

Aus dem Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie der Anatomischen Anstalt
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

Subcortikale Atrophie im chronischen Cuprizone-Modell der Maus

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Kerstin Hecher

aus

Villach

Jahr

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Univ. Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. Markus Kipp

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Peter Nelson

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Tanja Hochstrasser

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.03.2022

gewidmet den Mitarbeitern der Neuroanatomie der Anatomischen Anstalt der
Ludwig-Maximilians-Universität München
unter der Leitung von Univ. Prof. Dr.med. Markus Kipp
sowie meinem Freund und all den Tieren die täglich
für die Medizin ihr Leben geben

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	8
1.1. Multiple Sklerose	8
1.2 Hirnatrophie	12
1.3 Tiermodelle/das Cuprizone-Modell.....	13
1.4 Zielsetzung	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Geräte und Laborbedarf	16
2.2. Reagenzien und Antikörper	17
2.3 Versuchstiere	19
2.4 Materialgewinnung.....	20
2.4.1 Gefrierschnitte	20
2.4.2 Anfertigen von Kryoschnitten	21
2.5 Färbungen.....	22
2.5.1 Prinzip der Nissl-Färbung.....	22
2.5.2 Vorbereitung der Nissl-Färbung	22
2.5.3 Durchführung der Nissl-Färbung.....	23
2.5.4 Prinzip der Immunfluoreszenz-Färbung.....	24
2.5.5 Durchführung der Immunfluoreszenzdoppel-Färbung (frei flottierend)	24
2.6 Auswertung.....	26
2.6.1 Prinzip der Cavalieri-Methode	26
2.6.2 Volumenbestimmung	27
2.6.3 Prinzip der stereologischen Analyse.....	33
2.6.4 Schätzung der absoluten Anzahl von Nervenzellen	34
2.6.5 Quantifizierung der Zelldichte.....	37
2.6.6 Statistische Analyse	38
3. Ergebnisse	38
3.1 Volumenbestimmung.....	38
3.1.1 Cuprizone induziert einen Volumenverlust subkortikaler Bereiche	38
3.1.1.1 Cuprizone induziert keinen Volumenverlust des Thalamus	39
3.1.1.2 Cuprizone induziert keinen Volumenverlust im Hypothalamus	40
3.1.1.3 Cuprizone induziert einen signifikanten Volumenverlust der Capsula interna	42
3.1.2 Cuprizone induziert keinen Volumenverlust in den Basalganglien	44
3.2. Schätzung der absoluten Anzahl von Nervenzellen im Cortex und Subcortex	45
3.3. Quantifizierung der Zelldichte des Cortex und des Subcortex	49
4. Diskussion.....	54
4.1 Das Cuprizone-Modell	54
4.2 Vorbereitung und Histologie.....	56
4.3 Cavalieri-Methode.....	57
4.4 Volumenverlust und Hirnatrophie bei MS-Patienten	58
4.4.1 Signifikanter Volumenverlust der Capsula interna	59
4.4.2 Kein Volumenverlust von Thalamus und Hypothalamus	60
4.4.3 Kein Volumenverlust der Basalganglien	61
4.5. Design-based Stereology	62
4.5.1 Keine Abnahme der Zellzahl des Cortex und des Subcortex	62
4.5.2 Keine Abnahme der Zelldichte des Cortex und des Subcortex	63
5. Zusammenfassung.....	64

6. Literaturverzeichnis	66
7. Abbildungsverzeichnis	77
8. Danksagung.....	79
9. Publikationsliste	80

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Name
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
anti	gegen
BA	Bed nucleus of the accessory olfactory tract
Ca ²⁺	Calcium
CEAc	Central amygdalar nucleus, capsular part
CEAl	Central amygdalar nucleus, lateral part
CEAm	Central amygdalar nucleus, medial part
CIS	Clinically Isolated Syndrome/ klinisch isoliertes Syndrom
DMT	Disease-modifying therapy
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dorsal	hinten
DOS	Donkey Serum/Esel-Serum
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
et al.	und Kollegen
H ₂ O	Wasser
Kaudal	Unterhalb, zum Schwanz hin
M	Mol
MEA	Medial amygdalar nucleus
Mg ²⁺	Magnesium
ml	Milliliter
MRI	Magnetic Resonance Imaging/ Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
N.	Nervus
NeuN	Neuronal Nuclei
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Perfusionslösung
PPMS	primary progressive MS/ primär progredienten Form
RNA	Ribonukleinsäure

ROI	Region of interest
ROIs	Regions of interest
RRMS	relapsing-remitting MS/ schubförmig remittierenden MS
Seriennr.:	Seriennummer
SI	Substantia innominate
SH	Sulfhydryl
SPMS	secondary progressive MS/ sekundär progrediente Form
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAP	Total radical-trapping antioxidant parameter
ventral	vorne
%	Prozent

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist bekannt als Autoimmunerkrankung, bei der es zu einer Abnahme von zentralen Markscheiden, auch Demyelinisierung genannt, kommt. Sie zählt zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen bei jungen Erwachsenen.

(Epidemiologie) Wie bei den meisten Autoimmunerkrankungen, sind Frauen häufiger betroffen als Männer und zwar zwei- bis dreimal häufiger (Stys et al., 2012). Möglicherweise sind die Sexualhormone und deren Einfluss auf Nerven-, Hormon- und Immunsystem ursächlich (Mendibe Bilbao et al., 2019). Die Erkrankung tritt rund um das 30. Lebensjahr gehäuft auf. Ein Lebensjahrzehnt, in dem sich Frauen im gebärfähigen Alter befinden (Alroughani et al., 2020). Auch Bevölkerungsgruppen, die weiter entfernt vom Äquator leben sind häufiger betroffen. Als Risikofaktoren gelten zum Beispiel ein Vitamin-D-Mangel, Rauchen, Übergewicht in jungen Jahren sowie eine Epstein-Barr-Virusinfektion. Einfluss hat auch eine positive Familienanamnese. So haben Geschwister von betroffenen Personen ein 30% höheres Risiko an MS zu erkranken, als es die Gesamtbevölkerung hat (Shull et al., 2020).

(Ätiologie/Pathophysiologie) Bisher wurde vermutet, dass es bei der Erkrankung nur zu einer Veränderung der weißen Substanz kommt (Chiang et al., 2019). Eine Metaanalyse von Chiang und Kollegen konnte jedoch 2019 zeigen, dass auch die graue Substanz bei der Erkrankung betroffen sein kann. So kann es zur Atrophie der grauen Substanz in Thalamus, Putamen, Nucleus caudatus, sensomotorischem Cortex, Insel und auch der Gyrus Cingulie kommen. Und das von Beginn der Erkrankung an (Chiang et al., 2019). Über die zeitlichen Abläufe weiß man allerdings noch nicht eindeutig Bescheid (Eshaghi et al., 2018). Der Subcortex, der auch als „Barometer“ für diffuse Schäden des Hirnparenchyms gilt, ist mit seinen zahlreichen reziproken Verbindungen anfällig für neurodegenerative Veränderungen (Wagenknecht et al., 2016).

Die histopathologischen Veränderungen der grauen Substanz zeigen sich nicht nur in Demyelinisierung und an neurodegenerativen und neuronalen Schäden, sondern auch in axonaler Hinsicht (Kipp et al., 2015).

So gehören neben Demyelinisierung auch Gliaktivierung, und inflammatorische Infiltrate, zum Beispiel T-Zellen, die körpereigene ZNS-Bestandteile wie etwa Myelin angreifen, auch

zu der Erkrankung (Stys et al., 2012, Barnett and Prineas, 2004). Eine veränderte Eisenakkumulation, die mittels spezieller Magnetic Resonance Imaging (MRI) Technik ermittelt wurde, scheint ursächlich mit Neuroinflammation und Neurodegeneration einherzugehen (Pudlac et al., 2020). Neben Eisenakkumulation führen mitochondriale Dysfunktion oder Glutamat Exzitotoxizität letztlich zu oxidativem Stress, der zum neuronalen Zelltod führen kann, sofern die Kompensationsmechanismen der Zelle nicht mehr ausreichen (Azevedo et al., 2018).

Eine erste frühe Veränderung wurde bei Patienten mit schubförmiger remittierender MS festgestellt und zeigte sich in Form von Oligodendrozytenapoptose, Mikrogliaaktivierung, dem Vorhandensein von wenigen bis hin zu fehlenden Lymphozyteninfiltraten und/oder Myelinphagozytose (Barnett et al., 2004).

Gehirnbiopsien von MS-Patienten und Gehirne von verstorbenen MS-Patienten zeigen perivaskuläre Infiltrate durch Makrophagen und T-Zellen sowie Demyelinisierung und axonale Schäden (Stys et al., 2012). Diese autoreaktiven T- und B-Zellen sowie dysfunktionale Oligodendrozyten führen zu Schäden am Myelin (Kipp et al., 2015). Doch die genauen zugrundeliegenden pathologischen Mechanismen sind noch immer nicht ausreichend erforscht (Cappellani et al., 2014).

(klinische Verlaufsformen) Es wird zwischen drei Formen der Erkrankung unterschieden. Die Mehrzahl der betroffenen MS-Patienten (85%) leiden an der schubförmig remittierenden MS (relapsing-remitting MS (RRMS)). Die RRMS ist gekennzeichnet durch Symptome, die für Wochen oder Monate auftreten und teilweise oder vollständig wieder abklingen. Die sekundär progrediente Form (secondary progressive MS ((SPMS)) verläuft anfangs schubförmig, verschlechtert sich aber im Verlauf stetig. Die Mehrzahl der Patienten, welche an der RRMS leiden, gehen im Verlauf in die SPMS über. Ein geringer Prozentsatz der Patienten leidet unter der primär progredienten Form (primary progressive MS ((PPMS)) die von Beginn an eine stetige Verschlechterung aufweist (Stys et al., 2012, Kipp et al., 2015, Wagenknecht et al., 2016).

Neben diesen drei Formen wird auch der Begriff klinisch isoliertes Syndrom oder Clinically Isolated Syndrome mit MS in Verbindung gebracht und für ein mögliches erstes Anzeichen einer späteren MS-Erkrankung gehalten. CIS ist gekennzeichnet durch frühe neurologische Veränderungen, die in Form eines geänderten Metabolismus und Demyelinisierung für 48 Stunden oder länger auftreten können (Abidin et al., 2017; Henry et al., 2008).

Ebenso sollte zwischen Phasen der akuten Inflammation sowie den chronischen Schäden unterschieden werden. Viele Axone überstehen eine Demyelinisierung bei einer akuten Inflammation, jedoch können die Axone an langandauernder sowie chronischer Demyelinisierung zu Grunde gehen (Azevedo et al., 2018).

Der Fortschritt sowie die Schwere der Erkrankung sind maßgeblich von der Menge an degenerativen Veränderungen im ZNS abhängig (Stys et al., 2012).

(Symptome/Klinik) Diese Veränderungen im Gehirn äußern sich durch körperliche, sensorische und kognitive Einschränkungen, wobei sie je nach Ort der betroffenen Region im Gehirn variieren (Burfeind et al., 2016; Cappellani et al., 2014). Ein typisches anfängliches Symptom der MS ist etwa die einseitige Entzündung des N. opticus. Eine Sehnervenentzündung kann allerdings auch gesondert von einer MS auftreten. Die Symptome sind sehr ähnlich und können nur durch klinische Untersuchungen unterschieden werden (Pudlac et al., 2020). Ebenso können das Sehen von Doppelbildern, schmerzhaftes Augenbewegungen, Trigeminusneuralgie, der Verlust von Sensibilität im Gesicht, Nystagmus, motorische Störungen, Ataxie, Harndranginkontinenz, Obstipation, erektile Dysfunktion oder unspezifische Müdigkeit auftreten. So sollte man bei einem Patienten, der unter 50 Jahre alt ist und einige neurologische Symptome zur Vorgeschichte hat, die sich nach mehreren Tagen bis Wochen wieder gebessert haben, auch an die Diagnose MS denken.

Differentialdiagnostisch kommen Erkrankungen wie verschiedene Vaskulitiden, eine HIV-Infektion, Lyme-Borreliose, Schilddrüsenfunktionsstörungen, oder Mangelernährung in Frage, die zugleich abgeklärt werden sollten (Shull et al., 2020).

(Diagnostik) Aktuell gibt es verschiedene Methoden, wie etwa radiologische Verfahren, elektrophysiologische Messungen wie evozierte Potentiale oder Liquordiagnostik, zur Untersuchung der inflammatorischen Komponente dieser Erkrankung. Im Gegensatz dazu sind Verfahren zur Überwachung der frühen und späten Neurodegeneration noch nicht ausreichend entwickelt (Wagenknecht et al., 2016). Spezielle MRI-Techniken zur genauen Darstellung der einzelnen Strukturen des Gehirns scheinen aber eine verlässliche Methode zur Untersuchung und Überwachung von Gehirnatrophie zu sein (Duan et al., 2012).

Im Jahr 2020 haben Mezzaroba und Kollegen in ihrer Studie herausgefunden, dass niedrige Plasma-Level von Zink, Adiponectin, TRAP und SH-Gruppen, die als Antioxidantien gelten, mit der MS zu assoziieren sind und dass sie möglicherweise

wichtige Biomarker in der Erkennung der Erkrankung sind (Mezzaroba et al., 2020).

Zur schnellen Diagnosesicherung der RRMS helfen die McDonald- Kriterien von 2017, die unter anderem räumlich sowie zeitlich getrennte Läsionen im MRI fordern (Shull et al., 2020).

(Therapie) Patienten mit einem akuten Schub, und solche mit akuten oder subakuten Symptomen, das heißt neurologischen Begleiterscheinungen für einen Zeitraum von maximal 24 Stunden, ohne dass ersichtliche Zeichen eines akuten Infektes oder Fiebers erkennbar sind, sollten mit einem Kortison-Stoß für etwa fünf Tage behandelt werden (Shull et al., 2020).

Immunmodulatoren haben sich in gewisser Weise als effektiv in der Behandlung der MS gezeigt (Chiang et al., 2019). Doch nicht jedes dieser Medikamente ist geeignet für jeden Patienten. Die Wahl des richtigen Medikaments ist essentiell für die Behandlung der Erkrankung (Bose and Freedman, 2020).

Aktuell stehen etwa 18 Disease-modifying therapy (DMT) krankheitsmodifizierende Therapeutika oder Immunmodulatoren zur Verfügung. Eines der am meisten Untersuchten, seit langem und häufig eingesetzten spezifischen Immunmodulatoren in der Behandlung von MS ist Beta-Interferon. Es reduziert die Schubraten und verlangsamt den Übergang der RRMS in die SPMS (Chitnis and Prat, 2019; Bose and Freedman, 2020).

Natalizumab wurde als einer der ersten monoklonalen Antikörper entwickelt, welcher den Übertritt von Leukozyten aus der Blutbahn ins Gehirn hemmt. Breitere Angriffspunkte hat Fingolimod. Das Medikament führt sowohl zu einer Hemmung der Immunreaktion, einer Verminderung der Anzahl an T- und B-Zellen sowie Verbleib dieser in sekundären lymphatischen Organen als auch zu einer Hemmung des Eintritts von Entzündungszellen in das Gehirn (Rommer et al., 2019).

Patienten mit aggressiven Formen der MS wie der PPMS profitieren durch den Einsatz von Ocrelizumab. Auch dabei handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der das Fortschreiten der Erkrankung hemmt. Er führt jedoch zu keiner Heilung (Bigaut et al., 2019).

Besonderes Augenmerk verlangen schwangere Patientinnen. Der Großteil der Medikamente ist in einer Schwangerschaft kontraindiziert. Beta-Interferon kann etwa in einer Schwangerschaft bei klinischer Notwendigkeit nur gemeinsam mit Glatirameracetat verabreicht werden. Cladribin und Alemtuzumab bewirken eine Reduktion von Rückfällen über einen längeren Zeitraum, jedoch muss die Patientin eine Wartezeit von bis zu 20

Monaten nach Beginn einer Therapie einhalten, bevor es zu einer Schwangerschaft kommen kann (Alroughani et al., 2020).

Neben medikamentösen Therapien sollten begleitend auch nicht- medikamentöse wie etwa Bewegung, Achtsamkeitstraining, Gleichgewichtsübungen, Aerobic oder Gedächtnistraining durchgeführt werden (Shull et al., 2020).

1.2 Hirnatrophie

Hirnatrophie oder mit anderen Worten der Abbau von Gehirnmasse und eine damit verbundene Abnahme von Gehirnvolumen sind natürliche Prozesse in unserem Körper. So wie sich das Gehirn in der Kindheit entwickelt und wächst, so nimmt es mit dem Älterwerden wieder an Masse ab. Je nach Struktur des Gehirns ist der Abbau ganz unterschiedlich, verläuft nicht nach Regeln, und ein exaktes Alter, in dem der Abbau beginnt, ist nicht bekannt (Azevedo et al., 2019). Bei gesunden Menschen beschleunigt sich der Abbau ab dem 60. Lebensjahr (Ghione et al., 2019). Nicht nur das Alter, sondern auch Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson ziehen einen Abbau von Gehirnmasse mit sich (Krajcovicova et al., 2019).

Darüber hinaus gibt es auch andere Faktoren wie etwa Ernährung, Infektionskrankheiten oder Schockzustände, die das Gehirnvolumen beeinflussen und zu einer Verminderung führen können (Sungura et al., 2020).

Bei der MS ist Atrophie oder auch Gewebeschwund ein wichtiger Bestandteil der Erkrankung. Lange Zeit dachte man, dass sich lediglich die weiße Substanz verändert. Neuere Untersuchungen zeigten aber sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz Atrophie des Gehirns. Sie tritt in allen drei Krankheitstypen auf, und zwar sowohl im frühen wie im späten Stadium. Außerdem gilt sie als zuverlässiger Marker für Neurodegeneration (Marciniewicz et al., 2019; Zivadinov et al., 2013; Rojas et al., 2016).

Die körperlichen Behinderungen sowie die Einschränkungen gehen mit dem Ausmaß der Atrophie der grauen Substanz einher. Atrophie der subkortikalen Regionen führen etwa zu einer Beeinträchtigung des Gedächtnisses (Zivadinov et al., 2013). Umso wichtiger ist es, die Erkrankung von Beginn an zu therapieren, um eine Atrophie zu vermindern (Rojas et al., 2016).

Ursächlich für eine Atrophie und somit die Abnahme von Gehirnmasse ist der Abbau von Myelin und eine damit verbundene Demyelinisierung. Darüber hinaus sind auch die Veränderung der Menge an Gewebewasser und der Verlust von Gliazellen relevant (Marciniewicz et al., 2019). Nicht zu vernachlässigen ist eine Pseudoatrophie, welche

durch einen Wasserverlust sowie eine verminderte Ödembildung im Rahmen einer antientzündlichen Therapie auftritt.

Wie bereits erwähnt, sind radiologische Verfahren wie MRI wesentliche Bestandteile in der Messung und Überwachung von Atrophie des Gehirns. Darüber hinaus sind die körperlichen Beeinträchtigungen des Patienten nicht zu vernachlässigen. Aus diesen lassen sich Rückschlüsse auf die betroffene Gehirnregion ziehen.

1.3 Tiermodelle/das Cuprizone-Modell

MS ist eine Erkrankung, die nur Menschen betrifft. Sie kommt in dieser Form bei Tieren nicht vor. Aber Tiermodelle sind wichtig, um die verschiedenen Aspekte der Erkrankung wie etwa Neuroinflammation, ihren Einfluss auf Demyelinisierung und neuronale Schäden zu erforschen. Es gibt verschiedene Modelle wie etwa das autoimmune, das virale oder das toxische Tiermodell, die alle ihre Vor- und Nachteile haben. Jedoch gibt es kein Tiermodell, das alle Bestandteile der menschlichen MS-Erkrankung vereint (Pachner, 2011).

Das Cuprizone-Modell ist ein bereits vielfach durchgeführtes toxisches Tiermodell, welches ideal zur Beobachtung von De- und Remyelinisierung bei Nagetieren ist (Zhen et al., 2017). Bereits 1950 wurde Cuprizone, ein Kupfer-Chelator, erstmals von Gustav Nilsson als eine empfindliche blaue Farbreaktion beschrieben, die entsteht, sobald es zu einer Chelatisierung von Oxalyldiazid und Cyclohexanon mit Kupfer-Salzen kommt. Cuprizone scheint einen Einfluss auf den Kupferhaushalt der Tiere zu haben. So konnte Carlton 1966 bei der Verabreichung von Cuprizone bei Mäusen einen niedrigen Kupfer-Serum-Spiegel feststellen und Untersuchungen hinsichtlich Demyelinisierung anstellen (Carlton, 1966; Praet et al., 2014). Zatta und Kollegen wiederum zeigten in ihrer Studie 2005 das Gegenteil davon und wiesen erhöhte Kupfer- sowie Zink- Spiegel nach (Zatta et al., 2005).

Bis heute ist der genaue Mechanismus hinter der Funktion von Cuprizone noch unklar. Man weiß, dass Kupfer ein wichtiger Cofaktor von einigen Enzymen wie der mitochondrialen Zytochrom C Oxidase oder dem Komplex IV der Atmungskette ist (Varhaug et al., 2019). Und man hat gesehen, dass sowohl ein Anstieg als auch ein Abfall der Kupferionen möglich ist (Matsushima und Morell, 2001; Zatta et al., 2005). Außerdem scheint Cuprizone nicht nur auf Oligodendrozyten, sondern auch auf Neurone eine Wirkung zu haben. Die Rolle der Mitochondrien wurde bis jetzt unterschätzt, sie können

aber als Auslöser für Demyelinisierung und axonalen Schaden fungieren (Varhaug et al., 2020). Bereits 1966 beschrieb Carlton erstmals die toxische Wirkung von Cuprizone an Mäusen. Auch die Auswahl des passenden Versuchstieres, die Anschaffungskosten, die Unterhaltung und die Handhabung spielen eine wichtige Rolle. So gibt es unter Nagetieren etwa ein unterschiedliches Ansprechen auf die Gabe von Cuprizone. So sprechen C57BL/6J-Mäuse besser auf Cuprizone an, als zum Beispiel Wistar- Ratten oder Meerschweinchen (Carlton, 1966; Elsworth and Howell 1973; Love, 1988). Neben der Tierart sind des Weiteren die Größe und das Geschlecht der Tiere von Bedeutung. Mäuse mit geringerem Körpergewicht sprechen stärker auf die Intoxikation an, als Mäusen mit vermehrtem Körpergewicht (Leopold et al., 2019). Viele Studien werden nur mit männlichen Mäusen durchgeführt (Mohammadi-Rad et al., 2019; Zhang et al., 2020; Zhen et al., 2017; Mason et al., 2004; Hiremath et al., 1998), obwohl es bis jetzt noch nicht klar ist, ob es geschlechtliche Unterschiede in der Ausprägung der Demyelinisierung gibt.

Nicht irrelevant ist die Art der Verabreichung von Cuprizone an die Tiere. Es kann in reiner Form dem normalen Futter zugegeben werden, es kann als fertig gepresste Pellets oder auch mittels Magensonde direkt der Maus verabreicht werden (Zhen et al., 2017). Letzteres wird angewendet, um sicherzugehen, dass jedes Tier eine auf sein Körpergewicht abgestimmte Dosis erhält (Zhen et al., 2017).

Um eine akute und verlässliche Demyelinisierung des Corpus callosum sowie anderer Gehirnregionen zu erzielen, sollte Cuprizone über eine Dauer von 4-6 Wochen gefüttert werden. Nach dieser Zeit kommt es zu einer Aktivierung von Mikroglia sowie Astrozyten die sich in den Myelinscheiden einlagern (An et al., 2020). Die Dosis von etwa 400 mg/ kg pro Tag bei der Fütterung über eine orale Gavage/ orale Schlundsonde ist ideal, um eine ausreichende Demyelinisierung zu erreichen sowie die toxischen Nebenwirkungen gering zu halten und das Überleben der Maus während des Versuches zu sichern. Dosen von etwa 1000 mg/ kg pro Tag über eine orale Schlundsonde führen innerhalb weniger Tage zum Tod der Mäuse (Zhen et al., 2017).

Eine chronische Demyelinisierung wird durch eine zwölfwöchige oder längere Fütterung von Cuprizone erreicht (Mason et al., 2004).

Bereits während als auch nach einer sechs-wöchigen Fütterung mit Cuprizone kommt es zu einer spontanen Remyelinisierung durch neu gebildete Oligodendrozyten (Zhen et al., 2017). Nach zwölfwöchiger oder noch länger andauernder Fütterung mit Cuprizone ist eine Regeneration der Oligodendrozyten oder Demyelinisierung spärlich vorhanden, diese

erreicht aber nicht mehr die anfängliche Anzahl der Oligodendrozyten (Mason et al., 2004).

1.4 Zielsetzung

Zeigt sich eine Veränderung im Volumen von subkortikalen Regionen im chronischen Cuprizone-Modell und welche Bedeutung hat diese?

Bereits von Beginn an kommt es zur Atrophie der grauen Substanz, jedoch sind die Mechanismen dahinter sowie der zeitliche Ablauf bis heute noch nicht exakt geklärt (Eshaghi et al., 2018). Dieser Volumenverlust bei MS-Patienten zeigt sich besonders stark in subkortikalen Kerngebieten, speziell dem Thalamus, Nucleus caudatus und Putamen. Hingegen ist eine Atrophie im Bereich der kortikalen grauen Substanz sowie der weißen Substanz bei diesen Patienten eher gering (Cappellani et al., 2014; Bishop et al., 2016).

Diese Arbeit, die damit verbundenen Experimente und Analysen soll einen möglichen Volumenverlust in einzelnen Bereichen des Subcortex am chronischen Cuprizone-Modell der Maus untersuchen. Überprüft werden soll, ob die Intoxikation von Cuprizone einen signifikanten Volumenverlust von Basalganglien, Thalamus, Hypothalamus oder Capsula interna auslöst.

Im weiteren Verlauf soll untersucht werden, ob mit einem Volumenverlust auch gleichzeitig ein Verlust von Neuronen in diesen Bereichen stattfindet.

Abschließend soll die Zelldichte des Cortex und des Subcortex errechnet werden, um die Ergebnisse vergleichbar zu machen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen die Cuprizone-induzierten Verluste auf zellulärer als auch auf nicht-zellulärer Ebene zeigen und somit weitere Hinweise auf die Pathomechanismen von MS liefern, um weitere Therapiekonzepte zu entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Laborbedarf

Laborbedarf	Hersteller	Bestellnummer/ Seriennummer
Deckgläschen für Objektträger	Avantor/VWR	24x32mm ->631-0711 24x40mm ->631-1573 24x50mm ->631-1574 24x60mm ->631-1575
Horizontalschüttler	SunLab	SU1020
Kryostat Type CM 1950	Leica Microsystems	Serienr.: 153072007
Magnetrührer Combimag RET	IKA Labortechnik	Serienr.: 138782
MS1 Minishaker	IKA Labortechnik	Serienr.: 004105
pH Meter SenTix81	Xylem Analytics Germany Sakes GmbH & Co. KG	103642
Pipetten Eppendorf Research plus Einkanal- Pipetten	Eppendorf AG	3120000909
Superfrost Objektträger	Thermo Scientific	12134682
VF2 Vortex Schüttler	IKA Labortechnik	Serienr.: 708022
Vibrax VXR (Kreisschüttler)	IKA Labortechnik	Serienr.: 709700
12er-Wellplatten unbeschichtet	Avantor/VWR	734-2778

Tabelle 1 zeigt die verwendeten Geräte sowie Laborbedarf mit Hersteller sowie Bestellnummern.

2.2. Reagenzien und Antikörper

Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
5N HCL	Merck	109911
2-Propanol (Isopropanol)	VWR	20842.298
Aqua dest.	hauseigene Filteranlage	
Aqua bidest.	ROTH	3478
bisBenzamide H33258	Sigma-Aldrich	14530
Chloralhydrat	ROTH	K318.1
Chrom III Kaliumsulfat	Merck	101036
Cuprizone (Bis- (cyclohexanone))oxaldihydrazone)	Sigma-Aldrich	C9012
DePeX	Serva	18243.2
Donkey anti Mouse IgG, Alexa Fluor 488	ThermoFisher	A 21202
DOS Donkey Serum/Esel-Serum	Sigma	D9663
Essigsäure (Eisessig) 100%	Merck	100063
Ethanol 99% vergällt	CLN	CLN-1006
Ethylenglycol	Merck	109621
FluorePreserve Reagent	Merck Millipore	345787
FluorSave	Merck Millipore	345789
37% Formaldehyde	ROTH	P733.2
Gelatine	Merck	104078
Glycerol 99%	Aldrich	G9012
Isopentan	VWR	2487229

Kresylviolett (Acetat)	Waldeck	1A-400
Mausfutter	Ssniff	Ratte/Maus Haltung Mehl V1530-000
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	Merck Millipore	106349
NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O	Merck Millipore	106345
NaOH Plätzchen	Merck	106498 5000
Natriumacetat	Merck	106268
PBS Trockenpulver ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom	L182-05
Sucrose	Merck	107687 5000
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sukura	4583
Triton X-100	Merck	108603
Xylol p.A.	VWR	28975 325

Tabelle 2 zeigt die verwendeten Reagenzien sowie Hersteller und Bestellnummer.

Lösung	Herstellung
0,5% Gelatine für Objektträger	2,5 g Gelatine in 500 ml Aqua dest. lösen und zusätzlich 0,25 g (0,05%) Chrom III Kaliumsulfat einrühren
0,5% Triton/1x PBS	Konzentration 1:200, Triton X-100 in 1x PBS lösen
1x PBS	500 ml 10x PBS mit 4500 ml Aqua dest. verlängern, pH-Wert 7,40-7,45
10% Sucrose	10 g Sucrose mit 1x PBS auf 100 ml auffüllen
20% Sucrose	20 g Sucrose mit 1x PBS auf 100 ml auffüllen
30% Sucrose	30 g Sucrose mit 1x PBS auf 100 ml auffüllen
10 x Phosphat Puffer (für Gefrierschutz-Lösung)	65 g NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O 15 g NaOH Plätzchen und 2 ml 5M HCL mit Aqua dest. auf 400 ml auffüllen, pH-Wert auf 7,2-7,4 einstellen mit 5M HCL
10x PBS	477,75 g PBS Trockenpulver ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺ in 5000 ml Aqua dest. lösen
DAPI Stock A	10 mg bisBenzimid-DAPI in 1 ml Aqua dest. lösen

DAPI Stock B	Konzentration 1:1000, 1µl DAPI Stock A in 1 ml Aqua dest. lösen
Gefrierschutz-Lösung	50 ml 10x Phosphat-Puffer, 150 ml Glycerol 99%, 150 ml Ethylenglycol und 150 ml Aqua dest. mischen
Nissl-Stammlösung zum Färben	82,03 g Natriumacetat wasserfrei in 1000 ml Aqua dest. lösen, ergibt 1 M Natriumacetat
Nissl-Stammlösung zum Entfetten	2% Triton X-100, 20 ml Triton X-100 in 980 ml Aqua dest. lösen
Nissl-Färbepuffer	40 ml Nissl-Stammlösung zum Färben, 9,6 ml 100% Essigsäure (Eisessig) auf 1000 ml mit Aqua dest. verlängern, pH-Wert auf 3,8-4,0, Endkonzentration= 0,2 M
Nissl-Farbe	1 g Kresylviolett Acetat in 1000 ml Nissl-Färbepuffer lösen
Entfettungslösung für Nissl-Färbung	2,5 ml Nissl-Stammlösung zum Entfetten mit 47,5 ml Aqua dest. und 150 ml Ethanol vermischen
Perfusionslösung: 4% PFA	4,6 g NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O 8,0 g NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O in 900 ml Aqua dest. mit 100 ml 37% Formaldehyde lösen, pH auf 7,40 einstellen mit NaOH

Tabelle 3 zeigt die verwendeten Lösungen und ihre Herstellung.

Primär-Antikörper				
Name	Verdünnung	Firma	Bestellnummer	Spezifische Färbung
Anti-NeuN	1:2000	Millipore	MAB377	Immunfluoreszenz-Färbung
Sekundär-Antikörper				
Alexa 488 donkey anti mouse	1:500	ThermoFisher	A 21202	Immunfluoreszenz-Färbung
Serum				
DOS Donkey Serum	1:9 (10%)	Sigma	D9663	Blockierung

Tabelle 4 zeigt die verwendeten Antikörper sowie das verwendete Serum.

2.3 Versuchstiere

Für die Durchführung des Versuchs wurden acht Wochen alte C57BL/6J Mäuse (Janvier, Frankreich) mit einem Gewicht von 19-21 g verwendet. Die Tiere wurden im Tierstall des

Max-von-Pettenkofer-Instituts gehalten. Zur Eingewöhnung wurden die Mäuse für zwei Wochen mit Normalfutter versorgt. Anschließend erhielt die Versuchsgruppe zwölf Wochen lang 0,25% Cuprizone-haltiges Futter. Die Kontrollgruppe wurde über den gesamten Zeitraum mit Normalfutter versorgt. Die Tiere wurden bei einem hell/dunkel Zyklus von zwölf Stunden, einer gleichbleibenden Temperatur von 21-24 °C, sowie einer Luftfeuchtigkeit von 55-65% gehalten. Wasser und Futter hatten sie zu jeder Zeit zur Verfügung. Die Versuche wurden nach den Empfehlungen des Europäischen Verbandes für Labortierwissenschaften durchgeführt und vom Prüfungsausschuss für die Versorgung tierischer Probanden der Bezirksregierung Oberbayern unter der Versuchsnummer 55.2-1-54-2532-73-15 genehmigt.

2.4 Materialgewinnung

Nach zwölfwöchiger Cuprizone-Fütterung wurden die Tiere durch eine Injektion von 1 ml Narkosemittel intraperitoneal tief narkotisiert. Nach Erlöschen der Schutzreflexe erfolgte die transkardiale Perfusion. Hierzu wurde der rechte Vorhof eröffnet und die linke Herzkammer mit einer an ein Infusionssystem angeschlossenen Kanüle punktiert. Es erfolgte die transkardiale Perfusion mit 20 ml 1x PBS sowie zwei Mal je 50 ml 4%iger Paraformaldehydlösung. Im Anschluss wurde die Perfusionskanüle entfernt, die Maus dekapitiert, die Schädelkalotte eröffnet, der Kopf mit dem Gehirn in 50 ml 4%ige Paraformaldehydlösung gegeben und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C postfixiert. Letztlich wurde das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel präpariert.

2.4.1 Gefrierschnitte

Für die Kryo-Einbettung wurden die Gehirne für mindestens eine Stunde in 50 ml 1x PBS gespült, um die überschüssige Paraformaldehydlösung zu entfernen. Anschließend wurden die Gehirne über Nacht im erneuerten 1x PBS aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgte ein Tausch des 1x PBS und die Gehirne wurden für eine weitere Stunde gespült. Dies fand bei Raumtemperatur und unter Bewegung auf dem Schüttler statt.

Um die Bildung von Kristallen zu vermeiden, die beim Einfrieren die Gewebestruktur zerstören, wurden die Gehirne in Sucroslösung mit zunehmender Konzentration inkubiert.

Dauer	Sucroslösung
-------	--------------

9 Stunden	10%ige Sucroselösung
15 Stunden	10%ige Sucroselösung
9 Stunden	20%ige Sucroselösung
15 Stunden	20%ige Sucroselösung
9 Stunden	30%ige Sucroselösung
15 Stunden	30%ige Sucroselösung

Tabelle 5 zeigt die Verweildauer der Gehirne in den einzelnen Sucroselösungen.

Die Inkubationsschritte mittels Sucroselösung fanden im Kühlschrank bei 4 °C statt. Zu Beginn jeder neuen Sucrorestufe schwammen die Gehirne oben auf der Lösung, bis sie durch die Sättigung mit der Sucrose zu Boden gesunken sind.

Für die Kryo-Einbettung wurde ein Becherglas mit gekühltem Isopentan (-70 °C) befüllt und in eine Styroporbox mit Trockeneis gestellt. Die gesättigten Gehirne wurden aus der 30%igen Sucroselösung entnommen und die überschüssige Sucroselösung wurde vorsichtig abgetupft.

Einige Gehirne wurden ohne Tissue-Tek eingefroren. Hierzu mussten sie in ein kleines Plastikförmchen mit Löchern gegeben und mit Hilfe einer Plastikpinzette komplett in das -70 °C kalte Isopentan eingetaucht werden. Nach drei Minuten wurden die gefrorenen Gehirne aus dem Isopentan genommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Einige Gehirne wurden in Tissue-Tek eingebettet. Hierzu konnten die Plastikförmchen mit Tissue-Tek gefüllt und das Gehirn auf den Boden positioniert werden. Anschließend wurden die Förmchen mit einer Plastikpinzette in das -70 °C kalte Isopentan gesetzt. Nach fünf Minuten war das Tissue-Tek fest und die Gehirne durchgefroren. Sie konnten nun in den Förmchen verpackt bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt werden.

2.4.2 Anfertigen von Kryoschnitten

Die Gehirne wurden bei -24 °C Kammer- und Schneideblocktemperatur mit einem Kryostaten (Type CM 1950; Leica Microsystems) in 40 µm dicke Scheiben geschnitten. Hierzu haben wir die Gehirne auf einen Schneideteller mit Tissue-Tek aufgeklebt und in den Schneideblock eingespannt. Ab der Region 200 bis 355 (Sidman et al., 1970) wurden die Schnitte aufgenommen und in 1x PBS gegeben. Jeder dritte Schnitt der 40 µm dicken

Schnittserien wurde direkt auf Superfrost-Objektträger aufgezogen, welche bei -20 °C in Objektträgerboxen eingefroren wurden. Die Objektträger waren zuvor mit 0,5% Gelatine und 0,05% Chrom III Kaliumsulfat beschichtet und über Nacht bei 60 °C im Wärmeschrank getrocknet worden. Die restlichen Schnitte haben wir in einer Gefrierschutzlösung bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

2.5 Färbungen

Um eine mögliche Volumenveränderung durch die Cuprizone-Intoxikation zu untersuchen, wurden einige Schnitte der 40 µm dicken Schnittserien histochemisch Nissl-gefärbt. Eine weitere Schnittserie der gleichen Tiere haben wir immunfluoreszierend gegen NeuN gefärbt, um die Anzahl und Dichte der Neuronen zu bestimmen.

2.5.1 Prinzip der Nissl-Färbung

Die Nissl-Färbung die zu den histochemischen Färbungen zählt, ermöglicht es, Bestandteile in Zellen spezifisch anzufärben, ohne die Struktur der Zelle zu zerstören. Kresylviolett bindet als basischer Farbstoff im Gewebe an negativ geladene Strukturen wie DNA und RNA. Somit werden Zellkerne als auch Ribosomen angefärbt. Ribosomen kommen vermehrt in Nervenzellen vor und ermöglichen eine genauere Unterscheidung dieser Zellen von übrigen Zellen im Gehirn der Maus.

2.5.2 Vorbereitung der Nissl-Färbung

Die Kresylviolett-Farbe wurde mindestens einen Tag vor der Färbung angesetzt. Hierzu wurde 1 g Kresylviolett in 1000 ml Färbepuffer (Herstellung siehe Tabelle 3) für mindestens eine Stunde mittels eines Magnetrührers eingerührt. Den Färbepuffer haben wir vorher hergestellt aus 40 ml Stammlösung zum Färben (Herstellung siehe Tabelle 3), 9,6 ml 100% Essigsäure und Aqua dest. zum Auffüllen auf 1000 ml. Die Stammlösung zum Färben (Herstellung siehe Tabelle 3) besteht aus 82,03 g wasserfreiem Natriumacetat, das in 1000 ml Aqua dest. gelöst wird und somit eine 1 M Natriumacetatlösung ergibt.

Die Farbe wurde anschließend über Nacht zur weiteren Reifung im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Die Kresylviolett-Farbe wurde vor dem Gebrauch gefiltert. Die Entfettungslösung wurde aus 2,5 ml Stammlösung zum Entfetten, 47,5 ml Aqua dest. und 150 ml 100% Ethanol

hergestellt (Herstellung siehe Tabelle 3). Für die Färbereihe wurde noch 1000 ml Färbepuffer benötigt, der auf die gleiche Art hergestellt wurde wie für die Farbe selbst.

Am nächsten Tag wurden Küvetten für die Färbereihe in folgender Reihenfolge aufgestellt.

- | | |
|------------------------|-----------------|
| 1. Färbepuffer | 8. 100% Ethanol |
| 2. Entfettungslösung | 9. Isopropanol |
| 3. Färbepuffer | 10. Isopropanol |
| 4. Kresylviolett-Farbe | 11. Xylol |
| 5. Färbepuffer | 12. Xylol |
| 6. Färbepuffer | 13. Xylol |
| 7. Färbepuffer | |

2.5.3 Durchführung der Nissl-Färbung

Jeder dritte Schnitt der 40 µm dicken Schnittserien wurde Nissl-gefärbt.

Hierzu wurden die Schnitte für 20 Minuten im Färbepuffer gewaschen, um Reste von 1x PBS und Tissue-Tek zu entfernen. Es folgte ein Bad der Schnitte für 20 Minuten in der Entfettungslösung, um anschließend erneut für 20 Minuten in Färbepuffer gewaschen zu werden. Danach wurden die Schnitte für 3-7 Minuten in Kresylviolett-Farbe inkubiert.

Nach dem Färben haben wir die Schnitte für je eine Minute in drei aufeinander folgende Küvetten aus Färbepuffer gegeben, um die ungebundene Farbe zu entfernen. Im Anschluss wurden die Schnitte in 100%igem Ethanol differenziert. Nach Ablauf von 30 Sekunden überprüften wir unter dem Mikroskop die richtige Färbung der Schnitte. Dieser Vorgang nennt sich Differenzierung. Waren die Zellen blau und faserreiche Regionen wie das Corpus callosum hell bis weiß, waren die Schnitte lange genug entfärbt worden und mussten sofort für je fünf Minuten in zwei aufeinander folgende Xylol-Küvetten gegeben werden. Waren die Schnitte noch dunkel blau, erfolgten neuerliche 30 Sekunden in 100%igem Ethanol zur weiteren Differenzierung. Anschließend haben wir die Schnitte nochmal für 10 Minuten in eine dritte Küvette mit Xylol gegeben, bevor sie mit DePeX eingedeckt wurden.

Nach einer Stunde Trocknung bei Raumtemperatur konnten die Schnitte mit kleinen Gewichten beschwert werden, wodurch DePeX gleichmäßig am Objektträger verteilt und überschüssiges DePeX vom Objektträger verdrängt wurde.

2.5.4 Prinzip der Immunfluoreszenz-Färbung

Die Immunfluoreszenz-Färbung visualisiert Antigene im Gewebe. Ein Erstantikörper, der spezifisch für ein Antigen ist, bindet durch verschiedene Schritte im Gewebe. Der verwendete Antikörper sowie die Methode der Färbung sollen je nach Gewebe und der zu erwartenden Spezifität und Sensitivität ausgewählt werden.

Es gibt verschiedene Methoden der Immunfluoreszenz-Färbung. Für die hier verwendete indirekte Two-step-Methode wird ein durch Fluoreszenz markierter Zweitantikörper verwendet, der an den zuvor verwendeten Erstantikörper bindet. Dieses Verfahren ist zeitaufwändiger aber sensitiver auf das zu färbende Antigen im Gewebe.

Um eine noch spezifischere Immunfluoreszenz-Färbung auf das zu färbende Antigen zu erreichen, kann mit Hilfe von normalem Serum eine unspezifische Antikörperbindung und Hintergrundfärbung geblockt werden. Das Blockieren mit dem Serum findet im ersten Schritt der Färbung statt. Das Normalserum findet sich auch in der Lösung des ersten und zweiten Antikörpers wieder. Es sollte von dem Tier stammen, in dem der zweite Antikörper hergestellt wurde. In dieser Färbereihe haben wir Alexa 488 donkey anti mouse als zweiten Antikörper verwendet, sodass für die Blockierung ein Donkey/Esel-Serum zur Verfügung stand.

Als Zweitantikörper dient ein Antikörper, der gegen das Tier gerichtet ist, in dem der erste Antikörper hergestellt wurde. In der vorliegenden Studie wurde als erster Antikörper der Anti-NeuN-Antikörper aus einer Maus verwendet und als zweiter Antikörper Alexa 488 donkey anti mouse, der in einem Esel hergestellt und gegen die Maus gerichtet wurde. Mit Hilfe von DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol) wird der Zellkern zusätzlich visualisiert.

2.5.5 Durchführung der Immunfluoreszenzdoppel-Färbung (frei flottierend)

Jeder sechste Schnitt der 40 µm dicken Schnittserien eines behandelten und unbehandelten Tieres wurde fluoreszierend gefärbt.

Die Färbung wurde in unbeschichteten 12er Wellplatten (Avantor/VWR; Bestellnummer: 734-2778), immer in der gleichen Anordnung der Schnitte (Abbildung 1) durchgeführt.

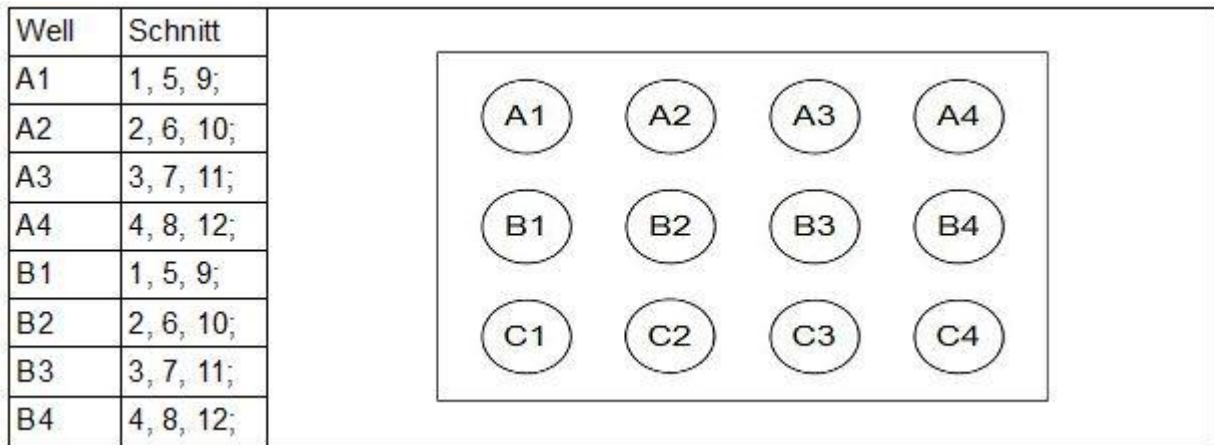


Abbildung 1 zeigt die Anordnung der Schnitte in einer unbeschichteten Wellplatte. In A1 waren der erste, fünfte und neunte Schnitt, in A2 befand sich der zweite, sechste und zehnte Schnitt, in A3 waren der dritte, siebte und elfte Schnitt, in A4 befand sich der vierte, achte und zwölfte Schnitt, in B1 befand sich der erste, fünfte und neunte Schnitt des anderen Tieres.

Zu Beginn wurden die Schnitte vier Mal für je 5 Minuten in 1x PBS auf dem Schüttler gewaschen, um die Gefrierschutz-Lösung und Tissue-Tek-Reste zu entfernen.

Anschließend konnten die Schnitte in je 1000 µl 0,5% Triton X-1000 1x PBS Lösung pro Well für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert werden. Im weiteren Verlauf wurden die Schnitte für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in 1000 µl 10% Esel-Serum in 0,5% Triton X-1000 in 1x PBS pro Well geblockt.

Nach der unspezifischen Blockierung wurden die Schnitte im ersten Antikörper inkubiert. Hierzu haben wir 1000 µl der Lösung pro Well verwendet. Die Lösung bestand aus 10% Esel-Serum in 0,5% Triton X-1000 in 1x PBS, sowie dem Erstantikörper Anti-NeuN im Verhältnis 1:2000. Anschließend wurden die Schnitte eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubiert, gefolgt von 48 weiteren Stunden bei 4 °C auf dem Schüttler im Kühlschrank.

Nach diesen 48 Stunden haben wir die Schnitte drei Mal für je 10 Minuten in 1x PBS gewaschen und anschließend für sechs Stunden mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Schritt wurde bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler und im Dunkeln durchgeführt. Als Zweitantikörper wurde Alexa 488 im Verhältnis 1:500 in 10% Esel-Serum gemeinsam mit 0,5% Triton X-1000 in 1x PBS verwendet, welcher für sechs Stunden inkubiert wurde.

Nach Ablauf von fünf Stunden wurde der Zweitantikörperlösung 100 µl DAPI je Well hinzugefügt und weiter im Dunkeln bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler

inkubiert.

Im letzten Schritt wurden die Schnitte für weitere zehn Minuten unter Lichtschutz bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in 1x PBS gewaschen.

Anschließend haben wir die Schnitte auf Superfrost-Objektträger, welche mit 0,5% Gelatine und 0,05% Chrom III Kaliumsulfat beschichtet waren, aufgezogen, mit "FluorePreserve" oder "FluorSave" eingedeckt und wieder im Dunkeln zum Trocknen für 24 bis 48 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Die Ränder der Objektträger wurden nach dem Trocknen mit durchsichtigem Nagellack versiegelt und anschließend in einer dunklen Objektträgerbox zur Lagerung bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt.

2.6 Auswertung

Mit dieser Arbeit sollen mögliche Cuprizone-induzierte Veränderungen sowohl der weißen als auch der grauen Substanz untersucht werden. Das Augenmerk liegt auf der Untersuchung eines Volumenverlusts des Subcortex sowie des Verlusts von Zellen oder Fasern. Im Subcortex wurden der Thalamus, Hypothalamus und die Basalganglien bestehend aus Globus pallidum und Putamen als zellenreiche Regionen ausgewählt. Die Capsula interna wurde als Vertreter einer faserreichen Region herangezogen. Das Volumen der einzelnen Regionen wurde mit der Cavalieri-Methode bestimmt.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob es zu einem Verlust der NeuN-gefärbten Zellen im Cortex und im Subcortex kommt. Hierzu wurde die Methode der Design-based-Stereology verwendet.

Mit Hilfe dieser Ergebnisse wurde letztlich noch die Zelldichte des Cortex und des Subcortex ermittelt.

Die Schnitte wurden verblindet ausgewertet. Jeweils zehn Schnitte eines behandelten und eines unbehandelten Tieres wurden miteinander gemischt, verblindet, ausgewertet und am Ende nach der Auswertung wieder entblindet.

2.6.1 Prinzip der Cavalieri-Methode

Die Cavalieri-Methode ist ein schnelles, häufig verwendetes und zuverlässiges Verfahren zur Volumenbestimmung von dreidimensionalen Strukturen. Diese Methode benutzt ein gleichbleibendes Raster und ermittelt Punkte in der zweidimensionalen Ebene, welche in den dreidimensionalen Raum hochgerechnet werden. Dieses Verfahren wird sowohl am

Mikroskop als auch an MRI-Bildern angewendet.

2.6.2 Volumenbestimmung

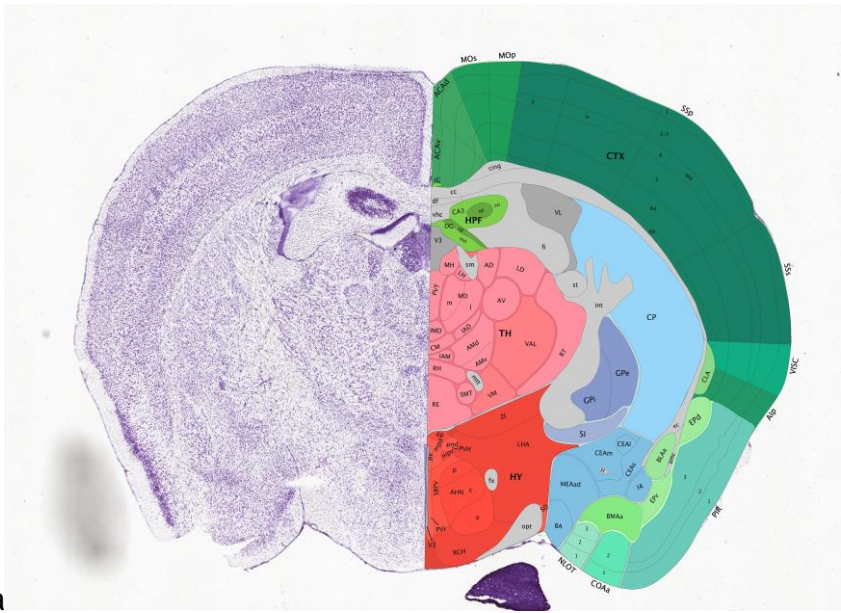
Die Volumenbestimmung wurde durch die Cavalieri-Methode an Nissl-gefärbten Schnitten durchgeführt. Aus einer Serie von Schnitten wurde eine Folge aus jedem dritten Schnitt zwischen Region 260 und 315 zufällig ausgewählt. Pro Tier wurden insgesamt zehn Schnitte ausgewertet.

Diese zehn Schnitte eines Kontrolltieres und die zehn Schnitte eines behandelten Tieres wurden nach der Färbung durch eine dritte Person verblindet.

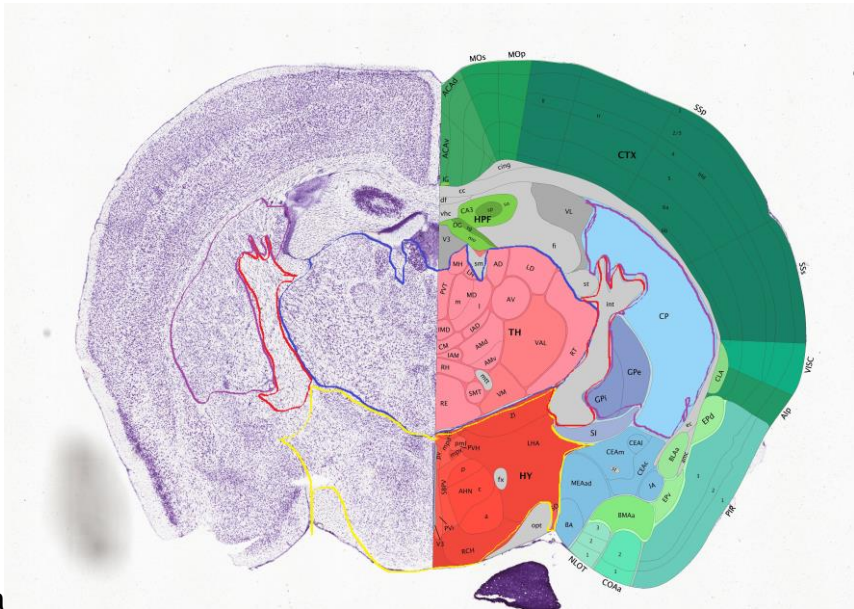
Die Auswertung wurde mit der Computersoftware Stereo Investigator Version 11.07 (MBF Bioscience, Williston, USA) und mit dem Unterprogramm Cavalieri estimator durchgeführt. Als Mikroskop wurde ein Lichtmikroskop der Marke Olympus BX51WI (Olympus, Tokyo, Japan) mit dem Objektiv UPlanApo (4x, N.A.=0.16; Olympus), einer CCD Farbkamera (U-CMAD-2; Olympus) sowie einem beweglichen Objektisch verwendet.

Für die Auswertung sind die Schnitte mit der beschrifteten Seite nach rechts auf den Objektisch gelegt worden. Im 2er-Objektiv wurde der Schnitt in den Fokus gebracht, die ROI durch geschlossene Konturen markiert und anschließend ausgewertet.

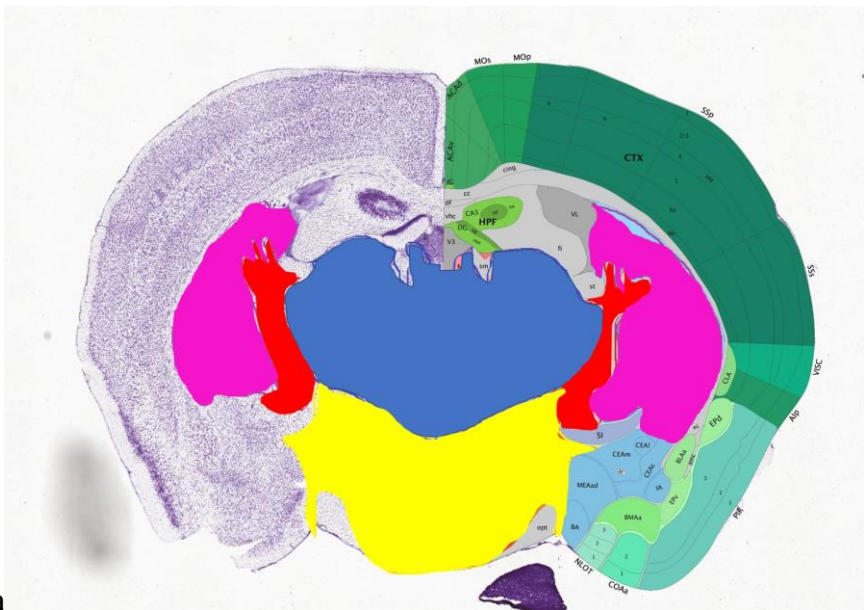
Die Grenze für den Thalamus befand sich zwischen dem dritten Ventrikel, Hippocampus, Fimbrien, Capsula interna und Hypothalamus. Kaudal des Thalamus befindet sich der Hypothalamus, der zusätzlich zum Thalamus noch durch die Capsula interna, N. opticus, Bed nucleus of the accessory olfactory tract (BA), Medial amygdalar nucleus (MEA) und Substantia innominate (SI) abgegrenzt wurde. Die Grenze für die Capsula interna verlief zwischen Thalamus, Hypothalamus, SI, Globus pallidum, Putamen und rechtem oder linkem Ventrikeln. Für die Kontur der Basalganglien, die aus Globus pallidum externus und internus sowie dem Putamen bestehen, wurde die Grenze zwischen Capsula interna, Corpus callosum, Central amygdalar nucleus capsular part (CEAc), Central amygdalar nucleus lateral part (CEAl), Central amygdalar nucleus medial part (CEAm) und SI gezogen (siehe Abbildungen 2-4). Die Konturen zwischen angrenzenden Bereichen haben sich berührt.



1a

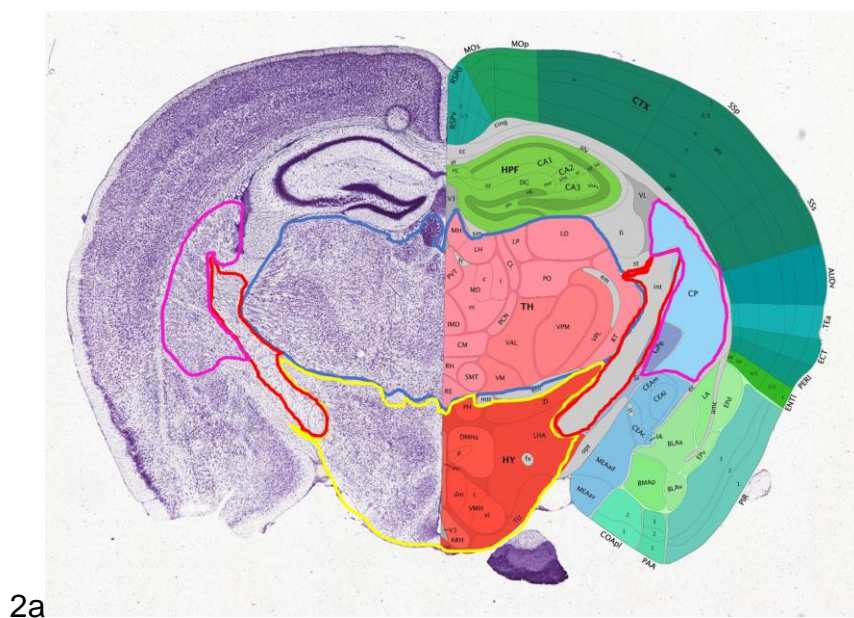
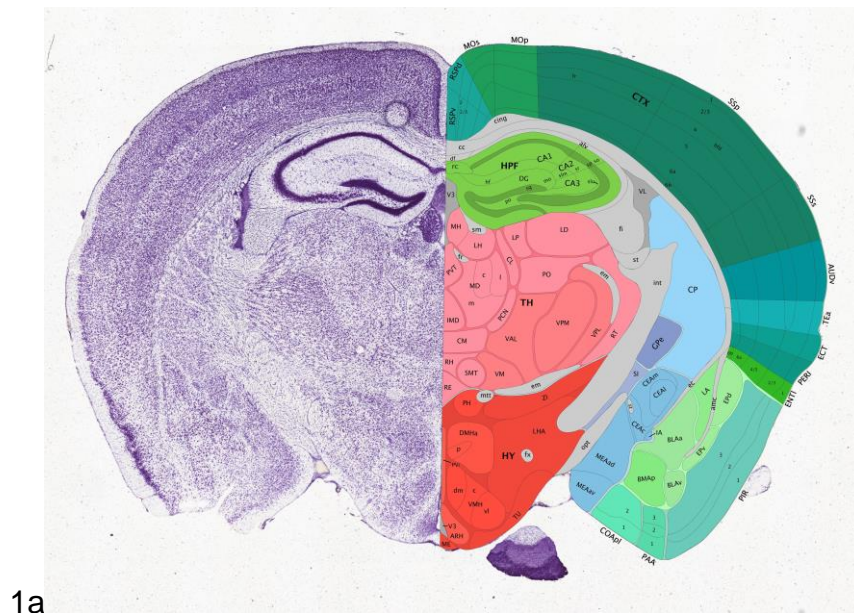


2a



3a

Abbildung 2 zeigt schematisch die Einteilung der einzelnen Regionen anhand von einem Bild aus dem Allen Mouse Brain Atlas. Es handelt sich um das Bild 64/132 aus dem Allen Mouse Brain Atlas. Die Abbildung 1a die Abbildung ohne Markierung. 2a die Abbildung mit Umrandung der einzelnen Regionen. 3a zeigt die einzelnen Regionen mit Farben ausgefüllt. Blau markiert den Thalamus, Gelb den Hypothalamus, Rot die Capsula interna und Lila die Basalganglien. Siehe auch Abbildungsverzeichnis.



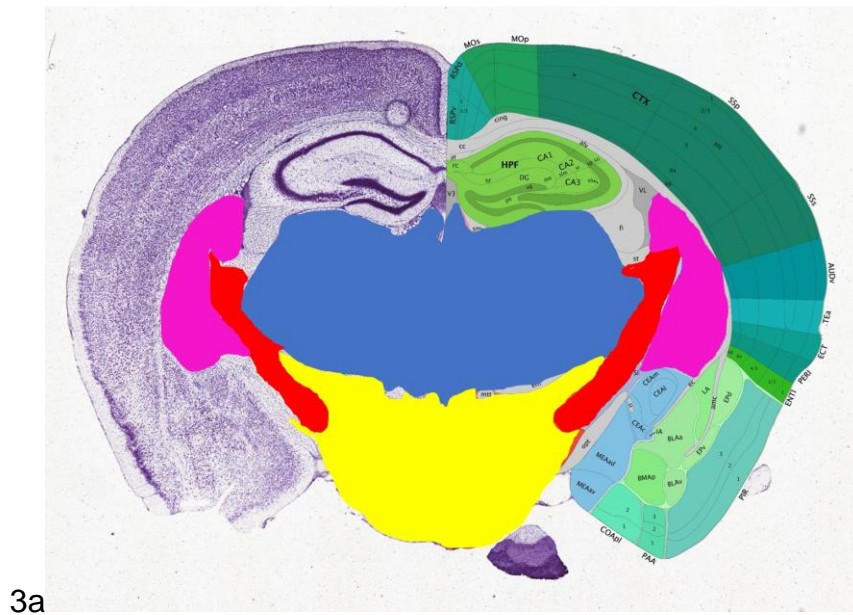


Abbildung 3 zeigt schematisch die Einteilung der einzelnen Regionen anhand von einem Bild aus dem Allen Mouse Brain Atlas. Es handelt sich um das Bild 70/132 aus dem Allen Mouse Brain Atlas. Die Abbildung 1a die Abbildung ohne Markierung. 2a die Abbildung mit Umrandung der einzelnen Regionen. 3a zeigt die einzelnen Regionen mit Farben ausgefüllt. Blau markiert den Thalamus, Gelb den Hypothalamus, Rot die Capsula interna und Lila die Basalganglien. Siehe auch Abbildungsverzeichnis.

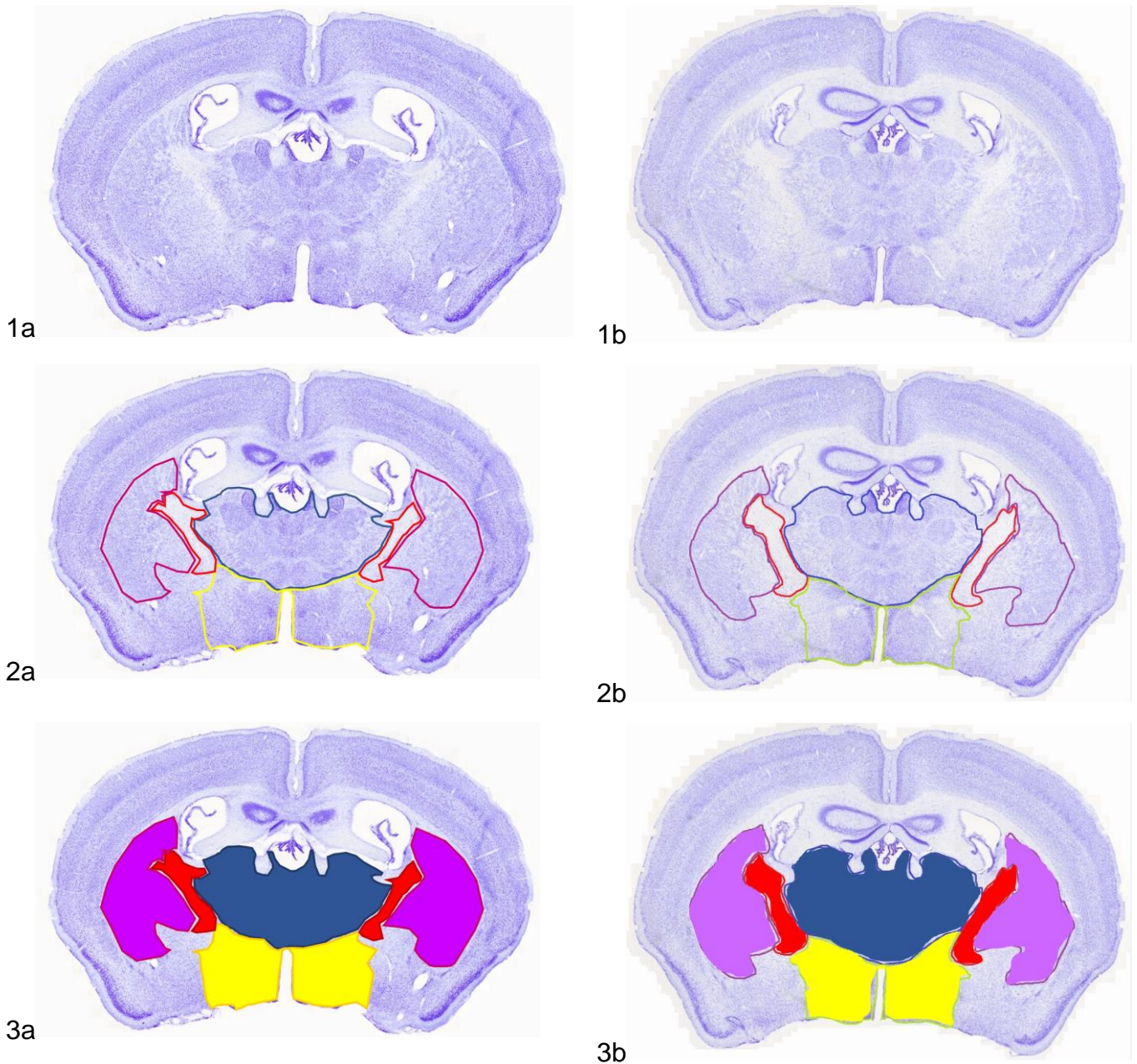


Abbildung 4 zeigt schematisch die Einteilung der einzelnen Regionen am lichtmikroskopischen Schnitt. 1a und 1b zeigen einen repräsentativen Schnitt ohne Markierung. 2a und 2b zeigen den Schnitt mit Umrandung der einzelnen Regionen. 3a und 3b zeigen die einzelnen Regionen mit Farben ausgefüllt. Blau markiert den Thalamus, Gelb den Hypothalamus, Rot die Capsula interna und Lila die Basalganglien.

Für die Auswertung wurden ein Raster (Grid) mit einer Größe von 120 μm und die Schnittdicke (Section Cut Thickness) mit 40 μm festgelegt.

Mit Hilfe des Computerprogramms Cavalieri estimator wurden die einzelnen Punkte des Rasters der definierten ROI gezählt. Zwischen den Konturen befanden sich keine Punkte, da die Konturen sich berührten. Die Anzahl der einzelnen Punkte innerhalb der verschiedenen ROI konnte nach der Auswertung als Exceltabelle exportiert werden.

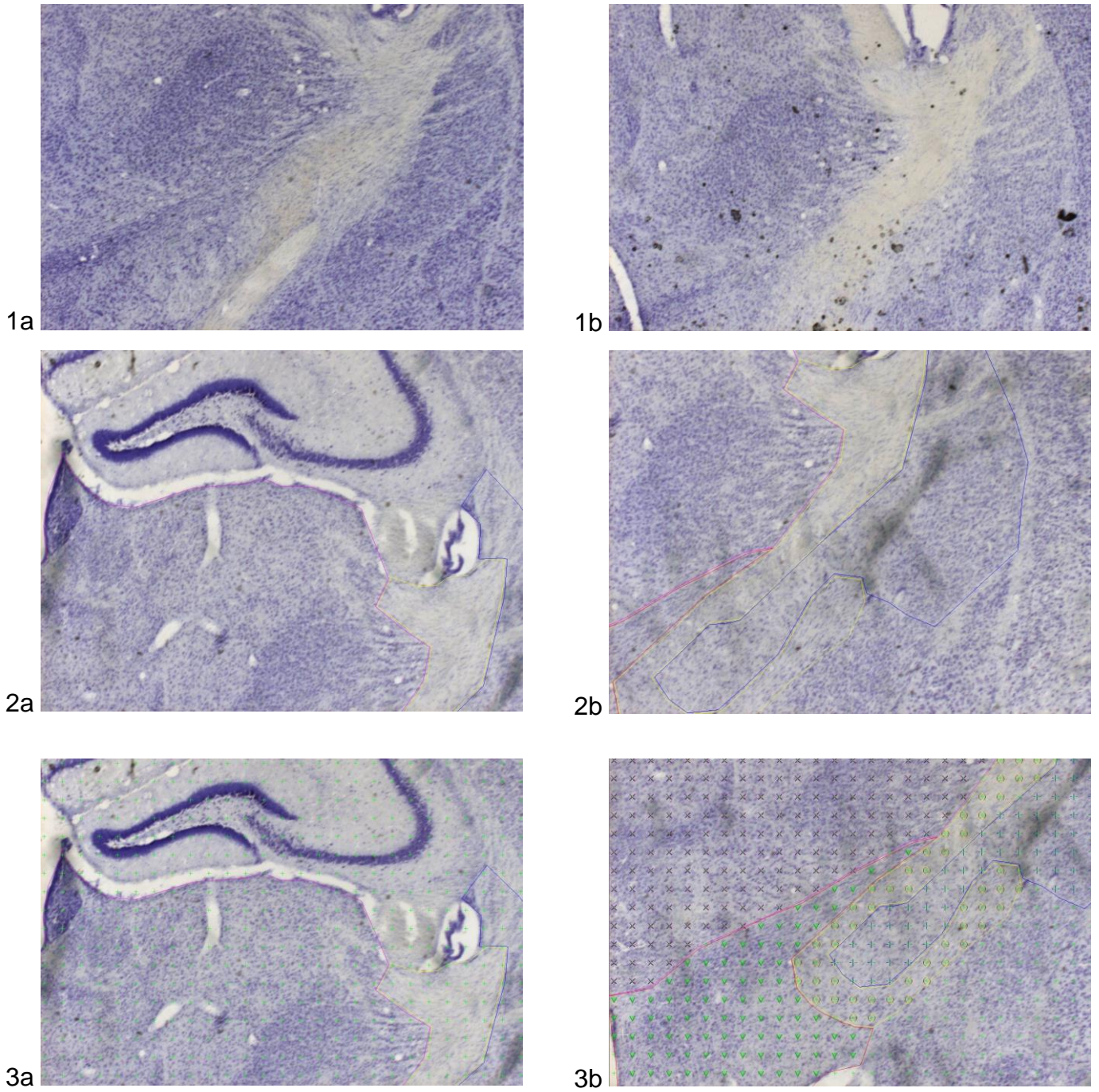


Abbildung 5 zeigt einzelne Schnitte der Nissl-Färbung in originaler Größe unter dem Mikroskop. Abbildung 1a und 1b zeigen Teile der Capsula interna, Thalamus, Hypothalamus, Corpus callosum und Cortex eines Nissl-gefärbten Schnittes. Abbildung 2a und 2b zeigen jeweils durch eine pinke Linie markiert den Thalamus, mit gelb abgegrenzt die Capsula interna, sowie durch blau markiert die Basalganglien. In Abbildung 2b sind zusätzlich noch Teile des Hypothalamus mit einer roten Linie eingezeichnet. Abbildung 3a zeigt das Grid von 120 µm als grüne Kreuze. Abbildung 3b zeigt die einzelnen ROIs mit farbigen Symbolen markiert, wobei blaue Kreuze die Basalganglien, pinke Kreuze den Thalamus, gelbe Kreise die Capsula interna und grüne Dreiecke den Hypothalamus ausfüllen.

Die Schnitte wurden nach der Auswertung entblindet und die Anzahl der gesetzten Marker in eine Ergebnistabelle eingetragen, um das Volumen der ausgewählten Bereiche errechnen zu können.

2.6.3 Prinzip der stereologischen Analyse

Design-based stereologische Verfahren werden verwendet, um eine reproduzierbare quantitative Analyse in einem vorgegebenen Bereich, der sogenannten Region of Interest (ROI) zu ermitteln. Es ist möglich, diese Analyse an dicken Gewebeschnitten im dreidimensionalen Raum durchzuführen. Die ROI kann ein ganzes Organ wie etwa Herz, Gehirn, Lunge und weitere sein. Sie kann sich aber auch nur auf einen Teil innerhalb eines Organs begrenzen wie etwa einen Lungenlappen, eine Herzkammer oder den Thalamus im Gehirn.

Innerhalb der ROI ist es möglich, das Volumen oder auch die Anzahl einer ausgewählten Zellpopulation zu ermitteln, und letztlich kann eine Zelldichte errechnet werden (Kipp et al., 2017).

Um nicht jede einzelne Zelle in der ROI zählen zu müssen, ermittelt man die Zellzahl stichprobenartig. Aus einer Schnittfolge (z.B. 1, 2, 3,n) wird eine Schnittserie bestehend aus z.B. jedem dritten (1, 4, 7, 10,n) oder jedem sechsten (1, 7, 13, 19,n) Schnitt gewählt.

Die gesamte Ermittlung hat systematische und zufällige (systematic and random) Komponenten. Durch diese Komponenten hat jede Zelle die gleiche Wahrscheinlichkeit, erfasst zu werden. In ausgewählten kleinen Bereichen werden die Zellen gezählt und letztlich auf die gesamte ROI hochgerechnet.

Zu Beginn wird auf einer zweidimensionalen Ebene ein Gitternetz über die ROI gelegt. Die Auflösung des Gitternetzes (1100,00 μm x 1100,00 μm) wird systematisch festgelegt und darf während der Zählung nicht geändert werden. Innerhalb dieses Gitternetzes (1100,00 μm x 1100,00 μm) befindet sich immer an der gleichen Stelle der eigentliche Zählbereich (Counting Frame) der eine Größe von 35,00 μm x 35,00 μm umfasst. Der Zählbereich besteht aus drei Ebenen, x und y sowie der Ebene z. Die Ebene z entspricht der definierten Dicke des Schnittes. Um das Risiko einer Fehlzählung auf Grund einer ungeraden Schnittoberfläche zu vermeiden, wird ein Sicherheitsabstand zwischen Oberfläche und Unterkante des Schnittes definiert. Dieser Bereich, in dem keine Zellen gezählt werden, wird als Guard Zone bezeichnet und ebenfalls vor der Zählung festgelegt. In der vorliegenden Auswertung wurden Zellen in einem Bereich über 15 μm gezählt.

Der Zählbereich ist durch zwei Arten von Linien begrenzt, die Einschlusslinie (inclusion line) und die Ausschlusslinie (exclusion line). Um die Zellen zu zählen und somit die absolute Zellzahl zu ermitteln, muss ein eindeutiges Zählkriterium festgelegt werden. Hier bietet sich etwa die Oberfläche des Zellkerns oder ein anderes Kriterium an, das in jeder Zelle nur einmal vorkommt. Die Zelle darf nur dann gezählt werden, wenn das Zählkriterium zum ersten Mal im Fokus ist und innerhalb des Zählbereichs liegt (Kipp et al., 2017). Befindet sich das Zählkriterium genau auf der Einschlusslinie, ein Teil der Zelle aber außerhalb des Zählbereiches, darf die Zelle mitgezählt werden, da das Zählkriterium ausschlaggebend ist. Liegt das Zählkriterium auf der Ausschlusslinie, die Zelle selbst mit einem großen Teil im Zählbereich, darf die Zelle nicht gezählt werden, da die Bedingungen nicht erfüllt sind.

2.6.4 Schätzung der absoluten Anzahl von Nervenzellen

Die Schätzung von Nervenzellen wurde an fluoreszierend NeuN-gefärbten 40 µm Schnitten durchgeführt. Aus einer Serie von Schnitten wurde eine Folge aus jedem sechsten Schnitt zwischen Region 215 bis 325 zufällig ausgewählt. Pro Tier wurden insgesamt zehn Schnitte ausgewertet.

Die Schnittserien wurden mit dem Programm Stereo Investigator Version 11.07 (MBF Bioscience, Williston, USA) und mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) eingescannt. Das Fluoreszenzmikroskop verfügte über einen beweglichen Objektisch (MBF Bioscience), eine spezielle Spinnscheibe (DSU; Olympus), das UPlanSApo Objektiv (20x, N.A.=0.75; Olympus), einen Alexa Fluor 488 Filter mit einer Erregung von 498 nm und einer Ausstrahlung von 520 nm (Chroma, Bellows Falls, USA) sowie eine Retiga 2000R CCD Kamera (Q-Imaging, Surrey, Canada).

Die Auswertung wurde mit der Software Stereo Investigator Version 11.07 und dem Unterprogramm Optical Fractionator Workflow durchgeführt. Die Einstellungen zur Auswertung sind in Tabelle 6 gezeigt.

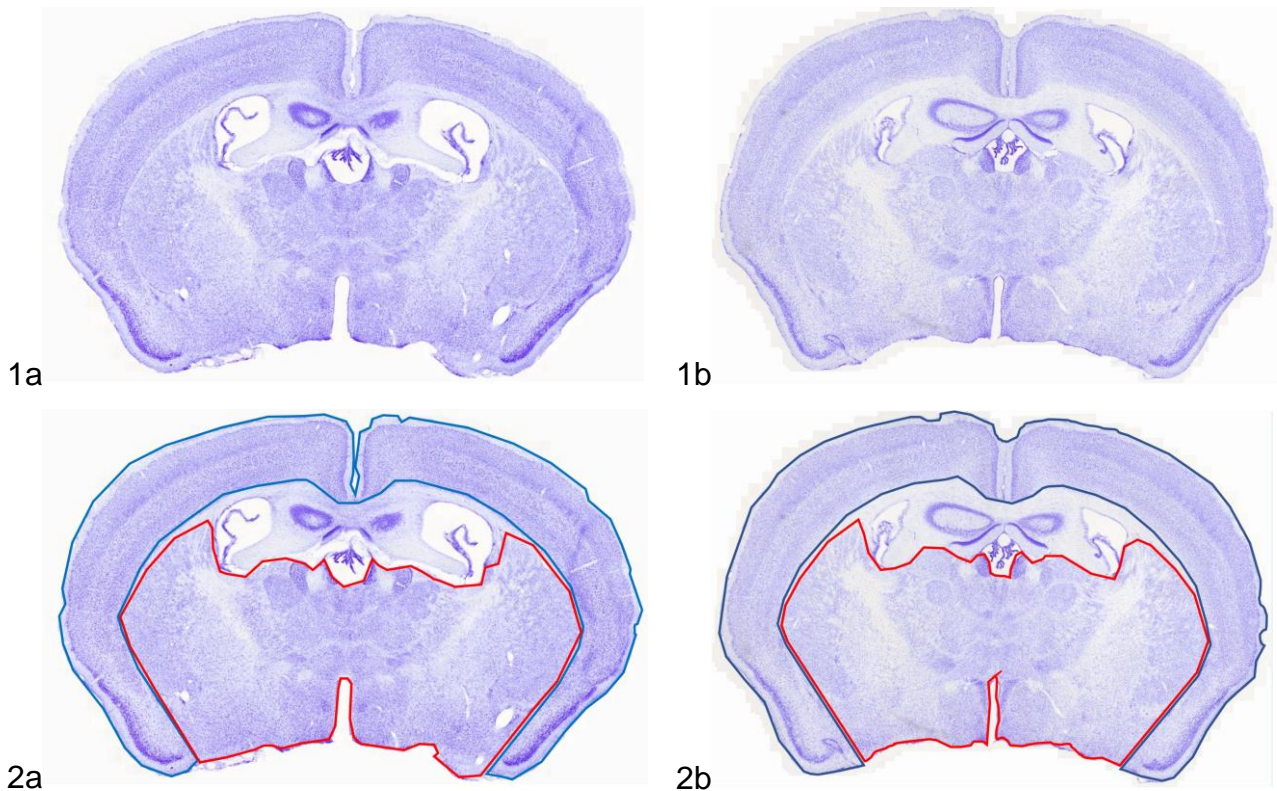
Name	Größe
Counting Frame X	35,00 µm
Counting Frame Y	35,00 µm
Grid Size X	1100,00 µm
Grid Size Y	1100,00 µm

Section Cut Thickness	40,00 μm
Guard Zone Type	Fixed Distance
Guard Zone Height	4,00 μm
Height	15,00 μm

Die Tabelle 6 zeigt die Einstellungen in der Software Stereo Investigator Version 11.07, welche zur Ermittlung der Zellzahl verwendet wurden.

Die Grenzen der ROI des Cortex waren die Cortex-Oberfläche sowie der obere Rand des Corpus callosum und eine gerade Linie von der Aufzweigung des Corpus callosum bis zur zellenarmen Region der Lamina 1 des piriformen Cortex.

Der ROI des Subcortex wurde durch eine Begrenzungslinie entlang des unteren Randes des Corpus callosum und einer geraden Linie, die von der Aufzweigung des Corpus callosum bis zur zellenarmen Region der Lamina 1 des piriformen Cortex reichte, markiert (siehe Abbildung 6, sowie Abbildung 2-4 bezüglich piriformer Cortex (PIR) . Die Ventrikel, Hippocampi und die Fimbrien wurden bei der Auswertung des Subcortex nicht zur ROI gezählt.



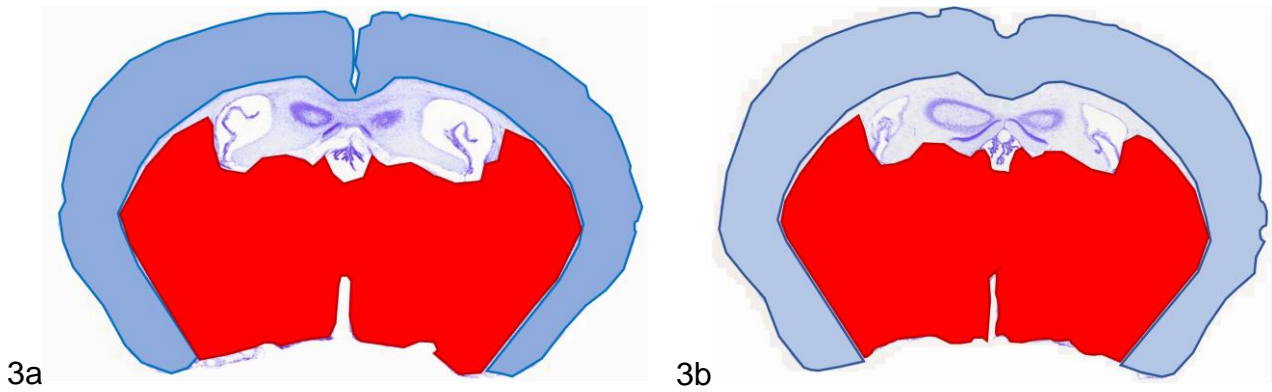
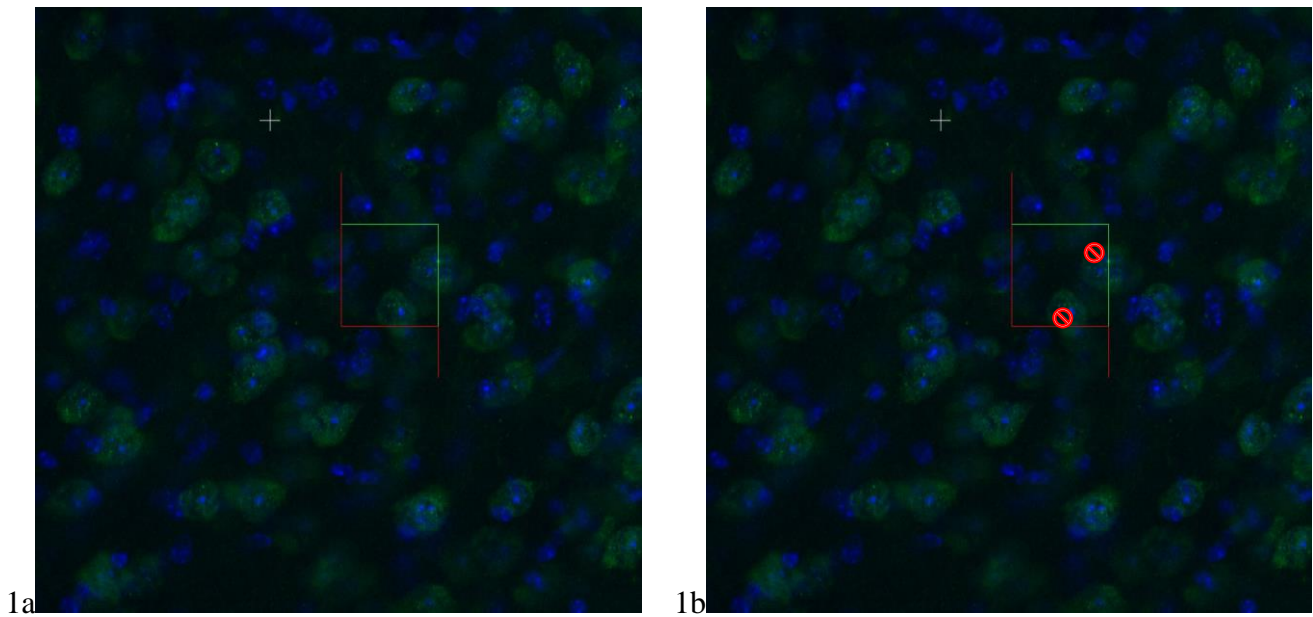


Abbildung 6 zeigt die ROI der Schnitte. Bilder 1a und 1b zeigen einen Schnitt ohne Markierung. Bilder 2a und 2b zeigen den Schnitt mit Umrandung der einzelnen Bereiche, Cortex und Subcortex. Bilder 3a und 3b zeigen die einzelnen Bereiche ausgefüllt.

Die NeuN-gefärbte Zelle wurde nur dann gezählt, wenn der rechte obere Rand der Zelle im Zählbereich war. Abbildung 7 zeigt NeuN-gefärbte Schnitte der Auswertung mit Zellen, die gezählt wurden, sowie Zellen, die nicht gezählt werden durften.



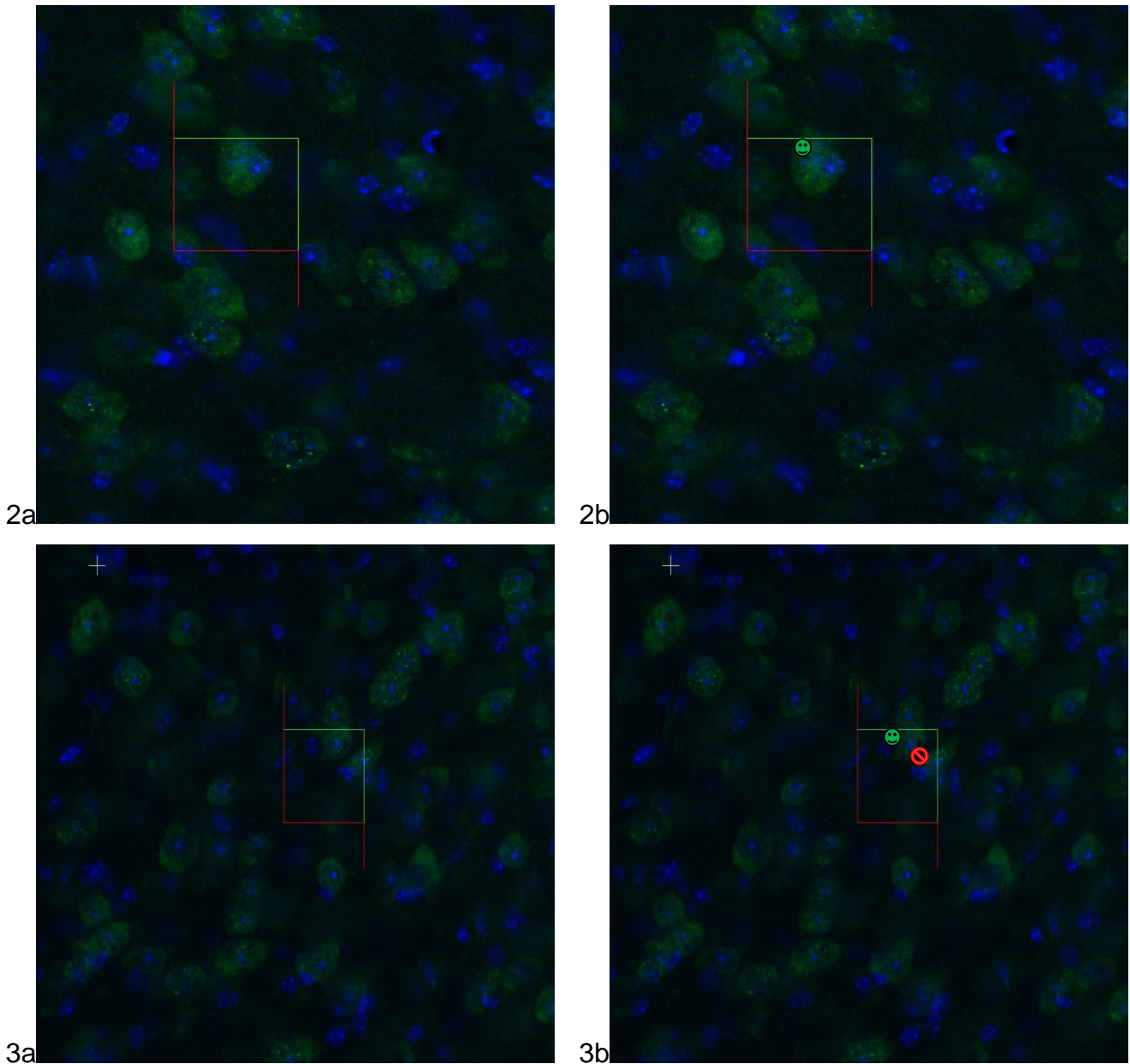


Abbildung 7 zeigt verschiedene Abbildungen zum Zählbereich der NeuN-gefärbten Zellen jeweils mit der grünen Einschluss- und der roten Ausschlusslinie. Bild 1a zeigt einen Zählbereich mit zwei Zellen, die sich im Fokus befinden. Bild 1b zeigt die mit einem grünen Smilie markierte Zelle, welche gezählt wird, die mit einem roten Verbotsschild wird nicht gezählt, da das Zählkriterium außerhalb der Einschlusslinie ist. Bild 2a zeigt eine sich im Fokus befindende Zelle, die in Bild 2b durch einen grünen Smilie markiert ist und somit gezählt werden darf. Bild 3a zeigt zwei Zellen, welche sich im Fokus befinden. In Bild 3b wird die mit dem grünen Smilie markierte Zelle gezählt, hingegen die mit dem roten Verbotsschild darf nicht gezählt werden.

2.6.5 Quantifizierung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde an den fluoreszierend NeuN-gefärbten Schnitten ermittelt. Aus einer Serie von Schnitten wurde eine Folge aus jedem sechsten Schnitt zwischen Region 260

und 315 zufällig ausgewählt. Pro Tier wurden insgesamt zehn Schnitte ausgewertet.

Die Zelldichte wurde aus den Daten der quantitativen Analyse der NeuN-gefärbten Schnitte errechnet. Hierfür wurde die Formel $(\text{Zelldichte ((Zellzahl/mm}^3)) = \text{Zellzahl/Volumen ((mm}^3))$ verwendet.

Zur Errechnung des Volumens diente die Formel $(\text{Volumen} = \text{Flächen ((}\mu\text{m}^2)) \times \text{Höhe ((}\mu\text{m))} \times n$.

Die Software Stereo Investigator Version 11.07 und das Unterprogramm Optical Fractionator Workflow ermitteln automatisch für jede ROI von jedem Schnitt die Total Area (μm^2), die für die Berechnung des Volumens nötig ist. Die Summe aus allen ROI wurde sowohl mit dem Mittelwert der gemessenen Schnittdicke als auch mit n multipliziert. Die Zahl n berechnet die Schnittfolge der Schnittserien mit ein. In diesem Fall war n=6, da jeder sechste Schnitt genommen wurde.

2.6.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit der statistischen Grafik- und Analysesoftware GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., Version 5.04; San Diego, USA) durchgeführt.

Es wurden jeweils Mittelwert und Standardfehler (Mean und SEM) der Daten erhoben. Um die Normalverteilung zu ermitteln, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Mit Hilfe des Student-T-Tests konnten die normalverteilten Werte auf ihre Signifikanz hin überprüft sowie Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gezeigt werden. Der P-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Volumenbestimmung

3.1.1 Cuprizone induziert einen Volumenverlust subkortikaler Bereiche

Hochstrasser und Kollegen konnten in ihrer Studie 2019 zeigen, dass Tiere, die zwölf Wochen lang Futter erhielten, das mit 0,25 % haltigen Cuprizone versetzt war, einen Volumenverlust im ausgewerteten Subcortex sowie des Cortex aufweisen (Hochstrasser et al, 2019).

Die Gefrierschnitte dieser Tiere und auch die Gefrierschnitte einer neuen Versuchsreihe mit demselben Aufbau wurden Nissl-gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Der

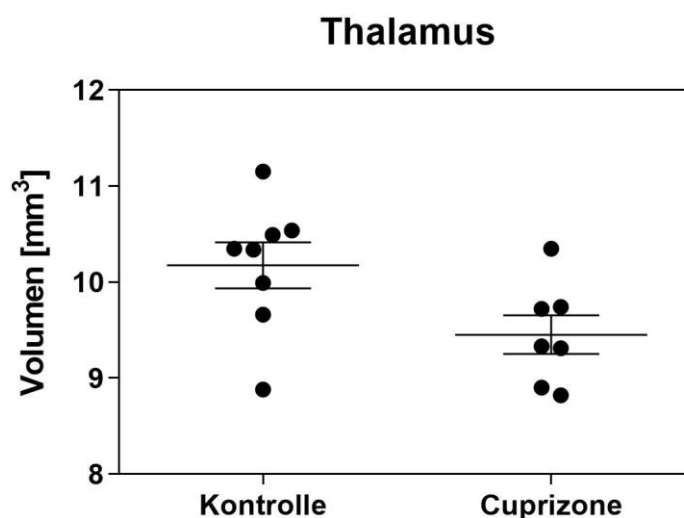
Volumenverlust des Subcortex war im Vergleich zum Cortex deutlicher ausgeprägt und wurde daher nochmal genauer in einzelnen Bereichen untersucht.

Hierbei wurden Thalamus, Hypothalamus, Basalganglien und Capsula interna zwischen der Region 260 bis 315 zur Auswertung herangezogen. Diese Bereiche konnten in den Nissl-gefärbten Schnitten am besten von den anderen Bereichen des Gehirns abgegrenzt werden, um eine reproduzierbare Analyse zu gewährleisten. Des Weiteren wurden diese Bereiche ausgewählt, da sie eine wichtige Rolle im Bereich der MS-Forschung einnehmen.

3.1.1.1 Cuprizone induziert keinen Volumenverlust des Thalamus

Um Unterschiede im Volumen des Thalamus zu bestimmen, wurden die Nissl-gefärbten Schnitte von sieben Tieren, die zwölf Wochen lang mit 0,25%-haltigem Cuprizone-versetztem Futter gefüttert wurden, sowie von acht Kontrolltieren lichtmikroskopisch untersucht. Die Analyse dieser Gehirnschnitte aus der Region 260 bis 315 ergab keinen signifikanten Volumenverlust des Thalamus im Vergleich der beiden Gruppen. Ermittelt wurde das Volumen jeweils durch die Cavalieri-Methode.

In der Kontrollgruppe (n=8) zeigte sich ein mittleres Volumen von $10,18 \text{ mm}^3 \pm 0,24 \text{ mm}^3$ (Mean \pm SEM). Bei den Cuprizonetieren (n=7) wurde ein mittleres Volumen von $9,45 \text{ mm}^3 \pm 0,20 \text{ mm}^3$ (Mean \pm SEM) ermittelt.



Die Abbildung 8 zeigt das Volumen in mm^3 des Thalamus der Kontrolltiere (n=8) sowie der Cuprizonetiere (n=7) als Punkte geordnet. Ebenso zeigt die Tabelle den Mittelwert (Mean) sowie den jeweiligen

Standardfehler (SEM). Die einzelnen Werte können ergänzend der Tabelle 7 entnommen werden.

Das ermittelte Volumen des Thalamus je Tier ist in der Tabelle 7 gelistet.

Kontrolltiere	Volumen Thalamus mm ³
KO 1	10,49 mm ³
KO 2	9,66 mm ³
KO 3	10,35 mm ³
KO 4	9,99 mm ³
KO 5	10,54 mm ³
KO 6	10,34 mm ³
KO 7	8,88 mm ³
KO 8	11,15 mm ³
Summe:	81,40 mm ³
Mean:	10,18 mm ³
SEM:	0,24 mm ³
Cuprizonetiere	Volumen Thalamus mm ³
Cup 1	9,72 mm ³
Cup 2	10,35 mm ³
Cup 3	9,74 mm ³
Cup 4	9,33 mm ³
Cup 5	8,90 mm ³
Cup 6	8,82 mm ²
Cup 7	9,31 mm ³
Summe:	66,17 mm ³
Mean:	9,45 mm ³
SEM:	0,20 mm ³

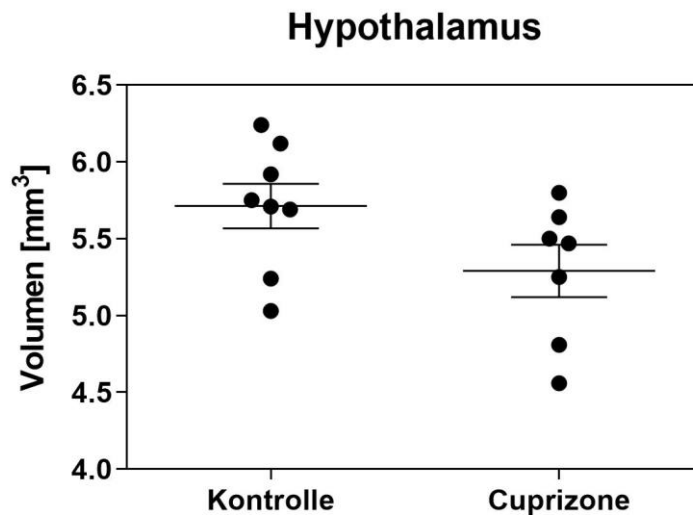
Tabelle 7: Die Tabelle zeigt das Volumen des Thalamus der Kontrolltiere (n=8) sowie der Cuprizonetiere (n=7), Mittelwert (Mean) und Standardfehler (SEM).

3.1.1.2 Cuprizone induziert keinen Volumenverlust im Hypothalamus

Die Nissl-gefärbten Schnitte von sieben Tieren, die zwölf Wochen lang mit 0,25%-haltigem Cuprizone-versetztem Futter gefüttert wurden, sowie von acht Kontrolltieren wurden

lichtmikroskopisch hinsichtlich eines Volumenverlust im Hypothalamus untersucht. In den Regionen 260 bis 315 konnte kein signifikanter Volumenverlust des Hypothalamus der Cuprizonetiere gegenüber den Kontrolltieren evaluiert werden.

Die Kontrolltiere (n=8) weisen ein mittleres Volumen von $5,71 \text{ mm}^3 \pm 0,15 \text{ mm}^3$ (Mean \pm SEM) auf. Im Vergleich dazu zeigen die Cuprizonetiere (n=7) ein mittleres Volumen von $5,29 \text{ mm}^3 \pm 0,17 \text{ mm}^3$ (Mean \pm SEM).



Die Abbildung 9 zeigt das Volumen in mm^3 des Hypothalamus der Kontrolltiere (n=8) sowie der Cuprizonetiere (n=7) als Punkte geordnet. Ebenso zeigt die Tabelle den Mittelwert (Mean) sowie den jeweiligen Standardfehler (SEM). Die einzelnen Werte können zusätzlich noch der Tabelle 8 entnommen werden.

In der Tabelle 8 ist das Volumen des Hypothalamus der Kontrolltiere sowie der Cuprizonetiere gelistet.

Kontrolltiere	Volumen Hypothalamus mm^3
KO 1	6,12 mm^3
KO 2	5,69 mm^3
KO 3	5,24 mm^3
KO 4	5,92 mm^3
KO 5	5,71 mm^3
KO 6	6,24 mm^3
KO 7	5,03 mm^3

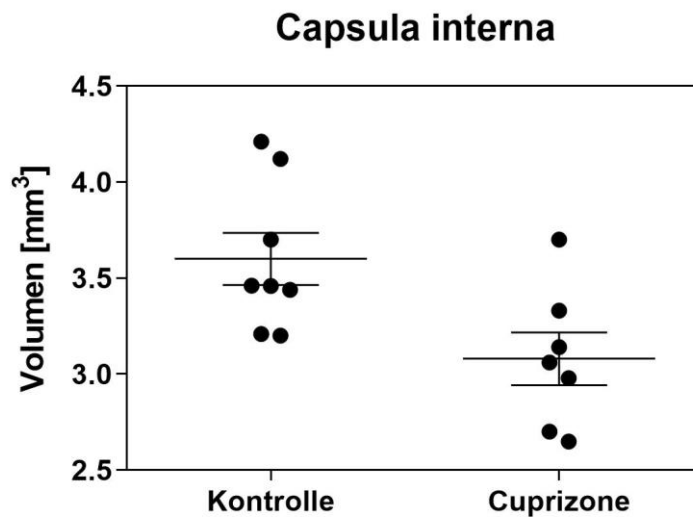
KO 8	5,75 mm ³
Summe:	45,70 mm ³
Mean:	5,71 mm ³
SEM:	0,15 mm ³
Cuprizonetiere	Volumen Hypothalamus mm ³
Cup 1	5,50 mm ³
Cup 2	5,80 mm ³
Cup 3	5,25 mm ³
Cup 4	5,64 mm ³
Cup 5	4,81 mm ³
Cup 6	4,56 mm ²
Cup 7	5,47 mm ³
Summe:	37,08 mm ³
Mean:	5,29 mm ³
SEM:	0,17 mm ³

Tabelle 8: Die Tabelle zeigt das Volumen des Hypothalamus der Kontrolltiere (n=8) sowie der Cuprizonetiere (n=7), Mittelwert (Mean) und Standardfehler (SEM).

3.1.1.3 Cuprizone induziert einen signifikanten Volumenverlust der Capsula interna

Lichtmikroskopisch untersucht wurde auch das Volumen der Capsula interna an den Nissl-gefärbten Präparaten der acht Kontrolltiere sowie der sieben Cuprizonetiere. Hier konnte ein signifikanter Volumenverlust ($p=0,02$) in den Regionen 260 bis 315 der Cuprizonetiere im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden.

Bei den Kontrolltieren (n=8) zeigte sich ein mittleres Volumen von $3,60 \text{ mm}^3 \pm 0,14 \text{ mm}^3$ (Mean \pm SEM). Die Cuprizonetiere (n=7) hatten ein mittleres Volumen von $3,08 \text{ mm}^3 \pm 0,14 \text{ mm}^3$ (Mean \pm SEM).



Die Abbildung 10 zeigt das Volumen in mm³ der Capsula interna der Kontrolltiere (n=8) sowie der Cuprizonetiere (n=7) als Punkte geordnet. Ebenso zeigt die Tabelle den Mittelwert (Mean) sowie den jeweiligen Standardfehler (SEM). Die einzelnen Werte können ergänzend der Tabelle 9 entnommen werden.

In der Tabelle 9 ist das Volumen der Capsula interna der Kontrolltiere sowie der Cuprizonetiere gelistet.

Kontrolltiere	Volumen Capsula interna mm ³
KO 1	3,46 mm ³
KO 2	3,44 mm ³
KO 3	3,70 mm ³
KO 4	3,20 mm ³
KO 5	4,21 mm ³
KO 6	4,12 mm ³
KO 7	3,21 mm ³
KO 8	3,46 mm ³
Summe:	28,80 mm ³
Mean:	3,60 mm ³
SEM:	0,14 mm ³
Cuprizonetiere	Volumen Capsula interna mm ³
Cup 1	3,33 mm ³
Cup 2	2,65 mm ³

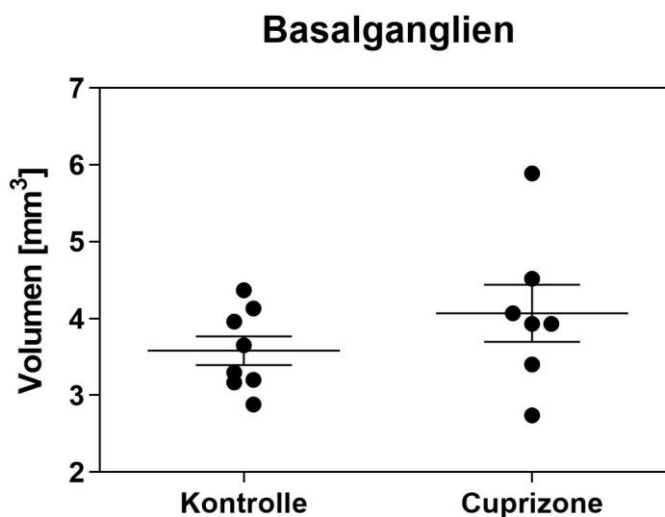
Cup 3	3,14 mm ³
Cup 4	3,06 mm ³
Cup 5	3,70 mm ³
Cup 6	2,70 mm ²
Cup 7	2,98 mm ³
Summe:	21,56 mm ³
Mean:	3,08 mm ³
SEM:	0,14 mm ³

Tabelle 9: Die Tabelle zeigt das Volumen der Capsula interna der Kontrolltiere (n=8) sowie der Cuprizonetiere (n=7), Mittelwert (Mean) und Standardfehler (SEM).

3.1.2 Cuprizone induziert keinen Volumenverlust in den Basalganglien

Im Gegensatz zu dem Volumenverlust der Capsula interna ließ sich auch bei den Basalganglien, bestehend aus Globus pallidum und Putamen, in den Nissl-gefärbten Schnitten kein Volumenverlust zeigen.

Während die Kontrollgruppe (n=8) ein mittleres Volumen der Basalganglien von 3,58 mm³ +- 0,19 mm³ (Mean +- SEM) aufwies, zeigten die Cuprizonetiere (n=7) bei den Basalganglien ein mittleres Volumen von 4,07 mm³ +- 0,37 mm³ (Mean +- SEM).



Die Abbildung 11 zeigt das Volumen in mm³ der Basalganglien der Kontrolltiere (n=8) sowie der Cuprizonetiere (n=7) als Punkte geordnet. Ebenso zeigt die Tabelle den Mittelwert (Mean) sowie den jeweiligen Standardfehler (SEM). Die einzelnen Werte können ergänzend der Tabelle 10 entnommen

werden.

In der Tabelle 10 ist das Volumen der Basalganglien der Kontrolltiere sowie der Cuprizonetiere gelistet.

Kontrolltiere	Volumen Basalganglien mm ³
KO 1	3,20 mm ³
KO 2	4,13 mm ³
KO 3	3,17 mm ³
KO 4	2,88 mm ³
KO 5	3,65 mm ³
KO 6	3,30 mm ³
KO 7	396 mm ³
KO 8	4,37 mm ³
Summe:	28,66 mm ³
Mean:	3,58 mm ³
SEM:	0,19 mm ³
Cuprizonetiere	Volumen Basalganglien mm ³
Cup 1	4,07 mm ³
Cup 2	2,74 mm ³
Cup 3	3,40 mm ³
Cup 4	3,93 mm ³
Cup 5	5,89 mm ³
Cup 6	3,93 mm ²
Cup 7	4,52 mm ³
Summe:	28,49 mm ³
Mean:	4,07 mm ³
SEM:	0,37 mm ³

Tabelle 10: Die Tabelle zeigt das Volumen der Basalganglien der Kontrolltiere (n=8), sowie der Cuprizonetiere (n=7), Mittelwert (Mean) und Standardfehler (SEM).

3.2. Schätzung der absoluten Anzahl von Nervenzellen im Cortex und

Subcortex

Die fluoreszierend NeuN-gefärbten Schnitte von sechs Tieren, die zwölf Wochen lang mit 0,25%-haltigem Cuprizon-versetztem Futter gefüttert wurden, sowie die sieben Kontrolltiere wurden hinsichtlich ihrer absoluten Zellzahl untersucht. Mit Hilfe der design-based stereologischen Analyse konnte die Zellzahl der NeuN-gefärbten Zellen des Cortex sowie des Subcortex geschätzt werden.

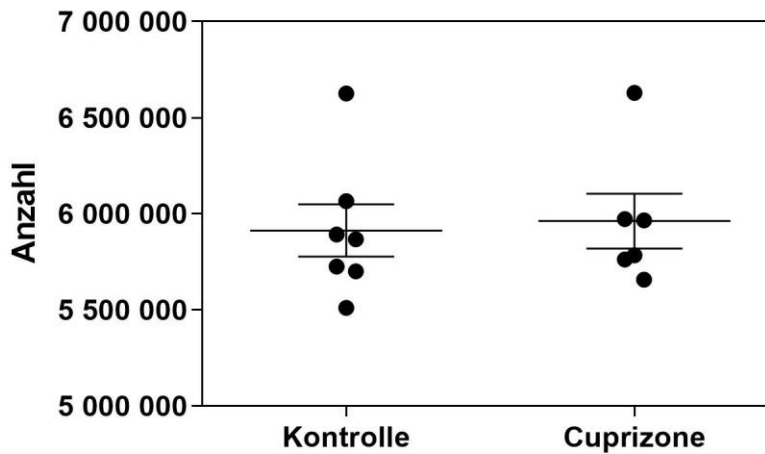
Im Cortex der Cuprizonetiere (n=6) zeigt sich eine mittlere Anzahl von 5 961 852,74 Nervenzellen \pm 142 594,72 Nervenzellen in einem mittleren Volumen von 23,72 mm³ \pm 0,38 mm³. Im Vergleich dazu ergab sich bei den Kontrolltieren (n=7) eine mittlere Anzahl von 5 912 792,35 Nervenzellen \pm 135 751,82 Nervenzellen in einem mittleren Volumen von 24,84 mm³ \pm 0,58 mm³ (Mean \pm SEM).

Der Subcortex der Cuprizonetiere (n=6) weist eine mittlere Anzahl von 4 960 499,54 Nervenzellen \pm 216 395,03 Nervenzellen in einem mittleren Volumen von 29,13 mm³ \pm 0,91 mm³ auf. Im Subcortex der Kontrolltiere (n=7) konnte eine mittlere Anzahl von 5 384 687,67 Nervenzellen \pm 204 420,06 Nervenzellen in einem mittleren Volumen von 32,00 mm³ \pm 1,11 mm³ geschätzt werden.

Die einzelnen Werte des Cortex der Kontroll- sowie der Cuprizonetiere sind als Punktgrafik in der Abbildung 12 dargestellt. Ebenso kann der Punktgrafik der Mean sowie der SEM entnommen werden. Die einzelnen Werte je Tier und Gruppe sind in der Tabelle 11 angegeben.

Für den Subcortex sind die einzelnen Werte der Kontroll- sowie der Cuprizonetiere als Punktgrafik in der Abbildung 13 dargestellt. Ebenso kann der Punktgrafik der Mean sowie der SEM entnommen werden. Die einzelnen Werte je Tier und Gruppe sind in der Tabelle 12 angegeben.

Schätzung der NeuN-Nervenzellen des Cortex



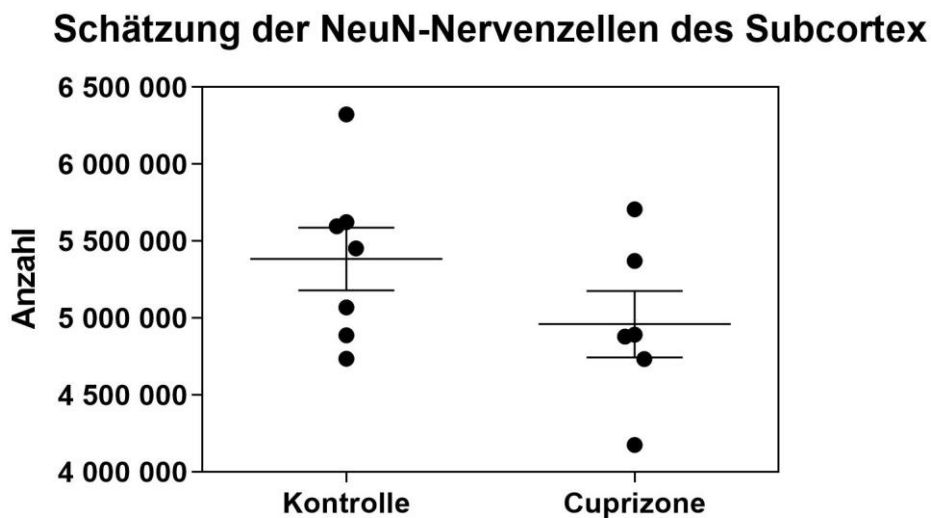
Die Abbildung 12 zeigt die ermittelte Schätzung über die absolute Anzahl der NeuN-gefärbten Nervenzellen des Cortex. Die einzelnen Punkte repräsentieren jeweils den Wert eines Tieres der Kontroll- (n=7) sowie der Cuprizonetiere (n=6). Ebenfalls angeführt der Mittelwert (Mean) sowie der Standardfehler (SEM) der einzelnen Gruppen. Die einzelnen Werte können ergänzend der Tabelle 11 entnommen werden.

In der Tabelle 11 sind die absolute Anzahl an Nervenzellen sowie das ermittelte Volumen des Cortex der Kontrolltiere und der Cuprizonetiere gelistet.

Kontrolltiere	Absolute Anzahl Nervenzellen Cortex	Ermitteltes Cortex-Volumen
KO 2	5 701 638,53	24,87 mm ³
KO 3	5 891 919,67	24,68 mm ³
KO 4	5 868 213,55	24,55 mm ³
KO 5	6 065 685,55	25,35 mm ³
KO 6	5 511 278,37	23,75 mm ³
KO 7	6 625 110,53	22,86 mm ³
KO 8	5 725 700,24	27,81 mm ³
Summe:	41 389 546,44	173,87 mm ³
Mean:	5 912 792,35	24,84 mm ³
SEM:	135 751,82	0,58 mm ³
Cuprizonetiere	Absolute Anzahl Nervenzellen Cortex	Ermitteltes Cortex-Volumen

Cup 2	5 762 918,86	23,94 mm ³
Cup 3	5 965 448,16	23,69 mm ³
Cup 4	5 657 387,10	25,20 mm ³
Cup 5	5 971 769,80	24,07 mm ³
Cup 6	6 629 654,20	22,70 mm ³
Cup 7	5 783 938,29	22,71 mm ³
Summe:	35 771 116,41	142,31 mm ³
Mean:	5 961 852,74	23,72 mm ³
SEM:	142 594,72	0,38 mm ³

Tabelle 11: Die Tabelle zeigt die ermittelte Schätzung der absoluten Anzahl der Nervenzellen des Cortex der Kontrolltiere (n=7) sowie der Cuprizonetiere (n=6), Mittelwert (Mean) und Standardfehler (SEM) der einzelnen Tiere.



Die Abbildung 13 zeigt die ermittelte Schätzung über die absolute Anzahl der NeuN-gefärbten Nervenzellen des Subcortex. Die einzelnen Punkte repräsentieren jeweils den Wert eines Tieres der Kontroll- (n=7) sowie der Cuprizonetiere (n=6). Ebenfalls angeführt der Mittelwert (Mean) sowie der Standardfehler (SEM) der einzelnen Gruppen. Die einzelnen Werte können ergänzend der Tabelle 12 entnommen werden.

In der Tabelle 12 sind die absolute Anzahl an Nervenzellen sowie das ermittelte Volumen des Subcortex der Kontrolltiere und der Cuprizonetiere gelistet.

Kontrolltiere	Absolute Anzahl Nervenzellen Subcortex	Ermitteltes Subcortex-Volumen
KO 2	5 624 988,73	34,83 mm ³
KO 3	4 889 466,78	29,61 mm ³
KO 4	5 069 001,14	34,33 mm ³
KO 5	5 596 264,82	32,40 mm ³
KO 6	6 324 200,82	30,77 mm ³
KO 7	4 736 325,22	27,27 mm ³
KO 8	5 452 566,20	34,83 mm ³
Summe:	37 692 813,72	224,01 mm ³
Mean:	5 384 687,67	32,00 mm ³
SEM:	204 420,06	1,11 mm ³
Cuprizonetiere	Absolute Zellzahl Subcortex	Ermitteltes Subcortex-Volumen
Cup 2	4 879 668,24	29,52 mm ³
Cup 3	4 734 033,63	29,97 mm ³
Cup 4	4 893 220,24	30,89 mm ³
Cup 5	5 707 407,02	31,24 mm ³
Cup 6	5 372 360,49	25,24 mm ³
Cup 7	4 176 307,59	27,93 mm ³
Summe:	2 976 2997,21	174,79 mm ³
Mean:	4 960 499,54	29,13 mm ³
SEM:	216 395,03	0,91 mm ³

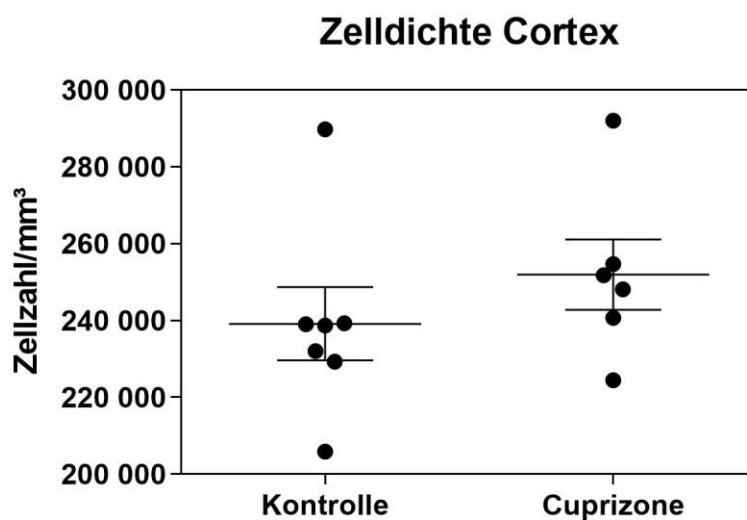
Tabelle 12: Die Tabelle zeigt die ermittelte geschätzte Zellzahl des Subcortex der Kontrolltiere (n=7) sowie der Cuprizonetiere (n=6), Mittelwert (Mean) und Standardfehler (SEM) der einzelnen Tiere.

3.3. Quantifizierung der Zelldichte des Cortex und des Subcortex

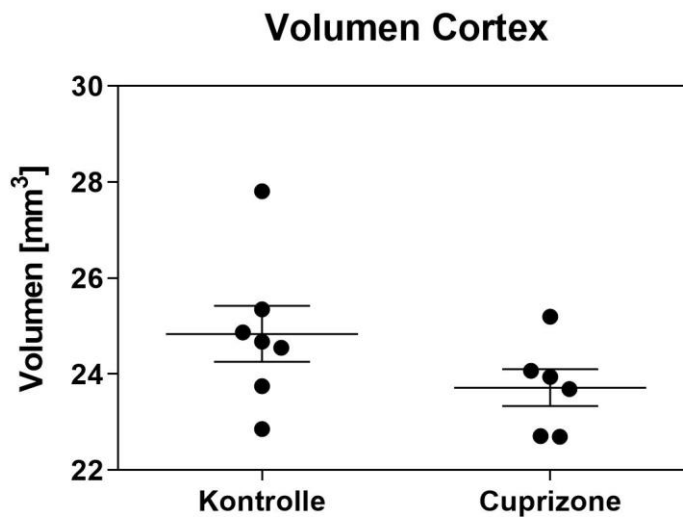
Die fluoreszierend NeuN-gefärbten Schnitte von sechs Tieren, die zwölf Wochen lang mit 0,25%-haltigem Cuprizone-versetztem Futter gefüttert wurden, sowie der sieben Kontrolltiere wurden hinsichtlich ihrer Zelldichte untersucht. Nach Ermittlung der Schätzung über die absolute Anzahl von NeuN-gefärbten Nervenzellen des Cortex sowie des Subcortex wurde das Volumen derselben Schnitte bestimmt. Sowohl Volumen als auch Zellzahl wurden mit Hilfe der design-based Stereology ermittelt.

Im Cortex der Kontrolltiere (n=7) zeigt sich eine mittlere Zelldichte von 239 150,21 Zellen/mm³ +- 9 538,84 Zellen/mm³ in einem mittleren Gesamtvolumen von 24,84 mm³ +- 0,58 mm³ (Mean +- SEM). Im Vergleich dazu ergab sich bei den Cuprizonetieren (n=6) eine mittlere Zelldichte von 251 979,68 Zellen/mm³ +- 9 147,54 Zellen/mm³ in einem mittleren Gesamtvolumen von 23,72 mm³ +- 0,38 mm³

Im Subcortex der Kontrolltiere (n=7) konnte eine mittlere Zelldichte von 168 570,40 Zellen/mm³ +- 4 852,00 Zellen/mm³ in einem mittleren Gesamtvolumen von 32,00 mm³ +- 1,11 mm³ gezeigt werden. Der Subcortex der Cuprizonetiere (n=6) weist eine mittlere Zelldichte von 171 172,82 Zellen/mm³ +- 9 679,60 Zellen/mm³ in einem mittleren Gesamtvolumen von 29,13 mm³ +- 0,91 mm³ auf.



Die Abbildung 14 zeigt die ermittelte Zelldichte in Zellzahl/mm³ des Cortex der Kontrolltiere (n=7) sowie der Cuprizonetiere (n=6) als Punkte. Ebenso sind der Mittelwert (Mean) sowie der Standardfehler (SEM) angegeben. Absolute Werte des Volumens der Kontrolltiere (n=7) sowie der Cuprizonetiere (n=6) können der Tabelle 13 entnommen werden.



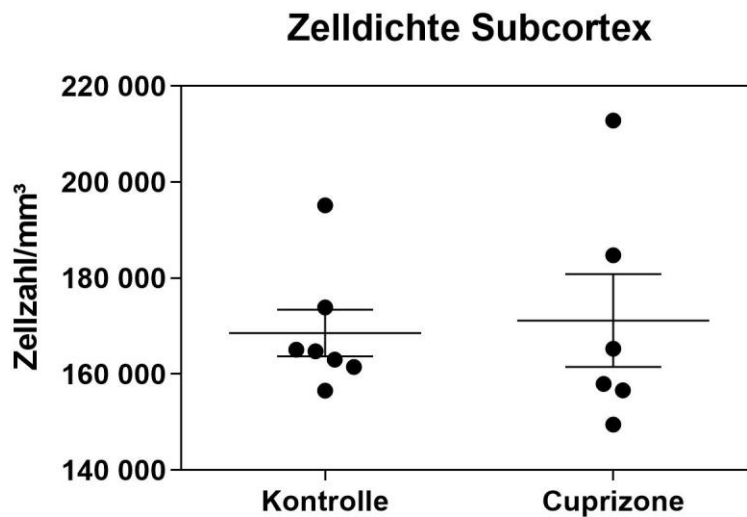
Die Abbildung 15 zeigt das ermittelte Volumen in mm³ des Cortex der Kontrolltiere (n=7) sowie der Cuprizonetiere (n=6) als Punkte. Ebenso sind der Mittelwert (Mean) sowie der Standardfehler (SEM) angegeben. Absolute Werte des Volumens der Kontrolltiere (n=7) sowie der Cuprizonetiere (n=6) können der Tabelle 13 entnommen werden.

In der Tabelle 13 sind die Zelldichte der NeuN-Nervenzellen je mm³ sowie das ermittelte Volumen des Cortex der Kontrolltiere und der Cuprizonetiere gelistet.

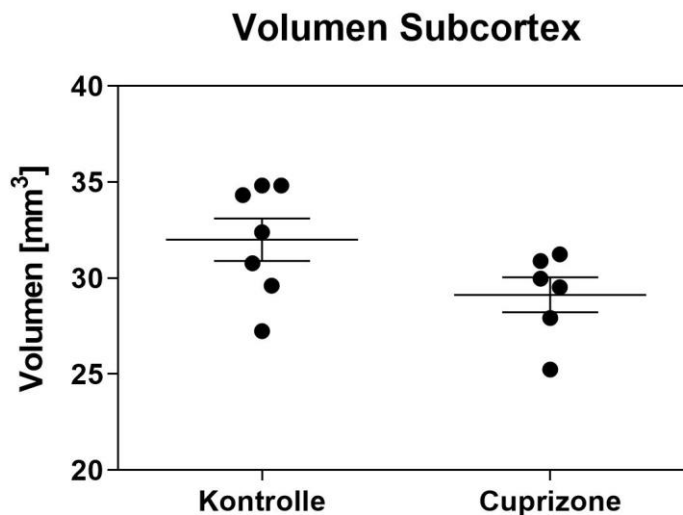
Kontrolltiere	Zelldichte Cortex [Zellzahl/mm ³]	Ermitteltes Cortex-Volumen
KO 2	229 257,68	24,87 mm ³
KO 3	238 732,56	24,68 mm ³
KO 4	239 031,10	24,55 mm ³
KO 5	239 277,54	25,35 mm ³
KO 6	232 053,83	23,75 mm ³
KO 7	289 812,36	22,86 mm ³
KO 8	205 886,38	27,81 mm ³
Summe:	1 674 051,45	173,87 mm ³
Mean:	239 150,21	24,84 mm ³
SEM:	9 538,84	0,58 mm ³
Cuprizonetiere	Zelldichte Cortex [Zellzahl/mm ³]	Ermitteltes Cortex-Volumen
Cup 2	240 723,43	23,94 mm ³
Cup 3	251 812,92	23,69 mm ³

Cup 4	224 499,49	25,20 mm ³
Cup 5	248 100,12	24,07 mm ³
Cup 6	292 055,25	22,70 mm ³
Cup 7	254 686,85	22,71 mm ³
Summe:	1 511 878,05	142,31 mm ³
Mean:	251 979,68	23,72 mm ³
SEM:	9 147,54	0,38 mm ³

Tabelle 13 beinhaltet die einzelnen Werte der Zelldichte in Zellzahl/mm³ sowie Volumen des Cortex von Kontrolltieren und Cuprizonetieren.



Die Abbildung 16 zeigt die ermittelte Zelldichte in Zellzahl/mm³ des Subcortex der Kontrolltiere (n=7) sowie der Cuprizonetiere (n=6) als Punkte. Ebenso sind der Mittelwert (Mean) sowie der Standardfehler (SEM) angegeben. Absolute Werte des Volumens der Kontrolltiere (n=7) sowie der Cuprizonetiere (n=6) können der Tabelle 14 entnommen werden.



Die Abbildung 17 zeigt das ermittelte Volumen in mm³ des Subcortex der Kontrolltiere (n=7) sowie der Cuprizonetiere (n=6) als Punkte. Ebenso sind der Mittelwert (Mean) sowie der Standardfehler (SEM) angegeben. Absolute Werte des Volumens der Kontrolltiere (n=7) sowie der Cuprizonetiere (n=6) können der Tabelle 14 entnommen werden.

In der Tabelle 13 sind die Zelldichte der NeuN-Nervenzellen je mm³ sowie das ermittelte Volumen des Subcortex der Kontrolltiere und der Cuprizonetiere gelistet.

Kontrolltiere	Zelldichte Subcortex [Zellzahl/mm ³]	Ermitteltes Subcortex-Volumen
KO 2	161 498,38	34,83 mm ³
KO 3	165 128,90	29,61 mm ³
KO 4	163 013,83	34,33 mm ³
KO 5	195 191,38	32,40 mm ³
KO 6	164 738,42	30,77 mm ³
KO 7	173 873,91	27,24 mm ³
KO 8	156 547,98	34,83 mm ³
Summe:	1 179 992,81	224,01 mm ³
Mean:	168 570,40	32,00 mm ³
SEM:	4 852,00	1,11 mm ³
Cuprizonetiere	Zelldichte Subcortex [Zellzahl/mm ³]	Ermitteltes Subcortex-Volumen
Cup 2	165 300,41	29,52 mm ³
Cup 3	157 959,08	29,97 mm ³

Cup 4	184 765,52	30,89 mm ³
Cup 5	156 633,17	31,24 mm ³
Cup 6	212 851,05	25,24 mm ³
Cup 7	149 527,66	27,93 mm ³
Summe:	1 027 036,90	174,79 mm ³
Mean:	171 172,82	29,13 mm ³
SEM:	9 679,60	0,91 mm ³

Tabelle 14 beinhaltet die einzelnen Werte zu Zelldichte sowie Volumen des Subcortex von Kontrolltieren (n=7) und Cuprizonetieren (n=6).

4. Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit wurde ein möglicher Volumenverlust verbunden mit einem Verlust von Neuronen in Thalamus, Hypothalamus, Basalganglien und Capsula interna im chronischen Cuprizone-Modell bei C57BL/6J Mäusen untersucht.

4.1 Das Cuprizone-Modell

Zur Untersuchung von De- und Remyelinisierung der grauen und der weißen Substanz im Versuchstier erwies sich das Cuprizone-Modell als zuverlässig (Matsushima & Morell, 2001; Gudi et al., 2009).

Nach aktuellem Stand der Forschung führt Cuprizone zu einer toxischen Demyelinisierung im zentralen Nervensystem. Dem liegt eine Apoptose der reifen Oligodendrozyten zu Grunde. Dieser Apoptose folgt eine Mikroglia-Aktivierung und Astrogliose. Der exakte Mechanismus aufgrund von Cuprizone ist bis heute noch nicht vollständig geklärt, jedoch kann gesagt werden, dass nicht nur Oligodendrozyten eine wichtige Rolle spielen, sondern auch einzelne Bestandteile wie Mitochondrien involviert sind (Varhaug et al., 2019).

Im ersten Schritt dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von Cuprizone auf das Volumen von grauer sowie weißer Substanz untersucht. Hierbei wurde das Volumen von unterschiedlichen Bereichen gemessen, ohne jedoch den genauen Pathomechanismus, der letztlich zur Demyelinisierung führt, näher zu beleuchten. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Auswirkung von Cuprizone auf die Anzahl von Nervenzellen untersucht. Cuprizone als neurotoxische Substanz wurde aufgrund seiner Auswirkungen auf De- und Remyelinisierung und der damit verbundenen Volumenveränderungen im Gehirn der

Versuchstiere ausgewählt. Als Versuchstiere dienten C57BL/6J Mäuse, die ein besseres Ansprechen auf Cuprizone haben als zum Beispiel andere Nagetiere wie Wistar- Ratten oder Meerschweinchen (Love, 1988; Elsworth and Howell, 1973). Um die Mortalität und die damit verbundenen Ausfälle der Tiere möglichst gering zu halten, wurde der Versuch mit Tieren im Alter von acht Wochen und einem Körpergewicht von 19-21 g gestartet. Das Ausmaß der Demyelinisierung hängt auch vom Gewicht der Mäuse ab. Bei Mäusen mit geringerem Körpergewicht ist es stärker ausgeprägt als bei solchen mit vermehrtem Körpergewicht (Leopold et al., 2019). Wir verwendeten bei unserem Versuch sowohl männliche als auch weibliche Tiere. Ein möglicher Unterschied im Ausmaß der Demyelinisierung zwischen den Geschlechtern wurde allerdings nicht untersucht.

Viele Studien werden nur mit männlichen Mäusen durchgeführt (Mohammadi-Rad et al., 2019; Zhang et al., 2020; Zhen et al., 2017; Mason et al., 2004; Hiremath et al., 1998), obwohl bis jetzt noch unklar ist, ob es geschlechtliche Unterschiede in der Ausprägung der Demyelinisierung gibt. Matsushima und Morell konnten in ihrer Studie keine geschlechtlichen Unterschiede feststellen (Matsushima & Morell, 2001). Bei der Erkrankung am Menschen zeigen sich jedoch durchaus geschlechtliche Unterschiede. So sind Frauen zwei- bis dreimal häufiger betroffen als Männer (Stys et al., 2012).

Um eine ausreichende Demyelinisierung verbunden mit einer geringen Mortalität zu erreichen, sind nicht nur Alter und Gewicht der Mäuse von Bedeutung, sondern auch die Konzentration und die Dauer der Fütterung von Cuprizone. In diesem Versuch wurde eine Konzentration von 0,25% über einen Zeitraum von zwölf Wochen gefüttert. Dies führte zu einer chronischen Demyelinisierung.

Bei einer Cuprizonekonzentration von 0,6% sind die Mortalität sowie ein Gewichtsverlust der Tiere erhöht (Hiremath et al., 1998). Ebenso spielt die Art der Verabreichung von Cuprizone eine wesentliche Rolle in der Ausprägung der Demyelinisierung. Die Tiere erhielten Normalfutter mit Cuprizone versetzt. Möchte man sichergehen, dass jede Maus eine auf ihr Körpergewicht abgestimmte Dosis erhält, so empfiehlt sich die Verabreichung mittels oraler Sonde (Zhen et al., 2017).

Nach einer vierwöchigen Gabe von Cuprizone weist das Corpus callosum bereits eine gleichmäßige Demyelinisierung auf, die nach zwei weiteren Wochen spontan remyelinisiert. Bei zwölfwöchiger Fütterung kommt es zu einem Wechsel aus De- und Remyelinisierung, die zu chronischen Läsionen führen (Mason et al., 2001). Dutta und Kollegen konnten in ihrer Studie 2013 einen Verlust von 95% des Myelins im Hippocampus nach einer zwölfwöchigen Gabe von Cuprizone und Rapamycin zeigen (Dutta et al.,

2013).

4.2 Vorbereitung und Histologie

Bei der Durchführung von Tierversuchen ist auf eine tiergerechte Haltung sowie auf standardisierte, reproduzierbare Bedingungen zu achten. Vorab sollten das Ziel des Versuches sowie die daraus resultierenden ethischen Richtlinien festgelegt sein.

Eine der schwersten Aufgaben neben dem Töten der Tiere ist es, die Gehirne am Kryostaten exakt auszurichten, um eine Vergleichbarkeit beider Gehirnhälften zu gewährleisten. Jedes Gehirn sollte in exakt gleich dicke Schnitte, mit gleicher Ausrichtung geschnitten werden, um eine Reproduzierbarkeit und insbesondere Vergleichbarkeit der einzelnen Gehirne zu ermöglichen.

Die verwendeten histochemischen und immunhistochemischen Färbungen sind etablierte Methoden, die vorab durch Probefärbungen sowie eine Verdünnungsreihe von unterschiedlicher Konzentration der Antikörper getestet wurden. Die Färbungen sind mit größter Sorgfalt, exakten Konzentrationen und unter Einhaltung der Inkubationszeiten durchgeführt worden. Bei fluoreszierenden Antikörpern ist zusätzlich auf eine schnelle Verarbeitung und einen ausreichenden Lichtschutz zu achten. Die Färbungen wurden anhand von Protokollen durchgeführt und dokumentiert.

Die Nissl-Färbung wurde ausgewählt, da sie eine effiziente und günstige Methode ist, um zellenreiche Bereiche im Gehirn anzufärben. Die Methode färbt RNA und DNA blau ein, welche vermehrt in Zellkernen sowie Ribosomen vorkommen. Dadurch werden Zellkörper sowie Dendriten besser sichtbar und können von umliegenden Bereichen, die reich an Axonen sind, besser abgegrenzt werden (Gomes, 2019). In den Nissl-Schnitten war es durch die Nissl-Färbung möglich, das Volumen von Thalamus, Hypothalamus, Basalganglien sowie Capsula interna zu ermitteln. Die Grenzen der untersuchten Bereiche in jeder Region wurden mit Hilfe des Allen Mouse Brain Atlas für jeden Schnitt gewissenhaft eingezeichnet. Die einzelnen Bereiche konnten anhand der Größe der Zellen sowie der Dichte und Intensität der Färbung voneinander unterschieden werden. Dies ist nicht immer ganz einfach und bedarf größter Sorgfalt. Mit Hilfe der Nissl-Färbung konnten wir eine signifikante Volumenreduktion der Capsula interna bei den Cuprizonetieren zeigen. Diese Färbung erwies sich für uns als eine geeignete und reproduzierbare

Methode.

Die NeuN-Färbung ist eine Methode, die neuronale nukleäre Proteine in fast allen Neuronen im ZNS von Säugetieren reproduzierbar und zuverlässig anfärbt. Neuronale nukleäre Proteine sind in den Zellkernen sowie im umliegenden Zytoplasma der Zellkerne fast aller Neuronen zu finden. Diese Färbung wurde durch Gusel'nikova und Kollegen 2015 ausgewählt, um pathologische Veränderungen in Neuronen zu zeigen. Sie dient schon seit über 20 Jahren als wichtiger Marker, um Veränderungen in Neuronen von gesundem, als auch pathologischem Gewebe zu zeigen (Gusel'nikova et al., 2015). Wir haben diese Methode ausgewählt, um ebenfalls eine reproduzierbare Aussage über die Anzahl von NeuN-positiven Neuronen im Gehirn von Mäusen zu treffen. Wir erhofften uns einen Unterschied in der NeuN-gefärbten Zellzahl der Cuprizonetiere im Vergleich zu den gesunden Kontrollen zeigen zu können.

4.3 Cavalieri-Methode

Die Cavalieri-Methode ist eine der wichtigsten Methoden der letzten Jahre, um schnell, präzise und reproduzierbar das Volumen einer anatomischen Struktur zu ermitteln. Sie zählt zu den stereologischen Methoden, durch die anhand von gezählten Punkten in einem zuvor definierten Raster letztlich das Volumen errechnet werden kann (Taman et al., 2020). Die Cavalieri-Methode wird auch als Goldstandard zur Volumenermittlung in MRI-Studien herangezogen (Karaca et al., 2020). Poorna Pillutla und Kollegen konnten 2019 in ihrer Studie zeigen, dass es im ermittelten Volumen der Stria vascularis der menschlichen Hörschnecke keinen Unterschied zwischen der Cavalieri-Methode und einer anderen Punkte-zähl-Methode gibt. Wie Poorna Pillutla haben auch wir das Volumen an 40 µm dicken Schnitten ermittelt (Poorna Pillutla et al., 2019). Owjard und Kollegen verwendeten in ihrer Studie 2020 ebenfalls die Cavalieri-Methode zur Ermittlung des Volumens von Hippocampus, Striatum und Cortex im Rattengehirn (Owjard et al., 2020).

Alper und Kollegen ermittelten 2006 mit Hilfe der Cavalieri-Methode das Gehirnvolumen anhand von MRI-Bildern von MS-Patienten und gesunden Probanden (Alper et al., 2006). Auch in einer zweiten Studie verwendeten Alper und Kollegen 2006 die Cavalieri-Methode, um das Hirnstammvolumen zu ermitteln (Alper et al., 2006).

Wir haben diese Methode ausgewählt, um schnell genaue und reproduzierbare Daten zu bekommen.

Die Auswertungen sind exakt und gleichbleibend durchgeführt worden. Die Grenzen zwischen den einzelnen Bereichen wurden mit Hilfe des Allen Mouse Brain Atlas für jeden einzelnen Schnitt festgelegt. Hierbei wurden Größe, optische Dichte, Intensität der Färbung und Anordnung der einzelnen Zellen beachtet, um die Bereiche besser voneinander unterscheiden zu können.

Die Auswertung der einzelnen Schnitte, die zu diesem Zeitpunkt verblindet waren, muss sehr sorgfältig immer wieder auf die gleiche Art und Weise durchgeführt werden. Sehr leicht schleichen sich Fehler ein, sodass es sich empfiehlt, die verwendete Methode durch eine zweite oder dritte Person überprüfen zu lassen.

4.4 Volumenverlust und Hirnatrophie bei MS-Patienten

Atrophie des Gehirns sowie des Rückenmarks scheinen bereits in frühen Stadien der MS aufzutreten (Minagar et al., 2004). Die Atrophie der grauen Substanz hat eine wichtige klinische Relevanz, jedoch sind die Ursachen noch zu wenig verstanden (Fisher et al., 2008). Im Vergleich zu gesunden Probanden zeigen Patienten, die an einer schubförmigen MS leiden, einen starken Verlust an grauer Substanz Thalamus, Nucleus caudatus, Corpora mammilaria, Gyrus parahippocampalis, Hippocampus, Insula sowie im frontalen, temporalen, occipitalen und parietalen Cortex (Duan et al., 2012).

Neben Atrophie der grauen Substanz kommt es auch zur Atrophie der weißen Substanz, jedoch in geringerem Ausmaß (Eshaghi et al., 2018). Erst kürzlich konnten Heidari und Kollegen in einer Studie 2020 ein signifikant kleineres Volumen der linken Gehirnhälfte, des Kleinhirns, der Seitenventrikel, des Hirnstamms, des Corpus callosum und der weißen Substanz von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigen. Dieses Volumen wurde mittels Cavalieri-Methode anhand von MRI-Bildern untersucht (Heidari et al., 2020). Hingegen konnten Mesaros und Kollegen in ihrer Studie 2008 an pädiatrischen MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden keine Veränderung des durch MRI ermittelten Volumens der gesamten grauen und weißen Substanz sowie des intrakraniellen Volumens feststellen (Mesaros et al., 2008). Alper und Kollegen verwendeten 2006 die Cavalieri-Methode, um das Gehirnvolumen von Patienten, die an der schubförmigen und der sekundär progredienten MS litten, mit dem Gehirnvolumen von gesunden Probanden zu vergleichen. Hier ergab sich ein signifikant vermindertes Gehirnvolumen der MS-Patienten gegenüber den Probanden (Alper et al., 2006). In einer weiteren Studie konnten Alper und Kollegen 2006 auch eine Verminderung des Hirnstammvolumens von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachweisen.

Für diese Studie wurden MRI-Bilder mittels Cavalieri-Methode von an der schubförmigen und an der sekundär progredienten MS leidenden Patienten mit gesunden Probanden verglichen (Alper et al., 2006).

Bagnato und Kollegen bezeichneten kürzlich in einer Studie Hirnatrophie als einen wichtigen Biomarker für Neurodegeneration, betonten aber, dass es zwar verschiedene Methoden gibt, um diese Atrophie nachzuweisen, jedoch noch keine exakten Techniken, um mögliche Mechanismen aufzuspüren (Bagnato et al., 2020). Zum Beispiel können MRI-Verfahren genutzt werden, um diese Atrophie aufzuzeigen und sie im Krankheitsverlauf weiter zu beobachten (Chard et al., 2002). Besteht aber bereits eine Atrophie, kann es manchmal zu spät für eine therapeutische Intervention sein und die kognitiven und körperlichen Fähigkeiten können schon beeinträchtigt sein (Bagnato et al., 2020). Daher ist es wichtig, die exakten Mechanismen hinter einer Atrophie zu klären und passende Screening-Methoden zu ermitteln.

4.4.1 Signifikanter Volumenverlust der Capsula interna

Die Capsula interna des Menschen ist eine wichtige Faserverbindung, die kortikale Bereiche mit subkortikalen Regionen verbindet. Myelinisierte Faserbündel verlaufen zwischen den Basalganglien und trennen hier den Nucleus caudatus sowie den Thalamus vom Nucleus lentiformis (Emos und Agarwal, 2020).

Bereits 2010 konnten Levy und Kollegen in ihrer Studie an nicht übergewichtigen diabetischen Mäusen mittels experimenteller autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) eine Demyelinisierung der Capsula interna sowie der Fimbrien zeigen (Levy et al., 2010). Auch Yamazaki und Kollegen schrieben in ihrer Studie 2020, dass Schäden an der Capsula interna zu motorischen Ausfällen führen und diese nicht nur bei Schlaganfällen, sondern auch bei Patienten mit MS auftreten (Yamazaki et al., 2020). Ebenso scheint es durch Läsionen in der Capsula interna sowie den Basalganglien zu paroxysmalen Dyskinesien zu kommen (Fröhlich et al., 2018). Maimone berichtete 1991 von einem an MS leidenden Patienten, der in einem akuten Schub einseitige tonische Spasmen aufwies. In einem durchgeführten MRI zeigten sich in der rechten Capsula interna demyelinisierte Bereiche. Nach 10 Monaten wurde ein weiteres MRI durchgeführt, in welchem sich keine Läsionen im zuvor ermittelten Bereich zeigten, ebenso waren die tonischen Spasmen nicht mehr vorhanden (Maimone et al., 1991).

In der vorliegenden Studie zeigt sich ein signifikanter Volumenverlust ($p=0,02$) der Capsula

interna. Die Fasern der Capsula interna sind myelinisierte Fasern. Da es bei der MS zu einer Demyelinisierung kommt, kann es auch zu demyelinisierenden Läsionen in der Capsula interna mit dementsprechenden neurologischen Ausfällen kommen.

Cuprizone induziert eine Demyelinisierung im ZNS. Durch diese Cuprizone-induzierte Demyelinisierung lässt sich der ermittelte Volumenverlust der Capsula interna durchaus erklären.

4.4.2 Kein Volumenverlust von Thalamus und Hypothalamus

Die jeweils paarigen Thalami des Menschen sind ein Bereich des Diencephalons, die aus 50-60 Kernen und etwa 10 Millionen Neurone pro Hemisphäre bestehen. Ein Thalamus wird in vier Teile, bestehend aus Hypothalamus, Epithalamus, ventralem und dorsalem Thalamus, unterteilt (Herrero et al., 2002).

Der Volumenverlust im Gehirn von MS-Patienten scheint ein wichtiger Marker zur Erkennung und Verlaufskontrolle von Neurodegeneration und dem damit verbundenen Gewebeschäden zu sein. So gibt es bereits verschiedene MRI-Methoden um das Gehirnvolumen von MS-Patienten zu bestimmen. Diese sind jedoch mit Vorsicht zu genießen, denn Faktoren wie Pseudoatrophie spielen eine wichtige Rolle bei der komplexen Erkrankung (De Stefano et al., 2014). In letzter Zeit hat sich immer mehr herauskristallisiert, dass nicht nur die weiße Substanz, sondern auch Veränderungen der grauen Substanz bei MS weit verbreitet sind. So kommt es eher zur Atrophie in einzelnen spezifischen Bereichen, weniger zu einer diffusen Verteilung. Bis jetzt ist der genaue Mechanismus, der zur Atrophie der grauen Substanz führt, jedoch noch unklar. Trotz alledem ist eine Atrophie der grauen Substanz ein wesentlicher Bestandteil von Veränderungen im Gehirn bei MS-Patienten (Chiang et al., 2019). Gehirnschnitte von verstorbenen MS-Patienten zeigten demyelinisierte Bereiche im Thalamus, die letztlich zu einer Atrophie des Thalamus führten.

Wie bereits Kipp und Kollegen in ihrer Studie 2015 berichteten, scheint der Thalamus auch eine direkte Rolle in der Cuprizone-induzierten Intoxikation zu spielen. Cuprizone schädigt direkt die Oligodendrozyten im Thalamus und führt dadurch zu einer Demyelinisierung und letztlich zu Veränderungen von lebenswichtigen Funktionen (Kipp et al., 2015).

Auch Azevedo und Kollegen konnten in ihrer Studie 2018 zeigen, dass es zu einer Volumenabnahme des Thalamus bei MS-Patienten kommt und dass diese Volumenabnahme schneller voranschreitet, als es bei gesunden Kontrollpersonen der Fall ist (Azevedo et al., 2018). Ebenso scheint die durch MRI ermittelte Größe der grauen

Substanz des rechten und linken Thalamus bei jungen pädiatrischen MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden vermindert zu sein (Mesaros et al., 2008).

Der Hypothalamus des Menschen spielt eine wichtige Rolle in Bezug auf Grundumsatz, Appetit, Schlaf und Motivation. Er besitzt Neurone und weitere Zellen, die Hormone, Metabolite und andere zirkulierende Botenstoffe erkennen und so gezielt auf Stressoren und physikalische Störungen reagieren. Letztlich sollte dadurch die Homöostase in unserem Körper aufrecht gehalten werden. Ebenso konnten bisher einige wenige Studien eine gestörte Sekretion hypothalamischer Hormone und Peptide bei MS-Patienten aufzeigen, wie etwa von Cortisol und Orexin (Burfeind et al., 2016).

Hnilicová und Kollegen konnten 2019 in ihrer Studie einen signifikanten Unterschied im Metabolismus des Hypothalamus zu Beginn der Krankheit bei MS-Patienten zeigen (Hnilicová et al., 2019). So scheint es zu einer Störung unter anderem der Wachheit und des Aktivitätsniveaus bei MS Patienten zu kommen (Burgeind et al., 2016).

In unserem chronischen Cuprizone-Modell konnten wir keinen signifikanten Volumenverlust des Hypothalamus im Vergleich zu gesunden Kontrollmäusen messen.

4.4.3 Kein Volumenverlust der Basalganglien

Die Basalganglien des menschlichen Gehirns zählen zur grauen Substanz und sind als tiefe graue Kernmassen des Telencephalons von weißer Substanz umgeben. Zu ihnen zählen der Nucleus caudatus, Nucleus lentiformis, bestehend aus Putamen und Globus pallidum, Nucleus subthalamicus und die Substantia nigra. Sie bilden einerseits das Hauptzentrum des extrapyramidalen motorischen Systems, andererseits haben sie auch eine wichtige Funktion bei Motivation, Emotionen, Assoziation und kognitiven Prozessen (Herrero et al., 2002). Die Basalganglien und der Thalamus beeinflussen eine schnelle Verarbeitung von Informationen (Batista et al., 2012). Bei MS-Patienten scheinen sie eine wichtige Rolle bei chronischer Müdigkeit zu spielen, ebenso bei zielorientiertem Verhalten und belohnungsbasierter Motivation (Hoffnung et al., 2019). In einer Studie von Batista im Jahr 2012 konnte ein Volumenverlust der Basalganglien und des Thalamus gezeigt werden (Batista et al., 2012). Conte und Kollegen gelang es kürzlich in einer Studie, einen Zusammenhang zwischen Volumenverlust von Thalamus und Basalganglien mit einer funktionellen Behinderung von MS-Patienten herzustellen (Conte et al., 2020).

In unserer Arbeit zeigt sich kein Volumenverlust der Basalganglien. Dieser nicht

vorhandene Volumenverlust lässt sich möglicherweise durch einen Messfehler erklären. Die Basalganglien sind angrenzend an die Capsula interna, Corpus callosum und weitere Strukturen. In der Nissl-Färbung lassen sich diese Strukturen oftmals schwer voneinander unterscheiden. Die Grenzen für jeden Schnitt und jeden Bereich wurden individuell und möglichst reproduzierbar anhand unterschiedlicher Zellen, Zelldichte, Zellgröße, Farbe und unter Zuhilfenahme des Allen Mouse Brain Atlas festgelegt. Es kann möglich sein, dass die Grenze der Basalganglien falsch gezogen wurde, zumal sich die Basalganglien von Region 260 bis 315 in ihrer Form und Größe verändern. Somit sollte dieses Ergebnis durchaus kritisch hinterfragt werden und durch andere Verfahren nochmal überprüft werden.

4.5. Design-based Stereology

Um die Anzahl von Zellen oder Neurone im Gehirn zu schätzen, gibt es verschiedene Verfahren und Programme. Eine Möglichkeit ist, die Anzahl durch design-based stereologische Verfahren zu ermitteln. Sterio berichtet 1984, dass es möglich ist, durch stereologische Verfahren eine Schätzung über die Anzahl von Partikeln in einem dreidimensionalen Raum durch Zählung von mindestens zwei aufeinanderfolgenden Schnitten zu ermitteln, sofern man den Abstand dieser Schnitte kennt (Sterio, 1984).

In unserer Auswertung wurde der optical fractionator des Computerprogramms Stereo Investigator Version 11.07 verwendet, um die Anzahl von NeuN-gefärbten Zellen im Gehirn von Mäusen zu schätzen. Sadeghinezhad und Amrein haben 2020 in ihrer Studie, in der Ratten das Zytostatikum Oxaliplatin erhielten, die Neurone mittels der Optical-fractionator-Methode ermittelt (Sadeghinezhad und Amrein, 2020). Bereits 1991 verwendete West in einer Studie zur Ermittlung der Neuronenanzahl im Hippocampus der Ratte dasselbe Zählverfahren (West et al., 1991). Auch Korbo und Kollegen schätzten 1990 mit Hilfe der Disector-Methode eine absolute Anzahl von Neuronen im Cortex von Ratten. Bei dieser Methode ergibt sich die Anzahl der Neurone als Produkt aus dem ermittelten Volumen und der ermittelten Dichte.

4.5.1 Keine Abnahme der Zellzahl des Cortex und des Subcortex

Die MS ist eine Erkrankung, bei der es neben Demyelinisierung auch zu einer Abnahme der Neuronenanzahl im ZNS kommt (Papadopoulos et al., 2009). Bereits 2002 konnte Cifelli in einer Studie feststellen, dass es zu einem erheblichen Verlust von Neuronen

im Thalamus bei MS-Patienten kommt (Cifelli et al., 2002). Wegner und Kollegen sind 2006 in einer Studie ebenfalls auf einen erheblichen Verlust von Neuronen und Gliazellen in Läsionen des Neocortex von MS-Patienten gestoßen. Außerdem ist mit dem Verlust von Neuronen auch eine Abnahme von Synapsen im ZNS verbunden (Wegner et al., 2006).

Carassiti und Kollegen gelang es in einer Studie 2018 mit Hilfe der Optical-fractionator-Methode im Optical-disector, der der eigentliche dreidimensionale Zählbereich ist, eine Abnahme der absoluten Zellzahl von Neuronen des Neocortex im Vergleich zu gesunden Probanden nachzuweisen (Carassiti et al., 2018).

In unserer Studie zeigte sich ein Volumenverlust der Capsula interna, jedoch keine Abnahme der Zellzahl von NeuN-gefärbten Zellen des Cortex sowie des Subcortex. Dies könnte sich einerseits auf die verwendete Färbung zurückführen lassen. NeuN ist ein Antikörper, der an fast alle Neurone im ZNS bindet. Es kann also durchaus der Fall sein, dass es zu einer Abnahme von speziellen Neuronen im ZNS kommt. Möglich wäre auch, dass das verwendete Mausmodell nicht ideal zur Schätzung der Zellzahl war. Cuprizone führt zu einem Untergang der Oligodendrozyten verbunden mit einer Demyelinisierung im ZNS, jedoch zeigt sich keine Auswirkung von Cuprizone auf die Anzahl der Neurone. Wir konnten keine Abnahme feststellen.

4.5.2 Keine Abnahme der Zelldichte des Cortex und des Subcortex

Carassiti und Kollegen konnten 2018 neben einer Abnahme der Anzahl von Neuronen im Neocortex auch eine Abnahme der Neuronendichte ermitteln. So wiesen die an MS leidenden Patienten eine signifikant geringere Dichte der Neurone des Neocortex im Vergleich zu gesunden Probanden auf (Carassiti et al., 2018). Trapp und Kollegen haben in einer Studie 2018 die mittlere Neuronendichte des Cortex in der Schicht III, V, VI an fünf verschiedenen Stellen des Cortex bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der mittleren Neuronendichte der Schicht V des Cortex im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Bei MS-Patienten, die an der myelokortikalen MS litten, zeigte sich eine signifikante Abnahme der mittleren Neuronendichte der Schicht III, V und VI (Trapp et al., 2018).

In unserem Versuch am chronischen Cuprizone-Model der Maus ergab sich kein signifikanter Unterschied der Neuronendichte von Cuprizonemäusen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren.

5. Zusammenfassung

Die MS ist eine komplexe Autoimmunerkrankung, die unter anderem aus verschiedensten Komponenten wie Demyelinisierung, axonaler Schädigung, neuronaler Schädigung, Neuroinflammation, oxidativem Stress und einigen mehr aufgebaut ist. Klinisch zeigen sich neurologische Beschwerden je nach Lokalisation der Läsion im Gehirn. Diese Beschwerden reichen von Sehen von Doppelbildern, schmerzhaften Augenbewegungen, Trigeminalneuralgie, dem Verlust von Sensibilität im Gesicht, Nystagmus, motorischen Störungen, Ataxie, Harndranginkontinenz, Obstipation, erektiler Dysfunktion bis hin zu unspezifischer Müdigkeit. Aufgrund der unterschiedlichsten Beschwerden ist es eine Herausforderung, die Erkrankung schnellstmöglich zu diagnostizieren, um eine entsprechende Therapie einzuleiten. Hierfür stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Neben Anamnese und körperlicher Untersuchung auch evozierte Potentiale, Liquordiagnostik, Nervenleitgeschwindigkeit bis hin zu MRI und PET.

Bis heute ist die Erkrankung noch nicht bis ins Detail geklärt. Verschiedene medikamentöse Angriffspunkte zeigen eine gute Wirkung mit Unterdrückung der Schübe, jedoch ohne Heilung.

Mit dieser Arbeit am chronischen Cuprizone-Modell der Maus sollte die Komponente der Demyelinisierung genauer ins Blickfeld genommen werden. Es wurde untersucht, ob es durch zwölfwöchige Cuprizonegabe bei C57BL/6J Mäusen zu einem signifikanten Volumenverlust von sowohl grauer als auch weißer Substanz kommt. Neben einem möglichen Volumenverlust sollte auch ein möglicher Verlust an NeuN-gefärbten Zellen des Cortex und des Subcortex untersucht werden, sowie die Zelldichte des Kortex und des Subkortex ermittelt werden.

Nach zwölfwöchiger Cuprizonegabe wurden die Mäuse tief narkotisiert, transkardial perfundiert und die Gehirne entnommen. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Gehirne in verschiedenen Sucroslösungen gelagert und mit Hilfe eines Kryostat in 40 µm dicke Schnitte geschnitten. Eine Serie aus jedem dritten Schnitt zwischen der Region 260 und 315 wurde zufällig ausgewählt und Nissl-gefärbt. Mittels Cavalieri-Methode wurde das Volumen von Thalamus, Hypothalamus, Capsula interna und Basalganglien bestimmt. Thalamus, Hypothalamus und Basalganglien wiesen keinen Volumenverlust auf. Ein signifikanter Volumenverlust ergab sich aber hinsichtlich der Capsula interna der Cuprizonemäuse im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren.

Um diesen Volumenverlust weiter zu untersuchen und um festzustellen, ob mit ihm auch

ein möglicher Verlust von NeuN-gefärbten Zellen einhergeht, wurde aus einer Serie jeder sechste Schnitt zwischen Region 215 bis 325 desselben Tieres zufällig ausgewählt und fluoreszierend NeuN-gefärbt. Mit Hilfe der Design-based Stereology konnte eine absolute Zellzahl des Cortex und des Subcortex geschätzt werden. In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der NeuN-gefärbten Zellen des Cortex, sowie des Subcortex im Vergleich zu gesunden Kontrollmäusen nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der ermittelten Zelldichte des Cortex und des Subcortex der NeuN-gefärbten Schnitte.

Diese Ergebnisse können keineswegs eins zu eins auf die MS-Erkrankung übertragen werden. Es sind Ergebnisse eines Tiermodells, die bereits vorliegende Ergebnisse und Erkenntnisse zur Erkrankung unterstreichen.

6. Literaturverzeichnis

- Abidin AZ, Chockanathan U, DSouza AM, Inglese M, Wismüller A. Using Large-Scale Granger Causality to Study Changes in Brain Network Properties in the Clinically Isolated Syndrome (CIS) Stage of Multiple Sclerosis. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng.* 2017; 10137:101371B.
- Alper F, Gundogdu C, Varoglu AO, Kantarci M, Bulucu Z, Malkoc I, Unal B. Determination of Brain Volumes Using Quantitative MR Imaging in Patients with Multiple Sclerosis. *Neuroradiol J.* 2006; 19(3):283-288.
- Alper F, Kantarci M, Altunkaynak E, Varoglu AO, Karaman A, Oral E, Okur A. Quantitative magnetic resonance imaging of brainstem volumes, plaques, and surface area in the occipital regions of patients with multiple sclerosis. *Acta Radiol.* 2006; 47(4):413-418.
- Alroughani R, Inshasi J, Al-Asmi A, Alkhabouri J, Alsaadi T, Alsalti A, Boshra A, Canibano B, Ahmed SF, Shatila A. Disease-Modifying Drugs and Family Planning in People with Multiple Sclerosis: A Consensus Narrative Review from the Gulf Region. *Neurol Ther.* 2020.
- An J, Yin JJ, He Y, Sui RX, Miao Q, Wang Q, Yu JZ, Yu JW, Shi FD, Ma CG, Xiao BG. Temporal and Spatial Dynamics of Astroglial Reaction and Immune Response in Cuprizone-Induced Demyelination. *Neurotox Res.* 2020; 37(3):587-601.
- Azevedo CJ, Cen SY, Khadka S, Liu S, Kornak J, Shi Y, Zheng L, Hauser SL, Pelletier D. Thalamic atrophy in multiple sclerosis: A magnetic resonance imaging marker of neurodegeneration throughout disease. *Ann Neurol.* 2018; 83(2):223-234.
- Azevedo CJ, Cen SY, Jaberzadeh A, Zheng L, Hauser SL, Pelletier D. Contribution of normal aging to brain atrophy in MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2019; 6(6):e616.
- Bagnato F, Gauthier SA, Laule C, Moore GRW, Bove R, Cai Z, Cohen-Adad J, Harrison DM, Klawiter EC, Morrow SA, Öz G, Rooney WD, Smith SA, Calabresi PA, Henry RG,

Oh J, Ontaneda D, Pelletier D, Reich DS, Shinohara RT, Sicotte NL; NAIMS Cooperative. Imaging Mechanisms of Disease Progression in Multiple Sclerosis: Beyond Brain Atrophy. *J Neuroimaging*. 2020; 30(3):251-266.

Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and Remitting Multiple Sclerosis: Pathology of the Newly Forming Lesion. *Ann Neurol*. 2004; 55(4):458-68.

Batista S, Zivadinov R, Hoogs M, Bergsland N, Heininen-Brown M, Dwyer MG, Weinstock-Guttman B, Benedict RH. Basal ganglia, thalamus and neocortical atrophy predicting slowed cognitive processing in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2012; 259(1):139-146.

Bigaut K, De Seze J, Collongues N. Ocrelizumab for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*. 2019; 19(2):97-108.

Bishop CA, Newbould RD, Lee JS, Honeyfield L, Quest R, Colasanti A, Ali R, Mattoscio M, Cortese A, Nicholas R, Matthews PM, Muraro PA, Waldman AD. Analysis of ageing-associated grey matter volume in patients with multiple sclerosis shows excess atrophy in subcortical regions. *Neuroimage Clin*. 2016; 13:9-15.

Bose G, Freedman MS. Precision medicine in the multiple sclerosis clinic: Selecting the right patient for the right treatment. *Mult Scler*. 2020; 26(5):540-547.

Burfeind KG, Yadav V, Marks DL. Hypothalamic Dysfunction and Multiple Sclerosis: Implications for Fatigue and Weight Dysregulation. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2016; 16(11):98.

Cappellani R, Bergsland N, Weinstock-Guttman B, Kennedy C, Carl E, Ramasamy DP, Hagemeyer J, Dwyer MG, Patti F, Zivadinov R. Subcortical deep gray matter pathology in patients with multiple sclerosis is associated with white matter lesion burden and atrophy but not with cortical atrophy: a diffusion tensor MRI study. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2014; 35(5):912-919.

Carassiti D, Altmann DR, Petrova N, Pakkenberg B, Scaravilli F, Schmierer K. Neuronal loss, demyelination and volume change in the multiple sclerosis neocortex.

Neuropathol Appl Neurobiol. 2018; 44(4):377-390.

Carlton W W. Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, alpha-benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone. Toxicol Appl Pharmacol. 1966; 8(3):512-521.

Chard DT, Griffin CM, Parker GJ, Kapoor R, Thompson AJ, Miller DH. Brain atrophy in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. Brain. 2002; 125(Pt 2):327-337.

Chiang FL, Wang Q, Yu FF, Romero RS, Huang SY, Fox PM, Tantiwongkosi B, Fox PT. Localised grey matter atrophy in multiple sclerosis is network-based: a coordinate-based meta-analysis. Clin Radiol. 2019; 74(10): 816.e19-816.e28.

Chitnis T, Prat A. A roadmap to precision medicine for multiple sclerosis. Mult Scler. 2020; 26(5):522-532.

Cifelli A, Arridge M, Jezzard P, Esiri MM, Palace J, Matthews PM. Thalamic neurodegeneration in multiple sclerosis. Ann Neurol. 2002; 52(5):650-653.

Conte A, Gianni C, Belvisi D, Cortese A, Petsas N, Tartaglia M, Cimino P, Millefiorini E, Berardelli A, Pantano P. Deep grey matter involvement and altered sensory gating in multiple sclerosis. Mult Scler. 2020; 26(7):786-794.

De Stefano N, Airas L, Grigoriadis N, Mattle HP, O'Riordan J, Oreja-Guevara C, Sellebjerg F, Stankoff B, Walczak A, Wiendl H, Kieseier BC. Clinical relevance of brain volume measures in multiple sclerosis. CNS Drugs. 2014; 28(2):147-156.

Duan Y, Liu Y, Liang P, Jia X, Yu C, Qin W, Sun H, Liao Z, Ye J, Li K. Comparison of grey matter atrophy between patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis: a voxel-based morphometry study. Eur J Radiol. 2012; 81(2):e110-114.

Dutta R, Chomyk AM, Chang A, Ribaldo MV, Deckard SA, Doud MK, Edberg DD, Bai B, Li M, Baranzini SE, Fox RJ, Staugaitis SM, Macklin WB, Trapp BD. Hippocampal demyelination and memory dysfunction are associated with increased levels of the neuronal microRNA miR-124 and reduced AMPA receptor. Ann Neurol. 2013;

73(5):637-645.

Elsworth S and Howell JM. Variation in the response of mice to cuprizone. *Res Vet Sci.* 1973; 14:385-387.

Emos MC, Agarwal S. Neuroanatomy, Internal Capsule. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing. 2020.

Eshaghi A, Marinescu RV, Young AL, Firth NC, Prados F, Jorge Cardoso M, Tur C, De Angelis F, Cawley N, Brownlee WJ, De Stefano N, Laura Stromillo M, Battaglini M, Ruggieri S, Gasperini C, Filippi M, Rocca MA, Rovira A, Sastre-Garriga J, Geurts JGG, Vrenken H, Wottschel V, Leurs CE, Uitdehaag B, Pirpamer L, Enzinger C, Ourselin S, Gandini Wheeler-Kingshott CA, Chard D, Thompson AJ, Barkhof F, Alexander DC, Ciccarelli O. Progression of regional grey matter atrophy in multiple sclerosis. *Brain.* 2018; 141(6):1665-1677.

Fisher E, Lee JC, Nakamura K, Rudick RA. Gray matter atrophy in multiple sclerosis: a longitudinal study. *Ann Neurol.* 2008; 64(3):255-265.

Fröhlich K, Winder K, Linker RA, Huhn K, Engelhorn T, Dörfler A, Lee DH, Schwab S, Seifert F. Lesion correlates of secondary paroxysmal dyskinesia in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2018; 265(10):2277-2283.

Ghione E, Bergsland N, Dwyer MG, Hagemeyer J, Jakimovski D, Paunkoski I, Ramasamy DP, Carl E, Hojnacki D, Kolb C, Weinstock-Guttman B, Zivadinov R. Aging and Brain Atrophy in Multiple Sclerosis. *J Neuroimaging.* 2019; 29(4):527-535.

Gilmore CP, Donaldson I, Bo L, Owens T, Lowe J, Evangelou N. Regional variations in the extent and pattern of grey matter demyelination in multiple sclerosis: a comparison between the cerebral cortex, cerebellar cortex, deep grey matter nuclei and the spinal cord. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2009; 80, 182-187.

Gomes MDM. Franz Nissl (1860-1919), noted neuropsychiatrist and neuropathologist, staining the neuron, but not limiting it. *Dement Neuropsychol.* 2019; 13(3):352-355.

- Gudi V, Moharreggh-Khiabania D, Skripuletz T, Koutsoudakia PN, Kotsiaria A, Skuljeca J, Trebsta C, Stangel M. Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination. *Brain Res.* 2009; 1283:127-138.
- Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae.* 2015; 7(2):42-7.
- Heidari Z, Mahmoudzadeh-Sagheb H, Moghtaderi A, Ramazanpour N, Gorgich EAC. Structural changes in the brain of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis compared to controls: a MRI-based stereological study. *Ir J Med Sci.* 2020.
- Henry RG, Shieh M, Okuda DT, Evangelista A, Gorno-Tempini ML, Pelletier D. Regional grey matter atrophy in clinically isolated syndromes at presentation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008; 79(11):1236-44.
- Herrero MT, Barcia C, Navarro JM. Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv Syst.* 2002; 18(8):386-404.
- Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, Ting JP, Suzuki K, Matsushima GK. Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol.* 1998; 92(1-2):38-49.
- Hnilicová P, Kantorová E, Poláček H, Grendár M, Bittšanský M, Čierny D, Sivák Š, Zeleňák K, Lehotský J, Dobrota D, Kurča E. Altered hypothalamic metabolism in early multiple sclerosis—MR spectroscopy study. *J Neurol Sci.* 2019; 407:116458.
- Hochstrasser T, Rühling S, Hecher K, Fabisch KH, Chrzanowski U, Brendel M, Eckenweber F, Sacher C, Schmitz C, Kipp M. Stereological Investigation of Regional Brain Volumes after Acute and Chronic Cuprizone-Induced Demyelination. *Cells.* 2019; 8(9):1024.
- Hoffnung G, Portnoy JG, Altaras C, Zemon V, Holtzer R, Picone MA, Foley FW. Motivation in multiple sclerosis cognitive fatigue: An experimental approach. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2019; 41(9):905-912.

- Karaca O, Buyukmert A, Tepe N, Ozcan E, Kus I. Volume estimation of brain ventricles using Cavalieri's principle and Atlas-based methods in Alzheimer disease: Consistency between methods. *J Clin Neurosci*. 2020: S0967-5868(20)30474-4.
- Korbo L, Pakkenberg B, Ladefoged O, Gundersen HJ, Arlien-Søborg P, Pakkenberg H. An efficient method for estimating the total number of neurons in rat brain cortex. *J Neurosci Methods*. 1990; 31(2):93-100.
- Kipp M, Wagenknecht N, Beyer C, Samer S, Wuerfel J, Nikoubashman O. Thalamus pathology in multiple sclerosis: from biology to clinical application. *Cell Mol Life Sci*. 2015; 72(6):1127-1147.
- Kipp M, Kiessling MC, Hochstrasser T, Roggenkamp C, Schmitz C. Design-Based Stereology for Evaluation of Histological Parameters. *J Mol Neurosci*. 2017; 61(3):325-342.
- Krajcovicova L, Klobusiakova P, Rektorova I. Gray Matter Changes in Parkinson's and Alzheimer's Disease and Relation to Cognition. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2019; 19(11):85.
- Lavezzi AM, Corna MF, Matturri L. Neuronal nuclear antigen (NeuN): A useful marker of neuronal immaturity in sudden unexplained perinatal death. *J Neurol Sci*. 2013; 329(1-2):45-50.
- Leopold P, Schmitz C, Kipp M. Animal Weight Is an Important Variable for Reliable Cuprizone-Induced Demyelination. *J Mol Neurosci*. 2019; 68(4):522-528.
- Levy H, Assaf Y, Frenkel D. Characterization of brain lesions in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *Exp Neurol*. 2010; 226(1):148-158.
- Love S. Cuprizone neurotoxicity in the rat: Morphologic observations. *J Neurol Sci*. 1988; 84(2-3):223-237.

- Maimone, Reder AT, Finocchiaro F, Recupero E. Internal Capsule Plaque and Tonic Spasms in Multiple Sclerosis. *Arch Neurol.* 1991; 48(4):427-429.
- Marciniewicz E, Podgórski P, Szaśiadek M, Bladowska J. The role of MR volumetry in brain atrophy assessment in multiple sclerosis: A review of the literature. *Adv Clin Exp Med.* 2019; 28(7):989-999.
- Mason JL, Langaman C, Morell P, Suzuki K, Matsushima GK. Episodic demyelination and subsequent remyelination within the murine central nervous system: changes in axonal calibre. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2001; 27(1):50-58.
- Mason JL, Toews A, Hostettler JD, Morell P, Suzuki K, Goldman JE, Matsushima GK. Oligodendrocytes and progenitors become progressively depleted within chronically demyelinated lesions. *Am J Pathol.* 2004; 164(5):1673-1682.
- Matsushima GK & Morell P. The neurotoxicant cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain pathol.* 2001; 11(1):107-116.
- Mendibe Bilbao M, Boyero Durán S, Bárcena Llona J, Rodríguez-Antigüedad A. Multiple Sclerosis: Pregnancy and Women's Health Issues. *Neurologia.* 2019; 34(4):259-269.
- Mesaros S, Rocca MA, Absinta M, Ghezzi A, Milani N, Moiola L, Veggiotti P, Comi G, Filippi M. Evidence of thalamic gray matter loss in pediatric multiple sclerosis. *Neurology.* 2008; 70(13 Pt 2):1107-1112.
- Mezzaroba L, Simão ANC, Oliveira SR, Flauzino T, Alfieri DF, de Carvalho Jennings Pereira WL, Kallaur AP, Lozovoy MAB, Kaimen-Maciel DR, Maes M, Reiche EMV. Antioxidant and Anti-inflammatory Diagnostic Biomarkers in Multiple Sclerosis: A Machine Learning Study. *Mol Neurobiol.* 2020; 57(5):2167-2178.
- Minagar A, Toledo EG, Alexander JS, Kelley RE. Pathogenesis of brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *J Neuroimaging.* 2004; 14(3 Suppl):5S-10S.
- Mix E, Meyer-Rienecker H, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis for the

- development and validation of novel therapies - potential and limitations. *J. Neurol.* 2008; 255 Suppl 6:7-14.
- Mohammadi-Rad M, Nazem Ghasemi N, Aliomrani M. Evaluation of apamin effects on myelination process in C57BL/6 mice model of multiple sclerosis. *Res Pharm Sci.* 2019; 14(5):424-431.
- Owjfard M, Bigdeli MR, Safari A, Namavar MR. Effects of nicorandil on neurobehavioral function, BBB integrity, edema and stereological parameters of the brain in the sub-acute phase of stroke in a rat model. *J Biosci.* 2020; 45:49.
- Pachner AR. Experimental models of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2011; 24(3):291-299.
- Papadopoulos D, Dukes S, Patel R, Nicholas R, Vora A, Reynolds R. Substantial archaеocortical atrophy and neuronal loss in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2009;19(2):238-253.
- Poorna Pillutla SV, Kaur C, Roy TS, Jacob TG. Estimation of Volume of Stria Vascularis and the Length of Its Capillaries in the Human Cochlea. *J Microsc Ultrastruct.* 2019; 7(3):117-123.
- Praet J, Guglielmetti C, Berneman Z, Van der Linden A, Ponsaerts P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: Clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014; 47:485-505.
- Pudlac A, Burgetova A, Dusek P, Nytrova P, Vaneckova M, Horakova D, Krasensky J, Lambert L. Deep Gray Matter Iron Content in Neuromyelitis Optica and Multiple Sclerosis. *Biomed Res Int.* 2020; 2020:6492786.
- Rommer PS, Milo R, Han MH, Satyanarayan S, Sellner J, Hauer L, Illes Z, Warnke C, Laurent S, Weber MS, Zhang Y, Stuve O. Immunological Aspects of Approved MS Therapeutics. *Front Immunol.* 2019; 10:1564.

- Rojas JI, Patrucco L, Miguez J, Cristiano E. Brain atrophy in multiple sclerosis: therapeutic, cognitive and clinical impact. *Arq Neuropsiquiatr*. 2016; 74(3):235-243.
- Sadeghinezhad J, Amrein I. Stereological analysis of hippocampus in rat treated with chemotherapeutic agent oxaliplatin. *Folia Morphol (Warsz)*. 2020.
- Shull C, Hoyle B, Iannotta C, Fletcher E, Curan M, Cipollone V. A current understanding of multiple sclerosis. *JAAPA*. 2020; 33(2):19-23.
- Sidman RL, Angevine JB, Pierce ET. *Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord*. 1970; Cambridge
- Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc*. 1984; 134(Pt 2):127-136.
- Stys PK, Zamponi GW, van Minnen J, Geurts JJ. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci*. 2012; 13(7):507-514.
- Sungura RE, Spitsbergen JM, Mpolya EA, Sauli E, Vianney JM. The neuroimaging magnitude of pediatric brain atrophy in northern Tanzania. *Pan Afr Med J*. 2020; 36:25.
- Taman FD, Kervancioglu P, Kervancioglu AS, Turhan B. The importance of volume and area fractions of cerebellar volume and vermian subregion areas: a stereological study on MR images. *Childs Nerv Syst*. 2020; 36(1):165-171.
- Trapp BD, Vignos M, Dudman J, Chang A, Fisher E, Staugaitis SM, Battapady H, Mork S, Ontaneda D, Jones SE, Fox RJ, Chen J, Nakamura K, Rudick RA. Cortical neuronal densities and cerebral white matter demyelination in multiple sclerosis: a retrospective study. *Lancet Neurol*. 2018; 17(10):870-884.
- Varhaug KN, Kråkenes T, Alme MN, Vedeler CA, Bindoff LA. Mitochondrial complex IV is lost in neurons in the cuprizone mouse model. *Mitochondrion*. 2020; 50:58-62.
- Vega-Riquer JM, Mendez-Victoriano G, Morales-Luckie RA, Gonzalez-Perez O. Five

Decades of Cuprizone, an Updated Model to Replicate Demyelinating Diseases. *Curr Neuropharmacol.* 2019; 17(2):129-141.

Wagenknecht N, Becker B, Scheld M, Beyer C, Clarner T, Hochstrasser T, Kipp M. Thalamus Degeneration and Inflammation in Two Distinct Multiple Sclerosis Animal Models. *J Mol Neurosci.* 2016; 60(1):102-114.

Wegner C, Esiri MM, Chance SA, Palace J, Matthews PM. Neocortical neuronal, synaptic, and glial loss in multiple sclerosis. *Neurology.* 2006; 67(6):960-967.

West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec.* 1991; 231(4):482-497.

Yamazaki R, Ohno N, Huang JK. Acute motor deficit and subsequent remyelination-associated recovery following internal capsule demyelination in mice. *J Neurochem.* 2020.

Zatta P, Raso M, Zambenedetti P, Wittkowski W, Messori L, Piccioli F, Mauri PL, Beltramini M. Copper and zinc dismetabolism in the mouse brain upon chronic cuprizone treatment. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62(13):1502-1513.

Zhang H, Kim Y, Ro EJ, Ho C, Lee D, Trapp BD, Suh H. Hippocampal Neurogenesis and Neural Circuit Formation in a Cuprizone-Induced Multiple Sclerosis Mouse Model. *J Neurosci.* 2020; 40(2):447-458.

Zhen W, Liu A, Lu J, Zhang W, Tattersall D, Wang J. An Alternative Cuprizone-Induced Demyelination and Remyelination Mouse Model. *ASN Neuro.* 2017; 9(4):1759091417725174.

Zivadinov R, Bergsland N, Dolezal O, Hussein S, Seidl Z, Dwyer MG, Vaneckova M, Krasensky J, Potts JA, Kalincik T, Havrdová E, Horáková D, Evolution of cortical and thalamus atrophy and disability progression in early relapsing-remitting MS during 5 years. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2013; 34(10):1931-1939.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: die Anordnung der Schnitte in einer unbeschichteten Wellplatte, selbst erstellt, (Seite 25)

Abbildung 2: Allen Institute, 2021, Allen Brain Reference Atlas, Mouse, P56, Coronal, **Bild 64/132**

URL: <http://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1#atlas=1&structure=304325711&resolution=18.60&x=5536.296657986111&y=4142.81494140625&zoom=-4&plate=100960268> 05.05.2021, (Seiten 28-29)

Abbildung 3: Allen Institute, 2021, Allen Brain Reference Atlas, Mouse, P56, Coronal, **Bild 70/132**

URL: <http://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1#atlas=1&plate=100960244&structure=512&x=5280&y=3762.0001220703125&zoom=-4&resolution=20.94&z=5> 05.05.2021, (Seiten 29-30)

Abbildung 4: Einteilung der einzelnen Regionen am lichtmikroskopischen Schnitt, selbst erstellt, (Seite 31)

Abbildung 5: Schnitte der Nissl-Färbung in originaler Größe unter dem Lichtmikroskop, selbst erstellt, (Seite 32)

Abbildung 6: ROI der NeuN Schnitte, selbst erstellt, (Seiten 35-36)

Abbildung 7: Abbildungen zum Zählbereich der NeuN-gefärbten Zellen, selbst erstellt, (Seiten 36-37)

Abbildung 8: Volumen in mm³ des Thalamus der Kontrolltiere (n=8) sowie der Cuprizonetiere, selbst erstellt, (Seiten 39-40)

Abbildung 9: Volumen in mm³ des Hypothalamus der Kontrolltiere (n=8) sowie der Cuprizonetiere (n=7), selbst erstellt, (Seite 41)

Abbildung 10: Volumen in mm³ der Capsula interna der Kontrolltiere (n=8) sowie der Cuprizonetiere (n=7), selbst erstellt, (Seite 43)

Abbildung 11: Volumen in mm³ der Basalganglien der Kontrolltiere (n=8) sowie der Cuprizonetiere (n=7) selbst erstellt, (44-45)

Abbildung 12: Schätzung über die absolute Anzahl der NeuN-gefärbten Nervenzellen des Cortex, selbst erstellt, (Seite 47)

Abbildung 13: Schätzung über die absolute Anzahl der NeuN-gefärbten Nervenzellen des Subcortex, selbst erstellt, (Seite 48)

Abbildung 14: Zelldichte in Zellzahl/mm³ des Cortex der Kontrolltiere (n=7) sowie der

Cuprizonetiere (n=6), selbst erstellt, (Seite 50)

Abbildung 15: Volumen in mm^3 des Cortex der Kontrolltiere (n=7) sowie der Cuprizonetiere (n=6), selbst erstellt, (Seite 51)

Abbildung 16: Zelldichte in Zellzahl/ mm^3 des Subcortex der Kontrolltiere (n=7) sowie der Cuprizonetiere (n=6), selbst erstellt, (Seite 52)

Abbildung 17: Volumen in mm^3 des Subcortex der Kontrolltiere (n=7) sowie der Cuprizonetiere (n=6), selbst erstellt, (Seite 53)

8. Danksagung

Herrn Univ. Prof. Dr.med. Markus Kipp für das Vertrauen, die Geduld und vor allem die Möglichkeit zur Mitarbeit in der Arbeitsgruppe und die damit verbundene Promotion. Ebenso gilt der Dank auch für die bereitgestellten Ressourcen sowie die Räumlichkeiten.

Frau Dr. Tanja Hochstrasser für die Unterstützung, die Geduld sowie die hervorragende Betreuung und die Erreichbarkeit auch im Urlaub. Ein weiterer Dank für die vielen Stunden der Einarbeitung, Erklärungen und Korrekturen.

Ein weiterer Dank geht an die zahlreichen Mitarbeiter der Neuroanatomie der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München, die immer wieder geduldig Fragen beantworteten, hilfsbereit Unterstützten und ihre Energie in diese Arbeit miteinbrachten. Besonders hervorheben möchte ich Beate Aschauer für Ihre Geduld und Ausdauer beim Einscannen der fluoreszierenden Schnitte.

Meinen Freund Robert Paulus, der mich immer und immer wieder ermutigt hat an meiner Arbeit weiterzumachen.

Frau Helga Dick für die Korrektur der Sprache und Rechtschreibung.

9. Publikationsliste

Hochstrasser T, Rühling S, **Hecher K**, Fabisch KH, Chrzanowski U, Brendel M, Eckenweber F, Sacher C, Schmitz C, Kipp M. Stereological Investigation of Regional Brain Volumes after Acute and Chronic Cuprizone-Induced Demyelination. *Cells*. 2019; 8(9):1024.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Hecher, Kerstin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel
Subcortikale Atrophie im chronischen Cuprizone-Modell der Maus

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 22.03.22

Ort, Datum

Kerstin Hecher

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand