

Aus dem Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie

Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Christoph Schmitz

**Stereologische Untersuchung des Volumens spezifischer
Hirnregionen nach akuter und chronischer Demyelinisierung
durch Cuprizone-Intoxikation**

Dissertation

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

vorgelegt von

Kai Hartmut Fabisch

aus
Bremen

Jahr

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Markus Kipp
Prof. Dr. Frank Weber

Mitberichterstatter: Dr. Anneli Peters

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Tanja Hochstrasser

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2022

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ZUSAMMENFASSUNG	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
TABELLENVERZEICHNIS	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. EINLEITUNG	8
1.1 Die Multiple Sklerose.....	8
1.2 Das Cuprizone-Modell	11
1.3 Neuropathologie der Multiplen Sklerose und Parallelen zum Tiermodell.....	15
1.4 Neurodegeneration und Atrophie in der Multiplen Sklerose	17
1.5 Neurodegeneration im Cuprizone-Modell	19
1.6 Fragestellung und Forschungsziel	20
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Materialien und Chemikalien	21
2.2 Färbelösungen, Puffer und Blockseren	23
2.3 Versuchstiere	25
2.4 Versuchsaufbau	26
2.5 Materialgewinnung und Aufbereitung	27
2.5.1 Perfusion und Fixation	27
2.5.2 Anfertigung histologischer Schnittserien	29
2.6 Histologische Färbungen.....	29
2.6.1 Nissl-Färbung	29
2.6.2 Immunhistochemie	31
2.6.3 Chromogen-immunhistochemische Färbung	33
2.6.4 Immunfluoreszenzfärbung	36
2.7 Stereologische Auswertung.....	39
2.7.1 Stereologischer Arbeitsplatz	39
2.7.2 Design-based Stereologie - Cavalieri-Methode	39
2.7.3 Definition der <i>Regions of Interest</i>	43
2.7.4 Durchführung der Volumenbestimmung	45
2.7.5 Statistische Auswertung	47
3. ERGEBNISSE	48
3.1 Evaluation der histopathologischen Kennzeichen der Cuprizone-Intoxikation.....	48
3.2 Kein regionaler Gehirnvolumenverlust bei akuter Cuprizone-Intoxikation.....	54

3.3 Regionaler Gehirnvolumenverlust bei chronischer Cuprizone-Intoxikation	61
4. DISKUSSION	68
4.1 Validität der stereologischen Auswertung	68
4.2 Diskussion der Ergebnisse	72
LITERATURVERZEICHNIS	79
DANKSAGUNG	95
AFFIDAVIT	96
LEBENS LAUF	97
PUBLIKATIONS LISTE	98

Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Es kommt zur Ausbildung herdförmiger Läsionen im gesamten ZNS und einem heterogenen klinischen Bild mit Ausfällen entsprechend der jeweiligen Läsionslokalisationen. Die MS ist vor allem in den nördlichen Industriestaaten eine häufige Erkrankung, die vorwiegend Menschen jungen Alters und weiblichen Geschlechts betrifft. Neuropathologisch weist die MS neben entzündlichen Aspekten auch klassisch neurodegenerative Aspekte auf. Es kommt beispielsweise zu axonalem Schaden oder Apoptose von Oligodendrozyten. Der genaue Pathomechanismus der MS ist jedoch unbekannt. Um die Mechanismen von Entzündung und Neurodegeneration in der MS genauer zu verstehen, bedarf es der Verwendung von präklinischen Tiermodellen. Mit Hilfe dieser Modelle können die einzelnen Aspekte der heterogenen MS-Pathologie nachgestellt und untersucht werden.

Einer der wichtigsten biologischen Parameter bei der Beurteilung neuroprotektiver Effekte in präklinischen MS-Modellen ist die Messung von Gehirnvolumen. Tatsächlich korreliert die Gehirnatrophie in der MS stärker mit klinischer Behinderung als die in der Breite etablierte Bestimmung der Läsionslast. Die der Gehirnatrophie in der MS zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch wenig verstanden. Einer der Gründe hierfür ist das Fehlen eines passenden Tiermodells, das die Gehirnatrophie der MS ausreichend widerspiegelt und ein genaues Erforschen dieses Aspekts ermöglicht.

Ziel dieser Arbeit war es daher, das Ausmaß der Gehirnatrophie im Cuprizone-Modell durch die Verwendung standardisierter histologischer Methoden zu bestimmen. Es wurde die Methode der design-based Stereologie verwendet, um das Volumen des Kortex, Corpus callosum und Subkortex des Mäusegehirns nach akuter (fünf Wochen) sowie nach chronischer (zwölf Wochen) Cuprizone-Intoxikation zu bestimmen. Unsere Untersuchung ergab ein signifikantes Ausmaß cerebralen Volumenverlusts des Subkortex und des Corpus callosum nach chronischer Cuprizone-Intoxikation. Nach akuter Cuprizone-Intoxikation konnte dagegen kein signifikanter Volumenverlust festgestellt werden.

Insgesamt konnten wir im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass das chronische, nicht jedoch das akute Cuprizone-Modell ein wertvolles Instrument zur Untersuchung subkortikaler Gehirnatrophie ist. Das chronische Cuprizone-Modell spiegelt somit wichtige Parallelen zur MS und der dort beobachteten Gehirnatrophie wider, wodurch es ein wichtiges Werkzeug zum besseren Verständnis der neurodegenerativen Mechanismen vor allem der progredienten MS-Formen sein könnte. Es bedarf nun weiterer Studien, um zu erforschen, welche Mechanismen der Gehirnatrophie innerhalb des Cuprizone-Modells zugrunde liegen und inwiefern diese pharmakologisch beeinflusst werden können.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der klinischen Verlaufsformen der MS	9
Abbildung 2: Strukturformel von Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon)	12
Abbildung 3: Versuchsaufbau der akuten- und chronischen Demyelinisierung durch Cuprizone-Intoxikation	27
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der immunhistochemischen Färbung nach der indirekten ABC-Methode	32
Abbildung 5: Prinzip der Volumenbestimmung nach der Cavalieri-Methode (vgl. Schmitz & Hof, 2005)	40
Abbildung 6: Darstellung des Erstellungsprinzips einer SRS-Schnittserie	41
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Punktzählung anhand eines Quadratrasters	42
Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der definierten <i>Regions of Interest</i> (vgl. Hochstrasser et al., 2019)	44
Abbildung 9: Volumenbestimmung mittels Cavalieri-Methode (vgl. Hochstrasser et al., 2019)	46
Abbildung 10: Effekt der Cuprizone-Intoxikation über fünf und 12 Wochen auf die Myelinisierung im Bereich des medialen Corpus callosum anhand immunhistochemischer anti-PLP und anti-CNPase-Färbungen	50
Abbildung 11: Effekt der Cuprizone-Intoxikation über fünf und 12 Wochen auf die reaktive Gliose anhand immunhistochemischer Färbungen der Mikrogliazellen (anti-IBA1) und Astrozyten (anti-GFAP)	52
Abbildung 12: Effekt der Cuprizone-Intoxikation über fünf und 12 Wochen auf die Zellmorphologie der Mikrogliazellen (anti-IBA1) und Astrozyten (anti-GFAP) anhand immunhistochemischer Färbungen	53
Abbildung 13: Keine Volumenreduktion des Kortex nach akuter Cuprizone-Intoxikation	56
Abbildung 14: Keine Volumenreduktion des Corpus callosum nach akuter Cuprizone-Intoxikation	58
Abbildung 15: Keine Volumenreduktion des Subkortex nach akuter Cuprizone-Intoxikation	60
Abbildung 16: Keine Volumenreduktion des Kortex nach chronischer Cuprizone-Intoxikation	63
Abbildung 17: Volumenreduktion des Corpus callosum nach chronischer Cuprizone-Intoxikation	65
Abbildung 18: Volumenreduktion des Subkortex nach chronischer Cuprizone-Intoxikation	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste aller verwendeten Chemikalien.....	21
Tabelle 2: Liste aller verwendeten Färbelösungen, Puffer und Blockseren.....	23
Tabelle 3: Protokoll der Kryoprotektion mittels aufsteigender Sucrose-Stufen.....	28
Tabelle 4: Protokoll der manuellen Einbettung des Gewebes in Paraffin.....	28
Tabelle 5: Protokoll der histochemischen Nissl-Färbung.....	30
Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper innerhalb der chromogen-immunhistochemischen Färbung.....	33
Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper innerhalb der chromogen-immunhistochemischen Färbung.....	34
Tabelle 8: Protokoll der Dehydratation der Gewebsschnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe.....	34
Tabelle 9: Protokoll der chromogen-immunhistochemischen Färbung.....	35
Tabelle 10: Protokoll der Entparaffinierung mittels Xylol und absteigender Alkoholreihe...	36
Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper innerhalb der Immunfluoreszenzfärbungen.....	37
Tabelle 12: Verwendete Sekundärantikörper innerhalb der Immunfluoreszenzfärbungen....	37
Tabelle 13: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung.....	38
Tabelle 14: Exemplarische Darstellung der Details der Volumenbestimmung des Kortex (CTX), Corpus callosum (CC) und des Subkortex (SCTX) einer vollständig vermessenen Schnittserie eines Versuchs- bzw. Kontrolltieres.....	46
Tabelle 15: Details der Volumenbestimmung des Kortex (CTX) der Versuchstiere (Cuprizone; n = 5) und der Kontrolltiere (Kontrolle; n = 4) nach akuter Cuprizone-Intoxikation (5 Wochen).....	55
Tabelle 16: Details der Volumenbestimmung des Corpus callosum (CC) der Versuchstiere (Cuprizone; n = 5) und der Kontrolltiere (Kontrolle; n = 4) nach akuter Cuprizone-Intoxikation (5 Wochen).....	57
Tabelle 17: Details der Volumenbestimmung des Subkortex (SCTX) der Versuchstiere (Cuprizone; n = 5) und der Kontrolltiere (Kontrolle; n = 4) nach akuter Cuprizone-Intoxikation (5 Wochen).....	59
Tabelle 18: Details der Volumenbestimmung des Kortex (CTX) der Versuchstiere (Cuprizone; n = 5) und der Kontrolltiere (Kontrolle; n = 6) nach chronischer Cuprizone-Intoxikation (12 Wochen).....	62
Tabelle 19: Details der Volumenbestimmung des Corpus callosum (CC) der Versuchstiere (Cuprizone; n = 5) und der Kontrolltiere (Kontrolle; n = 6) nach chronischer Cuprizone-Intoxikation (12 Wochen).....	64
Tabelle 20: Details der Volumenbestimmung des Subkortex (SCTX) der Versuchstiere (Cuprizone; n = 5) und der Kontrolltiere (Kontrolle; n = 6) nach chronischer Cuprizone-Intoxikation (12 Wochen).....	66

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
APP	Amyloid-Vorläuferprotein; engl. <i>amyloid precursor protein</i>
BBB	Blut-Hirn-Schranke; engl. <i>blood-brain-barrier</i>
BCR	Bicaudates Verhältnis; engl. <i>bicaudate ratio</i>
CA-II	zytosolische Carboanhydrase II
CC	<i>region of interest</i> : Corpus callosum
CIS	klinisch isoliertes Syndrom; engl. <i>clinically isolated syndrome</i>
CNPase	2',3'-zyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase
CTX	<i>region of interest</i> : Kortex
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DDIT3	engl. <i>DNA Damage Inducible Transcript 3</i>
DGM	tiefe graue Substanz; engl. <i>deep grey matter</i>
DMT	verlaufsmodifizierende Therapie; engl. <i>disease-modifying-therapy</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	engl. <i>Expanded Disability Status Scale</i>
FELASA	engl. <i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
GFAP	saures Gliafaserprotein
HIER	engl. <i>heat induced epitope retrieval</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
IBA1	ionisiertes kalziumbindendes Adaptermolekül
Ig	Immunglobulin
LFB	Luxol-Fast-Blue
LPC	Lysophosphatidylcholin
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MAO	Monoaminoxidase
MBP	basische Myelinprotein
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex; engl. <i>major histocompatibility complex</i>
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MRI	Magnetresonanztomografie; engl. <i>magnetic resonance imaging</i>
MS	Multiple Sklerose
MSFC	engl. <i>Multiple Sclerosis Functional Composite</i>

NAA	N-Acetylaspartat
NeuN	neuronales Kernantigen
NGS	Normales Ziegenserum
OPC	Oligodendrozyten-Vorläuferzellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PLP	Proteolipid-Protein
PPMS	primär progrediente MS; engl. <i>primary-progressive MS</i>
RAG1	engl. <i>recombination activating gene 1</i>
RIS	radiologisch isoliertes Syndrom
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	engl. <i>region of interest</i>
RRMS	schubförmig remittierende MS; engl. <i>relapsing-remitting MS</i>
SCTX	<i>region of interest</i> : Subkortex
SPMS	sekundär progrediente MS; engl. <i>secondary-progressive MS</i>
SRS	engl. <i>systematic and random sampling</i>
TierSchG	Tierschutzgesetz
TMEV	Theilers murine Enzephalomyelitis Virus
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Die Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Klassischerweise kommt es zur Ausbildung herdförmiger Läsionen, in denen es zu Entzündung, Demyelinisierung und axonaler Degeneration kommt. Das klinische Bild ist sehr heterogen und richtet sich nach den einzelnen oder multiplen Ausfällen im gesamten ZNS (Goodin, 2014; Nylander & Hafler, 2012; Sand & Lublin, 2013; Thompson, Banwell, et al., 2018). Die Prävalenz der MS variiert international stark und liegt bei 50 – 300 Fällen pro 100.000 Einwohner. Die höchste Prävalenz findet sich in den nördlichen Industriestaaten, in Nordamerika und Europa (Browne et al., 2014). Allgemein sind Frauen häufiger betroffen als Männer (ca. 2:1). Das Erkrankungsalter liegt überwiegend zwischen dem 15. und 45. Lebensjahr (Alonso & Hernán, 2008; Goodin, 2014). Klinisch werden die remittierenden von den progredienten Formen unterschieden. Hierbei kommt es zur Unterteilung in drei klassische Verlaufsformen (Abbildung 1) (Lublin et al., 2014; Lublin & Reingold, 1996).

Die häufigste Form (85 %) ist die schubförmig remittierende MS (engl. *relapsing-remitting MS*; RRMS) (Keegan & Noseworthy, 2002; Weinshenker, 1994). Hierbei kommt es schubweise zu neu auftretenden neuronalen Dysfunktionen und Läsionen im radiologischen Bild. Die klinischen Symptome sind vielfältig und richten sich nach dem Ort der Läsion. Die aktive Krankheit („Schub“) erreicht ein Maximum und geht anschließend in eine Plateauphase über. In dieser bleiben die vorhandenen Symptome zwar bestehen, es kommt jedoch nicht zu neuen Beeinträchtigungen. Im Verlauf der folgenden Wochen und Monate kommt es zu einer Remission mit teilweiser oder vollständiger Rückbildung der neuronalen Dysfunktionen. Bei inkompletter Remission kommt es zu einer Akkumulation von Behinderung über den Zeitverlauf der Erkrankung. Die RRMS geht häufig nach Jahren in eine sekundär progrediente Form über (Bejaoui & Rolak, 2010; Keegan & Noseworthy, 2002). Teilweise werden beim Erstauftreten aktiver Krankheit mit Verdacht auf MS die Diagnosekriterien der MS trotz Krankheitsschub nicht ausreichend erfüllt. Dieser Zustand wird als *clinically isolated syndrome* (CIS) bezeichnet, die Diagnose MS kann bei entsprechender Entwicklung erst im Verlauf gestellt werden (Lublin et al., 2014; Miller et al., 2012).

Die sekundär progrediente MS (engl. *secondary-progressive MS*; SPMS) entsteht aus einer bestehenden RRMS. Dabei nehmen Frequenz und Intensität der Schübe und Remissionen ab und es entwickelt sich ein progredienter Krankheitsverlauf. Es kommt zur permanenten, Schub-unabhängigen Zunahme der klinischen Beeinträchtigung. Der Übergang von RRMS in SPMS erfolgt ca. 10 – 20 Jahre nach Krankheitsbeginn (Eriksson et al., 2003). Die Diagnose der SPMS kann nur retrospektiv gestellt werden, da es keine spezifischen Zeichen für einen Übergang in die SPMS gibt (Lublin et al., 2014).

Etwa 10 % der Patienten zeigen direkt bei Krankheitsbeginn einen primär progredienten Verlauf (engl. *primary-progressive MS*; PPMS). Es kommt zur permanenten und kontinuierlichen Zunahme der klinischen Beeinträchtigung. Innerhalb dieses Verlaufs kann die Krankheitsaktivität stellenweise schwanken und schneller oder langsamer fortschreiten. Die Diagnose der PPMS wird anhand des klinischen Bildes und Verlaufs gestellt (Ebers, 2004; Keegan & Noseworthy, 2002; Koch et al., 2009)

Die MS wird mit einer verlaufsmodifizierenden Therapie (engl. *disease-modifying-therapy*; DMT) behandelt. Bei akuten Krankheitsschüben werden im Rahmen einer Schubtherapie Glucocorticoide eingesetzt (Galea et al., 2015). Mit Hilfe immunmodulatorischer und immunsuppressiver Medikamente kann vor allem der Krankheitsverlauf von Patienten mit RRMS positiv beeinflusst werden (Oh & O'Connor, 2015). Bei progredienten Formen der MS hat die DMT nur wenig Effekt und kann den Krankheitsfortschritt nicht wirksam beeinflussen. Hier sind die therapeutischen Optionen noch immer unzureichend (Thompson, Baranzini, et al., 2018; Wingerchuk & Carter, 2014).

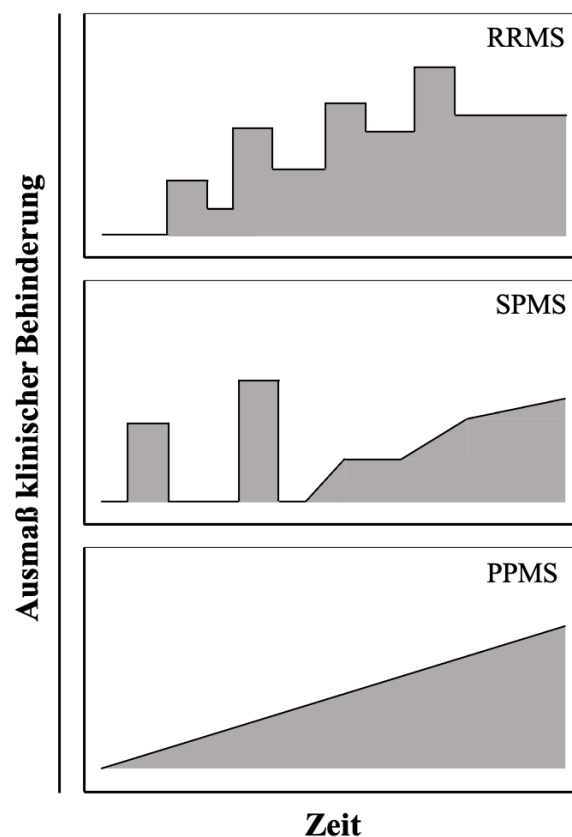


Abbildung 1: Schematische Darstellung der klinischen Verlaufsformen der MS

(schubförmig remittierende MS; **RRMS**) schubförmiger Krankheitsverlauf mit inkompletten Remissionen. Zwischen den Krankheitsschüben kommt es zu einer Plateauphase ohne neu auftretende Symptomatik. Im Krankheitsverlauf kommt es zu einer Akkumulation klinischer Behinderung. (sekundär progrediente MS; **SPMS**) nach schubförmigem Beginn der Erkrankung kommt es zu einem Wechsel auf einen chronisch-progredienten Krankheitsverlauf. (primär progrediente MS; **PPMS**) primär chronisch-progredienter Krankheitsverlauf ohne Schübe oder Remissionen.

Die MS ist ein sehr komplexes und heterogenes Krankheitsbild. Die Ursache der Erkrankung ist noch immer nicht bekannt (Goodin, 2014; Nylander & Hafler, 2012). Eine genetische Prädisposition scheint jedoch eine Rolle zu spielen. Besonders bestimmte Allele der Haupthistokompatibilitätskomplexe (engl. *major histocompatibility complex*; MHC) Klasse I und II, speziell des HLA-DRB1 Gens, sind mit der Krankheit assoziiert (Friese et al., 2008; Lincoln et al., 2005). In Zwillingsstudien wurde für monozygotische Zwillinge eine Konkordanzrate für MS von 25-30 % festgestellt. Bei dizygoten Zwillingen betrug die Konkordanzrate jedoch nur noch 3-5 % und entsprach damit dem normalen Risiko für Geschwister (Sadovnick et al., 1993). Die MS häuft sich innerhalb betroffener Familien. Im Vergleich zur Normalbevölkerung haben Verwandte ersten Grades ein bis zu siebenfach erhöhtes Erkrankungsrisiko (Nielsen et al., 2005).

Des Weiteren wird die Krankheitsentstehung durch diverse Umweltfaktoren, wie Sonnenlicht, Infektionen und Tabakrauch, beeinflusst (Franklin & Nelson, 2003). Beispielsweise besteht ein Zusammenhang zwischen Inzidenz und geografischer Breite. Länder mit großer Entfernung zum Äquator haben eine höhere Inzidenz für MS als äquatornahe Länder (Alonso & Hernán, 2008). Ein möglicher Faktor dabei ist die Sonnenlichtexposition. In Zwillingsstudien wurde gezeigt, dass eine höhere Sonnenlichtexposition im Kindesalter protektiv wirkt und ein geringeres Erkrankungsrisiko zur Folge hat (Islam et al., 2007). Als mögliche Erklärung für diesen Effekt werden Unterschiede im Vitamin-D Spiegel herangezogen (Grant, 2006). Tatsächlich sind höhere Vitamin-D Spiegel im Blut mit einer verringerten Erkrankungswahrscheinlichkeit assoziiert (Munger et al., 2006). Ein weiterer Umweltfaktor in der Ätiologie der MS sind bakterielle und virale Infektionen. Insbesondere die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) scheint von besonderer Bedeutung zu sein (Ascherio & Munger, 2007; Thacker et al., 2006). Nahezu alle Patienten mit MS sind seropositiv für EBV. Außerdem haben Menschen mit aktiver EBV-Infektion oder hohen Antikörper-Titern ein erhöhtes Risiko an MS zu erkranken (Ascherio & Munger, 2007, 2010; Levin et al., 2005).

1.2 Das Cuprizone-Modell

Um die Pathologie und das komplexe Bild der MS besser zu verstehen, verwendet man verschiedene Tiermodelle. Mit Hilfe dieser Modelle können einzelne Aspekte der MS, darunter Entzündung, Demyelinisierung, Remyelinisierung und Neurodegeneration im ZNS, genauer untersucht werden. Noch gibt es jedoch kein Tiermodell, welches die volle Bandbreite der klinischen, pathologischen und immunologischen Eigenschaften der MS abbilden kann (Lassmann & Bradl, 2017). Das am häufigsten verwendete Tiermodell ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). Dabei werden den Versuchstieren Proteine der Myelinscheiden injiziert. Die injizierten Antigene rufen eine systemische Autoimmunreaktion hervor, bei welcher das Myelin angegriffen wird. Typische Antigene sind das basische Myelinprotein (MBP), Proteolipid-Protein (PLP), oder Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG). Das EAE-Modell erzeugt eine akute, chronisch schubhafte, entzündlich-demyelinisierende Autoimmunerkrankung (Kipp et al., 2009; Kipp, Nyamoya, et al., 2017; Lassmann, 2007). Weitere wichtige Tiermodelle der MS-Forschung sind die Theilers murine Enzephalomyelitis (TMEV), bei welchem die Demyelinisierung viral induziert wird sowie das Lysophosphatidylcholin (LPC)-Modell, welches, wie auch das Cuprizone-Modell, zu den toxisch demyelinisierenden Modellen gehört (Blakemore & Franklin, 2008; Tsunoda & Fujinami, 2010). Darüber hinaus entwickelte unsere Arbeitsgruppe das Cup/EAE-Modell, welches die toxisch induzierte Demyelinisierung durch Cuprizone-Intoxikation mit einer darauffolgenden, aktiven EAE-Immunsierung kombiniert (Oleszak et al., 2004; Scheld et al., 2016).

Das Cuprizone-Modell gehört zu den toxisch-demyelinisierenden Modellen und ermöglicht die Untersuchung reproduzierbarer akuter und chronischer Demyelinisierung des ZNS sowie begleitender Remyelinisierungsvorgänge (Kipp & Baumgartner, 2011; Praet et al., 2014). Die Demyelinisierung wird dabei primär durch eine Degeneration der Oligodendrozyten und nicht durch einen direkten Schaden am Myelin hervorgerufen (Kipp et al., 2009).

Das Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon, Abbildung 2), ein Kondensationsprodukt aus Oxalhydrazid und Cyclohexanon, wurde erstmalig 1950 von Gustav Nilsson beschrieben. Es ist ein Kupfer-Chelator und bildet in Verbindung mit diesem einen auffälligen, blauen Komplex mit Absorptionsbande um 595 nm (Messori et al., 2007; Nilsson et al., 1950). Aufgrund der intensiven Färbung wurde es primär zur quantitativen Bestimmung von Kupferanteilen verschiedener Proben verwendet. Die erste biomedizinische Anwendung erfolgte 1966 durch William W. Carlton. Er stellte fest, dass Cuprizone mikroskopische Läsionen im Gehirn verursacht, welche von Ödembildung, Hydrocephalus, Demyelinisierung und Astrogliose begleitet werden. Carlton versetzte Futter mit unterschiedlichen Mengen Cuprizone (Anteil 0,2 – 0,5 %) und beobachtete eine dosisabhängige Wachstumsverzögerung bei den behandelten Tieren. Hohe Konzentrationen (0,5 %) führten vor allem bei jungen Tieren

zu einer hohen Mortalität. Während vier Wochen alte Tiere eine Mortalität von 100 % aufwiesen, betrug die Mortalität bei acht Wochen alten Tieren nur 20 %. In seinen Versuchen nutzte Carlton Mäuse, Ratten und Meerschweinchen (Carlton, 1966, 1967, 1969; Kesterson & Carlton, 1970).

In den folgenden Jahren wurden vor allem verschiedenste Mäusestämme für das Cuprizone-Modell verwendet, darunter Swiss, Albino, BALB/c, BSVS, CD1, ICI und SJL (Praet et al., 2014). Neben Dosierung und Dauer der Cuprizone-Intoxikation haben auch Stamm, Alter, Gewicht und Geschlecht einen erheblichen Einfluss auf den Studienverlauf (Irvine & Blakemore, 2006; Leopold et al., 2019; Taylor et al., 2009; Valeiras et al., 2014). Beispielsweise weichen Ort und Stärke der Demyelinisierung bei SJL-Mäusen deutlich von der Pathologie bei C57BL/6-Mäusen ab (Taylor et al., 2009). In einer wegweisenden Arbeit zeigten Hiremath et al. (1998), dass die Intoxikation von acht bis zehn Wochen alten C57BL/6-Mäusen mit 0,2 % Cuprizone in Normalfutter zu einer stetigen und hoch reproduzierbaren Demyelinisierung bei gleichzeitig geringer Toxizität führt. Nach 5 - 6 Wochen wird so eine vollständige Demyelinisierung des medialen Corpus callosum erreicht (Hiremath et al., 1998). Die vorteilhaften Eigenschaften dieses Verfahrens trugen maßgeblich dazu bei, dass sich der Versuchsaufbau mit 6 - 9 Wochen alten C57BL/6-Mäusen und die Fütterung mit 0,2 – 0,3 % Cuprizone in Normalfutter als häufigste Form des Cuprizone-Modells etablierte (Gudi et al., 2014; Kipp & Baumgartner, 2011; Praet et al., 2014).

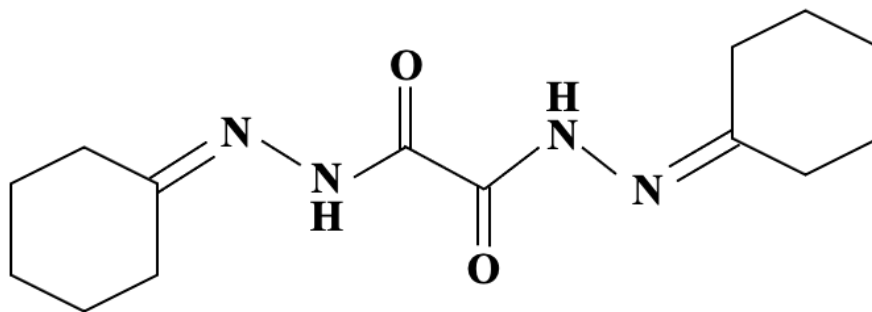


Abbildung 2: Strukturformel von Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon)

Im Cuprizone-Modell mit C57BL/6-Mäusen gibt es heutzutage zwei standardmäßig angewandte Versuchsabläufe. Für das Modell der akuten Demyelinisierung werden die Tiere über fünf bis sechs Wochen mit 0,2 – 0,3 % Cuprizone in Normalfutter gefüttert. Dabei bilden sich akute, demyelinisierende Läsionen im ZNS, bestimmte Bereiche des Corpus callosum werden nahezu vollständig demyelinisiert. Wird nach Ende der fünf Wochen wieder auf Normalfutter umgestellt, erfolgt eine spontane Remyelinisierung der geschädigten Bereiche. Beim Modell der chronischen Demyelinisierung erfolgt eine prolongierte Cuprizone-Gabe, bei der die Cuprizone-Intoxikation über 12 oder mehr Wochen fortgeführt wird. Es entstehen chronisch demyelinisierte Läsionen, in denen Remyelinisierungsvorgänge deutlich beeinträchtigt bis komplett erloschen sind (Armstrong, 2007; Harsan et al., 2008; Tansey et al., 1996; Torkildsen et al., 2008).

Das Ausmaß der De- und Remyelinisierung kann durch verschiedenste Labortechniken untersucht werden, beispielsweise durch histochemische Färbungen wie der Luxol-Fast-Blue (LFB) Färbung oder durch immunhistochemische Markierung von Myelinbestandteilen wie MBP oder PLP (Acs et al., 2009; Harsan et al., 2008; Norkute et al., 2009). Anfänglich ging man davon aus, dass die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung hauptsächlich die weiße Substanz, vor allem das mediale Corpus callosum und den Pedunculus cerebellaris superior betrifft (Torkildsen et al., 2008). Inzwischen weiß man jedoch, dass verschiedenste Strukturen, auch der grauen Substanz, betroffen sind. Cuprizone-Läsionen finden sich außerdem in Kortex (Gudi et al., 2009; Skripuletz et al., 2008), Cerebellum (Groebe et al., 2009), Hippocampus (Norkute et al., 2009) und Teilen der Basalganglien (Pott et al., 2009).

Die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung erfolgt nicht durch eine direkte Schädigung des Myelins, sondern entsteht auf Basis der Degeneration der Oligodendrozyten. Hierbei scheinen die peripheren Anteile der Oligodendrozyten empfindlicher zu sein als ihre Zellkörper (Carlton, 1966, 1967; Tansey et al., 1996). Der Wirkmechanismus des Cuprizones und die Ursache der Schädigung der Oligodendrozyten ist jedoch noch nicht ausreichend verstanden. Vor allem mitochondriale Störungen scheinen eine wichtige Rolle in der hervorgerufenen Pathologie zu spielen. In den Hepatozyten und Oligodendrozyten mit Cuprizone behandelte Mäuse können Riesensomitochondrien gefunden werden (Blakemore, 1972; Suzuki, 1969). Diese morphologischen Veränderungen sind Zeichen metabolischer Störungen der Mitochondrien (Hoppel & Tandler, 1973). Durch seine Eigenschaft als Kupfer-Chelator beeinflusst Cuprizone die Kupfer-Homöostase. Dies könnte speziell jene mitochondrialen Enzyme stören, welche Kupfer als Cofaktor benötigen. Beispielsweise konnte eine Inhibition der Monoaminoxidase (MAO) bereits drei Tage nach Beginn der Cuprizonegabe festgestellt werden (Kesterson & Carlton, 1971; Venturini, 1973). Darüber hinaus zeigte sich in Leber und Hirngewebe eine Inhibition der Cytochrom-c-Oxidase, deren aufgebauter Protonengradient maßgeblicher Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung ist (Venturini, 1973). Weiter findet sich eine verringerte Aktivität der Komplexe I, II, III der Atmungskette in behandelten Oligodendrozytenkulturen sowie isolierten Mitochondrien mit Cuprizone behandelte Mäuse. (Pasquini et al., 2007). Dies verdeutlicht die Störung speziell des mitochondrialen Metabolismus und somit des Energiehaushalts der gesamten Zelle.

Eine regelhafte Funktion der Mitochondrien ist für Oligodendrozyten von besonderer Bedeutung, da sie durch ihre hohe Syntheseleistung zur Aufrechterhaltung der Myelinscheiden einen erhöhten zellulären Metabolismus und Bedarf an Sauerstoff und Adenosintriphosphat haben (Bradl & Lassmann, 2010; McTigue & Tripathi, 2008). Interessanterweise konnte keine Änderung der Enzymaktivität festgestellt werden, wenn bereits mit Kupfer chelatiertes Cuprizone zur Fütterung verabreicht wurde (Venturini, 1973). Trotzdem wurde durch die simultane Substitution von Kupfer während der Cuprizone-Intoxikation keine Reduktion der Toxizität erreicht (Carlton, 1966, 1967). Möglicherweise ist Cuprizone als Chelator jedoch nicht selektiv für Kupfer, sondern geht auch Komplexe mit anderen Metallen wie Zink, Eisen,

oder Mangan ein (Hoppel & Tandler, 1973; Venturini, 1973; Zatta et al., 2005). Dadurch könnten verschiedenste Metalloenzyme in ihrer Funktion gestört werden. Die Aktivität der zinkabhängigen zytosolischen Carboanhydrase II (CA-II) fällt bei Cuprizone-Intoxikation früh ab, noch bevor sich eine Demyelinisierung feststellen lässt (Cammer et al., 1995; Komoly et al., 1987). Das Enzym ist relevant, um akute Änderungen des pH-Milieus im Gehirn zu puffern. Störungen der intrazerebralen pH-Homöostase können zu Oligodendrozytenstress und Zelltod führen (Kida et al., 2006). Außerdem wird vermutet, dass die CA II zur Formation und Verdichtung des Myelins beiträgt, da es bei der Myelinisierung im Rahmen der Gehirnentwicklung aktiviert wird (Delaunoy et al., 1980; Ghandour et al., 1980; Komoly et al., 1987). Die Cuprizone-Intoxikation führt außerdem zur Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems, speziell von Mikroglia und Astrozyten (Hiremath et al., 1998). Von diesen Zellen ausgeschüttete, proinflammatorische Zytokine sind mit oxidativem, metabolischem Stress der Oligodendrozyten und einer Exazerbation der akuten Demyelinisierung assoziiert. Eine Inhibition der Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPC) ist in diesem Zusammenhang ein weiterer möglicher Wirkmechanismus der Pathologie durch Cuprizone (Arnett et al., 2001; Pasquini et al., 2007).

In Regionen toxischer Demyelinisierung durch Cuprizone kommt es darüber hinaus zu axonalem Schaden. Hierbei findet sich eine Akkumulation von Amyloid-Vorläuferprotein positiven (APP⁺) Sphroiden innerhalb der Axone, was ein Zeichen eines gestörten anterograden axonalen Transports ist (Höflich et al., 2016; Rühling et al., 2018). Allgemein gilt die durch Cuprizone induzierte Demyelinisierung als unabhängig von peripheren Immunzellen, speziell Lymphozyten (Hiremath et al., 2008; Sen et al., 2019; Tejedor et al., 2017). Beispielsweise sind RAG1-defiziente Mäuse (engl. *recombination activating gene 1*) unter Cuprizone-Intoxikation gleichermaßen von Demyelinisierung und Oligodendrozytenschaden betroffen wie Kontrolltiere (Hiremath et al., 2008). Auch die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (engl. *blood-brain barrier*; BBB) bleibt unter Cuprizone-Intoxikation weitestgehend intakt (Bakker & Ludwin, 1987). Trotzdem kommt es nach Cuprizone-Intoxikation vereinzelt zu einer Anwesenheit peripherer Immunzellen (McMahon et al., 2002; Remington et al., 2007). Kaddatz et al. (2021) konnten in ihrer Studie die Einwanderung von CD8-positiven T-Zellen nach toxischer Demyelinisierung durch Cuprizone feststellen. Sie konnten zeigen, dass die toxische Demyelinisierung durch Cuprizone ein ausreichend potenter Auslöser für die Rekrutierung peripherer Immunzellen ins ZNS ist.

1.3 Neuropathologie der Multiplen Sklerose und Parallelen zum Tiermodell

Neuropathologisch zeigen sich bei der MS fokale entzündliche, demyelinisierte Läsionen im Gehirn und Rückenmark. Innerhalb dieser kommt es zu einem entzündlichen Infiltrat vor allem aus T-Zellen und Makrophagen. Es kommt zur Apoptose von Oligodendrozyten, zu axonalem Schaden und zur Gliose. Der Nachweis von oligoklonalem Immunglobulin G im Liquor der Patienten sowie die Gadolinium-Aufnahme verschiedener Läsionen lassen auf eine Störung der Blut-Hirn-Schranke schließen (Popescu et al., 2013). Die genaue Pathophysiologie der MS ist jedoch noch nicht verstanden (Goodin, 2014; Nylander & Hafler, 2012). Grundsätzlich werden eine autoimmune Pathogenese oder eine primär neurodegenerative Genese der Erkrankung diskutiert (Barnett & Prineas, 2004; Baxi et al., 2015; Lucchinetti et al., 2000; Maggi et al., 2014; Stys et al., 2012).

In detaillierten histopathologischen Studien stellten Lucchinetti et al. (2000) deutliche interindividuelle Unterschiede im Muster der Demyelinisierung bei MS-Patienten fest. Trotz Gemeinsamkeiten in der Entzündungsreaktion (Infiltrat aus T-Zellen und Makrophagen, Zerstörung von Myelin) trennten deutlich heterogene histopathologische Merkmale die Läsionen in vier verschiedene Subtypen. Während die Läsionen des Typs I und II primär durch eine deutliche Entzündungsreaktion mit und ohne Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplementfaktoren charakterisiert sind, werden die Läsionen des Typs III und IV vor allem durch Zeichen der Oligodendrozytendystrophie bzw. Apoptose definiert. Der bei MS-Patienten am häufigsten vorgefundene Läsionstyp ist Typ II. Jedoch bestehen signifikante Unterschiede in der Häufigkeit der einzelnen Läsionstypen zwischen akuter MS (Probengewinnung innerhalb des ersten Jahres nach Krankheitsbeginn) und chronischer MS. Speziell Typ III-Läsionen finden sich hauptsächlich bei Patienten mit einem Krankheitsverlauf von zwei oder weniger Monaten bis zur Biopsie bzw. Autopsie (Kipp et al., 2009; Lucchinetti et al., 2000).

Läsionen des Typs III unterscheiden sich durch mehrere Merkmale in besonderem Maße von Typ I und II-Läsionen (Lucchinetti et al., 2000). Speziell im Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis konnten jedoch bislang keine Veränderungen gefunden werden, die dieses histopathologische Muster widerspiegeln. Die Ergebnisse stützen die Annahme, dass die Demyelinisierung bei MS-Patienten mit Läsionen des Typs III auf einer funktionellen Störung der Oligodendrozyten beruht. Die Ursache einer solchen Störung könnte möglicherweise eine Infektion oder ein Toxin sein (Kipp et al., 2009). Im toxisch demyelinisierenden Cuprizone-Modell sind Störungen der Oligodendrozyten das wesentliche pathologische Merkmal. Tatsächlich weist das histopathologische Muster der Demyelinisierung im Cuprizone-Modell dabei Parallelen zum Muster einer Typ III-Läsion auf (Torkildsen et al., 2008). Beispielsweise sind die Läsionen im Cuprizone-Modell nicht um zentrale Venen angeordnet und ihr Randbereich ist nur unscharf begrenzt (Kipp et al., 2009). Innerhalb der Regionen aktiver Demyelinisierung können im Cuprizone-Modell apoptotische

Oligodendrozyten gefunden werden (Buschmann et al., 2012). Außerdem ist in der frühen Phase der Demyelinisierung das Expressionslevel der MAG mRNA geringer als das Level anderer Marker für Myelin-Protein (Morell et al., 1998).

Grundsätzlich werden mehrere wichtige histopathologische Aspekte der MS im Cuprizone-Modell gut abgebildet. Es findet sich eine erhöhte Dichte von Mitochondrien in demyelinisierten Axonen sowohl in aktiven MS-Läsionen (Witte et al., 2009), als auch in Cuprizone-induzierten Läsionen weißer Substanz (Ohno et al., 2014). Weiter zeigt sich eine selektive Degeneration der inneren Myelin-Lamelle bei anderweitig intakter Myelinscheide, die sogenannte *dying-back oligodendroglipathy*. Diese betrifft primär die distalen Fortsätze der Oligodendrozyten und wurde sowohl in Läsionen der MS (Rodriguez & Scheithauer, 1994) als auch im Cuprizone-Modell beschrieben (Johnson & Ludwin, 1981). Ebenso wurde die Anwesenheit von aktivierter Caspase-3 exprimierenden, prä-apoptischen Oligodendrozyten während der Läsionsentstehung sowohl in der MS (Prineas & Parratt, 2012) als auch bei Cuprizone-induzierter Demyelinisierung beschrieben (Buschmann et al., 2012). Darüber hinaus kommt es sowohl in der MS (Bitsch et al., 2000; Ferguson et al., 1997) als auch im Cuprizone-Modell (Höflich et al., 2016; Rühling et al., 2018) zu axonalem Schaden.

Die biochemischen Vorgänge, durch die es bei Cuprizone-Intoxikation zum Schaden an Oligodendrozyten kommt, sind jedoch noch nicht ausreichend erforscht (Kipp et al., 2009; Zatta et al., 2005). Obwohl Cuprizone ein Kupfer-Chelator ist, wird beispielsweise noch immer kontrovers diskutiert, in wie weit sich der Kupfer-Spiegel durch die Intoxikation verändert (Venturini, 1973; Zatta et al., 2005). Ferner ist auch in der MS nicht bekannt, welche Mechanismen dem Untergang von Oligodendrozyten innerhalb der Läsionen zugrunde liegen. Dementsprechend ist unklar, inwieweit ähnliche Pathomechanismen in der MS-Läsion und dem Cuprizone-Modell zum Verlust der Oligodendrozyten führen (Kipp et al., 2009). Die Komplexität der MS kann momentan von keinem experimentellen Tiermodell in seiner Gesamtheit erfasst werden. Aus diesem Grund können die unterschiedlichen experimentellen Tiermodelle und Protokolle am ehesten dazu genutzt werden, selektiv einzelne Teilaspekte der pathologischen Prozesse und Reparaturvorgänge der MS herauszuarbeiten und zu untersuchen (Kipp et al., 2009; Kipp, Nyamoya, et al., 2017; Vega-Riquer et al., 2019).

1.4 Neurodegeneration und Atrophie in der Multiplen Sklerose

Die Pathologie der MS ist geprägt durch die Aspekte der Entzündung und der Neurodegeneration (Noseworthy et al., 2000). Histopathologisch kennzeichnend ist die fokale Demyelinisierung weißer und grauer Substanz, getrieben von einem Zusammenspiel aus ortsständigen Hirnzellen, wie Mikroglia und Astrozyten, sowie peripheren Immunzellen, wie Lymphozyten und Monozyten. Die fokale und diffuse Invasion und Aktivierung dieser Immunzellen führt neben der Demyelinisierung zum Schaden an Nervenzellen (Carassiti et al., 2018). Dabei können jegliche neuronalen Substrukturen, inklusive Axone, Dendriten und axonale Spines, im Gehirn der MS-Patienten zerstört werden (Dutta et al., 2011; Jürgens et al., 2016; Peterson et al., 2001; Trapp et al., 1998). Letztendlich kann es zum Untergang ganzer Nervenzellen kommen (Kipp, Nyamoya, et al., 2017; Peterson et al., 2001).

Im klinischen Bereich ist die Bildgebung mittels Magnetresonanztomografie (engl. *Magnetic resonance imaging*; MRI) ein wichtiges diagnostisches Mittel in Bezug auf die MS. Sie ist maßgeblicher Bestandteil der Diagnosestellung, Beurteilung und Verlaufsprognose der Erkrankung (Polman et al., 2011; Sand & Lublin, 2013; Thompson, Banwell, et al., 2018). Ein wichtiger Marker der globalen Pathologie und Neurodegeneration der MS ist dabei die Darstellung der Atrophie von Hirngewebe (Miller et al., 2002). Neben der klassischen Erhebung demyelinisierender Läsionen in weißer und grauer Substanz, entwickelt sich die Darstellung der Gehirnatrophie zu einem zunehmend bedeutsamen Parameter und prognostischen Faktor (Bermel & Bakshi, 2006; Miller et al., 2002; Rojas et al., 2016).

Es konnte gezeigt werden, dass Gehirnatrophie schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Erkrankung nachweisbar ist. Teilweise tritt sie in Stadien auf, in denen noch keine klinischen Symptome der MS vorhanden sind (De Stefano et al., 2011; Okuda et al., 2014). Die Gehirnatrophie ist außerdem von prognostischer Bedeutung für den klinischen Verlauf des CIS und die Wahrscheinlichkeit einer Konversion zur MS (Di Filippo et al., 2010; Filippi et al., 2004; Fisniku et al., 2008; Pérez-Miralles et al., 2013). Allgemein findet sich bei Patienten mit RRMS ein durchschnittlicher Verlust an Gehirnvolumen von ca 0,6 % - 1,35 % pro Jahr (Bermel & Bakshi, 2006). Am häufigsten wurde Gehirnatrophie bei Patienten mit RRMS untersucht. Sie scheint besonders in frühen Stadien der Erkrankung verstärkt stattzufinden (Zivadinov & Bakshi, 2004).

Das Ausmaß der Gehirnatrophie ist ein wichtiger Parameter im Bezug auf die physische Beeinträchtigung der MS-Patienten. Fisher et al. (2002) untersuchten den Zusammenhang zwischen Gehirnatrophie und dem klinischen Grad physischer Behinderung über einen Zeitraum von acht Jahren. Dabei korrelierte die Rate der Gehirnatrophie positiv mit der Schwere der Behinderung bzw. der Verschlechterung des *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) sowie der Funktionalität im *Multiple Sclerosis Functional Composite* (MSFC). Das Ausmaß der Atrophie im Zeitraum der frühen Erhebung war der beste prädiktive Faktor des

MRI für den Grad der Behinderung im EDSS nach acht Jahren bei Patienten mit RRMS. Speziell die Atrophierate grauer Substanz korreliert positiv mit physischer Behinderung. Der Verlust grauer Substanz bei MS zeigt sich unter anderem in der Abnahme der Kortexdicke. Besonders der Substanzverlust im Motorkortex ist assoziiert mit einem Fortschritt physischer Behinderung sowie einem schweren klinischen Verlauf (Chen et al., 2004; Fisher et al., 2008; Sailer et al., 2003). In der Untersuchung von Fisniku et al. (2008) fand sich eine stärkere Atrophie der grauen Substanz bei Patienten mit SPMS verglichen mit RRMS und stärker bei RRMS verglichen mit CIS. Die Atrophie der grauen Substanz korrelierte dabei besser als die der weißen Substanz mit der Zunahme physischer Behinderung (EDSS) und Abnahme der Funktionalität (MSFC).

Neben der Motorik beeinflusst die MS auch verschiedenste neuropsychologische Bereiche, wie Kognition, Stimmung, Persönlichkeit und Lebensqualität (Amato et al., 1995; Bakshi et al., 2000; Benedict, Carone, et al., 2004; Janardhan & Bakshi, 2000). Kognitive Beeinträchtigungen treten in allen Stadien der MS auf und sind bereits präklinisch im Rahmen des radiologisch isolierten Syndroms (RIS) nachweisbar (Amato et al., 2008; 2012). Insgesamt besteht eine breite Evidenz über einen Zusammenhang zwischen Gehirnatrophie und dem neuropsychologischen Status der Patienten (Amato et al., 2007; Batista et al., 2012; Calabrese et al., 2010; Houtchens et al., 2007). In der frühen Phase der RRMS findet sich eine signifikante Korrelation der Gehirnatrophie mit der kognitiven Verschlechterung der Patienten (Zivadinov et al., 2001). Dabei zeigt die Gehirnatrophie im MRI einen größeren Einfluss auf die kognitive Verschlechterung als die Läsionslast und ist assoziiert mit neuropsychologischer Morbidität (Benedict, Weinstock-Guttman, et al., 2004).

Besonders die Atrophie subkortikaler Gehirnstrukturen korreliert signifikant mit kognitiver Beeinträchtigung. Diese Korrelation erscheint sogar stärker als die Korrelation mit der Gesamtgehirnatrophie oder Läsionslast (Benedict, Weinstock-Guttman, et al., 2004; Bermel et al., 2002; Calabrese et al., 2010; Christodoulou et al., 2003; Eshaghi et al., 2018; Sánchez et al., 2008). Sánchez et al. (2008) beobachteten eine erhöhte ventrikuläre Atrophie bei MS-Patienten mit kognitiver Beeinträchtigung verglichen mit Patienten ohne solche Beeinträchtigungen. Die Weite des dritten Ventrikels erwies sich dabei als bester prädiktiver Faktor hierfür. Bermel et al. (2002) fanden bei MS Patienten ein erhöhtes Bicaudates Verhältnis (engl. *Bicaudate ratio*, BCR) als Korrelat subkortikaler Atrophie. Dabei war primär das BCR und nicht die Gesamtgehirnatrophie oder Läsionslast ein prädiktiver Faktor für kognitive Beeinträchtigung. Eshaghi et al. (2018) beobachteten bei allen klinischen MS Phänotypen einen stärkeren Volumenverlust der tiefen grauen Substanz (engl. *deep grey matter*; DGM) verglichen mit anderen Hirnregionen. Ebenso korrelierte nur das DGM-Volumen, nicht jedoch das Volumen anderer Regionen grauer Substanz, mit der Akkumulation klinischer Behinderung.

Insbesondere Veränderungen des Thalamus sind im Rahmen subkortikaler Atrophie von Bedeutung. In MRI Studien findet sich ein verringertes thalamisches Volumen bei MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Die Atrophie subkortikaler grauer Substanz

zeigt sich am stärksten im Thalamus mit einer Volumenreduktion von 12 – 25 % (Batista et al., 2012; Cifelli et al., 2002; Houtchens et al., 2007; Kipp et al., 2015; Wylezinska et al., 2003). Allgemein korreliert der Volumenverlust des Thalamus signifikant positiv mit dem Verlust kognitiver und physischer Leistungsfähigkeit (Batista et al., 2012; Houtchens et al., 2007; Magon et al., 2014; Schoonheim et al., 2012). Batista et al. (2012) fanden eine Korrelation des Volumens von DGM-Strukturen mit kognitiver Leitungsfähigkeit, der stärkste Effekt konnte dabei für die Strukturen von Thalamus und Putamen gezeigt werden. Houtchens et al. (2007) stellten in ihrer Studie darüberhinaus eine prädiktive Relevanz des thalamischen Volumens bezüglich kognitiver Leistungsfähigkeit fest. Magon et al. (2014) beobachteten in ihrer Untersuchung, dass der Thalamus die relevanteste DGM-Struktur im Bezug auf physische Behinderung war.

Die genannten Erkenntnisse verdeutlichen die hohe Relevanz der Gesamtgehirnatrophie sowie der spezifischen Atrophie einzelner Hirnregionen bezüglich der physischen, neurophysiologischen und kognitiven Einschränkungen im Krankheitsverlauf der MS. Sie unterstreichen die Bedeutsamkeit der Gehirnatrophie für ein tieferes Verständnis der Pathophysiologie und bestärken die Rolle als zukünftigen klinisch relevanten Marker der MS.

1.5 Neurodegeneration im Cuprizone-Modell

Bei der MS handelt es sich um ein komplexes, heterogenes Krankheitsbild mit unterschiedlichem klinischen Verlauf, Pathologie und Entzündungsaktivität. Mithilfe von Tiermodellen können jeweils einzelne Aspekte dieser Heterogenität nachgestellt und genauer untersucht werden. Ein großer Teil der MS-Forschung bezieht sich auf den Aspekt der Entzündung. Entsprechend werden im Tiermodell vor allem entzündungsassoziierte Aspekte wie die Rekrutierung peripherer Immunzellen oder die T-Zell vermittelte Pathologie von Oligodendrozyten intensiv beforscht (Patel & Balabanov, 2012; Rossi & Constantin, 2016; Simmons et al., 2013). Der neurodegenerative Aspekt der MS wird dagegen deutlich seltener untersucht. Zusätzlich beschränken sich die Studien häufig auf die Degeneration im Bereich der Axone (Höflich et al., 2016; Rühling et al., 2018). Speziell die Gehirnatrophie wird im Tiermodell nur selten untersucht, obwohl sie ein wichtiger Parameter des Ergebnisses klinischer Studien ist (Calabrese, Romualdi, et al., 2013; Derakhshan et al., 2010; Fisher et al., 2008).

Obwohl es im Cuprizone-Modell sowohl nach akuter als auch nach chronischer Demyelinisierung zu axonalem Schaden kommt (Höflich et al., 2016; Lindner et al., 2009; Rühling et al., 2018), gibt es nur wenig Daten bezüglich des Verlusts von Neuronen oder Änderungen des Volumens der verschiedenen vulnerablen Hirnregionen. Wood et al. (2016) konnten in ihrer MRI-Untersuchung des Gesamtgehirns von Mäusen nach akuter Cuprizone-Intoxikation Änderungen des Volumens von Kortex, Corpus callosum, Hippocampus, Cerebellum und Putamen feststellen. Es fanden sich jedoch keine Änderung des Gesamtgehirnvolumens. Weiter zeigte sich in histopathologischen Studien an chronisch

demyelinisierten Mäusen ein Verlust von Neuronen im Hilus des Gyrus dentatus sowie ein Verlust Parvalbumin-positiver Interneurone in der CA1-Region des Hippocampus (Hoffmann et al., 2008; Lapato et al., 2017). Allgemein ist jedoch das Ausmaß von kortikaler oder subkortikaler Atrophie im Cuprizone-Modell, wie es durch standardisierte, quantitative stereologische Methoden beurteilt werden kann, noch nicht erforscht.

1.6 Fragestellung und Forschungsziel

In MRI-Untersuchungen von MS-Patienten zeigen sich demyelinisierende Läsionen der weißen und grauen Substanz sowie Atrophie innerhalb bestimmter Hirnregionen, wie der kortikalen und subkortikalen grauen Substanz (Batista et al., 2012; Bergsland et al., 2012; Calabrese, Favaretto, et al., 2013; De Stefano et al., 2003). Die Atrophie betrifft dabei verstärkt den Subkortex verglichen mit dem superfiziellen Kortex und korreliert mit klinischer Behinderung und kognitiver Leistungsfähigkeit (Batista et al., 2012; Fisher et al., 2002; Houtchens et al., 2007). Aufgrund der hohen Relevanz der Volumenveränderungen im Gehirn ist es von großer Bedeutung, das histologische Korrelat dieser Veränderungen zu verstehen.

Das toxisch-demyelinisierende Cuprizone-Modell ist ein gut etabliertes Mausmodell der MS, welches die Untersuchung reproduzierbarer akuter und chronischer Demyelinisierung des ZNS sowie begleitender Remyelinisierungsvorgänge ermöglicht. Das Cuprizone-Modell ist ein wichtiges Werkzeug, um vor allem neurodegenerative und nicht-autoimmunvermittelte Aspekte des komplexen und heterogenen Krankheitsbildes der MS besser zu verstehen (Kipp et al., 2009; Kipp & Baumgartner, 2011; Praet et al., 2014; Vega-Riquer et al., 2019). Ein wichtiger Bestandteil der Pathologie des Cuprizone-Modells ist axonaler Schaden (Höflich et al., 2016; Lindner et al., 2009; Rühling et al., 2018). Es gibt jedoch nur wenig Daten bezüglich des cerebralen Verlusts von Neuronen, cerebraler Atrophie oder Volumenveränderungen nach Cuprizone-Intoxikation. Das Ausmaß von kortikaler oder subkortikaler Atrophie, wie es mittels standardisierter, histologischer Methoden wie der design-based Stereologie (Kipp, Kiessling, et al., 2017) beurteilt werden kann, ist in diesem Tiermodell nicht erforscht. Aus diesem Grund ist die Signifikanz des Cuprizone-Modells in Bezug auf die der Gehirnatrophie der MS zugrunde liegenden Mechanismen noch unbekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, das Ausmaß der Gehirnatrophie im Cuprizone-Modell, durch die Verwendung standardisierter histologischer Methoden zu bestimmen. In der vorliegenden Dissertationsarbeit wird die Methode der design-based Stereologie verwendet, um das Volumen des Kortex, Corpus callosum und Subkortex des Mäusegehirns nach fünf sowie nach zwölf Wochen Cuprizone-Intoxikation zu bestimmen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien und Chemikalien

Tabelle 1: Liste aller verwendeten Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
3,3-Diaminobenzidin (DAB)+ Chromogen	Dako Omnis	K3468
3,3-Diaminobenzidin (DAB)+ Substrat	Dako Omnis	K3468
4,5 % Formaldehydlösung (Roti- Histofix 4,5 %)	Roth	2213.1
ABC-Kit	Vectastain	PK-4000
Aqua Bidest	Braun	0082479E
Bisbenzimid H33258	Sigma-Aldrich	14530
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich	A2153
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich	15307
Chrom (III)-Kaliumsulfat- Dodecahydrat	Merck	1.01036.0250
Cresylviolett Acetat	Waldeck	1A-400
Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon)	Sigma-Aldrich	C9012
DePex	Serva	18243.2
Dinatriumhydrogenphosphat (wasserfrei)	Merck	106559
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth	8043.2
Essigsäure	Merck	1000631000

Ethanol 100 %	Merck	100983
Ethylenglycol	Merck	1.09621
FluorPreserve Reagenz	Calbiochem	345787-25ML
Formaldehyd 37 %	Roth	P733.2
Gelatine (Kaltwasserfischhaut)	Sigma-Aldrich	G7041
Gelatine gepulvert	Merck	104078
Glycerol 99 %	Sigma-Aldrich	G-9012
Isopentan	VWR Chemicals	103614T
Isopropanol	VWR Chemicals	20842.298
Methanol	Merck	1.06009
Natriumacetat (wasserfrei)	Merck	1062680250
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck	106346
Natronlauge	Merck	109137
normales Eselserum	Sigma-Aldrich	D9663
normales Ziegenserum	Vector Laboratories	S-1000
Paraffin	Merck	107158
PBS Pulver ohne Ca²⁺/Mg²⁺	Biochrom	L-182-50
Salzsäure	Roth/Merck	K025.1/1.09057
Sucrose	Merck	107687

Tissue Tek O.C.T Compound	Sakura Finetek	4583
Tris (Pufferan®)	Roth	4855.2
Triton-X-100	Merck	1086031000
Tween® 20	Sigma-Aldrich	P1379
Wasserstoffperoxid 30 %	Roth	8070.4
Xylol	VWR Chemicals	1330-20-7
Zitronensäure	Roth	X863.2

2.2 Färbelösungen, Puffer und Blockseren

Tabelle 2: Liste aller verwendeten Färbelösungen, Puffer und Blockseren.

10x Phosphatpuffer	65 g Natriumdihydrogenphosphat (wässrig) 15 g Natronlauge 320 ml doppelt destilliertes Wasser pH-Wert auf 7,3 eingestellt (mit 5N Salzsäure)
Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Kit)	250 µl Reagenz A 250 µl Reagenz B 25 ml PBS-Puffer
Bisbenzimid Stocklösung	<u>Stock A:</u> 10 mg Bisbenzimid 1 ml destilliertes Wasser <u>Stock B:</u> 10 µg Stock A 1 ml destilliertes Wasser
Blockserum (normales Eselserum 2 %)	Verdünnung 1:50 1 ml Normalserum-Esel 0,05 g Gelatine (Kaltwasserfischhaut) 0,5 g Bovines Serumalbumin

	250 µl Tween® 20 10 % (in PBS) 48,75ml PBS
Blockserum (normales Eseserum 5 %)	Verdünnung 1:20 2,5 ml normales Eseserum 47,5 ml PBS-Puffer
Blockserum (normales Ziegenserum 10 %)	Verdünnung 1:10 100 ml normales Ziegenserum 1 ml Triton-X-100 899 ml PBS-Puffer
Citratpuffer:	10,5 g Zitronensäure 5 l destilliertes Wasser pH-Wert auf 6,0 eingestellt
DAB-Komplex	Verdünnung 1:50 20 µl DAB-Stock 980 µl DAB-Substrat
Entfettungslösung	2,5 ml 2 % Triton-X-100 150 ml Ethanol 47,5 ml destilliertes Wasser
Färbelösung (Kresylviolett)	1 g Kresylviolett 1 L Färbepuffer über Nacht ruhen gelassen vor Gebrauch filtriert
Färbepuffer	40 ml 1 M Natriumacetat (82,03 g in 1 L destilliertem Wasser) 9,6 ml Essigsäure 950 ml destilliertes Wasser pH-Wert auf 3,9 eingestellt
Fixierlösung	100 ml Formaldehyd 37 % 4,6 g Natriumdihydrogenphosphat (wässrig) 8,0 g Dinatriumhydrogenphosphat 900 ml destilliertes Wasser

Gelatinelösung 5 %	50 g Gelatine gepulvert 1 L destilliertes Wasser 0,32 g Chrom (III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat abschließend filtriert
PBS-Puffer	47,75 g PBS-Pulver ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 5 l destilliertes Wasser pH-Wert auf 7,4 eingestellt
Peroxidaseblockierlösung	10 ml Methanol 1 ml Wasserstoffperoxid 30 % 89 ml PBS-Puffer
Kryoprotektive Lagerlösung; Storage-Solution	50 ml 10x Phosphatpuffer 150 ml Aqua Bidest 150 ml Glycerol 99 % 150 ml Ethylenglycol
Tris-EDTA-Puffer	6,05 g Tris (Pufferan®) 1,85 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat 5 l destilliertes Wasser pH-Wert auf 5,0 eingestellt

2.3 Versuchstiere

Für die Untersuchung wurden ca. 8 Wochen alte, männliche, 19-21 g schwere C57BL/6J-Mäuse von Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) verwendet. Die Tiere wurden bei kontrollierten 21-24 °C Raumtemperatur und einer standardisierten Luftfeuchtigkeit von 55-65 %, bei festem 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Futter und Wasser waren ad libitum verfügbar. Die Käfige wurden regelmäßig gewechselt und verfügten standardmäßig über Einstreu, Nestlet, Mäusehäuschen und eine Trinkflasche. Alle Tiere wurden nach standardisierten Laborbedingungen gemäß den Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) gehalten. Es wurden bei allen Versuchstieren die aktuell geltenden Tierschutzbestimmungen eingehalten und eine Genehmigung für die Durchführung der Tierversuche gemäß §8 Tierschutzgesetz (TierSchG) lag durch die Regierung von Oberbayern vor (Tierversuchsgenehmigung 55.2-1-54-2532-73-15). Die Tierversuche wurden

von Mitarbeitern des Lehrstuhls für Neuroanatomie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

2.4 Versuchsaufbau

Ziel des Versuchs war es, das Ausmaß der Gehirnatrophie im Cuprizone-Modell durch die Verwendung standardisierter histologischer Methoden zu bestimmen. Hierzu erfolgte die stereologische Bestimmung des Volumens spezifischer Hirnregionen (Kortex, Subkortex, Corpus callosum; zur genauen Definition der ROIs siehe 2.7.3) sowohl nach akuter als auch nach chronischer Demyelinisierung durch Cuprizone-Intoxikation. Zur Durchführung des Experiments wurden die Versuchstiere in jeweils zwei Versuchsgruppen und zwei Kontrollgruppen eingeteilt (entlang ihrer Bestellnummer, keine zusätzlichen Kriterien). Die Versuchsgruppen wurden mit 0,25 % Cuprizone versetztem Futter intoxiciert. Zum Erreichen der akuten Demyelinisierung betrug der Intoxikationszeitraum fünf Wochen, zum Erreichen der chronischen Demyelinisierung zwölf Wochen (Abbildung 3). Das mit Cuprizone versetzte Futter wurde aus 200 g gemahlenem Standardfutter und 0,5 g Cuprizone hergestellt. Es wurde alle zwei Tage frisch zubereitet, wobei jeweils die Hälfte über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert wurde. In jedem Käfig wurden 100 g Futter zu je 50 g in zwei Petrischalen bereitgestellt. Die Fütterung erfolgte ad libitum. Die Kontrollgruppen bekamen über den ganzen Versuchszeitraum normales Haltungsfutter.

Nach beendeter Cuprizone-Intoxikation erfolgten die transkardiale Perfusion und die Entnahme der Mäusegehirne. Die Proben wurden anschließend histologisch aufbereitet und gefärbt. Die stereologische Untersuchung zur Bestimmung der spezifischen Hirnvolumina erfolgte verblindet, sowohl bezüglich Versuchs- und Kontrollgruppe als auch bezüglich Behandlungsdauer (Cuprizone-Intoxikation über fünf oder zwölf Wochen). Zur Evaluation der erfolgreichen Demyelinisierung durch Cuprizone wurden zusätzlich einzelne Gewebsschnitte der Versuchstiere immunhistochemisch gefärbt und qualitativ histologisch untersucht.

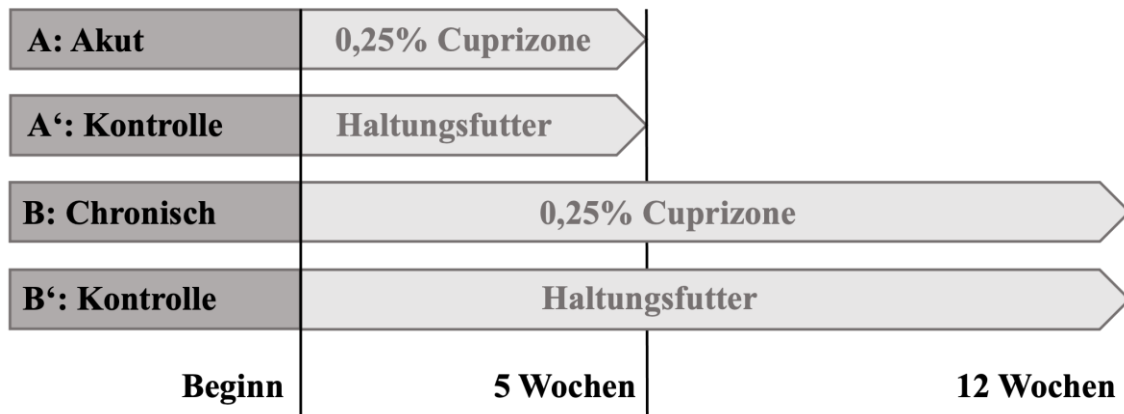


Abbildung 3: Versuchsaufbau der akuten- und chronischen Demyelinisierung durch Cuprizone-Intoxikation

Die Versuchstiere wurden in zwei Versuchsgruppen (**A**; **B**) und zwei zugehörige Kontrollgruppen (**A'**; **B'**) eingeteilt und über verschiedene Zeiträume mit 0,25 % Cuprizone versetztem Futter gefüttert. (**A**) die Cuprizone-Intoxikation erfolgte über fünf Wochen, um eine akute Demyelinisierung zu erreichen. (**B**) die Cuprizone-Intoxikation erfolgte über zwölf Wochen, um eine chronische Demyelinisierung zu erreichen. (**A'**; **B'**) Die Kontrollgruppen bekamen über den ganzen Versuchszeitraum normales Haltungsfutter.

2.5 Materialgewinnung und Aufbereitung

2.5.1 Perfusion und Fixation

Nach Erreichen des Versuchszeitraums erfolgte die trunkardiale Perfusion. Dazu wurden die Tiere mittels intraperitonealer Applikation eines Ketamin-Xylazin-Gemischs in Narkose versetzt. Perfundiert wurde durch den linken Ventrikel, zuerst mit 20 ml PBS und anschließend mit 100 ml Fixierlösung. Danach wurde das Gehirn freigelegt und vorsichtig entnommen. Die Präparate wurden über Nacht bei 4 °C in Fixierlösung postfixiert. Nachfolgend wurden die Proben entweder in Paraffin eingebettet oder als Kryopräparat eingefroren. Zur Kryoeinbettung wurden die Proben zuerst über Nacht in PBS gespült. Darauf folgte die Kryoprotektion in aufsteigenden Sucrose-Stufen über die nächsten Tage (Tabelle 3). Schließlich wurden die Proben für eine Minute in -70 °C kaltem Isopentan mit anschließendem Trockeneis schockgefroren. Bei der Paraffineinbettung wurden die Proben für mindestens fünf Stunden in Leitungswasser gewässert und anschließend in Ethanol (50 %) über Nacht gelagert. Danach wurden sie mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und in Paraffinblöcke eingebettet (Tabelle 4).

Tabelle 3: Protokoll der Kryoprotektion mittels aufsteigender Sucrose-Stufen.

Tag	Chemikalie	Dauer
1	PBS-Puffer	1 Stunde
1 - 2	PBS-Puffer	über Nacht
2	PBS-Puffer	1 Stunde
2	10 % Sucrose in PBS	9 Stunden
2 - 3	10 % Sucrose in PBS	15 Stunden
3	20 % Sucrose in PBS	9 Stunden
3 - 4	20 % Sucrose in PBS	15 Stunden
4	30 % Sucrose in PBS	9 Stunden
4 - 5	30 % Sucrose in PBS	15 Stunden

Tabelle 4: Protokoll der manuellen Einbettung des Gewebes in Paraffin.

Schritt	Chemikalie	Dauer
1	70 % Ethanol	40 Minuten
2	70 % Ethanol	40 Minuten
3	96 % Ethanol	40 Minuten
4	96 % Ethanol	40 Minuten
5	96 % Ethanol	40 Minuten
6	100 % Ethanol	40 Minuten
7	100 % Ethanol	60 Minuten
8	100 % Ethanol	60 Minuten
9	Xylol	40 Minuten
10	Xylol	40 Minuten
11	Xylol	40 Minuten
12	Paraffin	60 Minuten
13	Paraffin	60 Minuten
14	Paraffin	2 Tage

2.5.2 Anfertigung histologischer Schnittserien

Aus dem gefrorenen, fixierten Gewebe wurden mit einem Kryostaten (Leica Biosystems, CM 1950) lückenlose Serien 40 µm dicker, coronarer Gewebsschnitte der Regionen 265 - 305 nach dem *Mouse Brain Atlas* (Sidman et al., n.d.) angefertigt. Die Proben wurden mittels TissueTek O.C.T Compound auf der Halterung befestigt. Die Temperatur der Kammer und des Objektkopfes betragen -20 °C. Die fertigen Gefrierschnitte wurden in die kryoprotektive Lagerlösung gegeben und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingelagert. Für histochemische Färbungen wurden die Gewebsschnitte im PBS-Bad gewaschen und aus diesem paarweise auf Objektträger aufgezogen. Damit die Gefrierschnitte auf den Objektträgern haften, wurden diese zuerst mit Gelatine beschichtet. Dazu wurden sie ca. zwei Sekunden in eine 5 %-ige Gelatinelösung getaucht und anschließend bei 37 °C im Brutschrank über Nacht getrocknet. Danach wurden die Objektträger für 30 Minuten in 4,5 %-ige Formaldehydlösung getaucht und zur Verflüchtigung über Nacht unter dem Luftabzug stehen gelassen.

Zur Herstellung der Paraffinschnittserien wurden die bereits eingebetteten Proben mit einem Schlittenmikrotom (Leica Biosystems, SM 2000R) jeweils 5 µm dick geschnitten und paarweise aus dem warmen Wasserbad auf Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden sie im Brutschrank über Nacht bei 37 °C getrocknet.

2.6 Histologische Färbungen

2.6.1 Nissl-Färbung

Bei der Nissl-Färbung handelt es sich um eine klassische histochemische Färbung, die auf elektrostatischen Interaktionen zwischen gegensätzlich geladenen Farbstoffen und Zielstrukturen basiert. Sie wird vorwiegend für die Färbung von Nervenzellen eingesetzt. Für die Nissl-Färbung wird ein kationischer Farbstoff verwendet, der an anionische Strukturen bindet, beispielsweise Kresylviolett. In Nervenzellen befinden sich basophile Strukturen, wie DNA und RNA, hauptsächlich im Zellkörper und sind in den Fortsätzen dagegen kaum vorhanden. Es werden daher nur die Zellkörper angefärbt. Zellkern, Nucleoli und Ribosomen färben sich blauviolett, außerdem bilden sich „Nissl-Schollen“, welche raues endoplasmatisches Retikulum und anhaftende Ribosomen darstellen.

Die Färbung aller Gewebsschnitte erfolgte stets nach dem folgenden Färbeprotokoll, um eine konstante Qualität und Vergleichbarkeit der gefärbten Proben zu garantieren:

Zuerst werden die Objektträger für jeweils 20 Minuten in Färbepuffer gewaschen, dann in einer Entfettungslösung von Rückständen befreit und erneut in Färbepuffer gewaschen. Es folgt das Anfärben in der Färbelösung (Kresylviolett) für fünf Minuten sowie dreimaliges Abwaschen ungebundener Farbe in Färbepuffer für jeweils eine Minute. Zur Differenzierung werden die Objektträger danach eine Minute in Ethanol (100 %) getaucht. Dann werden sie zweimalig für jeweils fünf Minuten in Isopropanol sowie zweimalig für jeweils zehn Minuten in Xylol dehydriert und mit DePex eingedeckt. Abschließend werden die Objektträger mit Gewichten beschwert und zum Trocknen über Nacht ruhen gelassen.

Tabelle 5: Protokoll der histochemischen Nissl-Färbung.

Schritt	Chemikalie	Dauer
1	Färbepuffer	20 Minuten
2	Entfettungslösung	20 Minuten
3	Färbepuffer	20 Minuten
4	Färbelösung	5 Minuten
5	Färbepuffer	1 Minuten
6	Färbepuffer	1 Minuten
7	Färbepuffe	1 Minuten
8	Ethanol 100 %	1 Minuten
9	Isopropanol	5 Minuten
10	Isopropanol	5 Minuten
11	Xylol	10 Minuten
12	Xylol	10 Minuten

2.6.2 Immunhistochemie

Zur Darstellung und Evaluation von Demyelinisierung und reaktiver Gliose wurden immunhistochemische Färbungen (Chromogen- und Fluoreszenzfärbungen) nach der indirekten Methode verwendet. Die chromogen-immunhistochemische Färbung wurde nach der ABC-Methode durchgeführt.

Bei der indirekten Immunhistochemie (vgl. Abbildung 4) bindet zuerst der polyklonale oder monoklonale Primärantikörper an das Zielantigen. Dann wird ein Sekundärantikörper hinzugegeben, der gegen jene Tierspezies gerichtet ist, aus welcher der Primärantikörper stammt. Der Sekundärantikörper ist mit einem Chromophor oder Fluorophor markiert, welcher nach Aktivierung den farblichen Niederschlag oder das Signal erzeugt. Da mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden, kommt es zu einer Amplifikation des Signals und damit zur Erhöhung der Sensitivität.

Die indirekte ABC-Methode (Abbildung 4) ist eine spezielle Form der indirekten Immunhistochemie, bei der der Sekundärantikörper biotinyliert ist. Es wird ein Avidin-Biotin Komplex (engl. *Avidin-Biotin Complex*; ABC) hinzugegeben, welcher durch das enthaltene Avidin eine starke Bindung mit dem Biotin des Sekundärantikörpers eingeht. In dem Avidin-Biotin Komplex ist eine Meerrettichperoxidase (HRP) enthalten. Nach Zugabe eines DAB-Komplexes (3,3-Diaminobenzidin (DAB⁺)-Substrat und 3,3-Diaminobenzidin (DAB⁺)-Chromogen) und H₂O₂ katalysiert diese eine Peroxidasereaktion. Hierbei kommt es zum Ausfall von bräunlichem Präzipitat, welches erkennbar wird.

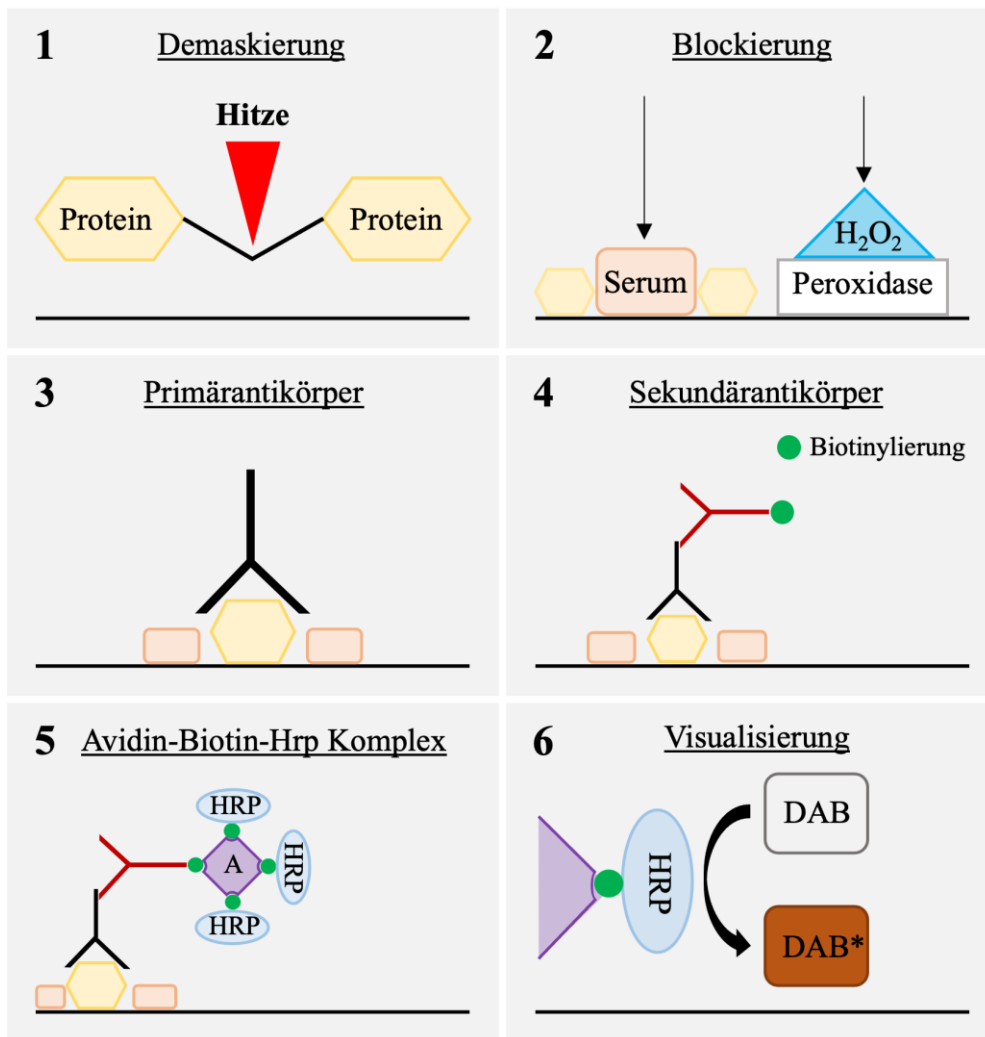


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der immunhistochemischen Färbung nach der indirekten ABC-Methode

(1 - 6) zeigen schematisch die einzelnen Schritte der immunhistochemischen Färbung nach der indirekten ABC-Methode. (1) Durch Anwendung von Hitze werden fixationsbedingte Quervernetzungen der Proteine gelöst und die Epitope demaskiert (HIER). (2) Es erfolgt eine Blockierung des Gewebes mittels Normalserum, um unspezifische, elektrostatisch getriebene Antikörperbindungen zu minimieren. Störungen durch die Aktivität endogener Peroxidasen werden vermieden, indem diese durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid blockiert werden. (3) Das Zielantigen wird vom Primärantikörper gebunden. (4) Der Primärantikörper wird von einem biotinylierten Sekundärantikörper gebunden. (5) Es wird ein Avidin-Biotin-Hrp-Komplex (ABC) hinzugegeben, wodurch ein größerer Komplex mit dem biotinylierten Sekundärantikörper gebildet wird. Ein Avidin-Molekül ist tetravalent für Biotin, wodurch eine Signalamplifikation bezüglich der folgenden Peroxidasereaktion erreicht wird. (6) Nach Zugabe des DAB-Komplexes wird durch die Meerrettichperoxidase (Hrp) eine Peroxidasereaktion katalysiert. Dabei kommt es zum Ausfall bräunlichen Präzipitats, welches für den Betrachter erkennbar wird.

2.6.3 Chromogen-immunhistochemische Färbung

Um eine gleichbleibende Qualität sowie Vergleichbarkeit der histologischen Gewebsschnitte zu gewährleisten, erfolgte die chromogen-immunhistochemische Färbung stets nach dem folgenden Protokoll:

Für die Färbung werden frei-schwimmende (engl. *free-floating*) 40 µm dicke formalinfixierte Gefrierschnitte verwendet. Die Färbung wird mit zwei Gewebsschnitten pro Well in unbeschichteten 12-Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Zuerst werden die Gewebsschnitte dreimalig für jeweils zehn Minuten unter leichtem Schütteln in PBS gewaschen und so Reste der kryoprotektiven Lagerlösung entfernt. Um die fixationsbedingten Quervernetzungen der Proteine (Maskierung) zu lösen und die Epitope freizugeben, werden die Proben nach der HIER-Methode (engl. *heat induced epitope retrieval*; HIER) demaskiert. Dazu werden sie für 15 Minuten in Tris-EDTA-Puffer gekocht und anschließend für zwei Minuten in einer Eisdübelbox abgekühlt. Um endogene Peroxidasen zu deaktivieren, werden pro Well 500 µl einer Lösung aus Methanol (10 %) und H₂O₂ (0,3 %) in PBS appliziert und für eine Stunde im Dunkeln unter leichtem Schütteln gelagert. Danach wird für jeweils 15 Minuten, zweimalig in PBS und einmalig in PBS/0,1 % Triton X-100 unter leichtem Schütteln gewaschen. Um unspezifische Bindung und Hintergrundfärbung zu minimieren, werden die Proben mit normalem Ziegen Serum (10 % in PBS/ 0,1 % Triton X-100) für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln geblockt. Anschließend wird der Primärantikörper (Tabelle 6) appliziert und die Gewebsschnitte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Alle verwendeten Antikörper werden mit Blockserum (10 % NGS/ PBS/ 0,1 % Triton X-100) verdünnt.

Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper innerhalb der chromogen-immunhistochemischen Färbung.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-CNPase IgG1; monoclonal	Maus	1:1000	Abcam	Ab6319

Die Gewebsschnitte werden jeweils 15 Minuten zweimalig in PBS und einmalig in PBS/0,1 % Triton X-100 unter leichtem Schütteln gewaschen. Danach wird der Sekundärantikörper (Tabelle 7) appliziert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper innerhalb der chromogen-immunhistochemischen Färbung.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-Maus IgG (biotinyliert)	Ziege	1:500	Vector Laboratories	BA 9200

Es folgt dreimaliges Waschen für jeweils 15 Minuten unter leichtem Schütteln in PBS. Der Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Kit, Vectastain) wird mindestens eine halbe Stunde vor Gebrauch angesetzt und dunkel gelagert. Nach Applikation der Lösung werden die Gewebsschnitte für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend dreimalig jeweils 15 Minuten in PBS gewaschen. Nun erfolgt die Visualisierung durch Applikation des DAB-Komplexes. Die ablaufende Peroxidasereaktion führt zum sichtbaren Ausfall bräunlichen Niederschlags. Nach zehn Minuten Inkubationszeit wird der DAB-Komplex für jeweils 15 Minuten zweimalig in Leitungswasser und einmalig in PBS abgewaschen. Die Gewebsschnitte werden auf gelatinierte Objektträger aufgezogen und über Nacht zum Trocknen stehen gelassen. Am nächsten Tag werden die Gewebsschnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert (Tabelle 8). Danach können sie mit DePex Mounting Agenz eingedeckt werden. Die Objektträger werden nach kurzem Antrocknen mit Gewichten beschwert und über Nacht stehen gelassen.

Tabelle 8: Protokoll der Dehydratation der Gewebsschnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe.

Schritt	Chemikalie	Dauer
1	destilliertes Wasser	1 Minute
2	Ethanol 50 %	5 Minuten
3	Ethanol 70 %	5 Minuten
4	Ethanol 96 %	5 Minuten
5	Ethanol 96 %	5 Minuten
6	Ethanol 100 %	5 Minuten
7	Ethanol 100 %	5 Minuten
8	Xylol 50 % / Ethanol 50 %	5 Minuten
9	Xylol I	5 Minuten
10	Xylol II	5 Minuten
11	Xylol III	5 Minuten

Tabelle 9: Protokoll der chromogen-immunhistochemischen Färbung.

Schritt	Durchführung
1	Dreimaliges Waschen in PBS für jeweils 10 Minuten unter leichtem Schütteln
2	Demaskierung durch 15-minütiges Kochen in der Mikrowelle in Tris-EDTA-Puffer
3	Abkühlung auf Raumtemperatur durch Platzierung in einer Eisdübelbox für 2 Minuten
4	Blockierung endogener Peroxidasen
5	Inkubation in einer Lösung aus Methanol (10 %) und H ₂ O ₂ (0,3 %) in PBS für 1 Stunde im Dunkeln unter leichtem Schütteln
6	Waschen für jeweils 15 Minuten unter leichtem Schütteln zweimalig in PBS und einmalig in 0,1 % Triton X-100
7	Blockierung durch 10 % normales Ziegen Serum
8	Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln
9	Applikation des Primärantikörpers
10	Inkubation in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln
11	Waschen für jeweils 15 Minuten unter leichtem Schütteln zweimalig in PBS und einmalig in 0,1 % Triton X-100
12	Applikation des Sekundärantikörpers
13	Inkubation für 2 Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur
14	Dreimaliges Waschen in PBS für jeweils 15 Minuten unter leichtem Schütteln
15	Applikation des Avidin-Biotin-Komplexes (dieser wird mindestens eine halbe Stunde vor Gebrauch angesetzt und dunkel gelagert)
16	Inkubation für 2 Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur
17	Dreimaliges Waschen in PBS für jeweils 15 Minuten unter leichtem Schütteln
18	Applikation des DAB-Komplexes zur Visualisierung
19	Inkubation für 10 Minuten unter Luftabzug
20	Waschen für jeweils 15 Minuten: zweimalig in Leitungswasser und einmalig in PBS
21	Aufziehen der Gewebsschnitte auf gelatinierte Objektträger
22	Trocknen lassen über Nacht
23	Dehydratation durch aufsteigende Alkoholreihe (Tabelle 8)
24	Eindecken mit DePex Mounting Agenz
25	Mit Gewichten beschwert über Nacht stehen lassen

2.6.4 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte stets nach dem folgenden Protokoll, um eine konstante Qualität und Vergleichbarkeit der Gewebeproben zu gewährleisten. Zeigen die Sekundärantikörper ein unterschiedliches Excitations-/ Emissionsspektrum (anti-GFAP 594 nm; anti-PLP 488 nm), so wurde das Protokoll als Doppelfärbung durchgeführt:

Für die Färbung werden 5 µm dicke, formalinfixierte Paraffinschnitte verwendet. Um das in Paraffin-fixierte Gewebe zugänglich zu machen, wird es zuerst entparaffiniert (Tabelle 10). Dazu werden die Objektträger dreimalig für jeweils zehn Minuten in Xylol und anschließend für fünf Minuten in ein Gemisch aus Xylol (50 %) und Ethanol (50 %) getaucht. Danach durchlaufen sie eine absteigende Alkoholreihe.

Tabelle 10: Protokoll der Entparaffinierung mittels Xylol und absteigender Alkoholreihe.

Schritt	Chemikalie	Dauer
1	Xylol I	10 Minuten
2	Xylol II	10 Minuten
3	Xylol III	10 Minuten
4	Xylol 50 % / Ethanol 50 %	5 Minuten
5	Ethanol 100 %	3 Minuten
6	Ethanol 100 %	3 Minuten
7	Ethanol 96 %	3 Minuten
8	Ethanol 96 %	3 Minuten
9	Ethanol 70 %	3 Minuten
10	Ethanol 50 %	3 Minuten
11	destilliertes Wasser	3 Minuten

Durch die Formalinfixierung und Einbettung in Paraffin bilden sich Quervernetzungen in den Proteinen (Maskierung). Um die Epitope wieder freizulegen, müssen die Quervernetzungen gelöst und die Proteine demaskiert werden. Dies geschieht durch zehnminütiges Kochen in Tris-EDTA-Puffer (HIER). Anschließend werden die Objektträger für 15 Minuten im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt und dreimalig für jeweils fünf Minuten unter leichtem Schütteln in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen und Hintergrundfärbung zu minimieren, werden die Proben mit normalem Eselserum (5 % in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Danach werden verbleibende Tropfen mit Filterpapier vom Objektträger gesaugt. Anschließend werden pro Objektträger jeweils 100 µl der Primärantikörperlösung appliziert und zur Inkubation über Nacht bei 4 °C in eine feuchte Kammer gelegt. Der Primärantikörper (Tabelle 11) ist in 5 % normalem Eselserum gelöst.

Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper innerhalb der Immunfluoreszenzfärbungen

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-GFAP IgY; polyclonal	Huhn	1:2000	Abcam	ab4674
Anti-PLP IgG2a; monoclonal	Maus	1:1000	Bio-Rad	MCA839G
Anti-IBA1 IgG; polyclonal	Ziege	1:500	Abcam	ab107159

Nach erfolgter Inkubation werden die Objektträger dreimalig für jeweils fünf Minuten unter leichtem Schütteln in PBS gewaschen. Anschließend wird pro Objektträger 100 µl Sekundärantikörperlösung appliziert und die Gewebsschnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten, feuchten Kammer inkubiert. Der Sekundärantikörper (Tabelle 12) ist in normalem Eselserum (5 % in PBS/ 0,1 % Triton-X-100) gelöst (Anti-Ziege-IgG in 2 % normalem Eselserum in PBS/ 0,1 % Triton-X-100). Um den Fluoreszenzfarbstoff zu schützen, befinden sich ab diesem Punkt alle Objektträger konstant in Dunkelheit und werden zur Manipulation einem reduzierten Lichteinfall ausgesetzt.

Tabelle 12: Verwendete Sekundärantikörper innerhalb der Immunfluoreszenzfärbungen.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Fluorophor	Hersteller	Bestellnummer
Anti-Huhn IgG; polyclonal	Ziege	1:400	Alexa Fluor 594	Life Technologies	A11042
Anti-Maus IgG; polyclonal	Esel	1:2000	Alexa Fluor 488	Life Technologies	A21202
Anti-Ziege IgG; polyclonal	Esel	1:200	Alexa Fluor 488	Life Technologies	A11055

Die Gewebsschnitte werden dreimalig für jeweils fünf Minuten bei leichtem Schütteln in PBS gewaschen. Danach folgt die Gegenfärbung der DNA mit Bisbenzimid H33258. Dazu werden pro Objektträger 100 µl einer Bisbenzimidlösung (10 % DAPI Stock B in destilliertem Wasser) appliziert und die Gewebsschnitte für fünf Minuten bei 26 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Ungebundener Farbstoff wird durch zweimaliges Waschen in destilliertem Wasser für jeweils fünf Minuten bei leichtem Schütteln abgewaschen. Anschließend werden die Gewebsschnitte mit FluorPreserve Reagenz eingedeckt und mit kleinen Gewichten beschwert über Nacht stehen gelassen. Um ein mögliches Austrocknen sowie in der Folge auftretende

Luft einschließen zu vermeiden, werden die Objektträger mit klarem Nagellack versiegelt und schließlich bei 4 °C gelagert.

Tabelle 13: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung

Schritt	Durchführung
1	Entparaffinierung und Hydrierung mittels absteigender Alkoholreihe (Tabelle 10)
2	Demaskierung durch 10-minütiges Kochen in der Mikrowelle in Tris-EDTA-Puffer
3	Abkühlen auf Raumtemperatur durch Umspülen des Behälters mit Leitungswasser
4	Dreimaliges Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten unter leichtem Schütteln
5	Blockierung durch 5 % normales Eselserum
6	Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
7	Applikation des Primärantikörpers
8	Inkubation über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer
9	Dreimaliges Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten unter leichtem Schütteln
10	Applikation des Sekundärantikörpers
11	Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten, feuchten Kammer
12	Dreimaliges Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten unter leichtem Schütteln
13	Applikation der Bisbenzimidlösung (10 % DAPI Stock B in destilliertem Wasser) zur Gegenfärbung der DNA
14	Inkubation für 5 Minuten bei 26°C in einer abgedunkelten, feuchten Kammer
15	Zweimaliges Waschen in destilliertem Wasser für jeweils 5 Minuten bei leichtem Schütteln
16	Eindecken mit FluorPreserve Reagenz
17	Mit kleinen Gewichten beschwert über Nacht stehen lassen
18	Versiegelung der Objektträger mit klarem Nagellack
19	Lagerung bei 4 °C

2.7 Stereologische Auswertung

2.7.1 Stereologischer Arbeitsplatz

Die stereologische Auswertung erfolgte mit einer Stereologie Software (Stereo Investigator, Version 11.07; MBF Bioscience, Williston, ND, USA). Das Lichtmikroskop (Olympus BX51WI; Olympus, Tokyo, Japan) war ausgestattet mit einem motorgetriebenen Objektträgtisch mit Steuereinheit (motorized XYZ stage system; MBF Bioscience), UPlanApo Objektiv (4x, Numerische Apertur (N.A.) = 0.16; Olympus) und CCD-Farbkamera (U-CMAD-2; Olympus). Das Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX51; Olympus) war ausgestattet mit einem motorgetriebenen Objektträgtisch (motorized XYZ stage system; MBF Bioscience), Disk Scanning Unit (DSU; Olympus), UPlanSApo Objektiv (20x, N.A. = 0,75; Olympus), Alexa Fluor 488 Filter (Excitation: 470 nm, Emission: 525 nm; Chroma, Bellows Falls, VT, USA), Alexa Fluor 594 Filter (Excitation: 560 nm, Emission: 630 nm; Chroma), Alexa Fluor 350 Filter (Excitation: 395 nm, Emission: 460 nm; Chroma) sowie einer CCD Farbkamera (Retiga 2000R; Q-Imaging, Surrey, BC, Canada).

2.7.2 Design-based Stereologie - Cavalieri-Methode

Die design-based Stereologie ist eine Methode zur systematischen, quantitativen Bestimmung stereologischer Parameter dreidimensionaler Strukturen. Die design-based Stereologie gilt als „*state-of-the-art*“ in diesem Feld und bietet mehrere Vorteile gegenüber anderen Methoden zur Messung der Zellzahl, Volumen und Zelldichte (Schmitz & Hof, 2005, p. 813). Sie ist unabhängig von Form, Größe oder Lage der untersuchten Strukturen, wodurch systematische Messfehler vermieden werden (Gundersen et al., 1988; West, 1993, 2002). Ihre konsequente Anwendung führt zu reproduzierbaren und untereinander vergleichbaren Datensätzen (Coggeshall & Lekan, 1996; Coleman, 1997; Harrison, 1999). Anwendungsbereiche der design-based Stereologie sind beispielsweise die Volumenbestimmung definierter Regionen (engl. *region of interest*; ROI), die Bestimmung der Gesamtzellzahl eines Zelltyps sowie die Bestimmung der Zelldichte (Kipp, Kiessling, et al., 2017; Schmitz et al., 2005; Schmitz & Hof, 2005).

Die design-based stereologische Methode zur Ermittlung von Volumen definierter Regionen basiert auf dem Prinzip von Cavalieri (Cavalieri, 1635). Dieses Prinzip besagt, dass zwei Körper das gleiche Volumen besitzen, wenn alle zur Grundebene parallelen Schnittflächen auf gleicher Höhe den gleichen Flächeninhalt haben. Nach diesem Prinzip erlaubt die Schätzung zweidimensionaler Flächeninhalte eine Quantifizierung dreidimensionaler ROI-Volumen (Abbildung 5). Bei der Volumenbestimmung durch die Cavalieri-Methode wird nach dem *systematic and random sampling* (SRS) der Schnittserie über jeden Gewebsschnitt ein digitales,

zufällig positioniertes, uniformes Quadratraster gelegt. Die Schätzung des Flächeninhalts erfolgt durch die Punktzählung aller Schnittpunkte (Kreuzungspunkte) dieses Rasters, welche auf den Bereich der ROI fallen. Man erhält eine unverzerrte Schätzung des ROI-Volumens, indem der ROI-Flächeninhalt aller Gewebsschnitte der Serie mit dem immer gleichen Abstand zwischen den Schnitten multipliziert wird (Gundersen & Jensen, 1987).

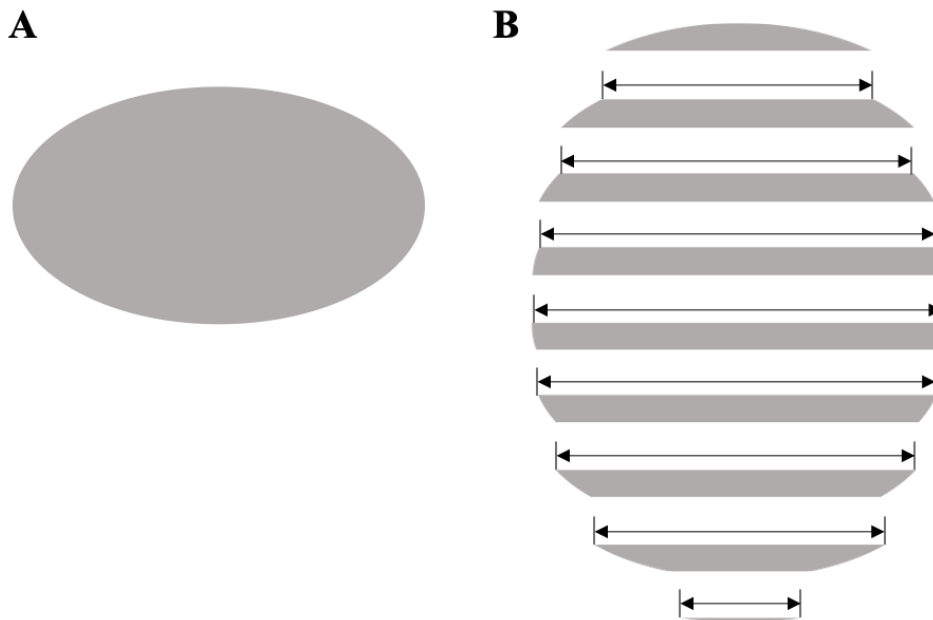


Abbildung 5: Prinzip der Volumenbestimmung nach der Cavalieri-Methode (vgl. Schmitz & Hof, 2005)

Mit Hilfe der Cavalieri-Methode kann das Volumen eines dreidimensionalen Körpers auf Basis des Flächeninhalts seiner Schnittflächen bestimmt werden. **(A)** zeigt schematisch die zu vermessende, dreidimensionale Geweberegion. **(B)** Die zu untersuchende Geweberegion ist vollständig in eine Schnittserie mit Schnitten uniformer Dicke zerteilt. Es wird der Flächeninhalt des oberen Profils aller Schnitte (oder jedes n-ten) vermessen (Pfeile). Die Summe der Flächeninhalte aller Schnitte wird mit der uniformen Schnittdicke multipliziert. Hierdurch erhält man eine unverzerrte Schätzung des Volumens der untersuchten Geweberegion. Da der oberste Schnitt in diesem Beispiel kein oberes Profil besitzt, ist er nicht Teil der Untersuchung.

Zur Anwendung der Cavalieri-Methode (Glaser & Greene, 2006; Gundersen & Jensen, 1987; Kipp et al., 2017; Prakash et al., 1994) wird zuerst eine SRS-Schnittserie des Zielgewebes angefertigt (Abbildung 6). Zur Erstellung der SRS-Schnittserie wird zunächst von den ersten Gewebsschnitten innerhalb der Zielregion ein einzelner Gewebsschnitt als Serienbeginn ausgewählt. Die Auswahl erfolgt ausschließlich nach dem Zufallsprinzip, der Beginn der SRS-Schnittserie ist somit zufällig (engl. *random*). Nun wird ein gleichbleibendes Intervall n festgelegt, in dem die folgenden Gewebsschnitte in die Schnittserie aufgenommen werden. Beispielsweise wird jeder dritte Gewebsschnitt in die Serie aufgenommen ($n = 3$). Die Auswahl der Gewebsschnitte, welche die SRS-Schnittserie ergeben, erfolgt nach zufälligem Beginn rein systematisch, da es keine anderweitigen Auswahlkriterien gibt (engl. *systematic*). Durch diese

Vorgehensweise wird jeder Gewebsschnitt mit der gleichen Wahrscheinlichkeit ausgewählt. Das SRS wird im experimentellen Ablauf zweifach angewendet: (i) zuerst bei der Entscheidung, welche Gewebsschnitte der gesamten Schnittserie für die Untersuchung verwendet werden (ii) zweitens bei der Bestimmung, welche Zonen bzw. Teile der Gewebsschnitte später mikroskopisch analysiert werden.

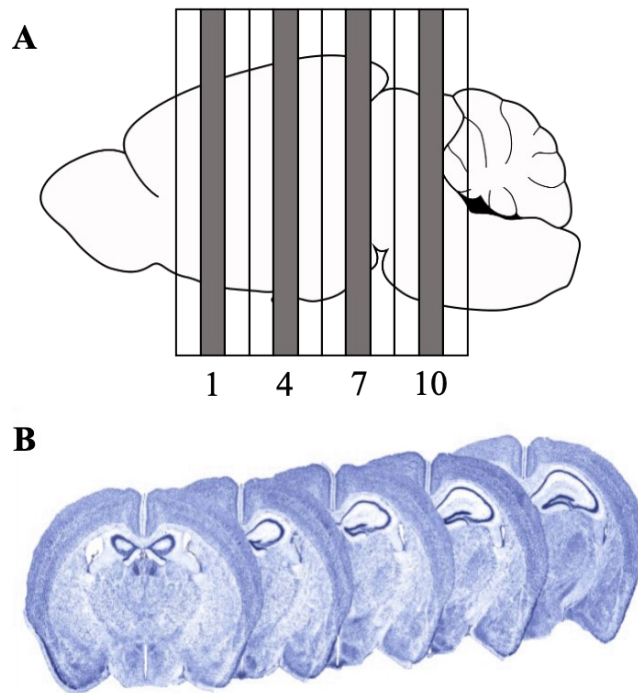


Abbildung 6: Darstellung des Erstellungsprinzips einer SRS-Schnittserie

Durch die Verwendung einer SRS-Schnittserie wird ein Bias der stereologischen Analyse vermieden. Der Beginn der SRS-Serie wird zufällig gewählt, ihre Fortführung erfolgt systematisch. Hierdurch hat jeder Gewebsschnitt die gleiche Wahrscheinlichkeit, in die SRS-Serie einbezogen zu werden. (A) zeigt die prinzipielle Erstellung einer SRS-Schnittserie. Es wird eine Schnittserie der Hirnregion erstellt. Der Beginn der SRS-Serie innerhalb dieser Serie wird zufällig gewählt. Nach Beginn wird jeder n-te Schnitt in die SRS-Serie aufgenommen (In der schematischen Darstellung beträgt der Serienabstand $n = 3$, also Schnitt-Nr. 1, 4, 7 usw.). Die SRS-Serie wird über die gesamte Hirnregion fortgeführt. (B) zeigt schematisch eine SRS-Schnittserie.

Nach Anfertigung der SRS-Schnittserie erfolgt die Schätzung des zweidimensionalen Flächeninhalts der ROI jedes Gewebsschnitts. Mithilfe einer Stereologiesoftware kann eine Punktzählung angewendet werden oder die ROI als Kontur umfahren werden (Abbildung 7). Zur Punktzählung wird ein uniformes Quadratraster definierter Kantenlänge digital über den Gewebsschnitt gelegt. Es werden die Schnittpunkte (Kreuzungspunkte) des Rasters betrachtet und alle Punkte gezählt, welche in der ROI liegen. Die Position des Rasters ist zufällig, alle Teile des Gewebsschnitts werden mit der gleichen Wahrscheinlichkeit vom Raster erfasst.

Die Bestimmung des endgültigen ROI-Volumens erfolgt durch folgende Formel:

$$V_{ROI} = \sum P_{ROI} \times a_p \times d,$$

wobei V_{ROI} das geschätzte ROI-Volumen, $\sum P_{ROI}$ die Summe aller gezählten Schnittpunkte, a_p der mit jedem Kreuzungspunkt assoziierte Flächeninhalt (Flächeninhalt eines einzelnen Quadrats im Raster), d die Distanz zwischen den Oberflächen zwei aufeinander folgender Gewebsschnitte der untersuchten Serie ist. Somit wird zuerst der zweidimensionale Flächeninhalt der Zielregion auf allen SRS-Gewebsschnitten bestimmt. Dieser wird über die gesamte Schnittserie summiert und mit dem Intervallabstand der Serie multipliziert. Hieraus ergibt sich das endgültige ROI-Volumen (Kipp, Kiessling, et al., 2017).

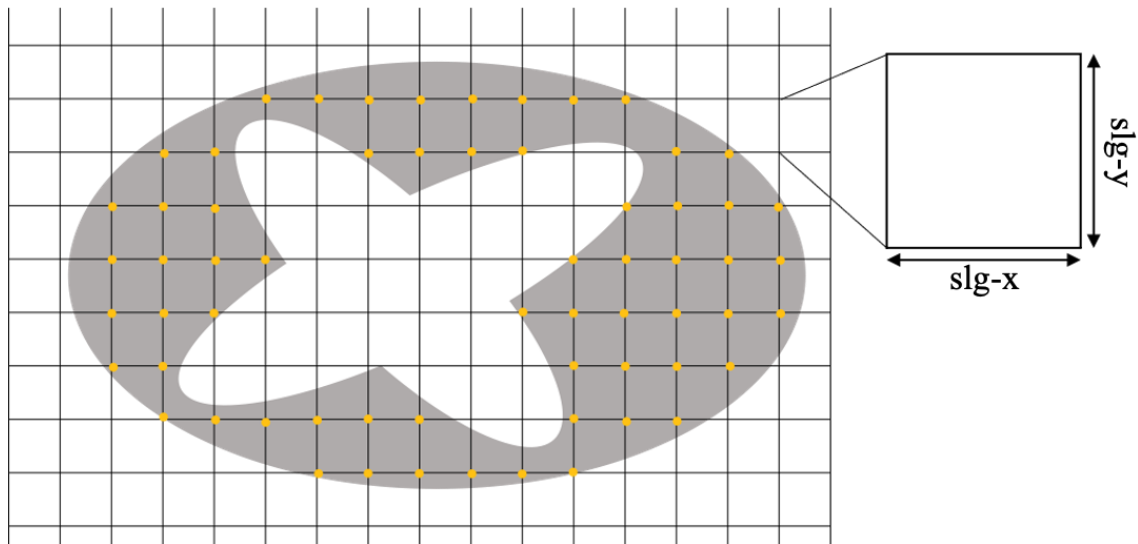


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Punktzählung anhand eines Quadratrasters

Durch die Verwendung einer Punktzählung innerhalb eines Zählrasters kann der Flächeninhalt einer spezifischen Gewebsregion bestimmt werden. Mittels Stereologiesoftware wird ein zufällig positioniertes, uniformes Quadratraster definierter Kantenlänge (slg in x- und y-Richtung) digital über die gesamte Gewebsregion gelegt. Es werden die Schnittpunkte des Rasters betrachtet und alle Kreuzungspunkte gezählt, welche in der spezifischen *region of interest* (ROI; graues Oval) liegen (gelbe Markierung). Die Summe aller gezählten Kreuzungspunkte wird mit dem assoziierten Flächeninhalt pro Kreuzungspunkt ($slg-x \times slg-y$) multipliziert. Hierdurch ergibt sich eine unverzerrte Schätzung des Flächeninhalts der spezifischen Gewebsregion.

2.7.3 Definition der *Regions of Interest*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestimmten wir das Volumen spezifischer Hirnregionen (Kortex, Corpus callosum, Subkortex) nach akuter und chronischer Demyelinisierung durch Cuprizone. Die untersuchten Hirnregionen wurden zur stereologischen Auswertung als drei histologische *regions of interest* (ROIs) definiert. Diese sind in Abbildung 8 dargestellt:

- Kortex (CTX)
- Corpus callosum (CC)
- Subkortex (SCTX)

Um alle Strukturen trotz teilweise unscharfer Morphologie vollständig abgrenzen zu können, wurden die Begrenzungen der untersuchten ROIs genau definiert: die mediale Begrenzung der Region Kortex (CTX) bestand in der morphologischen Grenze zum Corpus callosum. Nach dem lateralen Abbruch des Corpus callosum erfolgte die mediale Begrenzung durch eine gezogene Gerade zwischen der lateralen Basis des Corpus callosum und dem basalen Ende der Schicht II (Pyramidenzellschicht) der Area piriformis; die Region Corpus callosum (CC) wurde entsprechend ihrer eindeutigen Morphologie definiert; die Region Subkortex (SCTX) umfasste alle Strukturen medial des Corpus callosum, ausgenommen des Hippocampus und dessen Fimbrien. Lateral erfolgt die Abgrenzung zum Kortex entlang der zuvor beschriebenen Gerade zwischen der lateralen Basis des Corpus callosum und dem basalen Ende der Schicht II der Area piriformis.

Die untersuchten Schnittserien umfassten die Regionen 265 (entspricht dem rostralen Ende des Hippocampus) bis Region 305 (entspricht dem Beginn des kaudalen Diencephalons) nach dem *Mouse Brain Atlas* (Sidman et al., n.d.).

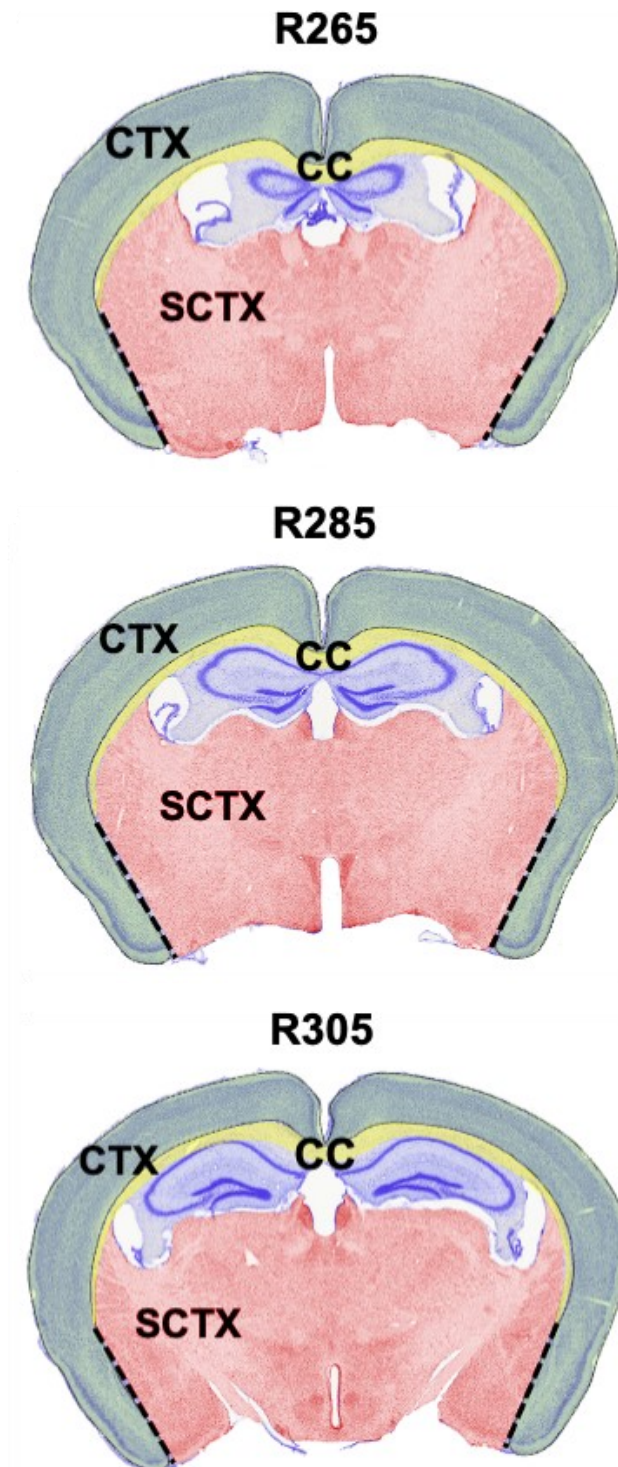


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der definierten *Regions of Interest* (vgl. Hochstrasser et al., 2019)

Es werden die definierten *regions of interest* anhand der Regionen 265, 285, 305 nach dem *Mouse Brain Atlas* (Sidman et al., n.d.) exemplarisch dargestellt. (Kortex; CTX) die Region ist nach medial durch die morphologische Grenze zum Corpus callosum begrenzt. Im lateralen Anteil erfolgt die Abgrenzung zum Subkortex entlang einer definierten Gerade zwischen der lateralen Basis des Corpus callosum und dem basalen Ende der Schicht II (Pyramidenzellschicht) der Area piriformis (gestrichelte Linie). (Corpus callosum; CC) die Region folgt ihrer morphologisch abgrenzbaren Struktur. (Subkortex; SCTX) die Region umfasst alle Strukturen medial des Corpus callosum, ausgenommen des Hippocampus und dessen Fimbrien.

2.7.4 Durchführung der Volumenbestimmung

In der vorliegenden Arbeit wurden das Volumen von drei spezifischen Hirnregionen (Kortex, Corpus callosum, Subkortex) durch Verwendung der Cavalieri-Methode bestimmt.

Hierzu wurden lückenlose Serien 40 µm dicker, coronarer Gefrierschnitte der Regionen 265-305 nach dem *Mouse Brain Atlas* (Sidman et al., n.d.) angefertigt. Innerhalb dieser Hirnregionen lässt sich die Demyelinisierung im Corpus callosum zuverlässig reproduzierbar induzieren (Chrzanowski et al., 2019; Goldberg et al., 2015). Aus den ursprünglichen Schnittserien wurden nach dem Prinzip des *systematic and random sampling* SRS-Schnittserien erstellt (zur Erläuterung des Prinzips siehe Abbildung 6). Die Auswahl des Beginns der Serie erfolgte zufällig ab Region 265 nach Sidman et al. und jeder dritte folgende Schnitt wurde in die Serie aufgenommen (Schnitte Nr. 1, 4, 7, 10 usw.). Nach zehn eingeschlossenen Schnitten wurde die Serie abgeschlossen. Das anatomische Korrelat des Endpunktes war die Region 305 nach Sidman et al., n.d. Der Abstand zwischen den einzelnen Schnitten der SRS-Serie betrug 120 µm.

Die Berechnung des Volumens erfolgte anhand der durch Punktzählung ermittelten Flächen der ROIs. Für die Punktzählung wurde ein digitales, zufällig positioniertes Quadratraster aufgelegt und die Anzahl aller Schnittpunkte im Bereich der ROIs gezählt (Abbildung 9). Für die Regionen Kortex und Subkortex betrug die Seitenlänge eines Quadrats im Raster 500 µm in x- und y-Richtung (slg). Für die Region Corpus callosum wurde das Raster entsprechend kleiner gewählt. Hier betrug die Seitenlängen 220 µm in x- und y-Richtung. Um das abschließende Gesamtvolumen zu bestimmen, wurde die folgende Formel verwendet:

$$\text{Gesamtvolumen} = \sum \text{Punkte} \times \text{slg}^2 \times \text{Punktdicke}$$

Es wurden alle über die vollständige Schnittserie gezählten Punkte einer Region addiert und deren Summe mit der assoziierten Fläche pro Punkt sowie dem Abstand zwischen zwei aufeinander folgenden Schnitten (Punktdicke) multipliziert (Tabelle 14).

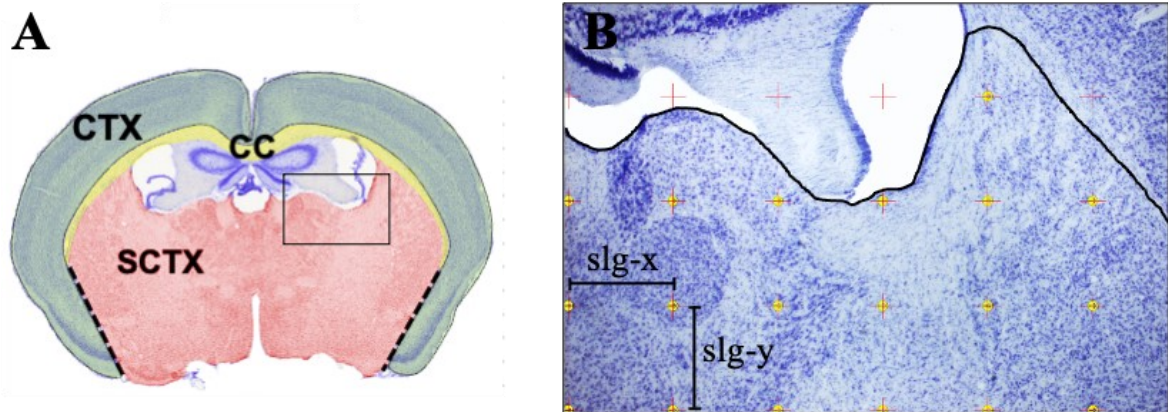


Abbildung 9: Volumenbestimmung mittels Cavalieri-Methode (vgl. Hochstrasser et al., 2019)

Die Berechnung des Volumens erfolgt anhand der durch Punktzählung ermittelten Fläche der *region of interest*. (A) Übersicht der *regions of interest*. Der rechteckige Ausschnitt entspricht der Position von (B). (B) Zur Punktzählung wird ein digitales, zufällig positioniertes Raster definierter Kantenlängen (slg in x- und y-Richtung) aufgelegt und die Anzahl aller Kreuzungspunkte im Bereich der ROI gezählt (gelbe Markierung). Die Summe aller gezählten Kreuzungspunkte wird mit der assoziierten Fläche pro Punkt sowie der Punktdicke multipliziert, um das Gesamtvolumen der ROI zu bestimmen.

Tabelle 14: Exemplarische Darstellung der Details der Volumenbestimmung des Kortex (CTX), Corpus callosum (CC) und des Subkortex (SCTX) einer vollständig vermessenen Schnittserie eines Versuchs- bzw. Kontrolltieres. Exemplarisch sind die der Volumenberechnung nach dem Cavalieri-Prinzip zugrundeliegenden Parameter aufgeführt. slg: Kantenlänge der x- und y-Dimension des Zählrasters der Punktzählung; Punktdicke: Größe des uniformen Abstands zwischen den einzelnen Gewebsschnitten der Schnittserie; Fläche pro Punkt, Volumen pro Punkt: Die mit jeweils einem gezählten Punkt assoziierte Fläche bzw. Volumen; Σ Punkte: alle gezählten Punkte innerhalb der vollständigen Schnittserie des Versuchs- bzw. Kontrolltieres.

Tiernummer	CTX	CC	SCTX
slg (μm)	500	220	500
Punktdicke (μm)	120	120	120
Fläche pro Punkt (μm^2)	250000	48400	250000
Volumen pro Punkt (mm^3)	0,03	0,00581	0,03
Σ Punkte	-	-	-
Gesamtvolumen (mm^3)	-	-	-

2.7.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., Version 9.1.2; San Diego, CA, USA) verwendet. Sämtliche bestimmten Volumina der spezifischen Hirnregionen wurden ihren entsprechenden Gruppen zugeordnet und für jede Gruppe wurde der Mittelwert berechnet. Die Datensätze wurden mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung getestet. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels t-Test auf Signifikanz geprüft und als p-Wert dargestellt. Statistische Signifikanz bestand ab einem Wert $p \leq 0,05$. Eine mögliche Alphafehler-Kumulierung durch multiples Testen wurde nicht korrigiert.

3. Ergebnisse

Anmerkung: Die Versuche und Daten der vorliegenden Arbeit sind teilweise Bestandteil der Veröffentlichung Hochstrasser, T., Rühling, S., Hecher, K., Fabisch, K. H., Chrzanowski, U., Brendel, M., Eckenweber, F., Sacher, C., Schmitz, C., & Kipp, M. (2019). Stereological Investigation of Regional Brain Volumes after Acute and Chronic Cuprizone-Induced Demyelination. *Cells*, 8(9), 1024. <https://doi.org/10.3390/cells8091024>.

3.1 Evaluation der histopathologischen Kennzeichen der Cuprizone-Intoxikation

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Volumen spezifischer Hirnregionen (ROI: Kortex; Corpus callosum; Subkortex) nach Demyelinisierung durch Cuprizone-Intoxikation quantitativ stereologisch untersucht. Die Untersuchung erfolgte sowohl für die akute Demyelinisierung (fünf Wochen Intoxikation) als auch für die chronische Demyelinisierung (12 Wochen Intoxikation).

In einem ersten Schritt wurden die bekannten, histopathologischen Kennzeichen des Cuprizone-Modells an einzelnen Gewebsschnitten des Versuchs exemplarisch evaluiert. Hierdurch konnte histologisch gezeigt werden, dass die Demyelinisierung durch Cuprizone-Intoxikation im Sinne des Cuprizone-Modells innerhalb des Gesamtversuchs erfolgreich war. Die Gewebsschnitte wurden hierzu gesondert histochemisch aufbereitet. Mittels Immunhistochemie wurden Myelinhalt (anti-PLP; anti-CNPase), Astrozyten (anti-GFAP) und Mikroglia (anti-IBA1) dargestellt. Die histologische Untersuchung konzentrierte sich dabei besonders auf die Region um das mediale Corpus callosum. Diese Region ist im Cuprizone-Modell besonders relevant, da sich dort die Demyelinisierung höchst reproduzierbar untersuchen lässt (Chrzanowski et al., 2019; Goldberg et al., 2015; Schmidt et al., 2013). Es wurden sowohl die akute- als auch die chronische Demyelinisierung untersucht (Abbildung 10 - 12).

Das mediale Corpus callosum ist nach akuter Cuprizone-Intoxikation weitestgehend demyelinisiert. Ebenso zeigt sich eine Demyelinisierung der angrenzenden Kortexareale. Cingulum und Fornix hippocampi (Fornix) sind jedoch kaum betroffen und weisen eine gewisse Resistenz auf. Bei den Kontrolltieren findet sich eine intensive Färbung des gesamten medialen Corpus callosum. Auch die orthogonal verlaufenden Fasertrakte der Fornix erscheinen homogen gefärbt und vollständig myelinisiert (Abbildung 10 A, 10 D). Nach akuter Cuprizone-Intoxikation ist die anti-PLP-Intensität im medialen Corpus callosum deutlich verringert. Die angrenzenden Kortexareale weisen ebenfalls eine verringerte Immunreaktivität auf und erscheinen weniger homogen. Die Regionen des Cingulums und der Fornix zeigen dagegen weiterhin eine hohe Färbeintensität (Abbildung 10 E). In der anti-CNPase-Färbung erscheint die Myelinisierung lückenhaft und sichtbar verringert. Das Corpus callosum

imponiert durch teilweise noch myelinisierte Anteile faserig und ausgedünnt (Abbildung 10 **B**). Nach chronischer Demyelinisierung mit Cuprizone zeigt sich ein weitestgehend analoges Bild. Das mediale Corpus callosum ist praktisch vollständig demyelinisiert. Die angrenzenden Kortexregionen sind ebenfalls demyelinisiert. Die anti-PLP-Immunreaktivität beider Regionen ist erheblich reduziert. Das Cingulum ist ebenfalls von der Demyelinisierung betroffen und weist nur wenig anti-PLP-Reaktivität auf. Die Fornix bleibt dagegen weiterhin myelinisiert, hier besteht eine lediglich geringfügig verminderte anti-PLP-Immunreaktivität (Abbildung 10 **F**). In der anti-CNPase-Färbung findet sich eine massiv rarifizierte Myelinstruktur innerhalb des Corpus callosum und eine Demyelinisierung der angrenzenden Kortexareale (Abbildung 10 **C**).

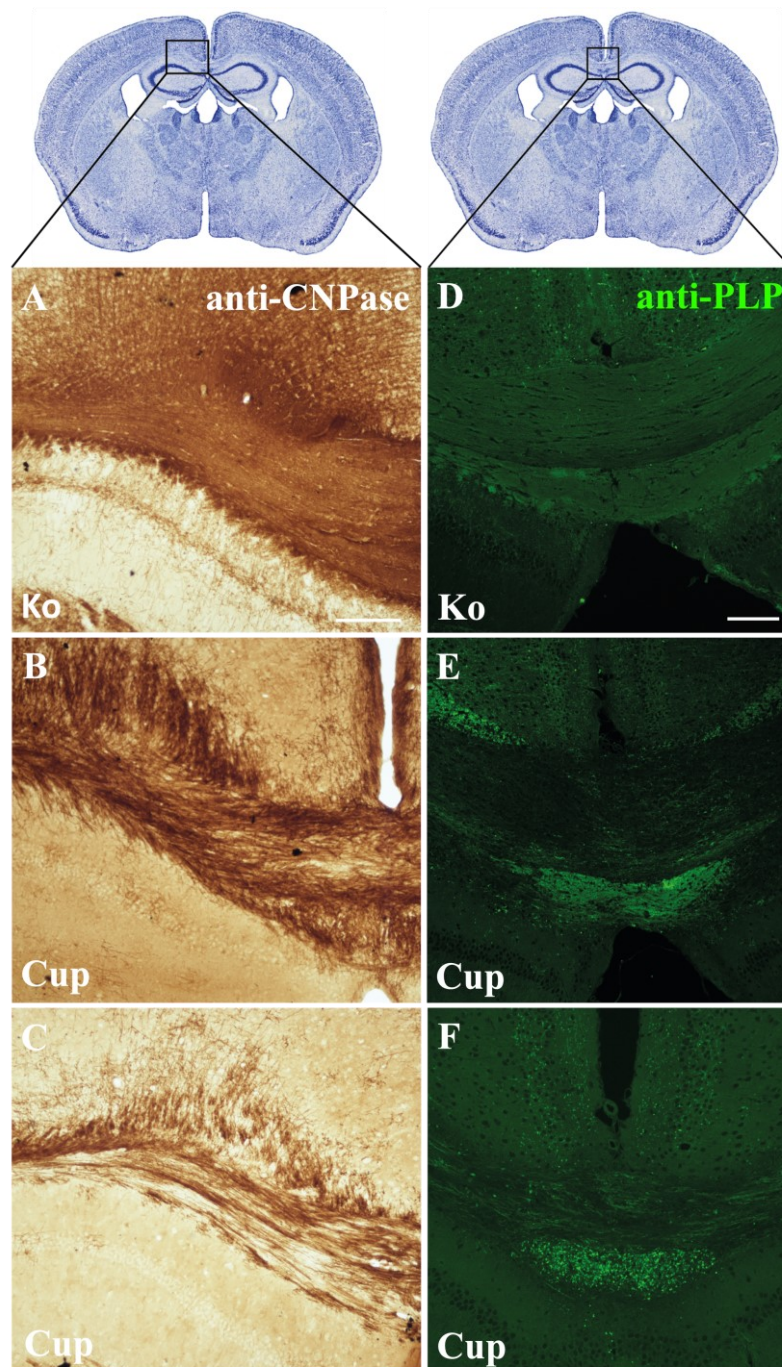


Abbildung 10: Effekt der Cuprizone-Intoxikation über fünf und 12 Wochen auf die Myelinisierung im Bereich des medialen Corpus callosum anhand immunhistochemischer anti-PLP und anti-CNPase-Färbungen

(A - C) zeigen eine immunhistochemische anti-CNPase-Färbung im Bereich des medialen Corpus callosum nach Cuprizone-Intoxikation (Cup) über fünf (B), zwölf (C) Wochen und bei Kontrolltieren (Ko) (A). (D - F) zeigen eine immunhistochemische anti-PLP-Färbung im Bereich des medialen Corpus callosum nach Cuprizone-Intoxikation über fünf (E), 12 (F) Wochen und bei Kontrolltieren (D). (A, D) Homogene Myelinisierung im Bereich des medialen Corpus callosum bei den Kontrolltieren. (B, E) Intensive Demyelinisierung nach akuter (fünf Wochen) Cuprizone-Intoxikation. Die Bereiche des Cingulum und der Fornix hippocampi sind nicht betroffen. (C, F) Nahezu vollständige Demyelinisierung des medialen Corpus callosum nach chronischer (12 Wochen) Cuprizone-Intoxikation. Das Cingulum ist ebenfalls betroffen, während die Fornix hippocampi myelinisiert bleibt. Messskala (A - C) = 100 µm; Messskala (D - F) = 100 µm.

Des Weiteren wurde die akute und chronische Demyelinisierung durch Cuprizone von einer reaktiven Gliose aus Mikrogliazellen und Astrozyten begleitet. In den Kontrolltieren finden sich im medialen Corpus callosum einige GFAP-positive Astrozyten sowie vereinzelt IBA1-positive Mikrogliazellen (Abbildung 11 **A**, 11 **D**). Die Astrozyten erscheinen bei höherer Auflösung geordnet und schmal. Die Mikrogliazellen sind als ruhender Phänotyp zu erkennen: sie haben kleine Zellkörper, ihre Ausläufer sind lang und verzweigt (Abbildung 12 **A**, 12 **D**). Nach akuter Cuprizone-Intoxikation kommt es im medialen Corpus callosum zu einer ausgeprägten Aktivierung von Mikrogliazellen. Die anti-IBA1-Intensität nimmt deutlich zu. Durch die hohe Zellzahl und größere Morphologie der Mikrogliazellen erscheint das mediale Corpus callosum unscharf durchsetzt (Abbildung 11 **B**). Bei höherer Auflösung ist der aktivierte Phänotyp der Mikrogliazellen zu erkennen: die Zellen sind vergrößert, die Ausläufer sind kurz, dick und wenig verzweigt (Abbildung 12 **B**). Es kommt außerdem zur intensiven Aktivierung und Ansammlung von Astrozyten. Die GFAP-Immunreaktivität im medialen Corpus callosum nimmt erheblich zu (Abbildung 11 **E**). Die reaktiven Astrozyten zeigen vergrößerte Zellkörper und ungeordnete Ausläufer (Abbildung 12 **E**). Nach chronischer Demyelinisierung mit Cuprizone ist im medialen Corpus callosum ebenfalls eine deutliche Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten sichtbar (Abbildung 11 **C**, 11 **F**). Im Vergleich zur akuten Demyelinisierung ist die Mikrogliose nach chronischer Demyelinisierung jedoch abgeschwächt, während die Astrozytose weiterhin stark ausgeprägt ist. Dementsprechend findet sich eine vergleichsweise schwächere IBA1-Immunreaktivität aber erhebliche GFAP-Immunreaktivität (Abbildung 11 **B**, 11 **C**, 11 **E**, 11 **F**). Sowohl Mikrogliazellen als auch Astrozyten zeigen bei höherer Auflösung eine verdickte Morphologie im Sinne eines aktivierten, reaktiven Phänotyps (Abbildung 12 **C**, 12 **F**).

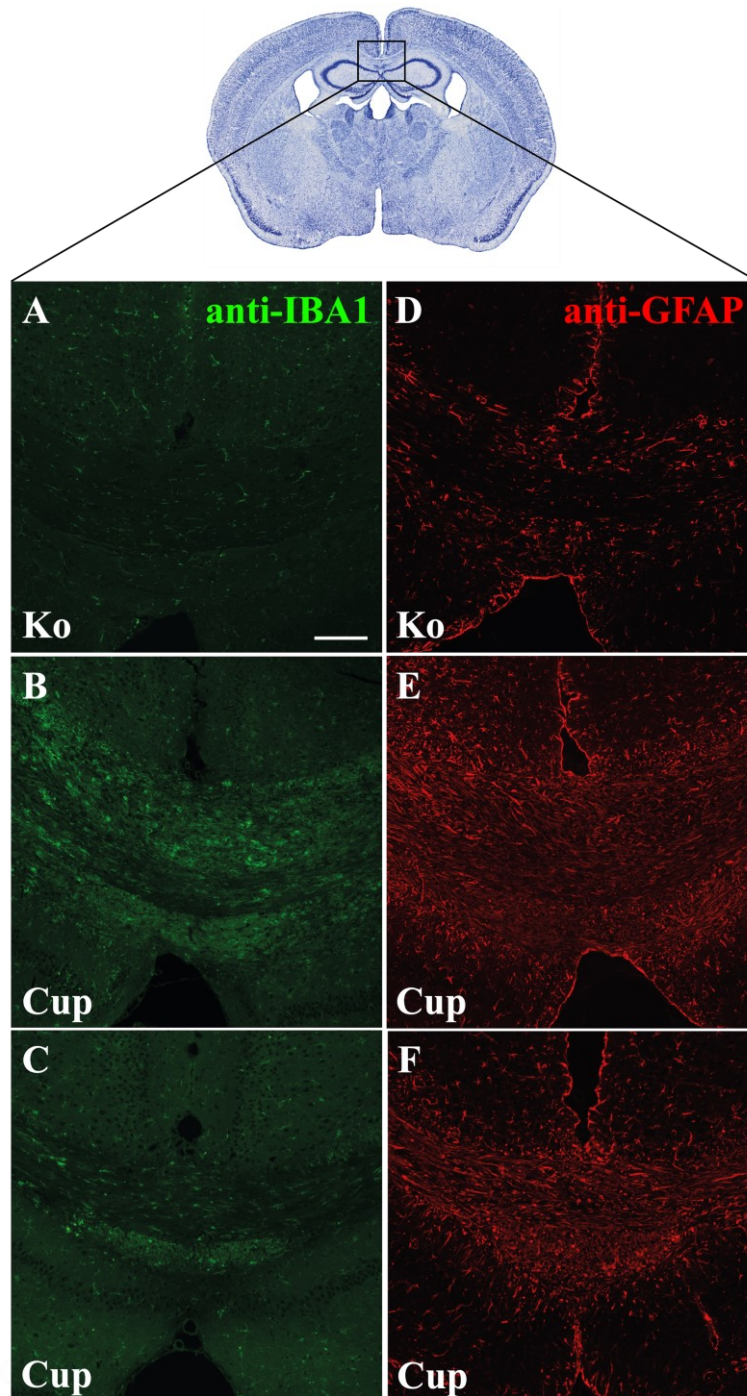


Abbildung 11: Effekt der Cuprizone-Intoxikation über fünf und 12 Wochen auf die reaktive Gliose anhand immunhistochemischer Färbungen der Mikrogliazellen (anti-IBA1) und Astrozyten (anti-GFAP)

(A - C) zeigen eine immunhistochemische anti-IBA1-Färbung im Bereich des medialen Corpus callosum nach Cuprizone-Intoxikation (Cup) über fünf (B), zwölf (C) Wochen und bei Kontrolltieren (Ko) (A). (D - F) zeigen eine immunhistochemische anti-GFAP-Färbung der gleichen Region nach Cuprizone-Intoxikation über fünf (E), 12 (F) Wochen und bei Kontrolltieren (D). (A) Einzelne IBA1-positive Mikrogliazellen bei den Kontrolltieren. (B) Massive Mikrozytose nach akuter (fünf Wochen) Cuprizone-Intoxikation. (C) Anhaltende Mikrozytose nach chronischer (12 Wochen) Cuprizone-Intoxikation. Jedoch sichtbar abgeschwächt im Vergleich zum Zustand nach akuter (B) Intoxikation. (D) GFAP-positive Astrozyten bei den Kontrolltieren. (E) Ausgeprägte Astrozytose nach akuter (fünf Wochen) Cuprizone-Intoxikation, welche nach chronischer (12 Wochen) Cuprizone-Intoxikation (F) anhaltend besteht. Messskala (A - F) = 100 μ m.

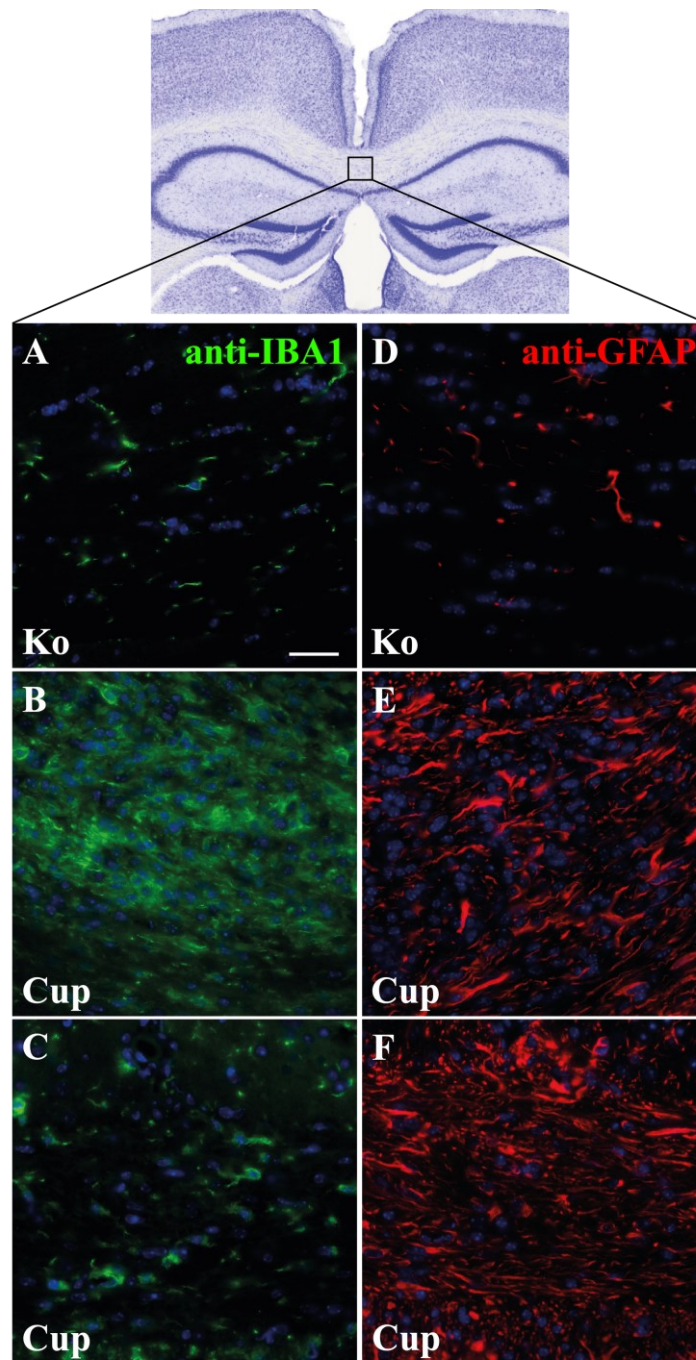


Abbildung 12: Effekt der Cuprizone-Intoxikation über fünf und 12 Wochen auf die Zellmorphologie der Mikrogliazellen (anti-IBA1) und Astrozyten (anti-GFAP) anhand immunhistochemischer Färbungen

(A - C) zeigen die 40-fache Vergrößerung einer immunhistochemischen anti-IBA1-Färbung des Corpus callosum nach Cuprizone-Intoxikation (Cup) über fünf (B), zwölf (C) Wochen und bei Kontrolltieren (Ko) (A). (D - F) zeigen die 40-fache Vergrößerung einer immunhistochemischen anti-GFAP-Färbung der gleichen Region nach Cuprizone-Intoxikation über fünf (E), 12 (F) Wochen und bei Kontrolltieren (D). (A) Einzelne, ruhende IBA1-positive Mikrogliazellen mit kleiner, schmaler Morphologie und dünnen Ausläufern bei den Kontrolltieren. (D) Ruhende GFAP-positive Astrozyten mit kleiner Morphologie und einzelnen, schmalen Ausläufern bei den Kontrolltieren. (B, C) Aktivierte Mikrogliazellen mit vergrößertem Zellkörper, verdickten Ausläufern und plumper Morphologie nach akuter und chronischer Cuprizone-Intoxikation. (E, F) Reaktive Astrozyten mit vergrößertem Zellkörpern und ungeordneten, verdickten Ausläufern nach akuter und chronischer Cuprizone-Intoxikation. Messskala (A - F) = 25 µm.

Die genannten histologischen Beobachtungen und Merkmale entsprechen den in der Literatur mehrfach beschrieben, typischen histopathologischen Veränderungen nach einer Cuprizone-Intoxikation (Chrzanowski et al., 2019; Goldberg et al., 2015; Kipp, Nyamoya, et al., 2017; Schmidt et al., 2013). Anhand der Befunde innerhalb dieser repräsentativen Gewebsschnitte zeigt sich eine regelhafte und erfolgreiche Demyelinisierung im Rahmen des Gesamtversuchs.

3.2 Kein regionaler Gehirnvolumenverlust bei akuter Cuprizone-Intoxikation

Wir untersuchten zuerst, ob sich die akute, fünfwöchige Cuprizone-Intoxikation auf die regionalen Hirnvolumen spezifischer Hirnregionen (ROI: Kortex, Corpus callosum, Subkortex) innerhalb der Zielregion (R265 – R305 nach Sidman et al., n.d.) auswirkt. Hierzu verwendeten wir quantitative stereologische Verfahren. Trotz der zuvor beschriebenen histopathologischen Veränderungen, wie Demyelinisierung und reaktiver Gliose, der über fünf Wochen behandelten Tiere zeigten sich nach akuter Cuprizone-Intoxikation keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Volumens der untersuchten Hirnregionen zwischen Behandlungsgruppe und Kontrollgruppe. Das Volumen der drei spezifischen Hirnregionen war für beide Gruppen vergleichbar: Kortex ($19,69 \pm 0,32 \text{ mm}^3$ vs. $19,29 \pm 0,31 \text{ mm}^3$); Corpus callosum ($2,03 \pm 0,05 \text{ mm}^3$ vs. $2,20 \pm 0,11 \text{ mm}^3$); Subkortex ($29,02 \pm 0,72 \text{ mm}^3$ vs. $28,93 \pm 0,82 \text{ mm}^3$). Die individuellen Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt: Kortex (CTX, Tabelle 15, Abbildung 13); Corpus callosum (CC, Tabelle 16, Abbildung 14), Subkortex (SCTX, Tabelle 17, Abbildung 15).

3. Ergebnisse

Tabelle 15: Details der Volumenbestimmung des Kortex (CTX) der Versuchstiere (Cuprizone; n = 5) und der Kontrolltiere (Kontrolle; n = 4) nach akuter Cuprizone-Intoxikation (5 Wochen). Individuelle Messwerte jeder pro Versuchstier vermessenen Schnittserie mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) sowie die der Volumenberechnung nach dem Cavalieri-Prinzip zugrundeliegenden Parameter. slg: Kantenlänge der x- und y-Dimension des Zählrasters der Punktzählung; Punktdicke: Größe des uniformen Abstands zwischen den einzelnen Gewebsschnitten der Schnittserie; Fläche pro Punkt, Volumen pro Punkt: Die mit jeweils einem gezählten Punkt assoziierte Fläche bzw. Volumen; Σ Punkte: alle gezählten Punkte innerhalb der vollständigen Schnittserie eines Versuchstiers; Δ -MW: Mittlere Änderung des Volumens zwischen Kontroll- und Cuprizonegruppe.

Kortex (CTX) - Akute Intoxikation				
slg (μm)	500			
Fläche pro Punkt (μm^2)	250000			
Punktdicke (μm)	120			
Volumen pro Punkt (mm^3)	0,03			
	Kontrolle		Cuprizone	
	Σ Punkte	Volumen (mm^3)	Σ Punkte	Volumen (mm^3)
	629	18,87	677	20,31
	650	19,50	646	19,38
	674	20,22	643	19,29
	672	20,16	612	18,36
			638	19,13
Mittelwert		19,69		19,29
SD		0,64		0,70
SEM		0,32		0,31
Δ-MW (mm^3)	0,4 \pm 1,34			
Δ-MW (%)	2,03 \pm 6,80			
p-Wert	0,4108			

Kortex (CTX)

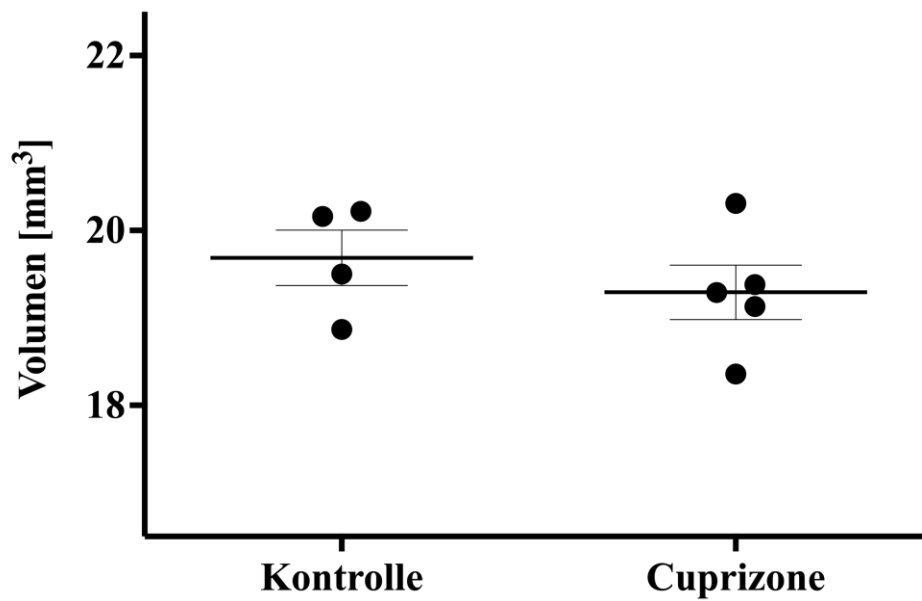


Abbildung 13: Keine Volumenreduktion des Kortex nach akuter Cuprizone-Intoxikation

Quantifizierung des kortikalen Volumens (CTX) nach akuter Cuprizone-Intoxikation (5 Wochen) bei Kontrolltieren (Kontrolle; $n = 4$) und Versuchstieren (Cuprizone; $n = 5$). Die Daten sind als individuelle Werte (Punkte) sowie als Mittelwert pro Gruppe (dicke Linie) mit Fehlerbalken (schmale Linien) dargestellt. Es ergibt sich keine statistisch signifikante Reduktion des Volumens des Kortex zwischen Kontroll- und Versuchstieren nach akuter Cuprizone-Intoxikation.

Tabelle 16: Details der Volumenbestimmung des Corpus callosum (CC) der Versuchstiere (Cuprizone; n = 5) und der Kontrolltiere (Kontrolle; n = 4) nach akuter Cuprizone-Intoxikation (5 Wochen). Individuelle Messwerte jeder pro Versuchstier vermessenen Schnittserie mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) sowie die der Volumenberechnung nach dem Cavalieri-Prinzip zugrundeliegenden Parameter. slg: Kantenlänge der x- und y-Dimension des Zählrasters der Punktzählung; Punktdicke: Größe des uniformen Abstands zwischen den einzelnen Gewebsschnitten der Schnittserie; Fläche pro Punkt, Volumen pro Punkt: Die mit jeweils einem gezählten Punkt assoziierte Fläche bzw. Volumen; Σ Punkte: alle gezählten Punkte innerhalb der vollständigen Schnittserie eines Versuchstiers; Δ -MW: Mittlere Änderung des Volumens zwischen Kontroll- und Cuprizonegruppe.

Corpus callosum (CC) - Akute Intoxikation				
slg (μm)	220			
Fläche pro Punkt (μm^2)	48400			
Punktdicke (μm)	120			
Volumen pro Punkt (mm^3)	0,00581			
	Kontrolle		Cuprizone	
	Σ Punkte	Volumen (mm^3)	Σ Punkte	Volumen (mm^3)
	327	1,90	387	2,25
	366	2,13	430	2,50
	345	2,00	324	1,88
	362	2,10	396	2,30
			354	2,05
Mittelwert		2,03		2,20
SD		0,10		0,24
SEM		0,05		0,11
Δ-MW (mm^3)	0,17 \pm 0,34			
Δ-MW (%)	8,37 \pm 16,75			
p-Wert	0,2465			

Corpus callosum (CC)

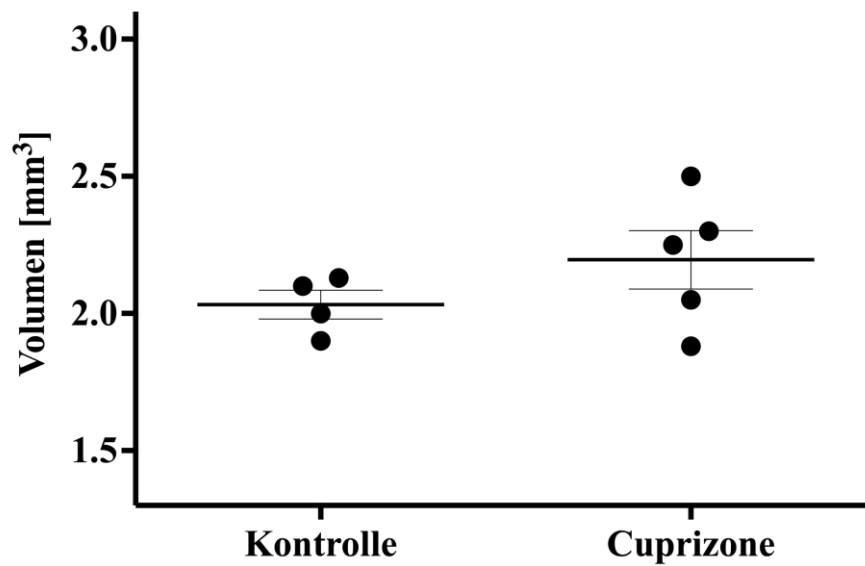


Abbildung 14: Keine Volumenreduktion des Corpus callosum nach akuter Cuprizone-Intoxikation

Quantifizierung des Volumens des Corpus callosum (CC) nach akuter Cuprizone-Intoxikation (5 Wochen) bei Kontrolltieren (Kontrolle; $n = 4$) und Versuchstieren (Cuprizone; $n = 5$). Die Daten sind als individuelle Werte (Punkte) sowie als Mittelwert pro Gruppe (dicke Linie) mit Fehlerbalken (schmale Linien) dargestellt. Es ergibt sich keine statistisch signifikante Reduktion des Volumens des Corpus callosum zwischen Kontroll- und Versuchstieren nach akuter Cuprizone-Intoxikation.

Tabelle 17: Details der Volumenbestimmung des Subkortex (SCTX) der Versuchstiere (Cuprizone; n = 5) und der Kontrolltiere (Kontrolle; n = 4) nach akuter Cuprizone-Intoxikation (5 Wochen). Individuelle Messwerte jeder pro Versuchstier vermessenen Schnittserie mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) sowie die der Volumenberechnung nach dem Cavalieri-Prinzip zugrundeliegenden Parameter. slg: Kantenlänge der x- und y-Dimension des Zählrasters der Punktzählung; Punktdicke: Größe des uniformen Abstands zwischen den einzelnen Gewebsschnitten der Schnittserie; Fläche pro Punkt, Volumen pro Punkt: Die mit jeweils einem gezählten Punkt assoziierte Fläche bzw. Volumen; Σ Punkte: alle gezählten Punkte innerhalb der vollständigen Schnittserie eines Versuchstiers; Δ -MW: Mittlere Änderung des Volumens zwischen Kontroll- und Cuprizonegruppe.

Subkortex (SCTX) - Akute Intoxikation				
slg (μm)	500			
Fläche pro Punkt (μm^2)	250000			
Punktdicke (μm)	120			
Volumen pro Punkt (mm^3)	0,03			
	Kontrolle		Cuprizone	
	Σ Punkte	Volumen (mm^3)	Σ Punkte	Volumen (mm^3)
	1176	35,28	1208	36,24
	1299	38,97	1298	38,94
	1214	36,42	1170	35,10
	1263	37,89	1235	37,05
			1328	39,84
Mittelwert		29,02		28,93
SD		1,43		1,83
SEM		0,72		0,82
Δ-MW (mm^3)	0,09 \pm 3,26			
Δ-MW (%)	0,31 \pm 11,23			
p-Wert	0,9413			

Subkortex (SCTX)

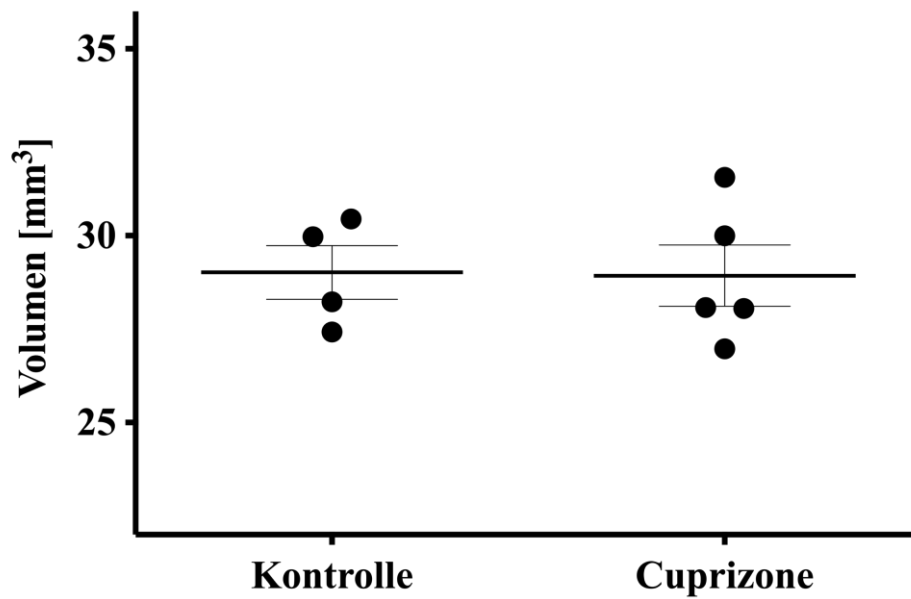


Abbildung 15: Keine Volumenreduktion des Subkortex nach akuter Cuprizone-Intoxikation

Quantifizierung des subkortikalen Volumens (SCTX) nach akuter Cuprizone-Intoxikation (5 Wochen) bei Kontrolltieren (Kontrolle; n = 4) und Versuchstieren (Cuprizone; n = 5). Die Daten sind als individuelle Werte (Punkte) sowie als Mittelwert pro Gruppe (dicke Linie) mit Fehlerbalken (schmale Linien) dargestellt. Es ergibt sich keine statistisch signifikante Reduktion des Volumens des Subkortex zwischen Kontroll- und Versuchstieren nach akuter Cuprizone-Intoxikation.

3.3 Regionaler Gehirnvolumenverlust bei chronischer Cuprizone-Intoxikation

Als zweites untersuchten wir, ob sich die chronische, zwölfwöchige Cuprizone-Intoxikation auf die regionalen Hirnvolumen der spezifischen Hirnregionen (ROI: Kortex, Corpus callosum, Subkortex) innerhalb der Zielregion (R265 – R305 nach Sidman et al., n.d.) auswirkt. Dies erfolgte ebenfalls mittels quantitativer stereologischer Verfahren. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Volumenverlust des Corpus callosum sowie des Subkortex nach chronischer Cuprizone-Intoxikation verglichen mit der Kontrollgruppe. Das mittlere Volumen des Corpus callosum betrug $1,96 \pm 0,10 \text{ mm}^3$ in den Kontrolltieren und $1,59 \pm 0,09 \text{ mm}^3$ in den Cuprizone behandelten Tieren (*p = 0,0208). Das mittlere Volumen des Subkortex betrug $30,96 \pm 0,34 \text{ mm}^3$ in den Kontrolltieren und $29,11 \pm 0,14 \text{ mm}^3$ in den Cuprizone behandelten Tieren (**p = 0,0012). Im Kortex konnte jedoch kein signifikanter Volumenverlust festgestellt werden ($20,58 \pm 0,24 \text{ mm}^3$ vs. $20,71 \pm 0,22 \text{ mm}^3$). Die individuellen Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt: Kortex (CTX, Tabelle 18, Abbildung 16); Corpus callosum (CC, Tabelle 19, Abbildung 17), Subkortex (SCTX, Tabelle 20, Abbildung 18).

3. Ergebnisse

Tabelle 18: Details der Volumenbestimmung des Kortex (CTX) der Versuchstiere (Cuprizone; n = 5) und der Kontrolltiere (Kontrolle; n = 6) nach chronischer Cuprizone-Intoxikation (12 Wochen). Individuelle Messwerte jeder pro Versuchstier vermessenen Schnittserie mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) sowie die der Volumenberechnung nach dem Cavalieri-Prinzip zugrundeliegenden Parameter. slg: Kantenlänge der x- und y-Dimension des Zählrasters der Punktzählung; Punktdicke: Größe des uniformen Abstands zwischen den einzelnen Gewebsschnitten der Schnittserie; Fläche pro Punkt, Volumen pro Punkt: Die mit jeweils einem gezählten Punkt assoziierte Fläche bzw. Volumen; Σ Punkte: alle gezählten Punkte innerhalb der vollständigen Schnittserie eines Versuchstiers; Δ -MW: Mittlere Änderung des Volumens zwischen Kontroll- und Cuprizonegruppe.

Kortex (CTX) - Chronische Intoxikation				
slg (μm)	500			
Fläche pro Punkt (μm^2)	250000			
Punktdicke (μm)	120			
Volumen pro Punkt (mm^3)	0,03			
	Kontrolle		Cuprizone	
	Σ Punkte	Volumen (mm^3)	Σ Punkte	Volumen (mm^3)
	675	20,25	699	20,97
	696	20,88	674	20,22
	681	20,43	695	20,85
	655	19,65	673	20,19
	701	21,03	711	21,33
	707	21,21		
Mittelwert		20,58		20,71
SD		0,58		0,50
SEM		0,24		0,22
Δ-MW (mm^3)	0,13 \pm 1,08			
Δ-MW (%)	0,63 \pm 5,25			
p-Wert	0,6875			

Kortex (CTX)

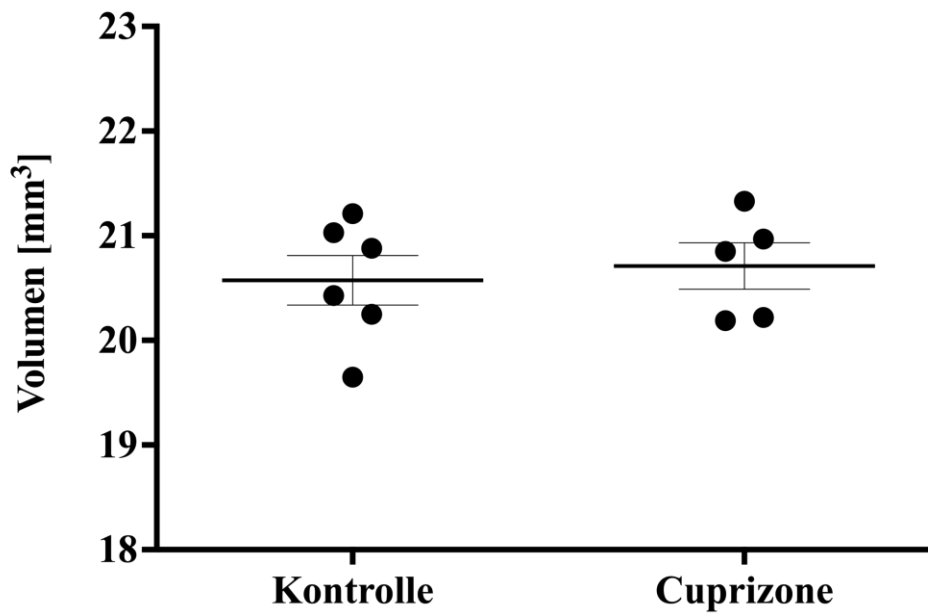


Abbildung 16: Keine Volumenreduktion des Kortex nach chronischer Cuprizone-Intoxikation

Quantifizierung des kortikalen Volumens (CTX) nach chronischer Cuprizone-Intoxikation (12 Wochen) bei Kontrolltieren (Kontrolle; $n = 6$) und Versuchstieren (Cuprizone; $n = 5$). Die Daten sind als individuelle Werte (Punkte) sowie als Mittelwert pro Gruppe (dicke Linie) mit Fehlerbalken (schmale Linien) dargestellt. Es ergibt sich keine statistisch signifikante Reduktion des Volumens des Kortex zwischen Kontroll- und Versuchstieren nach chronischer Cuprizone-Intoxikation.

3. Ergebnisse

Tabelle 19: Details der Volumenbestimmung des Corpus callosum (CC) der Versuchstiere (Cuprizone; n = 5) und der Kontrolltiere (Kontrolle; n = 6) nach chronischer Cuprizone-Intoxikation (12 Wochen). Individuelle Messwerte jeder pro Versuchstier vermessenen Schnittserie mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) sowie die der Volumenberechnung nach dem Cavalieri-Prinzip zugrundeliegenden Parameter. slg: Kantenlänge der x- und y-Dimension des Zählrasters der Punktzählung; Punktdicke: Größe des uniformen Abstands zwischen den einzelnen Gewebsschnitten der Schnittserie; Fläche pro Punkt, Volumen pro Punkt: Die mit jeweils einem gezählten Punkt assoziierte Fläche bzw. Volumen; Σ Punkte: alle gezählten Punkte innerhalb der vollständigen Schnittserie eines Versuchstiers; Δ -MW: Mittlere Änderung des Volumens zwischen Kontroll- und Cuprizonegruppe; *p \leq 0,05.

Corpus Callosum (CC) - Chronische Intoxikation				
slg (μm)	220			
Fläche pro Punkt (μm^2)	48400			
Punktdicke (μm)	120			
Volumen pro Punkt (mm^3)	0,00581			
	Kontrolle		Cuprizone	
	Σ Punkte	Volumen (mm^3)	Σ Punkte	Volumen (mm^3)
	361	2,10	316	1,84
	406	2,36	299	1,74
	325	1,89	231	1,34
	293	1,70	257	1,49
	314	1,82	261	1,52
	325	1,89		
Mittelwert		1,96		1,59
SD		0,24		0,20
SEM		0,10		0,09
Δ-MW (mm^3)	0,37 \pm 0,44			
Δ-MW (%)	18,8 \pm 22,45			
p-Wert	0,0208 *			

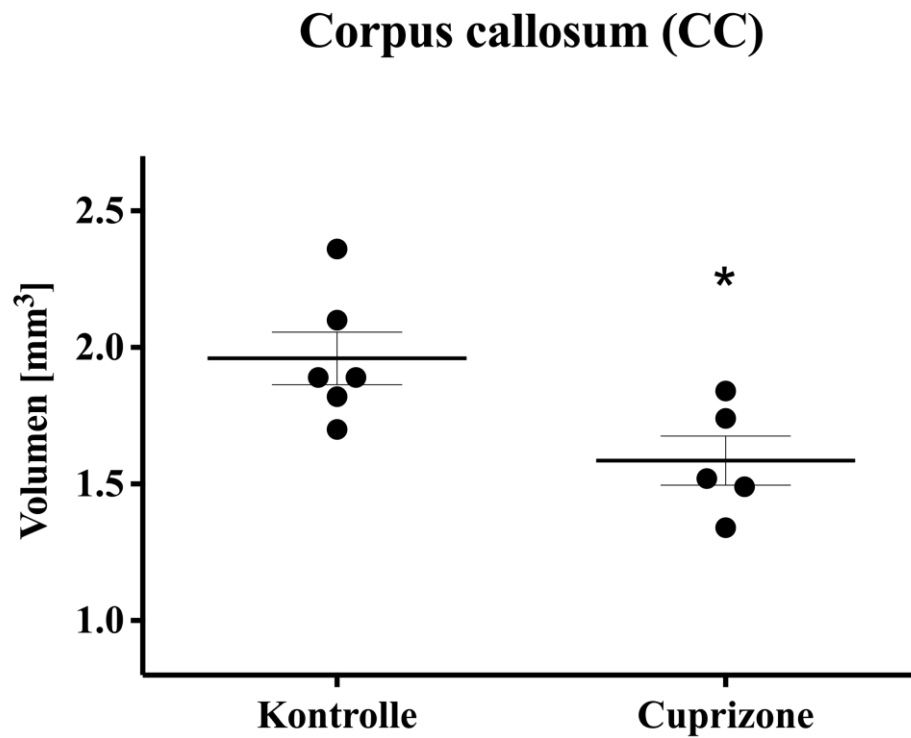


Abbildung 17: Volumenreduktion des Corpus callosum nach chronischer Cuprizone-Intoxikation

Quantifizierung des callosalen Volumens (CC) nach chronischer Cuprizone-Intoxikation (12 Wochen) bei Kontrolltieren (Kontrolle; $n = 6$) und Versuchstieren (Cuprizone; $n = 5$). Die Daten sind als individuelle Werte (Punkte) sowie als Mittelwert pro Gruppe (dicke Linie) mit Fehlerbalken (schmale Linien) dargestellt. Es ergibt sich eine statistisch signifikante Reduktion des Volumens des Corpus callosum zwischen Kontroll- und Versuchstieren nach chronischer Cuprizone-Intoxikation (CC, $p = 0,0208$). $*p \leq 0,05$.

3. Ergebnisse

Tabelle 20: Details der Volumenbestimmung des Subkortex (SCTX) der Versuchstiere (Cuprizone; n = 5) und der Kontrolltiere (Kontrolle; n = 6) nach chronischer Cuprizone-Intoxikation (12 Wochen). Individuelle Messwerte jeder pro Versuchstier vermessenen Schnittserie mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) sowie die der Volumenberechnung nach dem Cavalieri-Prinzip zugrundeliegenden Parameter. slg: Kantenlänge der x- und y-Dimension des Zählrasters der Punktzählung; Punktdicke: Größe des uniformen Abstands zwischen den einzelnen Gewebsschnitten der Schnittserie; Fläche pro Punkt, Volumen pro Punkt: Die mit jeweils einem gezählten Punkt assoziierte Fläche bzw. Volumen; Σ Punkte: alle gezählten Punkte innerhalb der vollständigen Schnittserie eines Versuchstiers; Δ -MW: Mittlere Änderung des Volumens zwischen Kontroll- und Cuprizonegruppe. *p \leq 0,05; **p \leq 0,01.

Subkortex (SCTX) - Chronische Intoxikation				
slg (μm)	500			
Fläche pro Punkt (μm^2)	250000			
Punktdicke (μm)	120			
Volumen pro Punkt (mm^3)	0,03			
	Kontrolle (n = 6)		Cuprizone (n = 5)	
	Σ Punkte	Volumen (mm^3)	Σ Punkte	Volumen (mm^3)
	1281	38,43	1260	37,80
	1309	39,27	1252	37,56
	1310	39,30	1225	36,75
	1266	37,98	1237	37,11
	1354	40,62	1252	37,56
	1355	40,65		
Mittelwert		30,96		29,11
SD		0,83		0,32
SEM		0,34		0,14
Δ-MW (mm^3)	1,85 \pm 1,15			
Δ-MW (%)	5,99 \pm 3,71			
p-Wert	0,0012 **			

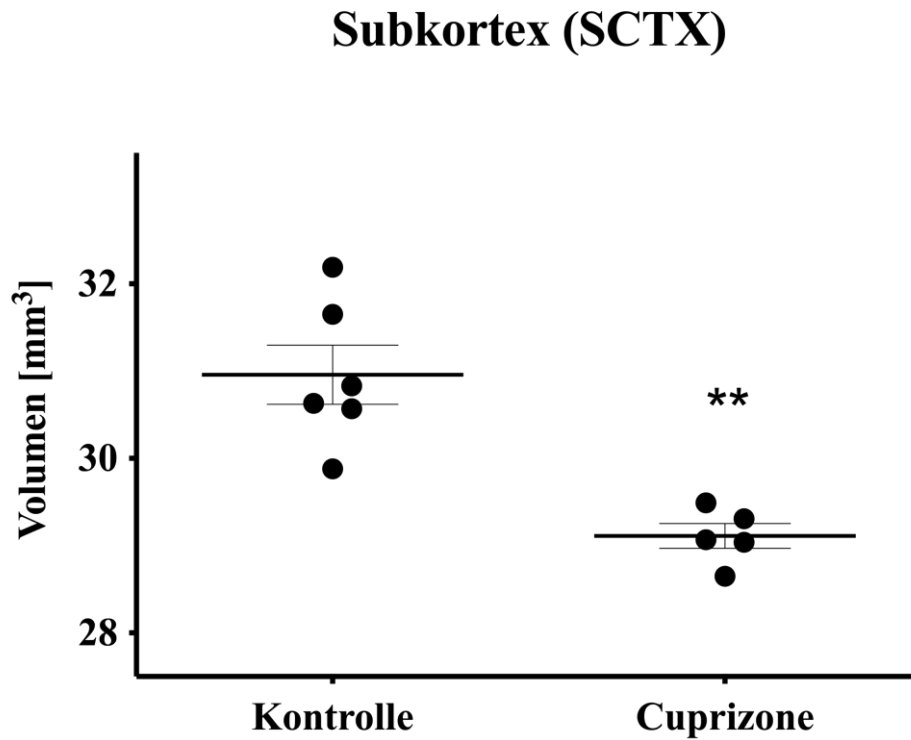


Abbildung 18: Volumenreduktion des Subkortex nach chronischer Cuprizone-Intoxikation

Quantifizierung des subkortikalen Volumens (SCTX) nach chronischer Cuprizone-Intoxikation (12 Wochen) bei Kontrolltieren (Kontrolle; $n = 6$) und Versuchstieren (Cuprizone; $n = 5$). Die Daten sind als individuelle Werte (Punkte) sowie als Mittelwert pro Gruppe (dicke Linie) mit Fehlerbalken (schmale Linien) dargestellt. Es ergibt sich eine statistisch signifikante Reduktion des Volumens des Subkortex zwischen Kontroll- und Versuchstieren nach chronischer Cuprizone-Intoxikation (SCTX, $p = 0,0012$). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

4. Diskussion

4.1 Validität der stereologischen Auswertung

In der klinischen MS-Forschung wird Gehirnatrophie meist mittels MRI-Bildgebung evaluiert. Dabei kann entweder durch segmentierungsbasierte Querschnittsverfahren eine punktuelle Volumenbestimmung erfolgen oder mit Hilfe longitudinaler Methoden eine Atrophierate aus dem Abgleich zweier MRT-Datensätze miteinander bestimmt werden. Es erfolgen sowohl direkte Bestimmungen des cerebralen Parenchymvolumens als auch Bestimmungen indirekter Indikatoren wie der Größe des dritten Ventrikels, aus denen später das Gehirnvolumen abgeleitet wird (Andravizou et al., 2019; Bermel et al., 2002; De Stefano et al., 2014; Giorgio et al., 2008; Miller et al., 2002). Die Messung der Gehirnatrophie durch MRI-Bildgebung ist inzwischen ein wichtiger Endpunkt klinischer Studien, sie ist jedoch aufgrund verschiedener Limitationen noch kein regulärer Bestandteil der klinischen Praxis (De Stefano et al., 2014; Giorgio et al., 2008; Klawiter, 2013).

Trotz ihrer grundsätzlichen Präzision bergen die MRI-Verfahren mehrere potenzielle Fehlerquellen. Die Auflösung und Qualität der Bildgewinnung sind zentral für die Qualität der erhobenen Daten und benötigen kostenintensive, hochwertige Technik (Giorgio et al., 2008). Beispielsweise führt ein schlechter Kontrast der Bilder zu Schwierigkeiten in der Gewebeklassifikation segmentierungsbasierter Verfahren. Auch führen Intensitätsänderungen durch Bewegungsartefakte und Frequenzinhomogenitäten zu Segmentierungsfehlern, insbesondere wenn eine hohe Auflösung als Grundlage einer präzisen Analyse benötigt wird (Dale et al., 1999; Fischl et al., 1999). Des Weiteren kann es innerhalb der automatisierten Auswertung zu Fehlern im Ausschluss nicht relevanter Strukturen und somit einer erhöhten Variabilität kommen (Battaglini et al., 2008; Giorgio et al., 2008; Jasperse et al., 2007). Neben der technischen Ansprüche wird die MRI-Bildgebung besonders in-vivo außerdem durch Krankheitsfaktoren wie Entzündungslast und der Menge an Flüssigkeit im Gewebe sowie im klinischen Bereich durch verschiedene Physiologie- und Umweltfaktoren (Komorbiditäten, Lebensstil, Alter, Genetik) beeinflusst (Enzinger et al., 2005; Giorgio et al., 2008; Zivadinov et al., 2009).

Die Messung von Gehirnatrophie durch MRI-Bildgebung ist eine wertvolle und präzise Methode, die vielfältigen Einflussfaktoren stellen jedoch eine besondere Schwierigkeit dar. Momentan fehlt es an in der Breite standardisierten, validierten Protokollen, welche diese Faktoren kontrollieren und eine zufriedenstellende Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der verschiedenen Datensätze untereinander ermöglichen (De Stefano et al., 2014; Filippi et al., 2011; Filippi & Rocca, 2011). Die statistisch valide Messung auch diskreter Unterschiede von Strukturen im dreidimensionalen Raum bedarf demnach weiterhin robuster, quantitativer stereologischer Methoden. Die design-based Stereologie gilt als „*state-of-the-art*“ in diesem

Feld (Kipp, Kiessling, et al., 2017; Schmitz & Hof, 2005, p. 813). Sie ist daher die Methode der Wahl in unserer Untersuchung.

Die design-based Stereologie bietet mehrere Vorteile gegenüber anderen Methoden zur Messung von Zellzahl, Volumen und Zelldichte (Schmitz & Hof, 2005). Mit Hilfe der design-based Stereologie können Zellen und Strukturen im dreidimensionalen Raum direkt gezählt oder vermessen werden. Dabei werden systematische Messfehler vermieden und es entfällt die Notwendigkeit weitere Parameter wie Zellgröße, Form oder Orientierung zu berücksichtigen (Gundersen et al., 1988; West, 1993, 2002). Die konsequente Anwendung der design-based Stereologie ermöglicht eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener quantitativer histologischer Untersuchungen zum gleichen Thema (Coggeshall & Lekan, 1996; Coleman, 1997; Harrison, 1999).

Grundsätzlich können die nach Anfärbung und Schnitt entstandenen Zellprofile der Schnittbilder die eigentlichen Eigenschaften eines Gewebes deutlich verfälscht darstellen. In histologischen Auswertungen kommt es daher zu mehreren Schwierigkeiten (Kipp, Kiessling, et al., 2017). Beispielsweise steigt die Wahrscheinlichkeit eines gesuchten Objekts, in einem Schnitt erfasst zu sein, mit zunehmender Größe des Objekts an. Speziell bei geringer Schnittdicke und großem Objekt kann dasselbe Objekt in mehreren Schnittbildern abgebildet sein. Die Anzahl sichtbarer Profile eines bestimmten Zelltyps unter dem Mikroskop entspricht also nicht der tatsächlichen Zellzahl dieses Typs, sondern hängt unter anderem vom Volumen der Zellen ab. Des Weiteren ist die räumliche Orientierung der untersuchten Zellpopulation von Bedeutung. Beispielsweise haben ovale, zigarrenförmige Zellen eine höhere Wahrscheinlichkeit in transversalen als in longitudinalen Schnitten abgebildet zu werden. Demnach kann ihre Anzahl bei transversalem Anschnitt überschätzt werden (Kipp, Kiessling, et al., 2017; Mayhew, 1991). Ein weiterer wichtiger Aspekt der Quantifizierung von Zellzahlen ist der Unterschied zwischen absoluter Zellzahl und Zelldichte. Wenn es in einem Gewebe zu signifikanter Atrophie kommt, so rücken die Zellen in diesem Gewebe enger zusammen und die Zelldichte steigt. Bei erhöhter Zelldichte hat jedoch jede Zelle auch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, in einem Schnittbild erfasst zu sein. Die absolute Zellzahl wird somit überschätzt und kann bei hoher Zelldichte fälschlich erhöht sein (Kipp, Kiessling, et al., 2017). Darüber hinaus ist die Zelldichte grundsätzlich vom untersuchten Volumen abhängig. Beispielsweise resultiert eine verringerte Zellzahl nicht zwingend in einer verringerten Zelldichte. Kommt es gleichzeitig zu einer Volumenabnahme des Gewebes, so bleibt die Zelldichte trotz niedrigerer Zellzahl gleich (als Beispiel hierfür vgl. Schmitz et al., 2005).

Die Ergebnisse histologischer Untersuchungen können also von verschiedensten Faktoren beeinflusst werden. Die Auswertung der Daten wird hierdurch jedoch erschwert und die Validität der Ergebnisse beeinträchtigt. Die design-based Stereologie löst die geschilderten Probleme durch verschiedene Prinzipien: (i) die Quantifizierung basiert auf dicken, dreidimensionalen Schnittvolumen und nicht auf dünnen zweidimensionalen Ebenen; (ii) es wird nicht die Zelldichte errechnet, sondern die absolute Zellzahl erhoben; (iii) durch das

Zählen spezifischer Punkte, welche nur einmal in jeder Zelle vorkommen, werden ganze Zellen und nicht die Zellprofile gezählt. Außerdem müssen die Zellgröße, Form, räumliche Verteilung und Orientierung der Zellen durch vorab definierte Parameter und Kriterien bei der Untersuchung nicht beachtet werden. Indem die Notwendigkeit entfällt, geometrische Parameter der Zellen einbeziehen zu müssen, werden systematische Fehlerquellen eliminiert. Dies führt zu robusteren, valideren Daten. Diese Aspekte der Morphometrie wurden in der Literatur ausführlich dargestellt (Cruz-Orive, 1987; Gundersen et al., 1988; Mayhew, 1991; Mayhew & Burton, 1997; Ochs, 2014; Puelles et al., 2014; Schmitz & Hof, 2005; Sterio, 1984; West, 1993, 2002).

Im Rahmen einer quantitativen histologischen Untersuchung werden aus Gründen der Durchführbarkeit häufig nicht alle Objekte einer bestimmten Struktur tatsächlich gezählt, sondern anhand einer „repräsentativen“ Stichprobe abgeschätzt. Ein Problem hierbei ist die Auswahl „repräsentativer“ Gewebsschnitte und Gesichtsfelder. Die Klassifizierung der verwendeten Stichprobe als „repräsentativ“ basiert auf der Annahme, sie bilde den Durchschnitt der Ergebnisse ab, welche man erhalte, würde man die gesamte ROI auf die gleiche Art untersuchen. Oft orientiert sich die Auswahl der Stichprobe jedoch ebenfalls an praktischen Kriterien wie der Qualität des Schnittes und der Färbeintensität. In der Folge wird das gesamte Gewebe möglicherweise nicht gleichmäßig abgebildet. Tatsächlich können „repräsentativ“ ausgewählte Schnittserien und Gesichtsfelder erheblich vom eigentlichen Durchschnitt des Gewebes abweichen (vgl. Schmitz et al., 2005). Die Reproduzierbarkeit von Daten anhand einer solchen, subjektiv ausgewählten Stichprobe ist eingeschränkt (Glaser et al., 2006; Kipp, Kiessling, et al., 2017; Schmitz & Hof, 2005).

Eines der wichtigsten Prinzipien der design-based Stereologie ist deshalb das *systematic and random sampling* (SRS). Ziel dabei ist es, allen Zonen und Zellen innerhalb der ROI die gleiche Wahrscheinlichkeit der Aufnahme in die Stichprobe zu garantieren. Das SRS wird im experimentellen Ablauf zweifach angewendet: (i) zuerst bei der Entscheidung, welche Gewebsschnitte der gesamten Schnittserie für die Untersuchung verwendet werden (ii) zweitens bei der Bestimmung, welche Zonen bzw. Teile dieser Schnitte später mikroskopisch analysiert werden. Da jede Zelle die gleiche Wahrscheinlichkeit hat, in der Stichprobe abgebildet zu werden, handelt es sich um ein „*unbiased sampling*“. Der zu erwartende Durchschnitt des Gewebes wird in der Untersuchung somit adäquat abgebildet. Hierdurch werden unter anderem die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse maßgeblich erhöht (Glaser et al., 2006; Kipp, Kiessling, et al., 2017, p. 329; Schmitz & Hof, 2005). Bei der auch in unserer Untersuchung durchgeführten Punktmessung des Volumens einer SRS-Schnittserie mittels Cavalieri-Methode entspricht die zweite Anwendung des SRS der zufälligen Positionierung des uniformen Quadratrasters über der ROI. Die gesamte Anzahl von Punkten auf der ROI ist somit eine systematisch und zufällig generierte („*unbiased*“) Annäherung an die Gesamtfläche der ROI (Gundersen & Jensen, 1987, p. 229). Die Punktzählung erlaubt darüber hinaus die Bestimmung von Volumen zusätzlicher

Subkompartimente des gleichen Gewebsschnitts. Sie ist außerdem stärker („*powerful*“) bei der Analyse komplexer Formen als andere Messmethoden (Kipp, Kiessling, et al., 2017, p. 329).

Grundsätzlich gilt, dass quantitative histologische Untersuchungen mit Hilfe der design-based Stereologie keine exakten Messdaten ergeben, sondern präzise Schätzungen darstellen. Der Fehlerkoeffizient hierbei bleibt bei der praktischen Anwendung der design-based Stereologie zwar unbekannt, es ist jedoch möglich Vorhersagen diesbezüglich zu treffen (Schmitz & Hof, 2005). In der Literatur werden mehrere Methoden beschrieben, den Fehlerkoeffizienten der Volumenbestimmung mittels Cavalieri-Prinzip vorherzusagen (García-Fiñana et al., 2003; Geinisman et al., 1996; Gundersen & Jensen, 1987; Roberts et al., 1994). Ein Problem der design-based Stereologie ist die Festlegung spezifischer Kriterien und Rahmenbedingungen, welche die Quantifizierung erfüllen muss, damit eine bestimmte Zielvarianz in den Ergebnissen der Schätzung erreicht wird. Ein optimales Protokoll liefert einerseits ausreichend Daten aus den Stichproben, um eine hohe Präzision in der Schätzung zu erreichen. Andererseits sollten möglichst wenig Messungen durchgeführt werden müssen, um durch einen niedrigen Arbeitsaufwand eine hohe Effizienz der Untersuchung zu erzielen. Verschiedene wissenschaftliche Fragestellungen haben jedoch unterschiedliche Rahmenbedingungen und unterschiedlich hohe Ansprüche an die Präzision der Schätzungen. Daher gibt es keine allgemeingültige Antwort darauf, wie ein Protokoll gestaltet sein muss, damit eine ausreichend hohe Präzision erreicht wird, während der Arbeitsaufwand ausreichend effizient gestaltet ist. Für jede Studie sollte deshalb ein jeweils individuelles Stichprobenschema erstellt werden, welches die beeinflussenden Faktoren, wie Anzahl der Versuchstiere oder Anzahl der zu zählenden Zellen, berücksichtigt (Kipp, Kiessling, et al., 2017; Schmitz & Hof, 2005). Für die auch in unserer Untersuchung verwendete Volumenbestimmung mittels Cavalieri-Methode wertet man hierzu allgemein mindestens acht Gewebsschnitte mit mindestens 250 gezählten Punkten pro ROI aus. Um dies zu erreichen, wird die Seitenlänge des Quadratrasters entsprechend der Fläche der ROI angepasst. Je kleiner die ROI, desto kürzer wird die Seitenlänge des Rasters gewählt (Kipp, Kiessling, et al., 2017).

Die histologischen Ergebnisse dieser Arbeit entstammen der konsequent durchgeführten methodischen Vorgehensweise der design-based Stereologie. Dies wird im Kapitel „Material und Methoden“ entsprechend dargestellt. Basierend auf der Methodik sowie den in diesem Kapitel geschilderten Überlegungen dazu, werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in ihrer Gesamtschau als valide beurteilt.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die humane MS-Forschung unterliegt verschiedenen Limitationen. Durch strenge Regularien und Vorgaben des Gesetzgebers ist der Zugang zu Gewebeproben und Untersuchungsmaterial von MS-Patienten grundsätzlich begrenzt. Die entnommenen Proben stammen dabei normalerweise von chronischen, späten Stadien der Erkrankung, was die Untersuchung früherer Stadien erschwert und das Forschungsbild verzerrt. Außerdem können experimentelle Rahmenbedingungen in klinischen Studien grundsätzlich schwer verändert und kontrolliert werden (Denic et al., 2011; Procaccini et al., 2015). Aufgrund dieser Einschränkungen wird ein erheblicher Teil der Daten in der MS-Forschung durch bildgebende Verfahren des MRI und der PET (Positronen-Emissions-Tomographie) gewonnen. Daten aus bildgebenden Verfahren sind zwar breit verfügbar, sie lassen jedoch nur eingeschränkt Rückschlüsse bezüglich der mechanistischen Vorgänge auf zellulärer Ebene zu (Filippi & Rocca, 2011; Wu et al., 2008). Studien zur Erforschung des Pathomechanismus der Erkrankung lassen sich somit weder klinisch am Patienten noch allein mittels Bildgebung leicht durchführen. Um die einzelnen Teilaspekte der pathologischen Prozesse und Vorgänge der MS adäquat herausarbeiten zu können, ist deshalb die Verwendung von experimentellen Tiermodellen in der MS-Forschung notwendig. Durch sie lassen sich Ätiologie sowie Mechanismen der Pathogenese und des Krankheitsprogresses näher untersuchen und therapeutische Ansätze präklinisch testen (Denic et al., 2011; van der Star et al., 2012; Procaccini et al., 2015; Wu et al., 2008).

In der klinischen MS-Forschung entwickelt sich die Volumenveränderung und Atrophie von Hirngewebe zu einem zunehmend bedeutsamen Parameter (Bermel & Bakshi, 2006; Miller et al., 2002; Rojas et al., 2016). Sie ist ein relevanter Prognosefaktor und zeigt eine gute Korrelation sowohl mit physischer Behinderung als auch mit kognitiver Leistungsfähigkeit (Batista et al., 2012; E. Fisher et al., 2002; Houtchens et al., 2007). Ebenso ist die Gehirnatrophie einer der am häufigsten verwendeten Biomarker zur Beurteilung neuroprotektiver Effekte in präklinischen MS-Studien. Aufgrund dieser Relevanz ist es von besonderer Bedeutung, das histologische Korrelat dieser Volumenveränderungen im Gehirn zu ergründen (Hochstrasser et al., 2019). In der Vergangenheit konnten mit Hilfe von Mausmodellen wichtige Fortschritte in der Erforschung der Pathogenese der MS gemacht werden und neue Medikamente zur Therapie der Erkrankung entwickelt werden (Denic et al., 2011; Hans Lassmann & Bradl, 2017; Steinman & Zamvil, 2006). Mausmodelle sind deshalb ein wichtiges Werkzeug, um die Mechanismen, welche der Gehirnatrophie in der MS zugrunde liegen, näher zu erforschen. Ziel dieser Arbeit war es, die Gehirnatrophie im Cuprizone-Modell zu quantifizieren, um die Signifikanz des Modells in Bezug auf die Mechanismen der Gehirnatrophie in der MS besser zu verstehen. Dazu bestimmten wir mittels standardisierter histologischer Methoden das Ausmaß der kortikalen und subkortikalen Gehirnatrophie nach

akuter sowie nach chronischer Demyelinisierung. Diese Daten verglichen wir mit denen der Kontrollgruppen.

Wir konnten zeigen, dass bestimmte Hirnregionen, nämlich Subkortex und Corpus callosum, nach Demyelinisierung durch Cuprizone einen Volumenverlust aufweisen. In beiden Regionen zeigte sich der Volumenverlust nach chronischer Demyelinisierung. Im Kortex konnte dagegen keine Volumenveränderung nach akuter oder chronischer Demyelinisierung durch Cuprizone festgestellt werden.

Es ist bemerkenswert, dass zwar der Subkortex einen deutlichen Volumenverlust aufwies, für den zerebralen Kortex jedoch kein signifikanter Volumenverlust in der Untersuchung festgestellt werden konnte. Grundsätzlich gilt der Kortex neben dem Corpus callosum als eine besonders vulnerable Hirnregion im Cuprizone-Modell. Hier zeigt sich bereits nach fünf Wochen Cuprizone-Intoxikation eine ausgeprägte Demyelinisierung (Cerina et al., 2017; Goldberg et al., 2015; Skripuletz et al., 2008). Vor diesem Hintergrund war es überraschend, dass sich für diese Region sogar nach chronischer Intoxikation keine kortikale Atrophie nachweisen ließ. Der zerebrale Kortex wurde von uns als eine zusammengefasste Region untersucht. Es lässt sich daher nicht ausschließen, dass sich in einzelnen Teilregionen wie etwa dem somatomotorischen oder somatosensorischen Kortex, welche im Cuprizone-Modell vulnerabel sind (Clarner et al., 2012), doch ein Volumenverlust findet (Hochstrasser et al., 2019).

In der Literatur findet sich eine breite Evidenz, dass es im Cuprizone-Modell zu axonalem Schaden kommt (Hoffmann et al., 2008; Höflich et al., 2016; Rühling et al., 2018). Ob es jedoch auch zu einem Verlust von Zellzahl oder Dichte der Neurone kommt, ist dagegen weniger einheitlich untersucht. In weiterführenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte trotz der in dieser Arbeit dargestellten Volumenveränderungen keine reduzierte Anzahl neuronales Kernantigen-positiver (NeuN⁺) Neurone und keine Verkleinerung der neuronalen Perikaryen in den untersuchten Hirnregionen festgestellt werden (Hochstrasser et al., 2019). Hoffmann et al. (2008) fanden in ihrer Untersuchung einen Verlust von Neuronen im Hilus des Gyrus dentatus chronisch demyelinisierter Mäuse. Darüber hinaus fanden Lapato et al. (2017) einen Verlust Parvalbumin-positiver Interneurone in der CA1-Region des Hippocampus nach chronischer Demyelinisierung durch Cuprizone. Während es im Gehirn von MS-Patienten definitiv zu einem Verlust neuronaler Zellen kommt, ist unklar, welche Mechanismen dort tatsächlich zur Neurodegeneration führen (Peterson et al., 2001). Im Cuprizone-Modell scheint die Demyelinisierung allein, zumindest in den untersuchten Hirnregionen, kein ausreichender Auslöser für den Zellverlust von Neuronen zu sein. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass in neuropathologischen, post-mortalen MS-Studien keine Assoziation zwischen dem Ausmaß der Demyelinisierung einerseits und der Neuronendichte im Neokortex andererseits festgestellt werden konnte (Carassiti et al., 2018; Klaver et al., 2015). Wir vermuten daher, dass es neben metabolischem Stress noch zusätzlicher Faktoren bedarf, um einen neuronalen Zellverlust im Neokortex und folglich kortikale Atrophie auszulösen. Beispielsweise könnten

Entzündungsfaktoren, welche im Rahmen autoimmuner Prozesse ausgeschüttet werden, einen Einfluss auf die Neurodegeneration im Neokortex haben (Hochstrasser et al., 2019).

Wie eingangs erwähnt, untersuchten wir außerdem die subkortikalen Hirnregionen und stellten dort einen signifikanten Volumenverlust nach chronischer Demyelinisierung durch Cuprizone fest. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der in der Literatur berichteten spezifischen Atrophie grauer Substanz in subkortikalen Hirnregionen bei MS-Patienten (Batista et al., 2012; Cifelli et al., 2002; Houtchens et al., 2007; Wylezinska et al., 2003). In diesen MRT-Studien konnte gezeigt werden, dass der Thalamus als subkortikale Hirnregion am stärksten von der Atrophie grauer Substanz betroffen ist. Dort fand sich eine Volumenreduktion von 12-25 %. Darüber hinaus korreliert der Volumenverlust des Thalamus signifikant positiv sowohl mit dem Verlust kognitiver Leistungsfähigkeit als auch der Abnahme physischer Funktionalität (Batista et al., 2012; Houtchens et al., 2007; Magon et al., 2014; Schoonheim et al., 2012). Dies verdeutlicht die besondere Relevanz des Thalamus als eine zentrale Struktur im Hinblick auf den klinischen Symptomverlauf und Krankheitsfortschritt. Basierend auf diesen Erkenntnissen untersuchte unserer Arbeitsgruppe in weiterführenden Studien, inwieweit die subkortikalen Hirnregionen im Einzelnen von dem hier dargestellten Volumenverlust des Subkortex betroffen sind. Hierbei zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Volumenverlust des Thalamus sowie der Capsula interna chronisch demyelinisierter Mäuse (Hochstrasser et al., 2019).

Der Thalamus ist die maßgebende und größte Struktur des Diencephalons. Er ist namensgebend für die kleineren diencephalischen Anteile wie dem Hypothalamus oder Epithalamus. Der Thalamus ist eine hochgradig vernetzte Hirnregion mit zahlreichen Verbindungen in verschiedenste kortikale und subkortikale Regionen. Wir vermuten, dass die multiplen reziproken Verbindungen des Thalamus zu einer Sensibilität gegenüber in anderen Hirnregionen stattfindenden pathologischen Prozessen führen. Der Thalamus fungiert dementsprechend als eine Art „Barometer“ für diffusen Schaden im Hirngewebe (Kipp et al., 2015, p. 1127). In der MS ist der thalamische Volumenverlust assoziiert mit neuroaxonaler Pathologie. Cifelli et al. (2002) konnten in ihrer Untersuchung mittels MRI und Magnetresonanzspektroskopie (MRS) sowohl verringerte Neuronendichten als auch verringerte Konzentrationen von N-Acetylaspartat (NAA) im Thalamus von MS-Patienten feststellen. Im Cuprizone-Modell ergaben weitere stereologische Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe jedoch subkortikal keine reduzierte Anzahl NeuN⁺-Neurone und keine Verkleinerung der neuronalen Perikaryen. Axonaler Schaden in Form akkumulierender APP⁺-Sphären konnte dagegen nach chronischer Demyelinisierung sowohl im Thalamus als auch der Capsula interna festgestellt werden (Hochstrasser et al., 2019). APP ist ein integrales Glykoprotein Typ-1, welches im neuronalen Soma synthetisiert, und mittels anterogradem axonalen Transport zur Synapse transportiert wird. Die immunhistochemische Färbung durch anti-APP ist eine Standardmethode zur Darstellung akuten axonalen Schadens (Rühling et al., 2018; Thiessen et al., 2013). Vor dem Hintergrund der thalamischen Beteiligung und des axonalen Schadens könnte der Volumenverlust innerhalb der Capsula interna durch die

Degeneration efferenter thalamischer Fasertrakte bedingt sein (Hochstrasser et al., 2019). Dies wäre kongruent mit in der Literatur beschriebenen reduzierten NAA-Konzentrationen in der normal-erscheinenden weißen Substanz der Capsula interna von MS-Patienten (Lee et al., 2000).

Die Demyelinisierung durch Cuprizone betrifft sowohl Strukturen der grauen als auch der weißen Substanz. Das Corpus callosum ist besonders stark von der Demyelinisierung betroffen und wird deshalb häufig zu deren Veranschaulichung herangezogen. Nach fünf Wochen Cuprizone-Intoxikation zeigt sich vor allem im medialen Corpus callosum eine ausgeprägte, fast vollständige Demyelinisierung, begleitet von einer Astrozytose und Infiltration von aktivierter Mikroglia (Acs et al., 2009; Vega-Riquer et al., 2019; Zhan et al., 2020). Parallel zur akuten Demyelinisierung finden sich dazu im Corpus Callosum deutliche Zeichen axonalen Schadens, unter anderem in Form axonaler Schwellung und akkumulierter APP⁺-Sphären (Hochstrasser et al., 2019; Rühling et al., 2018).

Vor allem vor dem Hintergrund der Demyelinisierung und des axonalen Schadens war es daher überraschend, dass wir in unserer stereologischen Untersuchung nach chronischer nicht aber nach akuter Demyelinisierung durch Cuprizone einen signifikanten Volumenverlust des Corpus callosum feststellen konnten. Hierzu sind mehrere Gründe denkbar. Grundsätzlich ist festzuhalten, dass die meisten Studien zu akutem axonalem Schaden im Cuprizone-Modell entweder axonale Transportdefizite oder Veränderungen in der Proteinexpression von Neurofilamenten untersuchten (Höflich et al., 2016; Irvine & Blakemore, 2006). Beides entspricht nicht zwangsweise dem Verlust von Axonen oder dem tatsächlichen Ausmaß irreversibler axonaler Degeneration (Nikić et al., 2011). Der Goldstandard zur Messung axonalen Verlusts ist die Verwendung von Elektronenmikroskopie oder kunststoffeingebetteten Dünnschnitten. Des Weiteren ist es möglich, dass trotz eines eventuell vorhandenen Verlusts von Axonen ein Volumenverlust des Corpus callosum aufgrund morphologischer Veränderungen durch die starke Astrozytose und Infiltration aktivierter Mikroglia maskiert wurde. Außerdem ist ein pathologisches Merkmal der Cuprizone-Intoxikation die spongiforme Degeneration weißer Substanz (Carlton, 1969). Die rarifizierte, mikrovakuoläre Struktur könnte einen möglichen Volumenverlust des Corpus callosum ebenfalls maskieren (Hochstrasser et al., 2019).

Es wird vermutet, dass Entzündungsvorgänge und das damit verbundene Gewebsödem in der MS zu einer Zunahme des Gehirnvolumens führen. Dieser Vorgang würde in einer Unterschätzung des echten Volumenverlusts resultieren. Im Cuprizone-Modell lässt sich ein maskierender Effekt durch ein entzündliches Gewebsödem besonders vor dem Hintergrund der starken Entzündungsaktivität im Corpus callosum nicht ausschließen. Falls vorhanden, könnte der Volumenverlust nach akuter Demyelinisierung möglicherweise schwächer sein als nach chronischer Demyelinisierung. Ein maskierender Effekt aufgrund eines Gewebsödems wäre somit eine mögliche Erklärung für den ausbleibenden Volumenverlust der einzelnen Hirnregionen und des Gesamtgehirnvolumens (Hochstrasser et al., 2019) nach akuter

Demyelinisierung durch Cuprizone. Tatsächlich sind antientzündliche Therapien in der MS vor allem am Therapieanfang teilweise mit einem beschleunigten Volumverlust von Hirngewebe assoziiert. Dieser Effekt wird als „Pseudoatrophie“ bezeichnet und entsteht vermutlich durch das Abklingen der Entzündung und des Gewebsödems. Es handelt sich dementsprechend wahrscheinlich nicht um echte Hirnatrophie. Basierend auf den Daten der vorliegenden Arbeit konnte unsere Arbeitsgruppe in weiterführenden Untersuchungen eine Reduktion des Gesamtgehirnvolumens nach chronischer Demyelinisierung durch Cuprizone trotz andauernder Mikrogliose feststellen. Dies lässt auf einen tatsächlichen Gewebsverlust im Cuprizone-Modell schließen (Hochstrasser et al., 2019). Es wird davon ausgegangen, dass die Pseudoatrophie Strukturen der weißen Substanz stärker betrifft als Strukturen der grauen Substanz, möglicherweise aufgrund einer erhöhten Aktivierung und Infiltration von Gliazellen. Der Volumenverlust grauer Substanz könnte deshalb ein verlässlicherer Marker sein, um irreversible Veränderungen durch Gewebsverlust von möglicherweise reversiblen Veränderungen durch Pseudoatrophie zu unterscheiden (Horakova et al., 2008; Zivadinov et al., 2008). Im Cuprizone-Modell zeigt sich im Kortex und anderen Regionen grauer Substanz ebenfalls eine weniger stark ausgeprägte Astrozytose und Mikrogliaaktivierung (Clarner et al., 2012; Große-Veldmann et al., 2016).

Es ist derzeit nicht bekannt, auf welcher pathologischen Grundlage der Volumenverlust im Cuprizone-Modell beruht. Grundsätzlich können mehrere Veränderungen zu cerebralem Volumenverlust führen: Verlust von Neuronen, axonale Degeneration, synaptischer Schaden, Verlust von Myelinscheiden im Rahmen von Demyelinisierungsprozessen sowie Degeneration von Gliazellen (Hochstrasser et al., 2019). In einer Untersuchung von Hirngewebe verstorbener MS-Patienten konnte im Kortex ein ausgedehnter Verlust der Dornenfortsätze festgestellt werden. Der Verlust der Dornenfortsätze fand sich sowohl in demyelinisierten als auch in nicht-demyelinisierten Regionen und war unabhängig vom generellen axonalen Verlust innerhalb der kortikalen Läsionen (Jürgens et al., 2016).

Für das Cuprizone-Modell konnte unsere Arbeitsgruppe in weiterführenden Untersuchungen zeigen, dass der hier beschriebene subkortikale Volumenverlust nicht von einer Reduktion der neuronalen Gesamtzellzahl begleitet wird. Tendenziell zeigte sich aber ein verringertes subkortikales Neuropil-Volumen, welches eine Degeneration im Bereich der Axone und/oder Dendriten vermuten lässt. Neben der Neuronenzellzahl wurden dabei jedoch keine Zellzahlen anderer Zelltypen stereologisch quantifiziert. Es ist daher möglich, dass die hier festgestellte subkortikale Atrophie auf einer Degeneration der Oligodendrozyten oder Astrozyten beruht (Hochstrasser et al., 2019). Unser Labor konnte in der Vergangenheit zeigen, dass Astrozyten nach akuter Demyelinisierung durch Cuprizone den stressassoziierten Transkriptionsfaktor *DNA Damage Inducible Transcript 3* (DDIT3) exprimieren (Fischbach et al., 2019). Es sind jedoch weitere Untersuchungen nötig, um diesen Aspekt näher zu beleuchten.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass das chronische Cuprizone-Modell ein signifikantes Ausmaß subkortikaler Gehirnatrophie aufweist, womit es wichtige Parallelen zur MS und der dort beobachteten Gehirnatrophie widerspiegelt.

Im akuten Cuprizone-Modell konnte dagegen kein signifikantes Ausmaß an Gehirnatrophie festgestellt werden. Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass das chronische, nicht jedoch das akute Cuprizone-Modell ein wertvolles Instrument zur Untersuchung subkortikaler Gehirnatrophie ist. Es bedarf nun weiterer Studien, um zu erforschen, welche Mechanismen der Gehirnatrophie innerhalb des Cuprizone-Modells zugrunde liegen und inwiefern diese pharmakologisch beeinflusst werden können.

Die progredienten Formen der MS sind weniger prävalent und allgemein weniger gut verstanden als die schubweise verlaufende RRMS. Pathologisch besteht in der progredienten Krankheitsphase eine geringere Beteiligung peripherer Immunzellen. Es kommt zu einem Wechsel von fokalem zu diffusem Schaden weißer Substanz sowie stärkerer kortikaler Beteiligung (Howell et al., 2011; Kutzelnigg et al., 2005; Thompson, Baranzini, et al., 2018). Beim diffusen Gewebsschaden stehen neben den immunologischen vor allem neurodegenerative Mechanismen im Vordergrund. Es kommt zur Degeneration chronisch demyelinisierter Axone (Kornek et al., 2000), Astrozytenschaden oder Dysfunktion (Rademakers et al., 2011; Schreiner et al., 2015) und Mikrogliaaktivierung (van Horssen et al., 2012). Die Therapiemöglichkeiten der progredienten MS sind weiterhin unzureichend. Auch im Vergleich zur Bandbreite an zugelassenen Pharmazeutika der RRMS besteht hier ein großer Bedarf an neuen, effektiven Therapiemöglichkeiten (Thompson, Baranzini, et al., 2018).

Die Forschung an Tiermodellen mit Fokus auf den neurodegenerativen Anteilen der MS könnte dabei ein wichtiger Bestandteil zum besseren Verständnis der progredienten MS-Formen sein. Das Cuprizone-Modell bildet mehrere Aspekte der progredienten MS-Pathologie gut ab. Die Gemeinsamkeiten bestehen unter anderem in dem intrinsisch getriebenen Schaden an Axonen und Myelin, der Aktivierung funktioneller Kaskaden gegen oxidativen Stress und dem weitestgehenden Erhalt der Blut-Hirn-Schranke (Draheim et al., 2016; Zhan et al., 2020). In der progredienten MS findet sich darüberhinaus eine verstärkte Atrophie von Strukturen der grauen Substanz (Cao et al., 2021; Pagani et al., 2005). Wie in unserer Untersuchung festgestellt werden konnte, wird dieser Aspekt im chronischen Cuprizone-Modell ebenfalls abgebildet. Das Cuprizone-Modell könnte deshalb auch zur Untersuchung von Mechanismen der Neuroprotektion und neuroprotektiven Wirksamkeit neuer Pharmazeutika genutzt werden.

Idealerweise wären in Zukunft alle Mechanismen und deren Ablauf exakt verstanden, die im Cuprizone-Modell zu Neurodegeneration und Hirnatrophie führen. Das Modell könnte dann gezielt zur Untersuchung einzelner pathologischer Vorgänge und Interaktionen eingesetzt werden. Dieses Ziel ist jedoch noch nicht vollständig erreicht. Die pathologische Grundlage, auf welcher der Volumenverlust im Cuprizone-Modell beruht, ist derzeit noch nicht verstanden. Der genaue Wirkmechanismus, durch den das Cuprizone zur Demyelinisierung, Degeneration der Oligodendrozyten und axonalem Schaden führt, ist ebenfalls weiterhin unklar. Wir sind der

Meinung, dass das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der Neurodegeneration im Cuprizone-Modell ein wichtiger Baustein zum besseren Verständnis der Neurodegeneration in der MS sein kann. Es ist daher wichtig, die pathologischen Vorgänge im Cuprizone-Modell in weiteren Studien zu erforschen und sie vollständig zu verstehen. Die im Cuprizone-Modell gewonnenen Einblicke können mit hoher Wahrscheinlichkeit eine wichtige Grundlage zur Entwicklung neuartiger Therapiemöglichkeiten und Behandlungsmethoden vor allem progredienter MS-Formen darstellen.

Literaturverzeichnis

- Acs, P., Kipp, M., Norkute, A., Johann, S., Clarner, T., Braun, A., Berente, Z., Komoly, S., & Beyer, C. (2009). 17beta-estradiol and progesterone prevent cuprizone provoked demyelination of corpus callosum in male mice. *Glia*, *57*(8), 807–814. <https://doi.org/10.1002/glia.20806>
- Alonso, A., & Hernán, M. A. (2008). Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: A systematic review. *Neurology*, *71*(2), 129–135. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000316802.35974.34>
- Amato, M. P., Hakiki, B., Goretti, B., Rossi, F., Stromillo, M. L., Giorgio, A., Roscio, M., Ghezzi, A., Guidi, L., Bartolozzi, M. L., Portaccio, E., & De Stefano, N. (2012). Association of MRI metrics and cognitive impairment in radiologically isolated syndromes. *Neurology*, *78*(5), 309–314. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31824528c9>
- Amato, Maria Pia, Ponziani, G., Pracucci, G., Bracco, L., Siracusa, G., & Amaducci, L. (1995). Cognitive Impairment in Early-Onset Multiple Sclerosis: Pattern, Predictors, and Impact on Everyday Life in a 4-year Follow-Up. *Archives of Neurology*, *52*(2), 168–172. <https://doi.org/10.1001/archneur.1995.00540260072019>
- Amato, Maria Pia, Portaccio, E., Goretti, B., Zipoli, V., Battaglini, M., Bartolozzi, M. L., Stromillo, M. L., Guidi, L., Siracusa, G., Sorbi, S., Federico, A., & De Stefano, N. (2007). Association of neocortical volume changes with cognitive deterioration in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Archives of Neurology*, *64*(8), 1157–1161. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.8.1157>
- Amato, Maria Pia, Zipoli, V., & Portaccio, E. (2008). Cognitive changes in multiple sclerosis. In *Expert Review of Neurotherapeutics* (Vol. 8, Issue 10, pp. 1585–1596). <https://doi.org/10.1586/14737175.8.10.1585>
- Andravizou, A., Dardiotis, E., Artemiadis, A., Sokratous, M., Siokas, V., Tsouris, Z., Aloizou, A.-M., Nikolaidis, I., Bakirtzis, C., Tsivgoulis, G., Deretzi, G., Grigoriadis, N., Bogdanos, D. P., & Hadjigeorgiou, G. M. (2019). Brain atrophy in multiple sclerosis: mechanisms, clinical relevance and treatment options. *Autoimmunity Highlights*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/s13317-019-0117-5>
- Armstrong, R. C. (2007). Growth factor regulation of remyelination: Behind the growing interest in endogenous cell repair of the CNS. In *Future Neurology* (Vol. 2, Issue 6, pp. 689–697). NIH Public Access. <https://doi.org/10.2217/14796708.2.6.689>
- Arnett, H. A., Mason, J., Marino, M., Suzuki, K., Matsushima, G. K., & Ting, J. P. Y. (2001). TNF α promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nature Neuroscience*, *4*(11), 1116–1122. <https://doi.org/10.1038/nn738>
- Ascherio, A., & Munger, K. L. (2007). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. *Annals of Neurology*, *61*(4), 288–299. <https://doi.org/10.1002/ana.21117>
- Ascherio, A., & Munger, K. L. (2010). Epstein–Barr Virus Infection and Multiple Sclerosis: A Review. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, *5*(3), 271–277. <https://doi.org/10.1007/s11481-010-9201-3>
- Bakker, D. A., & Ludwin, S. K. (1987). Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, *78*(2), 125–137. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(87\)90055-4](https://doi.org/10.1016/0022-510X(87)90055-4)
- Bakshi, R., Czarnecki, D., Shaikh, Z. A., Priore, R. L., Janardhan, V., Kaliszky, Z., & Kinkel, P. R. (2000). Brain MRI lesions and atrophy are related to depression in multiple sclerosis. *NeuroReport*, *11*(6), 1153–1158. <https://doi.org/10.1097/00001756-200004270-00003>

- Barnett, M. H., & Prineas, J. W. (2004). Relapsing and Remitting Multiple Sclerosis: Pathology of the Newly Forming Lesion. *Annals of Neurology*, 55(4), 458–468. <https://doi.org/10.1002/ana.20016>
- Batista, S., Zivadinov, R., Hoogs, M., Bergsland, N., Heininen-Brown, M., Dwyer, M. G., Weinstock-Guttman, B., & Benedict, R. H. B. (2012). Basal ganglia, thalamus and neocortical atrophy predicting slowed cognitive processing in multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, 259(1), 139–146. <https://doi.org/10.1007/s00415-011-6147-1>
- Battaglini, M., Smith, S. M., Brogi, S., & De Stefano, N. (2008). Enhanced brain extraction improves the accuracy of brain atrophy estimation. *NeuroImage*, 40(2), 583–589. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.10.067>
- Baxi, E. G., DeBruin, J., Tosi, D. M., Grishkan, I. V., Smith, M. D., Kirby, L. A., Strasburger, H. J., Fairchild, A. N., Calabresi, P. A., & Gocke, A. R. (2015). Transfer of myelin-reactive Th17 cells impairs endogenous remyelination in the central nervous system of cuprizone-fed mice. *Journal of Neuroscience*, 35(22), 8626–8639. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3817-14.2015>
- Bejaoui, K., & Rolak, L. A. (2010). What is the risk of permanent disability from a multiple sclerosis relapse? *Neurology*, 74(11), 900–902. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181d55ee9>
- Benedict, R. H. B., Carone, D. A., & Bakshi, R. (2004). Correlating brain atrophy with cognitive dysfunction, mood disturbances, and personality disorder in multiple sclerosis. In *Journal of Neuroimaging* (Vol. 14, Issue SUPPL. 3). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1051228404266267>
- Benedict, R. H. B., Weinstock-Guttman, B., Fishman, I., Sharma, J., Tjoa, C. W., & Bakshi, R. (2004). Prediction of Neuropsychological Impairment in Multiple Sclerosis: Comparison of Conventional Magnetic Resonance Imaging Measures of Atrophy and Lesion Burden. *Archives of Neurology*, 61(2), 226–230. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.2.226>
- Bergsland, N., Horakova, D., Dwyer, M. G., Dolezal, O., Seidl, Z. K., Vaneckova, M., Krasensky, J., Havrdova, E., & Zivadinov, R. (2012). Subcortical and cortical gray matter atrophy in a large sample of patients with clinically isolated syndrome and early relapsing-remitting multiple sclerosis. *American Journal of Neuroradiology*, 33(8), 1573–1578. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A3086>
- Bermel, R. A., & Bakshi, R. (2006). The measurement and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis. In *Lancet Neurology* (Vol. 5, Issue 2, pp. 158–170). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70349-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70349-0)
- Bermel, R. A., Bakshi, R., Tjoa, C., Puli, S. R., & Jacobs, L. (2002). Bicaudate ratio as a magnetic resonance imaging marker of brain atrophy in multiple sclerosis. *Archives of Neurology*, 59(2), 275–280. <https://doi.org/10.1001/archneur.59.2.275>
- Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T., & Brück, W. (2000). Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain*, 123(6), 1174–1183. <https://doi.org/10.1093/brain/123.6.1174>
- Blakemore, W. F. (1972). Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *Journal of Neurocytology*, 1(4), 413–426. <https://doi.org/10.1007/BF01102943>
- Blakemore, W. F., & Franklin, R. J. M. (2008). *Remyelination in Experimental Models of Toxin-Induced Demyelination* (pp. 193–212). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-73677-6_8
- Bradl, M., & Lassmann, H. (2010). Oligodendrocytes: Biology and pathology. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 119, Issue 1, pp. 37–53). Acta Neuropathol. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0601-5>
- Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B. V., &

- Thompson, A. J. (2014). Atlas of multiple sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. In *Neurology* (Vol. 83, Issue 11, pp. 1022–1024). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000768>
- Buschmann, J. P., Berger, K., Awad, H., Clarner, T., Beyer, C., & Kipp, M. (2012). Inflammatory response and chemokine expression in the white matter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination. In *Journal of Molecular Neuroscience* (Vol. 48, Issue 1, pp. 66–76). J Mol Neurosci. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9773-x>
- Calabrese, M., Favaretto, A., Martini, V., & Gallo, P. (2013). Grey matter lesions in MS From histology to clinical implications. *Prion*, 7(1), 20–27. <https://doi.org/10.4161/pri.22580>
- Calabrese, M., Rinaldi, F., Grossi, P., Mattisi, I., Bernardi, V., Favaretto, A., Perini, P., & Gallo, P. (2010). Basal ganglia and frontal/parietal cortical atrophy is associated with fatigue in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 16(10), 1220–1228. <https://doi.org/10.1177/1352458510376405>
- Calabrese, M., Romualdi, C., Poretto, V., Favaretto, A., Morra, A., Rinaldi, F., Perini, P., & Gallo, P. (2013). The changing clinical course of multiple sclerosis: A matter of gray matter. *Annals of Neurology*, 74(1), 76–83. <https://doi.org/10.1002/ana.23882>
- Cammer, W., Zhang, H., & Tansey, F. A. (1995). Effects of carbonic anhydrase II (CAII) deficiency on CNS structure and function in the myelin-deficient CAII-deficient double mutant mouse. *Journal of Neuroscience Research*, 40(4), 451–457. <https://doi.org/10.1002/jnr.490400404>
- Cao, Y., Diao, W., Tian, F., Zhang, F., He, L., Long, X., Zhou, F., & Jia, Z. (2021). Gray Matter Atrophy in the Cortico-Striatal-Thalamic Network and Sensorimotor Network in Relapsing–Remitting and Primary Progressive Multiple Sclerosis. In *Neuropsychology Review* (pp. 1–18). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11065-021-09479-3>
- Carassiti, D., Altmann, D. R., Petrova, N., Pakkenberg, B., Scaravilli, F., & Schmierer, K. (2018). Neuronal loss, demyelination and volume change in the multiple sclerosis neocortex. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 44(4), 377–390. <https://doi.org/10.1111/nan.12405>
- Carlton, W W. (1966). Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, alpha-benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 8(3), 512–521. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(66\)90062-7](https://doi.org/10.1016/0041-008x(66)90062-7)
- Carlton, William W. (1967). Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life Sciences*, 6(1), 11–19. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(67\)90356-6](https://doi.org/10.1016/0024-3205(67)90356-6)
- Carlton, William W. (1969). Spongiform encephalopathy induced in rats and guinea pigs by cuprizone. *Experimental and Molecular Pathology*, 10(3), 274–287. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(69\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0014-4800(69)90057-4)
- Cavalieri, B. (1635). *Geometria indivisibilibus continuorum. Bononiae: Typis Clementis Ferronij (reprinted 1966 as Geometria Degli Indivisibili. Torino: Unione Tipografico-Editrice Torinese).*
- Cerina, M., Narayanan, V., Göbel, K., Bittner, S., Ruck, T., Meuth, P., Herrmann, A. M., Stangel, M., Gudi, V., Skripuletz, T., Daldrup, T., Wiendl, H., Seidenbecher, T., Ehling, P., Kleinschnitz, C., Pape, H. C., Budde, T., & Meuth, S. G. (2017). The quality of cortical network function recovery depends on localization and degree of axonal demyelination. *Brain, Behavior, and Immunity*, 59, 103–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.08.014>
- Chen, J. T., Narayanan, S., Collins, D. L., Smith, S. M., Matthews, P. M., & Arnold, D. L. (2004). Relating neocortical pathology to disability progression in multiple sclerosis using MRI. *NeuroImage*, 23(3), 1168–1175.

- <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.07.046>
- Christodoulou, C., Krupp, L. B., Liang, Z., Huang, W., Melville, P., Roque, C., Scherl, W. F., Morgan, T., MacAllister, W. S., Li, L., Tudorica, L. A., Li, X., Roche, P., & Peyster, R. (2003). Cognitive performance and MR markers of cerebral injury in cognitively impaired MS patients. *Neurology*, *60*(11), 1793–1798. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000072264.75989.B8>
- Chrzanowski, U., Schmitz, C., Horn-Bochtler, A., Nack, A., & Kipp, M. (2019). Evaluation strategy to determine reliable demyelination in the cuprizone model. *Metabolic Brain Disease*, *34*(2), 681–685. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0375-3>
- Cifelli, A., Arridge, M., Jezard, P., Esiri, M. M., Palace, J., & Matthews, P. M. (2002). Thalamic neurodegeneration in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, *52*(5), 650–653. <https://doi.org/10.1002/ana.10326>
- Clarner, T., Diederichs, F., Berger, K., Denecke, B., Gan, L., van der Valk, P., Beyer, C., Amor, S., & Kipp, M. (2012). Myelin debris regulates inflammatory responses in an experimental demyelination animal model and multiple sclerosis lesions. *GLIA*, *60*(10), 1468–1480. <https://doi.org/10.1002/glia.22367>
- Coggeshall, R. E., & Lekan, H. A. (1996). Methods for determining numbers of cells and synapses: A case for more uniform standards of review. *Journal of Comparative Neurology*, *364*(1), 6–15. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960101\)364:1<6::AID-CNE2>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960101)364:1<6::AID-CNE2>3.0.CO;2-9)
- Coleman, P. D. (1997). Research uses of neuropathological data. *Neurobiology of Aging*, *18*(4 SUPPL.). [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(97\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(97)00059-6)
- Cruz-Orive, L. M. (1987). Particle number can be estimated using a disector of unknown thickness: the selector. *Journal of Microscopy*, *145*(Pt 2), 121–142. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3553604>
- Dale, A. M., Fischl, B., & Sereno, M. I. (1999). Cortical surface-based analysis: I. Segmentation and surface reconstruction. *NeuroImage*, *9*(2), 179–194. <https://doi.org/10.1006/nimg.1998.0395>
- De Stefano, N., Matthews, P. M., Filippi, M., Agosta, F., De Luca, M., Bartolozzi, M. L., Guidi, L., Ghezzi, A., Montanari, E., Cifelli, A., Federico, A., & Smith, S. M. (2003). Evidence of early cortical atrophy in MS: relevance to white matter changes and disability. *Neurology*, *60*(7), 1157–1162. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000055926.69643.03>
- De Stefano, Nicola, Airas, L., Grigoriadis, N., Mattle, H. P., O’Riordan, J., Oreja-Guevara, C., Sellebjerg, F., Stankoff, B., Walczak, A., Wiendl, H., & Kieseier, B. C. (2014). Clinical relevance of brain volume measures in multiple sclerosis. In *CNS Drugs* (Vol. 28, Issue 2, pp. 147–156). CNS Drugs. <https://doi.org/10.1007/s40263-014-0140-z>
- De Stefano, Nicola, Stromillo, M. L., Rossi, F., Battaglini, M., Giorgio, A., Portaccio, E., Hakiki, B., Malentacchi, G., Gasperini, C., Santangelo, M., Bartolozzi, M. L., Sormani, M. P., Federico, A., & Amato, M. P. (2011). Improving the characterization of radiologically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. *PLoS ONE*, *6*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019452>
- Delaunoy, J. P., Hog, F., Devilliers, G., Bansart, M., Mandel, P., & Sensenbrenner, M. (1980). Developmental changes and localization of carbonic anhydrase in cerebral hemispheres of the rat and in rat glial cell cultures. *Cellular and Molecular Biology*, *26*(2), 235–240. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6781751/>
- Denic, A., Johnson, A. J., Bieber, A. J., Warrington, A. E., Rodriguez, M., & Pirko, I. (2011). The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology*, *18*(1), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2010.04.004>
- Derakhshan, M., Caramanos, Z., Giacomini, P. S., Narayanan, S., Maranzano, J., Francis, S. J., Arnold, D. L., & Collins, D. L. (2010). Evaluation of automated techniques for the

- quantification of grey matter atrophy in patients with multiple sclerosis. *NeuroImage*, 52(4), 1261–1267. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.05.029>
- Di Filippo, M., Anderson, V. M., Altmann, D. R., Swanton, J. K., Plant, G. T., Thompson, A. J., & Miller, D. H. (2010). Brain atrophy and lesion load measures over 1 year relate to clinical status after 6 years in patients with clinically isolated syndromes. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 81(2), 204–208. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.171769>
- Draheim, T., Liessem, A., Scheld, M., Wilms, F., Weißflog, M., Denecke, B., Kensler, T. W., Zendedel, A., Beyer, C., Kipp, M., Wruck, C. J., Fragoulis, A., & Clarner, T. (2016). Activation of the astrocytic Nrf2/ARE system ameliorates the formation of demyelinating lesions in a multiple sclerosis animal model. *GLIA*, 64(12), 2219–2230. <https://doi.org/10.1002/glia.23058>
- Dutta, R., Chang, A., Doud, M. K., Kidd, G. J., Ribaldo, M. V., Young, E. A., Fox, R. J., Staugaitis, S. M., & Trapp, B. D. (2011). Demyelination causes synaptic alterations in hippocampi from multiple sclerosis patients. *Annals of Neurology*, 69(3), 445–454. <https://doi.org/10.1002/ana.22337>
- Ebers, G. C. (2004). Natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 10(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1191/1352458504ms1025oa>
- Enzinger, C., Fazekas, F., Matthews, P. M., Ropele, S., Schmidt, H., Smith, S., & Schmidt, R. (2005). Risk factors for progression of brain atrophy in aging: Six-year follow-up of normal subjects. *Neurology*, 64(10), 1704–1711. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000161871.83614.BB>
- Eriksson, M., Andersen, O., & Runmarker, B. (2003). Long-term follow up of patients with clinically isolated syndromes, relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 9(3), 260–274. <https://doi.org/10.1191/1352458503ms914oa>
- Eshaghi, A., Prados, F., Brownlee, W. J., Altmann, D. R., Tur, C., Cardoso, M. J., De Angelis, F., van de Pavert, S. H., Cawley, N., De Stefano, N., Stromillo, M. L., Battaglini, M., Ruggieri, S., Gasperini, C., Filippi, M., Rocca, M. A., Rovira, A., Sastre-Garriga, J., Vrenken, H., ... Ciccarelli, O. (2018). Deep gray matter volume loss drives disability worsening in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 83(2), 210–222. <https://doi.org/10.1002/ana.25145>
- Ferguson, B., Matyszak, M. K., Esiri, M. M., & Perry, V. H. (1997). Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*, 120(3), 393–399. <https://doi.org/10.1093/brain/120.3.393>
- Filippi, M., & Rocca, M. A. (2011). MR imaging of multiple sclerosis. In *Radiology* (Vol. 259, Issue 3, pp. 659–681). Radiological Society of North America, Inc. <https://doi.org/10.1148/radiol.11101362>
- Filippi, M., Rocca, M. A., De Stefano, N., Enzinger, C., Fisher, E., Horsfield, M. A., Inglese, M., Pelletier, D., & Comi, G. (2011). Magnetic resonance techniques in multiple sclerosis: The present and the future. *Archives of Neurology*, 68(12), 1514–1520. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.914>
- Filippi, M., Rovaris, M., Inglese, M., Barkhof, F., Stefano, N. De, Smith, S., & Comi, P. G. (2004). Interferon beta-1a for brain tissue loss in patients at presentation with syndromes suggestive of multiple sclerosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 364(9444), 1489–1496. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17271-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17271-1)
- Fischbach, F., Nedelcu, J., Leopold, P., Zhan, J., Clarner, T., Nellessen, L., Beißel, C., van Heuvel, Y., Goswami, A., Weis, J., Denecke, B., Schmitz, C., Hochstrasser, T., Nyamoya, S., Victor, M., Beyer, C., & Kipp, M. (2019). Cuprizone-induced graded oligodendrocyte vulnerability is regulated by the transcription factor DNA damage-inducible transcript 3. *GLIA*, 67(2), 263–276. <https://doi.org/10.1002/glia.23538>

- Fischl, B., Sereno, M. I., & Dale, A. M. (1999). Cortical surface-based analysis: II. Inflation, flattening, and a surface-based coordinate system. *NeuroImage*, *9*(2), 195–207. <https://doi.org/10.1006/nimg.1998.0396>
- Fisher, E., Rudick, R. A., Simon, J. H., Cutter, G., Baier, M., Lee, J. C., Miller, D., Weinstock-Guttman, B., Mass, M. K., Dougherty, D. S., & Simonian, N. A. (2002). Eight-year follow-up study of brain atrophy in patients with MS. *Neurology*, *59*(9), 1412–1420. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000036271.49066.06>
- Fisher, Elizabeth, Lee, J.-C., Nakamura, K., & Rudick, R. A. (2008). Gray matter atrophy in multiple sclerosis: A longitudinal study. *Annals of Neurology*, *64*(3), 255–265. <https://doi.org/10.1002/ana.21436>
- Fisniku, L. K., Chard, D. T., Jackson, J. S., Anderson, V. M., Altmann, D. R., Miszkiel, K. A., Thompson, A. J., & Miller, D. H. (2008). Gray matter atrophy is related to long-term disability in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, *64*(3), 247–254. <https://doi.org/10.1002/ana.21423>
- Franklin, G. M., & Nelson, L. (2003). Environmental risk factors in multiple sclerosis: Causes, triggers, and patient autonomy. *Neurology*, *61*(8), 1032–1034. <https://doi.org/10.1212/WNL.61.8.1032>
- Friese, M. A., Jakobsen, K. B., Friis, L., Etzensperger, R., Craner, M. J., McMahon, R. M., Jensen, L. T., Huygelen, V., Jones, E. Y., Bell, J. I., & Fugger, L. (2008). Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Nature Medicine*, *14*(11), 1227–1235. <https://doi.org/10.1038/nm.1881>
- Galea, I., Ward-Abel, N., & Heesen, C. (2015). Relapse in multiple sclerosis. In *BMJ (Online)* (Vol. 350). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj.h1765>
- García-Fiñana, M., Cruz-Orive, L. M., Mackay, C. E., Pakkenberg, B., & Roberts, N. (2003). Comparison of MR imaging against physical sectioning to estimate the volume of human cerebral compartments. *NeuroImage*, *18*(2), 505–516. [https://doi.org/10.1016/S1053-8119\(02\)00021-6](https://doi.org/10.1016/S1053-8119(02)00021-6)
- Geinisman, Y., Gundersen, H. J. G., Van Der Zee, E., & West, M. J. (1996). Unbiased stereological estimation of the total number of synapses in a brain region. *Journal of Neurocytology*, *25*(1), 805–819. <https://doi.org/10.1007/bf02284843>
- Ghandour, M. S., Vincendon, G., Gombos, G., Limozin, N., Filippi, D., Dalmaso, C., & Laurent, G. (1980). Carbonic anhydrase and oligodendroglia in developing rat cerebellum: A biochemical and immunohistological study. *Developmental Biology*, *77*(1), 73–83. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(80\)90457-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(80)90457-1)
- Giorgio, A., Battaglini, M., Smith, S. M., & De Stefano, N. (2008). Brain Atrophy Assessment in Multiple Sclerosis: Importance and Limitations. *Neuroimaging Clinics of North America*, *18*(4), 675–686. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2008.06.007>
- Glaser J, Greene G, H. S. (2006). *Stereology for Biological Research with a Focus on Neuroscience*. MBF Press.
- Goldberg, J., Clarner, T., Beyer, C., & Kipp, M. (2015). Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, *57*(2), 166–175. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0595-5>
- Goodin, D. S. (2014). The epidemiology of multiple sclerosis. insights to disease pathogenesis. *Handbook of Clinical Neurology*, *122*, 231–266. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00010-8>
- Grant, W. B. (2006). Epidemiology of disease risks in relation to vitamin D insufficiency. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *92*(1), 65–79. <https://doi.org/10.1016/J.PBIOMOLBIO.2006.02.013>
- Groebe, A., Clarner, T., Baumgartner, W., Dang, J., Beyer, C., & Kipp, M. (2009). Cuprizone Treatment Induces Distinct Demyelination, Astrocytosis, and Microglia Cell Invasion or Proliferation in the Mouse Cerebellum. *The Cerebellum*, *8*(3), 163–174.

- <https://doi.org/10.1007/s12311-009-0099-3>
- Große-Veldmann, R., Becker, B., Amor, S., van der Valk, P., Beyer, C., & Kipp, M. (2016). Lesion Expansion in Experimental Demyelination Animal Models and Multiple Sclerosis Lesions. *Molecular Neurobiology*, *53*(7), 4905–4917. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9420-y>
- Gudi, V., Gingele, S., Skripuletz, T., & Stangel, M. (2014). Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 73. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00073>
- Gudi, V., Moharreggh-Khiabani, D., Skripuletz, T., Koutsoudaki, P. N., Kotsiari, A., Skuljec, J., Trebst, C., & Stangel, M. (2009). Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination. *Brain Research*, *1283*, 127–138. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2009.06.005>
- Gundersen, H. J. G., Bagger, P., Bendtsen, T. F., Evans, S. M., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R., Pakkenberg, B., Sorensen, F. B., Vesterby, A., & West, M. J. (1988). The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*, *96*(10), 857–881. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1988.tb00954.x>
- Gundersen, H. J. G., & Jensen, E. B. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*, *147*(3), 229–263. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1987.tb02837.x>
- Harrison, P. J. (1999). The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. In *Brain* (Vol. 122, Issue 4, pp. 593–624). Brain. <https://doi.org/10.1093/brain/122.4.593>
- Harsan, L. A., Steibel, J., Zaremba, A., Agin, A., Sapin, R., Poulet, P., Guignard, B., Parizel, N., Grucker, D., Boehm, N., Miller, R. H., & Ghandour, M. S. (2008). Recovery from chronic demyelination by thyroid hormone therapy: Myelinogenesis induction and assessment by diffusion tensor magnetic resonance imaging. *Journal of Neuroscience*, *28*(52), 14189–14201. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4453-08.2008>
- Hiremath, M M, Saito, Y., Knapp, G. W., Ting, J. P., Suzuki, K., & Matsushima, G. K. (1998). Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Journal of Neuroimmunology*, *92*(1–2), 38–49. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(98\)00168-4](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(98)00168-4)
- Hiremath, Meenaxi M., Chen, V. S., Suzuki, K., Ting, J. P. Y., & Matsushima, G. K. (2008). MHC class II exacerbates demyelination in vivo independently of T cells. *Journal of Neuroimmunology*, *203*(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.06.034>
- Hochstrasser, T., Rühling, S., Hecher, K., Fabisch, K. H., Chrzanowski, U., Brendel, M., Eckenweber, F., Sacher, C., Schmitz, C., & Kipp, M. (2019). Stereological Investigation of Regional Brain Volumes after Acute and Chronic Cuprizone-Induced Demyelination. *Cells*, *8*(9), 1024. <https://doi.org/10.3390/cells8091024>
- Hoffmann, K., Lindner, M., Gröticke, I., Stangel, M., & Löscher, W. (2008). Epileptic seizures and hippocampal damage after cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Experimental Neurology*, *210*(2), 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.11.005>
- Höflich, K. M., Beyer, C., Clarner, T., Schmitz, C., Nyamoya, S., Kipp, M., & Hochstrasser, T. (2016). Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach. *Brain Research*, *1650*, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.08.048>
- Hoppel, C. L., & Tandler, B. (1973). Biochemical effects of cuprizone on mouse liver and heart mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, *22*(18), 2311–2318. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(73\)90012-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90012-9)
- Horakova, D., Cox, J. L., Havrdova, E., Hussein, S., Dolezal, O., Cookfair, D., Dwyer, M. G.,

- Seidl, Z., Bergsland, N., Vaneckova, M., & Zivadinov, R. (2008). Evolution of different MRI measures in patients with active relapsing-remitting multiple sclerosis over 2 and 5 years: A case-control study. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 79(4), 407–414. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.120378>
- Houtchens, M. K., Benedict, R. H. B., Killiany, R., Sharma, J., Jaisani, Z., Singh, B., Weinstock-Guttman, B., Guttmann, C. R. G., & Bakshi, R. (2007). Thalamic atrophy and cognition in multiple sclerosis. *Neurology*, 69(12), 1213–1223. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000276992.17011.b5>
- Howell, O. W., Reeves, C. A., Nicholas, R., Carassiti, D., Radotra, B., Gentleman, S. M., Serafini, B., Aloisi, F., Roncaroli, F., Magliozzi, R., & Reynolds, R. (2011). Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain*, 134(9), 2755–2771. <https://doi.org/10.1093/brain/awr182>
- Irvine, K. A., & Blakemore, W. F. (2006). Age increases axon loss associated with primary demyelination in cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Journal of Neuroimmunology*, 175(1–2), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.03.002>
- Islam, T., Gauderman, W. J., Cozen, W., & Mack, T. M. (2007). Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins. *Neurology*, 69(4), 381–388. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000268266.50850.48>
- J. van der Star, B., Y.S. Vogel, D., Kipp, M., Puentes, F., Baker, D., & Amor, S. (2012). In Vitro and In Vivo Models of Multiple Sclerosis. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 11(5), 570–588. <https://doi.org/10.2174/187152712801661284>
- Janardhan, V., & Bakshi, R. (2000). Quality of life and its relationship to brain lesions and atrophy on magnetic resonance images in 60 patients with multiple sclerosis. *Archives of Neurology*, 57(10), 1485–1491. <https://doi.org/10.1001/archneur.57.10.1485>
- Jasperse, B., Valsasina, P., Neacsu, V., Knol, D. L., De Stefano, N., Enzinger, C., Smith, S. M., Ropele, S., Korteweg, T., Giorgio, A., Anderson, V., Polman, C. H., Filippi, M., Miller, D. H., Rovaris, M., Barkhof, F., & Vrenken, H. (2007). Intercenter Agreement of brain atrophy measurement in multiple sclerosis patients using manually-edited SIENA and SIENAX. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 26(4), 881–885. <https://doi.org/10.1002/jmri.21101>
- Johnson, E. S., & Ludwin, S. K. (1981). Evidence for a “dying-back” gliopathy in demyelinating disease. *Annals of Neurology*, 9(3), 301–305. <https://doi.org/10.1002/ana.410090316>
- Jürgens, T., Jafari, M., Kreutzfeldt, M., Bahn, E., Brück, W., Kerschensteiner, M., & Merkler, D. (2016). Reconstruction of single cortical projection neurons reveals primary spine loss in multiple sclerosis. *Brain*, 139(1), 39–46. <https://doi.org/10.1093/brain/awv353>
- Kaddatz, H., Joost, S., Nedelcu, J., Chrzanowski, U., Schmitz, C., Gingele, S., Gudi, V., Stangel, M., Zhan, J., Santrau, E., Greiner, T., Frenz, J., Müller-Hilke, B., Müller, M., Amor, S., van der Valk, P., & Kipp, M. (2021). Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment. *Glia*, 69(4), 925–942. <https://doi.org/10.1002/glia.23937>
- Keegan, B. M., & Noseworthy, J. H. (2002). Multiple Sclerosis. *Annual Review of Medicine*, 53(1), 285–302. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.103909>
- Kesterson, J. W., & Carlton, W. W. (1970). Aqueductal stenosis as the cause of hydrocephalus in mice fed the substituted hydrazine, cuprizone. *Experimental and Molecular Pathology*, 13(3), 281–294. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(70\)90091-2](https://doi.org/10.1016/0014-4800(70)90091-2)
- Kesterson, J. W., & Carlton, W. W. (1971). Monoamine oxidase inhibition and the activity of other oxidative enzymes in the brains of mice fed cuprizone. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 20(3), 386–395. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(71\)90281-X](https://doi.org/10.1016/0041-008X(71)90281-X)
- Kida, E., Palmieriello, S., Golabek, A. A., Walus, M., Wierzba-Bobrowicz, T., Rabe, A., Albertini, G., & Wisniewski, K. E. (2006). Carbonic anhydrase II in the developing and

- adult human brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(7), 664–674. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000225905.52002.3e>
- Kipp, M., & Baumgartner, W. (2011). *The cuprizone model and multiple sclerosis : disparities and similarities*. Publikationsserver der RWTH Aachen University. <https://doi.org/30842>
- Kipp, M., Clarner, T., Dang, J., Copray, S., & Beyer, C. (2009). The cuprizone animal model: New insights into an old story. *Acta Neuropathologica*, 118(6), 723–736. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0591-3>
- Kipp, M., Kiessling, M. C., Hochstrasser, T., Roggenkamp, C., & Schmitz, C. (2017). Design-Based Stereology for Evaluation of Histological Parameters. *Journal of Molecular Neuroscience*, 61(3), 325–342. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0858-9>
- Kipp, M., Nyamoya, S., Hochstrasser, T., & Amor, S. (2017). Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. In *Brain Pathology* (Vol. 27, Issue 2, pp. 123–137). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/bpa.12454>
- Kipp, M., Wagenknecht, N., Beyer, C., Samer, S., Wuerfel, J., & Nikoubashman, O. (2015). Thalamus pathology in multiple sclerosis: From biology to clinical application. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(6), 1127–1147. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1787-9>
- Klaver, R., Popescu, V., Voorn, P., Galis-De Graaf, Y., Van Der Valk, P., De Vries, H. E., Schenk, G. J., & Geurts, J. J. G. (2015). Neuronal and Axonal Loss in Normal-Appearing Gray Matter and Subpial Lesions in Multiple Sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 74(5), 453–458. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000189>
- Klawiter, E. C. (2013). Current and new directions in MRI in multiple sclerosis. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*, 19(4), 1058–1073. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000433283.00221.37>
- Koch, M., Kingwell, E., Rieckmann, P., & Tremlett, H. (2009). The natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Neurology*, 73(23), 1996–2002. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c5b47f>
- Komoly, S., Jeyasingham, M. D., Pratt, O. E., & Lantos, P. L. (1987). Decrease in oligodendrocyte carbonic anhydrase activity preceding myelin degeneration in cuprizone induced demyelination. *Journal of the Neurological Sciences*, 79(1–2), 141–148. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(87\)90268-1](https://doi.org/10.1016/0022-510X(87)90268-1)
- Kornek, B., Storch, M. K., Weissert, R., Wallstroem, E., Stefferl, A., Olsson, T., Linington, C., Schmidbauer, M., & Lassmann, H. (2000). Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: A comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *American Journal of Pathology*, 157(1), 267–276. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64537-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64537-3)
- Kutzelnigg, A., Lucchinetti, C. F., Stadelmann, C., Brück, W., Rauschka, H., Bergmann, M., Schmidbauer, M., Parisi, J. E., & Lassmann, H. (2005). Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*, 128(11), 2705–2712. <https://doi.org/10.1093/brain/awh641>
- Lapato, A. S., Szu, J. I., Hasselmann, J. P. C., Khalaj, A. J., Binder, D. K., & Tiwari-Woodruff, S. K. (2017). Chronic demyelination-induced seizures. *Neuroscience*, 346, 409–422. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.01.035>
- Lassmann, H. (2007). Experimental models of multiple sclerosis. *Revue Neurologique*, 163(6–7), 651–655. [https://doi.org/10.1016/S0035-3787\(07\)90474-9](https://doi.org/10.1016/S0035-3787(07)90474-9)
- Lassmann, Hans, & Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, 133(2), 223–244. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1631-4>
- Lee, M. A., Blamire, A. M., Pendlebury, S., Ho, K. H., Mills, K. R., Styles, P., Palace, J., & Matthews, P. M. (2000). Axonal injury or loss in the internal capsule and motor

- impairment in multiple sclerosis. *Archives of Neurology*, 57(1), 65–70.
<https://doi.org/10.1001/archneur.57.1.65>
- Leopold, P., Schmitz, C., & Kipp, M. (2019). Animal Weight Is an Important Variable for Reliable Cuprizone-Induced Demyelination. *Journal of Molecular Neuroscience*, 68(4), 522–528. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01312-0>
- Levin, L. I., Munger, K. L., Rubertone, M. V., Peck, C. A., Lennette, E. T., Spiegelman, D., & Ascherio, A. (2005). Temporal Relationship Between Elevation of Epstein-Barr Virus Antibody Titers and Initial Onset of Neurological Symptoms in Multiple Sclerosis. *JAMA*, 293(20), 2496. <https://doi.org/10.1001/jama.293.20.2496>
- Lincoln, M. R., Montpetit, A., Cader, M. Z., Saarela, J., Dyment, D. A., Tiislar, M., Ferretti, V., Tienari, P. J., Sadovnick, A. D., Peltonen, L., Ebers, G. C., & Hudson, T. J. (2005). A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nature Genetics*, 37(10), 1108–1112. <https://doi.org/10.1038/ng1647>
- Lindner, M., Fokuhl, J., Linsmeier, F., Trebst, C., & Stangel, M. (2009). Chronic toxic demyelination in the central nervous system leads to axonal damage despite remyelination. *Neuroscience Letters*, 453(2), 120–125.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.02.004>
- Lublin, F. D., & Reingold, S. C. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. In *Neurology* (Vol. 46, Issue 4, pp. 907–911). <https://doi.org/10.1212/WNL.46.4.907>
- Lublin, F. D., Reingold, S. C., Cohen, J. A., Cutter, G. R., Sørensen, P. S., Thompson, A. J., Wolinsky, J. S., Balcer, L. J., Banwell, B., Barkhof, F., Bebo, B., Calabresi, P. A., Clanet, M., Comi, G., Fox, R. J., Freedman, M. S., Goodman, A. D., Inglese, M., Kappos, L., ... Polman, C. H. (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. In *Neurology* (Vol. 83, Issue 3, pp. 278–286).
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000560>
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., & Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology*, 47(6), 707–717. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200006\)47:6<707::AID-ANA3>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200006)47:6<707::AID-ANA3>3.0.CO;2-Q)
- Maggi, P., Cummings Macri, S. M., Gaitán, M. I., Leibovitch, E., Wholer, J. E., Knight, H. L., Ellis, M., Wu, T., Silva, A. C., Massacesi, L., Jacobson, S., Westmoreland, S., & Reich, D. S. (2014). The formation of inflammatory demyelinated lesions in cerebral white matter. *Annals of Neurology*, 76(4), 594–608. <https://doi.org/10.1002/ana.24242>
- Magon, S., Chakravarty, M. M., Amann, M., Weier, K., Naegelin, Y., Anelova, M., Radue, E. W., Stippich, C., Lerch, J. P., Kappos, L., & Sprenger, T. (2014). Label-fusion-segmentation and deformation-based shape analysis of deep gray matter in multiple sclerosis: The impact of thalamic subnuclei on disability. *Human Brain Mapping*, 35(8), 4193–4203. <https://doi.org/10.1002/hbm.22470>
- Mayhew, T. (1991). The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. *Experimental Physiology*, 76(5), 639–665.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1991.sp003533>
- Mayhew, T. M., & Burton, G. J. (1997). Stereology and its impact on our understanding of human placental functional morphology. *Microscopy Research and Technique*, 38(1–2), 195–205. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19970701/15\)38:1/2<195::AID-JEMT20>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19970701/15)38:1/2<195::AID-JEMT20>3.0.CO;2-J)
- McMahon, E. J., Suzuki, K., & Matsushima, G. K. (2002). Peripheral macrophage recruitment in cuprizone-induced CNS demyelination despite an intact blood-brain barrier. *Journal of Neuroimmunology*, 130(1–2), 32–45. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00205-9](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00205-9)

- McTigue, D. M., & Tripathi, R. B. (2008). The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 107, Issue 1, pp. 1–19). J Neurochem. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05570.x>
- Messori, L., Casini, A., Gabbiani, C., Sorace, L., Muniz-Miranda, M., & Zatta, P. (2007). Unravelling the chemical nature of copper cuprizone. *Dalton Transactions*, 21, 2112. <https://doi.org/10.1039/b701896g>
- Miller, D. H., Barkhof, F., Frank, J. A., Parker, G. J. M., & Thompson, A. J. (2002). Measurement of atrophy in multiple sclerosis: Pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain*, 125(8), 1676–1695. <https://doi.org/10.1093/brain/awf177>
- Miller, D. H., Chard, D. T., & Ciccarelli, O. (2012). Clinically isolated syndromes. In *The Lancet Neurology* (Vol. 11, Issue 2, pp. 157–169). Lancet Neurol. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70274-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70274-5)
- Morell, P., Barrett, C. V., Mason, J. L., Toews, A. D., Hostettler, J. D., Knapp, G. W., & Matsushima, G. K. (1998). Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 12(4–5), 220–227. <https://doi.org/10.1006/mcne.1998.0715>
- Munger, K. L., Levin, L. I., Hollis, B. W., Howard, N. S., & Ascherio, A. (2006). Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Risk of Multiple Sclerosis. *JAMA*, 296(23), 2832. <https://doi.org/10.1001/jama.296.23.2832>
- Nielsen, N. M., Westergaard, T., Rostgaard, K., Frisch, M., Hjalgrim, H., Wohlfahrt, J., Koch-Henriksen, N., & Melbye, M. (2005). Familial Risk of Multiple Sclerosis: A Nationwide Cohort Study. *American Journal of Epidemiology*, 162(8), 774–778. <https://doi.org/10.1093/aje/kwi280>
- Nikić, I., Merkler, D., Sorbara, C., Brinkoetter, M., Kreutzfeldt, M., Bareyre, F. M., Brück, W., Bishop, D., Misgeld, T., & Kerschensteiner, M. (2011). A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 17(4), 495–499. <https://doi.org/10.1038/nm.2324>
- Nilsson, G., Erdtman, H., Lindstedt, G., & Kinell, P.-O. (1950). A New Colour Reaction on Copper and Certain Carbonyl Compounds. *Acta Chemica Scandinavica*, 4, 205–205. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.04-0205>
- Norkute, A., Hieble, A., Braun, A., Johann, S., Clarner, T., Baumgartner, W., Beyer, C., & Kipp, M. (2009). Cuprizone treatment induces demyelination and astrogliosis in the mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, 87(6), 1343–1355. <https://doi.org/10.1002/jnr.21946>
- Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., & Weinshenker, B. G. (2000). Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 343(13), 938–952. <https://doi.org/10.1056/NEJM200009283431307>
- Nylander, A., & Hafler, D. A. (2012). Multiple sclerosis. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 122, Issue 4, pp. 1180–1188). J Clin Invest. <https://doi.org/10.1172/JCI58649>
- Ochs, M. (2014). Estimating structural alterations in animal models of lung emphysema. Is there a gold standard? In *Annals of Anatomy* (Vol. 196, Issue 1, pp. 26–33). Ann Anat. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2013.10.004>
- Oh, J., & O'Connor, P. W. (2015). Established disease-modifying treatments in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Current Opinion in Neurology*, 28(3), 220–229. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000202>
- Ohno, N., Chiang, H., Mahad, D. J., Kidd, G. J., Liu, L. P., Ransohoff, R. M., Sheng, Z. H., Komuro, H., & Trapp, B. D. (2014). Mitochondrial immobilization mediated by syntrophin facilitates survival of demyelinated axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(27), 9953–9958. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401155111>
- Okuda, D. T., Siva, A., Kantarci, O., Inglese, M., Katz, I., Tutuncu, M., Keegan, B. M.,

- Donlon, S., Hua, L. H., Vidal-Jordana, A., Montalban, X., Rovira, A., Tintoré, M., Amato, M. P., Brochet, B., De Seze, J., Brassat, D., Vermersch, P., De Stefano, N., ... Lebrun, C. (2014). Radiologically isolated syndrome: 5-year risk for an initial clinical event. *PLoS ONE*, *9*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090509>
- Oleszak, E. L., Chang, J. R., Friedman, H., Katsetos, C. D., & Platsoucas, C. D. (2004). Theiler's Virus Infection: A Model for Multiple Sclerosis. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 17, Issue 1, pp. 174–207). American Society for Microbiology (ASM). <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.174-207.2004>
- Pagani, E., Rocca, M. A., Gallo, A., Rovaris, M., Martinelli, V., Comi, G., & Filippi, M. (2005). Regional brain atrophy evolves differently in patients with multiple sclerosis according to clinical phenotype. *American Journal of Neuroradiology*, *26*(2), 341–346. [/pmc/articles/PMC7974082/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16144482/)
- Pasquini, L. A., Calatayud, C. A., Bertone Uña, A. L., Millet, V., Pasquini, J. M., & Soto, E. F. (2007). The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochemical Research*, *32*(2), 279–292. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9165-0>
- Patel, J., & Balabanov, R. (2012). Molecular mechanisms of oligodendrocyte injury in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 13, Issue 8, pp. 10647–10659). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms130810647>
- Pérez-Miralles, F., Sastre-Garriga, J., Tintoré, M., Arrambide, G., Nos, C., Perkal, H., Río, J., Edo, M. C., Horga, A., Castelló, J., Auger, C., Huerga, E., Rovira, A., & Montalban, X. (2013). Clinical impact of early brain atrophy in clinically isolated syndromes. *Multiple Sclerosis Journal*, *19*(14), 1878–1886. <https://doi.org/10.1177/1352458513488231>
- Peterson, J. W., Bö, L., Mörk, S., Chang, A., & Trapp, B. D. (2001). Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology*, *50*(3), 389–400. <https://doi.org/10.1002/ana.1123>
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F. D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A. J., Waubant, E., Weinshenker, B., & Wolinsky, J. S. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology*, *69*(2), 292–302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366>
- Popescu, B. F. G., Pirko, I., & Lucchinetti, C. F. (2013). Pathology of multiple sclerosis: Where do we stand? In *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology* (Vol. 19, Issue 4, pp. 901–921). American Academy of Neurology. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000433291.23091.65>
- Pott, F., Gingele, S., Clarner, T., Dang, J., Baumgartner, W., Beyer, C., & Kipp, M. (2009). Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the mouse basal ganglia. *Brain Research*, *1305*, 137–149. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2009.09.084>
- Praet, J., Guglielmetti, C., Berneman, Z., Van der Linden, A., & Ponsaerts, P. (2014). Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: Clinical relevance for multiple sclerosis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *47*, 485–505. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.10.004>
- Prakash, Y. S., Smithson, K. G., & Sieck, G. C. (1994). Application of the Cavalieri principle in volume estimation using laser confocal microscopy. *NeuroImage*, *1*(4), 325–333. <https://doi.org/10.1006/nimg.1994.1017>
- Prineas, J. W., & Parratt, J. D. E. (2012). Oligodendrocytes and the early multiple sclerosis lesion. *Annals of Neurology*, *72*(1), 18–31. <https://doi.org/10.1002/ana.23634>
- Procaccini, C., De Rosa, V., Pucino, V., Formisano, L., & Matarese, G. (2015). Animal

- models of Multiple Sclerosis. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 759, pp. 182–191). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.042>
- Puelles, V. G., Douglas-Denton, R. N., Cullen-McEwen, L., McNamara, B. J., Salih, F., Li, J., Hughson, M. D., Hoy, W. E., Nyengaard, J. R., & Bertram, J. F. (2014). Design-based stereological methods for estimating numbers of glomerular podocytes. *Annals of Anatomy, 196*(1), 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2013.04.007>
- Rademakers, R., Baker, M., Nicholson, A. M., Rutherford, N. J., Finch, N., Soto-Ortolaza, A., Lash, J., Wider, C., Wojtas, A., DeJesus-Hernandez, M., Adamson, J., Kouri, N., Sundal, C., Shuster, E. A., Aasly, J., MacKenzie, J., Roeber, S., Kretzschmar, H. A., Boeve, B. F., ... Wszolek, Z. K. (2011). Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Nature Genetics, 44*(2), 200–205. <https://doi.org/10.1038/ng.1027>
- Remington, L. T., Babcock, A. A., Zehntner, S. P., & Owens, T. (2007). Microglial recruitment, activation, and proliferation in response to primary demyelination. *American Journal of Pathology, 170*(5), 1713–1724. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060783>
- Roberts, N., Garden, A. S., Cruz-Orive, L. M., Whitehouse, G. H., & Edwards, R. H. T. (1994). Estimation of fetal volume by magnetic resonance imaging and stereology. *British Journal of Radiology, 67*(803), 1067–1077. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-67-803-1067>
- Rodriguez, M., & Scheithauer, B. (1994). Ultrastructure of multiple sclerosis. *Ultrastructural Pathology, 18*(1–2), 3–13. <https://doi.org/10.3109/01913129409016267>
- Rojas, J. I., Patrucco, L., Miguez, J., & Cristiano, E. (2016). Atrofia cerebral en esclerosis múltiple: Impacto clínico, cognitivo y terapéutico. In *Archivos de Neuro-Psiquiatria* (Vol. 74, Issue 3, pp. 235–243). Associação Arquivos de Neuro-Psiquiatria. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20160015>
- Rossi, B., & Constantin, G. (2016). Live imaging of immune responses in experimental models of multiple sclerosis. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 7, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00506>
- Rühling, S., Kramer, F., Schmutz, S., Amor, S., Jiangshan, Z., Schmitz, C., Kipp, M., & Hochstrasser, T. (2018). Visualization of the Breakdown of the Axonal Transport Machinery: a Comparative Ultrastructural and Immunohistochemical Approach. *Molecular Neurobiology, 56*(6), 3984–3998. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1353-9>
- Sadovnick, A. D., Armstrong, H., Rice, G. P. A., Bulman, D., Hashimoto, L., Party, D. W., Hashimoto, S. A., Warren, S., Hader, W., Murrar, T. J., Seland, T. P., Metz, L., Bell, R., Duquette, P., Gray, T., Nelson, R., Weinshenkar, B., Brunt, D., & Ebers, G. C. (1993). A population-based study of multiple sclerosis in twins: Update. *Annals of Neurology, 33*(3), 281–285. <https://doi.org/10.1002/ana.410330309>
- Sailer, M., Fischl, B., Salat, D., Tempelmann, C., Ariel, M., Enfeld, S., Busa, E., Bodammer, N., Heinze, H.-J., & Dale, A. (2003). Focal thinning of the cerebral cortex in multiple sclerosis. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awg175>
- Sánchez, M. P., Nieto, A., Barroso, J., Martín, V., & Hernández, M. A. (2008). Brain atrophy as a marker of cognitive impairment in mildly disabling relapsing-remitting multiple sclerosis. *European Journal of Neurology, 15*(10), 1091–1099. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2008.02259.x>
- Sand, I. B. K., & Lublin, F. D. (2013). Diagnosis and differential diagnosis of multiple sclerosis. In *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology* (Vol. 19, Issue 4, pp. 922–943). Continuum (Minneapolis, Minn.). <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000433290.15468.21>
- Scheld, M., Rütger, B. J., Große-Veldmann, R., Ohl, K., Tenbrock, K., Drey Müller, D., Fallier-Becker, P., Zendedel, A., Beyer, C., Clarner, T., & Kipp, M. (2016).

- Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(4), 1410–1415. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2456-15.2016>
- Schmidt, T., Awad, H., Slowik, A., Beyer, C., Kipp, M., & Clarner, T. (2013). Regional heterogeneity of cuprizone-induced demyelination: Topographical aspects of the midline of the corpus callosum. *Journal of Molecular Neuroscience*, 49(1), 80–88. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9896-0>
- Schmitz, C., Born, M., Dolezel, P., Rutten, B. P. F., De Saint-Georges, L., Hof, P. R., & Korr, H. (2005). Prenatal protracted irradiation at very low dose rate induces severe neuronal loss in rat hippocampus and cerebellum. *Neuroscience*, 130(4), 935–948. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.034>
- Schmitz, C., & Hof, P. R. (2005). Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130(4), 813–831. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.050>
- Schoonheim, M. M., Popescu, V., Lopes, F. C. R., Wiebenga, O. T., Vrenken, H., Douw, L., Polman, C. H., Geurts, J. J. G., & Barkhof, F. (2012). Subcortical atrophy and cognition: Sex effects in multiple sclerosis. *Neurology*, 79(17), 1754–1761. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182703f46>
- Schreiner, B., Romanelli, E., Liberski, P., Ingold-Heppner, B., Sobottka-Brillout, B., Hartwig, T., Chandrasekar, V., Johannssen, H., Zeilhofer, H. U., Aguzzi, A., Heppner, F., Kerschensteiner, M., & Becher, B. (2015). Astrocyte Depletion Impairs Redox Homeostasis and Triggers Neuronal Loss in the Adult CNS. *Cell Reports*, 12(9), 1377–1384. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.051>
- Sen, M. K., Almuslehi, M. S. M., Gyengesi, E., Myers, S. J., Shortland, P. J., Mahns, D. A., & Coorsen, J. R. (2019). Suppression of the Peripheral Immune System Limits the Central Immune Response Following Cuprizone-Feeding: Relevance to Modelling Multiple Sclerosis. *Cells*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/cells8111314>
- Sidman, R. L., Kosara, B., Misra, B., & Senft, S. (n.d.). *Mouse Brain Atlas*. Retrieved June 8, 2021, from <https://www.hms.harvard.edu/research/brain/index.html>
- Simmons, S. B., Pierson, E. R., Lee, S. Y., & Goverman, J. M. (2013). Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. In *Trends in Immunology* (Vol. 34, Issue 8, pp. 410–422). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.04.006>
- Skripuletz, T., Lindner, M., Kotsiari, A., Garde, N., Fokuhl, J., Linsmeier, F., Trebst, C., & Stangel, M. (2008). Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *The American Journal of Pathology*, 172(4), 1053–1061. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070850>
- Steinman, L., & Zamvil, S. S. (2006). How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. In *Annals of Neurology* (Vol. 60, Issue 1, pp. 12–21). Ann Neurol. <https://doi.org/10.1002/ana.20913>
- Sterio, D. C. (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy*, 134(2), 127–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1984.tb02501.x>
- Stys, P. K., Zamponi, G. W., Van Minnen, J., & Geurts, J. J. G. (2012). Will the real multiple sclerosis please stand up? In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 13, Issue 7, pp. 507–514). <https://doi.org/10.1038/nrn3275>
- Suzuki, K. (1969). Giant hepatic mitochondria: Production in mice fed with cuprizone. *Science*, 163(3862), 81–82. <https://doi.org/10.1126/science.163.3862.81>
- Tansey, F. A., Zhang, H., & Cammer, W. (1996). Expression of carbonic anhydrase II mRNA and protein in oligodendrocytes during toxic demyelination in the young adult mouse. *Neurochemical Research*, 21(4), 411–416. <https://doi.org/10.1007/BF02527704>
- Taylor, L. C., Gilmore, W., & Matsushima, G. K. (2009). SJL Mice Exposed to Cuprizone Intoxication Reveal Strain and Gender Pattern Differences in Demyelination. *Brain*

- Pathology*, 19(3), 467–479. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00230.x>
- Tejedor, L. S., Wostradowski, T., Gingele, S., Skripuletz, T., Gudi, V., & Stangel, M. (2017). The Effect of Stereotactic Injections on Demyelination and Remyelination: a Study in the Cuprizone Model. *Journal of Molecular Neuroscience*, 61(4), 479–488. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0888-y>
- Thacker, E. L., Mirzaei, F., & Ascherio, A. (2006). Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: A meta-analysis. *Annals of Neurology*, 59(3), 499–503. <https://doi.org/10.1002/ana.20820>
- Thiessen, J. D., Zhang, Y., Zhang, H., Wang, L., Buist, R., Del Bigio, M. R., Kong, J., Li, X.-M., & Martin, M. (2013). Quantitative MRI and ultrastructural examination of the cuprizone mouse model of demyelination. *NMR in Biomedicine*, 26(11), 1562–1581. <https://doi.org/10.1002/nbm.2992>
- Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M. S., Fujihara, K., Galetta, S. L., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Marrie, R. A., Miller, A. E., Miller, D. H., Montalban, X., ... Cohen, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. In *The Lancet Neurology* (Vol. 17, Issue 2, pp. 162–173). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
- Thompson, A. J., Baranzini, S. E., Geurts, J., Hemmer, B., & Ciccarelli, O. (2018). Multiple sclerosis. *The Lancet*, 391(10130), 1622–1636. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30481-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30481-1)
- Torkildsen, Ø., Brunborg, L. A., Myhr, K.-M., & Bø, L. (2008). The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurologica Scandinavica*, 117(s188), 72–76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2008.01036.x>
- Trapp, B. D., Peterson, J., Ransohoff, R. M., Rudick, R., Mörk, S., & Bö, L. (1998). Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 338(5), 278–285. <https://doi.org/10.1056/nejm199801293380502>
- Tsunoda, I., & Fujinami, R. S. (2010). Neuropathogenesis of theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 5(3), 355–369. <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9179-x>
- Valeiras, B., Rosato Siri, M. V., Codagnone, M., Reinés, A., & Pasquini, J. M. (2014). Gender influence on schizophrenia-relevant abnormalities in a cuprizone demyelination model. *Glia*, 62(10), 1629–1644. <https://doi.org/10.1002/glia.22704>
- van Horssen, J., Singh, S., van der Pol, S., Kipp, M., Lim, J. L., Peferoen, L., Gerritsen, W., Kooi, E. J., Witte, M. E., Geurts, J. J. G., de Vries, H. E., Peferoen-Baert, R., van den Elsen, P. J., van der Valk, P., & Amor, S. (2012). Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation. *Journal of Neuroinflammation*, 9. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-156>
- Vega-Riquer, J. M., Mendez-Victoriano, G., Morales-Luckie, R. A., & Gonzalez-Perez, O. (2019). Five Decades of Cuprizone, an Updated Model to Replicate Demyelinating Diseases. *Current Neuropharmacology*, 17(2), 129–141. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170717120343>
- Venturini, G. (1973). Enzymic Activities and Sodium, Potassium and Copper Concentrations in Mouse Brain and Liver After Cuprizone Treatment in Vivo. *Journal of Neurochemistry*, 21(5), 1147–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1973.tb07569.x>
- Weinshenker, B. G. (1994). Natural history of multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 36(SUPPL.). <https://doi.org/10.1002/ana.410360704>
- West, M. J. (1993). New stereological methods for counting neurons. *Neurobiology of Aging*, 14(4), 275–285. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(93\)90112-O](https://doi.org/10.1016/0197-4580(93)90112-O)
- West, M. J. (2002). Design-based stereological methods for counting neurons. *Progress in*

- Brain Research*, 135, 43–51. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(02\)35006-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(02)35006-4)
- Wingerchuk, D. M., & Carter, J. L. (2014). Multiple sclerosis: current and emerging disease-modifying therapies and treatment strategies. *Mayo Clinic Proceedings*, 89(2), 225–240. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.11.002>
- Witte, M. E., Lars, B., Rodenburg, R. J., Belien, J. A., Musters, R., Hazes, T., Wintjes, L. T., Smeitink, J. A., Geurts, J. J. G., De Vries, H. E., Van Der Valk, P., & Van Horsen, J. (2009). Enhanced number and activity of mitochondria in multiple sclerosis lesions. *Journal of Pathology*, 219(2), 193–204. <https://doi.org/10.1002/path.2582>
- Wood, T. C., Simmons, C., Hurley, S. A., Vernon, A. C., Torres, J., Dell'Acqua, F., Williams, S. C. R., & Cash, D. (2016). Whole-brain ex-vivo quantitative MRI of the cuprizone mouse model. *PeerJ*, 2016(11), e2632. <https://doi.org/10.7717/peerj.2632>
- Wu, Q.-Z., Yang, Q., Cate, H. S., Kemper, D., Binder, M., Wang, H.-X., Fang, K., Quick, M. J., Marriott, M., Kilpatrick, T. J., & Egan, G. F. (2008). MRI identification of the rostral-caudal pattern of pathology within the corpus callosum in the cuprizone mouse model. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 27(3), 446–453. <https://doi.org/10.1002/jmri.21111>
- Wylezinska, M., Cifelli, A., Jezard, P., Palace, J., Alecci, M., & Matthews, P. M. (2003). Thalamic neurodegeneration in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology*, 60(12), 1949–1954. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000069464.22267.95>
- Zatta, P., Raso, M., Zambenedetti, P., Wittkowski, W., Messori, L., Piccioli, F., Mauri, P. L., & Beltramini, M. (2005). Copper and zinc dimetabolism in the mouse brain upon chronic cuprizone treatment. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(13), 1502–1513. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5073-8>
- Zhan, J., Mann, T., Joost, S., Behrangi, N., Frank, M., & Kipp, M. (2020). The Cuprizone Model: Dos and Do Nots. *Cells*, 9(4), 843. <https://doi.org/10.3390/cells9040843>
- Zivadinov, R., Reder, A. T., Filippi, M., Minagar, A., Stüve, O., Lassmann, H., Racke, M. K., Dwyer, M. G., Frohman, E. M., & Khan, O. (2008). Mechanisms of action of disease-modifying agents and brain volume changes in multiple sclerosis. In *Neurology* (Vol. 71, Issue 2, pp. 136–144). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000316810.01120.05>
- Zivadinov, R., Sepcic, J., Nasuelli, D., De Masi, R., Monti Bragadin, L., Tommasi, M. A., Zambito-Marsala, S., Moretti, R., Bratina, A., Ukmar, M., Pozzi-Mucelli, R. S., Grop, A., Cazzato, G., & Zorzon, M. (2001). A longitudinal study of brain atrophy and cognitive disturbances in the early phase of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 70(6), 773–780. <https://doi.org/10.1136/jnnp.70.6.773>
- Zivadinov, R., Weinstock-Guttman, B., Hashmi, K., Abdelrahman, N., Stosic, M., Dwyer, M., Hussein, S., Durfee, J., & Ramanathan, M. (2009). Smoking is associated with increased lesion volumes and brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology*, 73(7), 504–510. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181b2a706>
- Zivadinov, Robert, & Bakshi, R. (2004). Central nervous system atrophy and clinical status in multiple sclerosis. In *Journal of Neuroimaging* (Vol. 14, Issue SUPPL. 3). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1051228404266266>

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp für die hervorragende Betreuung dieser Dissertation. Durch seine wertvollen Anregungen, seine schnellen Rückmeldungen und die Möglichkeit, ihn jederzeit um Rat fragen zu können, habe ich mich stets bestens betreut gefühlt. Die gemeinsame Zusammenarbeit hat mich auf persönlicher sowie auf fachlicher Ebene sehr bereichert.

Mein besonderer Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. med. Christoph Schmitz für die Möglichkeit, diese Promotion an der Abteilung der Neuroanatomie des Lehrstuhls II der Ludwig-Maximilians-Universität anzufertigen.

Mein herzliches Dankeschön geht an Frau Dr. Tanja Hochstrasser für die ausgezeichnete Mitbetreuung meines gesamten Promotionsvorhabens. Ihre fachliche Kompetenz und ihr großes Engagement gepaart mit der vielen Zeit und Mühe unterstützten mich sehr.

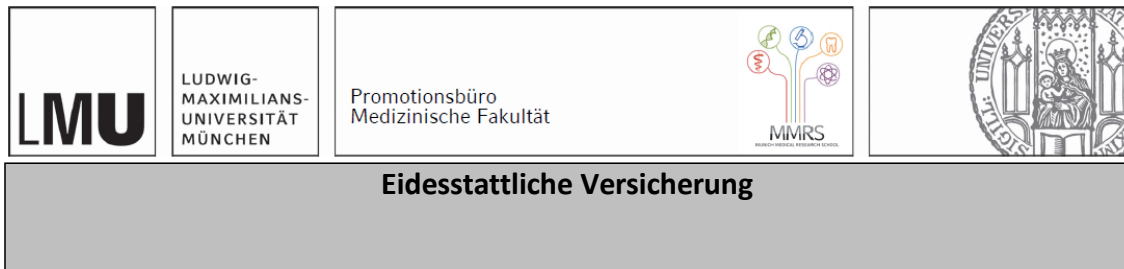
Ich möchte mich außerdem herzlich bei Astrid Baltruschat, Beate Aschauer, Sarah Wübbel und Sabine Tost für ihre stets hilfreiche technische Unterstützung und ihre große Geduld bei allen Fragen im Labor bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Wegbegleitern Selina, Carolin und Sebastian sowie allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das angenehme und humorvolle Miteinander und die gegenseitige Unterstützung und Motivation bedanken.

Mein Dank gilt darüber hinaus allen Mitarbeitern des Lehrstuhls II für die stets gute Zusammenarbeit.

Ich möchte mich besonders bei meiner Familie, meinen Angehörigen und meinen Freunden bedanken. Ihr habt mich immer motiviert, mir beigestanden, mir den nötigen Rückhalt und Zuspruch gegeben, die diese Dissertation überhaupt ermöglicht haben. Dafür möchte ich mich von Herzen bei euch bedanken.

Affidavit



Fabisch, Kai Hartmut

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Stereologische Untersuchung des Volumens spezifischer Hirnregionen nach akuter und chronischer Demyelinisierung durch Cuprizone-Intoxikation

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, 07.08.2022

Kai Hartmut Fabisch

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Publikationsliste

- Hochstrasser, T., Rühling, S., Hecher, K., Fabisch, K. H., Chrzanowski, U., Brendel, M., Eckenweber, F., Sacher, C., Schmitz, C., & Kipp, M. (2019). Stereological Investigation of Regional Brain Volumes after Acute and Chronic Cuprizone-Induced Demyelination. *Cells*, 8(9), 1024. <https://doi.org/10.3390/cells8091024>
- Fabisch, K., Roggencamp, C., Hecher, K., Rühling, S., Kipp, M., Hochstrasser, T. (2017, October 27). *The cuprizone model as a valuable tool to study progressive multiple sclerosis* [Poster session]. ECTRIMS 2017 Congress, Paris, France. <https://onlinelibrary.ectrims-congress.eu/ectrims/2017/ACTRIMS-ECTRIMS2017/200670/kai.fabisch.the.cuprizone.model.as.a.valuable.tool.to.study.progressive.html?f=listing%3D0%2Abrowseby%3D8%2Asortby%3D1%2Asearch%3Dkipp>