

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Kinderheilkunde I

Hormonelle Veränderungen und Neuroprotektion mittels Erythropoetin nach Sauerstoff-
induzierter Hirnschädigung im neonatalen Rattenmodell

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Mirjam Sophie Kowallick

aus Münster

2024

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/82691

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20241211-080833-0

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. medic. I. Bendix
2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. M. Küper
3. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Th. Höhn

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Oktober 2024

PUBLIKATIONEN

Kowallick M, Serdar M, Markova B, Salveridou E, Felderhoff-Müser U, Führer-Sakel D, Heuer H, Bendix I, Dewan MV. Hyperoxia Leads to Transient Endocrine Alterations in the Neonatal Rat During Postnatal Development. *Front Pediatr.* 2021 Oct 26;9:723928. doi: 10.3389/fped.2021.723928. PMID: 34805035; PMCID: PMC8596615.

Dewan MV, Serdar M, van de Looij Y, **Kowallick M**, Hadamitzky M, Endesfelder S, Fandrey J, Sizonenko SV, Herz J, Felderhoff-Müser U, Bendix I. Repetitive Erythropoietin Treatment Improves Long-Term Neurocognitive Outcome by Attenuating Hyperoxia-Induced Hypomyelination in the Developing Brain. *Front Neurol.* 2020 Aug 12;11:804. doi: 10.3389/fneur.2020.00804. PMID: 32903382; PMCID: PMC7434837.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	8
1.1 Frühgeburt	8
1.1.1 Neurologische Entwicklung Frühgeborener.....	9
1.2 Hyperoxie	10
1.2.1 Hyperoxie bei Frühgeborenen.....	10
1.2.2 Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung.....	10
1.2.3 Pathophysiologie der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung.....	11
1.3 Erythropoetin	12
1.3.1 Neonatale Neuroprotektion mit Erythropoetin.....	13
1.3.2 EPO-Dosierung in der Neuroprotektion von Frühgeborenen	14
1.3.3 EPO als neuroprotektiver Therapieansatz für Sauerstoff-induzierte Hirnschädigungen	15
1.4 Hypothalamus-Hypophysen-Achsen	16
1.4.1 Hypothalamus-Hypophysen-System bei Frühgeborenen.....	19
2 FRAGESTELLUNGEN	21
2.1 Analysen zum neuroprotektiven Effekt einer repetitiven Erythropoetin- Applikation im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung	21
2.2 Analysen zum Effekt der Hyperoxie auf das Hormonsystem im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung	22

3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung des Frühgeborenen und Gewebepräparation	23
3.2	Analysen zum neuroprotektiven Effekt einer repetitiven Erythropoetin-Applikation im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung	23
3.2.1	EPO-Applikation und Gewebepräparation.....	23
3.2.2	Biochemische Proteinanalyse.....	24
3.2.3	Immunhistochemie	26
3.2.4	Konfokale Mikroskopie.....	27
3.2.5	Verhaltenstests	28
3.2.6	Statistische Analyse.....	29
3.3	Analysen zum Effekt der Hyperoxie auf das Hormonsystem im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung	29
3.3.1	Gewebepräparation und Serumgewinnung	29
3.3.2	Herstellung von Gewebeschnitten.....	30
3.3.3	RNA-Sondenherstellung	30
3.3.4	Digoxigenin- <i>In situ</i> Hybridisierung	33
3.3.5	Multiplex Immunoassay	36
3.3.6	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	36
3.3.7	Statistische Analyse.....	36
3.4	Chemikalien und Materialien	37
3.4.1	Chemikalien und kommerzielle Lösungen.....	37
3.4.2	Plasmide, Antikörper und Enzyme.....	40
3.4.3	Lösungen und Puffer	41
3.4.4	Geräte, Verbrauchsmaterialien, Kits und Software.....	44

4	ERGEBNISSE	47
4.1	Analysen zum neuroprotektiven Effekt einer repetitiven Erythropoetin-Applikation im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung	47
4.1.1	Repetitive EPO-Applikation verringert die Hyperoxie-induzierte Hypomyelinisierung zum subakuten Zeitpunkt	47
4.1.2	Repetitive EPO-Applikation reduziert Hyperoxie-induzierte kognitive Defizite in adoleszenten und adulten Ratten.....	50
4.2	Analysen zum Effekt der Hyperoxie auf das Hormonsystem im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung	53
4.2.1	Verminderter hypophysärer Wachstumshormon-Transkriptionsspiegel nach 48-stündiger Sauerstoffexposition	53
4.2.2	Transiente Veränderungen der Wachstumshormon- und Thyroidea-Stimulierenden Hormon-Serumspiegel nach 48-stündiger Sauerstoffexposition.....	55
5	DISKUSSION	57
5.1	Erythropoetin	57
5.1.1	Dosisregime der EPO-Applikation.....	57
5.1.2	Hyperoxie induziert eine subakute Hypomyelinisierung	58
5.1.3	Verbesserung der Hyperoxie-induzierten Hypomyelinisierung nach repetitiver EPO-Applikation zum subakuten Zeitpunkt.....	59
5.1.4	Reduktion der kognitiven Defizite von adoleszenten und adulten Ratten nach repetitiver EPO-Applikation im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung..	60
5.2	Hypothalamus-Hypophysen-System	63
5.2.1	Versuchsaufbau des Hypothalamus-Hypophysen-Systems	63
5.2.2	Hormonbestimmung	64
5.2.3	Transiente hormonelle Veränderungen im Hypothalamus-Hypophysen-System nach Hyperoxie	65
5.3	Ausblick	69

6 ZUSAMMENFASSUNG	72
7 LITERATURVERZEICHNIS	74
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	84
9 ANHANG	85
9.1 Abbildungsverzeichnis	85
9.2 Tabellenverzeichnis	85
10 DANKSAGUNG	87
11 LEBENSLAUF	88

1 EINLEITUNG

1.1 Frühgeburt

Kinder werden nach der Definition der Weltgesundheitsorganisation als Frühgeborene bezeichnet, wenn sie vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW) geboren werden. Im Jahr 2014 betraf dies 7 bis 8% aller Geburten in Europa (Chawanpaiboon et al., 2019). Die Frühgeburt zählt neben den Pneumonien und den Geburtskomplikationen zu den drei Haupttodesursachen in der neonatalen Phase; jedoch verbesserte sich das Überleben der Frühgeborenen in den letzten Jahrzehnten (Liu et al., 2015; Saigal and Doyle, 2008). Trotz der höheren Überlebensrate leiden diese Kinder häufig an verschiedenen kurz- und langfristigen Folgen ihrer zu frühen Geburt, sodass die Frühgeborenen aufgrund ihres unterschiedlichen Risikos für Komplikationen in drei Gruppen eingeteilt werden:

1. Extrem Frühgeborene, die vor der 28. SSW geboren werden
2. Sehr Frühgeborene, die nach der vollendeten 28. SSW und vor der vollendeten 32. SSW geboren werden
3. Moderate Frühgeborene, die nach vollendeter 32. SSW geboren werden (Howson et al., 2013)

Zu den häufigsten Komplikationen zählen das Atemnotsyndrom, die Bronchopulmonale Dysplasie, die Frühgeborenen Retinopathie, die Nekrotisierende Enterokolitis sowie schwere Infektionen und neurologische Veränderungen (Patel, 2016). Zudem weisen Frühgeborene häufiger endokrine Veränderungen auf (Chung, 2014; Finken et al., 2017; Scratch et al., 2015). Diese Komplikationen sind meistens auf die unvollständige intrauterinen Entwicklung der Frühgeborenen zurückzuführen (Patel, 2016). Die weitere extrauterine Entwicklung der Frühgeborenen findet dann unter nicht physiologischen Bedingungen wie einer erhöhten Sauerstoffkonzentration statt (Reich et al., 2016). Unsere Arbeitsgruppe fokussiert sich unter anderem auf die Auswirkungen dieser Hyperoxie auf den unreifen Organismus in neonatalen Nagern.

1.1.1 Neurologische Entwicklung Frühgeborener

In der fetalen Phase der 20. bis 40. SSW sind die essentiellen Entwicklungsprozesse des Gehirns nicht vollständig abgeschlossen. Diese Entwicklungsphase zeichnet sich u. a. durch die Myelinisierung der weißen Substanz, der Synaptogenese, der axonalen und der dendritischen Entwicklung, die eine enorme Vergrößerung der kortikalen Oberfläche (Gyrierung) bewirkt, aus (Volpe, 2019). Bei Frühgeborenen findet dieser Teil der Gehirnreifung unter extrauterinen Bedingungen statt. Folglich treten neurologische Veränderungen in der weißen und grauen Substanz auf. So weisen ungefähr zwei Drittel der Frühgeborenen in MRT-Studien Veränderungen, wie vergrößerte Subarachnoidalräume, eine verzögerte Gyrierung und ein reduziertes Gesamtvolumen der weißen Substanz, unterschiedlichen Schweregrades am ursprünglich errechnetem Geburtstermin auf (Brown et al., 2009; Inder et al., 2003). Die detektierten MRT-Anomalitäten - vor allem in der weißen Substanz - korrelieren mit neurologischen Verhaltensauffälligkeiten bei den Frühgeborenen am errechnetem Geburtstermin, wie beispielsweise Schwierigkeiten bei der Regulation des Erregungszustandes und Veränderungen des spontanen Bewegungsmusters (Brown et al., 2009). Hierbei zeigen sich im MRT auch schwerere Schädigungsmuster der weißen Substanz wie die periventrikuläre Leukomalazie (PVL) (Inder et al., 2003). Die PVL lässt sich in zwei Formen einteilen: zystische PVL und nicht-zystische PVL (Volpe, 2009). Es handelt sich bei der PVL um fokale Nekrosen, die jedoch aufgrund verbesserter klinischer Versorgung der Frühgeborenen heutzutage seltener beobachtet wird (Stoll et al., 2015; Volpe, 2009). Deutlich häufiger beobachtet man neben fokalen Schädigungen diffuse Veränderungen, die durch die fehlende Differenzierung von Myelin-produzierenden Oligodendrozyten verursacht werden (Volpe, 2009). Ursächlich für die Veränderungen der grauen und weißen Substanz sind hauptsächlich zerebrale Sauerstofffluktuationen in Verbindung mit einer gestörten vaskulären Autoregulation und infektiöse Erkrankungen (Felderhoff-Mueser et al., 2004; Reich et al., 2016).

In den letzten Jahren reduzierte sich jedoch der Anteil an höhergradigen sensorischen Auffälligkeiten sowie neuromotorischen Behinderungen (Pierrat et al., 2017). In der Kohorten-Studie von Pierrat et al. traten neurologische Entwicklungsdefizite als häufigste neurologische Störung bei den Frühgeborenen im korrigierten Alter von zwei Jahren auf, während nur unter 5% der Frühgeborenen eine infantile Zerebralparese entwickelten (Pierrat et al., 2017). Neurologische Verhaltensauffälligkeiten und kognitive Defizite wie ein reduzierter Intelligenzquotient (IQ) ließen sich bei der Mehrheit der extrem Frühgeborenen im Schulalter sowie auch im Erwachsenenalter nachweisen (Eryigit Madzwamuse et al., 2015; Hutchinson et al., 2013). Aufgrund der hohen Inzidenz an neurologischen Defiziten bei Frühgeborenen

kommt die Frage nach einer potentiellen neuroprotektiven Therapie bei Frühgeborenen auf (Pierrat et al., 2017; Volpe, 2019).

1.2 Hyperoxie

1.2.1 Hyperoxie bei Frühgeborenen

Die intrauterine Entwicklung findet unter relativ hypoxischen Bedingungen (ca. PaO_2 25 mmHg) statt, sodass die Frühgeborenen einem unphysiologischen hohen Sauerstoffpartialdruck von ca. PaO_2 70 mmHg extrauterin ausgesetzt sind (Reich et al., 2016). Zudem erhalten die Frühgeborenen häufig ergänzend therapeutisch Sauerstoff aufgrund ihrer Lungenunreife (Saugstad, 2018). Diese beiden Faktoren resultieren in einem erhöhten Sauerstoffpartialdruck im Gewebe, der auf ein unausgereiftes antioxidatives System trifft (Tipple and Ambalavanan, 2019). Folglich entstehen wegen der schädigenden Wirkung von Sauerstoff Frühgeborenen-Komplikationen, wie beispielsweise die Frühgeborenen Retinopathie, die Bronchopulmonare Dysplasie aber auch die Enzephalopathie des Frühgeborenen (Day and Ryan, 2017; Felderhoff-Mueser et al., 2004; Obst et al., 2022; Perrone et al., 2009).

1.2.2 Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung

Zur Analyse der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigungen von Frühgeborenen wurde im Jahr 2004 von Felderhoff-Mueser et al. ein Tiermodell mit neonatalen Ratten etabliert (Felderhoff-Mueser et al., 2004). Hierbei wurden postnatale Wistar-Ratten in der ersten Lebenswoche erhöhten Sauerstoffkonzentrationen von bis zu 80%igem Sauerstoff ausgesetzt und anschließend auf Hirnschädigungen analysiert (Felderhoff-Mueser et al., 2004).

Bei der Etablierung dieses Modells wurde die Diskrepanz zwischen dem menschlichen Hirnwachstum und der Gehirnentwicklung der Ratte berücksichtigt (Craig et al., 2003; Dobbing and Sands, 1979). So beginnt die Phase des rapiden Hirnwachstum bei den Menschen im letzten Trimenon, während sie bei Ratten erst früh postnatal auftritt (Dobbing and Sands, 1979). Zwar ist die Neurogenese im Zeitraum einer menschlichen Frühgeburt größtenteils abgeschlossen, die Oligodendrogenese, die axonale Aussprossungen und die Synaptogenese sind jedoch auf einem Höhepunkt (Semple et al., 2013). Bei näherer Betrachtung des Reifungsprozesses der Oligodendrozyten im Menschen und in der Ratte entspricht der Anteil an mitotisch aktiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen am Tag zwei postnatal (P2) der 20. – 28. SSW im Menschen

(Craig et al., 2003). An P7 der Ratte ist dagegen der Reifungsgrad der weißen Substanz vergleichbar mit der 30. – 36. SSW. im Menschen (Craig et al., 2003). Die gestörte Reifung der Oligodendrozyten steht im pathologischen Zusammenhang mit der Ausbildung von Hirnschädigungen der weißen Substanz bei Frühgeborenen (Volpe, 2009). Die Störung von Entwicklungsprozessen, die an der Ausbildung einer neonatalen Hirnschädigung beteiligt sind, finden dementsprechend postnatal in der Ratte statt, sodass die potentiellen Effekte einer Hyperoxie auf das unreife Gehirn im neonatalen Rattenmodell untersucht werden (Craig et al., 2003; Felderhoff-Mueser et al., 2004; Volpe, 2009).

1.2.3 Pathophysiologie der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung

Die Komplexität der Pathophysiologie von Sauerstoff-induzierten Hirnschädigungen zeigt sich in der Vielfalt an Schädigungsmechanismen auf zellulärer wie auch auf struktureller Ebene im neonatalen Modell. Diese Sauerstoff-induzierten Hirnschädigungen können sich neben den kurzfristigen Veränderungen auch langfristig auf die Entwicklung des Gehirns auswirken. Dies präsentiert sich vor allem in der verschlechterten motorisch-kognitiven Langzeitentwicklung von Ratten (Dewan et al., 2020; Hoeber et al., 2016; Serdar et al., 2016).

In den ersten tierexperimentellen Versuchen mit supraphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen wurde durch oxidativen Stress eine Verlagerung des reduzierten Glutathions zu oxidiertem Glutathion induziert (Felderhoff-Mueser et al., 2004). Glutathion ist Teil des antioxidativen Systems, dessen Kapazität bei Frühgeborenen insgesamt verringert ist (Felderhoff-Mueser et al., 2004; Georgeson et al., 2002). Die frei gebildeten Sauerstoffradikale verursachen einen apoptotischen Zelltod, der nach einer Hyperoxie vermehrt im unreifen Gehirn detektiert wird und neben Neuronen vor allem prä-myelinisierende Oligodendrozyten schädigt (Felderhoff-Mueser et al., 2004; Gerstner et al., 2008). Reife Oligodendrozyten, die das basische Myelinprotein (MBP) exprimieren, zeigen keine erhöhte Vulnerabilität gegenüber erhöhter Sauerstoffkonzentrationen; jedoch liegen in der Entwicklungsphase von extrem unreifen Frühgeborenen vermehrt prä-myelinisierende vor (Craig et al., 2003; Gerstner et al., 2008; Semple et al., 2013).

Oligodendrozyten sind funktionell für die Myelinisierung von Axonen zuständig, sodass der signifikante Anstieg des Untergangs von Oligodendrozyten in der weißen Substanz und deren gestörte Reifung nach Hyperoxie mit einer Hypomyelinisierung zusammenhängt (Gerstner et al., 2008; Serdar et al., 2016; Volpe, 2019). Die Hypomyelinisierung demonstriert sich experimentell durch eine Reduktion der MBP-Expression (Brehmer et al., 2012; Serdar et al.,

2016). Darüber hinaus können mikrostrukturelle Veränderungen vor allem im Corpus callosum und in der Capsula externa der weißen Substanz in der Diffusions-Tensor-Bildgebung nach Hyperoxie detektiert werden (Hoeber et al., 2016). Weiterhin zeigen sich langfristige Myelinisierung-Veränderungen z.B. Axone ohne Myelinisierung oder fokale Myelin-Schäden in adulten Tieren (Serdar et al., 2018).

Parallel zu hypomyelinisierenden Effekten beeinflusst die Hyperoxie die Expression von Neurotrophenen, die die Entwicklung von Neuronen unterstützen (Felderhoff-Mueser et al., 2004). Nach einer Hyperoxie zeigte sich beispielsweise eine Reduktion der mRNA-Expression von Neurotrophenen wie dem *Brain Derived Neurotrophic Faktor* (Felderhoff-Mueser et al., 2004). Des Weiteren fördern die erhöhten Sauerstoffkonzentrationen inflammatorische Prozesse. In der Arbeit von Serdar et al. konnte eine Aktivierung von Mikroglia und eine Erhöhung von pro-inflammatorischen Cytokinen wie Interleukin-1 β im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung nachgewiesen werden (Serdar et al., 2016).

Dementsprechend sind erhöhte Sauerstoffkonzentrationen an der Pathogenese von neonatalen Hirnschädigungen beteiligt, sodass in den letzten Jahren nach protektiven Faktoren gegen Sauerstoff-induzierten Schädigungen geforscht wurde (Felderhoff-Mueser et al., 2004; Serdar et al., 2016). Hierzu zählt u. a. der mögliche präventive Einsatz des Glykoproteinormons Erythropoetin (Hoeber et al., 2016).

1.3 Erythropoetin

Erythropoetin (EPO), ein Glykoproteinormon mit einem Molekulargewicht von 30,4 kDa, reguliert hauptsächlich die Erythropoese im menschlichen Körper (Lombardero et al., 2011). Hierbei ist EPO für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Erythrozyten-Vorläuferzellen essentiell (Lombardero et al., 2011). Dieser Mechanismus wird beeinflusst durch die Gewebesauerstoffsättigung, wobei eine Hypoxie über die Aktivierung des Hypoxie-induzierter Faktor 1 (HIF-1) zu einer Steigerung der Transkription und der Produktion von EPO und EPO-Rezeptoren führt (Lombardero et al., 2011).

Neben der primären EPO-Produktion in den Nieren wird EPO fetal v.a. in der Leber gebildet; jedoch konnte zusätzlich in anderen Geweben wie dem Gehirn die Expression von EPO-mRNA und EPO-Rezeptoren nachgewiesen werden (Lombardero et al., 2011; Marti et al., 1996). EPO-mRNA wird u. a. im Hippocampus und im temporalen Cortex sowie in der Amygdala exprimiert, die EPO-Produktion findet zum Teil in den Astrozyten aber auch in den unreifen Oligodendrozyten statt (Marti et al., 1996; Sugawa et al., 2002). Wegen der lokalen EPO-

Bildung im Gehirn deutet dies auf eine parakrine Funktion von EPO im Gehirn hin (Marti et al., 1996). Insgesamt weist EPO hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Effekte auf. Zu den nicht-hämatopoetischen Effekten zählen u. a. die später aufgeführten neurotrophischen, neuroprotektiven und vaskulären Eigenschaften (Kumral et al., 2006; Sugawa et al., 2002; Yan et al., 2016).

Präventiv wird EPO in der Neonatologie zur Reduktion von Bluttransfusionen bei Frühgeborenen-Anämie eingesetzt, sodass EPO ein häufig genutztes Medikament in der Therapie von anämischen Frühgeborenen ist (Ohlsson and Aher, 2020; Wang et al., 2020).

1.3.1 Neonatale Neuroprotektion mit Erythropoetin

EPO und EPO-Rezeptor können im unreifen Gehirn ab der 5. bis 6. Schwangerschaftswoche post conceptionem (p.c.) nachgewiesen werden (Juul et al., 1999). In tierexperimentellen Studien wurde gezeigt, dass EPO zur Neurogenese und Gliogenese in der Gehirnentwicklung beiträgt (Sugawa et al., 2002; Yu et al., 2002). EPO induziert unter anderem die Proliferation von Astrozyten und die Reifung von Oligodendrozyten in der Gliogenese (Sugawa et al., 2002). Der Einfluss auf die Neurogenese wurde im Modell der EPO-Rezeptor-Knock-out Mäuse bestätigt. Der Verlust von EPO-Rezeptoren bewirkte eine Reduktion von neuronalen Vorläuferzellen und führte zu einer vermehrten Apoptose während der embryonalen Entwicklung (Yu et al., 2002).

Neben den neurotrophischen Effekten demonstriert EPO sich als neuroprotektive Substanz in tierexperimentellen Studien. Insgesamt kann die neuroprotektive Wirkung von EPO in akute und langfristige Effekte eingeteilt werden. Hierbei führt unter anderem die Applikation von rekombinantem EPO bei hypoxisch-ischämischen Hirnschädigungen im neonatalen Ratten-Modell zu antioxidativen und antiapoptotischen sowie zu antiinflammatorischen Effekten (Kumral et al., 2006; Kumral et al., 2005; Sun et al., 2005). In weiteren tierexperimentellen Studien zeigen sich EPOs langfristige neuroprotektive Eigenschaften durch eine Steigerung der Neurogenese, der Oligodendrogenese und der Angiogenese nach ischämischen Ereignissen (Gonzalez et al., 2013; Yan et al., 2016).

Der potentielle neuroprotektive Einfluss von EPO wurde ebenfalls in mehreren klinischen Studien untersucht (Fischer et al., 2017; Juul et al., 2020; Neubauer et al., 2010). Eine Metaanalyse über die neuroprotektiven Effekte von EPO, die sich auf vier randomisiert kontrollierte Studien stützt, ergab ein geringeres Risiko für einen *Mental Developmental Index* unter 70 im *Bayley Scales Infant Development Test* Version II (Fischer et al., 2017). Der *Bayley*

Scales Infant Development Test Version II ist ein Instrument zur Bestimmung von Entwicklungsverzögerungen im frühkindlichen Alter, wobei ein *Mental Development Index* unter 70 für eine moderate bis schwere Entwicklungsverzögerung spricht (Celik et al., 2020). Insgesamt umfasst die Metanalyse von Fischer et al. 1133 Frühgeborene, die im korrigierten Alter von 18 bis 22 Monaten beurteilt wurden (Fischer et al., 2017). Ebenso wurde die neurologische Leistung von 10- bis 13-jährigen Frühgeborenen innerhalb einer retrospektiven Studie von Neubauer et al. eruiert. Hierbei zeigte sich, dass die EPO-Gabe, die im Zusammenhang mit der neonatalen Anämie-Prophylaxe gegeben wurde, mit einem höheren IQ bei Frühgeborenen assoziiert ist (Neubauer et al., 2010). Dieser Effekt war sogar noch ausgeprägter bei Kindern mit intraventrikulären Blutungen (Neubauer et al., 2010). Bei Frühgeborenen im Vorschulalter (3,5 bis 4 Jahre) wurde auch in einer randomisiert kontrollierten Studie eine verbesserte kognitive Leistung nach repetitiver EPO-Applikation festgestellt (Ohls et al., 2016). Zudem konnten in MRT-Untersuchungen weniger Auffälligkeiten in der weißen und grauen Substanz nach einer EPO-Behandlung am errechneten Geburtstermin detektiert werden (Leuchter et al., 2014). Zu einem anderen Ergebnis kam die kürzlich veröffentlichte kontrollierte randomisierte Studie des „Preterm Erythropoietin Neuroprotection Trail“ (PENUT) mit 941 Frühgeborenen in der Phase III, bei der kein geringeres Risiko für neurologische Veränderungen im korrigierten Alter von zwei Jahren festgestellt wurde (Juul et al., 2020).

Zusammenfassend erweist sich EPO in tierexperimentellen Studien als eine neuroprotektive Substanz, wobei die genauen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind. Zudem unterliegt der klinische Nutzen im Hinblick auf die Neuroprotektion von Frühgeborenen einem aktuellen Diskurs, da sich die genannten klinischen Studien in Applikationsdauer, Dosierung und Fallzahl teils erheblich unterscheiden (Juul et al., 2020; Neubauer et al., 2010; Ohls et al., 2016).

1.3.2 EPO-Dosierung in der Neuroprotektion von Frühgeborenen

In der Therapie von Frühgeborenen-Anämie wird EPO als Medikament im klinischen Alltag eingesetzt (Ohlsson and Aher, 2017). Für neuroprotektive Effekte werden jedoch höhere EPO-Dosierungen benötigt, da nur ein geringer Anteil des injizierten EPOs die Blut-Hirnschranke passiert (Juul et al., 2004). Der Mechanismus für den Übertritt von EPO über die Blut-Hirnschranke ist wahrscheinlich passiv (Juul et al., 2004). Hierbei ist die Plasmakonzentration, die mit der Penetration von EPO durch die Blut-Hirnschranke korreliert, im neonatalen Ratten-

Modell mitentscheidend (Statler et al., 2007). Eine intraperitoneale Applikation verursacht unter anderem wegen einer schnelleren Absorption höhere Plasmakonzentrationen als eine subkutane EPO-Gabe (Statler et al., 2007). Dementsprechend ist nach einer subkutanen Gabe die EPO-Konzentration im Gehirn niedriger als nach einer intraperitonealen Gabe (Statler et al., 2007). Zudem konnte die pharmakokinetische Studie von Statler et al. demonstrieren, dass nach einer Verletzung einer Hirnhemisphäre die Gesamtkonzentration von EPO nach einer intraperitonealen Gabe 50% höher war als in der unverletzten kontralateralen Hemisphäre. Dieser Effekt war geringer bei einer subkutanen Gabe (Statler et al., 2007). EPO erwies sich im tierexperimentellen Modell der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung in der neuroprotektiven Wirkung als abhängig von der Dosierung (Kellert et al., 2007). Der größte neuroprotektive Effekt von EPO konnte hier nach einer Therapie mit drei subkutanen Injektionen von 5.000 IE/kg KG rekombinanten EPO oder nach einer subkutanen Bolusinjektion von 30.000 IE/kg KG rekombinanten EPO nachgewiesen werden (Kellert et al., 2007).

Die aktuellen klinischen Studien zur neuroprotektiven Wirkung von EPO bei Frühgeborenen unterscheiden sich in der Dosierung, dem Applikationsbeginn und der Therapiedauer (Fischer et al., 2017; Juul et al., 2020). Insgesamt wurden bisher in klinischen Phase I- und II-Studien keine negativen Auswirkungen bei Frühgeborenen wie z.B. erhöhter Blutdruck oder ein größeres Risiko für die Frühgeborenen-Retinopathie nach EPO-Applikation mit Dosierungen im moderaten Dosisbereich von 500, 1.000, 2.500 und 3.000 IE/kg KG i.v. nachgewiesen (Fauchere et al., 2015; Juul et al., 2008). Wenngleich mehrere tierexperimentelle und klinische Studien verschiedene therapeutische Schemata testeten, ist die Frage nach einer passenden Dosierung und Applikationsdauer in der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion noch nicht abschließend geklärt (Volpe, 2020).

1.3.3 EPO als neuroprotektiver Therapieansatz für Sauerstoff-induzierte Hirnschädigungen

Die supraphysiologische Sauerstoffkonzentration ist mit einem erhöhten Risiko für neurologische Veränderungen im unreifen Gehirn assoziiert, sodass ein Fokus der Forschung auf der Etablierung protektiver Therapieoptionen liegt (Dewan et al., 2020; Felderhoff-Mueser et al., 2004; Hoeber et al., 2016; Serdar et al., 2016).

EPO zeigte sich als neuroprotektiver Faktor im neonatalen Ratten-Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung (Hoeber et al., 2016; Kaindl et al., 2008; Sifringer et al., 2010; Sifringer et al., 2009). Experimentell resultierte eine Applikation von rekombinantem EPO zum

einen in einer Reduktion der Hyperoxie-induzierten Proteinproduktion der proinflammatorischen Cytokinen IL-1beta und IL-18 und zum anderen in einer Normalisierung des oxidativen Stressparameters Glutathion sowie in einer Hochregulation der neuroprotektiven Hämoxygenase-1 (Sifringer et al., 2010; Sifringer et al., 2009). Weiterhin inhibierte die Applikation des rekombinanten EPO die Dysregulationen von Apoptose-assoziierten Proteinen wie Caspase-2, -3 und -8 (Kaindl et al., 2008). Nach einer Einzelgabe rekombinanten EPO zeigten sich keine Verbesserung der langfristigen Sauerstoff-induzierten mikrostrukturellen Veränderungen der weißen Substanz nach vorausgegangener 48-stündigen Hyperoxie, jedoch bestätigte sich der protektive Effekt von EPO in der positiven Beeinflussung der kognitiven Leistungsfähigkeit von adoleszenten und adulten Ratten und in der akut-erhöhten Überlebensrate von Oligodendrozyten (Hoeber et al., 2016).

Daraus resultiert, dass der neuroprotektive Nutzen von EPO im Sauerstoff-induzierten Hirnschädigungsmodell noch weiter erforscht werden sollte und auch die potentiellen Auswirkungen eines anderen EPO-Applikationsschema, wie einer repetitiven EPO-Gabe, entsprechend den aktuellen klinischen Studien, untersucht werden sollten.

1.4 Hypothalamus-Hypophysen-Achsen

Das Hypothalamus-Hypophysen-System, bestehend aus den Ebenen Hypothalamus, Hypophyse und Endorganen, ist ein Teil des endokrinen Systems. Insgesamt beinhaltet das Hypothalamus-Hypophysen-System die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse mit dem adrenokortikotropen Hormon (ACTH), die Hypothalamus-Hypophysen-Wachstumshormon-Achse mit dem Wachstumshormon (GH), die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse mit dem Thyreoidea-stimulierenden Hormon (TSH), die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse mit den Hormonen Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH) und die laktotrope Achse mit dem Hormon Prolaktin (Prl). Ein weiterer Schwerpunkt dieser experimentellen Arbeit liegt auf den Hypothalamus-Hypophysen-Achsen, die an der neurologischen Entwicklung beteiligt sind.

Der Hypothalamus ist neben dem dritten Ventrikel im Bereich des Zwischenhirns lokalisiert und hat verschiedene Kerne mit jeweils spezifischen neurosekretorischen Zellen (Kleine and Rossmannith, 2021a). Die Entwicklung des Hypothalamus findet im Verlauf der Gehirnentwicklung sehr früh statt (Kleine and Rossmannith, 2021a). Die Hypophyse befindet sich in einer Ausbuchtung des Os sphenoidale und ist über den Hypophysenstiel mit dem Gehirn verbunden (Kleine and Rossmannith, 2021a). Insgesamt besteht die Hypophyse aus der

Adenohypophyse, der Neurohypophyse und dem Mittellappen. Embryologisch entsteht die Hypophyse aus der Rathke-Tasche (Adenohypophyse) und aus einer Ausstülpung des Diencephalons (Neurohypophyse) (Kleine and Rossmannith, 2021a). Die Rathke-Tasche bildet sich hierbei aus einer Verdickung des oralen Ektoderms (Kleine and Rossmannith, 2021a). Im Verlauf differenzieren sich im Bereich der Rathke-Tasche die unterschiedlichen hypophysären Zellen. Immunhistochemisch lassen sich zunächst in der menschlichen Hypophyse die somatotropen und adrenokortikotropen Zellen, welche das adrenokortikotrope Hormon (ACTH) und das Wachstumshormon (GH) produzieren, in der 8. SSW nachweisen (Asa et al., 1986). In der hypophysären Entwicklung folgt in der 9. SSW die Expression der alpha-Proteinkette von der Glykoproteinhormone (Asa et al., 1986). Hierzu zählen neben TSH das Hormon LH und FSH (Kleine and Rossmannith, 2021a). Die Bildung der beta-Proteinkette von TSH ist erst in der 12. SSW nachweisbar (Asa et al., 1986). Diese wird von ungefähr 10% der hypophysären Zellen produziert, welche die thyreotropen Zellen darstellen (Asa et al., 1986). Zudem regulieren die Hormone des Hypothalamus-Hypophysen-Systems essentielle Entwicklungsprozesse – insbesondere auch im Hinblick auf die Gehirnentwicklung (Ajo et al., 2003; Benjamins et al., 2014; Prezioso et al., 2018). Im Einzelnen übernehmen die Hypothalamus-Hypophysen-Achsen dabei folgende Funktionen:

I. Hypothalamus-Hypophysen-Wachstumshormon-Achse

Als Teil der Hypothalamus-Hypophysen-Wachstumshormon-Achse ist GH beteiligt an Wachstumsprozessen, sowie an der fetalen Entwicklung des Nervensystems (Kleine and Rossmannith, 2021b). Die Wirkung erzielt GH entweder direkt über den GH-Rezeptor oder über das in der Leber produzierte Hormon *insulin-like growth factor 1* (IGF₁) (Kleine and Rossmannith, 2021b). Die Prozesse werden reguliert über den Hypothalamus und dessen Kerngebiete Nucleus arcuatus und Nucleus paraventricularis mit den Hormonen Wachstumshormon-*Releasing*-Hormon (GHRH) und Somatostatin (Kleine and Rossmannith, 2021a). Diese wirken auf die somatotropen Zellen des hypophysären Vorderlappens, die GH sezernieren (Kleine and Rossmannith, 2021a). In der Gehirnentwicklung ist GH dann an der Differenzierung und der Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen sowie von Astrozyten beteiligt (Ajo et al., 2003). Zudem werden die GH-Rezeptoren in Bereichen der aktiven Neurogenese, wie dem Hippocampus und dem Gyrus dentatus, exprimiert (Scheepens et al., 2005).

II. Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse

Die Regulationszentren der Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüsen-Achse umfassen das hypothalamische Kerngebiet Nucleus paraventricularis mit dem Thyreotropin-*Releasing*-Hormon (TRH) und die thyreotropen Zellen der Adenohypophyse mit TSH (Kleine and Rossmannith, 2021a). TSH besteht als Glykoproteinormon aus einer alpha- und einer beta-Proteinkette (Kleine and Rossmannith, 2021b). Durch TSH wird mit verschiedenen Rückkopplungsmechanismen die Produktion und Sekretion der Schilddrüsenhormone Thyroxin (T4) und die aktive Form Triiodthyronin (T3) gesteuert (Kleine and Rossmannith, 2021b). Funktionell ist die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse über die Regulation von Stoffwechselprozessen an der Entwicklung des Menschen beteiligt (Kleine and Rossmannith, 2021b). In Hinblick auf die Gehirnentwicklung demonstrierten tierexperimentelle Studien mit Schilddrüsenhormon-Mangel, dass die thyreotrope Achse an Prozessen wie beispielsweise der Myelinisierung, der neuronalen Migration und der synaptischen Plastizität beteiligt ist (Prezioso et al., 2018). Die Schilddrüsenrezeptoren sind im Gehirn schon vor Beginn der fetalen Schilddrüsenfunktion nachweisbar, sodass die maternalen Schilddrüsenhormone die Entwicklung ebenfalls beeinflussen (Bernal, 2002). Klinisch kann sich ein postnataler Mangel an Schilddrüsenhormonen in der neonatalen Entwicklungsphase beim Menschen ohne Behandlung als das Krankheitsbild Kretinismus präsentieren. Kretinismus ist gekennzeichnet durch eine mentale und motorische Retardierung (Klosinska et al., 2022).

III. Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Das adrenokortikotrope Hormon (ACTH) der Hypophyse ist Bestandteil der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und reguliert die Freisetzung von Gluko- und Mineralokortikoiden aus der Nebennierenrinde (Kleine and Rossmannith, 2021b). ACTH entsteht aus dem Prohormon Proopiomelanokortin (POMC), aus welchem in der Adenohypophyse zusätzlich in den adrenokortikotropen Zellen die Peptidhormone β -Lipotropin und β -Endorphin hervorgehen (Kleine and Rossmannith, 2021b). In der Pars intermedia der Hypophyse erfolgt dagegen die Bildung von Melanokortin und Acetyl- β -Endorphin aus dem Vorläuferprotein POMC (Kleine and Rossmannith, 2021b). Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse wird auf hypothalamischer Ebene durch das Corticotropin-*Releasing*-Hormon (CRH)

gesteuert, das aus dem Nucleus paraventricularis freigesetzt wird. Insgesamt gilt die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse als Regulationsachse von Stressreaktionen (Kleine and Rossmann, 2021a). Zudem ist ACTH ebenfalls an der neurologischen Entwicklung beteiligt. So stimuliert ACTH die Proliferation aller drei Glia-Zellarten – Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten – und beschleunigt die Differenzierung von Oligodendrozyten (Benjamins et al., 2014).

Alle drei näher beschriebenen Hormon-Achsen sind maßgeblich an der neurologischen Entwicklung des unreifen Gehirns des Menschen beteiligt und stehen deshalb potentiell im Fokus der Pathogenese von Hirnschädigungen und neurologischen Folgeerkrankungen von Frühgeborenen (Delahunty et al., 2010; Scratch et al., 2015).

1.4.1 Hypothalamus-Hypophysen-System bei Frühgeborenen

Die Frühgeburt ist mit unterschiedlichen Folgeerkrankungen und Komplikationen assoziiert, sodass auch Anzeichen für Dysfunktionen und Dysregulationen im Hypothalamus-Hypophysen-System existieren.

In der somatotropen Achse präsentiert sich u. a. laborchemisch eine postnatale Erhöhung des Wachstumshormons bei den Frühgeborenen, welche als Risikofaktor für die Entwicklung einer Frühgeborenenretinopathie identifiziert wurde (Hikino et al., 2001; Scratch et al., 2015). Die Studie von Scratch et al. demonstrierte, dass der frühe erhöhte GH-Serumspiegel von extremen Frühgeborenen weiter mit einer verschlechterten kognitiven Leistung im Bereich des verbalen und räumlichen Arbeitsgedächtnisses im Grundschulalter verbunden ist (Scratch et al., 2015). Dagegen ist der Effekt von veränderten Hormonspiegeln in der thyreotropen Achse auf die kognitiven Fähigkeiten aktuell noch unklar. So zeigte sich in einer Kohorte bei Frühgeborenen mit transients Hypothyreose im korrigierten Alter von fünfenehalb Jahren ebenfalls entwicklungsneurologisch ein schlechteres Ergebnis (Delahunty et al., 2010). Dieser Zusammenhang konnte jedoch in einer aktuelleren Studie nicht verifiziert werden (Tan et al., 2019). Bei der transienten Hypothyreose handelt es sich insgesamt um eine häufige endokrine Veränderung, welche eine Prävalenz von 20% bei den Frühgeborenen unterhalb der 34. SSW hat (Chung, 2014; Delahunty et al., 2010). Die transiente Hypothyreose wird definiert als niedriger Schilddrüsenhormon-Serumspiegel in Kombination mit einer normwertigen TSH-

Konzentration (Chung, 2014). Diese Hormonkonstellation normalisiert sich innerhalb der ersten zwei bis drei Wochen postnatal (Chung, 2014). Neben dem Phänomen der transienten Hypothyreose zeigt sich bei einem Teil der Frühgeborenen eine verspätete Erhöhung des TSH-Serumspiegels im Vergleich zu Reifgeborenen, welche sich ebenfalls vorübergehend präsentiert (Zdraveska and Kocova, 2021). Ein Erklärungsansatz für die verspätete Erhöhung des TSH stellt die Unreife der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse dar (Zdraveska and Kocova, 2021).

Diese Hinweise auf eine unvollendete Entwicklung zeigen sich auch in der kortikotropen Achse (Chung, 2014). So weisen Frühgeborene in den ersten Lebenswochen eine relative adrenokortikale Insuffizienz auf, die mit erniedrigtem Blutdruck und Hypoglykämien assoziiert ist (Finken et al., 2017; Ng et al., 2004). Ab dem Schulkindalter ergeben sich in Speichel- und Serumuntersuchungen zusätzlich Anhaltspunkte auf einen erhöhten basalen Kortisol-Serumspiegel, wobei sich in akuten sozialen Stresssituationen eher eine abgeschwächte kortikotrope Reaktion zeigt (Finken et al., 2017). Langfristig geht diese gesteigerte Kortisol-Sekretionsrate mit einem vermehrten Risiko für ein metabolisches Syndrom einher (Finken et al., 2017). In einer Studie von Hofman et al. konnte zudem nachgewiesen werden, dass Frühgeborene mit einem Gestationsalter unter der 32. SSW schon im Kindesalter eine reduzierte Insulinsensitivität aufweisen (Hofman et al., 2004).

Klinisch ergeben sich also Anzeichen für Veränderungen im Hypothalamus-Hypophysen-System bei Frühgeborenen – auch im neurologischen Bereich. In vorherigen Studien konnten die Risikofaktoren dieser Dysfunktionen und Dysregulationen teilweise geklärt werden. Hierbei waren u. a. ein niedriges Geburtsgewicht, ein frühes Gestationsalter und postnatale Infektionen Risikofaktoren für endokrine Störungen in der neonatalen Phase (Chung, 2014). Bisher wurde jedoch der schädigende Einfluss von supraphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen in Bezug auf die multifaktorielle Genese von hormonellen Veränderungen in der Neonatologie nicht untersucht.

2 FRAGESTELLUNGEN

2.1 Analysen zum neuroprotektiven Effekt einer repetitiven Erythropoetin-Applikation im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung

Tierexperimentelle Studien ergaben eine signifikante Beziehung zwischen Hyperoxie und perinatalen Hirnschädigungen im neonatalen Ratten-Modell nach supraphysiologischer Sauerstoffgabe (Brehmer et al., 2012; Felderhoff-Mueser et al., 2004; Serdar et al., 2016). Dies zeigte sich in Form einer Hypomyelinisierung und mikrostrukturellen Veränderungen der weißen Substanz sowie im Verhalten langfristig als motorisch-kognitive Defizite (Brehmer et al., 2012; Schmitz et al., 2012; Serdar et al., 2016). Erythropoetin erwies sich als neuroprotektiver Faktor in mehreren klinischen Studien (Fischer et al., 2017; Neubauer et al., 2010); jedoch konnte eine verbesserte neurologische Leistung in einigen randomisiert-kontrollierten Untersuchungen im korrigierten Alter von zwei Jahren nicht verifiziert werden (Juil et al., 2020; Natalucci et al., 2016). Die Studien unterschieden sich in Dosierung und Behandlungsschema (Fischer et al., 2017; Juil et al., 2020; Natalucci et al., 2016). Im tierexperimentellen Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung führte eine einmalige Erythropoetin-Applikation zu einer Verbesserung der langfristigen kognitiven Defizite und reduzierte den Hyperoxie-induzierten Verlust von Oligodendrozyten, dagegen wurde kein Effekt auf die Hyperoxie-induzierte Hypomyelinisierung nachgewiesen (Hoerber et al., 2016). Aus den bisherigen publizierten Daten ergaben sich folgende Fragestellungen:

- I. Inwiefern reduziert eine repetitive Erythropoetin-Applikation die Hyperoxie-induzierte Hypomyelinisierung im neonatalen Ratten-Modell?
- II. Welchen Einfluss hat eine repetitive Erythropoetin-Applikation auf die motorisch-kognitiven Langzeitentwicklung nach Hyperoxie-induzierter Hirnschädigung?

2.2 Analysen zum Effekt der Hyperoxie auf das Hormonsystem im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung

In dem Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung wurde verifiziert, dass supraphysiologische Sauerstoffkonzentrationen an der Entstehung von Hirnschädigungen im unreifen Gehirn des Frühgeborenen beteiligt sind (Brehmer et al., 2012; Felderhoff-Mueser et al., 2004; Serdar et al., 2016). Dies zeigte sich z.B. durch eine transiente Hypomyelinisierung und langfristige kognitive Defizite (Hoeber et al., 2016; Serdar et al., 2016). Die toxikologische Wirkung von Sauerstoff ist jedoch nicht nur an pathologischen Prozessen im Gehirn beteiligt, sondern zusätzlich an neonatalen Komplikationen, wie beispielsweise der Frühgeborenen Retinopathie und der Bronchopulmonalen Dysplasie (Day and Ryan, 2017; Perrone et al., 2009). Neben den genannten Komplikationen gibt es bei Frühgeborenen Hinweise auf endokrine Veränderungen (Chung, 2014; Scratch et al., 2015). Hierbei wurde die potentiell schädigende Wirkung von supraphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen auf das unreife endokrine System bisher nicht untersucht. Insbesondere sind die Auswirkungen auf die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-, Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden- und Hypothalamus-Hypophysen-Wachstumshormon-Achse wegen ihrer Beteiligung an der Entwicklung des unreifen Gehirns relevant (Ajo et al., 2003; Benjamins et al., 2014; Bernal, 2002). Hieraus resultierten folgende Fragestellungen:

- I. Inwieweit beeinflusst eine Exposition gegenüber supraphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen die RNA-Expression der hypophysären Hormone TSH und GH sowie des Vorläuferproteins POMC im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung?
- II. Welchen Einfluss hat die Hyperoxie auf die Sekretion der hypophysären Hormone (TSH, GH und ACTH) und des Schilddrüsenhormons (T4) in der neonatalen Ratte?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung des Frühgeborenen und Gewebepräparation

Alle Tierexperimente wurden nach den Richtlinien des Zentralen Tierlabors des Universitätsklinikums Essen durchgeführt und vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt. Während des 12-stündigen Tag- und Nachtrhythmus war die adäquate Versorgung der Tiere mit Futter und Wasser gewährleistet.

Drei Tage (P3) alte Wistar-Ratten wurden zusammen mit einem Muttertier einer 48-stündigen Hyperoxie (P3-P5) mit einem Sauerstofflevel von 80 % in einer Sauerstoffkammer ausgesetzt. Die Kontrollgruppe blieb unter normoxischen Bedingungen (Raumlufte mit einem 21 %igen Sauerstofflevel). Um eine verlängerte erhöhte Sauerstoffexposition der Muttertiere zu vermeiden, wurden diese nach 24 Stunden ausgetauscht. Die Versuchsgruppen bestanden jeweils aus zwei Würfen mit ausgeglichenem Geschlechts- und Gewichtsverhältnis. Die Verteilung der Würfe erfolgte zufällig. Eine adäquate Gewichtszunahme der Ratten wurde täglich bis P11 dokumentiert. Anschließend wurden die Ratten wöchentlich gewogen. In die tierexperimentellen Studien wurden 132 Wistar-Ratten aus 14 Würfen für die EPO-Studie und 34 Wistar-Ratten aus vier Würfen für die Analyse der hypophysären Hormone aufgenommen.

3.2 Analysen zum neuroprotektiven Effekt einer repetitiven Erythropoetin-Applikation im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung

3.2.1 EPO-Applikation und Gewebepräparation

Zur Untersuchung der neuroprotektiven Effekte der repetitiven EPO-Applikation im Modell der Hyperoxie-induzierten Hirnschädigung des Frühgeborenen erhielten die Ratten von P3 bis P6 eine tägliche intraperitoneale (i.p.) EPO-Applikation (Epo, NeoRecormon®) von je 5.000 IE/kg Körpergewicht (10 ml/kg KG). Die kumulative Dosis betrug 20.000 IE/kg KG. Die erste Applikation erfolgte mit Beginn der Hyperoxie. Der Kontrollgruppe wurde ein äquivalentes Volumen NaCl 0,9 % (10 ml/kg KG) i.p. injiziert.

Insgesamt ergaben sich vier Versuchsgruppen: Normoxie + NaCl 0,9 % (NO), Normoxie + EPO (NO + EPO), Hyperoxie + NaCl 0,9 % (HO), Hyperoxie + EPO (HO + EPO).

Für die biochemische Proteinanalyse (Western Blot) erfolgte bei einem Teil der Versuchsgruppe eine Dekapitation an P11 nach transkardialer Perfusion mit Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS). Die beiden Hemisphären wurden freipräpariert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C aufbewahrt. Zunächst wurde den Tieren eine Überdosis Chloralhydrat i.p. appliziert. Nach Ausbleiben der Schmerzreflexreaktion der unteren Extremitäten erfolgte die Eröffnung des Brustkorbes und die Präparation des Herzens. Die transkardiale Perfusion wurde mit PBS über die linke Herzkammer nach Inzision des rechten Vorhofes durchgeführt. Die Gehirne wurden aus der Kalotte präpariert und in 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) für 2 Tage bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden diese in Paraffin eingebettet. Zur Übersicht dieses Experimentalansatzes siehe Abb. 1.

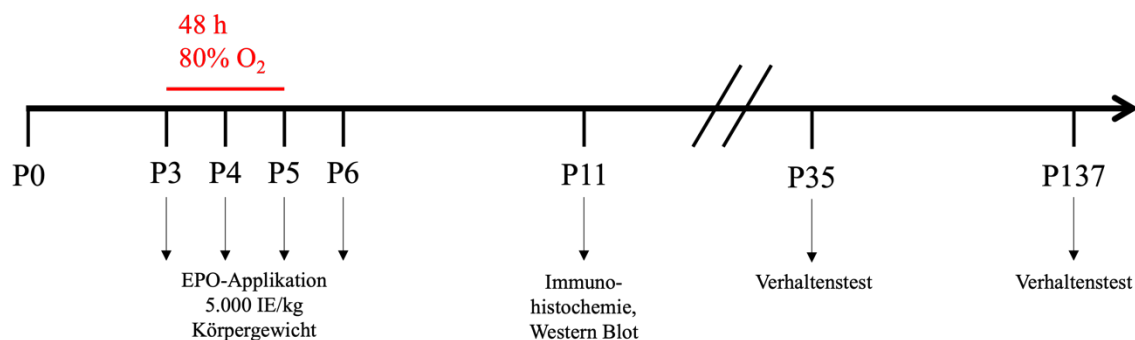


Abbildung 1: Versuchsaufbau der repetitiven Erythropoetin-Applikation im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung

3.2.2 Biochemische Proteinanalyse

3.2.2.1 Proteinisolierung und -quantifizierung

Das schockgefrorene Gehirngewebe wurde in Eis gekühltem Lysepuffer mittels mehrfachen Pipettierens mechanisch homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 20 min auf Eis inkubiert. Zur Trennung der Hirnbestandteile wurde das Homogenat für 20 min mit einer Drehzahl von $1700 \times g$ und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase bildet die zytosolische Fraktion. Diese wurde abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die zytosolischen Proben wurden bis zur Weiterverwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Die Proteinquantifizierung erfolgte mittels *Pierce BCA Assay*. Hierfür wurde zunächst eine Standardreihe aus der Stocklösung von 2 mg/ml BSA-Lösung und destilliertem Wasser hergestellt. Weiter erfolgte eine 1:50 Verdünnung der Proben mit destilliertem Wasser.

10 µl der verdünnten Probe wurden in Zweifach-Bestimmung auf die 96-Lochplatte aufgetragen und mit 150 µl BCA-Lösung aufgefüllt. Die BCA-Lösung bestand aus einem 1:50 Verhältnis der Reagenz B (Bischinoninsäure) und Reagenz A (Kupferionenlösung). Danach wurde die 96-Lochplatte mit den Proben für 30 min bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde die Proteinkonzentration mittels *Tecan Infinite M200* photometrisch bestimmt.

3.2.2.2 Western Blot

Für die biochemische Proteinanalyse wurden 30 µl Lysat pro Gewebeprobe verwendet. Das Lysat wurde zu gleichen Teilen mit 2 × Lämmli-puffer verdünnt und für 10 min bei 95 °C inkubiert, sodass die Proteine denaturieren. Nachfolgend wurden die Proben zentrifugiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese. Hierzu wurden zunächst 12 ml 15 %iges Trenngel in die Gelkammer gegossen und mit 250 µl Isopropanol beschichtet. Die Polymerisation des Bisacrylamids war nach 30 min bei Raumtemperatur beendet. Nach Entfernung des Isopropanols wurde das 4,5 %ige Sammelgel in die Gelkammer gegossen und der Kamm für die Probetaschen eingesetzt. Anschließend wurde nach der Polymerisation des Sammelgels der Kamm entfernt und die beiden Pufferreservoirs mit 1 × Elektrophoresepuffer befüllt. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Probetaschen jeweils mit 1 × Elektrophoresepuffer gespült, sodass mögliche Reste des Sammelgels entfernt wurden. Jeweils 10 µl der Proben und ein Molekulargewichtsmarker wurden mit einer 100 µl Hamilton Pipette auf das Gel aufgetragen. Danach wurde die Elektrophorese bei 80 V gestartet und auf 180 V hochgestellt, sobald die Farbmittelfront das Sammelgel durchwandert hatte. Nach Erreichen der unteren Kante der Gelkammer wurde die Elektrophorese beendet.

Für den Transfer wurde ein Tank-Blot-System verwendet. Hierfür wurde der Transferpuffer während der Elektrophorese für 45 min bei -80 °C gekühlt. Nach Entfernung des Sammelgels wurde das Trenngel in den Transferpuffer transferiert und die Nitrocellulose-Membran im bidestilliertem Wasser und Blotpuffer äquilibriert. Anschließend wurde das Blotsandwich – bestehend aus Schwamm, Whatman-Papier, Membran und Trenngel – in die mit Blotpuffer befüllte Kammer gesteckt, sodass der Proteintransfer unter Kühlung über 75 min bei 100 V stattfinden konnte. Nach dem Transfer wurde die Membran 3 × 5 min in 10 × Tris-gepufferte

Kochsalzlösung mit Tween (TBS-T) gewaschen. Um die Transfereffektivität zu überprüfen, wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung gefärbt, welche danach wieder in TBS-T entfärbt wurde. Die Membran wurde mit 5 %igem Blockierungspuffer für 60 min geblockt, sodass unspezifische Proteinbindungen vermieden wurden. Danach wurde die Membran mit 10 ml der Antikörperverdünnung mit dem entsprechenden 2,5 %igem (GAPDH) oder 5 %igem Blockierungspuffer (Olig2, CNPase, MBP) unter ständigem Schütteln über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach dreimaligem Waschen mit TBS-T die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 60 min bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion der Antikörperbindung wurde eine ECL-Lösung (*enhanced chemiluminescence*) verwendet. Diese bestand aus jeweils 6 ml ECL-Lösung I und II und einer Hinzugabe von 3,6 µl H₂O₂. Die Membranen wurden für 5 min in der Lösung in einer abgedunkelten Umgebung inkubiert. Dann wurden die Proteinbanden auf den Membranen mittels *ChemiDoc XRS+* System belichtet. Die densitometrische Analyse erfolgte mit *Image Lab Software*. Die Dichte der zu untersuchenden Proteine wurde ins Verhältnis zum Referenzprotein GAPDH gesetzt und auf die Kontrollgruppe normiert.

3.2.3 Immunhistochemie

Nach der Freipräparation wurden die Gehirne in 4 %igem PFA fixiert. Zur Dehydrierung wurden die Gehirne dann in Einbettkassetten transferiert und im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums dehydriert. Am nächsten Tag erfolgte die Paraffineinbettung. Die eingebetteten Gehirne wurden mit einem Schlittenmikrotom von kaudal nach rostral 10 µm dick geschnitten. Für die Immunhistochemie wurden der Bregma-Bereich $-3,72 \pm 0,7$ mm (nach Watson-Paxinos) verwendet.

Die Koronarschnitte wurden für die immunhistochemische Analyse deparaffinisiert. Hierzu wurden die Schnitte für 2 × 10 min in Xylol und in einer absteigenden Ethanolreihe – 2 × 5 min 100 % Ethanol, 2 × 5 min 70 % Ethanol, 2 × 5 min 50 % Ethanol – gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 2 × 5 min in destilliertem Wasser rehydriert. Die Antigendemaskierung erfolgte in heißem Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0) im Wasserbad bei 100 °C für 30 min. Danach kühlten die Schnitte für 15 – 30 min bei Raumtemperatur ab. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte für 3 × 5 min in TBS-T gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurden die Schnitte mit immunhistochemischer Blockierungslösung für 60 min bei

Raumtemperatur geblockt. Nach einer dreimal fünfminütigen Waschung mit TBS-T wurden die Schnitte mit den primären Antikörpern Kaninchen-anti-GAPDH, Maus-anti-CNPase, Maus-anti-MBP und Maus-anti-Olig2 – entsprechend der Verdünnung – in der Blockierungslösung über Nacht bei 4 °C inkubiert (Tabelle 3.4.2. II.I.). Am nächsten Tag wurden die Schnitte für 3 × 5 min in PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Danach erfolgte die einstündige Inkubation mit den sekundären Antikörpern Anti-Kaninchen und Meerrettich-Peroxidase-konjugierte-anti-Maus in der entsprechenden Verdünnung bei Raumtemperatur unter Vermeidung von direktem Lichteinfluss (Tabelle 3.4.2. II.II.). Vor der Gegenfärbung mit DAPI wurden die Schnitte erneut für 3 × 5 min in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden mit 1 µg/ml DAPI für 10 min zur Visualisierung der Zellkerne gegengefärbt und dann für 3 × 5 min in PBS und für 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte mit einem Eindeckmedium beschichtet und mit Deckgläschen bedeckt.

3.2.4 Konfokale Mikroskopie

Die Gewebeschnitte wurden mit einem Konfokalmikroskop (A1plus, Eclipse Ti, Nikon, Deutschland) analysiert. Für die Bilderfassung wurden vier Laser (Diodenlaser 405 nm, G-Helium-Neon-Laser 543 nm, Argonlaser 514 nm, RN-Laser 639 nm) und vier verschiedene Filter (450/50-405 LP, 515/20-540 LP, 585/65-640 LP) verwendet. Die kompletten Hemisphären wurden mit einem 10-fach Objektiv als konfokale Z-Stapel-Bilder mit einer Dicke von 10 µm (Z-Ebene 1 µm) aufgenommen. Es wurden von jedem Tier zwei Gewebeschnitte eingescannt. Die Bilder wurden mithilfe der *NIS Element AR Software 4.0* (Nikon) konvertiert. Zur Analyse der dreifach positiven Zellen (Olig2⁺/APC-CC1⁺/DAPI⁺) wurden neun zu untersuchende Regionen festgelegt: drei in der weißen Substanz, drei im Kortex und drei im Thalamus. Die Auswertung erfolgte verblindet. Für jede Region wurden die dreifach positiven Zellen mit dem *Cell Counter Plugin* der *Image J Software* ausgezählt. Die Daten wurden als durchschnittlich positive Zellen pro mm² in der weißen Substanz, im Kortex und im Thalamus dargestellt. Die MPB-Analyse erfolgte mit dem binären Tool der *NIR AIR Software*. Hier wurde die positive Fläche gemessen und die Daten wurden als Prozentsatz der MBP-positiven Fläche pro Hemisphäre angegeben.

3.2.5 Verhaltenstests

Die Verhaltenstests wurden mit adoleszenten Ratten (P35 bis P49) durchgeführt und im adulten Tier (P137 bis P145) wiederholt (Semple et al., 2013). Diese Verhaltenstests fanden verblindet statt. Zu Beginn wurden die Tiere ab P22 an einen inversen zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gewöhnt, damit die Verhaltenstests in der aktiven Phase der Versuchsratte stattfinden können. Durch tägliches Handling wurden die Tiere mit dem Versuchsleiter vertraut gemacht.

Die Versuchstiere durchliefen zuerst den Open Field Test. Anschließend wurden vier Tage Novel Object Recognition Test und weitere vier Tage Barnes Maze durchgeführt. Alle Arenen wurden nach jedem Tier mit 70 %igem Ethanol gereinigt. Die Daten wurden mittels automatisiertem Tracking System (Ethovision 14) akquiriert.

Open Field Test

Beim Open Field Test (DeFries et al., 1966) erfolgte die Bewertung von angstbezogenem Verhalten und spontaner motorischer Aktivität. Hierfür wurden die Tiere in die Mitte einer offenen Arena ($50 \times 50 \times 40 \text{ cm}^3$ für adoleszente Tiere, $75 \times 75 \times 40 \text{ cm}^3$ für erwachsene Tiere) ausgesetzt und für 5 min die motorische Aktivität mit einem Infrarotfeld (emittiertes Licht von 850 nm, TSE System) beobachtet. Zur Auswertung des Open Field Test wurden als Parameter die zurückgelegte Wegstrecke und die Geschwindigkeit verwendet.

Novel Object Recognition Test

Der Novel Object Recognition Test wurde erstmals von Ennaceur und Delacour 1988 beschrieben und beruht auf der Wiedererkennung von bekannten Objekten und der Neigung von Ratten neue Objekte zu erforschen (Ennaceur and Delacour, 1988). Die Versuchstiere wurden am ersten Tag zur Gewöhnung in die leere Arena unter rotem Licht gesetzt (Y-Maze, Armlänge: 60 cm, Weite: 26 cm und Wandhöhe: 56 cm). Am zweiten und dritten Tag wurden die Tiere mit den drei identischen Kegeln, welche am Ende jedes Armes lokalisiert waren, bekannt gemacht. Eine der Säulen wurde am letzten Tag durch ein neues Objekt (Zylinder) ausgetauscht. Hierbei wurden die Tiere für 5 min beobachtet, jedoch wurden am Ende nur die ersten zwei Minuten evaluiert (Chambon et al., 2011). Zur Bewertung des Novel Object Recognition Test wurden jeweils die Zeit mit dem bekannten und dem neuen Objekt gemessen.

Barnes Maze

Mithilfe des Barnes Maze können raum-zeitliche Erinnerungen erfasst werden (Barnes, 1979). Das Barnes Maze besteht aus einer runden Scheibe (\varnothing 1,22 m, Höhe: 0,8 m), welche 20 Löcher besitzt. Unter einem der 20 Löcher befindet sich eine Fluchtbox. Die Fluchtbox wird von der Ratte aufgesucht, da diese ein aversives Verhalten gegenüber hellerleuchteten, offenen Flächen zeigen. Für den Versuch wurden die Ratten zunächst in rotem Licht unter einen transparenten Zylinder auf die Scheibe platziert. Danach wurde zur Orientierung für 30 s auf Weißlicht geschaltet. Nach der Entfernung des Zylinders hatten die Tiere 120 s Zeit die Umgebung zu erkunden und die Fluchtbox aufzusuchen. In dieser Fluchtbox verblieben die Tiere dann für 1 min. Bei Nichtauffinden der Fluchtbox wurden die Tiere vorsichtig in diese für 1 min transferiert. Die Durchführung des Barnes Maze beinhaltete drei aufeinanderfolgende Übungstage und den Versuchstag. Am Versuchstag wurden alle Löcher verschlossen und die Latenzzeit zum Auffinden der Fluchtbox wurde gemessen (O'Leary et al., 2011). Um geruchsbedingte Hinweise innerhalb des Labyrinths zu verhindern, wurde die Fluchtbox nach jedem Tier im Uhrzeigersinn weiter rotiert. Die Position der Fluchtbox blieb für die Tiere während der Vorbereitung und des Versuches gleich.

3.2.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mittels GraphPad Prism 6.0. Die Normalverteilung wurde mittels D'Agostino-Pearson-Test bestätigt. Um Differenzen zwischen den Versuchstieren zu bestimmen, wurde eine einseitige Varianzanalyse mit one-way ANOVA durchgeführt und anschließend Bonferroni-Post-Hoc-Test. Als signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ angesehen. Zur Darstellung der Daten wurden Boxplots mit eingezeichnetem Median, 25 %iger und 75 %iger Perzentile verwendet.

3.3 Analysen zum Effekt der Hyperoxie auf das Hormonsystem im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung

3.3.1 Gewebepräparation und Serumgewinnung

Zur Analyse des Einflusses der Hyperoxie-induzierten Hirnschädigung des Frühgeborenen auf das Hormonsystem entfiel die EPO-Applikation, sodass sich zwei Versuchsgruppen ergaben:

Normoxie (NO) und Hyperoxie (HO). Nach Beendigung der Hyperoxie wurden die Ratten an P5 (akuter Zeitpunkt) und an P11 (subakuter Zeitpunkt) geopfert. Hierbei wurden die Ratten dekapitiert und das Blut wurde aus dem Torso für die Serumanalyse gewonnen. Dieses wurde anschließend für 10 min zentrifugiert ($1.000 \times g$) und das Serum abpipettiert.

Nach der Freipräparation der Gehirne wurden die Hypophysen aus der Sella turcica entnommen und in Einbettungsformen transferiert, die mit NEG-50 aufgefüllt wurden. Serum und Hypophysen wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Eine Übersicht über den Ablauf dieses Experimentalansatzes und der darauffolgenden Untersuchungen gibt Abb. 2.

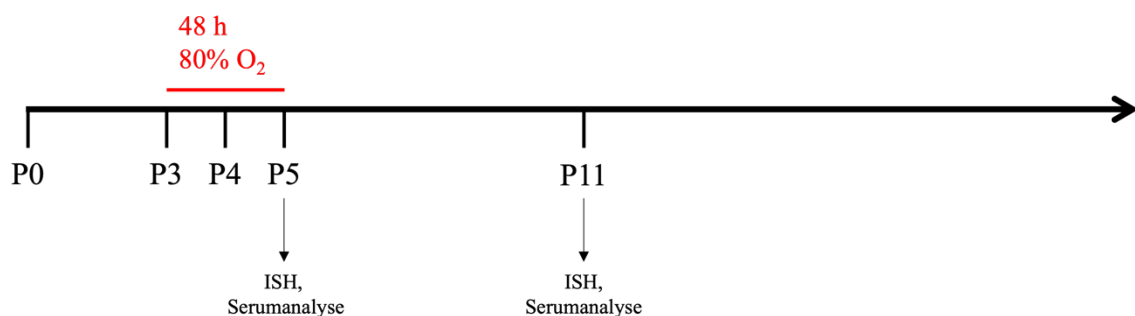


Abbildung 2: Versuchsaufbau zum Effekt der Hyperoxie auf das Hormonsystem im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung

3.3.2 Herstellung von Gewebeschnitten

Die Hypophysen wurden zum Temperatúrausgleich zunächst für 15 min im Kryostat bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ belassen. Danach wurden die Hypophysen mit dem Einbettungsmedium an den Gewebeprobenhalter des Kryostat befestigt und geschnitten. Die Schnittdicke für die Hypophysen betrug $14\text{ }\mu\text{m}$. Zur Trocknung wurden die Gewebeschnitte für 10 min bei Raumtemperatur ausgelegt und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.3.3 RNA-Sondenherstellung

3.3.3.1 Bakterielle Transformation und Plasmid-Purifikation

Zur Züchtung der Bakterienkultur wurden zu Beginn $80\text{ }\mu\text{l}$ H₂O, $20\text{ }\mu\text{l}$ $5 \times$ KCM-Puffer und $1\text{ }\mu\text{l}$ Plasmid-DNA in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ chemisch kompetenter Bakterien *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α hinzugegeben. Diese Kultur wurde für 15 min auf Eis inkubiert und dann für 2 min einem Hitzeschock von $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgesetzt,

sodass die Plasmide durch die Transformation der Bakterien aufgenommen wurden. Nach der Transformation erfolgte eine weitere Inkubation für 60 min bei 37 °C in Luria-Bertani (LB)-Medium. Danach wurde die Bakterienkultur auf eine LB-Agaroseplatte mit Ampicillin (100 µg/ml) als Resistenzantibiotikum transferiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine einzelne Bakterienkolonie der LB-Agaroseplatte entnommen und unter ständigem Schütteln bei 37 °C für eine weitere Nacht in LB-Medium mit einem Resistenzantibiotikum inkubiert.

Die Plasmid-Purifikation erfolgte mit NucleoBond® Machery-Nagel Kit nach firmeneigenem Protokoll. Hierzu wurden zunächst die Bakterienkultur für 15 min bei 4 °C zentrifugiert ($1.800 \times g$). Nach dem Verwurf des Überstandes wurde das Bakterienpellet in insgesamt 12 ml Puffer S1 und RNase A resuspendiert. Danach wurden 12 ml Puffer S2 zur Suspension hinzugefügt und für 2 - 3 min bei Raumtemperatur belassen. Abschließend wurden 12 ml Puffer S3 (4 °C) zur Suspension hinzugegeben und geschwenkt bis eine homogene Flüssigkeit mit weißen Ausflockungen entstand. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde die Suspension jedes Mal nicht geschüttelt, sondern lediglich geschwenkt. Diese homogene Flüssigkeit mit Ausflockungen wurde für 5 min auf Eis inkubiert. Für die folgenden Schritte wurde ein NucleoBond® AX 500 Column mit 6 ml Puffer N2 äquilibriert. Um ausgefällte Proteine und Zelltrümmer zu entfernen, wurden das Lysat für 5 min bei $12.000 \times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert und dann mit einem Faltenfilter in die NucleoBond® Column filtriert. Anschließend wurde das AX 500 Column mit 32 ml Puffer N3 gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer N5 eluiert. Zur Ausfällung der Plasmid-DNA wurden 11 ml Isopropanol hinzugegeben und die Probe bei $15.000 \times g$ für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet zur Entfernung der Salze mit 5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Ethanol entfernt und das DNA-Pellet für 20 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 150 µl Tris 10 mM aufgelöst.

3.3.3.2 DNA-Linearisierung und Phenol-Chloroform Extraktion

Für die Linearisierung wurde zunächst ein Verdau aus 15 µg DNA, 10 µl $10 \times$ Restriktionsenzym puffer und 5 µl Restriktionsenzym hergestellt und bis zu einem Gesamtvolumen 100 µl mit DEPC H₂O aufgefüllt. Die Reaktion wurde über Nacht bei 37 °C

inkubiert. Zur Herstellung der Antisense und Sense RNA-Sonden ist zu beachten, dass die Restriktionsenzyme an der vorgesehenen Stelle schneiden, sodass die RNA-Polymerasen bis zum 5' Ende der Hybridisierungssonde transkribiert. Hierbei dient die Sense RNA-Sonde als Kontrolle. Um den Erfolg der Linearisierung zu überprüfen, wurde zur Kontrolle eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Probenröhrchen des 1 %igen Agarosegels wurden mit 8 µl DEPC H₂O, 2 µl orangen Gelbeladungspuffer und 1,5 µl der jeweiligen linearisierte DNA beladen. Anschließend erfolgte die DNA-Extraktion mit Phenol-Isoamylalkohol-Chloroform (PIC). Hierzu wurden 100 µl PIC (4 °C) zu der Probe hinzugegeben und mittels eines Vortexmischers zu einer milchigen Lösung vermischt. Nach der Entstehung dieser Dispersion wurde die Probe für 2 min bei 4 °C zentrifugiert (20.800 × g). Durch diesen Prozess wird die DNA von den Proteinen separiert, da sich die Proteine in der Interphase der Phenol-Chloroform-Lösung befinden und die DNA in der wässrigen Phase enthalten ist. Deswegen wurde die wässrige Schicht mit der enthaltenen DNA in ein RNase-freies Mikroreaktionsgefäß transferiert. Danach wurden RNase-freies Natriumacetat (0,1 × Gesamtvolumen der DNA-Extraktion) und 100 %iges Ethanol (3 × Gesamtvolumen der DNA-Extraktion) hinzugeben. Die Proben wurden dann für 15 min bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine zwölfminütige Zentrifugation (20.800 × g) bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen. Um überschüssiges Salz zu entfernen, wurde die Probe mit 1 ml -20 °C kaltem Ethanol (70 %) gewaschen und erneut für 2 min bei 4 °C zentrifugiert. Daraufhin wurden die Proben auf einem Heizblock luftgetrocknet und mit RNase-freiem Wasser bis zu einer linearisierten DNA-Konzentration von 1 µg/µl verdünnt.

3.3.3.3 In vitro Transkription

Nach erfolgter DNA-Linearisierung wurden die RNA-Sonden hergestellt. Hierfür wurden jeweils 1 µg der linearisierten DNA, 2 µl Digoxigenin-markierte Uridin 5'-Triphosphat (NTP Mix Dig), 4 µl 5 × Transkriptionspuffer, 0,5 µl muriner RNase-Inhibitor, 1 µl RNA-Polymerase (T7, T3 oder SP6) und DEPC H₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 20 µl in RNase-freie Mikroreaktionsgefäße pipettiert. Darauf wurden die Proben zentrifugiert und auf 37 °C (T3 und T7) oder auf 40 °C (SP6) für 105 min inkubiert. Des Weiteren wurde 1 µl von 1 mg/ml RNase-freier DNase I hinzugegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert, um die vorhandene DNA zu entfernen. Zur Überprüfung wurden 2 µl des Syntheseprodukts zusammen mit 3 µl DEPC H₂O, 5 µl 2 × RNA-Gelbeladungspuffer, nach achtminütiger Inkubation bei

60 °C, auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Die restlichen Proben wurden in der Zeit bei 4 °C zwischengelagert. In die zwischengelagerten Proben wurden 42 µl DEPC H₂O in die Mikroreaktionsgefäße gegeben, sodass ein Gesamtvolumen von ungefähr 60 µl ergibt. Für die folgenden Schritte wurden *ProbeQuant G-50 MicroColumns* zur Aufreinigung der RNA-Proben verwendet. Nach der Vorbereitung der *MicroColumns* wurden die 60 µl RNA-Probe mittig auf das Harz der *MicroColumn* pipettiert und für 3 min bei 900 × g zentrifugiert. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde 1 µl der finalen RNA-Sonde auf den Nanodrop gegeben. Die RNA-Sonden wurden in der *In situ Hybridisierung* weiterverwendet.

3.3.4 Digoxigenin-*In situ* Hybridisierung

3.3.4.1 Prähybridisierung

Zur Vorbereitung der *In situ Hybridisierung* wurden die gefrorenen Kryotomschnitte (-80 °C) einer Prähybridisierung unterzogen. Diese fand in einer möglichst RNase-freien Umgebung statt. Zunächst wurden alle Schnitte für 15 min luftgetrocknet und in einen sterilisierten Metallobjektträger gestellt, um in 4 %iger Phosphat-gepufferten Paraformaldehyd-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert zu werden. Nach dreimaligem zehninütigem Waschen mit 1 × PBS wurden die Gewebeschnitte zur Permeabilisierung der Membran für 10 min in 0,4 %igem Triton X100 Puffer eingetaucht. Anschließend erfolgte eine weitere Waschung mit 1 × PBS (5 min) und ein mehrfaches Eintauchen in destilliertes Wasser. Zur Gewebeatylierung wurde der Metallobjektträger mit den Schnitten für eine Minute in 0,1 M Triethanolamin Lösung (pH 8,0) unter starkem Rühren gegeben. Diese Reaktion wurde durch die Hinzugabe von 0,25 % (v/v) Essigsäureanhydrid gestoppt. Die Schnitte verblieben für weitere 10 min in der Lösung. Vor der Gewebeatwässerung mit Ethanol wurden die Objektträger wiederholt in 1 × PBS (5min) und im Anschluss mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Gewebeatwässerung fand in steigender Ethanol-Konzentration statt. Die Schnitte wurden in 50 %igem und in 70 %igem Ethanol dehydriert. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurden sie wieder bei -80 °C bis zur Nutzung gelagert.

3.3.4.2 Hybridisierung

Die hergestellten RNA-Sonden wurden im Hybridisierungspuffer verdünnt, sodass eine Konzentration von 5 ng/ μ l im Gesamtvolumen (V_{total}) vorlag. Insgesamt bestand die Hybridisierungssonde aus:

1. $V_{\text{total}} \times 5 \text{ ng}/\mu\text{l} = \text{RNA-Konzentration} \times 60 \mu\text{l}$
2. $V_{\text{total}} = 90 \% \text{ Hybridisierungspuffer} + 2 \% \text{ DTT (1M)} + 60 \mu\text{l RNA-Sonde} + \text{DEPC H}_2\text{O}$

Nachdem die prähybridisierten Kryotomschnitte aufgetaut waren, wurde auf die hypophysären Gewebeschnitte je 30 μ l der Hybridisierungssonde pipettiert. Zur Kontrolle der *In situ Hybridisierung* wurde bei jeweils einem Gewebeschnitt die Sense-RNA-Sonde verwendet. Anschließend erfolgte über Nacht eine Inkubation in RNase-freien *BioAssay* Schalen mit 50 %igem Formamid mit einer Temperatur von 52 °C. Hierbei lagen die Gewebeschnitte erhöht in den *BioAssay* Schalen, sodass kein direkter Kontakt mit der Formamid-Flüssigkeit bestand.

3.3.4.3 Posthybridisierung

Um eine hohe Stringenz zu erreichen und eine Hintergrundfärbung zu reduzieren, wurden die Schnitte im Anschluss an die *In situ Hybridisierung* in niedrigen Salzkonzentrationen und im warmen Wasserbad gewaschen.

Die Schnitte wurden mit $2 \times \text{saline sodium citrat (SSC)}$ und anschließend mit $1 \times \text{SSC}$ für jeweils 20 min bei Raumtemperatur gewaschen. Dann wurden die Schnitte bei 37 °C im RNase-Puffer für 30 min inkubiert. In weiteren Schritten erfolgten Waschungen mit $1 \times \text{SSC}$, $0,5 \times \text{SSC}$ und $0,2 \times \text{SSC}$ für erneut je 20 min in absteigender Salzkonzentration bei Raumtemperatur. Als Nächstes wurden die Schnitte für eine Stunde in ein 65 °C warmes Wasserbad mit $0,2 \times \text{SSC}$ gestellt. Abschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 15 min im Posthybridisierung Puffer P1 gewaschen und mit dem Posthybridisierung Puffer P2 für 90 min geblockt.

3.3.4.4 Immunhistochemie von Digoxigenin

Zur Detektion der Digoxigenin-markierten RNA wurde zunächst eine Verdünnung von 1:500 des primären alkalisch Phosphatase-konjugierten Anti-DIG-Antikörpers (Fab-Fragment) mit Puffer P2 hergestellt. Anschließend wurden 60 µl der Lösung auf die Deckgläser gegeben und über Nacht in einer Feuchtkammer mit Wasser bei 4 °C belassen. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zweimal im Puffer P1 für jeweils 15 min und einmal im Posthybridisierung Puffer P3 für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Die Schnitte wurden danach im lichtdichten Objektträgerbehälter, befüllt mit der Färbelösung, inkubiert (siehe Tabelle 1). Durch die alkalische Phosphatase wird eine enzymatische Farbreaktion mit NBT/X-Phosphat ausgelöst, welche zu einem violetten Niederschlag führt. Nach Überprüfung der Färbung wurden die Schnitte bei ausreichender Intensität dreimal für 10 min in destilliertem Wasser gewaschen und dann mit Deckgläsern abgedeckt. In den Folgetagen wurden die Schnitte zur anschließenden Auswertung eingescannt.

Tabelle 1: Inkubationszeit der Färbungen

RNA-Sonden	Inkubationszeit
beta-TSH	4 Stunden 30 Minuten
GH	2 Stunden
POMC	3 Stunden 30 Minuten

3.3.4.5 Auswertung der *In situ Hybridisierung*

Die Auswertung aller Gewebeschnitte der *In situ Hybridisierung* erfolgte mit *Image J*. Hierzu wurden die Bilder zunächst in *Image J* in 8-Bit konvertiert und mit dem Befehl „invert“ invertiert. Die Gesamtfläche des hypophysären Vorderlappens (Pars distalis) wurde für jedes Bild mit dem Befehl „polygon“ umrissen, wobei der Pars intermedia des Vorderlappens und Artefakte ausgeschlossen wurden. Zur Quantifizierung wurde die Gesamtfläche in quadratischen Pixeln gemessen und die Intensität des Hintergrundsignals für jedes Hormon zur Abgrenzung einer Hintergrundfärbung ermittelt. Nach Bestimmung des Hintergrundsignals wurden diese Signale mit Hilfe des Befehls „threshold“, welcher einen Grenzwert für die minimale Signalintensität festlegt, ausgeschlossen. Der verbleibende Bereich, genannt Threshold-Fläche, repräsentiert die positiven mRNA-Signale für jedes Hormon. Die Threshold-Fläche wurde ebenfalls in quadratischen Pixeln ausgemessen und im Verhältnis zur

Gesamtfläche des Vorderlappens gesetzt, sodass der prozentuale Anteil der mRNA-Expression in Bezug auf die Gesamtfläche berechnet werden konnte.

$$\text{Gefärbte Fläche \%} = \frac{\text{Threshold} - \text{Fläche} \times 100 \%}{\text{Gesamtfläche d. Vorderlappens}}$$

3.3.5 Multiplex Immunoassay

Zur Analyse der Seren von P5 und P11 wurde das kommerzielle Milliplex® *MAP Rat Pituitary Magnetic Bead Panel* und das Milliplex® *MAP Rat Thyroid Hormone Magnetic Bead Panel* nach jeweils firmeneigenem Protokoll (EMD Millipore Corporation, #RPTMAG-86K und #RTHYMAG-30K) verwendet. Hiermit wurden die Konzentrationen von ACTH, TSH und T4 bestimmt. Es erfolgte eine Verdünnung der Serumproben von 1:3 bei TSH und ACTH mit der Serum-Matrix und eine von 1:6 bei T4 mit dem Assay-Puffer aus dem Analyse-Kit. Die Assay-Sensitivität betrug 1,95 pg/ml für ACTH, 0,87 pg/ml für TSH und 2255 pg/ml für T4. Die Qualität wurde mittels Kontrollproben sichergestellt.

3.3.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die Analyse der Seren auf GH an P5 und P11 wurden mit einem kommerziellen *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Kit nach firmeneigener Anleitung (EMD Millipore Corporation, #ERZMGH-45K) durchgeführt. Die Serumproben der Wistar-Ratten wurden im Assay-Puffer im Verhältnis 1:2 vor Durchführung der Analyse verdünnt, wobei die Assay-Sensitivität 0,07 ng/ml betrug. Anschließend wurden die Serumproben nach Methode des „Sandwich“-ELISAs quantifiziert. Die Qualitätskontrolle erfolgte mittels vorgegebener Proben aus dem ELISA-Kit.

3.3.7 Statistische Analyse

Die graphischen Daten wurden mittels GraphPad Prism 6.0 analysiert und als Median mit Mittelwert \pm Standardabweichung präsentiert, wobei die Normalverteilung mittels D'Agostino-Pearson-Test bestätigt wurde. Zur Detektion von Unterschieden in den Versuchsgruppen wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt. Hierbei galt ein p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant.

3.4 Chemikalien und Materialien

3.4.1 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

Tabelle 2: Chemikalien und kommerzielle Lösungen

Chemikalien	Firmen
Acrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland
AMPUWA	Fresenius SE & Co. KGaA Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
Anti-Digoxigenin	Roche Basel, Schweiz
beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich
Complete Mini, EDTA-free (Protease Inhibitor Cocktail)	Roche
Cutsmart	New England BioLabs GmbH Frankfurt am Main, Deutschland
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindole)	Invitrogen Karlsruhe, Deutschland
Denhardts Lösung 50 x	Sigma-Aldrich
Deoxyribonucleic acid from herring sperm	Sigma-Aldrich
Dextrasulfat 50 % Lösung	Merck Millipore Darmstadt, Deutschland
Diethylpyrocarbonat 0,1 %	Carl Roth GmbH & Co. KG
DIG RNA Labeling Mix	Sigma-Aldrich
N,N-Dimethylformamide (DMF)	Sigma-Aldrich

Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
EDTA	Thermo Fisher Scientific Inc.
Einbettungsmedium NEG-50	Thermo Fisher Scientific Inc.
Einschlussmittel Eukitt®	O.Kindler GmbH Freiburg im Breisgau, Deutschland
Erythropoetin NeoRecormon® (EPO)	Boehringer-La Roche Grenzach, Deutschland
Essigsäureanhydrid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethanol	Sigma-Aldrich
Fluoromount Aqueous Mounting Medium	Sigma-Aldrich
Formamid	Carl Roth GmbH & Co. KG
GeneRuler 100 bp DNA ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Isopropanol	PanReac AppliChem Darmstadt, Deutschland
KCM-Puffer	Invitrogen
Kaltwasserfischhaut-Gelatine	Sigma-Aldrich
Luminol	Sigma-Aldrich
Luria-Bertani-Medium (LB)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Magnesium chloride hexahydrate	Sigma-Aldrich
2-Methylbutan	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumhydrogenphosphat Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumhydroxid Tabletten	Merck KGaA
Natronlauge (NaOH) 4 mol/l	Thermo Fisher Scientific Inc.
NEBuffer	New England BioLabs GmbH

Nitroblue Tetrazolium (NBT)	Sigma-Aldrich
Orange G	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG
p-Coumarsäure	Sigma-Aldrich
peqGreen	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
Phenol-Isoamylalkohol-Chloroform (PIC)	Sigma-Aldrich
Phenylmethanesulfonylflourid (PMFS)	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Radioimmunprecipitation assay (RIPA-) Puffer	Sigma-Aldrich
RNase-Inhibitor (murine)	New England BioLabs GmbH
Salzsäure rauchend 37 % (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure rauchend 32 % (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	PanReac AppliChem
SSC Puffer (20 ×, saline sodium citrat)	Invitrogen by life technologies Carlsbad, CA, USA
5 × Transkription Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc.
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triethanolamin	Sigma-Aldrich
Tri-Natrium-Zitrat	PanReacAppliChem
Tris > 99,9 % Blotting Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (10 ×)	Invitrogen by life technologies
TritonX 100	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
tRNA von E.coli MRE 600	Roche
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck KGaA
X-Phosphat (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat)	Sigma-Aldrich
Xylol	PanReac AppliChem

3.4.2 Plasmide, Antikörper und Enzyme

I. Plasmide

Tabelle 3: Plasmide

cDNA	NCBI Accession	Fragment	Vektor	Linearisierung	RNA Polymerase
beta-TSH	M10902.1	nt190-443	pLS	PstI HindIII	T7 (as) T3 (sense)
GH	U62779.1	nt248-445	pLS	HindIII PstI	T7 (as) T3 (sense)
POMC	AH002232	nt56-526	pGEM4	XbaI HindIII	T7 (as) SP6 (sense)

II. Antikörper und Enzyme

Tabelle 4: Primäre Antikörper des Immunoblot

Antikörper	Klon	Verdünnung	Firma
Kaninchen-anti- GAPDH	monoklonal	1:5000	Cell Signaling Frankfurt, Deutschland
Maus-anti-CNPase	monoklonal	1:1000	Merck Millipore
Maus-anti-MBP	monoklonal	1:1000	Covance Münster, Deutschland
Maus-anti-Olig2	monoklonal	1:1000	Merck Millipore

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper des Immunoblot

Antikörper	Klon	Verdünnung	Firma
Anti-Kaninchen	polyklonal	1:2000	Dako Hamburg, Deutschland
Meerrettich- Peroxidase- konjugierte-anti- Maus	polyklonal	1:5000	Dako

Tabelle 6: Primäre Antikörper der Immunhistochemie

Antikörper	Klon	Verdünnung	Firma
Kaninchen-anti-Olig2	polyklonal	1:100	Millipore
Maus-anti-APC-CC1	monoklonal	1:100	Merck Millipore
Ratte-anti-MBP	monoklonal	1:200	abcam Berlin, Deutschland

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper der Immunhistochemie

Antikörper	Klon	Verdünnung	Firma	Konjugat
Ziege-anti-Kaninchen	polyklonal	1:500	Invitrogen	Alexa Fluor 647
Ziege-anti-Maus	polyklonal	1:500	Invitrogen	Alexa Fluor 488
Ziege-anti-Ratte	polyklonal	1:500	Invitrogen	Alexa Fluor 555

Tabelle 8: Enzyme der In situ Hybridisierung

HindIII Restriktionsenzym	New England BioLabs GmbH
PstI-HF Restriktionsenzym	New England BioLabs GmbH
RNase A	Thermo Fisher Scientific Inc.
RNase-freie DNase I	New England BioLabs GmbH
RNase T1	Thermo Fisher Scientific Inc.
SP6 Polymerase	New England BioLabs GmbH
T3 Polymerase	New England BioLabs GmbH
T7 Polymerase	New England BioLabs GmbH
XbaI Restriktionsenzym	New England BioLabs GmbH

3.4.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 9: Allgemeine Lösungen

Lösungen	Zusammensetzung
10 × Tris gepufferte Kochsalzlösung	0,1 M Tris-HCl; 3 M NaCl

(TBS, pH 7,4)	
10 × Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween (TBS-T)	1 % Tween in TBS
10 × Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4)	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 12 mM Gesamtphosphat ($\text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$)
4 % Paraformaldehyd (PFA)	4 % PFA in PBS; 5-8 NaOH-Tabletten

Tabelle 10: Lösungen der In situ Hybridisierung

1 %iges Agarosegel	0,6 g Agarose; 60 ml 1× TAE-Puffer; 3-4 µl peqGreen
Färbelösung (pro Objektträgerbehälter)	25 ml Puffer P3; 113 µl NBT-Stocklösung 75 mg/ml in 70 % DMF; 88 µl X-Phosphat (50 mg/ml Aqua dest.)
Hybridisierungspuffer (50 ml)	6 ml 5 M NaCl; 500 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,5); 100 µl 0,5 EDTA; 1250 µl tRNA (20 mg/ml); 1000 µl Denhardts Lösung 50 ×; 10 ml Dextransulfat 50 % Lösung
Orangener Ladungspuffer	50 mg Orange G; 500 µl 1 Tris-HCl (pH 7,5); 15 ml Glycerol; 50 ml H ₂ O
10 × Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,2 - 7,4 (5 l)	55 g Na ₂ PO ₄ ; 16 g NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O; 450 g NaCl
4 % Paraformaldehyd (1,5 l)	60 g Paraformaldehyd; 1350 ml Aqua dest.; 1-2 ml 1 M NaOH; 150 ml 10 × PBS
Posthybridisierung Puffer P1	100 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl
Posthybridisierung Puffer P2	500 ml P1; 50 g Milchpulver
Posthybridisierung Puffer P3	100 mM Tris-HCl (pH 9,5); 100 mM NaCl; 50 mM MgCl ₂
RNA Gelbeladungspuffer (blau)	47,5 % Formamid; 0,01 % SDS; 0,005 % Xylene Cyanol; 0,5 mM EDTA
RNase Puffer	0,5 M NaCl; 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 20 µg/ml RNase A; 1 unit/ml RNase T1

Triethanolamin Lösung (TEA)	740 ml Aqua dest.; 10 ml Triethanolamin; 2,25 ml 37 % HCl (rauchend, pH 8,0)
0,4 % Triton-X100 Puffer	8 ml Triton-X 100; 2 l 1 × PBS

Tabelle 11: Lösungen des Immunoblots

Blockierungspuffer	5 % Milchpulver/TBS-T
ECL-Lösung I	2,5 mM Luminol; 0,4 mM p-Coumarsäure; 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) in H ₂ O gelöst
ECL-Lösung II	100 mM Tris-HCl (pH 8,5) in H ₂ O gelöst
10 × Elektrophoresepuffer	1,92 M Glycin; 250 mM Tris; 1 % SDS
Lysepuffer	14,3 % complete 7 ×; 1 % PMSF in RIPA
2 × Lämmli	120 mM Tris-HCl (pH 6,8); 4 % SDS; 20 % Glycerol; 10 % β-Mercaptoethanol; 0,05 % Bromphenolblau
4,5 % Sammelgel	25 % 4 × Sammelgelpuffer; 4,5 % Acrylamid; 0,04 % APS; 0,2 % TEMED in AMPUWA
4 × Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,4 % SDS; 0,5 M Tris-HCl in AMPUWA (pH 6,8)
Transferpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % Methanol
15 % Trenngel	25 % 4 × Trenngelpuffer; 15 % Acrylamid; 0,05 % APS; 0,08 % TEMED in AMPUWA
4 × Trenngelpuffer (pH 8,8)	0,4 % SDS; 1,5 M Tris-HCl in AMPUWA

Tabelle 12: Lösungen der Immunhistochemie

Blockierungslösung	1 % BSA; 0,3 % Kaltwasserfischhaut- Gelatine in TBS-T
DAPI-Lösung	1 µg/ml in PBS
Zitratpuffer (pH 6,0)	10 mM Tri-Natrium-Zitrat; 0,05 % Tween 20

3.4.4 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Kits und Software

Tabelle 13: Geräte, Verbrauchsmaterialien, Kits und Software

Materialien	Firmen
BioAssay Schalen	VWR International GmbH
ChemiDocXRS+ imaging system	Bio-Rad Laboratories Inc. München, Deutschland
Coverplate-System Shandon Coverplate	Thermo Fisher Scientific Inc.
Deckgläser 24 × 40 mm ²	Carl Roth GmbH & Co. KG
Einbettungsform	TED PELLA Inc. Redding, CA, USA
Geldokumentation E-Box CX5 TS	Vilber Lourmat GmbH Eberhardzell, Deutschland
Gelsystem	Biometra Jena, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Carl Roth GmbH & Co. KG
Gewebescanner OpticLab H850	Plustec Technology GmbH Ahrensburg, Deutschland
Gewebescanner Software SliverFast	LaserSoft Imaging AG Kiel, Deutschland
Filterpapier Rotilabo-Blottingpapier, 1,5 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG
Heiz-Thermoschüttler HLC	Ditabis Pforzheim, Deutschland
ImageLab Software	Bio-Rad Laboratories Inc.
Inkubationsschalen	Thermo Fisher Scientific Inc.
Inkubationsschüttler INCU-Line ILS6	VWR International GmbH
Inkubator	PEQLAB Biotechnologie GmbH Erlangen, Deutschland
Konfokales Mikroskop	Nikon Minato, Tokio, Japan
Kryostat	Leica Biosystems Wetzlar, Deutschland
LB-Agaroseplatte	SARSTEDT AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland

Mikroskop Provis AX70	Olympus Europa SE & Co. KG Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplattenlesegerät Infinite M200	TECAN Group AG Männedorf, Schweiz
Mikrotom HM 430	Thermo Fisher Scientific Inc.
Milliplex® MAP Rat Thyroid Hormone Magnetic Bead Panel	EMD Millipore Corporation Billerica, USA
Milliplex® MAP Rat Pituitary Magnetic Bead Panel	EMD Millipore Corporation
Mini-Rocker-Shaker	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Netzgerät PowerPac HC power supply	Bio-Rad Laboratories Inc.
NIS Analysesoftware	Nikon
Nitrozellulose Blotting Membran Amersham Protan 0,2 µm NC	GE Healthcare Life Science Freiburg, Deutschland
NucleoBond® Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG Düren, Deutschland
Pierce BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay	Thermo Fisher Scientific Inc.
Präzisionswaage Explorer®	OHAUS® Parsippany, NJ, USA
Prism 6	GraphPad Software San Diego, CA, USA
ProbeQuant G-50 MicroColumns	GE-Healthcare Life Science
Rat/Mouse Growth Hormone ELISA-Kit	EMD Millipore Corporation
Sauerstoffkammer	OxyCycler, BioSpherix Lacona, NY, USA
Spektralphotometer NanoDrop Lite	Thermo Fisher Scientific Inc.
SuperFrost Plus Objektträger	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tank-Blotting-System	Bio-Rad Laboratories Inc.
Platten-Reader Infinite M200	Tecan Männedorf, Schweiz
Wasserbad	GFL Burgwedel, Deutschland

96-Well Platten	Sigma-Aldrich
Zentrifuge Micro STAR17	VWR International GmbH

4 ERGEBNISSE

4.1 Analysen zum neuroprotektiven Effekt einer repetitiven Erythropoetin-Applikation im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung

4.1.1 Repetitive EPO-Applikation verringert die Hyperoxie-induzierte Hypomyelinisierung zum subakuten Zeitpunkt

In einer vorherigen tierexperimentellen Studie im neonatalen Rattenmodell wurde demonstriert, dass eine Einzelgabe von 20.000 IE/kg KG EPO das Überleben von Oligodendrozyten nach einer Hyperoxie in neonatalen Ratten verbessert, jedoch keinen Effekt auf die Hypomyelinisierung und auf die strukturellen Langzeitveränderungen der weißen Substanz im sich entwickelnden Gehirn hatte (Hoeber et al., 2016). Nun wurde mittels Immunhistochemie und biochemischer Proteinanalyse ermittelt, inwiefern eine repetitive Applikation von Erythropoetin (4×5.000 IE/kg KG) von P3 bis P6 einen Einfluss auf die Hyperoxie-induzierte Hirnschädigung hat. Zur Analyse der Auswirkungen einer repetitiven EPO-Applikation wurden MBP, APC-CC1 (Marker für reife Oligodendrozyten) und Olig2 (Pan-Oligodendrozyten Marker) immunhistologisch, wie in Abbildung 3A beispielhaft für den Zeitpunkt P11 gezeigt, betrachtet. Hierbei zeigte sich in der hyperoxischen Gruppe (HO) eine signifikante Reduktion der MBP-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (NO). In der HO + EPO-Gruppe konnte in der immunhistologischen Untersuchung keine MBP-Reduktion (Abb. 3B) detektiert werden, welches in der proteinbiochemischen Analyse (Abb. 3C) verifiziert werden konnte. In der Analyse von Olig2 und APC-CC1 wurden keine Veränderungen in der Immunhistochemie festgestellt, sodass Anzahl der reifen Oligodendrozyten nicht von der Hyperoxie und der EPO-Behandlung beeinflusst wurden (Abb. 4A-C). Zudem zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede in der Expression der Oligodendrozyten-assoziierten Marker CNPase und Olig2 im Western Blot (Abb. 3D-E). Dieser Effekt blieb in der Immunhistochemie in allen vier Versuchsgruppen nach der Differenzierung in Cortex, Thalamus und weißer Substanz bestehen (Abb. 4A-C).

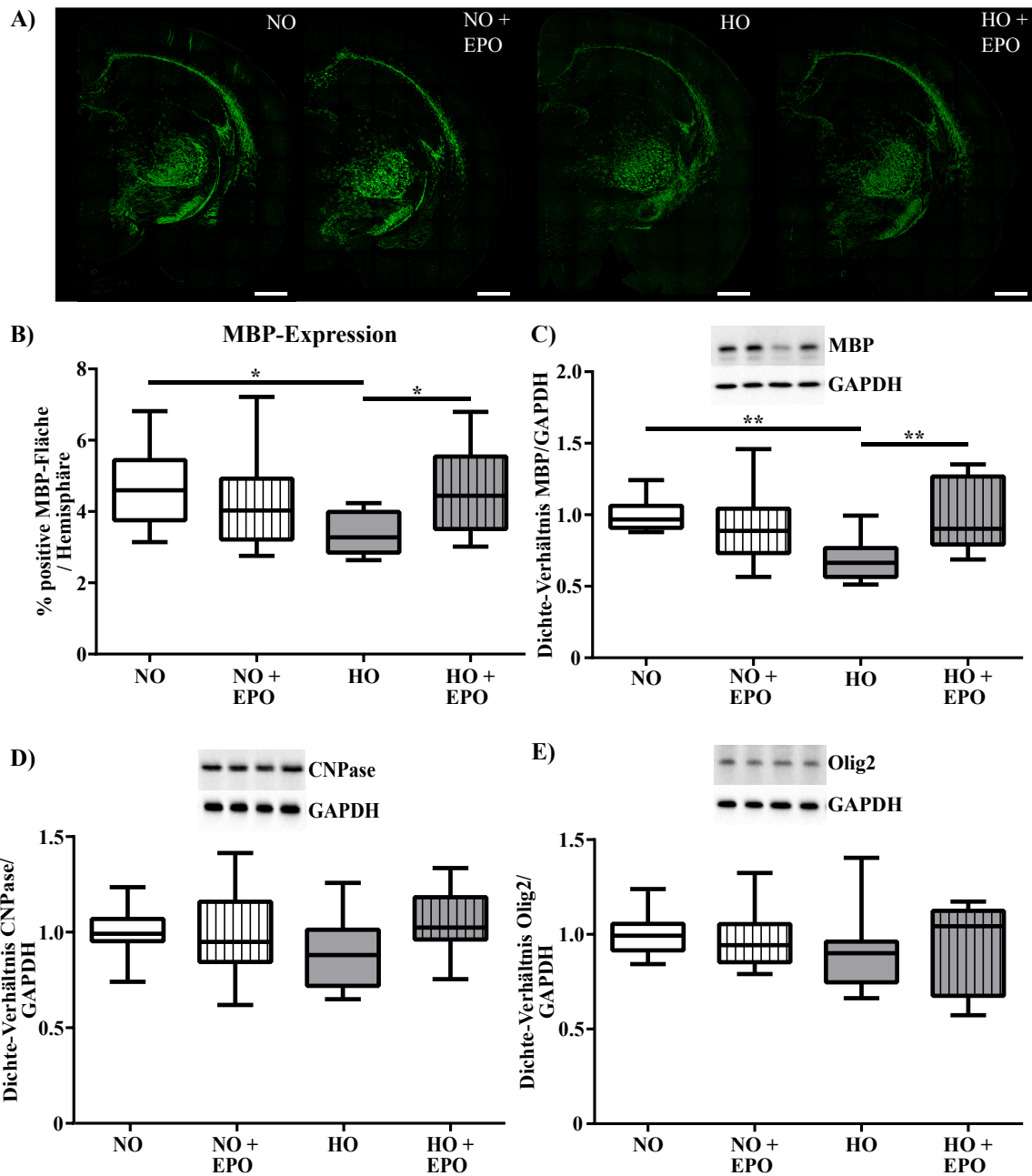


Abbildung 3: Repetitive EPO-Applikation verbessert die Hyperoxie-induzierte Hypomyelinisierung zum subakuten Zeitpunkt. Die Ratten wurden entweder einer Hyperoxie (HO, 80 %iger O₂ für 48 h von P3 bis P5) ausgesetzt oder blieben unter normoxischen Bedingungen (21 %ige Raumluft). Zusätzlich wurden die Tiere mit EPO (4 × 5.000 IE/kg KG von P3 bis P6) oder mit der gleichen Menge an NaCl 0,9 % behandelt. Die Analyse von Myelinisierung und Oligodendrozyten-assoziierten Proteinen wurde an P11 ausgewertet. (A) Repräsentative immunohistochemische MBP-Bilder (markierte MBP-Bereiche sind grün zu erkennen) im Koronarschnitt (-3,72 ± 0,7 mm Bregma-Bereich) an P11. Skalierung = 100 µm. (B) Auswertung der MBP-Immunohistochemie: Die Daten wurden in Prozent der MBP-positiven Fläche pro Hemisphäre angegeben. n = 10 – 11 Ratten/Gruppe. (C) Western Blot Analyse von MBP-, (D) CNPase- und (E) Olig2-Expression einer Großhirnhemisphäre. *p < 0,05, **p < 0,01, n = 11 – 12 Ratten/Gruppe. Abbildung nach Dewan et al, 2020.

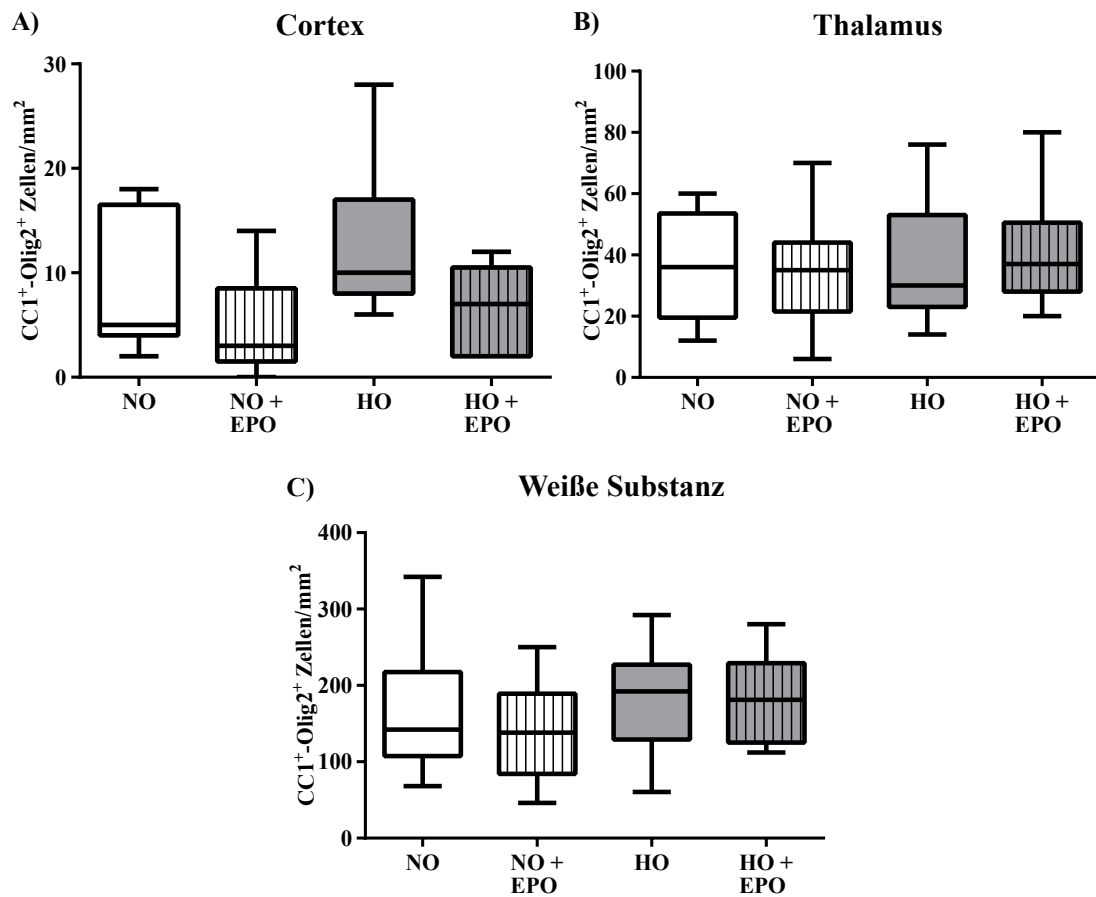


Abbildung 4: Reife Oligodendrozyten wurden nicht von der Hyperoxie und der EPO-Behandlung beeinflusst. Mittels Immunhistochemie wurde die Menge von Oligodendrozyten auf Olig2 und APC-CC1 analysiert. Dreifach-positive Zellen (Olig2+/APC-CC1+/DAPI+) wurden in Ratten an P11 nach abgelaufener Hyperoxie (48 h, 80 % O₂, P3 – P5, HO) oder nach Normoxie (21 % O₂) untersucht, wobei die Ratten entweder EPO (4 × 5000 IE/kg KG von P3 – P6) oder die gleiche Menge NaCl 0,9 % erhielten. Die durchschnittliche Menge an dreifach-positiven Zellen im (A) Cortex, (B) Thalamus und (C) in der weißen Substanz wurden in Zellen pro mm² ausgedrückt. n = 10 – 11 Ratten/Gruppe. Abbildung nach Dewan et al, 2020.

4.1.2 Repetitive EPO-Applikation reduziert Hyperoxie-induzierte kognitive Defizite in adoleszenten und adulten Ratten

Durch die Analyse der Gewebeproben konnte gezeigt werden, dass eine repetitive EPO-Applikation zu einer signifikanten Verbesserung der Hyperoxie-induzierten Hypomyelinisierung am subakuten Zeitpunkt P11 führt. Um die Effekte der verbesserten Hypomyelinisierung auf langfristige kognitive Defizite zu überprüfen, wurden in der adoleszenten und adulten Phase verschiedene Verhaltenstests durchgeführt, da eine neonatale Hyperoxie mit anhaltenden motorisch-kognitiven Defiziten in Mäusen und Ratten assoziiert ist (Schmitz et al., 2012; Serdar et al., 2016). Zuerst erfolgte der Open Field Test, welcher die Bewertung von angstbezogenem Verhalten und spontaner motorischer Aktivität ermöglicht (DeFries et al., 1966). Hierbei waren keine Veränderungen bei den beiden Parametern - zurückgelegte Wegstrecke und Geschwindigkeit - in allen vier Versuchsgruppen (NO, HO, NO + EPO, HO + EPO) zu beobachten (Abb. 5A). Im Novel Object Recognition Test wurden die Wiedererkennung von bekannten Objekten und die Neigung von Ratten, neue Objekte zu erkunden, evaluiert (Ennaceur and Delacour, 1988). Für die Auswertung wurde in den ersten zwei Minuten die Explorationszeit mit dem bekannten und dem neuen Objekt ermittelt (Chambon et al., 2011). Während die Kontrollgruppen (NO, NO + EPO) das neue Objekt präferierten, ergab sich bei der HO-Gruppe keine eindeutige Tendenz für ein Objekt in den beiden oben genannten Phasen (Abb. 5B). In der HO-Gruppe mit repetitiver EPO-Applikation wurden vergleichbare Objekt-Explorationszeiten detektiert wie in den Kontrollgruppen (NO, NO + EPO) (Abb. 5B). Weiterhin wurde das Barnes Maze zur Beurteilung der kognitiven Funktion, bei dem raum-zeitliche Erinnerungen erfasst werden, durchgeführt (Barnes, 1979). Im Vergleich zu den Kontrollgruppen wiesen die Tiere der HO-Gruppen in beiden Phasen eine signifikante verlängerte Latenz auf, um die Fluchtbox aufzufinden (Abb. 5C). Durch die repetitive EPO-Applikation wurde die Latenz bis zum Aufsuchen der Fluchtbox in der HO + EPO-Gruppe normalisiert (Abb. 5C). Insgesamt zeigen die Verhaltenstests eine Verbesserung der kognitiven Funktion nach repetitiver EPO-Applikation im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung.

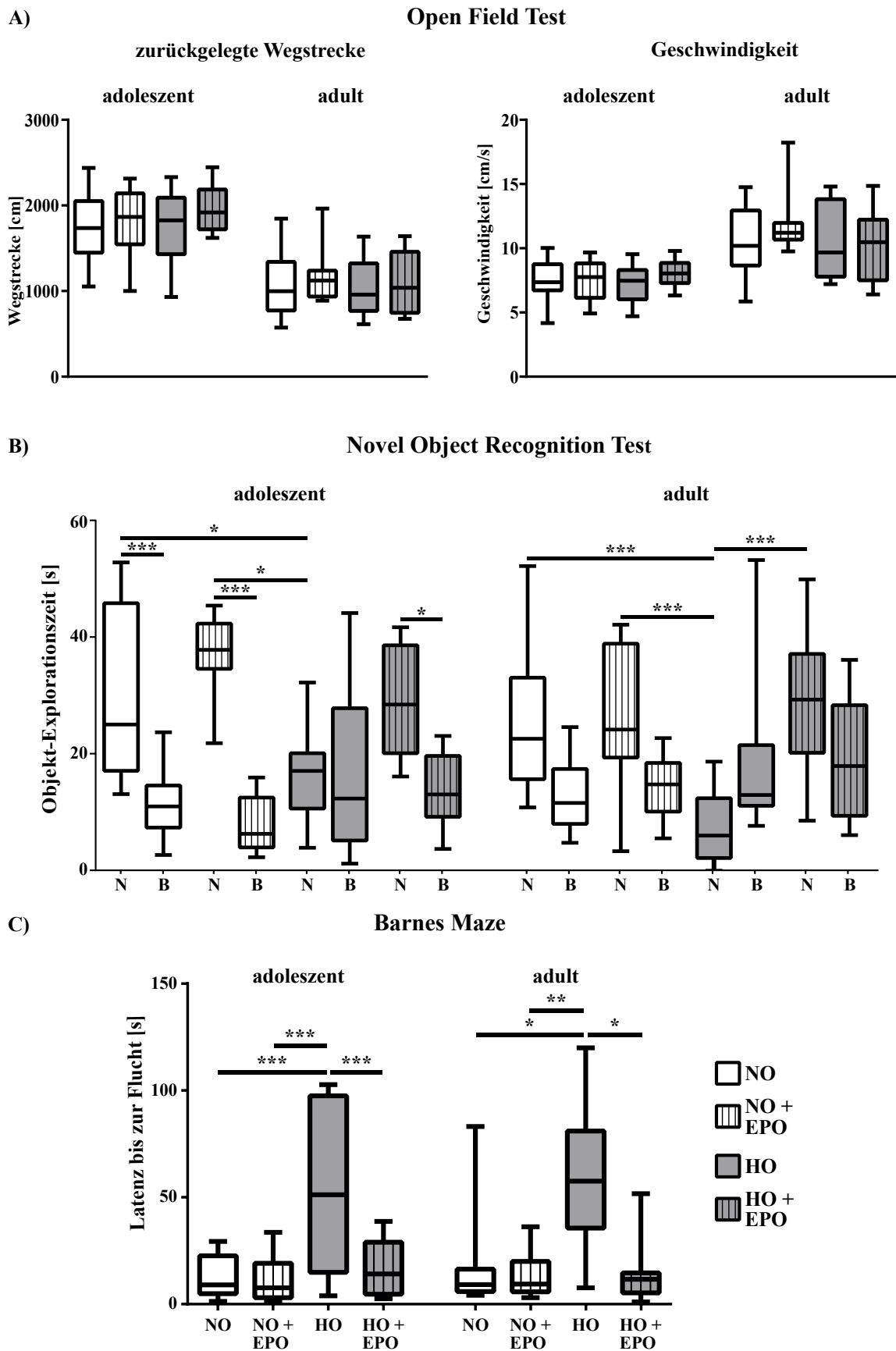


Abbildung 5: Repetitive EPO-Applikation reduziert Hyperoxie-induzierte kognitive Defizite in adoleszenten und adulten Ratten. Die Ratten wurden entweder einer Hyperoxie (HO, 80%iger O₂ für 48 h von P3 bis P5) ausgesetzt oder blieben unter normoxischen Bedingungen (21%ige O₂). Zusätzlich wurden die Tiere mit EPO (4 × 5.000 IE/kg KG von P3 bis P6) oder mit der gleichen Menge an NaCl 0,9% behandelt. Die

neurologische Entwicklung wurde im Alter von 2 Monaten (adoleszent) und 4 Monaten (adult) beurteilt. (A) Die spontane motorische Aktivität und das angstbezogene Verhalten wurden im Open Field Test untersucht, wo die Tiere für 5 min in die Arena gesetzt wurden. Die Bewegung wurde durch automatische Videoverfolgung ausgewertet. Die motorische Aktivität wird durch die mittlere Geschwindigkeit und die zurückgelegte Wegstrecke der Tiere ausgedrückt. (B) Die kognitive Funktion wurde im Novel Object Recognition Test analysiert, die als Explorationszeit am neuen Objekt (N) im Vergleich zum bekannten Objekt (B) dargestellt wurde. (C) Die raumzeitliche Erinnerung wurde mittels Barnes Maze als Latenz bis zur Flucht in die Fluchtbox angegeben. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$, $n = 10 - 12$ Ratten/Gruppe. Abbildung nach Dewan et al, 2020.

4.2 Analysen zum Effekt der Hyperoxie auf das Hormonsystem im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung

4.2.1 Verminderter hypophysärer Wachstumshormon-Transkriptionsspiegel nach 48-stündiger Sauerstoffexposition

Drei Tage alte Wistar-Ratten wurden in diesem Versuchsaufbau einer 48-stündigen Sauerstoffexposition (HO, 80 % O₂ von P3-P5) ausgesetzt. Die Kontrollgruppe blieb dagegen unter normoxischen Bedingungen (NO, 21 % O₂). Um die Effekte dieser Sauerstoffexposition zu analysieren, wurden die mRNA-Expression von TSH, GH und POMC mittels Digoxigenin-markierten RNA-Sonden quantifiziert. Dies ist beispielhaft in Abbildung 6 zu sehen. Die Hybridisierung-Signale wurden anschließend in *Image J* bestimmt und als Prozentsatz der Threshold-Fläche des hypophysären Vorderlappens angegeben. Hierbei zeigte sich in der *In situ Hybridisierung* (ISH) eine signifikante Reduktion des GH-Transkriptionsspiegel in der HO-Gruppe an P5 (Abb. 7E), wobei an P11 keine Veränderungen in der Expression von GH feststellbar waren (Abb. 7F). Es zeigten sich keine Signal-Unterschiede auf der mRNA-Ebene in den Hypophysen bei TSH und POMC an P5 und P11 (Abb. 7A-D).

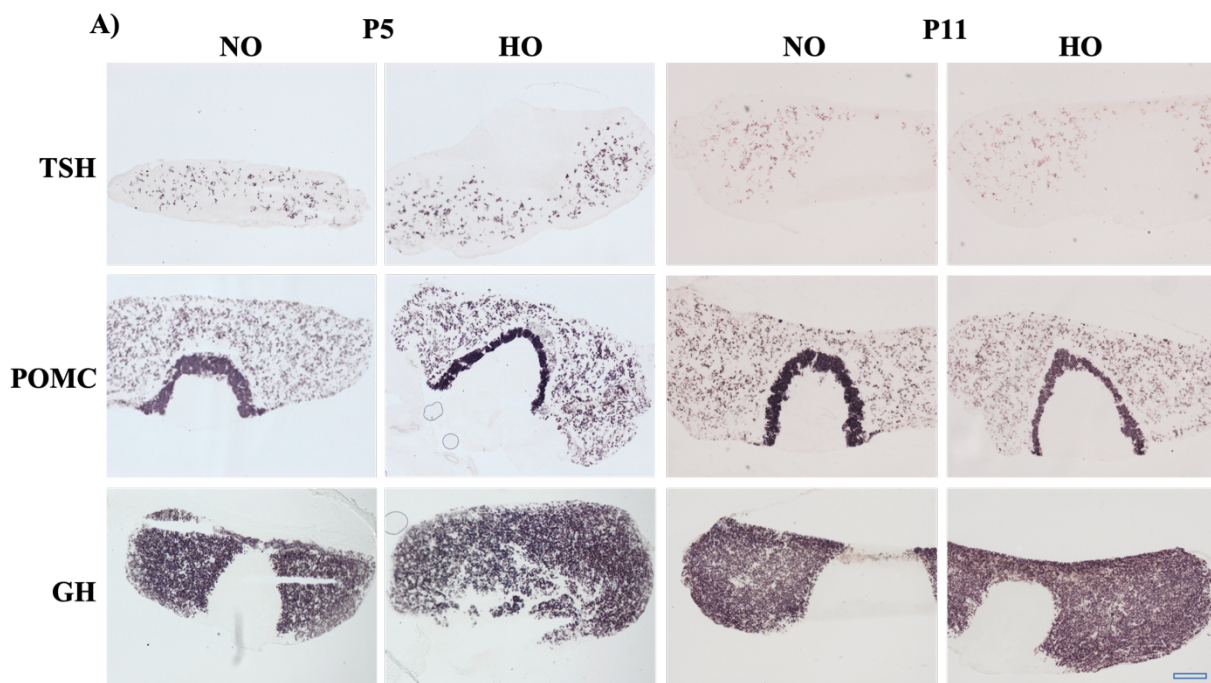


Abbildung 6: Darstellung der mRNA-Expression von TSH, POMC und GH nach 48-stündiger Hyperoxie an P5 und P11. Es erfolgte die *In situ Hybridisierung* von 14 µm dicken Hypophysen-Schnitten mittels Digoxigenin-markierten RNA-Sonden für TSH, POMC und GH. A) Repräsentative Darstellung von ISH-Schnitten für die Hyperoxie- (HO) und die Kontrollgruppe (NO) an P5 und P11. Skalierung = 500 µm. Abbildung nach Kowallick et al, 2021.

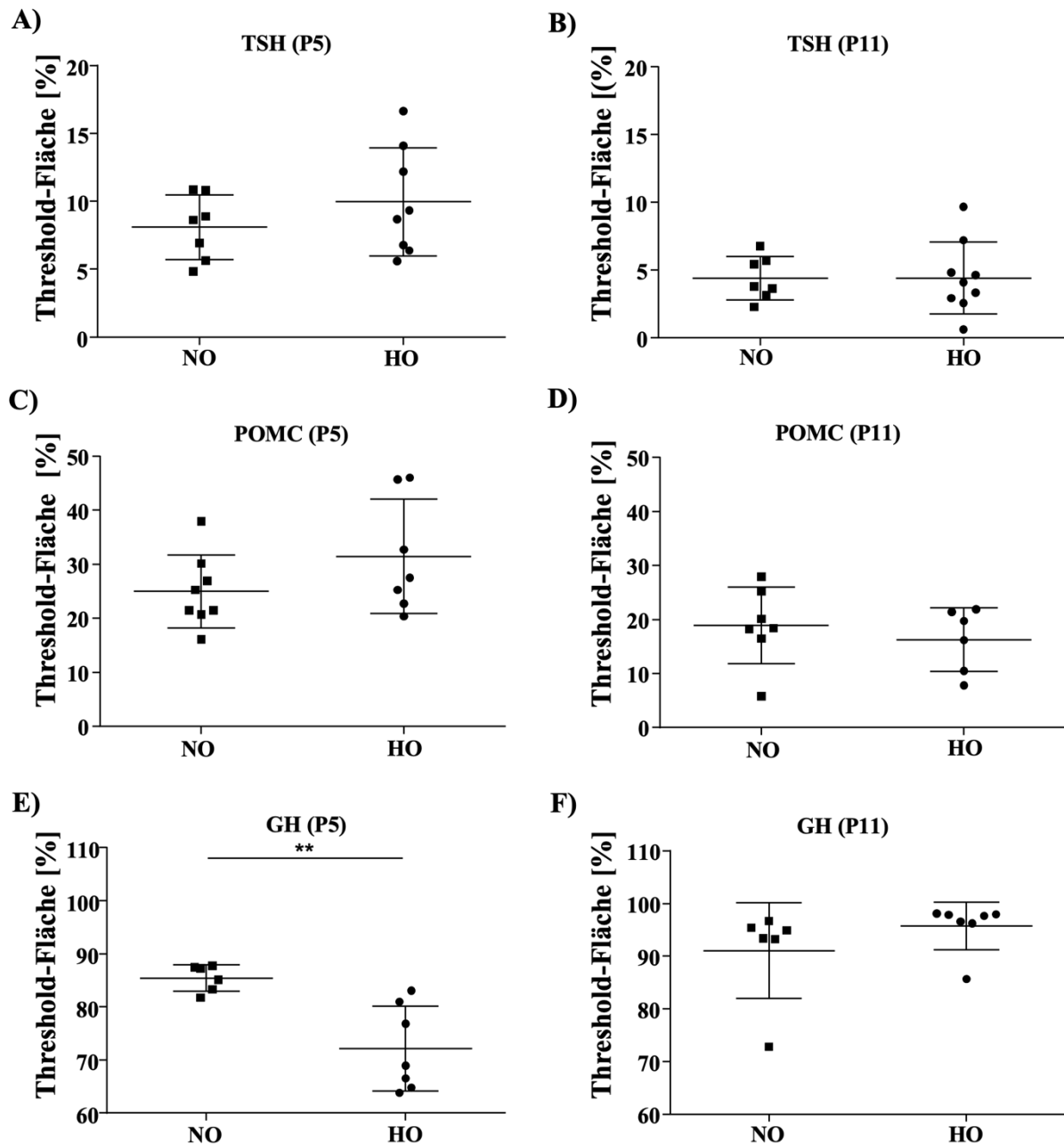


Abbildung 7: Verminderter hypophysärer GH-Transkriptionsspiegel nach 48-stündiger Sauerstoffexposition. A-F) Die hypophysären Hormone GH, TSH und POMC wurden mittels *In situ* Hybridisierung analysiert und in *Image J* quantifiziert. Die Hybridisierung-Signale wurden als prozentualer Anteil von der Threshold-Fläche der Hypophysen-Vorderlappen angegeben. A-D) Es waren keine Veränderungen für TSH und POMC zwischen Hyperoxie- (HO) und Kontrollgruppe (NO) an P5 und P11 feststellbar. E) An P5 zeigte sich eine signifikante Reduktion des Prozentsatzes der Threshold-Fläche für GH in der HO-Gruppe im Vergleich zur NO-Gruppe, wobei keine Unterschiede an P11 erkennbar waren (F). Mittelwert \pm SD. ** $p < 0,01$. $n = 5-9$ pro Gruppe. Abbildung nach Kowallick et al, 2021.

4.2.2 Transiente Veränderungen der Wachstumshormon- und Thyroidea-Stimulierenden Hormon-Serumspiegel nach 48-stündiger Sauerstoffexposition

Neben der Analyse auf mRNA-Ebene erfolgte zur Bestätigung eine Untersuchung der äquivalenten hypophysären Hormone TSH, GH und ACTH auf Proteinebene im Serum der Wistar-Ratten. Hierzu wurden die Seren mittels Multiplex Immunoassay (TSH, ACTH, T4) und mittels ELISA (GH) analysiert. Hierbei zeigte sich u. a. eine signifikante Erhöhung des TSH-Serumspiegels in der HO-Gruppe an P5 (Abb. 8.A.), jedoch keine an P11 (Abb. 8.B). Zur Beurteilung des TSH-Serumspiegels wurde zusätzlich der T4-Serumspiegel im Serum gemessen. Es konnten keine signifikanten Veränderungen bei dem T4-Serumspiegel an P5 nachgewiesen werden (Abb. 8.C.). Bei ACTH präsentierten sich weder an P5 noch an P11 in der HO- und NO-Gruppe signifikante Unterschiede (Abb. 8.D-E.). Korrespondierend zu den reduzierten Transkriptionsspiegeln von GH in den Hypophysen wurden erniedrigte GH-Serumspiegel in der HO-Gruppe an P5 bestimmt (Abb. 8.F.). Es wurden keine Unterschiede zwischen der HO- und NO-Gruppe bei GH an P11 gemessen (Abb. 8.G.).

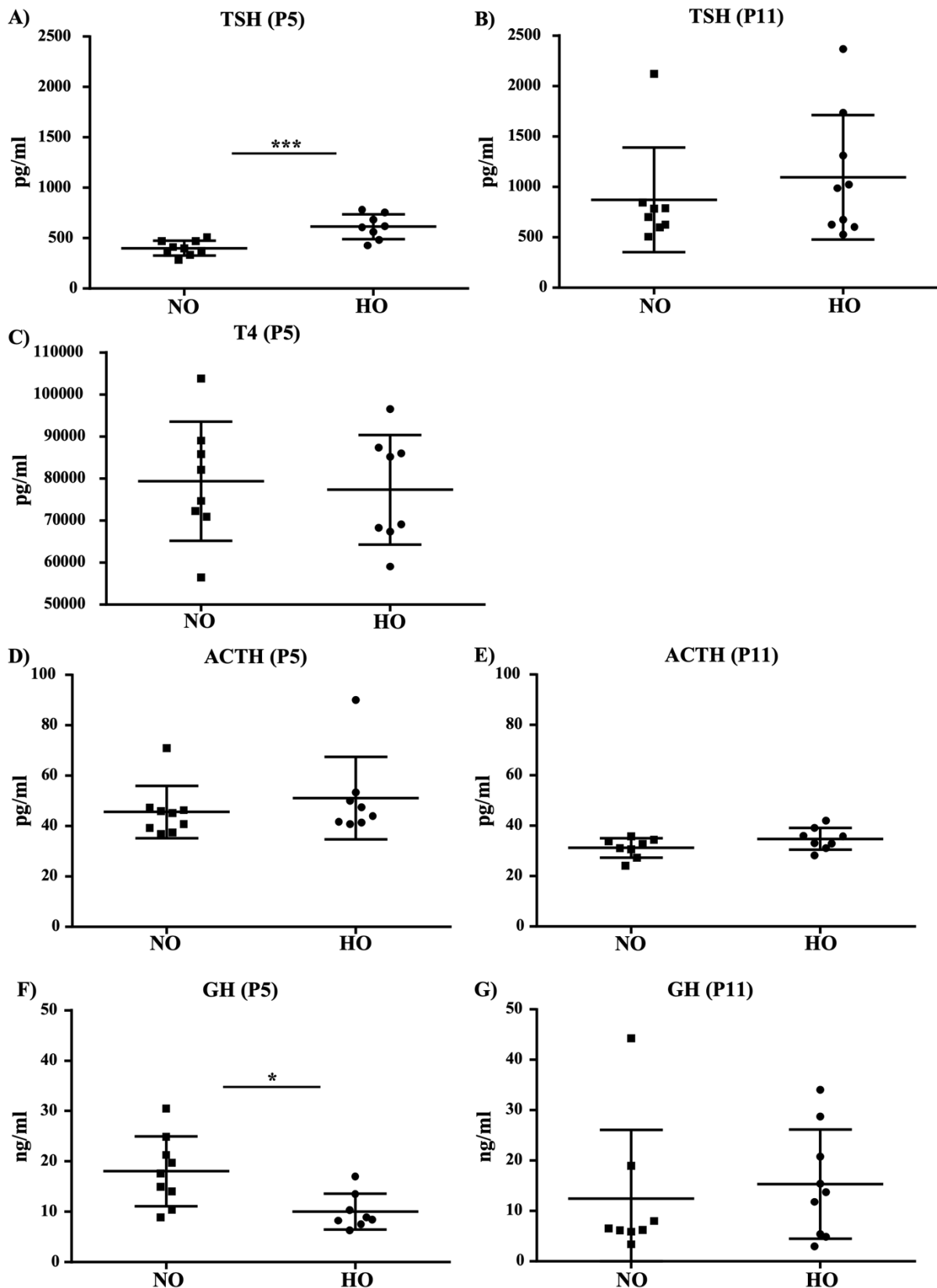


Abbildung 8: Transiente Veränderungen der GH- und TSH-Serumspiegel nach 48-stündiger Sauerstoffexposition. Die Analyse von TSH, T4, GH und ACTH erfolgte an P5 und P11 im Serum nach 48-stündiger Hyperoxie (80 % O₂, P3-P5). A) Die TSH-Serumkonzentration in der HO-Gruppe an P5 war signifikant erhöht, wobei sich an P11 keine Veränderung zeigte (B). C) Die Hormonanalyse von T4 ergab keine signifikanten Differenzen an P5. Keine Unterschiede bei ACTH waren an P5 (D) und P11 (E) feststellbar. Eine signifikante Reduktion von GH (F) zeigte sich an P5 in der HO-Gruppe ohne Veränderungen an P11 (G). Mittelwert ± Standardabweichung * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n = 7-8$ Ratten/Gruppe. Abbildung nach Kowallick et al, 2021.

5 DISKUSSION

Die Entwicklung der Frühgeborenen findet in einer Umgebung mit erhöhten Sauerstoffkonzentrationen statt (Reich et al., 2016). Im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung konnte nachgewiesen werden, dass sich Sauerstoff negativ auf das unreife Gehirn auswirkt (Felderhoff-Mueser et al., 2004; Serdar et al., 2016). Für extrem Frühgeborene ist die Sauerstofftherapie trotz Weiterentwicklungen in der neonatalen Intensivmedizin essentiell, sodass ein Fokus der Forschung auf der Untersuchung von neuroprotektiven Faktoren liegt (Saugstad, 2018). EPO präsentierte sich in vorherigen Studien der Arbeitsgruppe als ein möglicher therapeutischer Ansatz (Bendix et al., 2012; Dzierko et al., 2004; Hoeber et al., 2016).

Angelehnt an klinische Studien, wurden in der vorliegenden experimentellen Arbeit der Fokus auf die möglichen therapeutischen Effekte eines repetitiven Applikationsschemas von EPO im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung gelegt (Dewan et al., 2020). Die oben dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass sich die Hyperoxie-induzierte Hypomyelinisierung zum subakuten Zeitpunkt (P11) verbesserte und sich durch Sauerstoff verursachte kognitive Defizite in adoleszenten und adulten Ratten reduzierten (Dewan et al., 2020).

Trotz der ersten positiven Ergebnisse in der Neuroprotektion ist der Pathomechanismus hinter der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung nicht vollständig geklärt. Das Hypothalamus-Hypophysen-System ist beteiligt an der neurologischen Entwicklung (Ajo et al., 2003; Benjamins et al., 2014; Prezioso et al., 2018). Inwiefern eine Hyperoxie Auswirkungen auf das endokrine System hat, wurde in weiteren Experimenten überprüft und deutet auf eine transiente hormonelle Veränderung in der somatotropen und thyreotropen Achse hin (Kowallick et al., 2021).

5.1 Erythropoetin

5.1.1 Dosisregime der EPO-Applikation

Im Versuchsaufbau der repetitiven EPO-Applikation ist – neben dem Zeitpunkt der Bestimmung der Schädigung – der Applikationszeitpunkt und die Dosierung der EPO-Gabe für die Neuroprotektion entscheidend. Kellert et al. demonstrierte in dem Modell der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung u. a., dass ein Dosisregime mit drei Injektionen von jeweils 5.000 IE/kg KG rekombinanten EPO einen besseren neuroprotektiven Effekt erzielt, als eine

hohe Einzeldosis (Kellert et al., 2007). Im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine einmalige Applikation von 20.000 IE/kg KG rekombinanten EPO lediglich das Ausmaß des langfristigen neurokognitiven Defizits reduzierte und das Überleben der Oligodendrozyten verbesserte, jedoch keinen Effekt auf die Hyperoxie-induzierte Hypomyelinisierung hatte (Hoeber et al., 2016). Deshalb wurde in dieser experimentellen Arbeit das Dosisregime basierend auf Kellert et al. zu 4×5.000 IE/kg KG (insgesamt 20.000 IE/kg KG) verändert. Zusätzlich zur anderen Dosierung wurde der Schädigungszeitpunkt im Vergleich zu Hoeber et al. von P6 zu P3 angepasst (Dewan et al., 2020; Hoeber et al., 2016). Der Zeitpunkt P6 repräsentiert, vom Reifungsstadium der Oligodendrozyten ausgehend, ungefähr ein Frühgeborenes der 30. bis 36. SSW, wobei P3 mit einer hohen Anzahl an Oligodendrozyten-Vorläuferzellen einem extrem Frühgeborenen (vor der 28. SSW.) entspricht (Craig et al., 2003). Die Störung des Reifungsprozesses von Oligodendrozyten ist mit der Pathogenese von Hirnschädigungen der weißen Substanz assoziiert und vor allem eine Komplikation bei extrem Frühgeborenen, sodass diese Änderung des Versuchsaufbau in dieser Arbeit die klinische Situation besser widerspiegelt (Volpe, 2009).

5.1.2 Hyperoxie induziert eine subakute Hypomyelinisierung

Die Fortsätze der Oligodendrozyten bilden die Myelinscheiden in Form einer multilamellaren Struktur aus, die aus Myelin und der zytosolischen Membran besteht (Boggs, 2006). Die Funktion von MBP ist u. a. die Adhäsion dieser zytosolischen Membran und Myelin, sodass eine kompakte Myelinscheide entsteht (Boggs, 2006). Vorherige experimentelle Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe demonstrierten, dass eine Hyperoxie im neonatalen Ratten-Modell zu einer Zunahme von Oligodendrozyten-Zelltod, einer Reduktion der MBP-Expression und dementsprechend zu einer Hypomyelinisierung führt (Brehmer et al., 2012; Serdar et al., 2016). In dieser Arbeit wurde ebenfalls am subakuten Zeitpunkt (P11) eine verringerte MBP-Expression in der immunhistochemischen und der proteinbiochemischen Analyse nach einer 48-stündigen Hyperoxie detektiert, jedoch keine Veränderung in der Anzahl der reifen Oligodendrozyten (Dewan et al., 2020).

Die unterschiedlichen Reifungsgrade von Oligodendrozyten lassen sich durch spezifische Antikörper kennzeichnen, sodass mittels der Antikörper Olig2 und APC-CC1 reife Oligodendrozyten nachgewiesen werden können (Back et al., 2007; Bin et al., 2016). APC-CC1 bindet an den Zellkörper von Oligodendrozyten, sodass dieser somatische Marker nicht durch Veränderungen in der Myelinisierung beeinflusst wird (Bin et al., 2016). Die

immunhistochemische Analyse ergab hier keine Veränderung von Olig2 und APC-CC1 nach einer Hyperoxie und nach einer EPO-Behandlung (Dewan et al., 2020). Ein Erklärungsansatz stellt der bestehende Zusammenhang zwischen dem Reifungsgrad der Oligodendrozyten und der Anfälligkeit gegenüber oxidativen Stress dar (Back et al., 2007). Die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen sind anfälliger gegenüber einer oxidativen Schädigung als reife Oligodendrozyten, weswegen die 48-stündige Hyperoxie möglicherweise keinen Effekt auf die reife Oligodendrozyten-Population hatte (Back et al., 2007; Dewan et al., 2020). Eine weitere Erklärung für die fehlende reduzierte Anzahl von reifen Oligodendrozyten ist eine kompensatorische Zunahme dieser nach einer Hyperoxie (Dewan et al., 2020; Schmitz et al., 2011). Die Studie von Schmitz et al. demonstrierte, dass in der Erholungsphase von P8 bis P12 bei Mäusen die reifen Oligodendrozyten in der Hyperoxie-Gruppe um das Achtfache angestiegen sind (Schmitz et al., 2011). In der Kontrollgruppe lag der Anstieg lediglich bei dem Vierfachen, sodass an P12 kein signifikanter Unterschied zwischen der Hyperoxie-Gruppe und der Kontrollgruppe vorhanden war (Schmitz et al., 2011). Dagegen normalisierte sich die MBP-Expression erst an P15 (Schmitz et al., 2011). In dieser Arbeit war der subakute Messzeitpunkt an P11. Dementsprechend sind die unterschiedlichen Ergebnisse nach einer Sauerstoff-induzierten Schädigung in Bezug auf die Anzahl der Oligodendrozyten und die Myelinisierung im Vergleich zu vorherigen Arbeiten in dieser Arbeitsgruppe am ehesten auf den Messzeitpunkt zurückzuführen (Brehmer et al., 2012; Dewan et al., 2020).

5.1.3 Verbesserung der Hyperoxie-induzierten Hypomyelinisierung nach repetitiver EPO-Applikation zum subakuten Zeitpunkt

Auch wenn die beschriebenen Effekte transient scheinen, konnten langfristige ultrastrukturelle Veränderungen, wie beispielsweise eine gestörte Axon-Oligodendrozyten-Einheit mit einer verringerten Leitungsgeschwindigkeit der Axone, und ein schlechterer neurokognitiver Outcome nach einer Hyperoxie nachgewiesen werden, sodass die Frage nach einer passenden Neuroprotektion von Frühgeborenen relevant bleibt (Ritter et al., 2013; Serdar et al., 2016).

Die neuroprotektiven Eigenschaften von EPO wurden im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung schon unter verschiedenen Aspekten untersucht (Hoerber et al., 2016; Kaindl et al., 2008; Sifringer et al., 2010; Sifringer et al., 2009). Eine EPO-Applikation zeigte u. a. eine anti-inflammatorische und anti-oxidative Wirkung (Sifringer et al., 2010; Sifringer et al., 2009). Die Studie von Hoerber et al. untersuchte die Wirkung einer einzelnen intraperitonealen EPO-Applikation von 20.000 IE/kg KG an P6 zu Beginn der Hyperoxie auf die Myelinisierung

(Hoeber et al., 2016). Nach der exogenen Einzelgabe verbesserte sich zwar das Überleben der Oligodendrozyten, jedoch nicht die Myelinisierung (Hoeber et al., 2016).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Therapieschema von 4×5.000 IE/kg KG EPO mit jeweils einer Gabe an P3 bis P6 führte im Vergleich zur Hyperoxie-Gruppe dagegen zu einem signifikanten Anstieg der MBP-Expression in der EPO/Hyperoxie-Gruppe an P11 (Dewan et al., 2020). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Effekte auf die Myelinisierung stellt die oben beschriebene Anpassung des Schädigungszeitpunktes und die damit verbundenen frühere erste EPO-Applikation dar (Dewan et al., 2020; Hoeber et al., 2016). Neben den protektiven Eigenschaften beeinflusst EPO als Reifungsfaktor auch direkt die Oligodendrozyten, indem es die Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zu reifen Oligodendrozyten fördert (Cervellini et al., 2013; Sugawa et al., 2002). So reguliert EPO die Expression der Myelin-Gene MBP und Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) über den EPO-Rezeptor (Cervellini et al., 2013). Der EPO-Rezeptor wird nach Hirnschädigungen, wie beispielsweise nach einer pränatalen hypoxisch-ischämischen Schädigung, vor allem vermehrt auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimiert, wobei das im Gehirn gebildete EPO als Ligand im unreifen Gehirn nicht adäquat ansteigt (Jantzie et al., 2013). EPO hat also sowohl eine neuroprotektive als auch eine neuroreparative Funktion (Sifringer et al., 2010; Sugawa et al., 2002). Bei einem früheren Therapiebeginn im neonatalen Ratten-Modell liegt entwicklungsbedingt eine größere Anzahl an Oligodendrozyten-Vorläuferzellen vor, sodass dies die Effektivität von EPO im Hinblick auf die Hypomyelinisierung im Vergleich zu der Studie von Hoeber et al. beeinflusst haben könnte (Craig et al., 2003; Dewan et al., 2020; Hoeber et al., 2016). In nachfolgenden Studien sollte dementsprechend untersucht werden, inwieweit die Wirkungsweise von EPO im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung über einen neuroprotektiven oder einen neuroreparativen Mechanismus stattfindet, da dies den optimalen Therapiebeginn mitentscheiden könnte.

5.1.4 Reduktion der kognitiven Defizite von adoleszenten und adulten Ratten nach repetitiver EPO-Applikation im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung

Die Wirkung von EPO auf die neurokognitive Langzeitentwicklung von Frühgeborenen wird aktuell in klinischen Studien untersucht (Fischer et al., 2017; Juul et al., 2020). In dieser tierexperimentellen Arbeit reduzierte die repetitive, intraperitoneale EPO-Gabe das Hyperoxie-

induzierte kognitive Defizit in den Bereichen raumzeitliche Erinnerung und Wiedererkennen von bekannten Objekten sogar bis ins Erwachsenenalter (Dewan et al., 2020).

Die aktuellen klinischen Studien umfassen bisher vor allem den Entwicklungszeitraum bis zum zweiten Lebensjahr, also Kleinkindalter (Fischer et al., 2017; Juul et al., 2020). Hierbei zeigte sich in der Metaanalyse von Fischer et al. mit 1.133 Frühgeborenen im korrigierten Alter von 18 bis 22 Monaten ein geringeres Risiko für einen *Mental Developmental Index* < 70 im *Bayley Scales Development Test II* (Fischer et al., 2017). Das absolute Risiko für einen *Mental Developmental Index* < 70 reduzierte sich um ungefähr 7 % nach Applikation von rekombinanten EPO (Fischer et al., 2017). In der zuletzt veröffentlichten klinischen „PENUT“-Studie wurden keine Verbesserungen motorisch-kognitiver Entwicklungen im Alter von zwei Jahren nach EPO-Therapie festgestellt (Juul et al., 2020). Bei der „PENUT“-Studie handelt es sich um eine klinische Studie zur Analyse der neuroprotektiven Wirkung von EPO bei extrem Frühgeborenen (Juul et al., 2020). Die randomisiert kontrollierte „PENUT“-Studie umfasste 941 Frühgeborene mit einem medianen Gestationsalter bei der Geburt von 26 SSW (Juul et al., 2020). Die Frühgeborenen in der Metaanalyse von Fischer et al. waren im Durchschnitt reifer (Fischer et al., 2017). So hatte die Kohorte der klinischen Studie von Song et al., die die größte integrierte Studie in der Metaanalyse von Fischer et al. darstellt, ein medianes Gestationsalter von 30 SSW (Fischer et al., 2017; Song et al., 2016). Bei der Analyse der Subgruppe von Frühgeborenen unterhalb der 28. SSW zeigte sich in der Metaanalyse von Fischer et al. ebenfalls keine signifikante Reduktion des Risikos für einen *Mental Developmental Index* < 70, sodass die Zielgruppe für eine neuroprotektive Therapie mit EPO eventuell reifere Frühgeborene wären (Fischer et al., 2017; Juul et al., 2020). Zudem war die prognostizierte Rate an neurologisch schwer erkrankten Frühgeborenen und Todesrate in der „PENUT“-Kohorte um 14 % niedriger als erwartet, sodass aufgrund der verwendeten Ausschlusskriterien die Kohorte nicht die reguläre Verteilung dieser Frühgeborenen-Komplikationen widerspiegelt (Juul et al., 2020).

Der *Bayley Scales Infant Development Test*, der zur Evaluation der kognitiven Defizite in den klinischen Studien verwendet wurde, hat nur eine geringe Aussagekraft in Bezug auf die weitere neurokognitive und motorische Entwicklung der Frühgeborenen (Luttikhuisen dos Santos et al., 2013). So untersuchte lediglich die klinische Studie von Neubauer et al. mit 148 Frühgeborenen retrospektiv die Auswirkungen einer EPO-Behandlung auf die neurokognitive Entwicklung von Frühgeborenen im Schulalter (Neubauer et al., 2010). Hierbei präsentierte sich ein signifikant besseres Ergebnis in der EPO-Kohorte im Entwicklungstest

sowie in der psychologischen Testung (Neubauer et al., 2010). Insgesamt müssen die Ergebnisse der Folgestudien abgewartet werden.

Zudem können die unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf die Reduktion eines neurokognitiven Defizits in der EPO-Dosierung begründet sein. In den vier randomisierten kontrollierten klinischen Studien der Metaanalyse Fischer et al. und in der „PENUT“-Studie wurden jeweils unterschiedliche Dosisregime verwendet (Fischer et al., 2017; Juul et al., 2020). Beispielsweise erhielten die Frühgeborenen in der „PENUT“-Studie innerhalb der ersten 24 Stunden nach Geburt 1.000 IE/kg KG EPO i.v. und dann alle 48 Stunden eine weitere der insgesamt sechs Dosen (Juul et al., 2020). Eine Erhaltungstherapie erfolgte mit 400 IE/kg KG dreimal wöchentlich durch eine subkutane Injektion bis zur Vollendung der errechneten 32. SSW, wohingegen bei der Studie von Ohls et al., die Teil der Metaanalyse von Fischer et al ist, die Frühgeborenen innerhalb der ersten 24 Stunden eine subkutane Applikation von EPO 400 IE/kg KG erhielten (Juul et al., 2020; Ohls et al., 2016). Diese Applikation wurde dreimal wöchentlich bis zur Vollendung der errechneten 35. SSW fortgesetzt (Ohls et al., 2016). In der Studie von Song et al. erhielten die Frühgeborenen 500 IE/kg KG EPO jeden zweiten Tag über zwei Wochen, welches in einer kumulativen Dosis von 3.500 IE/kg KG resultierte (Song et al., 2016). Die tierexperimentelle Studie von Kellert et al. demonstrierte, dass unterschiedliche Dosierungen Auswirkungen auf die Effektivität der Neuroprotektion von EPO haben. Im niedrigen Einzeldosisbereich von EPO (2.500 und 5.000 IE/kg KG) war eine subkutane Injektion weniger effektiv als drei subkutane Injektionen (Kellert et al., 2007). Dagegen erbrachte eine siebentägige Applikationsdauer mit einer Gesamtdosis von 35.000 IE/kg KG (7×5.000 IE/kg KG pro Woche) oder drei hohe Dosen (3×30.000 IE/kg KG) keinen positiven Effekt (Kellert et al., 2007). Die größte Besserung zeigte sich nach einer Injektion von 30.000 IE/kg KG oder nach drei Injektionen von 5.000 IE/kg KG rekombinantem EPO im Modell der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung (Kellert et al., 2007). In dieser Arbeit, also im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung, wurden 4×5.000 IE/kg KG verabreicht (Dewan et al., 2020). Im Vergleich zu einer vorherigen Studie dieser Arbeitsgruppe mit einer einzigen Bolusinjektion von 20.000 IE/kg KG an P6 war die repetitive Applikation von 5.000 IE/kg KG an P3 bis P6 zumindest in Hinblick auf die Hyperoxie-induzierte Hypomyelinisierung effektiver (Dewan et al., 2020; Hoeber et al., 2016). Die applizierte Einzeldosis von 5.000 IE/kg KG resultierte in der neonatalen Ratte in einer Spitzenplasmakonzentration von 6.000 bis 10.000 mIE/ml (Statler et al., 2007). Dieser Konzentrationsbereich konnte bei Frühgeborenen nach einer Applikation von 1.000 und 2.500 IE/kg KG in der Phase I/II der „PENUT“-Studie gemessen werden (Juul et al., 2008). In

Phase III der „PENUT“-Studie erfolgte dementsprechend die Applikation von 6×1.000 IE/kg KG EPO alle 48 Stunden in der Hochdosistherapiephase (Juil et al., 2020). Die aktuelle Auswertung der EPO-Plasmaspiegel der „PENUT“-Kohorte zeigte jedoch, dass lediglich 3,1 % der Frühgeborenen Spitzenplasmakonzentrationen von über 10.000 mIE/ml nach einer Applikation von 1.000 IE/kg KG EPO erreichten, wo in tierexperimentellen Studien eine neuroprotektive Wirkung von EPO nachgewiesen werden konnte (Dewan et al., 2020; Kellert et al., 2007; Statler et al., 2007; Wood et al., 2021). Dies begründete die Arbeitsgruppe der „PENUT“-Studie mit unterschiedlichen Messmethoden, die aber keine Auswirkungen auf das negative Endergebnis der klinischen Studie hätten (Juil et al., 2020; Juil et al., 2008; Wood et al., 2021). Nichtsdestotrotz könnten das verwendete Dosisregime und die Dosishöhe die Unterschiede in den klinischen Studien und dieser tierexperimentellen Studie erklären.

5.2 Hypothalamus-Hypophysen-System

5.2.1 Versuchsaufbau des Hypothalamus-Hypophysen-Systems

Nach der Studie von Felderhoff-Müser et al. im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung umfasst der für eine Hyperoxie empfindliche Zeitraum im Gehirn die ersten zwei postnatalen Wochen (Felderhoff-Mueser et al., 2004). Basierend auf der Erfahrung aus diesem Modell wurden im Versuchsaufbau der Hypothalamus-Hypophysen-Achse die neonatalen Ratten einer 48-stündigen Hyperoxie von P3 bis P5 ausgesetzt und anschließend der akute Messzeitpunkt an P5 und der subakute Messzeitpunkt an P11 zur Untersuchung der Hormone gewählt (Kowallick et al., 2021). Unter Berücksichtigung wesentlicher Entwicklungsprozesse des Gehirns, wie z.B. der Oligodendrozyten-Differenzierung und Myelinisierung, entspricht P5 einem Frühgeborenen um die 30. bis 36. SSW und P11 einem reifen Neugeborenen (Craig et al., 2003).

Lediglich teilweise bei adulten Ratten wurden die Auswirkungen einer Hyperoxie auf die Hypothalamus-Hypophysen-Achse untersucht, sodass insgesamt keine vergleichbaren Studien im Hyperoxie-Modell existieren (Galton, 1978; Kobayashi et al., 2009). Im perinatalen Hypoxie-Modell ist ebenfalls kein einheitlicher akuter und subakuter Zeitpunkt zur hypophysären Hormonbestimmung bei neonatalen Ratten etabliert. Die Studie von Kartal et al. untersuchte den GH-Spiegel beispielsweise im perinatalen Hypoxie-Modell mit neonatalen Ratten an dem akuten Zeitpunkt P1 und dem subakuten Zeitpunkt P15 (Kartal et al., 2016). Dagegen wählte die Studie von Bruder et al. zur Analyse der ACTH-Spiegel nach einer

Hypoxie P2, P5 und P8 als Messzeitpunkt (Bruder et al., 2008). Diese Arbeit liefert dementsprechend einen ersten Zugang zu den Effekten einer Hyperoxie auf die Hypophyse der neonatalen Ratten an den Zeitpunkten P5 und P11.

5.2.2 Hormonbestimmung

Der schädigende Einfluss einer Hyperoxie auf das unreife Gehirn konnte in mehreren vorherigen tierexperimentellen Studien gezeigt werden (Dewan et al., 2020; Felderhoff-Mueser et al., 2004; Hoeber et al., 2016). Die hypophysären Hormone ACTH (Vorläuferprotein POMC), TSH und GH sowie das Schilddrüsenhormon T4 sind an der Entwicklung des unreifen Gehirns beteiligt (Ajo et al., 2003; Benjamins et al., 2014; Prezioso et al., 2018). Inwieweit eine Hyperoxie die Expression und Sekretion in der neonatalen Phase bei Ratten beeinflusst, wurde bisher nicht untersucht. Aufgrund dessen erfolgte in dieser Arbeit eine Analyse der Hormone mittels *in situ Hybridisierung* und Multiplex Immunoassay sowie ELISA im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung.

Hierbei orientierte sich die experimentelle Durchführung an Friedrichsen et al., in welcher die Expression der hypophysären Hormone auf mRNA-Ebene im Pax8^{-/-} Maus-Modell für kongenitale Hypothyreose durch die *in situ Hybridisierung* ermittelt wurde (Friedrichsen et al., 2004). Im Gegensatz zu Friedrichsen et al. erfolgte in dieser Arbeit die anschließende Auswertung der Signalintensität und des zellulären Verteilungsmuster nach der *in situ Hybridisierung* nicht deskriptiv, sondern durch das Bildverarbeitungsprogramm *Image J* (Friedrichsen et al., 2004). Aufgrund der Quantifizierung mit *Image J* war die Detektion von geringeren Veränderungen in der mRNA-Expression möglich. Zur Analyse der Gewebeschnitte wurde der prozentuale Anteil dieser Expression an der Gesamtfläche gemessen (Kowallick et al., 2021). Die Gewebeschnitte sind wegen der zellulären Verteilung innerhalb der Adenohypophyse vergleichbar. So bilden die somatotropen Zellen bei Nagern ein gleichmäßiges multizelluläres dreidimensionales Netzwerk über die gesamte Hypophyse aus, wobei an den Kreuzungsstellen kleine somatotrope Inseln entstehen (Bonfont et al., 2005). Die adrenokortikotropen Zellen breiten sich dagegen zunächst an der ventralen Unterseite aus und durchwandern anschließend in Strängen die Adenohypophyse, wo sie bis zur Mitte reichen (Budry et al., 2011). Diese Anordnung bleibt bis in das Erwachsenenalter bestehen (Budry et al., 2011). Die genaue räumliche Ausbreitung der thyreotropen Zellen in der Hypophyse ist nicht erforscht, jedoch präsentierte sich bei Friedrichsen et al., wie auch in dieser Arbeit, das zelluläre Verteilungsmuster als nestartig (Friedrichsen et al., 2004; Kleine and Rossmanith, 2021a).

Neben der Bestimmung der Hormone mittels *in situ Hybridisierung* erfolgte die Messung von TSH, GH, ACTH sowie T4 im Serum der Ratten durch ein Multiplex Immunoassay oder ein ELISA, wobei keine Analyse aller Endorganhormone ausfolgenden Gründen durchgeführt wurde. ACTH reguliert u. a. an der Nebenniere die Freisetzung des Glukokortikoids Kortison, welches an Stressreaktionen beteiligt ist (Kleine and Rossmanith, 2021b). Aufgrund dessen ist die Untersuchung von Kortison-Spiegeln im Serum anfällig gegenüber Hyperoxie-unabhängigen Stressfaktoren, wie beispielsweise maternaler Deprivation (Levine, 1994). Diese können zu Verfälschungen führen, sodass zuerst ACTH in dieser Arbeit betrachtet wurde. Zudem war eine Quantifizierung des Schilddrüsenhormons T3 aufgrund des physiologisch niedrigen Hormonspiegels an P5 nicht möglich, sodass lediglich die Bestimmung des Schilddrüsenhormons T4 erfolgte (Walker et al., 1980).

Insgesamt bietet die *in situ Hybridisierung* und Analyse des Serums die Möglichkeit, einen ersten Einblick über die hormonellen Veränderungen im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung zu erhalten. In Folgestudien sollte der Fokus auf den Hyperoxie-bedingten Veränderungen in der Hormonrezeptor-Verteilung und den direkten zellulären Auswirkungen von oxidativem Stress in der Hypophyse liegen.

5.2.3 Transiente hormonelle Veränderungen im Hypothalamus-Hypophysen-System nach Hyperoxie

Die Hyperoxie ist an der Pathogenese von Frühgeborenen-Komplikationen wie der Frühgeborenen Retinopathie und der Bronchopulmonaren Dysplasie beteiligt (Day and Ryan, 2017; Perrone et al., 2009). Zudem konnte im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung gezeigt werden, dass die Hyperoxie beispielsweise zu Veränderungen in der Myelinisierung und zu zellulären Schädigungen durch oxidativen Stress im unreifen Gehirn führt (Reich et al., 2016). In dieser Studie konnte nun nachgewiesen werden, dass die Hyperoxie auch zu transienten hormonellen Veränderungen in Teilen des Hypothalamus-Hypophysen-Systems in der neonatalen Ratte führt (Kowallick et al., 2021). Im Einzelnen zeigten sich in dieser experimentellen Arbeit also folgende Zusammenhänge zwischen der Hyperoxie und den hypophysären Hormonen:

5.2.3.1 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse

Hormonelle Veränderungen waren bei ACTH weder auf mRNA-Ebene noch im Serum nach Hyperoxie im neonatalen Rattenmodell detektierbar (Kowallick et al., 2021). Die Studie von

Bruder et al. zeigte dagegen im perinatalen Hypoxie-Modell eine Reduktion der Stresshormone, wobei die Ratten durch die Entfernung des Muttertiers zusätzlich zum Sauerstoffmangel der maternalen Deprivation als Stressfaktor ausgesetzt waren (Bruder et al., 2008).

Die postnatale Periode von ACTH ist durch eine vorübergehende Unfähigkeit gekennzeichnet, auf leichte Stressfaktoren wie z.B. chirurgische Eingriffe angemessen zu reagieren (Sapolsky and Meaney, 1986). Dieser Zeitraum wird als Stress-hypo-responsive Periode bezeichnet und dauert bei der Ratte von etwa P2 bis P14 an (Sapolsky and Meaney, 1986). Insgesamt ist die Stress-hypo-responsive Periode definiert durch einen erniedrigten basalen Kortison-Spiegel in Kombination mit einem reduzierten ACTH- und Kortison-Anstieg bei Stress (Sheng et al., 2020). Die Studie von Levine demonstrierte, dass die maternale Deprivation auch in der Stress-hypo-responsiven Periode zu einem signifikanten Anstieg von ACTH führen kann (Levine, 1994). In dieser experimentellen Arbeit wurden die Ratten auch während der Hyperoxie nicht vom Muttertier getrennt. So zeigte eine ältere Studie von Walker et al. keine messbare Veränderung nach einer Hypoxie im Zeitraum P3 bis P10, jedoch einen leichten Anstieg an ACTH nach Elektroschock-Applikation (Walker et al., 1986). Die Studie von Walker et al. hat in der Versuchsbeschreibung keine Angaben zum Muttertier, sodass die Anwesenheit des Muttertiers in der akuten Stresssituation nicht bekannt ist (Walker et al., 1986). Die Veränderungen von Bruder et al. können dementsprechend nicht eindeutig auf die Hypoxie zurückgeführt werden (Bruder et al., 2008).

Eine Hyperoxie kann die ACTH-Sekretion beeinflussen. Der schädigende Effekt einer 48-stündigen Hyperoxie mit 100%igem O₂ konnte in der Studie von Kobayashi et al. bei drei Monate und 25 Monate alten männlichen Wistar Ratten nachgewiesen werden (Kobayashi et al., 2009). Hierbei präsentierte sich eine signifikante Erhöhung der Stresshormone, sodass die ACTH-Ergebnisse in dieser Arbeit im Zusammenhang mit der Stress-hypo-responsiven Periode betrachtet werden müssen (Kobayashi et al., 2009). Hier lagen die Schädigungszeit mit P3 bis P5 und die Messzeitpunkte P5 und P11 in der Stress-hypo-responsiven Periode (Kowallick et al., 2021; Levine, 1994). Zudem konnte die Arbeitsgruppe von Kobayashi et al. eine direkte zelluläre Schädigung in der Hypophyse durch eine Hyperoxie mittels Detektion von oxidativem Stress durch Nachweis einer vermehrten Lipidperoxidation nachweisen (Kobayashi et al., 2009). Im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung zeigte sich ebenfalls im unreifen Gehirn ein Anstieg in der Lipidperoxidation nach Hyperoxie (Sifringer et al., 2013). Inwieweit die Hyperoxie eine zelluläre Schädigung in der neonatalen Hypophyse direkt verursacht, muss in nachfolgenden Studien näher betrachtet werden.

In Folgestudien sollten zudem die Auswirkungen einer Hyperoxie zu einem anderen Messzeitpunkt im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung untersucht werden, da ACTH die Entwicklung von Oligodendrozyten beeinflusst sowie eine neuroprotektive Wirkung zeigt und dementsprechend an der Pathogenese einer Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung beteiligt sein kann (Benjamins et al., 2014; Martins et al., 2020).

5.2.3.2 Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse

Frühgeborene zeigen häufig hormonelle Dysregulationen in der thyreotropen Achse, wie z.B. eine transiente Hypothyreose (Chung, 2014). Hierbei wurde die mögliche Beteiligung einer Hyperoxie an der Pathogenese dieser Dysregulationen bisher nicht betrachtet. In dieser experimentellen Arbeit präsentierte sich zumindest an P5 nach einer Hyperoxie im Serum ein signifikanter Anstieg von TSH, jedoch keine Veränderungen im Transkriptionsspiegel. Zudem wurde T4 nicht durch die erhöhte Sauerstoffgabe beeinflusst (Kowallick et al., 2021).

Die Effekte einer Hyperoxie auf die thyreotrope Achse wurden bereits bei adulten Ratten näher von Galton betrachtet (Galton, 1978). In dem Versuchsaufbau wurden die männlichen Sprague-Dawley Ratten für eine Zeitspanne von 24 bis 96 Stunden 40 bis 100 %igem Sauerstoff ausgesetzt (Galton, 1978). Durch die Hyperoxie reduzierte sich im Gegensatz zu dieser Arbeit die Konzentration von T4 und TSH im Serum (Galton, 1978; Kowallick et al., 2021). Galton demonstrierte auch, dass die Schilddrüsenfunktion, gemessen an der Iod-Aufnahme, abhängig von der zeitlichen Exposition und dem prozentualen Anteil an Sauerstoff ist (Galton, 1978). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse stellt die Hormonkonstellation einer subklinischen Hypothyreose dar, welche in dieser Arbeit nach der Exposition an P5 vorlag. Diese ist definiert durch einen erhöhten TSH-Serumspiegel und einen noch normalen T4-Wert im Serum, sodass die 48-stündige Hyperoxie mit 80 %igem Sauerstoff möglicherweise in der unreifen Schilddrüse zur einer Funktionsminderung führt, jedoch nicht in der Hypophyse (Biondi et al., 2019).

Zudem wird die TSH-Sekretion durch das hypothalamische Hormon TRH reguliert (Kleine and Rossmannith, 2021b). Eine Erhöhung von TRH stimuliert die Sekretion von TSH in der Hypophyse (Kleine and Rossmannith, 2021b). Die Sekretion von TRH wird durch die Schilddrüsenhormone sowie durch weitere direkte starke Umwelteinflüsse wie Entzündungen und Nahrungsrestriktion ausgelöst (Joseph-Bravo et al., 2016). Die Hyperoxie stellt möglicherweise ebenfalls einen starken Umwelteinfluss für den Hypothalamus dar, sodass diese die Sekretion von TRH stimuliert und über den TRH-Regulationsmechanismus den TSH-

Serumspiegel erhöht. Dies könnte ein weiterer Erklärungsansatz für die erhöhten TSH-Serumspiegel sein.

Die Unterschiede von TSH auf mRNA- und Proteinebene können gegebenenfalls in einem Rückkopplungsmechanismus begründet sein, bei dem die thyreotrope Achse in Form einer Autoregulation der TSH-Sekretion auf Hypophysen-Ebene auf die erhöhten TSH-Serumspiegel reagiert (Prummel et al., 2000). Hierbei lösen die erhöhten TSH-Serumspiegel eine Reduktion der Transkription von TSH aus (Prummel et al., 2000). Dementsprechend sollte in Folgestudien der Einfluss von unterschiedlichen Rückkopplungsmechanismen, wie beispielsweise über TRH und Autoregulation, und die Auswirkungen von längeren Sauerstoffexpositionen auf die thyreotrope Achse untersucht werden.

5.2.3.3 Hypothalamus-Hypophysen-Wachstumshormonachse

GH ist als hypophysäres Hormon an der neuronalen Entwicklung des Gehirns beteiligt und weist neuroprotektive Eigenschaften auf (Ajo et al., 2003; Jung et al., 2017). Bisher wurden die Auswirkungen einer Hyperoxie auf die somatotrope Achse im neonatalen Rattenmodell nicht untersucht. In dieser Studie präsentierte sich im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung ein erniedrigter Transkriptionsspiegel von GH in der Hypophyse sowie eine Reduktion von GH im Serum der neonatalen Ratten am akuten Zeitpunkt (P5) ohne Veränderungen am subakuten Zeitpunkt P11 (Kowallick et al., 2021).

Der Einfluss einer Hypoxie auf das somatotrope System wurde bereits in mehreren Studien untersucht (Cai et al., 2018; Chen and Du, 2000; Kartal et al., 2016). Eine hypoxische Schädigung löste im neonatalen Ratten-Modell von Kartal et al. ebenfalls eine Verringerung der GH-Konzentration aus, wobei diese bis zum subakuten Zeitpunkt P15 persistierte (Kartal et al., 2016). Abhängig von der Dauer und der Stärke der Hypoxie präsentierten sich zudem in einer weiteren Studie bei adulten männlichen Sprague-Dawley Ratten reduzierte oder erhöhte Somatostatin-Werte in der Eminentia mediana (Chen and Du, 2000). Bei der Eminentia mediana handelt es sich um eine stark vaskularisierte Region des Hypophysenstiels, in dem die Sekretion von u. a. Somatostatin ins Blut stattfindet (Kleine and Rossmannith, 2021a). Eine Funktion von Somatostatin ist die Inhibition von GH (Kleine and Rossmannith, 2021b). So zeigten sich in der Studie von Chen et al. signifikant erhöhte Somatostatin-Werte bei einem hypobaren Druck, der einem Sauerstoffanteil von 10,8 % in der Luft entspricht, jedoch nicht bei einer stärkeren Hypoxie mit einem Sauerstoffanteil von 8,2 % (Chen and Du, 2000). Bei einem Sauerstoffanteil von 8,2 % waren die Somatostatin-Werte erniedrigt (Chen and Du, 2000).

In einer weiteren Studie in dem hypobaren Tiermodell, das hypoxische Bedingungen simuliert, konnte demonstriert werden, dass die mRNA-Konzentration von GH in der Hypophyse fällt, die GH-Sekretion reduziert ist und dieser Effekt nach Hemmung von Somatostatin durch Cysteamin nicht mehr detektierbar ist (Xu et al., 2004). Insgesamt ist der Hormonspiegel von Somatostatin durch unterschiedliche weitere Stressfaktoren wie z.B. Nahrungsentzug beeinflussbar, sodass die Reduktion von GH in dieser Arbeit durch eine Hyperoxie-bedingte Erhöhung von Somatostatin verursacht sein könnte (Chen and Du, 2000; Ishikawa et al., 1997; Kowallick et al., 2021).

Zudem zeigt sich auch häufiger nach traumatischen Hirnverletzungen ein GH-Defizit, wobei eine direkte Schädigung der Hypophyse durch oxidativen Stress als ein Bestandteil der Pathogenese nachgewiesen werden konnte (Kgosidialwa et al., 2019). Aufgrund dessen kann neben eines möglichen veränderten Somatostatinspiegels ebenfalls eine direkte Schädigung der somatotropen Zellen in dieser Arbeit vorliegen. In nachfolgenden Studien sollte dementsprechend der Einfluss einer Hyperoxie auf regulierenden Hormonen wie Somatostatin näher betrachtet werden.

5.3 Ausblick

Die vermehrte Sauerstoffzufuhr führte im System der Hypothalamus-Hypophysen-Achse sowie in der weißen Substanz des unreifen Gehirns der neonatalen Ratten zu einer Schädigung (Dewan et al., 2020; Kowallick et al., 2021). Insgesamt verdeutlicht dieser Effekt von Sauerstoff auf den unreifen Organismus, dass ein rationaler Einsatz der Sauerstofftherapie bei Frühgeborenen notwendig ist. In der Behandlung von Frühgeborenen ist die Sauerstofftherapie jedoch häufig unausweichlich und die optimale Sauerstoffsättigung zur Prävention von Komplikationen weiterhin Bestandteil der Forschung, sodass neben der Optimierung der oxidativen Therapie die protektive Behandlung im Fokus steht (Saugstad, 2018).

EPO präsentierte sich in dieser Arbeit und in anderen präklinischen Studien bereits als eine mögliche neuroprotektive Substanz für Sauerstoff-induzierte Hirnschädigungen (Dewan et al., 2020; Hoeber et al., 2016). Die hypophysären Hormone bieten voraussichtlich ebenfalls einen möglichen therapeutischen Ansatz für die Neuroprotektion bei Sauerstoff-induzierten Hirnschädigungen, gerade im Hinblick auf die somatotrope und thyreotrope Achse, die durch die Hyperoxie transient verändert waren (Kowallick et al., 2021). Die neuroprotektiven Eigenschaften von ACTH, TSH und GH konnten in anderen Tiermodellen bereits nachgewiesen werden (Hung et al., 2013; Jung et al., 2017; Martins et al., 2020).

GH präsentierte sich beispielsweise durch eine antiapoptotische und antiinflammatorische Wirkung im murinen Modell der perinatalen systemischen Hypoxie (Jung et al., 2017; Jung et al., 2021). Die Applikation des Schilddrüsenhormons T4 wirkte sich im Tiermodell ebenfalls protektiv gegen eine Hirnschädigung der weißen Substanz nach einer hypoxischen Ischämie aus (Hung et al., 2013). Nachweislich verbesserte sich das Überleben der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, die Myelinisierung und das neuromotorische Defizit (Hung et al., 2013). In einer klinischen Studie von van Wassenaer-Leemhuis et al. zeigte sich jedoch keine Verbesserung in der mentalen und neurologischen Entwicklung im Alter von drei Jahren nach Gabe des Schilddrüsenhormons T4 bei Frühgeborenen (van Wassenaer-Leemhuis et al., 2014). Dies stimmt mit den Ergebnissen einer älteren Metaanalyse von Osborn überein (Osborn, 2001). Für das hypophysäre Hormon ACTH konnte in Glia-Zellkulturen von neonatalen Ratten eine protektive Wirkung gegenüber inflammatorisch-bedingten Hirnschäden nachgewiesen werden (Benjamins et al., 2014). Weiterhin demonstrierte die Studie von Martins et al., dass die Gabe von ACTH nach einer Kollagenase-induzierten peri-intraventrikulären Blutung den Verlust an Neuronen und Glia-Zellen sowie die mit einer Schädigung assoziierten Biomarker, wie das saure Gliafaserprotein (GFAP) und das S100 kalziumbindende Protein β (S100 β), im Hirngewebe von neonatalen Ratten verringert (Martins et al., 2020). Die Biomarker GFAP und S100 β steigen bei einer Hirnschädigung an und können somit zur Detektion dieser verwendet werden (Florio et al., 2010). Dementsprechend zeigen alle drei untersuchten hypophysären Hormone in tierexperimentellen Studien neuroprotektive Eigenschaften, weswegen in Folgestudien die Wirkung von ACTH-, TSH-, T4- und GH-Applikationen und der Ausgleich von Hyperoxie-induzierten hormonellen Veränderungen im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung näher betrachtet werden sollten (Hung et al., 2013; Jung et al., 2017; Martins et al., 2020).

Zusätzlich zu der eigenen protektiven Wirkung der hypophysären Hormone ist die Untersuchung von Hyperoxie-bedingten hormonellen Veränderungen im Hypothalamus-Hypophysen-System aufgrund des möglichen Einflusses auf die Effektivität einer EPO-Therapie wichtig. Eine Applikation von rekombinanten GH löste eine zeitlich verlängerte Aktivierung der zerebralen endogenen EPO-Produktion im murinen Modell der perinatalen systemischen Hypoxie aus (Jung et al., 2021). In den In-vitro-Analysen zeigte sich die EPO-mRNA-Konzentration in Neuronen hochreguliert (Jung et al., 2021). Des Weiteren induzieren Schilddrüsenhormone über HIF-1 die Genexpression von EPO (Ma et al., 2004). Dagegen reguliert EPO die Sekretion von ACTH über intrazelluläre Kalziumkanäle und bewirkt über diesen Mechanismus eine Hemmung von ACTH, sodass es die Stressreaktion über die

Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse beeinflussen kann (Dey et al., 2015; Kleine and Rossmann, 2021b). Insgesamt bestehen also unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen dem Hypothalamus-Hypophysen-System und EPO, sodass weitere präklinischen Studien zur Aufklärung der wechselseitigen Abhängigkeiten und Effekte durchgeführt werden sollten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Frühgeborenen sind aufgrund ihres unreifen Entwicklungsstadiums nach der Geburt einer unphysiologischen Hyperoxie – höherer extrauteriner Sauerstoffpartialdruck und häufige essenzielle Sauerstofftherapie – ausgesetzt. Die Hyperoxie ist nachweislich ein Faktor in der Pathogenese von neonatalen Hirnschädigungen, wobei es aktuell keine medikamentöse, neuroprotektive Therapie gibt. Erythropoetin (EPO) präsentierte sich in vorherigen tierexperimentellen Arbeiten als neuroprotektiv im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung. Neu ist in diesem Versuchsaufbau das repetitive, intraperitoneale EPO-Applikationsschema. Hierfür erhielten neonatale Ratten nach einer 48-stündigen Hyperoxie (80 % O₂) eine EPO-Applikation an den postnatalen Tagen 3 bis 6 (P3 - 6). Die Ratten wurden am subakuten Zeitpunkt (P11) mittels immunhistochemischer und proteinbiochemischer Verfahren auf neuroprotektive Effekte in der weißen Substanz analysiert. Die Evaluation der neurokognitiven Leistung erfolgte durch Verhaltenstests mit adoleszenten und adulten Ratten. Die Hyperoxie führte zu einer Hypomyelinisierung an P11, die sich durch die repetitive EPO-Behandlung signifikant verbesserte. Das Hyperoxie-induzierte kognitive Defizit reduzierte sich ebenfalls in der EPO-Versuchsgruppe. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf ein therapeutisches Potential von EPO für neonatale Neuroprotektion hin, welches in weiteren klinischen Studien untersucht werden muss.

Die Hormone des Hypothalamus-Hypophysen-Systems (HPA) sind an der Entwicklung des unreifen Gehirns beteiligt. Frühgeborene präsentieren sich häufig mit endokrinen Veränderungen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die Auswirkungen einer Hyperoxie auf HPA im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung mit Fokus auf der kortikotropen, thyreotropen und somatotropen Achse zu untersuchen. Nach der Hyperoxie (80 % O₂, P3 - P5) wurden die Transkriptionsspiegel vom Wachstumshormon (GH), Thyroidea-stimulierenden Hormon (TSH) und Proopiomelanokortin (POMC, Vorläuferprotein des Adrenokortikotropen Hormon (ACTH)) mittels *Digoxigenin-in situ Hybridisierung* am akuten (P5) und subakuten (P11) Zeitpunkt untersucht. Im Serum erfolgte die Quantifizierung von TSH, Thyroxin, GH und ACTH mittels Multiplex Immunoassay und Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Die Hyperoxie verringerte am P5 GH auf Transkriptionsebene und im Serum. TSH war am P5 nach Hyperoxie im Serum erhöht. An P11 und in der kortikotropen Achse waren keine hormonellen Unterschiede feststellbar. Nach der Hyperoxie zeigten sich transiente hormonelle Veränderungen in den neonatalen Ratten, die weitere Forschung in Bezug auf die Pathogenese von Hyperoxie-induzierten Hirnschädigungen der Frühgeborenen benötigen.

Premature infants are exposed to non-physiological hyperoxia due to the higher extrauterine oxygen partial pressure and oxygen therapy. Hyperoxia is part of the pathogenesis in neonatal brain damage. However, there is currently no drug-based neuroprotective therapy. In previous animal studies erythropoietin (EPO) has been reported as a neuroprotective agent. The aim of this study was to investigate the effects of a repetitive EPO application regimen in the model of oxygen-induced brain injury. Therefore, neonatal rats received EPO application on postnatal days 3 to 6 (P3 - 6) after 48 hours of hyperoxia (80 % O₂, P3 - 5). The rats were analyzed for neuroprotective effects in the white matter at the subacute time point (P11) using immunohistochemical and protein biochemical methods. Neurocognitive outcome was evaluated by behavioral tests in both adolescent and adult rats. Hyperoxia led to hypomyelination at P11, which was significantly reduced by repetitive EPO treatment. The hyperoxia-induced cognitive deficit was also attenuated in the EPO experimental group. The results indicate a therapeutic potential of EPO for neonatal neuroprotection, which needs to be investigated in further clinical studies.

The hormones of the hypothalamic-pituitary system (HPS) are involved in the development of the immature brain. Premature infants often have endocrine changes. Another aim of this work was to analyze the effects of hyperoxia on HPS in the model of oxygen-induced brain injury focusing on the corticotropic, thyrotropic and somatotropic axis. After hyperoxia (80 % O₂, P3 - P5), transcript levels of growth hormone (GH), thyroid-stimulating hormone (TSH) and proopiomelanocortin (POMC, precursor protein of adrenocorticotrophic hormone (ACTH)) were examined by digoxigenin in situ hybridization at acute (P5) and subacute (P11) time points. In serum, TSH, thyroxine, GH and ACTH were quantified by multiplex immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. Hyperoxia decreased GH at the transcriptional level and in serum at P5. TSH was increased in serum at P5 after hyperoxia. At P11 and in the corticotropic axis no hormonal changes were detectable. Transient hormonal changes were seen in the neonatal rats after hyperoxia, which requires further research regarding the pathogenesis of hyperoxia-induced brain damage in preterm infants.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ajo, R., Cacicedo, L., Navarro, C., and Sanchez-Franco, F. (2003). Growth hormone action on proliferation and differentiation of cerebral cortical cells from fetal rat. *Endocrinology* *144*, 1086-1097.
2. Asa, S.L., Kovacs, K., Laszlo, F.A., Domokos, I., and Ezrin, C. (1986). Human fetal adenohypophysis. Histologic and immunocytochemical analysis. *Neuroendocrinology* *43*, 308-316.
3. Back, S.A., Riddle, A., and McClure, M.M. (2007). Maturation-dependent vulnerability of perinatal white matter in premature birth. *Stroke* *38*, 724-730.
4. Barnes, C.A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* *93*, 74-104.
5. Bendix, I., Schulze, C., Haefen, C., Gellhaus, A., Endesfelder, S., Heumann, R., Felderhoff-Mueser, U., and Sifringer, M. (2012). Erythropoietin modulates autophagy signaling in the developing rat brain in an in vivo model of oxygen-toxicity. *Int J Mol Sci* *13*, 12939-12951.
6. Benjamins, J.A., Nedelkoska, L., and Lisak, R.P. (2014). Adrenocorticotropin hormone 1-39 promotes proliferation and differentiation of oligodendroglial progenitor cells and protects from excitotoxic and inflammation-related damage. *J Neurosci Res* *92*, 1243-1251.
7. Bernal, J. (2002). Action of thyroid hormone in brain. *J Endocrinol Invest* *25*, 268-288.
8. Bin, J.M., Harris, S.N., and Kennedy, T.E. (2016). The oligodendrocyte-specific antibody 'CC1' binds Quaking 7. *J Neurochem* *139*, 181-186.
9. Biondi, B., Cappola, A.R., and Cooper, D.S. (2019). Subclinical Hypothyroidism: A Review. *JAMA* *322*, 153-160.
10. Boggs, J.M. (2006). Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci* *63*, 1945-1961.
11. Bonnefont, X., Lacampagne, A., Sanchez-Hormigo, A., Fino, E., Creff, A., Mathieu, M.N., Smallwood, S., Carmignac, D., Fontanaud, P., Travo, P., Alonso, G., Courtois-Coutry, N., Pincus, S. M., Robinson, I. C., and Mollard, P. (2005). Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 16880-16885.
12. Brehmer, F., Bendix, I., Prager, S., van de Looij, Y., Reinboth, B.S., Zimmermanns, J., Schlager, G.W., Brait, D., Sifringer, M., Endesfelder, S., Sizonenko, S., Mallard, C., Bührer, C., Felderhoff-Mueser, U., and Gerstner, B. (2012). Interaction of inflammation and hyperoxia in a rat model of neonatal white matter damage. *PLoS One* *7*, e49023.
13. Brown, N.C., Inder, T.E., Bear, M.J., Hunt, R.W., Anderson, P.J., and Doyle, L.W. (2009). Neurobehavior at term and white and gray matter abnormalities in very preterm infants. *J Pediatr* *155*, 32-38, 38 e31.

14. Bruder, E.D., Taylor, J.K., Kamer, K.J., and Raff, H. (2008). Development of the ACTH and corticosterone response to acute hypoxia in the neonatal rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295, R1195-1203.
15. Budry, L., Lafont, C., El Yandouzi, T., Chauvet, N., Conejero, G., Drouin, J., and Mollard, P. (2011). Related pituitary cell lineages develop into interdigitated 3D cell networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12515-12520.
16. Cai, C., Ahmad, T., Valencia, G.B., Aranda, J.V., Xu, J., and Beharry, K.D. (2018). Intermittent hypoxia suppression of growth hormone and insulin-like growth factor-I in the neonatal rat liver. *Growth Horm IGF Res* 41, 54-63.
17. Celik, P., Ayranci Sucakli, I., and Yakut, H.I. (2020). Which Bayley-III cut-off values should be used in different developmental levels? *Turk J Med Sci* 50, 764-770.
18. Cervellini, I., Annenkov, A., Brenton, T., Chernajovsky, Y., Ghezzi, P., and Mengozzi, M. (2013). Erythropoietin (EPO) increases myelin gene expression in CG4 oligodendrocyte cells through the classical EPO receptor. *Mol Med* 19, 223-229.
19. Chambon, C., Wegener, N., Gravius, A., and Danysz, W. (2011). A new automated method to assess the rat recognition memory: validation of the method. *Behav Brain Res* 222, 151-157.
20. Chawanpaiboon, S., Vogel, J.P., Moller, A.B., Lumbiganon, P., Petzold, M., Hogan, D., Landoulsi, S., Jampathong, N., Kongwattanakul, K., Laopaiboon, M., Lewis, C., Rattanakanokchai, S., Teng, D.N., Thinkhamrop, J., Watananirun, K., Zhang, J., Zhou, W., and Gulmezoglu, A. M. (2019). Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Glob Health* 7, e37-e46.
21. Chen, X.Q., and Du, J.Z. (2000). Hypoxia influences somatostatin release in rats. *Neurosci Lett* 284, 151-154.
22. Chung, H.R. (2014). Adrenal and thyroid function in the fetus and preterm infant. *Korean J Pediatr* 57, 425-433.
23. Craig, A., Ling Luo, N., Beardsley, D.J., Wingate-Pearse, N., Walker, D.W., Hohimer, A.R., and Back, S.A. (2003). Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Exp Neurol* 181, 231-240.
24. Day, C.L., and Ryan, R.M. (2017). Bronchopulmonary dysplasia: new becomes old again! *Pediatr Res* 81, 210-213.
25. DeFries, J.C., Hegmann, J.P., and Weir, M.W. (1966). Open-field behavior in mice: evidence for a major gene effect mediated by the visual system. *Science* 154, 1577-1579.
26. Delahunty, C., Falconer, S., Hume, R., Jackson, L., Midgley, P., Mirfield, M., Ogston, S., Perra, O., Simpson, J., Watson, J., Willatts, P., Williams, F., and Scottish Preterm Thyroid Group (2010). Levels of neonatal thyroid hormone in preterm infants and neurodevelopmental outcome at 5 1/2 years: millennium cohort study. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 4898-4908.

27. Dewan, M.V., Serdar, M., van de Looij, Y., Kowallick, M., Hadamitzky, M., Endesfelder, S., Fandrey, J., Sizonenko, S.V., Herz, J., Felderhoff-Muser, U., and Bendix, I. (2020). Repetitive Erythropoietin Treatment Improves Long-Term Neurocognitive Outcome by Attenuating Hyperoxia-Induced Hypomyelination in the Developing Brain. *Front Neurol* *11*.
28. Dey, S., Scullen, T., and Noguchi, C.T. (2015). Erythropoietin negatively regulates pituitary ACTH secretion. *Brain Res* *1608*, 14-20.
29. Dobbing, J., and Sands, J. (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* *3*, 79-83.
30. Dzierko, M., Felderhoff-Mueser, U., Sifringer, M., Krutz, B., Bittigau, P., Thor, F., Heumann, R., Buhner, C., Ikonomidou, C., and Hansen, H.H. (2004). Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity. *Neurobiol Dis* *15*, 177-187.
31. Ennaceur, A., and Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* *31*, 47-59.
32. Eryigit Madzwamuse, S., Baumann, N., Jaekel, J., Bartmann, P., and Wolke, D. (2015). Neuro-cognitive performance of very preterm or very low birth weight adults at 26 years. *J Child Psychol Psychiatry* *56*, 857-864.
33. Fauchere, J.C., Koller, B.M., Tschopp, A., Dame, C., Ruegger, C., Bucher, H.U., and Swiss Erythropoietin Neuroprotection Trial, G. (2015). Safety of Early High-Dose Recombinant Erythropoietin for Neuroprotection in Very Preterm Infants. *J Pediatr* *167*, 52-57 e51-53.
34. Felderhoff-Mueser, U., Bittigau, P., Sifringer, M., Jarosz, B., Korobowicz, E., Mahler, L., Piening, T., Moysich, A., Grune, T., Thor, F., Heumann, R., Buhner, C., and Ikonomidou, C. (2004). Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiol Dis* *17*, 273-282.
35. Finken, M.J.J., van der Voorn, B., Hollanders, J.J., Ruys, C.A., de Waard, M., van Goudoever, J.B., and Rotteveel, J. (2017). Programming of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis by Very Preterm Birth. *Ann Nutr Metab* *70*, 170-174.
36. Fischer, H.S., Reibel, N.J., Buhner, C., and Dame, C. (2017). Prophylactic Early Erythropoietin for Neuroprotection in Preterm Infants: A Meta-analysis. *Pediatrics* *139*.
37. Florio, P., Abella, R., Marinoni, E., Di Iorio, R., Li Volti, G., Galvano, F., Pongiglione, G., Frigiola, A., Pinzauti, S., Petraglia, F., and Gazzolo, D. (2010). Biochemical markers of perinatal brain damage. *Front Biosci (Schol Ed)* *2*, 47-72.
38. Friedrichsen, S., Christ, S., Heuer, H., Schafer, M.K., Parlow, A.F., Visser, T.J., and Bauer, K. (2004). Expression of pituitary hormones in the Pax8^{-/-} mouse model of congenital hypothyroidism. *Endocrinology* *145*, 1276-1283.
39. Galton, V.A. (1978). Role of thyroid gland in oxygen toxicity. *Am J Physiol* *235*, E628-633.

40. Georgeson, G.D., Szony, B.J., Streitman, K., Varga, I.S., Kovacs, A., Kovacs, L., and Laszlo, A. (2002). Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* *103*, 136-139.
41. Gerstner, B., DeSilva, T.M., Genz, K., Armstrong, A., Brehmer, F., Neve, R.L., Felderhoff-Mueser, U., Volpe, J.J., and Rosenberg, P.A. (2008). Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter. *J Neurosci* *28*, 1236-1245.
42. Gonzalez, F.F., Larphaveesarp, A., McQuillen, P., Derugin, N., Wendland, M., Spadafora, R., and Ferriero, D.M. (2013). Erythropoietin increases neurogenesis and oligodendroglial precursor cells after neonatal stroke. *Stroke* *44*, 753-758.
43. Hikino, S., Ihara, K., Yamamoto, J., Takahata, Y., Nakayama, H., Kinukawa, N., Narazaki, Y., and Hara, T. (2001). Physical growth and retinopathy in preterm infants: involvement of IGF-I and GH. *Pediatr Res* *50*, 732-736.
44. Hoeber, D., Sifringer, M., van de Looij, Y., Herz, J., Sizonenko, S.V., Kempe, K., Serdar, M., Palasz, J., Hadamitzky, M., Endesfelder, S., Fandrey, J., Felderhoff-Mueser, U., and Bendix, I. (2016). Erythropoietin Restores Long-Term Neurocognitive Function Involving Mechanisms of Neuronal Plasticity in a Model of Hyperoxia-Induced Preterm Brain Injury. *Oxid Med Cell Longev* *2016*, 9247493.
45. Hofman, P.L., Regan, F., Jackson, W.E., Jefferies, C., Knight, D.B., Robinson, E.M., and Cutfield, W.S. (2004). Premature birth and later insulin resistance. *N Engl J Med* *351*, 2179-2186.
46. Howson, C.P., Kinney, M.V., McDougall, L., Lawn, J.E., and Born Too Soon Preterm Birth Action, G. (2013). Born too soon: preterm birth matters. *Reprod Health* *10 Suppl 1*, S1.
47. Hung, P.L., Huang, C.C., Huang, H.M., Tu, D.G., and Chang, Y.C. (2013). Thyroxin treatment protects against white matter injury in the immature brain via brain-derived neurotrophic factor. *Stroke* *44*, 2275-2283.
48. Hutchinson, E.A., De Luca, C.R., Doyle, L.W., Roberts, G., Anderson, P.J., and Victorian Infant Collaborative Study, G. (2013). School-age outcomes of extremely preterm or extremely low birth weight children. *Pediatrics* *131*, e1053-1061.
49. Inder, T.E., Wells, S.J., Mogridge, N.B., Spencer, C., and Volpe, J.J. (2003). Defining the nature of the cerebral abnormalities in the premature infant: a qualitative magnetic resonance imaging study. *J Pediatr* *143*, 171-179.
50. Ishikawa, M., Mizobuchi, M., Takahashi, H., Bando, H., and Saito, S. (1997). Somatostatin release as measured by in vivo microdialysis: circadian variation and effect of prolonged food deprivation. *Brain Res* *749*, 226-231.
51. Jantzie, L.L., Miller, R.H., and Robinson, S. (2013). Erythropoietin signaling promotes oligodendrocyte development following prenatal systemic hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr Res* *74*, 658-667.
52. Joseph-Bravo, P., Jaimes-Hoy, L., and Charli, J.L. (2016). Advances in TRH signaling. *Rev Endocr Metab Disord* *17*, 545-558.

53. Jung, S., Boie, G., Doerr, H.G., and Trollmann, R. (2017). Oxygen-sensitive regulation and neuroprotective effects of growth hormone-dependent growth factors during early postnatal development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 312, R539-R548.
54. Jung, S., Terorde, K., Dorr, H.G., and Trollmann, R. (2021). Recombinant Human Growth Hormone Activates Neuroprotective Growth Factors in Hypoxic Brain Injury in Neonatal Mice. *Endocrinology* 162.
55. Juul, S.E., Comstock, B.A., Wadhawan, R., Mayock, D.E., Courtney, S.E., Robinson, T., Ahmad, K.A., Bendel-Stenzel, E., Baserga, M., LaGamma, E.F., Downey, L. C., Rao, R., Fahim, N., Lampland, A., Frantz Iii, I. D., Khan, J.Y., Weiss, M., Gilmore, M. M., Ohls, R. K., Srinivasan, N., Perez, J. E., MacKay, V., Vu, P.T., Lowe, J., Kuban, K., O'Shea, T.M., Hartman, A.L., Heagerty, P.J., and Penut Trial Consortium (2020). A Randomized Trial of Erythropoietin for Neuroprotection in Preterm Infants. *N Engl J Med* 382, 233-243.
56. Juul, S.E., McPherson, R.J., Bauer, L.A., Ledbetter, K.J., Gleason, C.A., and Mayock, D.E. (2008). A phase I/II trial of high-dose erythropoietin in extremely low birth weight infants: pharmacokinetics and safety. *Pediatrics* 122, 383-391.
57. Juul, S.E., McPherson, R.J., Farrell, F.X., Jolliffe, L., Ness, D.J., and Gleason, C.A. (2004). Erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of nonhuman primates and fetal sheep following high-dose recombinant erythropoietin. *Biol Neonate* 85, 138-144.
58. Juul, S.E., Yachnis, A.T., Rojiani, A.M., and Christensen, R.D. (1999). Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol* 2, 148-158.
59. Kaindl, A.M., Sifringer, M., Koppelstaetter, A., Genz, K., Loeber, R., Boerner, C., Stuwe, J., Klose, J., and Felderhoff-Mueser, U. (2008). Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes. *Ann Neurol* 64, 523-534.
60. Kartal, O., Aydinöz, S., Kartal, A.T., Kelestemur, T., Caglayan, A.B., Beker, M.C., Karademir, F., Suleymanoglu, S., Kul, M., Yulug, B., and Kilic, E. (2016). Time dependent impact of perinatal hypoxia on growth hormone, insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor binding protein-3. *Metab Brain Dis* 31, 827-835.
61. Kellert, B.A., McPherson, R.J., and Juul, S.E. (2007). A comparison of high-dose recombinant erythropoietin treatment regimens in brain-injured neonatal rats. *Pediatr Res* 61, 451-455.
62. Kgosidialwa, O., Hakami, O., Muhammad Zia-Ul-Hussnain, H., and Agha, A. (2019). Growth Hormone Deficiency Following Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci* 20.
63. Kleine, B., and Rossmannith, W.G. (2021a). Organe des Hormonsystems und ihre Entstehung. In *Hormone und Hormonsystem - Lehrbuch der Endokrinologie* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 397-560.
64. Kleine, B., and Rossmannith, W.G. (2021b). Protein- und Peptid-Hormone von Vertebraten. In *Hormone und Hormonsystem - Lehrbuch der Endokrinologie* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 19-203.

65. Klosinska, M., Kaczynska, A., and Ben-Skowronek, I. (2022). Congenital Hypothyroidism in Preterm Newborns - The Challenges of Diagnostics and Treatment: A Review. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13, 860862.
66. Kobayashi, N., Machida, T., Takahashi, T., Takatsu, H., Shinkai, T., Abe, K., and Urano, S. (2009). Elevation by oxidative stress and aging of hypothalamic-pituitary-adrenal activity in rats and its prevention by vitamin e. *J Clin Biochem Nutr* 45, 207-213.
67. Kowallick, M., Serdar, M., Markova, B., Salveridou, E., Felderhoff-Muser, U., Fuhrer-Sakel, D., Heuer, H., Bendix, I., and Dewan, M.V. (2021). Hyperoxia Leads to Transient Endocrine Alterations in the Neonatal Rat During Postnatal Development. *Front Pediatr* 9, 723928.
68. Kumral, A., Genc, S., Ozer, E., Yilmaz, O., Gokmen, N., Koroglu, T.F., Duman, N., Genc, K., and Ozkan, H. (2006). Erythropoietin downregulates bax and DP5 proapoptotic gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Biol Neonate* 89, 205-210.
69. Kumral, A., Gonenc, S., Acikgoz, O., Sonmez, A., Genc, K., Yilmaz, O., Gokmen, N., Duman, N., and Ozkan, H. (2005). Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate* 87, 15-18.
70. Leuchter, R.H., Gui, L., Poncet, A., Hagmann, C., Lodygensky, G.A., Martin, E., Koller, B., Darque, A., Bucher, H.U., and Huppi, P.S. (2014). Association between early administration of high-dose erythropoietin in preterm infants and brain MRI abnormality at term-equivalent age. *JAMA* 312, 817-824.
71. Levine, S. (1994). The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann N Y Acad Sci* 746, 275-288; discussion 289-293.
72. Liu, L., Oza, S., Hogan, D., Perin, J., Rudan, I., Lawn, J.E., Cousens, S., Mathers, C., and Black, R.E. (2015). Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet* 385, 430-440.
73. Lombardero, M., Kovacs, K., and Scheithauer, B.W. (2011). Erythropoietin: a hormone with multiple functions. *Pathobiology* 78, 41-53.
74. Luttikhuisen dos Santos, E.S., de Kieviet, J.F., Konigs, M., van Elburg, R.M., and Oosterlaan, J. (2013). Predictive value of the Bayley scales of infant development on development of very preterm/very low birth weight children: a meta-analysis. *Early Hum Dev* 89, 487-496.
75. Ma, Y., Freitag, P., Zhou, J., Brune, B., Frede, S., and Fandrey, J. (2004). Thyroid hormone induces erythropoietin gene expression through augmented accumulation of hypoxia-inducible factor-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, R600-607.
76. Marti, H.H., Wenger, R.H., Rivas, L.A., Straumann, U., Digicaylioglu, M., Henn, V., Yonekawa, Y., Bauer, C., and Gassmann, M. (1996). Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 8, 666-676.

77. Martins, C.A., Neves, L.T., de Oliveira, M., Bagatini, P.B., Barboza, R., Mestriner, R.G., Xavier, L.L., and Rasia-Filho, A.A. (2020). Neuroprotective effect of ACTH on collagenase-induced peri-intraventricular hemorrhage in newborn male rats. *Sci Rep* 10, 17734.
78. Natalucci, G., Latal, B., Koller, B., Ruegger, C., Sick, B., Held, L., Bucher, H.U., Fauchere, J.C., and Swiss, E.P.O.N.T.G. (2016). Effect of Early Prophylactic High-Dose Recombinant Human Erythropoietin in Very Preterm Infants on Neurodevelopmental Outcome at 2 Years: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 315, 2079-2085.
79. Neubauer, A.P., Voss, W., Wachtendorf, M., and Jungmann, T. (2010). Erythropoietin improves neurodevelopmental outcome of extremely preterm infants. *Ann Neurol* 67, 657-666.
80. Ng, P.C., Lee, C.H., Lam, C.W., Ma, K.C., Fok, T.F., Chan, I.H., and Wong, E. (2004). Transient adrenocortical insufficiency of prematurity and systemic hypotension in very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 89, F119-126.
81. O'Leary, T.P., Savoie, V., and Brown, R.E. (2011). Learning, memory and search strategies of inbred mouse strains with different visual abilities in the Barnes maze. *Behav Brain Res* 216, 531-542.
82. Obst, S., Herz, J., Alexandre Alcazar, M.A., Endesfelder, S., Mobius, M.A., Rudiger, M., Felderhoff-Muser, U., and Bendix, I. (2022). Perinatal Hyperoxia and Developmental Consequences on the Lung-Brain Axis. *Oxid Med Cell Longev* 2022, 5784146.
83. Ohls, R.K., Cannon, D.C., Phillips, J., Caprihan, A., Patel, S., Winter, S., Steffen, M., Yeo, R.A., Campbell, R., Wiedmeier, S., Baker, S., Gonzales, S., and Lowe, J. (2016). Preschool Assessment of Preterm Infants Treated With Darbepoetin and Erythropoietin. *Pediatrics* 137, e20153859.
84. Ohlsson, A., and Aher, S.M. (2017). Early erythropoiesis-stimulating agents in preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 11, CD004863.
85. Ohlsson, A., and Aher, S.M. (2020). Early erythropoiesis-stimulating agents in preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2, CD004863.
86. Osborn, D.A. (2001). Thyroid hormones for preventing neurodevelopmental impairment in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001070.
87. Patel, R.M. (2016). Short- and Long-Term Outcomes for Extremely Preterm Infants. *Am J Perinatol* 33, 318-328.
88. Perrone, S., Vezzosi, P., Longini, M., Marzocchi, B., Paffetti, P., Bellieni, C.V., Martinelli, S., and Buonocore, G. (2009). Biomarkers of oxidative stress in babies at high risk for retinopathy of prematurity. *Front Biosci (Elite Ed)* 1, 547-552.
89. Pierrat, V., Marchand-Martin, L., Arnaud, C., Kaminski, M., Resche-Rigon, M., Lebeaux, C., Bodeau-Livinec, F., Morgan, A.S., Goffinet, F., Marret, S., Ancel, P.Y., and EpiPAGE-wiriting group (2017). Neurodevelopmental outcome at 2 years for preterm children born at 22 to 34 weeks' gestation in France in 2011: EPIPAGE-2 cohort study. *BMJ* 358, j3448.

90. Prezioso, G., Giannini, C., and Chiarelli, F. (2018). Effect of Thyroid Hormones on Neurons and Neurodevelopment. *Horm Res Paediatr* *90*, 73-81.
91. Prummel, M.F., Brokken, L.J., Meduri, G., Misrahi, M., Bakker, O., and Wiersinga, W.M. (2000). Expression of the thyroid-stimulating hormone receptor in the folliculo-stellate cells of the human anterior pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* *85*, 4347-4353.
92. Reich, B., Hoerber, D., Bendix, I., and Felderhoff-Mueser, U. (2016). Hyperoxia and the Immature Brain. *Developmental Neuroscience* *38*, 311-330.
93. Ritter, J., Schmitz, T., Chew, L.J., Buhner, C., Mobius, W., Zonouzi, M., and Gallo, V. (2013). Neonatal hyperoxia exposure disrupts axon-oligodendrocyte integrity in the subcortical white matter. *J Neurosci* *33*, 8990-9002.
94. Saigal, S., and Doyle, L.W. (2008). An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *Lancet* *371*, 261-269.
95. Sapolsky, R.M., and Meaney, M.J. (1986). Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res* *396*, 64-76.
96. Saugstad, O.D. (2018). Oxygenation of the Immature Infant: A Commentary and Recommendations for Oxygen Saturation Targets and Alarm Limits. *Neonatology* *114*, 69-75.
97. Scheepens, A., Modersheim, T.A., and Gluckman, P.D. (2005). The role of growth hormone in neural development. *Horm Res* *64 Suppl 3*, 66-72.
98. Schmitz, T., Endesfelder, S., Reinert, M.C., Klinker, F., Muller, S., Buhner, C., and Liebetanz, D. (2012). Adolescent hyperactivity and impaired coordination after neonatal hyperoxia. *Exp Neurol* *235*, 374-379.
99. Schmitz, T., Ritter, J., Mueller, S., Felderhoff-Mueser, U., Chew, L.J., and Gallo, V. (2011). Cellular changes underlying hyperoxia-induced delay of white matter development. *J Neurosci* *31*, 4327-4344.
100. Scratch, S.E., Anderson, P.J., Doyle, L.W., Thompson, D.K., Ahmadzai, Z.M., Greaves, R.F., Inder, T.E., and Hunt, R.W. (2015). High Postnatal Growth Hormone Levels Are Related to Cognitive Deficits in a Group of Children Born Very Preterm. *J Clin Endocrinol Metab* *100*, 2709-2717.
101. Semple, B.D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D.M., and Noble-Haesslein, 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.
102. Serdar, M., Herz, J., Kempe, K., Lumpe, K., Reinboth, B.S., Sizonenko, S.V., Hou, X., Herrmann, R., Hadamitzky, M., Heumann, R., Hansen, W., Sifringer, M., van de Looij, Y., Felderhoff-Mueser, U., and Bendix, I. (2016). Fingolimod protects against neonatal white matter damage and long-term cognitive deficits caused by hyperoxia. *Brain Behav Immun* *52*, 106-119.

103. Serdar, M., Herz, J., Kempe, K., Winterhager, E., Jastrow, H., Heumann, R., Felderhoff-Muser, U., and Bendix, I. (2018). Protection of Oligodendrocytes Through Neuronal Overexpression of the Small GTPase Ras in Hyperoxia-Induced Neonatal Brain Injury. *Front Neurol* *9*, 175.
104. Sheng, J.A., Bales, N.J., Myers, S.A., Bautista, A.I., Roueifar, M., Hale, T.M., and Handa, R.J. (2020). The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Development, Programming Actions of Hormones, and Maternal-Fetal Interactions. *Front Behav Neurosci* *14*, 601939.
105. Siffringer, M., Bendix, I., von Haefen, C., Endesfelder, S., Kalb, A., Buhner, C., Felderhoff-Mueser, U., and Spies, C.D. (2013). Oxygen toxicity is reduced by acetylcholinesterase inhibition in the developing rat brain. *Dev Neurosci* *35*, 255-264.
106. Siffringer, M., Brait, D., Weichelt, U., Zimmerman, G., Endesfelder, S., Brehmer, F., von Haefen, C., Friedman, A., Soreq, H., Bendix, I., Gerstner, B., and Felderhoff-Mueser, U. (2010). Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain. *Brain Behav Immun* *24*, 792-799.
107. Siffringer, M., Genz, K., Brait, D., Brehmer, F., Lober, R., Weichelt, U., Kaindl, A.M., Gerstner, B., and Felderhoff-Mueser, U. (2009). Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced cell death by modulation of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases. *Dev Neurosci* *31*, 394-402.
108. Song, J., Sun, H., Xu, F., Kang, W., Gao, L., Guo, J., Zhang, Y., Xia, L., Wang, X., and Zhu, C. (2016). Recombinant human erythropoietin improves neurological outcomes in very preterm infants. *Ann Neurol* *80*, 24-34.
109. Statler, P.A., McPherson, R.J., Bauer, L.A., Kellert, B.A., and Juul, S.E. (2007). Pharmacokinetics of high-dose recombinant erythropoietin in plasma and brain of neonatal rats. *Pediatr Res* *61*, 671-675.
110. Stoll, B.J., Hansen, N.I., Bell, E.F., Walsh, M.C., Carlo, W.A., Shankaran, S., Laptook, A.R., Sanchez, P.J., Van Meurs, K.P., Wyckoff, M., Das, A., Hale, E. C., Ball, M. B., Newman, N. S., Schibler, K., Poindexter, B. B., Kennedy, K.A., Cotton, C.M., Watterberg, K.L., D'Angio, C.T., DeMauro, S. B., Truog, W.E., Devaskar, U., Higgins, R.D., Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child, and Human Development Neonatal Research Network (2015). Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012. *JAMA* *314*, 1039-1051.
111. Sugawa, M., Sakurai, Y., Ishikawa-Ieda, Y., Suzuki, H., and Asou, H. (2002). Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *Neurosci Res* *44*, 391-403.
112. 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.
113. Tan, L.O., Tan, M.G., and Poon, W.B. (2019). Lack of association between hypothyroxinemia of prematurity and transient thyroid abnormalities with adverse long term neurodevelopmental outcome in very low birth weight infants. *PLoS One* *14*, e0222018.

114. Tipple, T.E., and Ambalavanan, N. (2019). Oxygen Toxicity in the Neonate: Thinking Beyond the Balance. *Clin Perinatol* 46, 435-447.
115. van Wassenaer-Leemhuis, A., Ares, S., Golombek, S., Kok, J., Paneth, N., Kase, J., and LaGamma, E.F. (2014). Thyroid hormone supplementation in preterm infants born before 28 weeks gestational age and neurodevelopmental outcome at age 36 months. *Thyroid* 24, 1162-1169.
116. Volpe, J.J. (2009). Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol* 8, 110-124.
117. Volpe, J.J. (2019). Dysmaturation of Premature Brain: Importance, Cellular Mechanisms, and Potential Interventions. *Pediatr Neurol* 95, 42-66.
118. Volpe, J.J. (2020). Commentary - Do the negative results of the PENUT trial close the book on erythropoietin for premature infant brain? *J Neonatal Perinatal Med* 13, 149-152.
119. Walker, C.D., Perrin, M., Vale, W., and Rivier, C. (1986). Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology* 118, 1445-1451.
120. Walker, P., Dubois, J.D., and Dussault, J.H. (1980). Free thyroid hormone concentrations during postnatal development in the rat. *Pediatr Res* 14, 247-249.
121. Wang, Y., Song, J., Sun, H., Xu, F., Li, K., Nie, C., Zhang, X., Peng, X., Xia, L., Shen, Z., Yuan, X., Zhang, S., Ding, X., Zhang, Y., Kang, W., Qian, L., Zhou, W., Wang, X., Cheng, X., and Zhu, C. (2020). Erythropoietin prevents necrotizing enterocolitis in very preterm infants: a randomized controlled trial. *J Transl Med* 18, 308.
122. Wood, T.R., Parikh, P., Comstock, B.A., Law, J.B., Bammler, T.K., Kuban, K.C., Mayoock, D.E., Heagerty, P.J., Juul, S., and consortium, P.T. (2021). Early Biomarkers of Hypoxia and Inflammation and Two-Year Neurodevelopmental Outcomes in the Preterm Erythropoietin Neuroprotection (PENUT) Trial. *EBioMedicine* 72, 103605.
123. Xu, N.Y., Chen, X.Q., Du, J.Z., Wang, T.Y., and Duan, C. (2004). Intermittent hypoxia causes a suppressed pituitary growth hormone through somatostatin. *Neuro Endocrinol Lett* 25, 361-367.
124. Yan, F., Zhang, M., Meng, Y., Li, H., Yu, L., Fu, X., Tang, Y., and Jiang, C. (2016). Erythropoietin improves hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal rats after short-term anoxia by enhancing angiogenesis. *Brain Res* 1651, 104-113.
125. Yu, X., Shacka, J.J., Eells, J.B., Suarez-Quian, C., Przygodzki, R.M., Beleslin-Cokic, B., Lin, C.S., Nikodem, V.M., Hempstead, B., Flanders, K.C., Costantini, F., and Noguchi, C.T. (2002). Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* 129, 505-516.
126. Zdraveska, N., and Kocova, M. (2021). Thyroid function and dysfunction in preterm infants-Challenges in evaluation, diagnosis and therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 95, 556-570.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
APC-CC1	Adenomatous polyposis coli clone CC1
CNPase	2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-phosphodiesterase
BDNF	Brain Derived Neutrophic Faktor
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPO	Erythropoetin
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FTY720	Fingolimod
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GH	Wachstumshormon
GHRH	Wachstumshormon-Releasing-Hormon
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HO	Hyperoxie
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
IQ	Intelligenzquotient
i.p.	intraperitoneal
ISH	In situ Hybridisierung
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
LH	Luteinisierendes Hormon
MBP	Myelin Basic Protein
MRT	Magnetresonanztomographie
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NO	Normoxie
Olig2	Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor 2
P	Postnataler Tag
PaO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PENUT	Preterm Erythropoietin Neuroprotection Trail
POMC	Proopiomelanokortin
Prä-OL	Prämyelinisierende Oligodendrozyten
Prl	Prolaktin
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
SSW	Schwangerschaftswoche
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormon
TSH	Thyreoida-stimulierendes Hormon

9 ANHANG

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Versuchsaufbau der repetitiven Erythropoetin-Applikation im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung.	17
Abbildung 2: Versuchsaufbau zum Effekt der Hyperoxie auf das Hormonsystem im Modell der Sauerstoff-induzierten Hirnschädigung.	23
Abbildung 3: Repetitive EPO-Applikation verbessert die Hyperoxie-induzierte Hypomyelinisierung zum subakuten Zeitpunkt.	40
Abbildung 4: Reife Oligodendrozyten wurden nicht von der Hyperoxie und der EPO-Behandlung beeinflusst.	41
Abbildung 5: Repetitive EPO-Applikation reduziert Hyperoxie-induzierte kognitive Defizite in adoleszenten und adulten Ratten.	44
Abbildung 6: Darstellung der mRNA-Expression von TSH, POMC und GH nach 48-stündiger Hyperoxie an P5 und P11.	45
Abbildung 7: Verminderter hypophysärer GH-Transkriptionsspiegel nach 48-stündiger Sauerstoffexposition.	46
Abbildung 8: Transiente Veränderungen der GH- und TSH-Serumspiegel nach 48-stündiger Sauerstoffexposition.	48

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inkubationszeit der Färbungen	28
Tabelle 2: Chemikalien und kommerzielle Lösungen	37
Tabelle 3: Plasmide	40
Tabelle 4: Primäre Antikörper des Immunoblot	40
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper des Immunoblot	40
Tabelle 6: Primäre Antikörper der Immunhistochemie	41
Tabelle 7: Sekundäre Antikörper der Immunhistochemie	41
Tabelle 8: Enzyme der In situ Hybridisierung	41
Tabelle 9: Allgemeine Lösungen	41
Tabelle 10: Lösungen der In situ Hybridisierung	42
Tabelle 11: Lösungen des Immunoblots	43

Tabelle 12: Lösungen der Immunhistochemie	43
Tabelle 13: Geräte, Verbrauchsmaterialien, Kits und Software	44

10 DANKSAGUNG

Zu guter Letzt möchte ich meine Dankbarkeit gegenüber all jenen zum Ausdruck bringen, die mich auf meinem Weg zur Erlangung des Dokortitels unterstützt und inspiriert haben.

An erster Stelle möchte ich Frau Univ.-Prof. Dr. med. Ursula Felderhoff-Müser Danke sagen, die mich in ihrer Klinik für Kinderklinik I und in ihrem Team herzlich aufgenommen hat und mir ermöglichte, diese Arbeit zu schreiben.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. medic. Ivo Bendix der mich mit fachlicher Expertise und enormer Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit begleitet hat und mich in meinem Werdegang ermutigt hat.

Des Weiteren möchte ich Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Heike Heuer meinen Dank aussprechen, die mich im Rahmen des Studiums und bei der Doktorarbeit auf meinem Weg mit vielen Anregungen inspiriert hat und mich in einer Phase meiner Arbeit freundlich integriert hat.

Meiner Betreuerin Frau Dr. med. Monia Dewan gilt ein besonderer Dank. Sie hat in vielen Gesprächen meine Arbeit konstruktiv begleitet, mich tatkräftig unterstützt im Labor und auch bei der Ausarbeitung der Arbeit. Danke für die Hilfsbereitschaft!

Ebenfalls möchte ich mich für die alltägliche Unterstützung im Speziellen bei Dr. rer. nat. Meray Serdar, Dr. rer. nat. Boyka Markova, PD Dr. phil. Josephine Herz, Dr. Eva Salveridou, Ralf Herrmann, Karina Kempe, Mandan Rizazad und Christian Köster bedanken.

Ein großes Dankeschön gebührt besonders meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets ermutigt haben, weiterzumachen, auch wenn die Herausforderungen groß waren.

11 LEBENSLAUF

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



