mit dem entsprechenden Zweit-Antikörper (Tabelle 9) für 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Visualisierung der Zellkerne erfolgte nach einem weiteren Waschgang eine Dapi (4',6-Diamidin-2-phenylindol; 1000 ng/ml, Tabelle 3)-Färbung für 10 min. Die Fixierung der Deckgläschen erfolgte mit Hilfe von Dako Fluoreszenz Mounting Medium (Tabelle 3). Als Waschpuffer diente für die Kryo-konservierten Schnitte PBS und für Paraffinschnitte PBS-0,2% Tween (Tabelle 4).

In der nachfolgenden Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Etablierungsfärbungen zusammengefasst.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der Etablierungsfärbungen für die immunhistochemische Evaluation typischer M1 und M2 Antigene

Antigene	Fixierung	Blockierungs- und Inkubationsbedingung (siehe Tabelle 11)		
		Bedingung A	Bedingung B	Bedingung C
Iba-1 (Wako)	Paraffin	✓	✓	✓
	Kryo-PFA	✓	✓	✓
	Kryo-PBS	✗	✗	✗
Iba-1 (GenTex)	Paraffin	✗	✗	✗
	Kryo-PFA	✗	✗	✗
	Kryo-PBS	✗	✗	✗
iNOS (Novus)	Paraffin	✗	✗	✗
	Kryo-PFA	✗	✗	✗

	Kryo-PBS	X	X	X
iNOS (Abcam)	Paraffin	X	X	X
	Kryo-PFA	X	X	X
	Kryo-PBS	X	X	X
Cox-2 (CellSignaling)	Paraffin	X	X	X
	Kryo-PFA	X	X	X
CD86 (eBioscience)	Paraffin	X	X	X
	Kryo-PFA	X	X	X
	Kryo-PBS	X	X	X
CD86 (Abcam)	Paraffin	X	X	X
	Kryo-PFA	✓	✓	X
Arginase (GenTex)	Paraffin	✓	✓	✓
	Kryo-PFA	X	X	X
Arginase (Novus)	Paraffin	X	X	X
	Kryo-PFA	X	X	X
	Kryo-PBS	X	X	X
CD 206 (R&D Systems)	Paraffin	✓	X	X
	Kryo-PFA	✓	X	X
	Kryo-PBS	✓	X	X
YM-1 (Abcam)	Paraffin	X	X	X
	Kryo-PFA	X	X	X

✓ = im Vergleich zur Negativkontrolle immunhistochemisch einzelne Zellen als positiv abgrenzbar,

X = Hintergrundfärbung oder kein Signal

Während der Etablierungsarbeiten wurde im zeitlichen Verlauf deutlich, dass die Bedingung Kryo-PBS sich aufgrund der fehlenden Färbung für Iba-1 für diese Arbeit nicht eignet. Daher wurde diese Bedingung in den folgenden Etablierungen ausgeschlossen. Daneben ließ sich lediglich CD86 (Abcam) als M1-Marker anfärben, dies jedoch nur in der Kryo-PFA-Bedingung. Als M2-Marker ließen sich CD206 (R&D) und Arginase (GenTex) darstellen (Tabelle 8, Tabelle 12). Da die Färbung für Arginase jedoch ausschließlich in Paraffin-Schnitten möglich war, entfiel die Möglichkeit einer Ko-Färbung mit einem M1-Marker. Daher wurde CD206 als M2-Marker für die Ko-Färbung mit CD86 ausgewählt. Basierend auf diesen umfangreichen Etablierungsfärbungen wurde für die immunhistochemischen Analysen in dieser Arbeit die Bedingung Kryo-PFA gewählt, da sich alle drei Antigene Iba-1, CD86 und CD206 in diesen Geweben nachweisen ließen. Da CD206 sich nur mit Blockierungsbedingung A (Tabelle 11, Tabelle 12) anfärben ließ, wurde diese für die finalen Analysen mit den in Tabelle 13 aufgeführten Antikörpern und Konzentrationen verwendet.

Tabelle 13: Final verwendete Antikörper

Antikörper	Firma	Gewählte Konzentration	Spezifität	Klonalität
Iba-1	Wako	1:500	Rabbit anti-mouse, rat, human	polyklonal
CD86	Abcam	1:200	Rat anti-mouse	monoklonal
CD206	R&D Systems	1:100	Goat anti-mouse	polyklonal

2.2.4.2 TUNEL-Färbung zur Bestimmung der zellulären Degeneration

Zur Evaluation der zellulären Degeneration wurde eine TUNEL-Färbung (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) (Tabelle 5) durchgeführt. Die TUNEL-Färbung ist eine Methode zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen, bei der markierte Uridintriphosphate (UTPs) mithilfe der terminalen Desoxynucleotid-Transferase (TdT) an freie 3'OH-Enden angehängt werden. Im hier verwendeten Kit wurden grün fluoreszierende Nukleotide (Markierungslösung) verwendet. Entsprechend der Herstellungsangaben wurden die Gewebeschnitte mit dem Enzym (1:50 in Markierungslösung) für 60 min bei 37°C inkubiert. Zuvor erfolgte die Blockierung mit IHC-Blockierungslösung in TBS-T (Tabelle 4) für 60 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss an die Färbung und nachfolgendem Waschgang in PBS wurden die Zellkerne mit Dapi (Tabelle 3) für 10 min gefärbt und anschließend mit Dako Fluoreszenz Mounting Medium (Tabelle 3) eingedeckt.

2.2.4.3 NeuN-Färbung zur Ermittlung der neuronalen Dichte

Die neuronale Dichte wurde über die immunhistochemische Detektion von *neuronal nuclei* (NeuN) untersucht. Die Schnitte wurden nach dem Auftauen und Trocknen mit IHC-Blockierungslösung in TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über Nacht bei +4°C mit dem Erstantikörper NeuN (Tabelle 8) in Blockierungslösung inkubiert. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte am nächsten Tag über Inkubation mit dem entsprechenden Fluorophor-konjugierten Sekundärantikörper (anti-rabbit Alexa Fluor 488) in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Kerne wurden mit Dapi gefärbt und die Schnitte wie zuvor beschrieben eingedeckt.

2.2.4.4 Konfokalmikroskopie und Auswertung immunhistochemischer Färbungen für Mikroglia und typische M1 und M2 Marker

Die immunhistochemische Analyse der Gewebeschnitte erfolgte mit dem Konfokalmikroskop (Tabelle 1) unter Verwendung des 20x Objektivs. Das A1plus Eclipse Ti ist mit drei Lasern (Diodenlaser 405 nm, Argonlaser 514 nm, G-Helium-Neon-Laser 543 nm) und drei Filtern (450/ 50-405 LP, 515/ 20-540 LP, 585/ 65-640 LP) ausgestattet. Es wurden konfokale Aufnahmen mit 10 µm Dicke in 1 µm Schritten in der z-Ebene gescannt und durch Verwendung der maximalen Intensitätsprojektion in 2-dimensionale Bilder konvertiert. Pro Färbung wurden die gleichen Aufnahmeeinstellungen (Laserspannung und Offset, Pinhole = 1.2) gewählt. Die Aufnahmen und Auswertung aller Färbungen erfolgte verblindet mit der NIS Analysesoftware (Tabelle 2) in insgesamt 7 nicht überlappenden Regionen (*Regions Of Interest* (ROIs, Abb. 4) mit einer Größe von jeweils 99729 µm²) im Cortex, Thalamus und Hippocampus der ipsilateralen Hemisphäre für je 2-4 Schnitte pro Tier. Für die Gruppenvergleiche wurden je Region und Tier jeweils Mittelwerte gebildet. Für CD86 und CD206 erfolgte die Auszählung einzeln und doppelt positiver Zellen. Aufgrund der hohen Dichte aktivierter Mikrogliazellen in Regionen starker Gewebeschädigung war eine Auszählung einzelner Zellen nicht möglich. Hier wurde die Iba-1 positive Fläche nach Umwandlung der Aufnahmen in binäre Bilder ermittelt.

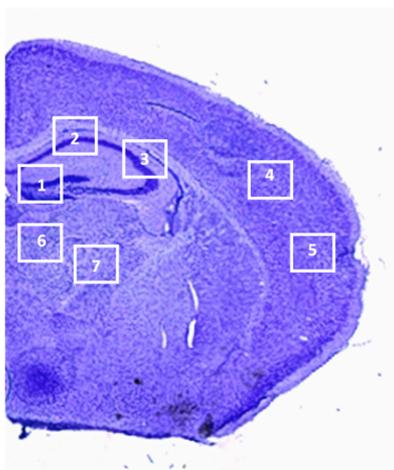


Abbildung 4: Darstellung der analysierten Regionen in immunhistochemischen Färbungen

Markierung der Regionen in einem Koronarschnitt des murinen Gehirns

- 1 = Gyrus Dentatus
- 2 = Hippocampusregion 1
- 3 = Hippocampusregion 2
- 4 = Cortexregion 1
- 5 = Cortexregion 2
- 6 = Thalamusregion 1
- 7 = Thalamusregion 2

2.2.4.5 Quantifizierung der zellulären Degeneration und neuronalen Dichte

Die Auswertung der TUNEL- und NeuN- Färbung (Tabelle 5, Tabelle 8) erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (Tabelle 1) wie zuvor durch die Arbeitsgruppe beschrieben (Herz et al., 2018b; Reinboth et al., 2016). Dazu wurden Aufnahmen in den zuvor genannten Regionen (Abb. 4) im Cortex, Hippocampus und Thalamus in der ipsi- und contralateralen Hemisphäre mit dem 40x Objektiv mit einer CCD Kamera (Tabelle 1) erstellt. Die Anzahl TUNEL-positiver Zellen wurde manuell in den Aufnahmen ausgezählt. Da eine Auszählung einzelner Neurone in dicht gepackten Regionen (z.B. Hippocampus) nicht möglich war, wurden die aufgenommenen Bilder für die Quantifizierung des neuronalen Zellverlusts in binäre Bilder umgewandelt und anschließend die NeuN-positive Fläche mittels Image J (Tabelle 2) bestimmt. Für jedes Tier und jede evaluierte Region wurde der Mittelwert der einzelnen ROIs gebildet. Der prozentuale neuronale Zellverlust wurde über folgende Formel bestimmt:

$$\text{neuronaler Zellverlust [\%]} = 100 - \frac{\text{Fläche ipsilateral} \times 100}{\text{Fläche contralateral}}$$

Alle mikroskopischen Aufnahmen und Quantifizierungen erfolgten verblindet.

2.2.5 Magnetische Zellsortierung (*magnetic-activated cell sorting, MACS*)

Um spezifisch den Einfluss einer HI und einer HT auf den Phänotyp myeloider Zellen zu analysieren, erfolgten Genexpressionsanalysen in *ex vivo* isolierten CD11b⁺ Zellen. Die Isolation der Zellen erfolgte mittels magnetischer Zellsortierung. Hierzu wurden Tiere an Tag 1, 3 und 7 nach Schädigung mit einer Überdosis Chloralhydrat (Tabelle 3) betäubt und daraufhin mit PBS (Tabelle 4) intrakardial perfundiert. Die Präparation der ipsilateralen Großhirnhälften erfolgte im unmittelbaren Anschluss. Um eine ausreichend hohe Zellzahl zu erhalten, wurden jeweils zwei Hemisphären pro Messung gepoolt.

In einem Pilotexperiment wurde zunächst überprüft, welche Methode zur Herstellung einer Einzelzellsuspension für die anschließende MACS-Sortierung am besten geeignet ist, um eine möglichst reine Population aus Mikrogliazellen und Makrophagen nach MACS zu erhalten. Dazu wurde die Isolation über Dichtegradientenzentrifugation (Beckmann et al., 2022; Herz et al., 2018a;

Mulling et al., 2021) mit der Gewebekomogenisierung über die Verwendung des *Neural Tissue Dissociation Kit P* (Tabelle 5, (Serdar et al., 2019)) miteinander verglichen. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde das Gewebe zunächst mechanisch durch ein 70- μm -Zellsieb mit einem Spritzenstempel in HEPES-gepuffertem RPMI1640 Medium (Tabelle 4) homogenisiert, anschließend bei 400 $\times g$ für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet in 37% Percoll in 0,01 N HCl/PBS (Tabelle 3, Tabelle 4) homogenisiert. Diese Zellsuspension wurde danach für 20 min bei 2800 $\times g$ ohne Bremse zentrifugiert. Das isolierte Myelin, das nach der Zentrifugation als obere Schicht auf der Lösung auflag, wurde zusammen mit der Percoll-Lösung abgesaugt und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Die Gewebekomogenisierung über das *Neural Tissue Dissociation Kit P* (Tabelle 5) erfolgte entsprechend der Herstellerangaben mit dem im Kit enthaltenen Papain-Enzym-Mix kombiniert mit mechanischer Dissoziation des Gewebes mithilfe von Pasteur-Pipetten. Nach mehrmaligen Inkubationsschritten für je 10 und 15 min in einem *MACSmix Tube Rotator* (Tabelle 1) bei 37°C wurde die erhaltende Zellsuspension anschließend durch 40- μm -Zellsiebe (Tabelle 1) filtriert. Zur Entfernung von Myelin-Resten, die eine Antikörperbindung behindern, wurde die Zellsuspension mit *Myelin Removal Beads* (Tabelle 7) entsprechend der Herstellerangaben für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschvorgang erfolgte die magnetische Separation des Myelinrestes über mit Stahlwolle gefüllte LS Säulen (Tabelle 1) in einem magnetischen Feld. Die mit magnetisch aktiven Beads gebundenen Myelinreste blieben im magnetischen Feld der Säulen zurück, während Zellen ohne Beads im Eluat aufgefangen werden konnten. Die Sortierung der CD11b⁺ Zellen erfolgte anschließend über Inkubation mit anti-CD11b Microbeads und Isolation in MS-Säulen (Tabelle 1). Während die mit Bead-markierten CD11b⁺ Zellen in der Säule verblieben, wurden alle unmarkierten CD11b⁻ Zellen durch die Säule über mehrmaliges Waschen eluiert. Nach Entfernung der Säule aus dem Magneten wurden die gebundenen CD11b⁺ Zellen in 500 μl MACS-Puffer (Tabelle 4) eluiert. Die Reinheit und Zusammensetzung der gewonnenen Zellsuspensionen wurde in einem kleinen Aliquot mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die restlichen Zellen wurden

zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend als Zellpellet bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Zur Überprüfung der Reinheit und Zusammensetzung isolierter CD11b^+ Zellen und zur Analyse der Expression jeweils eines typischen M1 und M2 Markers wurde für alle Proben je ein Aliquot der isolierten Zellen (1×10^5 - 4×10^5) mit Fluoreszenzmarkierten-Antikörpern gegen die Antigene CD45 (Panleukozytenmarker), CD11b (myeloide Zellen), Ly6G (Neutrophile), CD86 (M1) und CD206 (M2) für 20 min bei 4°C gefärbt (Tabelle 8). Tote und lebende Zellen wurden mittels Propidiumiodid (PI)-Färbung ($1 \mu\text{g/ml}$, Tabelle 3, Abbildung 5), das direkt vor der Messung in die Messröhrchen gegeben wurde, unterschieden. Die durchflusszytometrischen Messungen wurden am BD FACS LSRII (Tabelle 1) durchgeführt und mittels BD FACS Diva Software (Tabelle 2) analysiert.

Wie zuvor erwähnt wurde zunächst ein Testexperiment durchgeführt, in dem die Zusammensetzung der Zellen nach Isolation mittels Dichtegradientenzentrifugation mit der Gewebekomogenisierung über das *Neural Tissue Dissociation Kit* (Tabelle 5) verglichen wurde. Hier zeigte sich, dass die Zellsuspension nach Dichtegradientenzentrifugation mit 37% Percoll (Tabelle 3) einen deutlich höheren Anteil an toten Zellen und Zelldebris enthielt, die eine anschließende Zellsortierung mittels MACS hätten beeinträchtigen können (Abb. 5A). Darüber hinaus scheinen Neutrophile besonders sensitiv gegenüber der enzymatischen und mechanischen Gewebe-dissoziation mit dem *Neural Tissue Dissociation Kit* zu sein, da diese bereits vor der Sortierung nahezu vollständig eliminiert waren (Abb. 5B). Ziel dieser Arbeit war eine möglichst spezifische Analyse von Mikroglia und Makrophagen ohne Kontamination mit Neutrophilen, sodass für alle folgenden Analysen das *Neural Tissue Dissociation Kit* verwendet wurde um, aus der erhaltenen Einzelzellsuspension anschließend Mikroglia und Makrophagen mittels MACS aufzureinigen. Die in Abb. 5C exemplarisch dargestellten Dot Plots geben einen Überblick über die Zusammensetzung der aufgereinigten CD11b^+ Zellen nach MACS. ZNS-ständige Mikroglia und peripher

infiltrierte Makrophagen können anhand ihrer unterschiedlichen CD45 Expression unterschieden werden (Abbildung 5), die auf Mikroglia schwächer ausgeprägt ist als auf peripheren Leukozyten (Bedard et al., 2007; Sedgwick et al., 1991). Es wird deutlich, dass der Anteil peripherer Zellen in HI-Tieren deutlich höher ist als in Sham-Tieren (Abb. 5C).

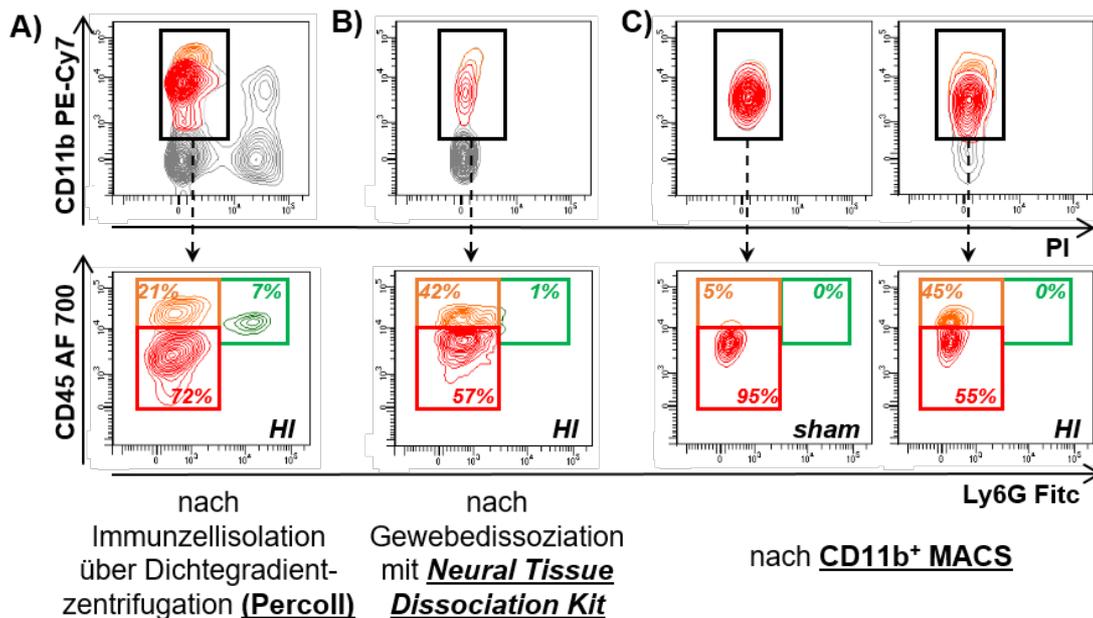


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analysen zur Aufreinigung myeloider Zellen aus Mausgehirngewebe. In der oberen Zeile ist die Aufteilung der Zellen anhand ihrer CD11b Expression dargestellt. Tote Zellen wurden mittels Propidiumiodid ausgeschlossen. In der unteren Zeile wurden die CD11b⁺ Zellen anhand ihrer CD45 und Ly6G Expression in folgende Zellpopulationen unterteilt: residente Mikroglia (rotes Gate CD11b⁺, CD45^{int}, Ly6G⁻), periphere Monozyten/Makrophagen (orangenes Gate CD11b⁺, CD45^{high}, Ly6G⁻) und Neutrophile (grünes Gate, CD11b⁺, CD45^{high}, Ly6G⁺). Abbildung (A) gibt die Verteilung nach Immunzellisolierung mittels Dichtegradientenzentrifugation wieder. Zum Vergleich wurde eine Gewebedissoziation mittels Neural Tissue Dissociation Kit durchgeführt (B). In (C) dargestellt ist die Immunzellverteilung nach MACS Sortierung von CD11b⁺ Zellen, links bei Sham-Tieren, rechts bei HI Tieren.

2.2.7 RNA-Isolation und quantitative real time PCR

2.2.7.1 RNA Isolation

Aus den mittels MACS separierten CD11b⁺ Zellen wurde totale RNA über Verwendung von kommerziell erhältlichen Kits und Mini-Säulen der Firma Qiagen entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Zunächst wurde das Zellpellet in RLT-Lyse-Puffer resuspendiert und die Zellen zusätzlich mit einer 1 ml Insulinspritze mechanisch aufgeschlossen. Proteine und DNA wurden über

Verwendung von Shredder Säulen entfernt und die Lösung anschließend mit 70%igem Ethanol versetzt. Dieses Gemisch wurde zur RNA-Isolation auf *RNEasy Mini spin columns* (Tabelle 1) aufgetragen. Daraufhin folgten mehrere Reinigungsschritte mit im Kit enthaltenen RW1 und RPE-Puffern. Die Eluierung der RNA erfolgte in RNase freiem Wasser. Die Reinheit und die Konzentration der RNA-Proben wurden spektralphotometrisch am Nanodrop1000 (Tabelle 1) ermittelt. Als Index für die Reinheit der RNA wurde das Verhältnis der Absorption von 260 nm und 230 nm sowie 280 nm und 260nm bestimmt. Die RNA Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.7.2 Reverse Transkription

Der cDNA-Synthese wurde die Entfernung genomischer DNA mittels DNA-Verdau vorangestellt. Für den DNA-Verdau wurden die Proben mit DNase (1 U/ml), in DNase I Reaction Buffer (Tabelle 6) bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch Zugabe von 1 µl einer 25 mM EDTA-Lösung (Tabelle 3) bei 65°C für 10 min im T3 Thermocycler (Tabelle 1). Für die reverse Transkription wurden die Proben mit RT-Reaktionsmix I (Tabelle 6) versetzt und bei 65°C für 5 min inkubiert. In RT-Reaktionsmix I sind Oligo dT Primer enthalten, die komplementär zum Poly-A-Schwanz der mRNA sind. Des Weiteren wurden random Primer verwendet, die zufällig zu einem oder mehreren Neukleotidbereichen komplementär sind, um der reversen Transkriptase mehrere Positionen zur Elongation zu ermöglichen. Nach Inkubation mit RT-Reaktionsmix I wurde RT-Reaktionsmix II (Tabelle 6), der die reverse Transkriptase enthielt, dazugegeben. Durch die reverse Transkriptase wird zunächst ein RNA-cDNA Hybrid synthetisiert, wodurch die interne RNase H (unspezifische Endoribonuklease) aktiviert und die RNA des Hybrids verdaut wird. Die einzelsträngige cDNA wiederum wird zu einer doppelsträngigen cDNA transkribiert. Während der Reaktionen im T3 Thermocycler (Tabelle 1) wurden folgende Zyklen durchlaufen: 25°C für 10 min; 42°C für 50 min; 70°C für 15 min; anschließend 4°C bis zur Probenentnahme.

2.2.7.3 Real-Time-Polymerasekettenreaktion

Die PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes/Zielgens. Bei der Real-Time-PCR werden fluoreszierende Reporter-Moleküle verwendet, die eine Quantifizierung der erstellten DNA-Kopien in jedem PCR-Zyklus zu ermöglichen. Die hier verwendeten Taqman Sonden waren am 5' Ende mit dem Reporterfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (FAM) und am 3' Ende mit dem Quencher Farbstoff 6-Carboxy-tetramethylrodamin (TAMRA) markiert. Bei intakter Sonde wird das Fluoreszenzsignal des Reporters FAM durch die räumliche Nähe zum Quencher TAMRA unterdrückt. Die DNA-Polymerase besitzt neben ihrer Synthase-Aktivität auch eine 5' 3' Exonuklease-Aktivität, die zur Abtrennung des Reporter-Molekül führt, wodurch sich Quencher und Reporter voneinander entfernen und die Fluoreszenz des Reporters aktiv wird (Lee et al., 1993). In dieser Arbeit wurden kommerziell erhältliche bereits optimierte Sonden und Primer-Paare der Firma Thermo Fischer verwendet. Die Amplifikation der gewünschten Produkte erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl/ Probe mit 10 µl Taqman Fast Universal Master Mix (Tabelle 3), 1 µl Primer-Sonden-Mix (Tabelle 10) und mit 9 µl in RNase freiem Wasser verdünnter cDNA. Die Messung erfolgte in einer 96-Well-Platte im StepOne Thermocycler (Tabelle 1). Die Vervielfältigung der DNA-Abschnitte fand in 40 Zyklen mit jeweils 30 s bei 60°C statt. β -2-Mikroglobulin diente als interne Genkontrolle (Referenzgen, Tabelle 10). Die Messung der einzelnen Proben erfolgte in Duplikaten und wurde mindestens einmal wiederholt. Die Auswertung wurde nach der beschriebenen $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode (Livak and Schmittgen, 2001) durchgeführt, wobei Proben von Sham-Tieren des gleichen Versuchs und Wurfs als Kontrolle dienten.

2.2.8 Statistik

Die Ergebnisse sind als Zeitverlaufskurven oder als Box Plots mit Einzelwerten dargestellt. In Box Plot Darstellungen sind die Medianwerte, die 25% und 75% Perzentile als Boxen angezeigt sowie die minimalen und maximalen Werte als *Whisker* abgebildet. Für Zeitverlaufskurven sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aufgetragen. Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism (Tabelle 2) durchgeführt. Die Analysen erfolgten über

zweifaktorielle ANOVA, wobei Faktor 1: entweder die Zeit (Tag 1 vs. Tag 3 vs. Tag 7 nach Schädigung) oder die Gehirnregion (Cortex vs. Thalamus vs. Hippocampus) und Faktor 2 die Behandlung (NT vs. HT) darstellte. Sofern diese Analysen signifikante Haupteffekte für einen der Faktoren und/oder Interaktionseffekte zwischen beiden Faktoren ergaben, erfolgte eine Posthoc-Analyse mit dem Tukey's Test für multiple Vergleiche. In allen Analysen wurde $p < 0,05$ als statistisch signifikant erachtet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Die Hypothermie wirkt neuroprotektiv auf die HI-induzierte subakute Gewebeschädigung

Zur Evaluation der Gewebeschädigung wurden verschiedene Bewertungssysteme verwendet. Zunächst erfolgte anhand Kresylviolett-gefärbter Schnitte (Abb. 6 A) eine neuropathologische Beurteilung der Gewebeschädigung (Abb. 6 B). Daneben wurde der HI-induzierte subakute Gewebeverlust bzw. eine potenziell akut auftretende Ödembildung über die Vermessung intakter Gewebeflächen in der hippocampalen Ebene ermittelt (Abb. 6 C), da dies den Bereich mit dem höchsten Schadensausmaß darstellt (Reinboth et al., 2016).

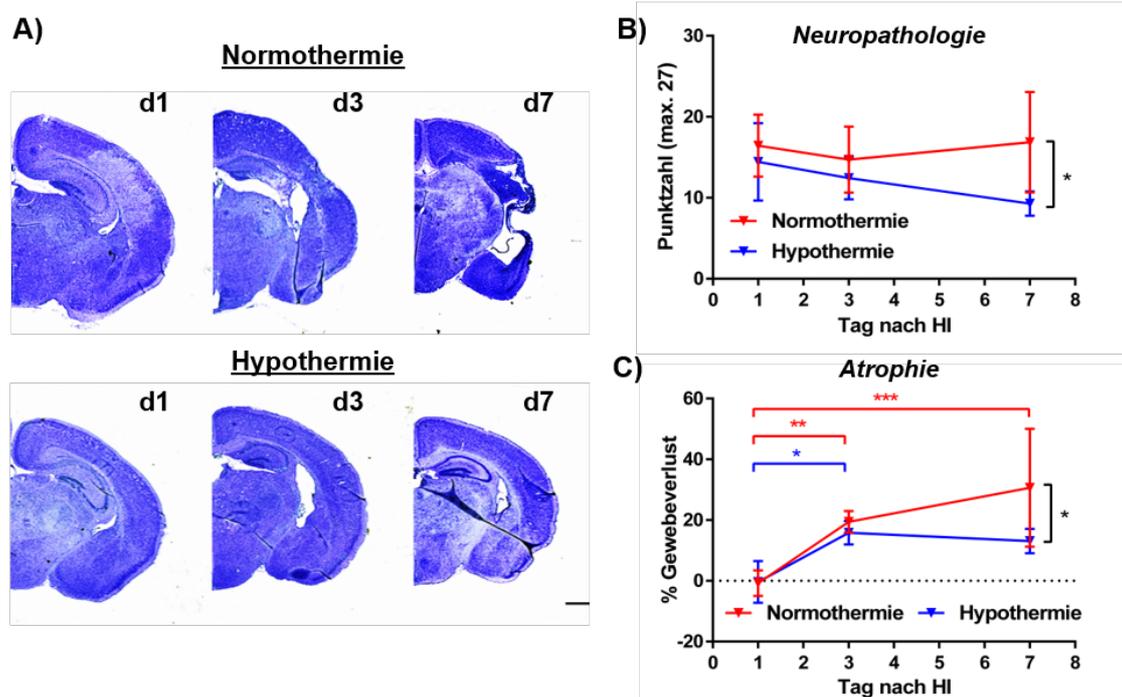


Abbildung 6: Einfluss einer Hypothermie auf HI-induzierte neuropathologische Veränderungen und Gewebeverlust. Die Schädigung des Hirngewebes wurde 1, 3 und 7 Tage nach HI in Kresylviolett-gefärbten Gewebeschnitten (A) über die Anwendung eines neuropathologischen Bewertungssystems ermittelt, das die Quantifizierung struktureller und zellulärer Veränderungen nach HI ermöglicht. Dargestellt sind die Mittelwerte der Punktzahlen der neuropathologischen Evaluierung (B). Die Evaluation der Gewebeatrophie bzw. Ödembildung erfolgte über die Ausmessung der ipsilateralen Hemisphärenflächen im Verhältnis zur kontralateralen Seite in Kresylviolett-gefärbten Gewebeschnitten der Hippocampusebene (A, C). Maßstabsbalken: 1 mm. n=7 / Gruppe. *p<0,05 **p<0,01, ***p<0,001. Rote und blaue Vergleichsbalken und Symbole zwischen den Zeitpunkten stellen Ergebnisse der statistischen Analyse für Normthermie- bzw. Hypothermie-Tiere dar.

Anhand der neuropathologischen Beurteilung ließ sich bereits an Tag 1 und 3 eine leichte protektive Tendenz durch die Hypothermie erkennen, die an Tag 7 deutlich ausgeprägt war und sich in einem signifikanten Unterschied zwischen der Normo- und der Hypothermie-Gruppe darstellte (Abb. 6 A, B). In der Atrophiebestimmung zeigte sich anhand der Zeitverlaufsanalysen, dass bereits an Tag 3 nach Schädigung in beiden Gruppen ein signifikanter Gewebeverlust zu verzeichnen war, der jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht durch eine Hypothermie moduliert war (Abb. 6 A, C). An Tag 7 nach Schädigung war in Normothermie-behandelten Tieren ein weiterer Gewebeverlust zu verzeichnen, der in Hypothermie-behandelten Tieren nicht beobachtet wurde (Abb. 6 A, C). Diese unterschiedliche Regulation resultierte an Tag 7 ähnlich wie für die neuropathologische Beurteilung in einem signifikanten Unterschied zwischen der Normothermie- und der Hypothermiegruppe (Abb. 6 A, C).

Sowohl die Analysen zu neuropathologischen Veränderungen als auch zum Gewebeverlust sind Bewertungssysteme, die sich primär für Analysen zu subakuten Zeitpunkten eignen. Darüber hinaus handelt es sich um eine subjektive Analyse, die viel Erfahrung vom Untersucher voraussetzt. Daher wurden zusätzlich zelluläre Veränderungen mithilfe einer TUNEL- (Abb. 7) und NeuN (Abb. 8) -Färbung erfasst.

Diese Analysen ergaben an Tag 1 nach Schädigung sowohl in der Normothermie- als auch in der Hypothermie-Gruppe, insbesondere im Bereich des Hippocampus eine signifikant erhöhte Anzahl TUNEL-positiver Zellen im Vergleich zum Thalamus (Abb. 7 A). Auch im Bereich des Cortex waren zahlreiche Zellen in beiden Behandlungsgruppen TUNEL-positiv (Abb. 7 A). An Tag 3 nach Schädigung war die Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu Tag 1 vor allem im Cortex und Hippocampus deutlich reduziert (Abb. 7 B). Die Hypothermie bewirkte in diesen beiden Regionen sowohl an Tag 1 und an Tag 3 eine leichte Reduktion der HI-induzierten Zelldegeneration (Abb. 7 B). Insgesamt ließ sich anhand der TUNEL-Färbung erkennen, dass der Hippocampus die am stärksten geschädigte Region ist. Zudem zeichnet sich ein protektiver Effekt durch die Hypothermie ab Tag 3 nach HI ab, der jedoch nicht signifikant war.

Diese Ergebnisse korrelieren mit denen der neuropathologischen Evaluation (Abb. 6 B).

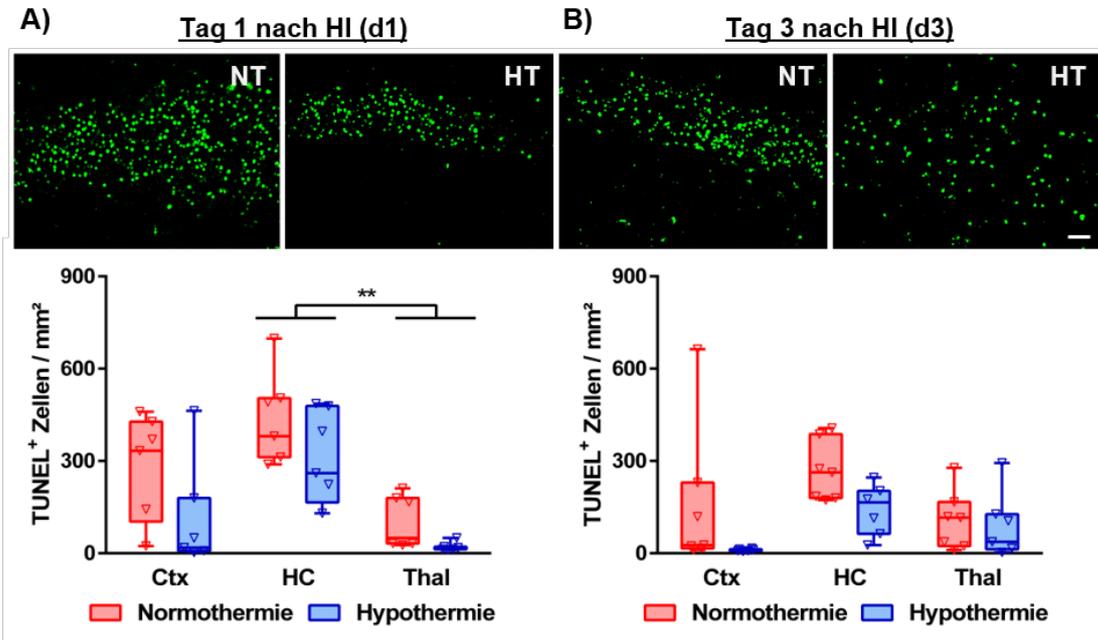


Abbildung 7: Einfluss einer Hypothermie auf die HI-induzierte akute Zelldegeneration. Das Ausmaß der apoptotischen Zellschädigung wurde über eine TUNEL-Färbung in Gewebeschnitten in der Ebene des Hippocampus (Bregma -1,9 mm bis -2,0 mm) 1 (A) und 3 (B) Tage nach HI analysiert. Die exemplarischen Aufnahmen stammen aus dem Bereich des CA2 im Hippocampus (Maßstabsbalken: 20 µm). Die Quantifizierung erfolgte in definierten Regionen des Cortex (Ctx), Hippocampus (HC) und Thalamus (Thal). n=7 Tiere / Gruppe. **p<0,01

An Tag 7 nach Schädigung ist die TUNEL-Färbung nicht geeignet, das Schadensausmaß darzustellen, da zu diesem Zeitpunkt geschädigte Zellen bereits abgestorben sind. Um das zelluläre Schadensausmaß auch zu subakuten Zeitpunkten zu evaluieren, wurde daher eine NeuN-Färbung zur Ermittlung der neuronalen Dichte durchgeführt (Abb. 8). Analog zu den Ergebnissen der TUNEL-Färbung ergab sich für die neuronale Dichte, dass der Hippocampus die am stärksten geschädigte Region darstellt, was sich in einem signifikant erhöhten neuronalen Zellverlust im Vergleich zum Cortex und Thalamus äußerte (Abb. 8). Das finale Ausmaß des neuronalen Zelluntergangs wurde 7 Tage nach HI am deutlichsten sichtbar, d.h. die HI-induzierte zelluläre Schädigung entwickelte sich über die Zeit. Auch morphologisch wird dieser sekundäre Zelluntergang zwischen Tag 3 und Tag 7 sehr gut anhand der mikroskopischen Aufnahmen ersichtlich.

Die offensichtlich an Tag 3 sterbenden Neurone sind an Tag 7 nicht mehr vorhanden, lediglich überlebende Neurone mit eindeutiger Morphologie intakter Neurone sind erhalten geblieben (Abb. 8 B). Dieser sekundäre Zelluntergang ist in Hypothermie-behandelten Tieren deutlich schwächer ausgeprägt, was in einem signifikant reduzierten neuronalen Zellverlust im Hippocampus 7 Tage nach resultierte (Abb. 8 B).

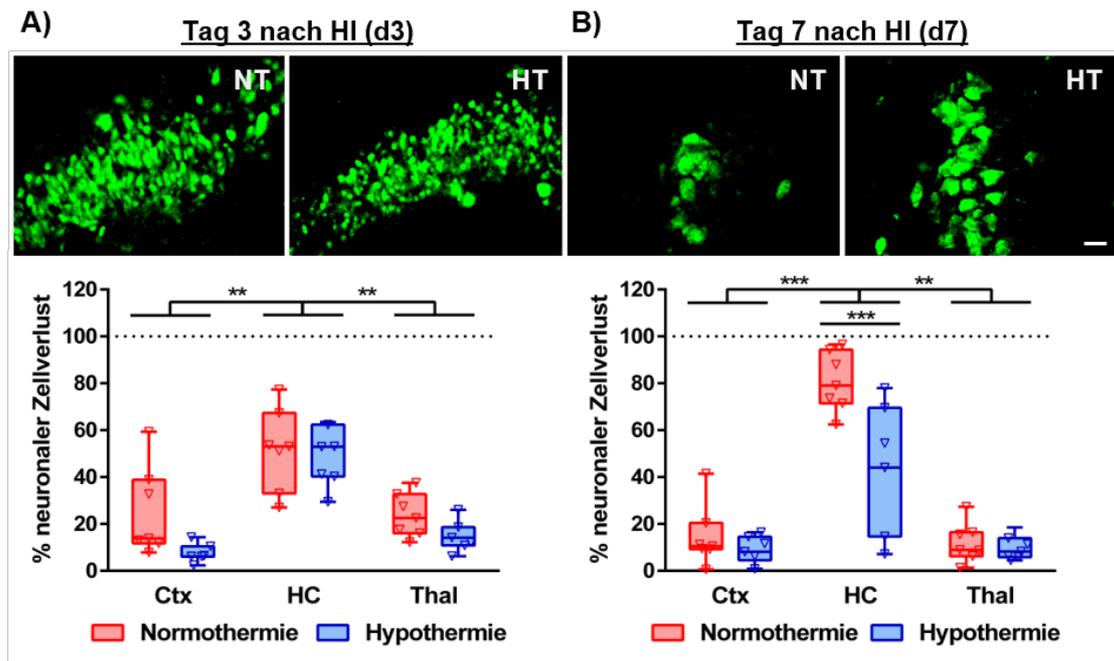


Abbildung 8: Einfluss einer Hypothermie auf den HI-induzierten subakuten neuronalen Zelluntergang. Die Ermittlung der neuronalen Dichte erfolgte über immunhistochemische Färbungen für den neuronalen Marker NeuN 3 (A) und 7 (B) Tage nach HI. Die exemplarischen Aufnahmen stammen aus dem Bereich des CA2 im Hippocampus (Maßstabsbalken: 20 µm). Die Quantifizierung der neuronalen Dichte erfolgte über die Messung der NeuN-positiven Fläche in definierten Regionen des Cortex (Ctx), Hippocampus (HC) und Thalamus (Thal) der ipsilateralen Hemisphäre im Verhältnis zur kontralateralen Seite. n=7 Tiere / Gruppe. **p<0,01; ***p<0,001.

3.2 Die Hypothermie hat keinen Einfluss auf die allgemeine Mikroglia-Aktivierung

Nachdem sich ein protektiver Effekt durch die Hypothermie abgebildet hat und vor dem Hintergrund voriger Studien in adulten Ischämie-Modellen, die die protektive Wirkung einer Hypothermie auf anti-inflammatorische Effekte zurückführten (Lee et al., 2016), sollte im Folgenden untersucht werden, inwiefern die HI-induzierte Mikroglia-Aktivierung durch eine Hypothermie reguliert wird. Hierzu wurde eine immunhistochemische Färbung für Iba-1 durchgeführt,

um die Menge aktivierter Mikroglia im Zeitverlauf regional zu bestimmen (Abb. 9).

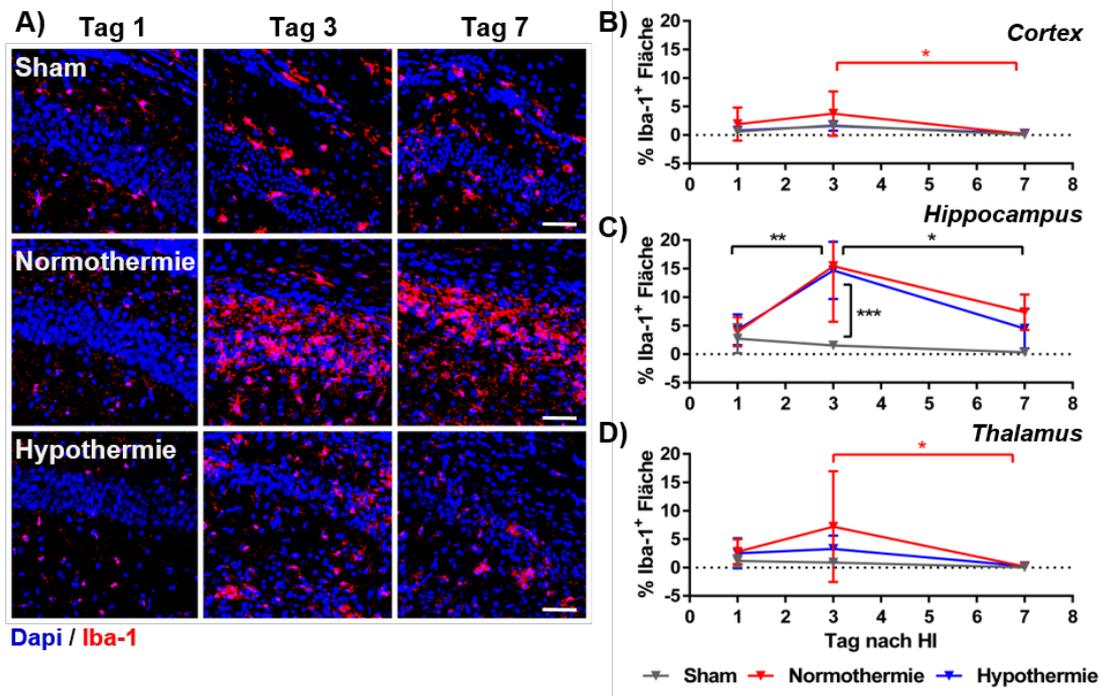


Abbildung 9: Der Einfluss der Hypothermie auf die HI-induzierte Mikroglia-Aktivierung. Die Erfassung der Menge aktivierter Mikroglia erfolgte über immunhistochemische Färbungen für den Mikrogliamarker Iba-1 (A) 1, 3 und 7 Tage nach HI im Cortex (B), Hippocampus (C) und Thalamus (D). In (A) dargestellt sind exemplarische Aufnahmen aus dem Bereich des CA2 des Hippocampus (Maßstabsbalken: 50 µm). Die Quantifizierung der Mikroglia-Aktivierung erfolgte über die Messung der Iba-1-positiven Fläche in definierten Regionen der ipsilateralen Hemisphären, die als prozentualer Anteil von der untersuchten ROI-Fläche angegeben ist (B-D). n=7 Tiere / Gruppe. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Rote Vergleichsbalken und Symbole zwischen den Zeitpunkten stellen Ergebnisse der statistischen Analyse für Normothermie Tiere dar, schwarze Balken und Symbole kennzeichnen signifikante Unterschiede für beide HI-Gruppen.

An Tag 1 nach Schädigung wurden sowohl in Normothermie- als auch Hypothermie-behandelten HI-Tieren weder im Cortex, Hippocampus noch im Thalamus signifikante Unterschiede im Vergleich zu gesunden Sham-Tieren beobachtet (Abb. 9). An Tag 3 hingegen wurde eine signifikant erhöhte Mikroglia-Aktivierung unabhängig von der Hypothermiebehandlung in HI-geschädigten Tieren im Hippocampus detektiert (Abb. 9 A, C). Auch im Bereich des Kortex sowie des Thalamus wurde an Tag 3 nach Schädigung ein leichter Anstieg in der Iba-1 Expression jedoch nur in Normothermie-behandelten Tieren beobachtet, der zudem deutlich geringer ausfiel als im Hippocampus und im Vergleich zur

Sham-Gruppe nicht signifikant war (Abb. 9 B, D). Trotz anhaltend erhöhter Iba-1 Expression im Hippocampus im Vergleich zur gesunden Sham-Kontrolle war diese an Tag 7 sowohl für die Normothermie- also auch die Hypothermiegruppe signifikant schwächer ausgeprägt als an Tag 3 (Abb. 9 A, C). Ebenso wurde im Bereich des Kortex und des Thalamus eine signifikante Abnahme der an Tag 3 erhöhten Mikroglia-Aktivierung in Normothermie-behandelten Tieren an Tag 7 nach HI verzeichnet (Abb. 9 B, D).

Zusammenfassend ist ein deutlicher Peak der mikroglialen Aktivierung an Tag 3 nach Schädigung festzustellen. In Korrelation zum Schadensausmaß wurde vor allem im Bereich des Hippocampus eine erhöhte Iba-1 Expression beobachtet, die sich jedoch zwischen Normothermie- und Hypothermie-behandelten Tieren nicht unterschied. Wenngleich Iba-1 als Pan-Mikroglia marker gewisse Rückschlüsse auf die Aktivierung dieser Zellen zulässt (Ito et al., 2001; Kozłowski and Weimer, 2012), so wird die Funktion der Mikroglia vor allem auch durch ihren Phänotyp bestimmt. Hu et al. beschrieben eine dualistische Rolle von Mikroglia und Makrophagen durch ihre Polarisierung in zwei Phänotypen, den sogenannten klassisch aktivierten M1- und den alternativ aktivierten M2-Phänotyp (Hu et al., 2015). Um zu untersuchen, inwiefern eine Hypothermie den Phänotyp der Mikroglia moduliert, wurden im Folgenden immunhistochemische, durchflusszytometrische und molekularbiologische Analysen für typische M1- und M2- Moleküle angeschlossen.

3.3 Der Einfluss einer Hypoxie-Ischämie und einer Hypothermie auf die Expression typischer M1 und M2 Marker ist von der Gehirnregion und vom Zeitpunkt abhängig

Um den Phänotyp der Mikroglia zu klassifizieren wurden zwei charakteristische Marker immunhistochemisch untersucht: CD86 als klassischer pro-inflammatorischer M1 Marker sowie CD206 als klassischer neuroregenerativer M2 Marker (Hellstrom Erkenstam et al., 2016). Entgegen der allgegenwärtigen Vorstellung einer strikten Unterteilung in entweder CD86 oder CD206 positive Zellen und der entsprechenden Einteilung in den M1 bzw. M2-Phänotyp wurde wie zuvor beschrieben (Hellstrom Erkenstam et al., 2016) auch ein nicht

unerheblicher Teil doppelt positiver Zellen vor allem im Bereich des Cortex detektiert (Abb. 10 A). Anhand der qualitativen Aufnahmen in Abb. 10 A lässt sich zusätzlich bereits erkennen, dass in den Regionen Hippocampus und Thalamus die Anzahl CD86 einzeln positiver Zellen gegenüber CD206 einzeln und CD206/CD86 doppelt positiver Zellen überwog (Abb. 10 A).

Die quantitative Auswertung bestätigte das Bild der qualitativen Beobachtungen. Hier wurde an Tag 1 in allen 3 Regionen eine erhöhte Anzahl an CD86 einzeln positiven Zellen in HI Tieren im Vergleich zu gesunden schein-operierten Tieren beobachtet, die jedoch in der Normothermie-Gruppe höher war als in der Hypothermie-Gruppe und im Thalamus in einer signifikanten Erhöhung im Vergleich zu schein-operierten Tieren resultierte (Abb. 10 D). Sowohl im Cortex als auch im Thalamus wurde über die Zeit eine Reduktion der Anzahl CD86 positiver Zellen festgestellt, die sich an Tag 3 und 7 nach HI nicht von Sham-Tieren unterschied (Abb. 10 B, D). Interessanterweise kam es im Hippocampus zwischen 3 und 7 Tagen zu einem weiteren Anstieg von CD86 einzeln positiven Zellen, der jedoch nur in Normothermie-behandelten Tieren beobachtet wurde und durch eine Hypothermie signifikant reduziert war (Abb. 10 C).

Die höchste Menge an CD206 einzeln positiven Zellen wurde in HI-Tieren 3 Tage nach Insult im Hippocampus detektiert, die jedoch in der Hypothermiegruppe deutlich stärker ausgeprägt war und in signifikanten Unterschieden zu gesunden schein-operierten Tieren Tag 3 und Tag 7 nach HI resultierte (Abb. 10 C). Auch im Thalamus kam es über die Zeit zu einer Erhöhung der Zellzahl in Hypothermie-Tieren, die 7 Tage nach HI signifikant im Vergleich zu gesunden schein-operierten Tieren war (Abb. 10 D). In allen untersuchten Regionen wurde im Vergleich zu Sham-Tieren eine signifikant erhöhte Anzahl CD86/CD206 doppelt positiver Zellen in Normothermie-behandelten HI-Tieren, nicht jedoch in Hypothermie-behandelten HI-Tieren an Tag 1 nach Insult detektiert, die über die Zeit rasch abnahm (Abb. 10 B-D).

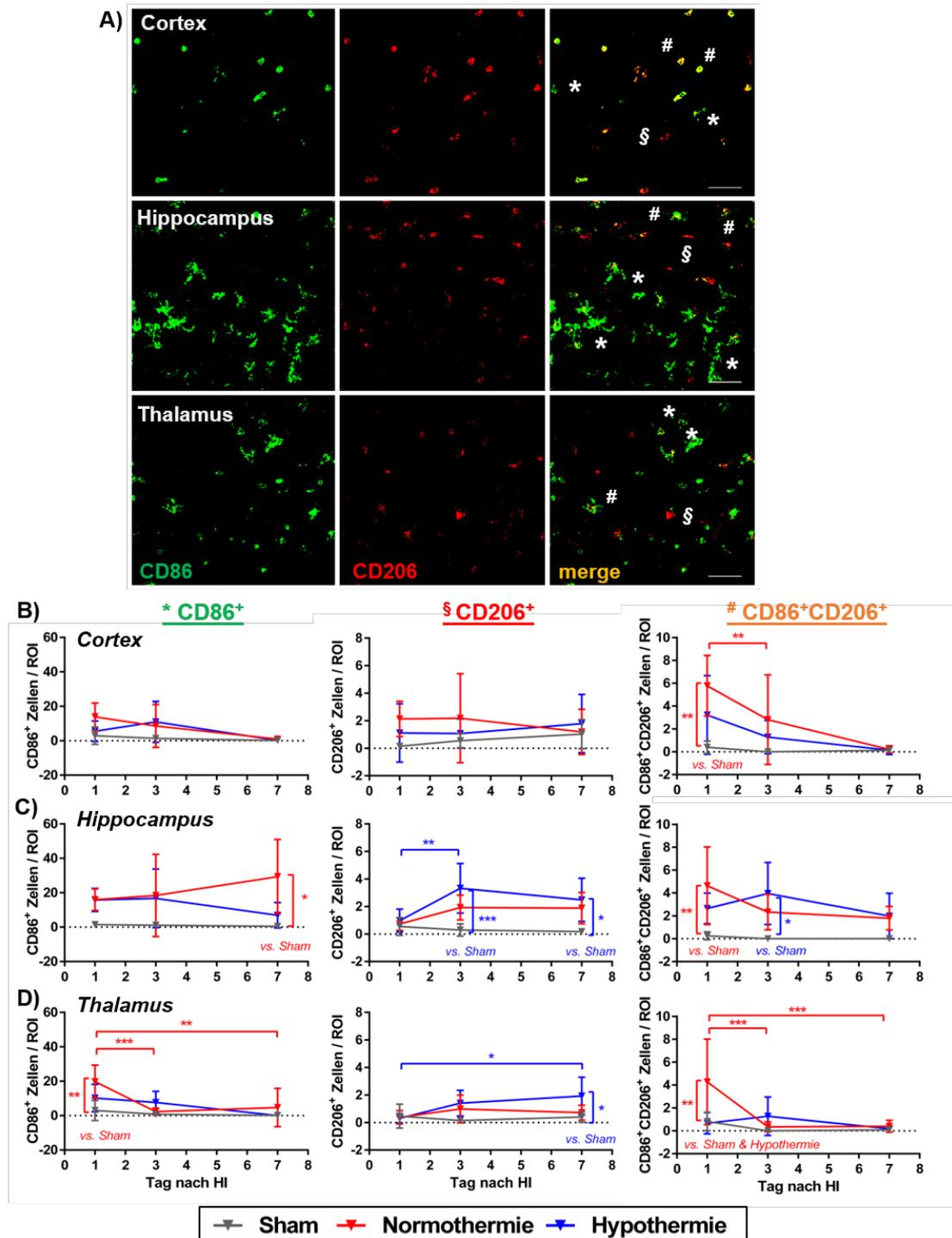


Abbildung 10: Einfluss einer HI auf die Expression der M1- und M2-Marker CD86 und CD206 im Zeitverlauf. Mithilfe einer Kombinationsfärbung für den M1-Marker CD86 (grün) und den M2 Marker CD206 (rot) wurden jeweils CD86 einzeln positive (Sternchen), CD206 einzeln positive (Paragrafenzeichen) und CD86/CD206 doppelt positive (Raute) Zellen ausgezählt. In (A) dargestellt sind exemplarische Aufnahmen aus unterschiedlichen Regionen in einem HI-geschädigten Tier 1 Tag nach HI (Maßstabsbalken: 50 µm). Die Anzahl CD86 und CD206 einzeln positiver sowie doppelt positiver Zellen wurde in definierten Regionen des Cortex (B), Hippocampus (C) und Thalamus (D) der ipsilateralen Hemisphären untersucht. n=7 Tiere / Gruppe. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Rote und blaue Vergleichsbalken und Symbole stellen

Ergebnisse der statistischen Analyse für Normothermie- bzw. Hypothermie-behandelte HI-Tiere dar.

Zusammenfassend zeigte sich eine akute Hochregulation des pro-inflammatorischen M1 Markers CD86, der im Verlauf zunächst herunterreguliert wurde. Interessanterweise kam es 7 Tage nach HI zu einem erneuten Anstieg in HI-geschädigten Tieren, der jedoch in Hypothermie-behandelten Tieren schwächer ausgeprägt war, was auf einen nachhaltigen Effekt einer akuten Hypothermiebehandlung hinweist. Diese Regulation beschränkte sich hauptsächlich auf den Hippocampus, die Region mit der stärksten zellulären Schädigung infolge einer neonatalen HI (Abb. 6 und 7). Im Thalamus wurde eine erhöhte CD206 Expression vor allem in Hypothermie-behandelten Tieren nachgewiesen, die ebenso etwas früher im Hippocampus beobachtet wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Hypothermie sehr differenzierte Effekte auf die myeloide Zellpolarisation hat, die eher mit einer Reduktion pro-inflammatorischer M1 Moleküle (CD86) und einer Erhöhung anti-inflammatorischer M2 Moleküle (CD206) assoziiert ist. Diese umfangreichen Analysen beschränkten sich jedoch auf sehr eingegrenzte Regionen, die keine vollumfängliche Aussage über die gesamte myeloide Zellpopulation und deren Polarisierung im hypoxisch-ischämischen Gehirn zulassen. Daher wurden in einem nächsten Schritt alle myeloiden Zellen einer gesamten Hemisphäre für ein breites Spektrum vorgeschlagener M1 und M2-Marker untersucht.

3.4 Die Hypothermie reguliert die myeloide Zellpolarisierung nach neonataler Hypoxie-Ischämie

Um den Einfluss einer HI und Hypothermie selektiv auf myeloide Zellen zu untersuchen, erfolgte eine *ex vivo* Zellsortierung aus Hirnlysaten gesunder Sham-Tiere und aus HI-Tieren, die eine Normothermie oder Hypothermie erhielten. Die Sortierung erfolgte mittels MACS für den zellspezifischen Oberflächenmarker CD11b (Hellstrom Erkenstam et al., 2016; Murray and Wynn, 2011). Um eine ausreichend hohe Zellzahl zu erhalten, wurde in Vorversuchen ermittelt, dass 2 Hemisphären gepoolt werden mussten, um die im Weiteren angestrebten Genexpressionsanalysen durchzuführen.

3.4.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung sortierter myeloider CD11b⁺ Zellen aus dem Gehirn

Die Reinheit der Zellpopulation nach MACS-Sortierung wurde in jedem Experimentalansatz durchflusszytometrisch überprüft und unterschied sich zwischen den untersuchten Experimentalgruppen nicht, sodass mögliche Störeinflüsse durch unterschiedliche Reinheiten auf die geplanten Genexpressionsanalysen ausgeschlossen werden konnten (Abb. 11 A, B). Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass die neonatale HI eine ausgeprägte periphere Immunzellinfiltration induziert, d.h. die mittels MACS aufgereinigten CD11b positiven Zellen enthielten neben Mikrogliazellen auch Makrophagen/Monozyten, die aus dem Blut infolge der HI-Schädigung infiltriert sind (Abb. 11 C).

In Normothermie-behandelten HI-Tieren wurde an Tag 1 nach HI im Vergleich zu Hypothermie-behandelten HI-Tieren und gesunden Sham-Tieren ein signifikant erhöhter Anteil peripherer Makrophagen ermittelt (Abb. 11 D). Wenngleich die initial erhöhte Anzahl an Makrophagen in Normothermie-behandelten HI Tieren über die Zeit abnahm, so war diese bis Tag 7 gegenüber Sham-Tieren und Hypothermie-behandelten HI-Tieren weiterhin leicht erhöht (Abb. 11 D).

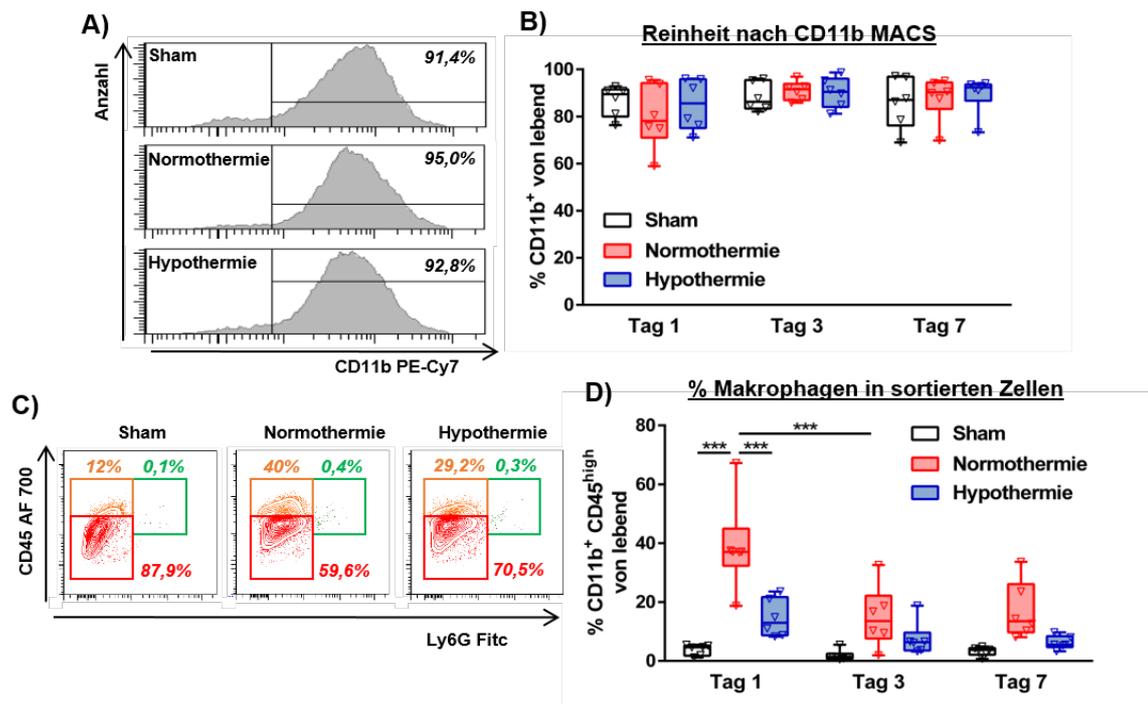


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Charakterisierung von sortierten myeloiden Zellen aus Mausgehirnlysaten nach MACS. Für die Isolation myeloider Zellen aus dem Gehirn wurden die Gewebe zunächst über Verwendung des Neural Tissue Dissociation Kit homogenisiert und anschließend $CD11b^+$ Zellen mittels MACS sortiert. Zur Überprüfung der Reinheit und Zusammensetzung der isolierten Zellen wurde ein Aliquot der gewonnenen Zellen durchflusszytometrisch anhand ihrer $CD11b$, $CD45$ und $Ly6G$ Expression charakterisiert. Das Gate zur Identifikation von $CD11b^+$ Zellen in (A) wurde pro Experimentalansatz anhand des $CD11b$ -negativen MACS Eluats gesetzt. Zur Quantifizierung wurde der prozentuale Anteil $CD11b$ positiver Zellen in allen lebenden Zellen ermittelt (B). Um den Anteil peripher infiltrierter myeloider Zellen in der sortierten Zellpopulation zu analysieren, wurden folgende Populationen unterschieden: $CD11b^+Ly6G^-$ mit geringer $CD45$ Expression (Mikroglia, rotes Gate), $CD11b^+Ly6G^-$ mit hoher $CD45$ Expression (periphere Makrophagen, orangenes Gate) und $CD11b^+Ly6G^+CD45^+$ (Neutrophile, grünes Gate) (C). Quantifiziert wurde der Anteil peripherer Makrophagen in allen lebenden Zellen (D). Die exemplarischen Histogramme (A) und Counter Plots (C) stammen aus einem Experimentalansatz vom Zeitpunkt 1 Tag nach HI. $n=12$ Tiere / Gruppe und Zeitpunkt (2 Hemisphären gepoolt pro Messung), $***p<0,001$

Basierend auf den zuvor dargestellten immunhistochemischen Analysen (Abb. 10), wurde in den durchflusszytometrischen Analysen der sortierten Zellen zusätzlich der Anteil $CD86$ positiver und $CD206$ positiver Zellen ermittelt, da diese Methode eine objektive Quantifizierung in der myeloiden Zellpopulation der gesamten Hemisphäre ermöglicht (Abb. 12 A). Darüber hinaus konnte in dieser Analyse zwischen residenten Mikroglia und peripher infiltrierten Makrophagen anhand ihrer $CD45$ Expression unterschieden werden (Abb. 12 B-D).

Analog zu den immunhistochemischen Untersuchungen (Abb. 10), war der Anteil $CD86$ einzeln positiver Zellen in HI-Tieren unabhängig von der Behandlung vor

allem akut nach HI am höchsten (Abb. 12 B-D). Darüber hinaus wurde wie zuvor im Hippocampus auch hier ein signifikant erhöhter Anteil dieser Zellen in Normothermie-behandelten Tieren im Vergleich zu Hypothermie-behandelten und gesunden schein-operierten Kontrolltieren 7 Tage nach HI detektiert (Abb. 12 A, B). Ebenso bestätigte sich die akute Erhöhung CD86/CD206 doppelt positiver Zellen in HI-geschädigten Tieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren (Abb. 12 C). Auch für CD206 wurden Ähnlichkeiten zur immunhistochemischen Untersuchung im Hippocampus festgestellt, mit einer signifikanten Erhöhung der Anzahl zwischen Tag 1 und Tag 3 in der Hypothermiegruppe (Abb. 12 D).

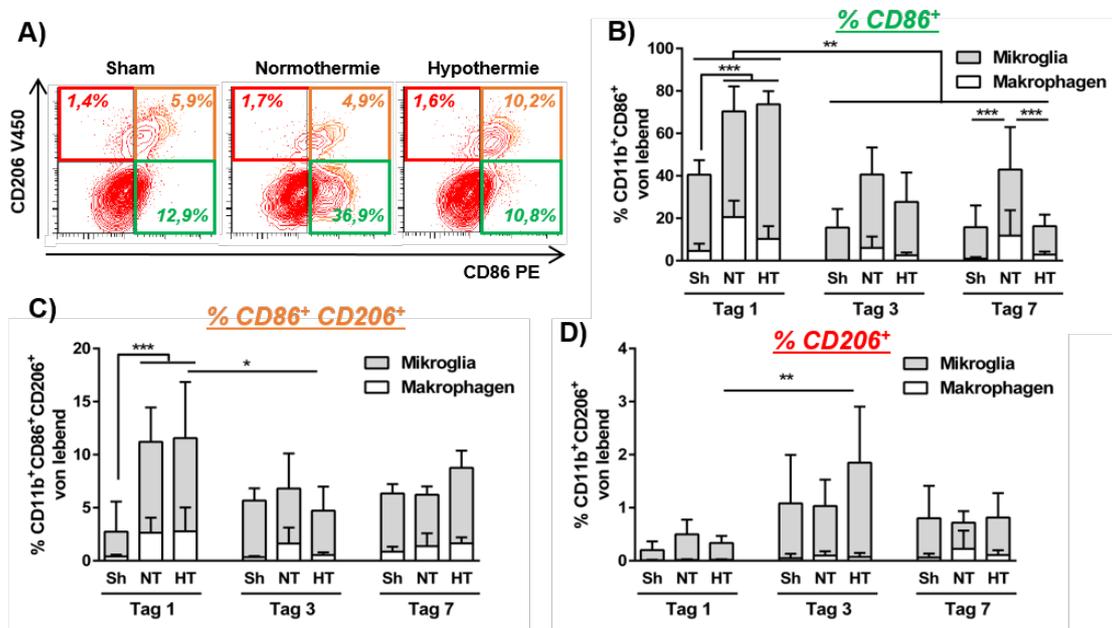


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse CD86- und CD206 positiver Zellen in MACS-sortierten CD11b⁺ myeloiden Zellen aus Mausgehirnlysaten. Zur Analyse der CD11b⁺ sortierten Zellen aus Gehirngewebe von gesunden Sham-Tieren (Sh), Normothermie-behandelten (NT) und Hypothermie-behandelten (HT) HI Tieren wurde der Anteil CD86 einzeln positiver Zellen (A, grünes Gate), CD86/CD206 doppelt positiver Zellen (A, orangenes Gate) und CD206 einzeln positiver Zellen (A, rotes Gate) durchflusszytometrisch analysiert. Die prozentualen Anteile der Zellen wurden in peripheren Makrophagen (orangene Population in A, weiße Balken in B-D), in residenten Mikrogliazellen (rote Population in A, graue Balken in B-D) und in der gesamten CD11b⁺ Population quantifiziert (B-D). In den Graphen (B-D) abgebildet sind die Ergebnisse der statistischen Analyse für die gesamte CD11b⁺ Population. Die Ergebnisse der statistischen Vergleiche getrennt nach Zellpopulation sind in Tabelle 14. zusammengefasst. Die exemplarischen Counter Plots in (A) stammen aus einem Experimentalansatz vom Zeitpunkt 7 Tage nach HI. n=12 Tiere / Gruppe und Zeitpunkt (2 Hemisphären gepoolt pro Messung), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Neben diesen Ähnlichkeiten zwischen beiden Analysemethoden wurden auch Unterschiede deutlich. So wurde immunhistochemisch z.B. im Hippocampus Normothermie-behandelter Tiere 7 Tage nach HI eine erhöhte Anzahl CD86 einzeln positiver Zellen im Vergleich zu Tag 1 und 3 nach HI beobachtet (Abb. 10C). In der durchflusszytometrischen Analyse hingegen wurde nach initialem Anstieg an Tag 1 eine anhaltende Reduktion bis zu Tag 7 nach HI detektiert (Abb. 12 B). Daneben zeigte sich in durchflusszytometrischen Analysen eine leichte Regulation in Sham-Tieren mit erhöhten Werten für CD86 einzeln und CD86/CD206 doppelt positive Zellen an Tag 1 im Vergleich zu Tag 3 und 7 (Abb. 12 C, D). Diese akuten Effekte in Sham-Tieren wurden immunhistochemisch in den in dieser Arbeit untersuchten Regionen nicht detektiert (Abb. 10 B-D). Dies verdeutlicht, die Vor- und Nachteile beider Methoden, die zum einen Aussagen über die lokalen zellulären Reaktionen im Kontext mit der Gewebeschädigung in spezifischen Regionen zulassen (Immunhistochemie) und zum anderen eine generelle Aussage über die zelluläre Modulation in der gesamten geschädigten Hemisphäre ermöglichen (Durchflusszytometrie).

Ein wesentlicher Vorteil, der sich aus der durchflusszytometrischen Analyse zusätzlich ergab, war eine differenzierte Analyse getrennt nach residenten Mikroglia und peripheren Makrophagen. Während hier für beide Populationen zum Teil ähnliche Regulationen beobachtet wurden, wie z.B. für den signifikanten Anstieg von CD86/CD206 doppelt positiven Zellen (Abb. 12 C, Tabelle 14), so wurden jedoch auch Unterschiede ermittelt. Dies betraf unter anderem z.B. den Anteil CD86 einzeln positiver Zellen 1 Tag nach HI, der lediglich in Makrophagen Normothermie-behandelter HI-Tiere im Vergleich zu Sham Tieren signifikant erhöht war, während für Mikroglia eine signifikante Erhöhung in Hypothermie-Tieren detektiert wurde (Abb. 12 B, Tabelle 14). Im Gegensatz dazu wurde in Makrophagen für Hypothermie-behandelte Tiere eine Reduktion CD86 einzeln positiver Zellen im Vergleich zu Normothermie-Tieren ($p=0,065$) beobachtet (Abb. 12 B, Tabelle 14). Für CD206 einzeln positive Zellen hingegen zeigte sich, dass der Anstieg in der Gesamtpopulation der CD11b⁺ Zellen vor allem durch eine Regulation in Mikroglia hervorgerufen wurde, während kaum CD206 einzeln

positive Zellen in der Makrophagenpopulation nachzuweisen waren (Abb. 12 C, Tabelle 14).

Tabelle 14: Zusammenfassung der statistischen Analyse zur Regulation der CD86 und CD206 Expression in Mikroglia und Makrophagen. Pro Zelltyp wurde eine Two-Way ANOVA (Gruppe x Zeitpunkt) durchgeführt und ein Tukey post hoc Test angeschlossen, dessen p-Werte in der Tabelle für die wichtigsten Vergleiche dargestellt sind, angeschlossen.

	Mikroglia			Makrophagen		
	CD86 ⁺	CD86 ⁺ CD206 ⁺	CD206 ⁺	CD86 ⁺	CD86 ⁺ CD206 ⁺	CD206 ⁺
Sh = Sham						
NT = Normothermie						
HT = Hypothermie						
Sh d1 vs. NT d1	0,4902	0,008	0,9927	0,0004	0,0308	> 0,9999
Sh d1 vs. HT d1	0,0045	0,0056	> 0,9999	0,7017	0,0175	> 0,9999
NT d1 vs. HT d1	0,5273	> 0,9999	0,9999	0,0656	> 0,9999	> 0,9999
Sh d3 vs. NT d3	0,1198	> 0,9999	> 0,9999	0,6823	0,5681	0,9986
Sh d3 vs. HT d3	0,8628	0,9982	0,3955	0,9983	> 0,9999	> 0,9999
NT d3 vs. HT d3	0,8864	0,9993	0,2346	0,9737	0,76	> 0,9999
Sh d7 vs. NT d7	0,2798	> 0,9999	0,9977	0,0398	0,9968	0,4227
Sh d7 vs. HT d7	> 0,9999	0,9786	> 0,9999	0,9996	0,9552	0,9995
NT d7 vs. HT d7	0,1911	0,8753	0,999	0,1562	> 0,9999	0,805
Sh d1 vs. Sh d3	0,0756	0,6263	0,2337	0,9069	> 0,9999	0,9998
Sh d1 vs. Sh d7	0,0614	0,5661	0,771	0,9663	0,9984	0,998
Sh d3 vs. Sh d7	> 0,9999	> 0,9999	0,9916	> 0,9999	0,9962	> 0,9999
NT d1 vs. NT d3	0,366	0,4597	0,9056	0,0016	0,8175	0,9683
NT d1 vs. NT d7	0,1408	0,3353	> 0,9999	0,1779	0,5829	0,1361
NT d3 vs. NT d7	0,9998	> 0,9999	0,9121	0,696	> 0,9999	0,7386
HT d1 vs. HT d3	< 0,0001	0,1174	0,0018	0,3027	0,0307	0,9979
HT d1 vs. HT d7	< 0,0001	0,9804	0,9549	0,357	0,7063	0,9479
HT d3 vs. HT d7	0,706	0,6427	0,0526	> 0,9999	0,751	> 0,9999

Wenngleich diese detaillierten Analysen verdeutlichen, dass differenzierte Analysen für Mikroglia und Makrophagen sinnvoll erscheinen, so sollte zunächst ein größeres Spektrum an Markern über mRNA-Expressionsanalysen in der Gesamtpopulation untersucht werden.

3.4.2 Modulation myeloider Zellen infolge einer HI und HT

Um die Polarisierung der myeloiden Zellen zu klassifizieren, wurde ein breites Spektrum an Molekülen mittels quantitativer *real time PCR* untersucht. Die Auswahl der Marker erfolgte anhand publizierter Studien aus experimentellen Arbeiten der adulten und neonatalen Hirnschädigung (Tabelle 16 im Anhang).

Um zunächst einen Überblick über den zeitlichen Verlauf und den Einfluss einer HI und HT auf die Expression der dargelegten Marker zu erhalten, wurden die Mittelwerte der n-fachen Erhöhung im Verhältnis zu Sham-Tieren (*Fold Change*) für jede Experimentalgruppe ermittelt und mittels einer Farbcodierung zusammenfassend in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Mittelwerte der *Fold Change*-Werte (*n*-fache Expression im Verhältnis zu Sham-Kontrolltieren) des jeweiligen Zeitpunkts mit farblicher Codierung (siehe Legende).

		Tag 1 nach HI		Tag 3 nach HI		Tag 7 nach HI	
		Normo-thermie	Hypo-thermie	Normo-thermie	Hypo-thermie	Normo-thermie	Hypo-thermie
immunmod	Gal-3	91,65	30,52	102,96	16,82	21,55	9,07
M2	YM-1	58,55	3,86	1,04	0,49	3,39	0,84
M1	IL-23	29,10	12,49	9,65	8,10	18,50	5,30
M2	Arg-1	22,31	3,97	1,49	1,39	18,08	3,04
M1	CCL-2	4,23	3,29	0,91	0,76	0,81	0,68
M1	IL-1 β	3,22	2,29	4,70	6,54	8,72	4,16
M1	CXCL-1	2,65	1,90	1,63	1,45	1,14	0,48
M1	iNOS	2,58	1,05	0,21	0,28	0,60	0,41
M1	Cox-2	2,51	1,12	1,09	0,88	0,64	0,49
M1	IL-6	2,24	1,37	0,47	0,70	0,58	0,46
M1	TNF α	1,69	1,84	0,72	0,75	0,56	0,45
M2	TGF- β	1,57	0,79	0,78	0,79	0,50	0,47
M2	IL-10	1,15	0,82	0,46	0,53	0,53	0,47
M2	Fizz	1,17	0,66	0,05	0,09	0,11	0,12
immunmod	SOCS-3	1,05	0,83	0,83	0,88	0,48	0,31
M1	IL-18	1,09	0,66	0,68	0,69	0,60	0,57

Legende:

0 - 0,5	0,5 - 1,0	1,0 - 2,0	2,0 - 5,0	5,0 - 10,0	10,0 - 20,0	20,0 - 50,0	> 50
---------	-----------	-----------	-----------	------------	-------------	-------------	------

Anhand der Tabelle wird bereits deutlich, dass es vor allem zum akuten Zeitpunkt 24 h nach HI zu einer Hochregulation für einen Großteil der analysierten Gene kam, die für bestimmte Moleküle mit einer 20, 60 und 80fach erhöhten Expression zum Teil extrem war. Interessanterweise betraf dies jeweils einen M1-Marker (IL-23), einen immunmodulatorischen Marker (Gal-3) und einen neuroregenerativen M2-Marker (YM-1) (Tabelle 15).

Für alle untersuchten Gene wurde zu diesem akuten Zeitpunkt eine Reduktion infolge der Hypothermiebehandlung beobachtet. Darüber hinaus kam es im

Zeitverlauf für alle Moleküle, bis auf Galectin-3, zu einer weiteren Reduktion der Genexpression sowohl in der Normo- als auch in der Hypothermiegruppe. Für viele Gene wurde zu diesen späteren Zeitpunkten eine geringere Expression als in Sham-Kontrolltieren (Fold Change <1) nachgewiesen (Tabelle 15). Andererseits wurde für einzelne Gene (IL-23, IL-1 β , Gal-3 und Arg-1) bis zu 3 bzw. 7 Tage nach HI eine anhaltend hohe Expression mit 7-20facher Erhöhung in der Normothermiegruppe detektiert, die in der Hypothermiegruppe (mit Ausnahme von Gal-3) bereits an Tag 3 reduziert war (Tabelle 15). Insgesamt zeigte sich jedoch auch in dieser Gruppe an Genen kein klares Muster hinsichtlich der Unterteilung in M1, immunmodulatorisch und M2. Zur differenzierteren Analyse und Darstellung der Effektgrößen und Streuungen werden die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen inkl. statistischer Auswertung in den folgenden Abschnitten detaillierter dargestellt.

3.4.3 Einfluss einer HI und HT auf die Expression typischer M1-Moleküle in myeloiden Zellen des Gehirns

Zunächst sind in den folgenden Abschnitten die Ergebnisse für Marker dargestellt, die den pro inflammatorischen und neurotoxischen M1 Phänotyp repräsentieren. Dazu zählen die typischen M1-assoziierten Enzyme iNOS und Cox-2 (Abb. 13), die Chemokine CCL-2 und CXCL-1 (Abb. 14) und die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-18, TNF α , IL-23 und IL-1 β (Abb. 15).

iNOS ist die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, die durch Mikroglia und Makrophagen vor allem als Reaktion auf inflammatorische Prozesse vermehrt gebildet wird und hohe Mengen des neurotoxischen Sauerstoffradikals Stickstoffmonoxid produziert (Aktan, 2004; Hu et al., 2012). Die Cyclooxygenase 2 (Cox-2) ist ein Enzym, deren Expression bei Entzündungsreaktionen (z.B. nach LPS-Injektion oder durch pro-inflammatorische Zytokine) stark ansteigt (Chandrasekharan and Simmons, 2004). Für beide Gene kam es infolge der HI akut zu einer Hochregulation im Vergleich zu Sham-Kontrolltieren, die durch eine Hypothermie signifikant auf das Niveau der Kontrolltiere herunterreguliert wurde (Abb. 13A-B). Im weiteren Zeitverlauf erfolgte eine starke Abnahme der

Expression unter das Niveau der Kontrolltiere an Tag 3 und 7 nach HI, sowohl in Normo- als auch in Hypothermie-behandelten HI-Tieren (Abb. 13).

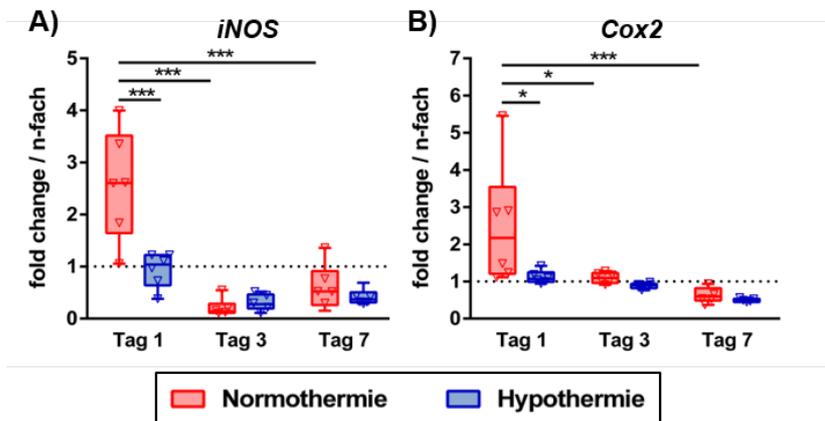


Abbildung 13: Einfluss einer HI und HT auf die Expression der M1- Marker iNOS und Cox-2 in myeloiden Zellen des ZNS. CD11b⁺ Zellen wurden mittels MACS 1, 3 und 7 Tage nach HI und anschließender NT bzw. HT aus der ipsilateralen Hemisphäre isoliert. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte über real-time PCR, wobei β -2-microglobulin als Referenz-Gen fungierte. Als Kontrollen dienten Sham Tiere. n=12 Tiere / Gruppe und Zeitpunkt (2 Hemisphären gepoolt pro Messung) *p<0,05, ***p<0,001

Als weitere Vertreter des M1-Phänotyps wurden charakteristische Chemokine und Zytokine untersucht. Im Speziellen wurden hier die Chemokine CCL-2 und CXCL-1 als Liganden des *C-C-chemokine receptor type 2* (CCR2) und CCR4 bzw. des CXCR2 Rezeptors, die u.a. als chemotaktische Moleküle für die Infiltration peripherer Immunzellen, wie z.B. Monozyten/Makrophagen und Neutrophile wirken, untersucht (Abb. 14). Hier zeigte sich, dass sowohl CXCL-1 als auch CCL-2 an Tag 1 nach Schädigung in der Normo- und der Hypothermie-Gruppe hochreguliert wurden, wobei dieser Effekt in der Hypothermie-Gruppe im Vergleich zur Normothermie-Gruppe weniger stark ausgeprägt war (Abb. 14), was für CCL-2 in einem signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen resultierte (Abb. 14 B). Ähnlich wie für die zuvor analysierten Gene iNOS und Cox-2 kam es im Zeitverlauf sowohl in Normo- als auch in Hypothermie-behandelten Tieren zu einer signifikanten Reduktion der Expression dieser Chemokine nahe dem Kontrollniveau schein-operierter Kontrolltiere (Abb. 14).

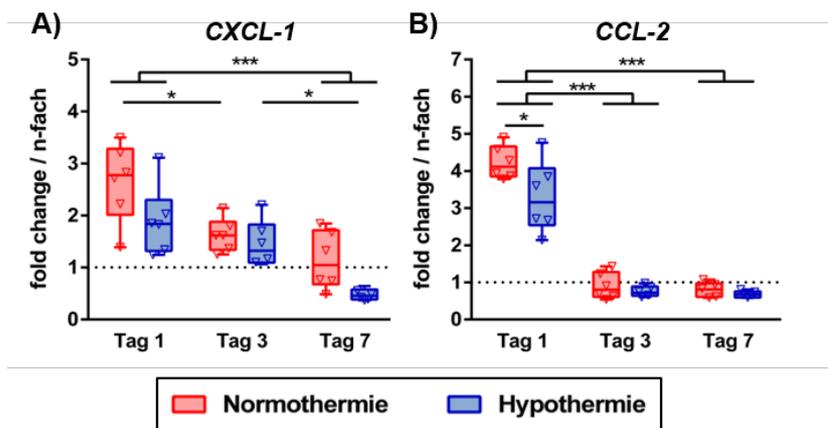


Abbildung 14: Einfluss einer HI und HT auf die Expression der Chemokine CXCL-1 und CCL-2 in myeloiden Zellen des ZNS. CD11b⁺ Zellen wurden mittels MACS 1, 3 und 7 Tage nach HI und anschließender NT bzw. HT aus der ipsilateralen Hemisphäre isoliert. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte über real-time PCR, wobei β -2-microglobulin als Referenz-Gen fungierte. Als Kontrollen dienten schein-operierte Tiere. n=12 Tiere / Gruppe und Zeitpunkt (2 Hemisphären gepoolt pro Messung) *p<0,05, ***p<0,001

Als typische pro-inflammatorische Zytokine, die klassischerweise dem M1-Phänotyp zugeordnet sind, wurden Interleukin IL-6, IL-18, TNF α , IL-23 und IL-1 β analysiert. Im Vergleich zu den vorigen Analysen ergab sich hier ein differenziertes Bild. Während für IL-6 und IL-18 (Abb. 15 A, B) eine ähnliche Regulation wie für die zuvor beschriebenen Moleküle detektiert wurde, so zeigten TNF α , IL-1 β und IL-23 vor allem im Zeitverlauf andere Regulationsmuster. Für IL-6 wurde in beiden HI-Gruppen akut eine erhöhte Expression nachgewiesen, die jedoch in der HT-Gruppe schwächer ausgeprägt war und in einem signifikanten Unterschied im Vergleich zur NT-Gruppe resultierte (Abb. 15 A). Im weiteren Verlauf kam es zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression unter das Niveau gesunder Sham-Tiere (Abb. 15C).

Für IL-18 wurde ein ähnliches Muster detektiert, jedoch war die akute Reduktion der Genexpression in HT-Tieren bereits so deutlich ausgeprägt, dass sie unter dem Niveau von Kontrolltieren lag (Abb. 15 B). Für TNF α wurde auch eine erhöhte Expression in HI-Tieren 1 Tag nach HI detektiert, die im Verlauf unter das Niveau von Kontrolltieren fiel; die Hypothermie hatte hier jedoch keinen Einfluss (Abb. 15 C). Für IL-1 β und IL-23 wurde ebenso eine Hochregulation

detektiert, die durch eine Hypothermie z.T. signifikant reduziert wurde (Abb. 15 D, E).

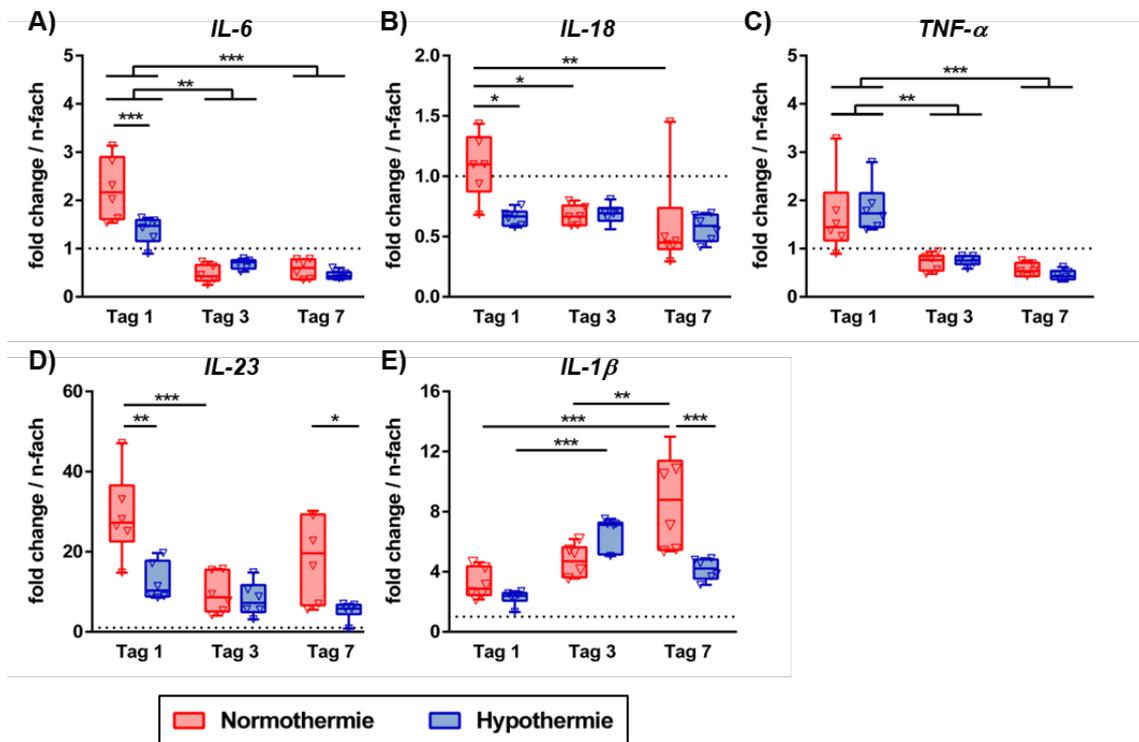


Abbildung 15: Einfluss einer HI und HT auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine in myeloiden Zellen des ZNS. CD11b⁺ Zellen wurden mittels MACS 1, 3 und 7 Tage nach HI und anschließender NT bzw. HT aus der ipsilateralen Hemisphäre isoliert. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte über real-time PCR, wobei β -2-microglobulin als Referenz-Gen fungierte. Als Kontrollen dienten Sham-Tiere. n=12 Tiere / Gruppe und Zeitpunkt (2 Hemisphären gepoolt pro Messung) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Im weiteren Zeitverlauf hingegen kam es nicht zu einer Reduktion auf bzw. unter Kontrollniveau wie für die meisten zuvor betrachteten Gene. So wurde zwar für IL-23 eine Reduktion in der NT-Gruppe beobachtet, dennoch war die Expression anhaltend bis Tag 7 10-15fach höher als in Sham-Kontrolltieren (Abb. 15 D). Interessanterweise kam es in der subakuten Phase an Tag 7 im Vergleich zu Tag 3 zu einer erneuten Hochregulation in NT-behandelten Tieren, während die HT-Gruppe eine weitere Reduktion im Vergleich zu Tag 3 aufwies, was in einem signifikanten Unterschied zwischen Normothermie und Hypothermie an Tag 7 resultierte (Abb. 15 D). Unter allen analysierten M1-Markern zeigte IL-1 β hinsichtlich seiner zeitlichen Regulation ein außergewöhnliches Expressionsmuster. Zwar wurde auch hier anfangs eine erhöhte Expression

infolge einer HI detektiert, diese nahm jedoch im weiteren Verlauf bis Tag 7 nach HI stetig zu (Abb. 15 E). In Hypothermie-behandelten Tieren wurde bis Tag 3 eine ähnliche Regulation wie für Normothermie-Tiere beobachtet. An Tag 7 hingegen erfolgte keine weitere Hochregulation, sondern eine Reduktion, was in einem signifikanten Unterschied zwischen beiden Behandlungsgruppen resultierte (Abb. 15 E).

Zusammenfassend war für nahezu alle untersuchten klassischerweise als M1-Marker-deklarierten Gene eine akute und deutliche Hochregulation insbesondere in Normothermie-behandelten HI-Tieren nachweisbar. Diese Hochregulation war in der Hypothermie-Gruppe für viele Marker signifikant schwächer ausgeprägt bzw. nicht vorhanden. Darüber hinaus reduzierte sich die akute Hochregulation für die meisten Marker im weiteren Verlauf in beiden Gruppen, teilweise unter das Niveau der Sham-Kontrolltiere. Hervorzuheben sind jedoch IL-1 β und IL-23, für die sich nach akuter Hypothermie-Behandlung auch sekundär in der subakuten Schadensphase (Tag 7) signifikante Unterschiede zwischen Normothermie- und Hypothermie-behandelten HI-Tieren ergaben. Diese begründeten sich vor allem in einem sekundären Anstieg bzw. einer stetig steigenden Expression in HI-Kontrolltieren, die in HT-therapierten Tieren für diese Zytokine nicht detektiert wurden.

3.4.4 Einfluss einer HI und HT auf die Expression immunmodulatorischer Moleküle in myeloiden Zellen des Gehirns

Basierend auf vorigen Arbeiten, wurden neben klassischen M1 und M2 Markern auch zwei immunmodulatorische Marker, Galectin-3 und SOCS3, untersucht (Abb. 16). Für beide Marker bestehen bislang unterschiedliche Erkenntnisse, was ihre Rolle in Entzündungs- und Hirnschädigungsprozessen angeht. Für Galectin-3 defiziente Mäuse wurde ein geringeres Schadensausmaß nach neonataler HI beobachtet (Doverhag et al., 2010). Demgegenüber steht jedoch die Beobachtung, dass es in Makrophagen eine alternative Aktivierung des M2-Phänotyps bewirkt (MacKinnon et al., 2008). In ähnlicher Weise wurde für SOCS3 in Mäusen mit SOCS3 defizienten myeloiden Zellen eine erhöhte Anzahl von M1-Markern sowie ein erhöhtes Schadensausmaß der LPS-induzierter

Sepsis (Qin et al., 2012) beobachtet, wohingegen Liu et al. eine essenzielle Rolle von SOCS3 in der Ausbildung des M1 Phänotyps beschrieben (Liu et al., 2008). Galectin-3 zeigte nach neonataler HI in der Normothermie-Gruppe eine starke ca. 90fach erhöhte Expression an Tag 1, die bis Tag 3 anhielt (Abb. 16 A). In Hypothermie-behandelten Tieren war diese Hochregulation mit einer mittleren Erhöhung um den Faktor 30 an Tag 1 bzw. 20 an Tag 3 weniger stark ausgeprägt, was in einem signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen an Tag 1 und 3 nach Schädigung mündete (Abb. 16 A). An Tag 7 glich die Expression von Galectin-3 in Normothermie-behandelten HI-Tieren der von Hypothermie-behandelten Tiere (Abb. 16 A).

Ein weniger eindeutiges Bild ergab sich für SOCS3, dass infolge der HI an Tag 1 und 3 im Vergleich zu Sham-Kontrolltieren kaum moduliert war (Abb. 16 B). Lediglich an Tag 7 kam es zu einer signifikanten Reduktion der Expression im Vergleich zu Tag 1, dies jedoch sowohl für NT- als auch HT-behandelte HI-Tiere (Abb. 16 B).

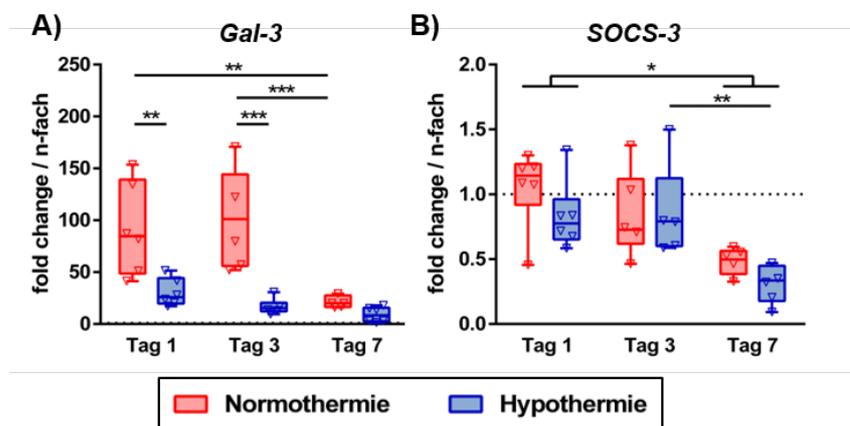


Abbildung 16: Einfluss einer HI und HT auf die Expression der immunmodulatorischen Marker Galectin-3 und SOCS3 in myeloiden Zellen des ZNS. CD11b⁺ Zellen wurden mittels MACS 1, 3 und 7 Tage nach HI und anschließender NT bzw. HT aus der ipsilateralen Hemisphäre isoliert. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte über real-time PCR, wobei β -2-microglobulin als Referenz-Gen fungierte. Als Kontrollen dienten schein-operierte Tiere. n=12 Tiere / Gruppe und Zeitpunkt (2 Hemisphären gepoolt pro Messung) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

3.4.5 Einfluss einer HI und HT auf die Expression typischer M2-Moleküle in myeloiden Zellen des Gehirns

Im folgenden Abschnitt werden typischerweise als M2-assoziierte Moleküle genauer betrachtet. Dazu zählen YM-1, Arg-1, Fizz-1 (Abbildung 17) und die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β (Abbildung 18).

Das Enzym Arginase-1 (Arg-1) fungiert als Gegenspieler zu iNOS, da beide Enzyme um dasselbe Substrat konkurrieren, sodass bei hoher Arginase-Aktivität folglich das Level an neurotoxischem Stickstoffmonoxid sinkt (Colton, 2009). Die Chitinase YM-1 (Chitinase-3 like 3) ist in alternativ aktivierten Makrophagen hochreguliert, was zu der Annahme führte, dass es eine wichtige Rolle in der Auflösung von Entzündungsreaktionen und Geweberegeneration hat (Chang et al., 2001). In ähnlicher Weise wie für YM-1 wurde für Fizz-1 (RELM α) eine Hochregulation in alternativ aktivierten Makrophagen beschrieben (Raes et al., 2002).

Nach neonataler HI kam es zu einer starken Hochregulation von YM-1 und Arg-1 im Vergleich zu gesunden Sham-Kontrolltieren (Abb. 17 A, B). Die Hypothermie-Behandlung bewirkte für beide Moleküle eine Reduktion (Abb. 17 A, B), die für YM-1 signifikant war (Abb. 17 A). Im weiteren Verlauf nahm die Expression in Normothermie-behandelten HI-Tieren rapide ab und glich an Tag 3 der von Hypothermie-behandelten HI-Tieren und Sham-Kontrolltieren (Abb. 17 A, B). Diese Reduktion hielt für YM-1 bis 7 Tage nach Schädigung an (Abb. 17 A), während für Arg-1 vor allem in Normothermie-behandelten Tieren eine erneute Hochregulation beobachtet wurde, die jedoch aufgrund der großen Streubreite nicht signifikant war (Abb. 17 B). Im Gegensatz zu Arg und YM-1 führte eine HI zu keiner akuten Hochregulation von Fizz-1 (Abb. 17 C). Eine HT-Behandlung bewirkte jedoch an Tag 1 nach HI eine starke Reduktion im Vergleich zu gesunden Sham-Kontrolltieren, was in einem signifikanten Unterschied zu Normothermie-behandelten Tieren resultierte (Abb. 17 C).

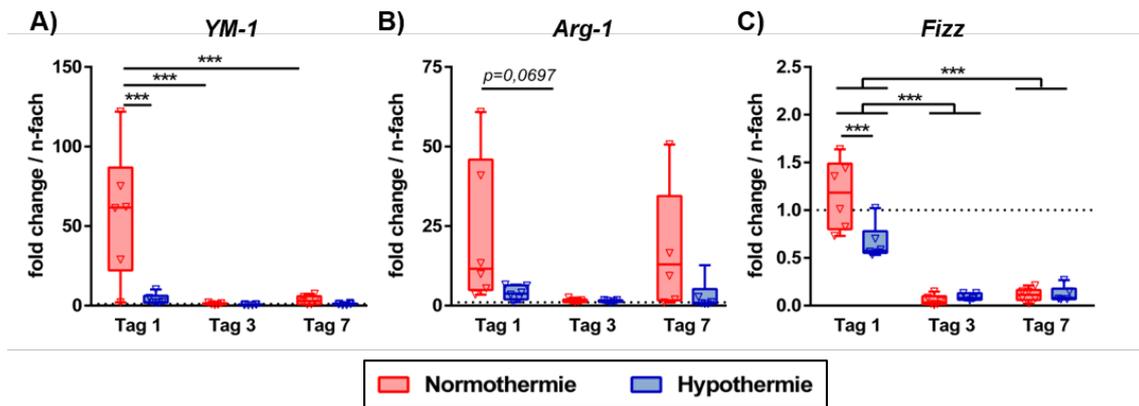


Abbildung 17: Einfluss einer HI und HT auf die Expression neuro-regenerativer M2- Marker in myeloiden Zellen des ZNS. CD11b⁺ Zellen wurden mittels MACS 1, 3 und 7 Tage nach HI und anschließender Normo- bzw. Hypothermie aus der ipsilateralen Hemisphäre isoliert. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte über real-time PCR, wobei β -2-microglobulin als Referenz-Gen fungierte. Als Kontrollen dienten schein-operierte Tiere. n=12 Tiere / Gruppe und Zeitpunkt (2 Hemisphären gepoolt pro Messung) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Als anti-inflammatorische Zytokine wurden IL-10 und TGF- β untersucht. IL-10 führt zu einer verminderten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen (Mosser and Zhang, 2008) und ist als klassischer M2-Marker beschrieben (Mantovani et al., 2004). Für TGF β wurden neben einer immunsuppressiven Wirkung, z.B. über die Induktion von *Forkhead-Box-Protein P3+* (Foxp3⁺) regulatorischen T-Zellen (Chen et al., 2003) auch neuroprotektive Effekte nachgewiesen (Ruocco et al., 1999). Wie für die meisten Gene wurde für IL-10 und TGF- β akut eine Hochregulation beobachtet, die jedoch nicht besonders stark ausgeprägt war (Abb. 18 A, B). Eine HT-Behandlung hingegen bewirkte akut eine Reduktion unter das Niveau von Sham-Kontrolltieren, was für TGF β in einem signifikanten Unterschied zwischen der Normothermie-Gruppe und der Hypothermie-Gruppe resultierte (Abb. 18B). Für beide Gene kam es sowohl in Normothermie-behandelten als auch in Hypothermie-behandelten Tieren zu einer weiteren Reduktion bis 7 Tage nach HI (Abb. 18 A, B).

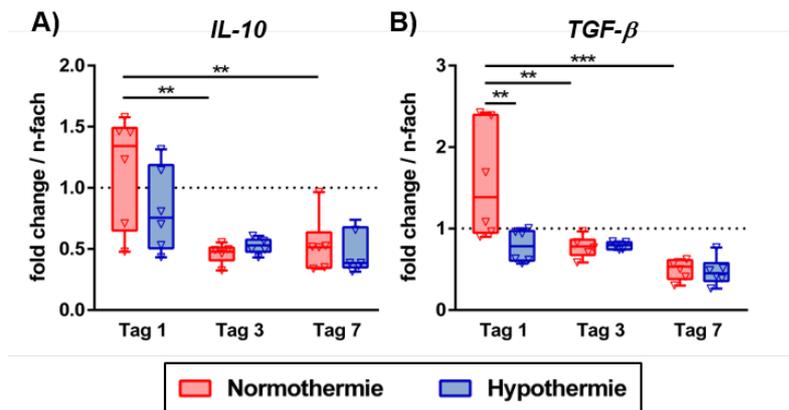


Abbildung 18: Einfluss einer HI und HT auf die Expression anti-inflammatorischer Zytokine in myeloiden Zellen des ZNS. CD11b⁺ Zellen wurden mittels MACS 1, 3 und 7 Tage nach HI und anschließender Normo- bzw. Hypothermie aus der ipsilateralen Hemisphäre isoliert. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte über real-time PCR, wobei β -2-microglobulin als Referenz-Gen fungierte. Als Kontrollen dienten schein-operierte Tiere. n=12 Tiere / Gruppe und Zeitpunkt (2 Hemisphären gepoolt pro Messung) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4 DISKUSSION

Die therapeutische Hypothermie (HT) ist die obligate Standardtherapie für die Behandlung der neonatalen hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie (HIE). Dennoch leiden bis zu 30% der überlebenden Kinder aufgrund eines kurzen therapeutischen Zeitfensters von 6 Stunden und einer limitierten Effektivität in schweren Fällen der HIE an langfristigen neurologischen Defiziten (Jacobs et al., 2013; Shankaran et al., 2017). Trotz einer Großzahl an präklinischen Studien zur Identifikation möglicher adjuvanter Therapien hat es bisher keine der vorgeschlagenen Behandlungen in die klinische Anwendung geschafft (Davidson et al., 2015). Eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung gezielter Therapien ist ein genaues Verständnis der HIE-Pathophysiologie im Allgemeinen und der spezifischen Effektormechanismen der HT im Speziellen. In Anbetracht der komplexen und zeitlich unterschiedlich einsetzenden aber auch überlappenden pathophysiologischen Prozesse (Abb. 1, (Ferriero, 2004), stellt die systematische Erfassung der zeitlichen Verläufe eine wesentliche Herausforderung dar. Zentrales Merkmal der HIE-Pathophysiologie sind inflammatorische Reaktionen, wobei myeloide Zellen, das heißt residente Mikroglia und aus dem Blut infiltrierte Makrophagen/Monozyten, eine der wichtigsten zellulären Komponenten sind (Herz et al., 2022; Ziemka-Nalecz et al., 2017). Myeloide Zellen sind durch eine enorme Plastizität gekennzeichnet und können sowohl pro-inflammatorische/neurotoxische Funktionen (klassische Aktivierung, M1-Phänotyp) als auch anti-inflammatorische/neuroregenerative Funktionen (alternative Aktivierung, M2-Phänotyp) übernehmen (Hu et al., 2015; Martinez et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde im Mausmodell der neonatalen HIE, der Hypoxie-Ischämie (HI) gezeigt, dass sich die HT-vermittelte Neuroprotektion über die Zeit entwickelt. Dem nachweisbaren protektiven Effekt in der subakuten Krankheitsphase 7 Tage nach HI ging eine stark reduzierte Expression inflammatorischer Moleküle in myeloiden Zellen 1 Tag nach HI voraus. Dies betraf sowohl Marker der klassischen (M1) als auch der alternativen (M2) Aktivierung. Eine zusätzliche Unterscheidung zwischen residenten Mikroglia und aus der Peripherie infiltrierte Makrophagen zeigte, dass die durch HT

hervorgerufene Suppression inflammatorischer Moleküle mit einer starken Reduktion der Infiltration von peripheren Makrophagen assoziiert war. Darüber hinaus führte die HT neben einer akuten Inhibition eines Großteils untersuchter Moleküle auch zu einer sekundären Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine in myeloiden Zellen.

Zahlreiche Studien belegten eine signifikante Neuroprotektion durch HT in der subakuten Krankheitsphase 7-8 Tage nach HI (Carlsson et al., 2012; Herz et al., 2018b; Reinboth et al., 2016; Sabir et al., 2012). Publierte Daten hinsichtlich eines Schutzes in der frühen Krankheitsphase waren jedoch diskrepant. Während einige Arbeiten im Nager- als auch im Großtiermodell eine reduzierte Apoptoserate 6 bzw. 48 Stunden nach HI zeigten (Lafuente et al., 2016; Shah et al., 2021), so konnte dies in anderen Arbeiten vor allem in Regionen mit starker Schädigung, z.B. im Hippocampus, nicht bestätigt werden (Klofers et al., 2017; Kovacs et al., 2020; Xiong et al., 2013). Sowohl im neonatalen Schweinchen- als auch im Rattenmodell wurde 48 Stunden nach HI und HT keine signifikante Protektion in dieser Region nachgewiesen (Klofers et al., 2017; Kovacs et al., 2020). In einer weiteren Arbeit, die 24 Stunden nach HI/HT im Rattenmodell analysierte, wurden ebenso keine Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen detektiert (Xiong et al., 2013). Im Einklang mit diesen publizierten Daten wurde auch in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied in der Anzahl degenerierender TUNEL-positiver Zellen 24 Stunden nach HI beobachtet. Vielmehr hat sich der neuroprotektive Effekt durch die HT erst in der subakuten Phase zwischen Tag 3 und Tag 7 nach HI deutlich gezeigt. So wurde bereits an Tag 3 ein Trend zu einer reduzierten Anzahl degenerierender Zellen im Hippocampus von HT-behandelten Tieren beobachtet. Diese Daten unterstützten Analysen von Zhu et al, die 4 Tage nach HI eine signifikante Reduktion an TUNEL-positiven Zellen in HT-behandelten Tieren im Vergleich zu Normothermie (NT)-behandelten Kontrolltieren detektiert haben (Zhu et al., 2004).

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Trend zu einer reduzierten Apoptose 3 Tage nach HI impliziert, dass die HT möglicherweise bereits zu frühen Zeitpunkten HI-induzierte Pathomechanismen, die zu Zelluntergang führen, abmildert. An Tag 7 nach HI wurden die an Tag 3 beobachteten Tendenzen sehr

deutlich. Sowohl die neuropathologische Beurteilung also auch die Analyse des neuronalen Zellverlusts und der Gewebeatrophie belegten signifikante Unterschiede zwischen beiden Behandlungsgruppen 7 Tage nach HI. Dies könnte einerseits darauf hindeuten, dass eine HT vor sekundärem Zelluntergang schützt und andererseits, dass eine HT auch sekundär regenerative Effekte induziert. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Arbeit von Xiong et al., die zeigte, dass eine HT die Anzahl unreifer und reifer Neurone im Vergleich zur NT-Kontrollgruppe 7 und 14 Tage nach HI erhöht (Xiong et al., 2011a). Darüber hinaus haben Kwak et al. gezeigt, dass die Hypothermie teilweise vor dem HI-induzierten Verlust von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen schützt (Kwak et al., 2015). Der Effekt einer HT auf die neuronale Regeneration und Proliferation ist Gegenstand aktueller Untersuchungen, insbesondere deshalb, da viele neue Therapieansätze wie die Gabe von Wachstumsfaktoren, mesenchymaler Stammzellen und Lithium im Bereich der Neurogenese wirken (Donega et al., 2013; Im et al., 2010; Li et al., 2011).

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Effektormechanismen einer HT im Zeitverlauf mit besonderem Fokus auf neuroinflammatorische Reaktionen. Ähnlich wie für die neuronale Zelldegeneration wurden zum Zeitpunkt der maximalen Iba-1-Expression 3 Tage nach HI keine signifikanten Unterschiede zwischen NT- und HT-behandelten Tieren beobachtet. Dies wird durch Korrelationsanalysen mit den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten unterstützt (Seitz et al., 2021). Hier zeigte sich in allen untersuchten Regionen eine signifikante positive Korrelation zwischen der Anzahl apoptotischer Zellen bzw. des neuronalen Zellverlust und der Iba-1 Immunreaktivität 3 Tage nach HI (Seitz et al., 2021). Hinsichtlich der Wirkmechanismen einer HT im Zeitverlauf wird vermutet, dass sie die HI-induzierte Neurodegeneration und assoziierte pathophysiologische Effekte wie bspw. Mikrogliaaktivierung lediglich verzögert (Trescher et al., 1997).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen nicht direkt für diese Hypothese, da 7 Tage nach HI ein deutlicher neuroprotektiver Effekt einer HT nachgewiesen werden konnte, der jedoch nicht von einem Unterschied in der Iba-1 Immunreaktivität begleitet wurde. Diese Differenzen lassen vermuten, dass

weitere Effektormechanismen unabhängig von myeloiden Zellen eine Rolle spielen. Nichtsdestotrotz, zeigt die durch HT-vermittelte Suppression des kontinuierlichen Anstiegs an CD86 und IL-1 β bis zu 7 Tage nach HI, dass auch sekundäre mitunter bis in die tertiäre Phase anhaltende chronische Inflammationsprozesse (Fleiss and Gressens, 2012) durch eine akute HT verändert werden. Inwiefern es sich bei diesen späten Einflüssen einer akut angewendeten HT nicht doch um eine Verzögerung der pathophysiologischen Prozesse handelt, gilt es in weitere Analysen, die spätere Analysezeitpunkte miteinschließen, herauszufinden. Andererseits sollte in Betracht bezogen werden, dass die Iba-1-Immunreaktivität nur limitierte Aussagen über die Funktion und den Phänotyp der Zellen zulässt, die nicht in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt sondern auch von der Gewebeumgebung, das heißt von der untersuchten Region variieren können (Fleiss et al., 2021; Jacobs et al., 2019; Savchenko et al., 2000). Neben Zeitverlaufsanalysen sind regionale Untersuchungen zur Beurteilung von Wirkmechanismen potentiell neuroprotektiver Therapien in Modellen der HIE essentiell. Sowohl in der Analyse der Zelldegeneration als auch der neuronalen Dichte präsentiert sich der Hippocampus als am stärksten geschädigte Region. Dies korreliert mit Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Herz et al., 2018b; Reinboth et al., 2016). Interessanterweise ist auch die Iba-1-Immunreaktivität als genereller Marker für Mikrogliaaktivierung (Kozlowski and Weimer, 2012) in diesem Bereich am stärksten ausgeprägt. Regionale Unterschiede sollten zudem bei der Interpretation der Ergebnisse, die einerseits mittels Immunhistochemie in definierten Regionen und andererseits mittels Durchflusszytometrie in myeloiden Zellen der gesamten Hemisphäre ermittelt wurden, berücksichtigt werden. Beispielsweise wurde in HI-geschädigten NT-behandelten Tieren ein sekundärer Anstieg an CD86 einzeln positiver Zellen zwischen 3 und 7 Tagen selektiv im Hippocampus beobachtet, während in der gesamten Zellpopulation aus einer Hemisphäre eine kontinuierliche Abnahme dieser Zellen beobachtet wurde. Diese Beobachtungen unterstreichen, dass Mikroglia/Makrophagen sich in ihrem Phänotyp und ihrer Funktion in Abhängigkeit von der Gehirnregion unterscheiden können. So wurde z.B. gezeigt, dass eine intrazerebroventrikuläre Injektion von

Chlordronat-Liposomen zur Reduktion von mikroglialen Zellen im Bereich der Amygdala und des medialen Septums den neuronalen Zelltod reduziert, in Teilen des Hippocampus jedoch erhöht (Jacobs et al., 2019). In vielen anderen Bereichen des ZNS wurde durch diese Intervention jedoch keine Veränderung beobachtet (Jacobs et al., 2019).

Trotz der heterogenen Wirkung einer HT hinsichtlich Zeitpunkt und Region haben sowohl immunhistochemische und durchflusszytometrische Analysen der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die HI eine akute Hochregulation des pro-inflammatorischen M1-Moleküls CD86 in myeloiden Zellen bewirkt, die durch eine HT 7 Tage nach HI herunterreguliert wird. Darüber hinaus zeigte sich, dass eine HT Behandlung zu einer Erhöhung der Expression des M2-Moleküls CD206 3 Tage nach HI führt. Diese Daten legen nahe, dass eine HT die myeloide Zellpolarisation von einem neurotoxischen M1 zu einem neuroprotektiven und -regenerativen M2-Phänotyp verändert. Hervorzuheben bleibt jedoch, dass sowohl in immunhistochemischen als auch durchflusszytometrischen ein nicht unerheblicher Anteil CD86/CD206 doppelt positiver Zellen detektiert wurde. Dies ist im Einklang mit vorigen Publikationen im gleichen Modell (Hellstrom Erkenstam et al., 2016). Daher scheint das Konzept der strikten Unterteilung zwischen einem schädigenden M1 und einem protektiven M2 Phänotyp zu stark vereinfacht und für die Situation im lebenden Organismus limitiert, um die Rolle der myeloiden Zellen im Kontext der HI und HT-Behandlung in Gänze zu erklären. Unterstützt wird dies durch anhaltende Diskussionen in verschiedenen (neuro)immunologischen Krankheitsmodellen (Murray et al., 2014; Nahrendorf and Swirski, 2016).

Abweichend von der Ausgangshypothese: „Die Hypothermie führt zu einer reduzierten Expression pro-inflammatorischer M1-Moleküle und einer Erhöhung anti-inflammatorischer M2-Marker“ wurde in der vorliegenden Arbeit für den Großteil der untersuchten Gene, unabhängig von ihrer Klassifizierung eine Reduktion der Expression in HT-behandelten Tieren beobachtet. Dies unterscheidet sich von Studien im adulten Schlaganfallmodell, in denen Veränderungen entsprechend der oben beschriebenen Hypothese gezeigt wurden (Lee et al., 2016; Liu et al., 2018). Die Pathophysiologie des

Schlaganfalls im Erwachsenen ähnelt der HIE im Neonaten nur bedingt. Daher können Konzepte und Therapieansätze nicht direkt übertragen werden. Dies begründet sich vor allem in wesentlichen Unterschieden hinsichtlich des Immunsystems und des Gehirns, die sich zum Zeitpunkt des Insults noch in der Entwicklung befinden. Physiologische Unterschiede im Immunsystem umfassen beispielsweise eine erhöhte Frequenz von Monozyten und regulatorischen T-Zellen im Blut des Neonaten verglichen mit Erwachsenen (Prabhu et al., 2016). Darüber hinaus unterscheidet sich das neonatale Gehirn von dem des Erwachsenen maßgeblich, z.B. hinsichtlich Oligodendrogenese und Myelinisierungsgrad (Qiu et al., 2015; van Dyck and Morrow, 2017). Auch die Mikrogliazellen befinden sich noch in der Entwicklung. So erfolgt die Differenzierung von mikroglialen Vorläuferzellen in residente Mikroglia in Nagern erst ab dem 15. postnatalen Tag (Dalmau et al., 1998). Vor diesem Hintergrund können neuroinflammatorische Prozesse und deren Relevanz für die zerebrale Schädigung im Neonaten einer grundlegend anderen Regulation unterliegen. So wirkt zum Beispiel eine genetische Deletion des immunmodulatorischen Moleküls Galectin-3 (Gal-3) neuroprotektiv in neonatalen Mäusen, während im Modell der adulten ischämischen Hirnschädigung größere Infarktareale detektiert wurden (Doverhag et al., 2010; Lalancette-Hebert et al., 2012). In ähnlicher Weise wurde von der Arbeitsgruppe in einer vorigen Studie gezeigt, dass die immunmodulatorische Substanz Fingolimod, die im adulten Schlaganfallmodell protektiv wirkt (Kraft et al., 2013), in der neonatalen HI eine erhöhte Gewebeschädigung verursacht (Herz et al., 2018a). Neben grundsätzlich unterschiedlichen Wirkungen immunmodulatorischer Interventionen, scheint sich auch die zeitliche Abfolge neuroinflammatorischer Reaktionen nach ischämischer Hirnschädigung zwischen neonatalen und erwachsenen Tieren zu unterscheiden. Die Iba-1 Expression erreichte in unseren Daten ihr maximales Ausmaß bereits am 3. Tag nach Schädigung. Im adulten Ischämie-Modell hingegen wurde eine maximale Iba-1 Expression erst am 4.-7. Tag nach Schädigung beobachtet (Ito et al., 2001). Daneben wurde im adulten Modell zwar an Tag 1 ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit ebenfalls kein Effekt einer HT nachgewiesen, jedoch an Tag 3 und 7 (Wang et al., 2002). Ein direkter Vergleich

im HI-Modell zeigte zusätzlich, dass neonatale Mikroglia früher proliferieren und frühzeitig aktiviert werden (Umekawa et al., 2015). Zudem ist die Expression des Zytokins CCL-2 bei neonatalen Tieren nach HI dreifach höher als bei adulten Tieren (Umekawa et al., 2015). Zusammenfassend deuten diese Erkenntnisse darauf hin, dass die pro-inflammatorische Antwort bei unreifen Mäusen stärker ausgeprägt ist und daher durch eine Hypothermie möglicherweise nicht so effizient wie beim Erwachsenen reduziert werden kann. In diesem Zusammenhang bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass Mikroglia eine enorme Plastizität aufweisen und nicht nur pro-inflammatorische und degenerative Effekte vermitteln.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der hinsichtlich des limitierten Effekts einer HT auf die Iba-1 Expression berücksichtigt werden sollte, sind mögliche Geschlechtsunterschiede. Auch wenn dies nicht Fokus der vorliegenden Arbeit und die Tierzahl dementsprechend gering war, so ergaben explorative nach Geschlecht-stratifizierte Analysen mit Daten der vorliegenden Arbeit erste interessante Hinweise. In weiblichen Tieren wurde ein erhöhter neuroprotektiver Effekt der HT im Hippocampus beobachtet (Seitz et al., 2021). Dies ist im Einklang mit einer kürzlich publizierten Meta-Analyse im HI-Modell, die ergab, dass männliche Tiere deutlich weniger von der HT-Therapie profitieren als weibliche (Wood et al., 2020). Hinsichtlich inflammatorischer Antworten wurde in männlichen Tieren eine insgesamt erhöhte Anzahl an CD86 positiven Zellen 3 Tage nach HI beobachtet (Seitz et al., 2021). Diese Daten werden durch Analysen im Modell des neonatalen Schlaganfalls unterstützt, die ein erhöhtes pro-inflammatorisches Profil in myeloiden Zellen männlicher Tiere belegten (Villapol et al., 2019). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die periphere Depletion myeloider Zellen in männlichen Tieren neuroprotektiv wirkt, jedoch nicht in weiblichen Jungtieren (Smith et al., 2018). Wenngleich für weibliche Tiere insgesamt eine erhöhte Anzahl an CD86/CD206 doppelt positiven Zellen nachgewiesen wurde (Seitz et al., 2021), so sind endgültige und umfassendere Aussagen über weitere Geschlechtsunterschiede mit den in dieser Arbeit angelegten Gruppengrößen nicht möglich, sodass weitere Studien mit einer größeren Tierzahlen notwendig sind.

Während die neuroprotektiven Effekte einer HT vor allem zu späteren Zeitpunkten deutlich wurden, deckten die Genexpressionsanalysen in isolierten myeloiden Zellen sehr akute Veränderungen infolge einer HI- und HT-Behandlung auf. Nahezu alle analysierten Gene, sowohl der M1- als auch der M2-Klassifikation waren 24 Stunden nach HI stark hochreguliert. Im Vergleich zu vorigen Studien in Gesamtgewebelysaten, werden vor allem Unterschiede in der zeitlichen Regulation deutlich. So hat bspw. Hellström-Erkenstam et al. die höchste Expression für den größten Teil der untersuchten Gene 6 Stunden nach HI beobachtet, die jedoch 1 Tag nach HI wieder stark abnahm, sodass zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede zwischen contra- and ipsilateralen Gehirnhälften detektiert wurden (Hellstrom Erkenstam et al., 2016). In ähnlicher Weise haben vorige Analysen der Arbeitsgruppe in Gesamtgewebelysaten 7 Tage nach HI eine starke Hochregulation für pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. IL-6 und TNF α gezeigt (Kaminski et al., 2020) die in der zell-spezifischen Analyse der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet wurde. Diese abweichenden Ergebnisse belegen einerseits, dass neben myeloiden Zellen weitere Zellen an der neuro-inflammatorischen Reaktion nach HI beteiligt sind. Andererseits wird auch deutlich, wie wichtig zell-spezifische Analysen sind, um die der Schädigung zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen besser zu verstehen.

Trotz der Vorteile zellspezifischer Untersuchungen, ist die Analyse *ex vivo* mittels MACS sortierter CD11b⁺ Zellen limitiert, da keine spezifischen Aussagen gemacht werden können, zu welchem Anteil residente Mikroglia oder eingewanderte Makrophagen/Monozyten zu den beobachteten Veränderungen in der Genexpression der gesamten CD11b-Zellpopulation beigetragen haben. Dass eine Unterscheidung zwischen diesen Zellpopulationen sinnvoll ist, wird anhand der durchflusszytometrischen Analysen dieser Arbeit deutlich. Hier zeigte sich, dass der akute Anstieg der CD86-Expression in allen myeloiden CD11b⁺ Zellen NT-behandelter HI-geschädigter Kontrolltiere vor allem auf eine signifikante Erhöhung in peripheren Makrophagen zurückzuführen ist. Andererseits war der Anstieg an CD206 einzeln positiver Zellen in der

Gesamtzellpopulation der CD11b⁺ Zellen, vor allem in HT-behandelten Tieren, durch eine erhöhte Expression in Mikroglia verursacht.

Die unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung der sortierten CD11b⁺ Zellen in den einzelnen Experimentalgruppen erklärt höchstwahrscheinlich auch die Reduktion der Genexpression unter das Niveau von gesunden Sham-Kontrolltieren für viele Moleküle (z.B. iNOS, Cox-2, CCL2, TNF α , IL-6). Im Vergleich zu HI-geschädigten Tieren, sind in gesunden Sham-Kontrolltieren keine aus der Peripherie-infiltrierten Makrophagen/Monozyten zu detektieren (Abb. 5). Dies impliziert, dass die reduzierte Genexpression in HI-geschädigten Tieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren vor allem durch Effekte der infiltrierten Makrophagen/Monozyten in HI-Tieren zu begründen sind. Darüber hinaus ergaben die durchflusszytometrischen Analysen eine signifikante Reduktion von peripheren Makrophagen/Monozyten in myeloiden Zellen, die aus HT-behandelten Tieren 1 Tag nach HI isoliert wurden. Diese Beobachtungen könnten zumindest teilweise die starke Reduktion der Expression eines Großteils der untersuchten Moleküle in der Gesamtpopulation der CD11b⁺ Zellen von HT-behandelten Tieren im Vergleich zu NT-behandelten Tieren erklären. Insgesamt sollte jedoch berücksichtigt werden, dass in dieser Arbeit lediglich der prozentuale Anteil peripherer Immunzellen in der sortierten CD11b-Zellpopulation ermittelt wurde. Die absolute Zellzahl ließ sich aufgrund des Verlusts sehr sensibler Zellen (wie z.B. neutrophiler Granulozyten, Abb. 5) mit der hier verwendeten Gewebedissoziation nicht eindeutig bestimmen. Um eine endgültige Aussage über absolute Zellzahlen in einer Hemisphäre im Zeitverlauf treffen zu können, sind Folgeanalysen mittels Durchflusszytometrie nach schonenderer Gewebekomogenisierung, wie zuvor in der Arbeitsgruppe beschrieben (Beckmann et al., 2022; Herz et al., 2018a; Mulling et al., 2021) notwendig. Zellspezifische durchflusszytometrische Untersuchungen scheinen auch vor dem Hintergrund voriger Analysen im adulten Schlaganfallmodell sinnvoll, die sehr distinkte Veränderungen des Transkriptoms zwischen Mikroglia und aus dem Blut eingewanderten Makrophagen belegten (Wang et al., 2020). Darüber hinaus wird für das neonatale Gehirn diskutiert, dass der Beitrag residenter Mikroglia zur HI-Schädigung größer ist als der von aus dem Blut

infiltrierten Makrophagen (Umekawa et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit erfolgte zunächst ein Screening von einer großen Anzahl an Molekülen über mRNA-Expressionsanalysen in der gesamten CD11b⁺ myeloiden Zellpopulation, um mögliche Kandidaten zu identifizieren, die in Folgeanalysen gezielt mittels Durchflusszytometrie zellspezifisch untersucht werden können.

Neben den zuvor beschriebenen sehr akuten Effekten einer HT auf die Expression einer großen Anzahl pro- und anti-inflammatorischer Moleküle, wurden über die umfassende Genexpressionsanalyse in der vorliegenden Arbeit auch wichtige Effektormoleküle identifiziert, die möglicherweise an sekundären HT-vermittelten neuroprotektiven Effekten beteiligt sein könnten. Der verzögerte Anstieg der IL-1 β und IL-23 Expression in myeloiden Zellen HI-geschädigter Tiere unterstützt die Hypothese einer langanhaltenden tertiären Inflammationsphase nach perinataler Hirnschädigung (Fleiss and Gressens, 2012). Dies wird auch durch frühere experimentelle Studien unterstützt, in denen ein kontinuierlicher und anhaltender Anstieg in der IL-1 β Expression von Tag 1 bis Tag 14 nach HI detektiert wurde (Hedtjarn et al., 2002; Sun et al., 2005). In Anbetracht der zuvor beschriebenen pro-inflammatorischen Rolle von IL-23 in verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen (Pastor-Fernandez et al., 2020), scheint die sekundär erhöhte IL-23-Expression ebenso ein wichtiger Mechanismus in der HI-Pathophysiologie zu sein. Im adulten Modell der zerebralen Ischämie wurde gezeigt, dass ein IL-23p19 knockdown die verzögerte ischämische Hirnschädigung über Reduktion inflammatorischer Mechanismen abmilderte (Zheng et al., 2015). Zusammenfassend legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der zeitlichen Regulation der beiden Zytokine nahe, dass eine HT neben akut-vermittelten Effekten, Einfluss auf subakut einsetzende inflammatorische Prozesse nimmt.

Hinsichtlich der Schwierigkeiten, eine geeignete Kombinationstherapie zur HT in der translationalen Forschung zu identifizieren (Azzopardi et al., 2016; George et al., 2011; George et al., 2012; Herz et al., 2018b), liefert die vorliegende Arbeit mögliche mechanistische Erklärungsansätze. In der Arbeitsgruppe wurde zuvor gezeigt, dass eine Therapie mit MSZ, die 3 Tage nach Insult appliziert wurde, weniger protektiv in HT-behandelten Tieren wirkte als in der nicht-gekühlten

Kontrollgruppe (Herz et al., 2018b). Als möglicher Mechanismus wurde die Veränderung der immunmodulatorischen Wirkung der MSZ aufgrund einer veränderten Gewebeumgebung infolge der HT identifiziert (Herz et al., 2018b). Interessanterweise war Gal-3 das einzige Molekül, das sich 3 Tage nach Insult zwischen NT- und HT-behandelten Tieren unterschied. Zudem wies dieses Molekül im Vergleich mit anderen untersuchten Genen eine enorme und anhaltende Hochregulation (fold change <100) in HI-geschädigten Tieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren auf. Dies wurde durch eine HT-Behandlung stark herunterreguliert. Die Rolle des Gal-3 in der ischämischen Hirnschädigung ist wie bereits oben ausgeführt mit einer neuroprotektiven Wirkung in adulten und einer neurodegenerativen Wirkung in neonatalen Tieren (Doverhag et al., 2010; Wesley et al., 2021) bislang nicht eindeutig geklärt. Im Zusammenhang mit der Wirkung von MSZ wurde jedoch bereits gezeigt, dass Gal-3 wichtig für die immunmodulatorische Funktion von MSZ ist (Sioud et al., 2010; Souza et al., 2017). Eine Hypothese könnte daher sein, dass MSZ das von myeloiden Zellen-sekretierte Gal-3 für ihre immunsuppressive Funktion benötigen. Die enorme Herunterregulation des Gal-3 in HT-Tieren könnte somit eine mögliche Ursache für die limitierte Wirksamkeit der MSZ in HT-behandelten Tieren sein, wenn sie 3 Tage nach HI appliziert werden (Herz et al., 2018b). Diese bislang spekulativen Hypothesen gilt es in Folgeexperimenten zu untersuchen, um die Limitationen der HT-Therapie zu überwinden und neugeborenen Kindern mit HIE und ihren Familien möglichst frühzeitig eine bessere Option für die Behandlung und die neurologische Entwicklung der Kinder zu liefern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die hypoxisch ischämische Enzephalopathie (HIE) ist einer der häufigsten Gründe für perinatale Mortalität und Morbidität. Die einzig verfügbare Therapie ist die Hypothermie (HT), die in ihrer Wirksamkeit limitiert ist. Trotz intensiver Forschung konnte bislang kein adjuvanter Therapieansatz in die Klinik übertragen werden. Wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung gezielter Therapien ist ein genaues Verständnis der HIE-Pathophysiologie und der Effektormechanismen der HT. Zentrales Merkmal der HIE-Pathophysiologie sind inflammatorische Reaktionen, wobei myeloide Zellen eine zentrale Rolle spielen. Myeloide Zellen sind durch eine enorme Plastizität gekennzeichnet und können sowohl pro-inflammatorische und neurotoxische (M1-Phänotyp) als auch anti-inflammatorische und neuroregenerative Effekte (M2-Phänotyp) vermitteln.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Mausmodell der neonatalen HIE gezeigt, dass sich die neuroprotektive Wirkung der HT über die Zeit entfaltet. Dem protektiven Effekt 7 Tage nach HI ging eine stark reduzierte Expression inflammatorischer Moleküle in myeloiden Zellen 1 Tag nach HI voraus. Dies betraf jedoch sowohl Moleküle der klassischen M1 also auch der alternativen M2 Aktivierung, was die allgemeine Kritik am strikten M1/M2 Klassifizierungsschema unterstützt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die HT die HI-induzierte Infiltration peripherer Makrophagen und Monozyten reduziert. Neben diesen akuten Effekten bewirkte eine HT-Behandlung auch eine sekundäre Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine in myeloiden Zellen.

Mit der in der vorliegenden Arbeit identifizierten immunmodulatorischen Wirkung einer HT auf myeloide Zellen wurde ein wichtiger Effektormechanismus identifiziert, der sowohl kurz- als auch langfristig wirkt und somit die neuroprotektive Wirkung der HT erklärt. Daneben unterstreichen die hier erlangten Erkenntnisse die Wichtigkeit von Zeitverlaufsanalysen und zellspezifischen Untersuchungen, um die komplexe Wechselwirkung zwischen peripheren und im zentralen Nervensystem ortsständigen Zellen besser zu verstehen. Außerdem wurden selektiv modulierte Moleküle identifiziert, die möglicherweise neue Ansätze für die Verbesserung adjuvanter Therapien liefern könnten.

SUMMARY

Neonatal encephalopathy due to hypoxia-ischemia (HI) is a leading cause of death and neurological impairments in term born children. Therapeutic hypothermia (HT) is the only recommended therapy, but it is limited due to low efficacy in severe cases and a short therapeutic window. In spite of tremendous pre-clinical research suggesting adjuvant therapies, clinical translation failed until now. In order to identify adjuvant therapies, a better knowledge of HI pathophysiology and of HT's effector mechanisms is urgently needed. Inflammation is a major hallmark of HI pathophysiology with myeloid cells playing a key role. Myeloid cells are highly plastic cells, which can contribute to neurodegeneration, represented by the classically activated, pro-inflammatory and neurotoxic M1 phenotype and the alternatively activated, neuroregenerative M2 phenotype, respectively.

In this thesis we showed in a mouse model of neonatal HI that neuroprotective effects of HT develop over time, revealed by a significantly reduced HI-induced brain injury and neuronal loss 7 days post HI, whereas only mild non-significant protection from HI-induced apoptosis and neuronal loss were observed 1 and 3 days after HI. Analyses of *ex vivo* isolated Cluster of Differentiation (CD) 11b⁺ cells demonstrated a strong upregulation of the majority of M1 but also M2 marker genes at day 1, which was significantly reduced by HT and rapidly declined at day 3. Furthermore, HI induced a significant increase in the frequency of peripheral macrophages in sorted CD11b⁺ cells at day 1, which deteriorated until day 7 and was significantly decreased by HT. Importantly, HT also reduced expression of specific pro-inflammatory cytokines in the secondary disease phase. This thesis demonstrate that HT-induced neuroprotection is preceded by acute suppression of HI-induced upregulation of inflammatory genes in myeloid cells and decreased infiltration of peripheral macrophages, both representing potential important effector mechanisms of HT. Furthermore, our findings support the overall criticism on the traditional M1/M2 classification concept. Time course analyses in this thesis also identified selective molecules in the secondary disease phase, which may be important for the targeted development of new adjuvant therapeutic strategies.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahearn, C.E., Boylan, G.B., and Murray, D.M. (2016). Short and long term prognosis in perinatal asphyxia: An update. *World J Clin Pediatr* 5, 67-74.
2. Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 75, 639-653.
3. Aly, H., Khashaba, M.T., El-Ayouty, M., El-Sayed, O., and Hasanein, B.M. (2006). IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha and outcomes of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain Dev* 28, 178-182.
4. Azzopardi, D., Robertson, N.J., Bainbridge, A., Cady, E., Charles-Edwards, G., Deierl, A., Fagiolo, G., Franks, N.P., Griffiths, J., Hajnal, J., Juszczak, E., Kapetanakis, B., Linsell, L., Maze, M., Omar, O., Strohm, B., Tusor, N., and Edwards, A. D. (2016). Moderate hypothermia within 6 h of birth plus inhaled xenon versus moderate hypothermia alone after birth asphyxia (TOBY-Xe): a proof-of-concept, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 15, 145-153.
5. Azzopardi, D., Strohm, B., Marlow, N., Brocklehurst, P., Deierl, A., Eddama, O., Goodwin, J., Halliday, H.L., Juszczak, E., Kapellou, O., Levene, M., Linsell, L., Omar, O., Thoresen, M., Tusor, N., Whitelaw, A., and Edwards, A.D. (2014). Effects of hypothermia for perinatal asphyxia on childhood outcomes. *N Engl J Med* 371, 140-149.
6. Baba, N., Wang, F., Iizuka, M., Shen, Y., Yamashita, T., Takaishi, K., Tsuru, E., Matsushima, S., Miyamura, M., Fujieda, M., Tsuda, M., Sagara, Y., and Maeda, N. (2019). Induction of regional chemokine expression in response to human umbilical cord blood cell infusion in the neonatal mouse ischemia-reperfusion brain injury model. *PLoS One* 14, e0221111.
7. Beckmann, L., Obst, S., Labusek, N., Abberger, H., Koster, C., Klein-Hitpass, L., Schumann, S., Kleinschnitz, C., Hermann, D.M., Felderhoff-Muser, U., Bendix, I., Hansen, W., and Herz, J. (2022). Regulatory T Cells Contribute to Sexual Dimorphism in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Stroke* 53, 381-390.
8. Bedard, A., Tremblay, P., Chernomoretz, A., and Vallieres, L. (2007). Identification of genes preferentially expressed by microglia and upregulated during cuprizone-induced inflammation. *Glia* 55, 777-789.
9. Blomgren, K., and Hagberg, H. (2006). Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med* 40, 388-397.
10. Bolanos, J.P., and Almeida, A. (1999). Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1411, 415-436.
11. Bona, E., Andersson, A.L., Blomgren, K., Gilland, E., Puka-Sundvall, M., Gustafson, K., and Hagberg, H. (1999). Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats. *Pediatr Res* 45, 500-509.
12. Carlsson, Y., Wang, X., Schwendimann, L., Rousset, C.I., Jacotot, E., Gressens, P., Thoresen, M., Mallard, C., and Hagberg, H. (2012). Combined effect of hypothermia and caspase-2 gene deficiency on neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr Res* 71, 566-572.
13. Chandrasekharan, N.V., and Simmons, D.L. (2004). The cyclooxygenases. *Genome Biol* 5, 241.

14. Chang, N.C., Hung, S.I., Hwa, K.Y., Kato, I., Chen, J.E., Liu, C.H., and Chang, A.C. (2001). A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. *J Biol Chem* 276, 17497-17506.
15. Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875-1886.
16. Chhor, V., Le Charpentier, T., Lebon, S., Ore, M.V., Celador, I.L., Josserand, J., Degos, V., Jacotot, E., Hagberg, H., Savman, K., Mallard, C., Gressens, P., and Fleiss, B. (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun* 32, 70-85.
17. Chhor, V., Moretti, R., Le Charpentier, T., Sigaut, S., Lebon, S., Schwendimann, L., Ore, M.V., Zuiani, C., Milan, V., Josserand, J., Vontell, R., Pansiot, J., Degos, V., Ikonomidou, C., Titomanlio, L., Hagberg, H., Gressens, P. and Fleiss, B. (2017). Role of microglia in a mouse model of paediatric traumatic brain injury. *Brain Behav Immun* 63, 197-209.
18. Chip, S., Zelmer, A., Ogunshola, O.O., Felderhoff-Mueser, U., Nitsch, C., Buhner, C., and Wellmann, S. (2011). The RNA-binding protein RBM3 is involved in hypothermia induced neuroprotection. *Neurobiol Dis* 43, 388-396.
19. Choi, J.S., Park, J., Suk, K., Moon, C., Park, Y.K., and Han, H.S. (2011). Mild Hypothermia Attenuates Intercellular Adhesion Molecule-1 Induction via Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase-1/2 in a Focal Cerebral Ischemia Model. *Stroke Res Treat* 2011, 846716.
20. Cikla, U., Chanana, V., Kintner, D.B., Covert, L., Dewall, T., Waldman, A., Rowley, P., Cengiz, P., and Ferrazzano, P. (2016). Suppression of microglia activation after hypoxia-ischemia results in age-dependent improvements in neurologic injury. *J Neuroimmunol* 291, 18-27.
21. Coeroli, L., Renolleau, S., Arnaud, S., Plotkine, D., Cachin, N., Plotkine, M., Ben-Ari, Y., and Charriaut-Marlangue, C. (1998). Nitric oxide production and perivascular tyrosine nitration following focal ischemia in neonatal rat. *J Neurochem* 70, 2516-2525.
22. Colton, C.A. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 4, 399-418.
23. Dalmau, I., Finsen, B., Zimmer, J., Gonzalez, B., and Castellano, B. (1998). Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* 8, 458-474.
24. Davidson, J.O., Wassink, G., van den Heuvel, L.G., Bennet, L., and Gunn, A.J. (2015). Therapeutic Hypothermia for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy - Where to from Here? *Front Neurol* 6, 198.
25. Davidson, J.O., Yuill, C.A., Zhang, F.G., Wassink, G., Bennet, L., and Gunn, A.J. (2016). Extending the duration of hypothermia does not further improve white matter protection after ischemia in term-equivalent fetal sheep. *Sci Rep* 6, 25178.
26. Davies, A., Wassink, G., Bennet, L., Gunn, A.J., and Davidson, J.O. (2019). Can we further optimize therapeutic hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy? *Neural Regen Res* 14, 1678-1683.
27. Deng, H., Han, H.S., Cheng, D., Sun, G.H., and Yenari, M.A. (2003). Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation. *Stroke* 34, 2495-2501.

28. Domoki, F., Perciaccante, J.V., Puskar, M., Bari, F., and Busija, D.W. (2001). Cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 preserves neuronal function after hypoxia/ischemia in piglets. *Neuroreport* 12, 4065-4068.
29. Donega, V., van Velthoven, C.T., Nijboer, C.H., Kavelaars, A., and Heijnen, C.J. (2013). The endogenous regenerative capacity of the damaged newborn brain: boosting neurogenesis with mesenchymal stem cell treatment. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 625-634.
30. Douglas-Escobar, M., and Weiss, M.D. (2015). Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA Pediatr* 169, 397-403.
31. Doverhag, C., Hedtjarn, M., Poirier, F., Mallard, C., Hagberg, H., Karlsson, A., and Savman, K. (2010). Galectin-3 contributes to neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Neurobiol Dis* 38, 36-46.
32. Fatemi, A., Wilson, M.A., and Johnston, M.V. (2009). Hypoxic-ischemic encephalopathy in the term infant. *Clin Perinatol* 36, 835-858, vii.
33. Fenn, A.M., Henry, C.J., Huang, Y., Dugan, A., and Godbout, J.P. (2012). Lipopolysaccharide-induced interleukin (IL)-4 receptor-alpha expression and corresponding sensitivity to the M2 promoting effects of IL-4 are impaired in microglia of aged mice. *Brain Behav Immun* 26, 766-777.
34. Ferriero, D.M. (2001). Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia. *Dev Neurosci* 23, 198-202.
35. Ferriero, D.M. (2004). Neonatal brain injury. *N Engl J Med* 351, 1985-1995.
36. Ferriero, D.M., Holtzman, D.M., Black, S.M., and Sheldon, R.A. (1996). Neonatal mice lacking neuronal nitric oxide synthase are less vulnerable to hypoxic-ischemic injury. *Neurobiol Dis* 3, 64-71.
37. Fleiss, B., and Gressens, P. (2012). Tertiary mechanisms of brain damage: a new hope for treatment of cerebral palsy? *Lancet Neurol* 11, 556-566.
38. Fleiss, B., Van Steenwinckel, J., Bokobza, C., I, K.S., Ross-Munro, E., and Gressens, P. (2021). Microglia-Mediated Neurodegeneration in Perinatal Brain Injuries. *Biomolecules* 11.
39. Flemmer, A.W., Maier, R.F., and Hummler, H. (2013). Behandlung der neonatalen Asphyxie unter besonderer Berücksichtigung der therapeutischen Hypothermie (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)), pp. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/024-023l_S022k_Behandlung_der_neonatalen_Aphyxie_unter_besonderer_Beruecksichtigung_der_therapeutischen_Hypothermie_2013-2006-abgelaufen.pdf.
40. Franco, R., and Fernandez-Suarez, D. (2015). Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 131, 65-86.
41. Froen, J.F., Munkeby, B.H., Stray-Pedersen, B., and Saugstad, O.D. (2002). Interleukin-10 reverses acute detrimental effects of endotoxin-induced inflammation on perinatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res* 942, 87-94.
42. Fukui, O., Kinugasa, Y., Fukuda, A., Fukuda, H., Tskitishvili, E., Hayashi, S., Song, M., Kanagawa, T., Hosono, T., Shimoya, K., and Murata, Y. (2006). Post-ischemic hypothermia reduced IL-18 expression and suppressed microglial activation in the immature brain. *Brain Res* 1121, 35-45.

43. George, S., Bennet, L., Weaver-Mikaere, L., Fraser, M., Bouwmans, J., Mathai, S., Skinner, S.J., and Gunn, A.J. (2011). White matter protection with insulin-like growth factor 1 and hypothermia is not additive after severe reversible cerebral ischemia in term fetal sheep. *Dev Neurosci* 33, 280-287.
44. George, S.A., Barrett, R.D., Bennet, L., Mathai, S., Jensen, E.C., and Gunn, A.J. (2012). Nonadditive neuroprotection with early glutamate receptor blockade and delayed hypothermia after asphyxia in preterm fetal sheep. *Stroke* 43, 3114-3117.
45. Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., and Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841-845.
46. Grilli, M., Barbieri, I., Basudev, H., Brusa, R., Casati, C., Lozza, G., and Ongini, E. (2000). Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage. *Eur J Neurosci* 12, 2265-2272.
47. Gulke, E., Gelderblom, M., and Magnus, T. (2018). Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia. *Ther Adv Neurol Disord* 11, 1756286418774254.
48. Gunn, A.J., and Thoresen, M. (2015). Animal studies of neonatal hypothermic neuroprotection have translated well in to practice. *Resuscitation* 97, 88-90.
49. Hamzei Taj, S., Kho, W., Riou, A., Wiedermann, D., and Hoehn, M. (2016). MiRNA-124 induces neuroprotection and functional improvement after focal cerebral ischemia. *Biomaterials* 91, 151-165.
50. Hedtjarn, M., Leverin, A.L., Eriksson, K., Blomgren, K., Mallard, C., and Hagberg, H. (2002). Interleukin-18 involvement in hypoxic-ischemic brain injury. *J Neurosci* 22, 5910-5919.
51. Hellstrom Erkenstam, N., Smith, P.L., Fleiss, B., Nair, S., Svedin, P., Wang, W., Bostrom, M., Gressens, P., Hagberg, H., Brown, K.L., Savman, K., and Mallard, C. (2016). Temporal Characterization of Microglia/Macrophage Phenotypes in a Mouse Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Front Cell Neurosci* 10, 286.
52. Herz, J., Bendix, I., and Felderhoff-Muser, U. (2022). Peripheral immune cells and perinatal brain injury: a double-edged sword? *Pediatr Res* 91, 392-403.
53. Herz, J., Koster, C., Crasmoller, M., Abberger, H., Hansen, W., Felderhoff-Muser, U., and Bendix, I. (2018a). Peripheral T Cell Depletion by FTY720 Exacerbates Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Mice. *Front Immunol* 9, 1696.
54. Herz, J., Koster, C., Reinboth, B.S., Dzierko, M., Hansen, W., Sabir, H., van Velthoven, C., Bendix, I., and Felderhoff-Muser, U. (2018b). Interaction between hypothermia and delayed mesenchymal stem cell therapy in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Behav Immun* 70, 118-130.
55. Hu, S., Sheng, W.S., Peterson, P.K., and Chao, C.C. (1995). Cytokine modulation of murine microglial cell superoxide production. *Glia* 13, 45-50.
56. Hu, X., Leak, R.K., Shi, Y., Suenaga, J., Gao, Y., Zheng, P., and Chen, J. (2015). Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair. *Nat Rev Neurol* 11, 56-64.
57. Hu, X., Li, P., Guo, Y., Wang, H., Leak, R.K., Chen, S., Gao, Y., and Chen, J. (2012). Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* 43, 3063-3070.

58. Huang, Z.G., Xue, D., Preston, E., Karbalai, H., and Buchan, A.M. (1999). Biphasic opening of the blood-brain barrier following transient focal ischemia: effects of hypothermia. *Can J Neurol Sci* 26, 298-304.
59. Im, S.H., Yu, J.H., Park, E.S., Lee, J.E., Kim, H.O., Park, K.I., Kim, G.W., Park, C.I., and Cho, S.R. (2010). Induction of striatal neurogenesis enhances functional recovery in an adult animal model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Neuroscience* 169, 259-268.
60. Ito, D., Tanaka, K., Suzuki, S., Dembo, T., and Fukuuchi, Y. (2001). Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke* 32, 1208-1215.
61. Jacobs, A.J., Castillo-Ruiz, A., Cisternas, C.D., and Forger, N.G. (2019). Microglial Depletion Causes Region-Specific Changes to Developmental Neuronal Cell Death in the Mouse Brain. *Dev Neurobiol* 79, 769-779.
62. Jacobs, S.E., Berg, M., Hunt, R., Tarnow-Mordi, W.O., Inder, T.E., and Davis, P.G. (2013). Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003311.
63. John E.Rice, I., BS, * Robert C.Vannucci,MD,* and James B.Brierley (1981). The Influence of Immaturity in Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Rat. *Annals of Neurology* 1981, 131-141.
64. Kaminski, N., Koster, C., Mouloud, Y., Borger, V., Felderhoff-Muser, U., Bendix, I., Giebel, B., and Herz, J. (2020). Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Reduce Neuroinflammation, Promote Neural Cell Proliferation and Improve Oligodendrocyte Maturation in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Front Cell Neurosci* 14, 601176.
65. Klofers, M., Kohaut, J., Bendix, I., Herz, J., Boos, V., Felderhoff-Muser, U., and Dzierko, M. (2017). Effects of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Inhibition in a Neonatal Rodent Model of Hypoxic-Ischemic Injury. *Biomed Res Int* 2017, 2924848.
66. Koo, E., Sheldon, R.A., Lee, B.S., Vexler, Z.S., and Ferriero, D.M. (2017). Effects of therapeutic hypothermia on white matter injury from murine neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 82, 518-526.
67. Kovacs, V., Remzso, G., Toth-Szuki, V., Varga, V., Nemeth, J., and Domoki, F. (2020). Inhaled H₂ or CO₂ Do Not Augment the Neuroprotective Effect of Therapeutic Hypothermia in a Severe Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy Piglet Model. *Int J Mol Sci* 21.
68. Kozłowski, C., and Weimer, R.M. (2012). An automated method to quantify microglia morphology and application to monitor activation state longitudinally in vivo. *PLoS One* 7, e31814.
69. Kraft, P., Gob, E., Schuhmann, M.K., Gobel, K., Deppermann, C., Thielmann, I., Herrmann, A.M., Lorenz, K., Brede, M., Stoll, G., Meuth, S.G., Nieswandt, B., Pfeilschifter, W., and Kleinschnitz, C. (2013). FTY720 ameliorates acute ischemic stroke in mice by reducing thrombo-inflammation but not by direct neuroprotection. *Stroke* 44, 3202-3210.
70. Kwak, M., Lim, S., Kang, E., Furmanski, O., Song, H., Ryu, Y.K., and Mintz, C.D. (2015). Effects of Neonatal Hypoxic-Ischemic Injury and Hypothermic Neuroprotection on Neural Progenitor Cells in the Mouse Hippocampus. *Dev Neurosci* 37, 428-439.

71. Lafemina, M.J., Sheldon, R.A., and Ferriero, D.M. (2006). Acute hypoxia-ischemia results in hydrogen peroxide accumulation in neonatal but not adult mouse brain. *Pediatr Res* 59, 680-683.
72. Lafuente, H., Pazos, M.R., Alvarez, A., Mohammed, N., Santos, M., Arizti, M., Alvarez, F.J., and Martinez-Orgado, J.A. (2016). Effects of Cannabidiol and Hypothermia on Short-Term Brain Damage in New-Born Piglets after Acute Hypoxia-Ischemia. *Front Neurosci* 10, 323.
73. Lai, M.C., and Yang, S.N. (2011). Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Biomed Biotechnol* 2011, 609813.
74. Lalancette-Hebert, M., Swarup, V., Beaulieu, J.M., Bohacek, I., Abdelhamid, E., Weng, Y.C., Sato, S., and Kriz, J. (2012). Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury. *J Neurosci* 32, 10383-10395.
75. Laptook, A.R., Corbett, R.J., Sterett, R., Garcia, D., and Tollefsbol, G. (1995). Quantitative relationship between brain temperature and energy utilization rate measured in vivo using ³¹P and ¹H magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 38, 919-925.
76. Lawn, J.E., Cousens, S., Zupan, J., and Lancet Neonatal Survival Steering, T. (2005). 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet* 365, 891-900.
77. Ledebøer, A., Breve, J.J., Poole, S., Tilders, F.J., and Van Dam, A.M. (2000). Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia* 30, 134-142.
78. Lee, J.H., Wei, Z.Z., Cao, W., Won, S., Gu, X., Winter, M., Dix, T.A., Wei, L., and Yu, S.P. (2016). Regulation of therapeutic hypothermia on inflammatory cytokines, microglia polarization, migration and functional recovery after ischemic stroke in mice. *Neurobiol Dis* 96, 248-260.
79. Lee, L.G., Connell, C.R., and Bloch, W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 21, 3761-3766.
80. Levene, M.L., Kornberg, J., and Williams, T.H. (1985). The incidence and severity of post-asphyxial encephalopathy in full-term infants. *Early Hum Dev* 11, 21-26.
81. Li, B., Concepcion, K., Meng, X., and Zhang, L. (2017). Brain-immune interactions in perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Prog Neurobiol* 159, 50-68.
82. Li, H., Li, Q., Du, X., Sun, Y., Wang, X., Kroemer, G., Blomgren, K., and Zhu, C. (2011). Lithium-mediated long-term neuroprotection in neonatal rat hypoxia-ischemia is associated with antiinflammatory effects and enhanced proliferation and survival of neural stem/progenitor cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 2106-2115.
83. Li, S.J., Liu, W., Wang, J.L., Zhang, Y., Zhao, D.J., Wang, T.J., and Li, Y.Y. (2014). The role of TNF-alpha, IL-6, IL-10, and GDNF in neuronal apoptosis in neonatal rat with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 18, 905-909.
84. Liu, F., and McCullough, L.D. (2013). Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy. *Acta Pharmacol Sin* 34, 1121-1130.
85. Liu, L., Liu, X., Wang, R., Yan, F., Luo, Y., Chandra, A., Ding, Y., and Ji, X. (2018). Mild focal hypothermia regulates the dynamic polarization of microglia after ischemic stroke in mice. *Neurol Res* 40, 508-515.

86. Liu, X., Liu, J., Zhao, S., Zhang, H., Cai, W., Cai, M., Ji, X., Leak, R.K., Gao, Y., Chen, J., and Hu, X. (2016). Interleukin-4 Is Essential for Microglia/Macrophage M2 Polarization and Long-Term Recovery After Cerebral Ischemia. *Stroke* 47, 498-504.
87. Liu, Y., Stewart, K.N., Bishop, E., Marek, C.J., Kluth, D.C., Rees, A.J., and Wilson, H.M. (2008). Unique expression of suppressor of cytokine signaling 3 is essential for classical macrophage activation in rodents in vitro and in vivo. *J Immunol* 180, 6270-6278.
88. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
89. Loddick, S.A., and Rothwell, N.J. (1996). Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16, 932-940.
90. Lorek, A., Takei, Y., Cady, E.B., Wyatt, J.S., Penrice, J., Edwards, A.D., Peebles, D., Wylezinska, M., Owen-Reece, H., Kirkbride, V., Cooper, C.E., Aldridge, R.F., Roth, S.C., Brown, G., Delpy, D.T., and Reynolds, E.O.R. (1994). Delayed ("secondary") cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 36, 699-706.
91. MacKinnon, A.C., Farnworth, S.L., Hodgkinson, P.S., Henderson, N.C., Atkinson, K.M., Leffler, H., Nilsson, U.J., Haslett, C., Forbes, S.J., and Sethi, T. (2008). Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *J Immunol* 180, 2650-2658.
92. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677-686.
93. Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6, 13.
94. Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13, 453-461.
95. Matsui, T., and Kakeda, T. (2008). IL-10 production is reduced by hypothermia but augmented by hyperthermia in rat microglia. *J Neurotrauma* 25, 709-715.
96. McGuire, W. (2007). Perinatal asphyxia. *BMJ Clin Evid* 2007.
97. McManus, T., Sadgrove, M., Pringle, A.K., Chad, J.E., and Sundstrom, L.E. (2004). Intraischemic hypothermia reduces free radical production and protects against ischemic insults in cultured hippocampal slices. *J Neurochem* 91, 327-336.
98. McNeill, H., Williams, C., Guan, J., Dragunow, M., Lawlor, P., Sirimanne, E., Nikolics, K., and Gluckman, P. (1994). Neuronal rescue with transforming growth factor-beta 1 after hypoxic-ischaemic brain injury. *Neuroreport* 5, 901-904.
99. Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958-969.
100. Mosser, D.M., and Zhang, X. (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 226, 205-218.
101. Mulling, K., Fischer, A.J., Siakaeva, E., Richter, M., Bordbari, S., Spyra, I., Koster, C., Hermann, D.M., Gunzer, M., Felderhoff-Muser, U., Bendix, I., Jablonska, J., and Herz, J. (2021). Neutrophil dynamics, plasticity and function in acute neurodegeneration following neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Behav Immun* 92, 234-244.

102. Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., Locati, M., Montovani, A., Martinez, F.O., Mege, J.L., Mosser, D.M., Natoli, G., Saeij, J.P., Schultze, J.L., Shirey, K.A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., van Ginderachter J.A., Vogel, S.N., and Wynn, T.A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* *41*, 14-20.
103. Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* *11*, 723-737.
104. Nahrendorf, M., and Swirski, F.K. (2016). Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function. *Circ Res* *119*, 414-417.
105. Nakashima, K., and Todd, M.M. (1996a). Effects of hypothermia on the rate of excitatory amino acid release after ischemic depolarization. *Stroke* *27*, 913-918.
106. Nakashima, K., and Todd, M.M. (1996b). Effects of hypothermia, pentobarbital, and isoflurane on postdepolarization amino acid release during complete global cerebral ischemia. *Anesthesiology* *85*, 161-168.
107. Nayak, D., Roth, T.L., and McGavern, D.B. (2014). Microglia development and function. *Annu Rev Immunol* *32*, 367-402.
108. Ohtaki, H., Ylostalo, J.H., Foraker, J.E., Robinson, A.P., Reger, R.L., Shioda, S., and Prockop, D.J. (2008). Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 14638-14643.
109. Palmer, C., Roberts, R.L., and Young, P.I. (2004). Timing of neutrophil depletion influences long-term neuroprotection in neonatal rat hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr Res* *55*, 549-556.
110. Panek, R.B., and Benveniste, E.N. (1995). Class II MHC gene expression in microglia. Regulation by the cytokines IFN-gamma, TNF-alpha, and TGF-beta. *J Immunol* *154*, 2846-2854.
111. Pastor-Fernandez, G., Mariblanca, I.R., and Navarro, M.N. (2020). Decoding IL-23 Signaling Cascade for New Therapeutic Opportunities. *Cells* *9*.
112. Pilati, N., Barker, M., Panteleimonitis, S., Donga, R., and Hamann, M. (2008). A rapid method combining Golgi and Nissl staining to study neuronal morphology and cytoarchitecture. *J Histochem Cytochem* *56*, 539-550.
113. Prabhu, S.B., Rathore, D.K., Nair, D., Chaudhary, A., Raza, S., Kanodia, P., Sopory, S., George, A., Rath, S., Bal, V., Tripathi, R., Ramji, S., Batra, A., Aggarwal, K.C., Chellani, H.K., Arya, S., Agarwal, N., Mehta, U., Natchu, U.C.M., Wadhwa, N., and Bhatnagar, S. (2016). Comparison of Human Neonatal and Adult Blood Leukocyte Subset Composition Phenotypes. *PLoS One* *11*, e0162242.
114. Prinz, M., Priller, J., Sisodia, S.S., and Ransohoff, R.M. (2011). Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* *14*, 1227-1235.
115. Qin, H., Holdbrooks, A.T., Liu, Y., Reynolds, S.L., Yanagisawa, L.L., and Benveniste, E.N. (2012). SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *J Immunol* *189*, 3439-3448.
116. Qiu, A., Mori, S., and Miller, M.I. (2015). Diffusion tensor imaging for understanding brain development in early life. *Annu Rev Psychol* *66*, 853-876.

117. Quirie, A., Demougeot, C., Bertrand, N., Mossiat, C., Garnier, P., Marie, C., and Prigent-Tessier, A. (2013). Effect of stroke on arginase expression and localization in the rat brain. *Eur J Neurosci* 37, 1193-1202.
118. Raes, G., De Baetselier, P., Noel, W., Beschin, A., Brombacher, F., and Hassanzadeh Gh, G. (2002). Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol* 71, 597-602.
119. Raghavendra Rao, V.L., Bowen, K.K., Dhodda, V.K., Song, G., Franklin, J.L., Gava, N.R., and Dempsey, R.J. (2002). Gene expression analysis of spontaneously hypertensive rat cerebral cortex following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 83, 1072-1086.
120. Ransohoff, R.M. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci* 19, 987-991.
121. Reinboth, B.S., Koster, C., Abberger, H., Prager, S., Bendix, I., Felderhoff-Muser, U., and Herz, J. (2016). Endogenous hypothermic response to hypoxia reduces brain injury: Implications for modeling hypoxic-ischemic encephalopathy and therapeutic hypothermia in neonatal mice. *Exp Neurol* 283, 264-275.
122. Relton, J.K., and Rothwell, N.J. (1992). Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain Res Bull* 29, 243-246.
123. Rice, J.E., 3rd, Vannucci, R.C., and Brierley, J.B. (1981). The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9, 131-141.
124. Rocha-Ferreira, E., and Hristova, M. (2016). Plasticity in the Neonatal Brain following Hypoxic-Ischaemic Injury. *Neural Plast* 2016, 4901014.
125. Ruocco, A., Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Chazalviel, L., Komesli, S., Yablonsky, F., Roussel, S., MacKenzie, E.T., Vivien, D., and Buisson, A. (1999). A transforming growth factor-beta antagonist unmasks the neuroprotective role of this endogenous cytokine in excitotoxic and ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 1345-1353.
126. Sabir, H., Scull-Brown, E., Liu, X., and Thoresen, M. (2012). Immediate hypothermia is not neuroprotective after severe hypoxia-ischemia and is deleterious when delayed by 12 hours in neonatal rats. *Stroke* 43, 3364-3370.
127. Savchenko, V.L., McKanna, J.A., Nikonenko, I.R., and Skibo, G.G. (2000). Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience* 96, 195-203.
128. Schlager, G.W., Griesmaier, E., Wegleiter, K., Neubauer, V., Urbanek, M., Kiechl-Kohlendorfer, U., Felderhoff-Mueser, U., and Keller, M. (2011). Systemic G-CSF treatment does not improve long-term outcomes after neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Exp Neurol* 230, 67-74.
129. Schmitt, K.R., Tong, G., and Berger, F. (2014). Mechanisms of hypothermia-induced cell protection in the brain. *Mol Cell Pediatr* 1, 7.
130. Sedgwick, J.D., Schwender, S., Imrich, H., Dorries, R., Butcher, G.W., and ter Meulen, V. (1991). Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7438-7442.
131. Seitz, M., Koster, C., Dzierko, M., Sabir, H., Serdar, M., Felderhoff-Muser, U., Bendix, I., and Herz, J. (2021). Hypothermia modulates myeloid cell polarization in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Neuroinflammation* 18, 266.

132. Semple, B.D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D.M., and Noble-Haeusslein, L.J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* *106-107*, 1-16.
133. Serdar, M., Kempe, K., Herrmann, R., Picard, D., Remke, M., Herz, J., Bendix, I., Felderhoff-Muser, U., and Sabir, H. (2020). Involvement of CXCL1/CXCR2 During Microglia Activation Following Inflammation-Sensitized Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. *Front Neurol* *11*, 540878.
134. Serdar, M., Kempe, K., Rizazad, M., Herz, J., Bendix, I., Felderhoff-Muser, U., and Sabir, H. (2019). Early Pro-inflammatory Microglia Activation After Inflammation-Sensitized Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. *Front Cell Neurosci* *13*, 237.
135. Shah, P.S., Ohlsson, A., and Perlman, M. (2007). Hypothermia to treat neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: systematic review. *Arch Pediatr Adolesc Med* *161*, 951-958.
136. Shah, T.A., Pallera, H.K., Kaszowski, C.L., Bass, W.T., and Lattanzio, F.A. (2021). Therapeutic Hypothermia Inhibits the Classical Complement Pathway in a Rat Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Front Neurosci* *15*, 616734.
137. Shankaran, S., Laptook, A.R., Ehrenkranz, R.A., Tyson, J.E., McDonald, S.A., Donovan, E.F., Fanaroff, A.A., Poole, W.K., Wright, L.L., Higgins, R.D., Finer, N.N., Carlo, W.A., Duara, S., Oh, W., Cotten, C.M., Stevenson, D.K., Stoll, B.J., Lemons, J.A., Guillet, R., and Jobe, A.H. (2005). Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med* *353*, 1574-1584.
138. Shankaran, S., Laptook, A.R., Pappas, A., McDonald, S.A., Das, A., Tyson, J.E., Poindexter, B.B., Schibler, K., Bell, E.F., Heyne, R.J., Pedroza, C., Bara, R., Van Meurs, K.P., Petrie Huitema, C.M., Grisby, C., Devaskar, U., Ehrenkranz, R.A., Harmon, H.M., Chalak, L.F., DeMauro, S.B., Garg, M., Hartley-McAndrew, M.E., Khan, A.M., Walsh, M.C., Ambalavanan, N., Brumbaugh, J.E., Watterberg, K.L., Shepherd, E.G., Hamrick, S.E.G., Barks, J., Cotten, C.M., Kilbride, H.W., and Higgins, R.D. (2017). Effect of Depth and Duration of Cooling on Death or Disability at Age 18 Months Among Neonates With Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* *318*, 57-67.
139. Sheldon, R.A., Sedik, C., and Ferriero, D.M. (1998). Strain-related brain injury in neonatal mice subjected to hypoxia-ischemia. *Brain Res* *810*, 114-122.
140. Sioud, M., Mobergslien, A., Boudabous, A., and Floisand, Y. (2010). Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation. *Scand J Immunol* *71*, 267-274.
141. Smith, P.L.P., Mottahedin, A., Svedin, P., Mohn, C.J., Hagberg, H., Ek, J., and Mallard, C. (2018). Peripheral myeloid cells contribute to brain injury in male neonatal mice. *J Neuroinflammation* *15*, 301.
142. Souza, B.S.F., da Silva, K.N., Silva, D.N., Rocha, V.P.C., Paredes, B.D., Azevedo, C.M., Nonaka, C.K., Carvalho, G.B., Vasconcelos, J.F., Dos Santos, R.R., and Soares, M.B.P. (2017). Galectin-3 Knockdown Impairs Survival, Migration, and Immunomodulatory Actions of Mesenchymal Stromal Cells in a Mouse Model of Chagas Disease Cardiomyopathy. *Stem Cells Int* *2017*, 3282656.
143. Spera, P.A., Ellison, J.A., Feuerstein, G.Z., and Barone, F.C. (1998). IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neurosci Lett* *251*, 189-192.

144. Sun, Y., Calvert, J.W., and Zhang, J.H. (2005). Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke* *36*, 1672-1678.
145. Thornton, C., Leaw, B., Mallard, C., Nair, S., Jinnai, M., and Hagberg, H. (2017). Cell Death in the Developing Brain after Hypoxia-Ischemia. *Front Cell Neurosci* *11*, 248.
146. Tong, G., Endersfelder, S., Rosenthal, L.M., Wollersheim, S., Sauer, I.M., Buhrer, C., Berger, F., and Schmitt, K.R. (2013). Effects of moderate and deep hypothermia on RNA-binding proteins RBM3 and CIRP expressions in murine hippocampal brain slices. *Brain Res* *1504*, 74-84.
147. Trescher, W.H., Ishiwa, S., and Johnston, M.V. (1997). Brief post-hypoxic-ischemic hypothermia markedly delays neonatal brain injury. *Brain Dev* *19*, 326-338.
148. Tsuji, S., Di Martino, E., Mukai, T., Tsuji, S., Murakami, T., Harris, R.A., Blomgren, K., and Aden, U. (2020). Aggravated brain injury after neonatal hypoxic ischemia in microglia-depleted mice. *J Neuroinflammation* *17*, 111.
149. Umekawa, T., Osman, A.M., Han, W., Ikeda, T., and Blomgren, K. (2015). Resident microglia, rather than blood-derived macrophages, contribute to the earlier and more pronounced inflammatory reaction in the immature compared with the adult hippocampus after hypoxia-ischemia. *Glia* *63*, 2220-2230.
150. van den Tweel, E.R., Peeters-Scholte, C.M., van Bel, F., Heijnen, C.J., and Groenendaal, F. (2002). Inhibition of nNOS and iNOS following hypoxia-ischaemia improves long-term outcome but does not influence the inflammatory response in the neonatal rat brain. *Dev Neurosci* *24*, 389-395.
151. van Dyck, L.I., and Morrow, E.M. (2017). Genetic control of postnatal human brain growth. *Curr Opin Neurol* *30*, 114-124.
152. van Rossum, D., and Hanisch, U.K. (2004). Microglia. *Metab Brain Dis* *19*, 393-411.
153. Vannucci, R.C., Towfighi, J., and Vannucci, S.J. (2004). Secondary energy failure after cerebral hypoxia-ischemia in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab* *24*, 1090-1097.
154. Vannucci, S.J., and Hagberg, H. (2004). Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol* *207*, 3149-3154.
155. Vexler, Z.S., Mallard, C., and Hagberg, H. (2018). Positive and negative conditioning in the neonatal brain. *Cond Med* *1*, 279-293.
156. Vexler, Z.S., and Yenari, M.A. (2009). Does inflammation after stroke affect the developing brain differently than adult brain? *Dev Neurosci* *31*, 378-393.
157. Villapol, S., Faivre, V., Joshi, P., Moretti, R., Besson, V.C., and Charriaut-Marlangue, C. (2019). Early Sex Differences in the Immune-Inflammatory Responses to Neonatal Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci* *20*.
158. Wang, G.J., Deng, H.Y., Maier, C.M., Sun, G.H., and Yenari, M.A. (2002). Mild hypothermia reduces ICAM-1 expression, neutrophil infiltration and microglia/monocyte accumulation following experimental stroke. *Neuroscience* *114*, 1081-1090.
159. Wang, Q., Tang, X.N., and Yenari, M.A. (2007). The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* *184*, 53-68.
160. Wang, R., Liu, Y., Ye, Q., Hassan, S.H., Zhao, J., Li, S., Hu, X., Leak, R.K., Rocha, M., Wechsler, L.R., Chen, J., and Shi, Y. (2020). RNA sequencing reveals novel

macrophage transcriptome favoring neurovascular plasticity after ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 40, 720-738.

161. Wesley, U.V., Sutton, I.C., Cunningham, K., Jaeger, J.W., Phan, A.Q., Hatcher, J.F., and Dempsey, R.J. (2021). Galectin-3 protects against ischemic stroke by promoting neuro-angiogenesis via apoptosis inhibition and Akt/Caspase regulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 41, 857-873.

162. Won, S., Lee, J.K., and Stein, D.G. (2015). Recombinant tissue plasminogen activator promotes, and progesterone attenuates, microglia/macrophage M1 polarization and recruitment of microglia after MCAO stroke in rats. *Brain Behav Immun* 49, 267-279.

163. Wood, T., Osredkar, D., Puchades, M., Maes, E., Falck, M., Flatebo, T., Walloe, L., Sabir, H., and Thoresen, M. (2016). Treatment temperature and insult severity influence the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia. *Sci Rep* 6, 23430.

164. Wood, T.R., Gundersen, J.K., Falck, M., Maes, E., Osredkar, D., Loberg, E.M., Sabir, H., Walloe, L., and Thoresen, M. (2020). Variability and sex-dependence of hypothermic neuroprotection in a rat model of neonatal hypoxic-ischaemic brain injury: a single laboratory meta-analysis. *Sci Rep* 10, 10833.

165. Xiao, B.G., Zhang, G.X., Ma, C.G., and Link, H. (1996). Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1)-mediated inhibition of glial cell proliferation and down-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) are interrupted by interferon-gamma (IFN-gamma). *Clin Exp Immunol* 103, 475-481.

166. Xin, D., Li, T., Chu, X., Ke, H., Yu, Z., Cao, L., Bai, X., Liu, D., and Wang, Z. (2020). Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles modulate microglia/macrophage polarization and protect the brain against hypoxia-ischemic injury in neonatal mice by targeting delivery of miR-21a-5p. *Acta Biomater*.

167. Xiong, M., Chen, L.X., Ma, S.M., Yang, Y., and Zhou, W.H. (2013). Short-term effects of hypothermia on axonal injury, preoligodendrocyte accumulation and oligodendrocyte myelination after hypoxia-ischemia in the hippocampus of immature rat brain. *Dev Neurosci* 35, 17-27.

168. Xiong, M., Cheng, G.Q., Ma, S.M., Yang, Y., Shao, X.M., and Zhou, W.H. (2011a). Post-ischemic hypothermia promotes generation of neural cells and reduces apoptosis by Bcl-2 in the striatum of neonatal rat brain. *Neurochem Int* 58, 625-633.

169. Xiong, X., Barreto, G.E., Xu, L., Ouyang, Y.B., Xie, X., and Giffard, R.G. (2011b). Increased brain injury and worsened neurological outcome in interleukin-4 knockout mice after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 42, 2026-2032.

170. Yager, J.Y., Brucklacher, R.M., and Vannucci, R.C. (1992). Cerebral energy metabolism during hypoxia-ischemia and early recovery in immature rats. *Am J Physiol* 262, H672-677.

171. Yenari, M.A., and Han, H.S. (2012). Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci* 13, 267-278.

172. Yu, Y., Li, J., Zhou, H., Xiong, Y., Wen, Y., and Li, H. (2018). Functional importance of the TGF-beta1/Smad3 signaling pathway in oxygen-glucose-deprived (OGD) microglia and rats with cerebral ischemia. *Int J Biol Macromol* 116, 537-544.

173. Zarruk, J.G., Fernandez-Lopez, D., Garcia-Yebenes, I., Garcia-Gutierrez, M.S., Vivancos, J., Nombela, F., Torres, M., Burguete, M.C., Manzanares, J., Lizasoain, I., and Moro, M.A. (2012). Cannabinoid type 2 receptor activation downregulates stroke-induced classic and alternative brain macrophage/microglial activation concomitant to neuroprotection. *Stroke* 43, 211-219.

174. Zhang, H., Zhou, M., Zhang, J., Mei, Y., Sun, S., and Tong, E. (2008). Therapeutic effect of post-ischemic hypothermia duration on cerebral ischemic injury. *Neurol Res* 30, 332-336.
175. Zheng, Y., Zhong, D., Chen, H., Ma, S., Sun, Y., Wang, M., Liu, Q., and Li, G. (2015). Pivotal role of cerebral interleukin-23 during immunologic injury in delayed cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* 290, 321-331.
176. Zhou, X., Chu, X., Xin, D., Li, T., Bai, X., Qiu, J., Yuan, H., Liu, D., Wang, D., and Wang, Z. (2019). L-Cysteine-Derived H₂S Promotes Microglia M2 Polarization via Activation of the AMPK Pathway in Hypoxia-Ischemic Neonatal Mice. *Front Mol Neurosci* 12, 58.
177. Zhu, C., Wang, X., Cheng, X., Qiu, L., Xu, F., Simbruner, G., and Blomgren, K. (2004). Post-ischemic hypothermia-induced tissue protection and diminished apoptosis after neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res* 996, 67-75.
178. Ziemka-Nalecz, M., Jaworska, J., and Zalewska, T. (2017). Insights Into the Neuroinflammatory Responses After Neonatal Hypoxia-Ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol* 76, 644-654.

7 ANHANG

Tabelle 16: Charakteristische Moleküle unterschiedlicher myeloider Zelltypen

Pro-inflammatorische, neurotoxische M1-Marker		
Molekül	Expression / Wirkung in HI	Referenzen für Klassifizierung und Expression/Wirkung in HI
IL-1 β	<ul style="list-style-type: none"> - erhöht in Liquor von neugeborenen Kindern mit HIE, Korrelation mit Schädigungsausmaß, - erhöhtes Protein an Tag 0-3 nach HI im Mausmodell, - Injektion von IL-1ra, dem natürlichen IL-1-Rezeptor-Antagonisten, führt zu einer 50 bis 60 %igen Reduktion des Zelltods - Injektion von IL-1β führt zu einem signifikant durch HI ausgelösten Zelltod 	(Aly et al., 2006) (Chhor et al., 2013; Won et al., 2015) (Smith et al., 2018) (Loddick and Rothwell, 1996) (Relton and Rothwell, 1992)
IL-18	<ul style="list-style-type: none"> - erhöhte mRNA und Proteinexpression 1-14 Tage nach HI, - reduzierte Schädigung in IL-18-/- Mäuse 	(Franco and Fernandez-Suarez, 2015) (Hedtjarn et al., 2002).
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> - erhöht im Liquor von neugeborenen Kindern mit HIE - erhöhtes Protein an Tag 0-3 nach HI im Mausmodell 	(Chhor et al., 2017), (Aly et al., 2006) (Smith et al., 2018) (Mosser and Edwards, 2008)
TNF α	<ul style="list-style-type: none"> - fördert Neutrophilinfiltation nach HI über Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen, die erhöhte Bluthirnschrankenpermeabilität induzieren in neonatalen Ratten - erhöht im Liquor von neugeborenen Kindern mit HIE 	(Mantovani et al., 2004) (Won et al., 2015) (Li et al., 2014) (Aly et al., 2006)
IL-23	<ul style="list-style-type: none"> - Im adulten Schlaganfall-Modell gesteigerte Produktion von IL-17 und dadurch Inflammation, neuronalen Schädigung und Apoptose 	(Mantovani et al., 2004),(Mosser and Edwards, 2008) (Aly et al., 2006)
iNos	<ul style="list-style-type: none"> - erhöhte Expression 48-72 h nach HI im Rattenmodell - genetische Deletion oder pharmakologische Blockade reduziert HI-Gewebschädigung 	(Hu et al., 2012; Won et al., 2015) (van den Tweel et al., 2002) (Coeroli et al., 1998)
Cox-2	<ul style="list-style-type: none"> - selektive Cox-2-Inhibition reduziert HI-Gewebschädigung in neugeborenen Schweinen 	(Chhor et al., 2013) (Domoki et al., 2001)
CXCL-1	<ul style="list-style-type: none"> - Erhöhte Proteinexpression 1 Woche nach HI Mausmodell - Erhöhte Protein Expression in Inflammations-sensibilisierter HI 	(Chhor et al., 2017) (Baba et al., 2019) (Serdar et al., 2020)
CCL-2	<ul style="list-style-type: none"> - erhöhtes Protein 24h nach HI im Mausmodell 	(Mantovani et al., 2004) (Baba et al., 2019)
CD86	<ul style="list-style-type: none"> - erhöhte Expression in Mikroglia 6h nach HI 	(Hellstrom Erkenstam et al., 2016; Hu et al., 2012)

Immunmodulatorische Marker		
Galectin-3	<ul style="list-style-type: none"> - Schadensreduktion in Galectin-3-/- Mäusen - Im adulten Schlaganfall-Modell bei Galectin-3-/- Mäusen Zunahme des ischämischen Areal und erhöhte Apoptose-Rate 	(Hellstrom Erkenstam et al., 2016) (Doverhag et al., 2010) (Lalancette-Hebert et al., 2012)
SOCS 3	<ul style="list-style-type: none"> - Bei SOCS-3-defizienten myeloiden Zellen erhöhte Konzentration von M1 Markern und erhöhter Schaden einer LPS induzierten Sepsis - Liu et al hingegen beobachten nur in Anwesenheit von SOCS3 die Ausbildung eines M1-Phänotyps - Im adulten Schlaganfall-Modell durch Antagonisierung von SOCS3 vergrößertes Infarktareal und Zunahme neurologisches Defizit 	(Chhor et al., 2017; Liu et al., 2008; Qin et al., 2012) (Raghavendra Rao et al., 2002)
Anti-inflammatorische, neuroregenerative M2 Marker		
YM-1	<ul style="list-style-type: none"> - Hochregulation von YM-1 nach der Applikation von humanen Stammzellen nach fokaler Ischämie im adulten Tiermodell ist mit einem protektiven Effekt assoziiert 	(Martinez and Gordon, 2014), (Mosser and Edwards, 2008) (Raes et al., 2002) (Ohtaki et al., 2008)
Arg-1	<ul style="list-style-type: none"> - Im Modell des photothrombotischen ischämischen Schlaganfalls zeigte sich eine Hochregulation der Arginase-1 in Makrophagen an Tag 8-30 nach Ischämie - Konkurriert mit iNOS um dasselbe Substrat 	(Hu et al., 2012; Won et al., 2015) (Quirie et al., 2013)
TGF β	<ul style="list-style-type: none"> - Reduziert das das kortikale Infarktareal und neuronalen Zellverlust - Reduziert die mikrogliale Zellproliferation - reduziert die Produktion von O₂⁻ - Reduktion von IL-1β, IL-6, TNFα sowie der lysosomalen Säure-Phosphatase nach LPS-Stimulation - Im Schlaganfall-Modell führt die Gabe eines TGF-β-Antagonisten zu einer Vergrößerung des Infarktareals 	(Chhor et al., 2013; Hu et al., 2012) (McNeill et al., 1994) (Xiao et al., 1996) (Hu et al., 1995) (Panek and Benveniste, 1995) (Yu et al., 2018)
IL-10	<ul style="list-style-type: none"> - verbessert zerebralen Stoffwechsel und Mikrozirkulation in Inflammations-sensibilisierter HI - IL-10 -/- weisen ein deutlich erhöhtes Infarktvolumen auf - Injektion von Interleukin-10 zeigt protektive Effekte im Modell des adulten Schlaganfalles - reduziert die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, NO, IL-1β und TNFα in glialen Zellkulturen, welche mit LPS stimuliert wurden 	(Mantovani et al., 2004; Won et al., 2015) (Froen et al., 2002) (Grilli et al., 2000) (Spera et al., 1998) (Ledeboer et al., 2000)

Fizz-1	- alternative Aktivierung von Makrophagen führt zu einer Hochregulation von Fizz-1	(Colton, 2009; Raes et al., 2002)
CD206	- als klassischer M2-Marker für Mikroglia und Makrophagen beschrieben	(Hellstrom Erkenstam et al., 2016; Hu et al., 2012)
IL-4	<ul style="list-style-type: none"> - IL-4 ist ein wichtiger Promotor für den Switch zum regenerativen M2-Phänotyp sowohl in Mikroglia als auch in Makrophagen - IL-4 reduziert die Produktion der pro-inflammatorischen Marker IL-6, NO und TNFα in glialen Zellkulturen, welche mit LPS stimuliert wurden - IL-4-knockout Mäuse zeigen ein deutlich vergrößertes Infarktvolumen und verschlechtertes neurologisches Outcome nach transientser fokalzerebraler Ischämie - Im Striatum und im Kortex zeigt sich bei IL-4-knockout-Mäusen eine Reduktion der M2-Polarisierung der Makrophagen und Mikroglia. - Die intrazerebrale Gabe von IL-4 nach ischämischer Hirnschädigung verbessert die funktionelle Regeneration 	(Chhor et al., 2017; Fenn et al., 2012) (Liu et al., 2016) (Ledeboer et al., 2000) (Xiong et al., 2011b)

Die Klassifizierung nach M1 (rot) / M2 (blau) / immunmodulatorisch (violett) und Zusammenfassung bekannter Informationen zu einzelnen Molekülen (mittlere Spalte) erfolgte basierend auf publizierten Studien (rechte Spalte)

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	Arteria carotis communis
Act- β	Beta-Aktin
ANOVA	Analysis of Variance
Arg-1	Arginase, Liver
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BSA	Bovines Serum Albumin
B2M	Beta-2-Mikroglobulin
C57BL/6	C57 black 6
CA	Cornu Ammonis
CCD	Charge Coupled Device
CCL	Chemokine (C-C motif) Ligand
CCR	C-C-chemokine receptor type
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CIRP	Kälte-induziertes RNA-bindendes Protein
Cox	Cyclooxygenase
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4
CTX	Cortex
CXCL-1	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1
d	Tag nach Schädigung (HI)
DAMP	Damage-associated-molecular pattern
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindiol
Dest.	Destilliert
DTT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonucleotid-Triphosphate
DPI	Days Post Injury
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalografie
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAM	6-Carboxyfluorescein
Fizz-1	Resistin like Alpha
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
FSG	Gelatin from Cold Water Fish Skin
Gal-3	Lectin, Galactose binding, soluble 3

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GD	Gyrus Dentatus
GFAP	glial fibrillary acidic protein
h	Stunde
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HC	Hippocampus
HI	Hypoxie-Ischämie
HIE	Hypoxisch-Ischämische Enzephalopathie
HT	Hypothermie
Iba-1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
iCAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IL-1ra	IL-1-Rezeptor-Antagonisten
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid (=NO) Synthase
JAK	Januskinase
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
MACS	Magnetic-activated cell sorting
mRNA	Messenger - Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
NeuN	Neuronal Nuclei
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGS	Normal Goat Serum
NIH	National Institutes of Health
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NNT	Number needed to Treat
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nukleotid-binding oligomerization domain
NT	Normothermie
P	Postnataler Tag
PAMP	Pathogen-associated-molecular pattern
PFA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI	Propidium-Iodid

PRR	Pattern Recognition Rezeptor
RBM3	RNA-bindendes modifizierendes Protein 3
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkriptase
SHAM	Schein-operierte Tiere
siRNA	Small interfering Ribonukleinsäure
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrodamin
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TdT	Terminale Desoxynucleotid-Transferase
TGF	Transforming growth factor,
T _H	T-Helferzelle
Thal	Thalamus
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF	TNF-Receptor Associated Factor
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
UTP	Uridintriphosphat
vCAM	Vascular Adhesion Molecule
YM-1	Chitinase-like 3
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien und Geräte	20
Tabelle 2: Software.....	21
Tabelle 3: Chemische Substanzen.....	21
Tabelle 4: Lösungen, Puffer und Medien.....	23
Tabelle 5: Kits	23
Tabelle 6: Reaktionsmixe	24
Tabelle 7: Magnetische Beads	24
Tabelle 8: Primäre Antikörper.....	24
Tabelle 9: Sekundäre Antikörper	25
Tabelle 10: Primer und Sonden.....	26
Tabelle 11: Protokolle der immunhistochemischen Etablierungsfärbungen.....	31
Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der Etablierungsfärbungen für die immunhistochemische Evaluation typischer M1 und M2 Antigene.....	32
Tabelle 13: Final verwendete Antikörper	34
Tabelle 14: Zusammenfassung der statistischen Analyse zur Regulation der CD86 und CD206 Expression in Mikroglia und Makrophagen..	56
Tabelle 15: Mittelwerte der Fold Change-Werte (n-fache Expression im Verhältnis zu Sham- Kontrolltieren) des jeweiligen Zeitpunkts mit farblicher Codierung (siehe Legende)	57
Tabelle 16: Charakteristische Moleküle unterschiedlicher myeloider Zelltypen	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Protektiver Effekt der Hypothermie in der neonatalen HIE.	8
Abbildung 2:	Pathophysiologische Prozesse der neonatalen hypoxisch- ischämischen Hirnschädigung im zeitlichen Verlauf.	9
Abbildung 3:	Rolle der myeloiden Zellpolarisation in der Wiederherstellung des neurovaskulären Netzwerks nach ischämischer und anderen ZNS-Schädigungen.	16
Abbildung 4:	Darstellung der analysierten Regionen in immunhistochemischen Färbungen	35
Abbildung 5:	Durchflusszytometrische Analysen zur Aufreinigung myeloider Zellen aus Mausgehirngewebe.	39
Abbildung 6:	Einfluss einer Hypothermie auf HI-induzierte neuropathologische Veränderungen und Gewebeverlust.	43
Abbildung 7:	Einfluss einer Hypothermie auf die HI-induzierte akute Zelldegeneration.	45
Abbildung 8:	Einfluss einer Hypothermie auf den HI-induzierten subakuten neuronalen Zelluntergang.	46
Abbildung 9:	Der Einfluss der Hypothermie auf die HI-induzierte Mikroglia- Aktivierung.	47
Abbildung 10:	Einfluss einer HI auf die Expression der M1- und M2-Marker CD86 und CD206 im Zeitverlauf.	50
Abbildung 11:	Durchflusszytometrische Charakterisierung von sortierten myeloiden Zellen aus Mausgehirnlysaten nach MACS.	53
Abbildung 12:	Durchflusszytometrische Analyse CD86- und CD206 positiver Zellen in MACS-sortierten CD11b+ myeloiden Zellen aus Mausgehirnlysaten.	54
Abbildung 13:	Einfluss einer HI und HT auf die Expression der M1- Marker iNOS und Cox-2 in myeloiden Zellen des ZNS.	59
Abbildung 14:	Einfluss einer HI und HT auf die Expression der Chemokine CXCL-1 und CCL-2 in myeloiden Zellen des ZNS.	60
Abbildung 15:	Einfluss einer HI und HT auf die Expression pro- inflammatorischer Zytokine in myeloiden Zellen des ZNS.	61
Abbildung 16:	Einfluss einer HI und HT auf die Expression der immunmodulatorischen Marker Galectin-3 und SOCS3 in myeloiden Zellen des ZNS.	63
Abbildung 17:	Einfluss einer HI und HT auf die Expression neuro-regenerativer M2- Marker in myeloiden Zellen des ZNS.	65
Abbildung 18:	Einfluss einer HI und HT auf die Expression anti- inflammatorischer Zytokine in myeloiden Zellen des ZNS.	66

DANKSAGUNG

Mein großer Dank gilt allen Menschen, die an dieser Arbeit beteiligt gewesen sind und mich unterstützt haben. Ohne Euch wäre diese Arbeit in dieser Form niemals möglich gewesen!

Mein Dank gebührt an erster Stelle Prof. Dr. Ivo Bendix für die Betreuung dieser Arbeit, die Bereitstellung des Themas, viele interessante Diskussionen und die Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Josephine Herz für die Betreuung sowohl beim experimentellen Arbeiten als auch beim gesamten Schreibprozess. Egal welche Schwierigkeiten sich auftaten – neue Ideen, Unterstützung und Hilfe war zu jeder Zeit da.

Ich danke der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung für die ideelle und finanzielle Unterstützung. Dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Essen danke ich für die Paraffin-Einbettung.

Für die Einarbeitung und Betreuung im Labor danke ich Christian Köster, der immer ein offenes Ohr für jegliches Problem hatte.

Zudem danke ich Lucia Beckmann und Sabrina Forell, ohne die ich die Versuchspausen nur hätte halb so gut füllen können. Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe des Forschungslabors für Experimentelle perinatale Neurowissenschaften, durch die ich jede denkbare Unterstützung erhalten habe.

Mein weiterer Dank gilt meinem Verlobten, Martin Jahrmarkt, der mich während der gesamten Arbeit unterstützt hat. Danken möchte ich zudem all meinen Freundinnen, die jederzeit für Rückfragen, Korrekturen aber auch aufmunternde Worte da waren.

Ich danke meiner gesamten Familie für die Unterstützung während des Studiums und während der gesamten Arbeit. Insbesondere danke ich meinem Opa, Hans-Dieter Seitz, und meiner Mutter, Andrea Seitz, die diese Arbeit Korrektur gelesen haben.

LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

PUBLIKATION

Seitz, M., Koster, C., Dzierko, M., Sabir, H., Serdar, M., Felderhoff-Muser, U., Bendix, I., and Herz, J. (2021). : Hypothermia modulates myeloid cell polarization in neonatal hypoxic-ischemic brain injury, *J Neuroinflammation* 18, 266.

KONGRESSBEITRÄGE / PUBLIZIERTE ABSTRACTS

M. Seitz, C. Köster, U. Felderhoff-Müser, M. Dzierko, J. Herz, I. Bendix. Modulation myeloider Zellen nach therapeutischer Hypothermie in der neonatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung. *Monatsschr Kinderheilkd.* 2019; 167(Suppl 3): 53–196. Published online 2019 May 20. German. doi: 10.1007/s00112-019-0700-x, 45. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) 2019, 23.05.-25.05.19, Leipzig

PREISE

Posterpreis Tag der Forschung 2017, Titel: „The impact of hypothermia on the phenotype of cerebral myeloid immune cells after neonatal hypoxia-ischemia“, Autoren: **M. Seitz**, C. Köster, R. Herrmann, U. Felderhoff-Müser, I. Bendix, M. Dzierko, J. Herz